



Desenvolupament, caracterització i avaluació *in vitro-ex vivo* de noves formulacions tòpiques pel tractament de la leishmaniosi cutània

Alba Pujol Brugués

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I PARASITOLOGIA SANITÀRIES
DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

**DESENVOLUPAMENT, CARACTERITZACIÓ I
AVALUACIÓ *IN VITRO-EX VIVO* DE NOVES
FORMULACIONS TÒPIQUES PEL TRACTAMENT DE LA
LEISHMANIOSI CUTÀNIA**

ALBA PUJOL BRUGUÉS
2015



UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE MICROBIOLOGIA I PARASITOLOGIA SANITÀRIES
DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA

UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

DESENVOLUPAMENT, CARACTERITZACIÓ I AVALUACIÓ *IN VITRO-EX VIVO* DE NOVES FORMULACIONS TÒPIQUES PEL TRACTAMENT DE LA LEISHMANIOSI CUTÀNIA

Memòria presentada per Alba Pujol Brugués per optar al títol de doctor per la Universitat de Barcelona

Directores

Dra. Cristina Riera Lizandra Dra. Ana C. Calpena Campmany Dra. Beatriz Clares Naveros

Tutor

Dra. Josefa Badia Palacín

Doctoranda

Alba Pujol Brugués

ALBA PUJOL BRUGUÉS, 2015

***A la meva família,
pels vostres recolzaments constants.***

Us estimo...

***“Si puedes soñarlo puedes hacerlo,
recuerda que todo esto comenzó con un ratón.”***

Walt Disney.

AGRAÏMENTS

AGRAÏMENTS

Diuen que a la vida s'ha d'escriure un llibre, tenir un fill i plantar un arbre...

Doncs bé, quan era petita hi va haver un incendi a la meva terra, a l'Alt Empordà, i vaig anar a plantar alzines amb la meva família. Aquest any ha nascut una de les persones més importants de la meva vida, el meu fill Arnau. I, ara, per fi, presento aquesta tesi; un llibre molt esperat per mi.

Pensava que no arribaria mai aquest dia però ja la tenim aquí, LA TESI, i ha sigut possible, en gran part, gràcies a un conjunt de persones a qui vull donar el meu agraïment.

Ja fa temps que em vaig iniciar en el món de la investigació i la recerca i poc a poc em va anar atrapant fins a apassionar-me. D'això pràcticament en té molta culpa una de les meves directores, la Dra. Cristina Riera, que ha sigut com una mare per mi en aquest camí i jo he pogut absorbir com un "paràsit" part del seu coneixement sobre la parasitologia.

També vull agrair aquesta trajectòria a les meves altres directores. A la Dra. Anna Calpena per introduir-me en el gran món de la Biofarmàcia, pel que fa als estudis de cessió i permeació, així com contagiar-me el seu esperit positiu que desprèn i xuts d'energia que són tan necessaris en alguns moments. I a la Dra. Beatriz Clares per la seva tasca en el desenvolupament i caracterització de les formulacions i pel gran esforç final que ha fet en la redacció dels articles que, sense ella, no ho hagués aconseguit.

Al Dr. Xavier Fernandez Busquets per la seva co-direcció en la investigació de l'estudi de localització subcel·lular de liposomes així com en el desenvolupament de tot el treball realitzat en aquest darrer article, i al Dr. Joan Estelrich pels ajuts prestats en la elaboració dels liposomes.

També vull agrair aquest treball a tots els companys del departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries i als del departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica, així com a tota la gent que ha passat per aquests, amb qui hem compartit moltes alegries i algunes penes i ens hem anat donant forces mútuament per seguir endavant.

Gràcies també a la gent dels serveis de Tècniques Separatives, de la Unitat de Microscòpia Confocal i de la Plataforma de Polimorfisme i Calorimetria per la seva amabilitat i les ajudes prestades.

A la meva família, tant biològica com política per escoltar-me, ajudar-me en tot moment i pels ànims constants, encara que molts dubtaven si acabaria la tan esperada tesis... També als meus amics i amigues que no acabaven de veure clar que tirés per aquest camí.

No em voldria deixar ningú però ha passat molt de temps i pel camí he conegut a molta gent, a tots ells gràcies. I per últim, a la meva petita família, Pol i Arnau, que m'heu donat l'empenta necessària per acabar i tancar aquest llibre.

Moltes gràcies a tots vosaltres.

ÍNDEX

ÍNDEX GENERAL

CAPÍTOL 1. INTRODUCCIÓ.....	19
1.1. LEISHMANIOSI.....	3
1.1.1. Generalitats.....	3
1.1.2. La leishmaniosi en el nostre entorn.....	4
1.1.3. Agent etiològic.....	4
1.1.4. Morfologia i cicle biològic.....	5
1.1.5. Resposta immune front a <i>Leishmania</i>	7
1.1.6. Patologia i manifestacions clíniques.....	8
1.1.7. Leishmaniosi cutània: problemàtica i la seva implicació socio sanitària.....	9
1.1.8. Tractament.....	10
1.1.9. Tractament de la leishmaniosi cutània en el vell món i en el nou món.....	14
1.1.10. Nous tractaments per la leishmaniosi cutània.....	17
1.1.10.1. Nous fàrmacs.....	17
1.1.10.2. Noves formulacions.....	18
1.1.10.3. Tractament combinat.....	19
1.2. SISTEMES NANO-ESTRUCTURATS.....	20
1.2.1. Liposomes.....	20
1.2.2. Antecedents en fàrmacs anti- <i>Leishmania</i> liposomals.....	21
1.2.3. Hidrogels.....	23
1.2.3.1. Pluronic F-127.....	26
1.2.3.2. Paper de la glicoproteïna p en la resistència a fàrmacs vs poloxamers.....	27
1.3. LA PELL I SISTEMES DE TRANSPORT CUTANI.....	28
1.3.1. Anatomia de la pell.....	30
1.3.2. Fisiologia de la pell.....	34
1.3.3. Permeació cutània.....	34
1.3.3.1. Vies de penetració a través de la pell.....	34
1.3.3.2. Procés de permeació cutània.....	35

1.3.3.3. Cinètica de la permeació cutània.....	35
1.3.3.4. Factors que influeixen en el pas de les substàncies actives a través de la pell.....	42
CAPÍTOL 2. OBJECTIUS I PLA DE TREBALL	47
Objectiu i pla de treball.....	49
CAPÍTOL 3. RESULTATS.....	51
Relació de treballs científics publicats.....	53
3.1 REVIEW AND NEW THERAPEUTIC ALTERNATIVES FOR THE TREATMENT OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS	55
3.2 DEVELOPMENT OF A LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF PAROMOMYCIN. APPLICATION TO IN VITRO RELEASE AND EX VIVO PERMEATION STUDIES.....	79
3.3 DEVELOPING CUTANEOUS APPLICATIONS OF PAROMOMYCIN ENTRAPPED INTO STIMULI-SENSITIVE BLOCK COPOLYMER NANOGEL DISPERSIONS.....	89
3.4 APPLICATION OF QUANTUM DOTS TO THE STUDY OF LIPOSOME TARGETING IN LEISHMANIASIS AND MALARIA.....	143
CAPÍTOL 4. DISCUSSIÓ	145
Discussió	157
CAPÍTOL 5. CONCLUSIONS	167
Conclusions	169
CAPÍTOL 6. BIBLIOGRAFIA ADDICIONAL	175
ANNEX. ALTRE MÈRITS	189

CAPÍTOL 1

INTRODUCCIÓ

1.1. LEISHMANIOSI

1.1.1. GENERALITATS

La leishmaniosi engloba un conjunt de malalties amb una àmplia diversitat clínica i epidemiològica produïdes per diferents espècies del gènere *Leishmania*. Es considera una zoonosis en la majoria d'ocasions, i pot afectar a unes 100 espècies diferents d'animals incloent a l'home.

Segons dades de l'Organització Mundial de la Salut (OMS), actualment hi ha un total de 350 milions de persones en situació de risc, de les quals 12 milions estan afectades per la malaltia, estimant-se que hi ha entre 1.5 i 2 milions de nous casos per any (<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>).

La OMS considera que existeix una distribució de la leishmaniosi molt ampla des de Sud-Amèrica, Àfrica i Àsia, fins Europa. La leishmaniosi és endèmica en 88 països, 22 en el nou món i 66 en el vell món, sent absent a Austràlia i Oceania (Figura 1).



Figura 1. Zones del món afectades per la leishmaniosi. En verd, la forma visceral i en vermell la forma cutània i mucocutània (OMS).

El 90% dels casos de leishmaniosi cutània es localitzen a Afganistan, Pakistan, Síria, Aràbia Saudita, Algèria, Iran, Brasil i Perú. Aproximadament el 90% dels casos de leishmaniosi visceral es troben a la Índia, Bangladesh, Nepal, Sudan i Brasil (González i cols., 2008).

S'han descrit al voltant de 29 espècies de *Leishmania*, 21 de les quals han estat aïllades a l'home. Aquestes són les responsables de produir les diferents formes clíniques de la malaltia amb manifestacions molt variades.

Les espècies es diferencien segons la distribució geogràfica, Vell Món o Nou Món, i el tropisme principal que causa: viscerotròpica, dermatotròpica o mucotròpica.

Una mateixa espècie pot trobar-se a ambdues situacions geogràfiques, i alhora ser responsable de més d'un tropisme (Taula 1).

Leishmania found in humans				
Subgenus	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Old World	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> ^a <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i>		
New World	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifanoi</i> ^a <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> ^a <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. lindenbergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis</i> ^b	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
Principal tropism	Viscerotropic	Dermotropic	Dermotropic	Mucotropic

^a Species status is under discussion
^b Taxonomic position is under discussion

Taula 1. Classificació de les diferents espècies de *Leishmania* en l'home, distribució geogràfica i tropisme (OMS, 2010).

1.1.2. LA LEISHMANIOSI EN EL NOSTRE ENTORN

En els països del Mediterrani la leishmaniosi presenta un caràcter hipoendèmic. Les manifestacions clíniques que es presenten són tant la leishmaniosi cutània (LC) com la leishmaniosi visceral (LV), i són causades per *Leishmania infantum* i transmeses per flebòtoms: *Phlebotomus ariasi* i *Phlebotomus perniciosus*, sent el seu principal reservori el gos.

A Espanya, les leishmaniosi van ser malalties de declaració obligatòria des de l'any 1982 fins el 1996, i a partir de llavors són malalties de declaració regional.

El fet és que no es disposa d'una informació fiable, ni tan sols de quan la declaració era obligatòria, ja que la subdeclaració era evident, però segons les dades oficials la prevalença declarada de leishmaniosi és de 0,3 casos per cada 100.000 habitants. En totes les comunitats autònomes es presenta la malaltia, però apareix amb una major distribució a la Meseta Central i a la conca Mediterrània, sent les comunitats de València, Madrid, Catalunya i Balears les de major freqüència de casos durant el 2003 (Centro Nacional de Epidemiología, 2004).

En aquesta declaració de casos, no es diferencia entre LC o LV. Segons Alvar (2001), una estimació realista seria d'uns 200 casos de LV nous cada any i 100 de LC.

1.1.3. AGENT ETIOLÒGIC

Existeixen diferents espècies del gènere *Leishmania*. La seva situació taxonòmica és la següent (Lainson i Shaw, 1987):

- *Phylum*: Sarcomastigophora (Honigberg & Balamuth, 1963).
- *Subphylum*: Mastigophora (Diesing, 1866).
- *Classe*: Zoomastigophorea (Calkins, 1909).
- *Ordre*: Kinetoplastida (Vickerman, 1976).
- *Subordre*: Trypanosomatina (Kent, 1880).
- *Família*: Trypanosomatidae (Gobben, 1905).
- *Gènere*: *Leishmania* (Ross, 1903).

La classificació del gènere *Leishmania* es basa en diferents criteris com són el quadre clínic de la malaltia, el reservori i aspectes epidemiològics, biològics i de distribució geogràfica. L'any 1987 Lainson i Shaw van proposar una classificació que englobava aquest protozou flagel·lat en dos subgèneres en funció del lloc de reproducció dins el tracte digestiu del vector: subgènere *Leishmania*, que fa referència al desenvolupament suprapilòric i subgènere *Viannia* de multiplicació peripilòrica. Actualment s'utilitzen diversos criteris biològics, tècniques immunològiques, bioquímiques i moleculars, especialment l'electroforesi d'isoenzims, per a la seva classificació. Això ha permès establir marcadors taxonòmics precisos de les característiques intrínseques del paràsit (Alvar, 1997).

1.1.4. MORFOLOGIA I CICLE BIOLÒGIC

El cicle biològic de *Leishmania* comprèn el pas alternatiu d'un hoste vertebrat a un altre invertebrat, i viceversa, amb dos formes morfològiques principals, la intracel·lular o amastigota a les cèl·lules del sistema fagocític mononuclear de l'hoste vertebrat i la forma extracel·lular o promastigota en el tracte intestinal de l'hoste invertebrat, un dípter hematòfag que comprèn nombroses espècies del gènere *Phlebotomus* a Europa i *Lutzomya* a Amèrica (Figura 2).



Figura 2. Dípter femella del gènere *Phlebotomus*.

Les dues formes evolutives del paràsit són:

- **Amastigota**: es reproduïx dins de macròfags i cèl·lules del sistema mononuclear fagocític de l'hoste vertebrat. Té forma oval amb un flagel molt curt que no

sobresurt de la bossa flagel·lar i per tant és immòbil, i té una longitud i amplada que oscil·la entre 3-5 μm i 1,5-2,5 μm respectivament. En el seu citoplasma s'observa un nucli i un kinetonucli d'aspecte bastoniforme. (Figura 3A)

- **Promastigota:** es localitza a l'intestí mitjà de l'hoste invertebrat (vector). Presenta una forma allargada, amb un únic flagel a la regió anterior i la seva mida varia entre els 10-30 μm de llarg i els 1,5-3 μm d'ample. Té un nucli oval central i un kinetonucli bastoniforme prenuclear. (Figura 3B)

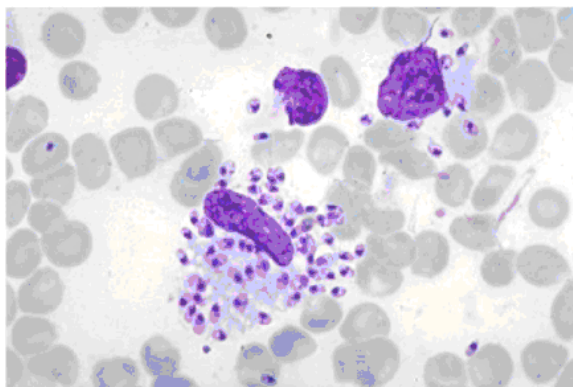


Figura 3A. Forma amastigota

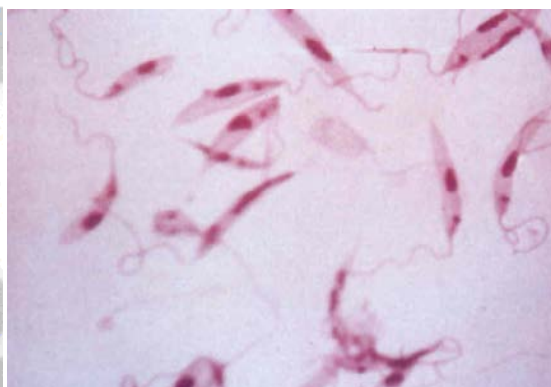


Figura 3B. Forma promastigota

El cicle biològic s'inicia quan el vector femella del flebotom (hoste invertebrat) ingereix sang de l'hoste vertebrat i inocula els promastigots infectants, també anomenats metacíclics (Figura 4, pas 3); aquests són adherits sobre els macròfags gràcies a una sèrie de molècules que *Leishmania* té a la seva superfície, les més abundants de les quals són la glicoproteïna 63 (gp63) i el lipofosfoglicà (LPG). Posteriorment els promastigots són fagocitats pels macròfags de la pell, vísceres i membranes mucoses (Fig. 4, pas 4), gràcies a la seva unió amb els receptors CR1 i CR3 del complement, el receptor manosa-fructosa i el receptor del fibrinogen. Dins el citoplasma dels macròfags, el fagosoma format es fusiona amb els lisosomes originant la vacuola parasitòfora o fagolisosòmica, on els promastigots es transformen en amastigots (Fig. 4, pas 5), procés que té lloc entre 1 a 4h més tard. La multiplicació dels amastigots és per successives divisions binàries, i finalitza quan la cèl·lula, ja amb molts paràsits, esclata. Els paràsits lliures envaeixen altres macròfags de la zona, en els quals es repeteix el procés de multiplicació, o bé es disseminen directament a través de la pell o de la circulació cutània fins arribar a les mucoses, o són arrossegats pel torrent sanguini i limfàtic, junt als macròfags circulants, per localitzar-se en òrgans rics en cèl·lules macrofàgiques fixes (medul·la òssia, fetge i melsa principalment) (Fig. 4, pas 6).

Els macròfags carregats d'amastigots poden tornar a ser ingerits pel vector durant una nova picada (Fig. 4, pas 1), són lisats i alliberen les formes amastigotes que es transformen en promastigotes en el tracte digestiu. Aquests promastigots pateixen transformacions complexes per acabar donant lloc als promastigots metacíclics que se situen a la regió bucal o trompa del vector, des d'on passaran a l'hoste vertebrat (Fig. 4, pas 2).

Aquest cicle general presenta diferents modalitats en les diferents espècies de *Leishmania*, depenent de la zona de l'intestí on es presenten i es multipliquen les formes paràsites.

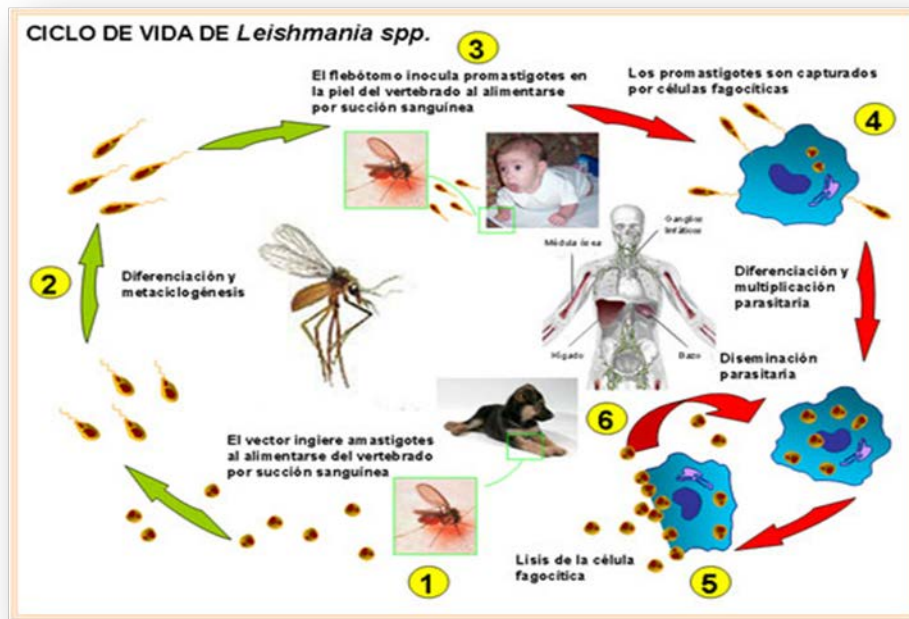


Figura 4. Cicle biològic de *Leishmania* sp (canidosfelices.wordpress.com)

1.1.5. RESPOSTA IMMUNE FRONT A LEISHMANIA

L'entrada de *Leishmania* en el sistema circulatori desencadena una resposta immune molt complexa. Segons la forma clínica de la malaltia, l'espècie de *Leishmania* implicada i la cronicitat de la malaltia, existeix un espectre de respostes immunes que inclouen tant mecanismes d'immunitat inespecífica com específica, la qual pot ser mediada per cèl·lules o anticossos.

Per una banda, l'entrada de *Leishmania* a la sang dona lloc a una resposta de tipus humoral que no és efectiva enfront el paràsit, que es protegeix com a forma amastigota dins del fagolisosoma dels macròfags. Els anticossos no són efectius contra la infecció i fins i tot poden ser perjudicials per l'hoste (Cunningham, 2002). Sembla ser que només la resposta cel·lular dirigida per les cèl·lules T helper (Th) poden tenir un paper important en la resposta immune diferenciant-se amb una sub població limfocitària de tipus Th1 o Th2 que es diferencia en el tipus de citosines que se segreguen.

En el model murí infectat experimentalment amb *L. major*, s'ha descrit que hi ha dos tipus de resposta, la resistent Th1 i la susceptible Th2. Les leishmànies destruïdes pels macròfags alliberen antigens que són expressats a la membrana del macròfag i presentats als limfòcits T CD4+ generant una resposta del tipus Th1 amb la producció de interleucina 2 (IL-2), interferó- γ (IFN- γ) i factor de necrosi tumoral (TNF- α) que activen aquest macròfag i mitjançant una sèrie de reaccions químiques generen metabòlits derivats de l'oxigen entre ells NO i enzims hidrolítics. Els ratolins susceptibles desenvolupen una resposta Th2 amb producció de IL-4, IL-

5 i IL-10 que provoquen l'activació dels limfòcits B amb la formació d'anticossos en resposta a antigens leishmanials, que són incapaçs d'eliminar el paràsit intracel·lular. En l'home, durant el procés d'infecció té lloc la producció de cèl·lules Th1 relacionades amb la protecció, mentre que la proliferació de cèl·lules Th2 està relacionada amb la malaltia. Les cèl·lules dendrítiques produeixen interleucina 12 (IL-12), que promou la diferenciació de les cèl·lules Th1 i indueix la producció de IFN- γ i de les cèl·lules *natural killer*. La interleucina 4 (IL-4) és essencial en la diferenciació de les cèl·lules Th2, fet que confereix susceptibilitat en front a la infecció per *Leishmania*.

1.1.6. PATOLOGIA I MANIFESTACIONS CLÍNiques

Les diferents formes clíniques que pot presentar aquesta malaltia tenen una estreta relació amb l'espècie de *Leishmania*, el tropisme que presenti (tal com queda reflectit a la Taula 1), la interacció entre paràsit i hoste i la resposta immunològica segons sigui de tipus Th1 o Th2. Tenint en compte aquests factors, les formes clíniques que presenta la leishmaniosi poden ser des de asimptomàtiques a simptomàtiques amb lesions a la pell (Leishmaniosi cutània o Botó d'Orient), destrucció de mucoses (Leishmaniosi muco-cutània) o infeccions amb afectació visceral (Leishmaniosi visceral o Kala-azar) (Figura 5).



Figura 5. Leishmaniosi cutània (Sánchez i cols., 2012) (A); Leishmaniosi muco-cutània (B); Leishmaniosi visceral (Murray i cols., 2005) (C)

- **Leishmaniosi cutània o Botó de l'Orient**

Respecte a la patologia i clínica de LC, després que el vector pica a l'hoste apareix a la zona de la picada una pàpula inespecífica que, o bé es resol de forma espontània o donarà lloc a la lesió característica de la leishmaniosi cutània, l'anomenat Botó de l'Orient. El període d'incubació és molt variable que oscil·la entre quinze dies a dos mesos. Generalment es tracta d'una lesió única localitzant-se en àrees descobertes com cara, braços i cames. La lesió inicial apareix com una pàpula eritematosa amb un tamany variable, generalment entre 2-3 cm, amb vora endurida i pruriginosa. Després de diversos dies, aquesta lesió inicial s'ulcera espontàniament i es recobreix d'un líquid groguenc i adherent, que posteriorment donarà lloc a la crosta. La úlcera característica és arrodonida, asimptomàtica i amb vores ben definides (Figura 5A). Amb el pas del temps, la lesió s'estabilitza fins que es cura espontàniament després de varis mesos, deixant una cicatriu i

conferint immunitat permanent en la majoria dels casos. Ocasionalment, pot complicar-se amb una sobreinfecció bacteriana o adenopaties regionals. (Figura 6)



Figura 6. Lesions pròpies de la leishmaniosi cutània per *L. infantum* (Imatges cedides pel Dr. Rocamora de l'Hospital de Manacor)

- **Leishmaniosi muco-cutània**

Aquesta forma clínica es dona solament en algunes espècies del Nou Món. Com s'ha citat anteriorment, la lesió primària apareix en extremitats en forma d'una ulceració que finalitza amb una cicatriu. En aproximadament un 15% dels casos no tractats, apareix després d'alguns anys d'evolució una fase tardana que afecta els cartílags nasals i paladar produint lesions destructives cròniques de difícil tractament. Aquestes lesions mucoses són conseqüència de la disseminació limfàtica o hematògena. A l'inici només s'aprecia una discreta secreció de moc, posteriorment es produeix la inflamació de la mucosa i la lesió es profunditza fins produir una pericondritis. Quan les lesions estan més avançades, es presenta exsudació i ulceració de la mucosa fins a comprometre el cartílag i finalment es perfora l'envà. (Figura 5B). Les lesions del paladar són més freqüentment proliferatives que destructives. Quan afecta a la gola la veu és ronca i hi ha dificultats per deglutir aliments.

- **Leishmaniosi visceral o Kala azar**

La leishmaniosi visceral o Kala azar és la forma més greu de leishmaniosi. Clínicament es caracteritza per l'aparició de febre, vòmits, sudoració, diarrea, pèrdua de pes i anèmia acompanyada de pancitopènia. Afecta a la melsa, fetge (hepatoesplenomegàlia) i medulla òssia. En els casos més avançats es produeixen trastorns de la coagulació i coloració de la pell. Si no es tracte pot conduir a la mort. (Figura 5C)

1.1.7. LEISHMANIOSI CUTÀNIA: PROBLEMÀTICA I LA SEVA IMPLICACIÓ SOCIOSANITÀRIA

La LC és una malaltia que no és mortal, algunes formes poden cicatritzar espontàniament amb el temps ("auto-curació"), però altres cronifiquen deixant importants cicatrius, produint desfiguracions i mutilacions a la cara que estigmatitzen i són una barrera pel casament en

molts dels països endèmics, especialment per les dones. Tots aquest fets porten a conseqüències socials i econòmiques de forma que la LC contribueix a incrementar la pobresa (Modabber i cols., 2007).

Una altre punt important a no oblidar des del punt de vista sanitari i epidemiològic, és que els pacients amb lesions actuen de reservoris de la infecció i per tant sinó es tracten s'incrementa la possibilitat de la transmissió. Degut a l'elevat cost del seu tractament en molts casos aquest no arriba a la població pobre (Modabber i cols., 2007).

Segons la OMS, el problema bàsic es refereix a l'accés al tractament, perquè el cost d'hospitalització s'afegeix al del medicament i resulta no assumible pels països en vies de desenvolupament. Per aquesta raó i tenint en compte que la leishmaniosi està inclosa dins del grup de les Malalties oblidades (Neglected Diseases), el grup Drugs For Neglected Disease Initiative (DNDi) assenyala la urgència de tenir fàrmacs eficaços de tractament curt, econòmic, que siguin d'administració no complicada (com seria l'administració tòpica) i que no requereixin de infraestructures sanitàries complexes.

Els tractaments de primera línia en la LC es basen en l'administració de fàrmacs antimonials pentavalents, que poden ser administrats de forma intramuscular o intravenós o mitjançant la injecció intralesional segons la importància de la lesió i la espècie responsable. Aquests composts tenen una elevada toxicitat, la qual cosa és necessària la hospitalització dels pacients i resulta molt costós en els països en vies de desenvolupament. Per l'altra banda, als medicaments amb pocs efectes tòxics que s'administren en casos de leishmaniosi mucocutània i cutània difusa com ara l'amfotericina B liposomal (Ambisome®), suposen un elevat cost i a la vegada són poc assequibles en països amb elevat índex de pobresa.

1.1.8. TRACTAMENT

Actualment existeixen diverses teràpies en el tractament de la leishmaniosi. Els compostos més utilitzats són els antimonials pentavalents considerats els fàrmacs de primera elecció pel tractament i control de la leishmaniosi. També tenim l'amfotericina B liposomal, la pentamidina, la paramomicina, medicaments derivats dels imidazols, immunomoduladors i un fàrmac d'administració oral, la miltefosina. (WHO, 2010).

Compostos antimonials pentavalents

Els compostos derivats de l'antimoni pentavalent (Sb^V) s'han utilitzat des dels anys quaranta com els principals agents terapèutics de primera línia pel tractament de la leishmaniosi.

Aquest grup està format per dos compostos, l'Estibogluconat de sodi (EGS) (Pentostam®) (Fig. 7A) i l'Antimoniat de meglumina (AMG) (Glucantime®) (Fig. 7B), aquests contenen com a grup actiu el Sb^V però a diferents dilucions en cada una de les molècules. L'AMG té una concentració aproximada de 85 mg de Sb^V /ml i el EGS de 100 mg de Sb^V /ml.

Aquests compostos no es poden administrar per via oral, la dosi recomanada per la OMS és de 20 mg/kg/dia de EGS per via intramuscular o intravenosa durant 20 dies o 60 mg/kg/dia de AMG. Els problemes que presenten són el seu cost, toxicitat i l'aparició de resistències. També s'administra intralesionalment a la dosi de 0,5-5 ml d'antimonials pentavalents injectats a la base de la lesió.

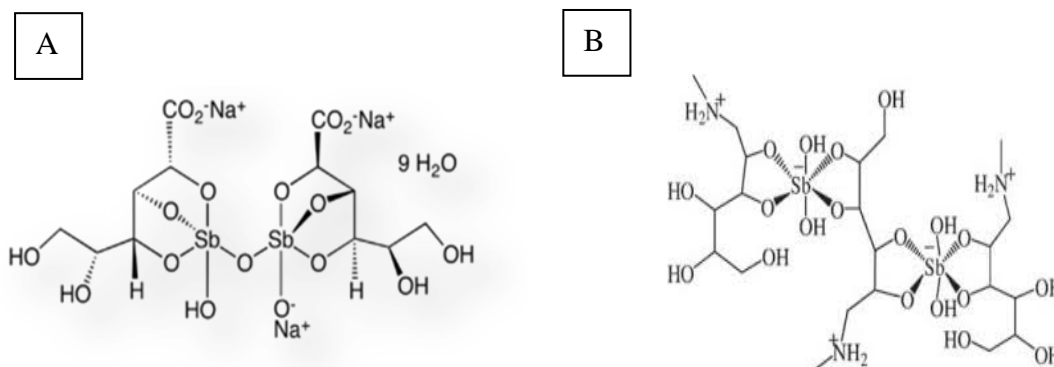


Figura 7. (A) Estibogluconat sòdic (Pentostam®); (B) Antimoniat de meglumina (Glucantime®) (Richard i cols., 2010)

Mecanisme d'acció:

Els antimonials pentavalents inoculats en el pacient han de convertir-se en trivalents a l'interior del macròfag per a poder exercir la seva acció. Aquests antimonials trivalents reaccionen amb els grups sulfhídrics del paràsit, donant com a resultat la inhibició de la seva glicòlisi i l'oxidació d'àcids grassos, reduint així la síntesi d'ATP.

Reaccions adverses:

Els derivats orgànics del Sb^{V} són els preparats menys tòxics en el tractament de la leishmaniosi. Els derivats del Sb^{III} són 10 vegades més tòxics que els Sb^{V} . El fet que el Sb^{V} sigui eliminat molt més ràpidament de l'organisme que el Sb^{III} explica la seva menor toxicitat. La reducció que sofreix el Sb^{V} a nivell hepàtic explicaria els efectes indesitjables: nàusees, vòmits, debilitat i miàlgia, dolor abdominal, diarrea, erupcions cutànies, alteracions respiratòries com tos i dispnea, cardiotoxicitat, lesions hepàtiques, discràsies sanguínies, nefrotoxicitat i alteracions reproductives i cromosòmiques.

Amfotericina B: És un antibiòtic antifúngic poliènic d'ampli espectre derivat de *Streptomyces nodosus*. Té una gran activitat leishmanicida en unir-se als lípids del paràsit, els quals representen un 15% del seu pes, en concret als lípids neutres com certs esterols de membrana (ergosterol), provocant alteracions en la permeabilitat amb pèrdua de potassi, aminoàcids i purines. És el medicament de segona elecció. Però aquest fàrmac també produeix danys a les cèl·lules dels mamífers, degut a que aquestes cèl·lules també contenen esterols. (Figura 8)

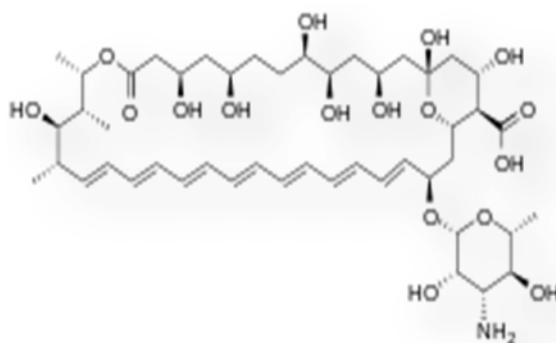


Figura 8. Amfotericina B (Richard i cols., 2010)

Pentamidina: És una diamina aromàtica considerada com a teràpia de segona línia. Inhibeixen la síntesi de proteïnes i de fosfolípids, produint un dany irreversible a la mitocondria. A més produeix importants efectes tòxics (dany en el pàncrees, ronyó i medul·la òssia). (Figura 9)

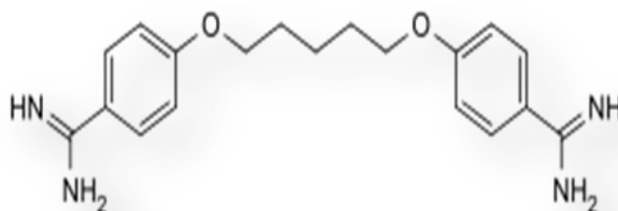


Figura 9: Pentamidina (Richard i cols., 2010)

Paramomicina: És un antibiòtic aminoglicòsid amb acció sobre la *Leishmania* (Neal, 1968) (Figura 10). Actua sobre el ribosoma bloquejant la síntesi proteica del paràsit. Els principals efectes adversos que produeix són nefrotoxicitat i ototoxicitat. En pacients amb leishmaniosi visceral s'ha observat que te efectes sinèrgics amb els antimonials (Seaman i cols., 1993), per tant se solen utilitzar associats o bé com a teràpia aïllada de segona elecció en les formes visceral.

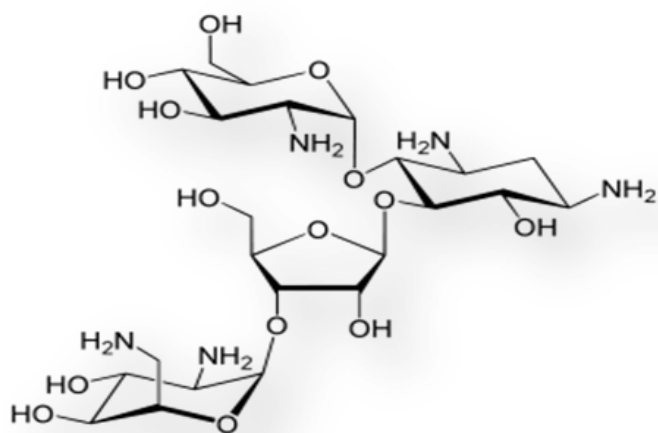


Figura 10. Paramomicina (Richard i cols., 2010)

Medicaments derivats dels imidazols:

- **Alopurinol:** És una pirazolopirimidina, un anàleg estructural de la hipoxantina que competeix en la reacció catalitzada per la xantina oxidasa evitant la síntesi normal de xantina. *Leishmania*, així com molts altres protozous, no és capaç de sintetitzar *de novo* les bases púriques per la formació dels àcids nucleics i les han d'obtenir dels seus hostes. Al incorporar com a base púrica la xantina obtinguda a partir de l'allopurinol, es produeix una modificació de l'ARN del paràsit que impedeix la síntesi proteica i, per tant, bloqueja el creixement del protozou (Davidson, 1998). (Figura 11)

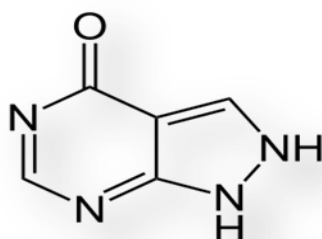


Figura 11. Allopurinol

- **Ketoconazol:** Antifúngic que inhibeix la síntesi de ergosterol de la membrana del paràsit. Presenta baixa toxicitat i es pot administrar per via oral. S'ha demostrat la seva eficàcia en el tractament de la leishmaniosi cutània (Berman, 1997). (Figura 12)

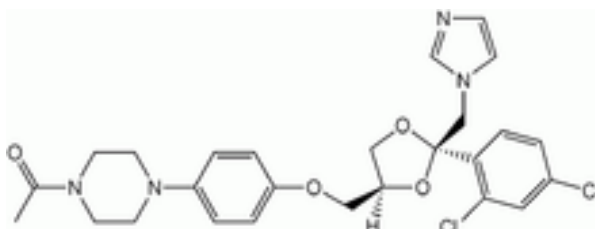


Figura 12. Ketoconazol

- **Itraconazol:** És un altre antifúngic amb un similar efecte al ketoconazol (Davidson, 1998). Únicament presenta avantatges en una millora farmacocinètica. (Figura 13)

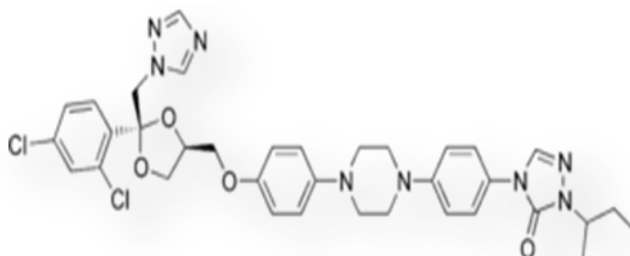


Figura 13. Itraconazol

Miltefosina (Milteforan®): (Hexadecilfosfocolina), és un derivat fosfolipídic relacionat estructuralment amb els fosfolípids que componen la membrana de les cèl·lules. Originalment es va desenvolupar com a medicament antineoplàsic, però es va descobrir que posseïa activitat antiprotozoària (Lux i cols., 2000). Representa el primer agent oral eficaç contra la leishmaniosi que només s'ha d'administrar una vegada al dia. Té un mecanisme d'acció diferent als altres, interromp les vies de senyalització cel·lular i la síntesi de la membrana cel·lular del paràsit mitjançant diferents mecanismes.

El problema és que ja han aparegut moltes resistències (Perez-Victoria i cols., 2001 i 2011, Seifert i cols., 2003; Choudhury i cols., 2008). (Figura 14)

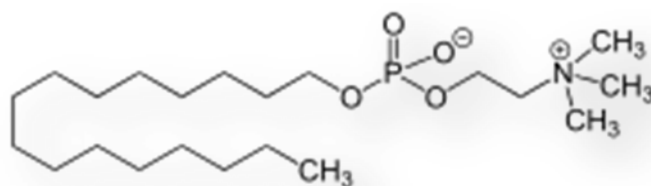


Figura 14. Miltefosina

1.1.9. TRACTAMENT DE LA LC EN EL VELL MÓN I EN EL NOU MÓN

L'elecció del tractament es basa sobretot en la relació benefici-risc de cada pacient.

En el cas de la LC en molts casos es combinen tractaments tòpics, sistèmics i no farmacològics. La decisió terapèutica depèn de l'espècie infectant i de la regió geogràfica. La OMS ha establert unes directrius on s'estableixen les noves recomenacions terapèutiques pel tractament de la LC segons formes clíniques i les espècies implicades en la malaltia (WHO, 2010).

• LEISHMANIOSI CUTÀNIA EN EL VELL MÓN

La leishmaniosi cutània del Vell Món és causada per cinc espècies de *Leishmania*: *L. infantum*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* i *L. donovani* post kala-azar (LC). Principalment són espècies del litoral mediterrani, l'Orient mitjà i Àfrica.

Les lesions cutànies causades per la *L. infantum* es veuen al llarg de la seva distribució, sobretot en la conca del mediterrani. La *L. infantum* és la causa més freqüent de leishmaniosi cutània al sud d'Europa. Les lesions causades són generalment nòduls individuals, amb poca inflamació però desencadenant úlceres. Aquestes lesions es curen espontàniament al cap d'un any conferint, així, immunitat (WHO, 2010).

Per altra banda, *L. tropica* causa una LC anomenada antroponòtica o leishmaniosi cutània antroponòtica urbana i es troba distribuïda principalment al Marroc, Àrabia Saudí i en els països de l'oest d'Àsia. Aquesta leishmaniosi es caracteritza per la presència de múltiples úlceres seques i indolores a la pell. Generalment, aquestes úlceres es curen espontàniament al cap d'un any, o a vegades es desenvolupen a cicatrius deformants.¹ (Figura 15A)

La leishmaniosi cutània causada per *L. major* (anteriorment coneguda com zoonòtica o leishmaniosi cutània zoonòtica rural), és una zoonosis pròpia de zones rurals i periurbanes del nord d'Àfrica, oest d'Àsia i Àsia menor. Es caracteritza al igual que altres formes de leishmaniosi cutània, per lesions sense dolor i a vegades per una severa inflamació i ulceració. Aquestes lesions es curen al cap de 2-8 mesos. Amb freqüència, aquestes lesions són múltiples, sobretot en immigrants no immunes, les quals són lentes de curar i pot deixar grans cicatrius.¹ (Fig. 15B)

Finalment la leishmaniosi cutània causada per *L. aethiopica* (Etiòpia, Kènia i Sudan) dona lloc principalment a lesions nodulars cutànies localitzades. Amb menor freqüència, es complica el pronòstic derivant a lesions mucocutànies de la orofaringe causant una distorsió de les narius del nas i els llavis. La majoria de les lesions es desenvolupen lentament i es poden estendre localment. La ulceració és tardana o absent. La curació espontània té lloc generalment al cap de 2-5 anys.

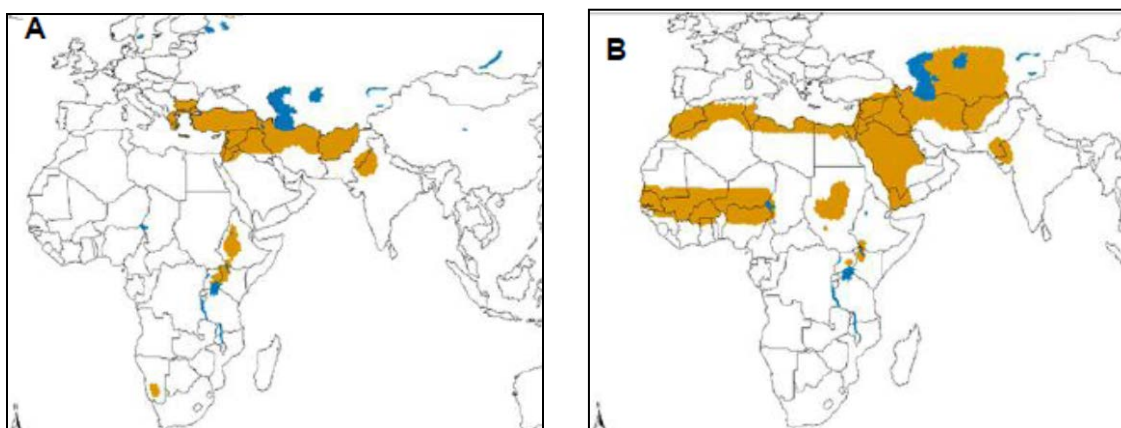


Figura 15. Distribució geogràfica de la LC en el Vell Món per *L.tropica* (A); LC en el Vell Món per *L.major* (B) (OMS 2010)

Criteris per establir el tractament tòpic:

Segons indicacions de la OMS per *Leishmania* del Vell món, el tractament local de la lesió no sempre és possible i està indicat per aquells pacients que compleixen els següents requisits:

- Infecció confirmada o gran sospita d'infecció amb *L.major*.
- Menys de quatre lesions que requereixin tractament immediat.
- Lesions amb un diàmetre inferior a 5 cm.
- Lesions no potencialment deformants (cara, articulacions, peus, dits)
- No immunosupressió.
- Possibilitat de seguiment.

Les opcions de tractament tòpic són: (WHO 2010).

- **Teràpia intralesional amb antimonials pentavalents:** s'injecta una dosi de 1 a 5 ml en la base i marges de la lesió per sessió entre 3 i 7 dies. Es poden realitzar

pautes diàries o dies alterns o setmanals fins a la curació de la lesió. Aquestes infiltracions són efectives però l'administració repetitiva pot donar lloc a resistències.

- **Ungüents de paramomicina:** poden ser una formulació de 15% de paramomicina i 12% de clorur de metilbencetonio (CLMB) o bé una formulació de 0,5 % de gentamicina i 15 % de paramomicina en base de parafina , dues vegades al dia durant un màxim de 20 dies.
- **Termoteràpia:** consisteix en una o dos aplicacions de calor localitzat a 50° per cada 30 s. Un dels inconvenients d'aquesta teràpia és l'elevat cost del dispositiu i també de les cremades de segon grau que es produeixen. Per aquest motiu és necessària l'anestèsia local.
- **Crioteràpia:** la crioteràpia amb nitrogen líquid (-195°) aplicada una vegada o dos per semana fins a 6 setmanes. L'aplicació de nitrogen líquid requereix de dispositius específics d'elevat cost i un equip mèdic especialitzat. Tot i que té una efectivitat elevada és menys efectiva que la teràpia intralesional amb antimoni pentavalent.

El tractament local és una opció atractiva, amb poca toxicitat, però el tractament intralesional i, en molt menor grau la termoteràpia, causa malestar significatiu.

• LEISHMANIOSI CUTÀNIA EN EL NOU MÓN.

La leishmaniosi cutània del Nou Món fa referència a la infecció produïda per espècies de Mèxic, Amèrica Central i Sud-Amèrica. Aquestes espècies pertanyen tant del subgènere *Leishmania* com *Vianna*, i són: *L.(L.) mexicana*, *L.(L.) amazonensis* *L.(V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* i *L. (V.) peruviana* (Alvar, J. 1997). Les manifestacions clíniques són similars a la leishmaniosi cutània del Vell Món però solen ser més agressives i tendeixen a crònificar-se. Les lesions causades per *L. mexicana* generalment tenen una evolució benigna, mentre que la *L. amazonensis* causa una lesió única o múltiple, resistent a la curació i amb alta tendència a evolucionar a la forma difusa. Per l'altra banda, les espècies del subgènere *Vianna* tendeixen a formar lesions mucocutànies. Normalment, produeixen una lesió única o múltiples que es resolt de forma habitual com és el cas de *L. braziliensis* o presenten un baix índex de curació (*L. panamensis*, *L. guyanensis*) . Si la lesió es situa en la proximitat d'una cadena limfàtica o és tractada de manera inadequada pot evolucionar a la forma mucocutània. Finalment, *L. peruviana*, és l'espècie més benigna ja que la curació es espontània i no hi ha tendència a causar forma mucocutània.

La teràpia local es considera inadequada per al tractament de LC en el Nou Món causada per *L. braziliensis* o *L. panamensis*, a causa del risc potencial de disseminació cap a mucoses. Actualment, es considera acceptable l'ús del tractament tòpic en casos específics de LC en el Nou Món. L'experiència amb la teràpia local per la LC al Nou Món és limitada. Els criteris per a

l'ús del tractament local són similars als del Vell Món. Les opcions proposades són la termoteràpia i la paramomicina. D'una a tres aplicacions de calor localitzat (50° durant 30 segons) produeixen un 70% d'efectivitat en estudis fets a Colòmbia i Guatemala, tres mesos després del tractament. Per l'altra banda, la pomada de paramomicina al 15% i 12% de CLMB dues vegades al dia durant 20 dies, va ser del 70-90% d'efectivitat contra la leishmaniosi cutània causada per *L. mexicana*, *L. panamensis* i *L. brazilensis* a Equador i Guatemala.

Les opcions de tractament sistèmic són: (WHO 2010).

- **Antimonials pentavalents:** La taxa de curació és molt elevada al voltant del 77% i 90 %, quan els antimonials pentavalents s'administren a una dosi de 20mg/kg/dia durant 20 dies per via endovenosa o intramuscular. L'eficàcia va ser molt gran contra la LC causada per *L. brazilensis* i *L. panamensis*.
- **Pentamidina:** La pentamidina a una dosi de 3-4 mg/kg en dies alterns, per un total de tres o quatre dosis per via intramuscular, és tant eficaç com els derivats de l'antimoni per curar la LC causada per *L. panamensis* o *L. guayanensis*. Però, per l'altra banda, és menys eficaç que els antimonials en el cas de la *L. brazilensis*.
- **Miltefosina:** la miltefosina oral a una dosi de 2mg/kg/dia durant 28 dies és eficaç contra LC causada per *L. panamensis* però no contra la *L. brazilensis* o *L. mexicana*, on la taxa de curació es inferior al 60%. La resposta de la miltefosina a LC per *L. brazilensis*, pot variar depenent de la zona.
- **Ketoconazol:** el ketoconazol a 600 mg al dia durant 28 dies té una eficàcia elevada (76-90%) en les espècies de *L. panamensis* i *L. mexicana* a Guatemala i Panamà.

En el cas de la LC recidivant no hi ha recomenacions fermes per al tractament. S'utilitza antimonials pentavalents a una dosi estàndard, però si no hi ha resposta, generalment es combina els compostos antimonials amb l'alogurinol en una dosi de 20 mg/kg durant 30 dies. Finalment, per la LC difusa causada per *L. aethiopica* i *L. amazonensis* i que es caracteritza per recaigudes freqüents, el tractament amb una combinació de antimonials pentavalents i paramomicina parenteral durant 60 dies van tenir èxit en tres pacients. La pentamidina a una dosi de 3-4 mg/kg un cop a la semana durant màxim 4 mesos, és una altra opció.

1.1.10. NOUS TRACTAMENTS PER LA LEISHMANIOSI CUTÀNIA

1.1.10.1 NOUS FÀRMACS

Molts dels fàrmacs esmentats a l'apartat anterior han creat resistències a moltes espècies de *Leishmania* i com a conseqüència s'ha vist disminuïda la seva eficàcia en poblacions on prèviament eren susceptibles a aquests. Per aquest motiu, molts grups de recerca s'han centrat en investigar noves alternatives terapèutiques contra la leishmaniosi.

Entre molts altres estudis, en són un exemple Arévalo i cols., els quals van evaluar l'activitat de diferents olis essencials de plantes de Colòmbia sobre *Leishmania braziliensis* (Arévalo i cols., 2009).

Altres autors han descobert que derivats sintètics de l'àcid ascòrbic també tenen activitat antileishmanicida per interacció mimètica amb la membrana de *Leishmania* (Kharrat i cols., 2014). Eduardo H. S. Ramos i cols., (2014) també van trobar activitat leishmanicida dels olis essencials de *Mangifera indica* var. Rosa i Espasa contra promastigots de *L. amazonensis*.

Per altra banda, la importància de compostos metàl·lics i de la bioinorgànica en el desenvolupament antiparasitari és històrica, la qual cosa està comprovat per l'existència d'amples treballs científics. Per exemple, s'han fet estudis *in vitro* i *in vivo* sobre les espècies *L. major* i *L. tropica* causants de LC que han mostrat més susceptibilitat al zinc que a l'antimoni pentavalent (Minodiera i cols., 2007).

Finalment, en un estudi recent, es va comprovar l'eficàcia anti-*Leishmania* d'un fàrmac anomenat buparvacuona, una hidroxinaftoquinona utilitzada per al tractament de theileriosis en el bestiar. Concretament es van realitzar diferents formulacions tòpiques de buparvacuona i es va assajar la seva eficàcia i toxicitat *in vivo* en ratolins BALB/c contra *L. major*. Els resultats d'aquest estudi van ser esperançadors ja que es va reduir la càrrega parasitària i la mida de la lesió i per tant, la introducció d'una formulació tòpica d'aquest tipus, seria un avanç significatiu per el tractament de lesions cutànies simples (Garnier i cols., 2007).

La recerca de nous fàrmacs amb activitat anti-*Leishmania* és un punt molt important en la investigació de nous tractaments per la LC. L'evitació dels derivats de l'antimoni parenterals augmentaria enormement el compliment del pacient i reduiria els costos de tractament.

1.1.10.2 NOVES FORMULACIONS

Com s'ha dit anteriorment, l'alternativa en el tractament tòpic més utilitzat en l'actualitat és la teràpia intralesional amb antimoni pentavalent. Però aquesta requereix múltiples injeccions, les quals són doloroses i no tolerades per la majoria dels pacients. A més, no sempre són eficaces ja que poden causar una gran quantitat d'efectes adversos i crear resistències. Com alternativa s'estan investigant diferents teràpies tòpiques utilitzant principalment la paramomicina. És el cas de la formulació WR279,396, una formulació hidrofílica de paramomicina al 15% i gentamicina al 0,5%, la qual està a la fase III d'assaig clínic a Túnisia (Salah i cols., 2013).

Altres grups han estudiat la permeació de la pell i l'activitat antileishmanicida *in vivo* en ratolins experimentalment infectats per *L. major*, utilitzant un gel hidrofílic al 10% de paramomicina comparant la seva activitat amb antimoni pentavalent parenteral. Es va comprovar que el gel va donar una efectivitat més elevada que l'antimoni pentavalent administrat per via parenteral. La mateixa formulació va ser assajada sobre hámster infectats per *L. braziliensis*, i es va concloure que l'eficàcia era la mateixa que l'administració parenteral amb l'antimoni (Gonçalves i cols., 2005).

Per altra banda, es va estudiar una nova formulació d'aplicació tòpica amb amfotericina B i es va avaluar la seva eficàcia leishmanicida en ratolins CBA. Per primera vegada, es va demostrar que l'amfotericina B administrada tòpicament en forma de complex amb fosfolípids i en presència d'etanol, pot penetrar la pell i actuar de forma localitzada utilitzant concentracions de fàrmac molt baixes i per tant, ser menys tòxic (Frankenburg i cols., 1998).

1.1.10.3 TRACTAMENT COMBINAT

El tractament combinat aporta diferents avantatges: redueix la duració del tractament, augmenta el compliment terapèutic, permet reduir la dosi de cada fàrmac, la qual cosa ajuda a reduir els efectes secundaris i el cost del medicament. D'aquesta manera, també es redueix la possibilitat d'aparició de resistències. Diferents autors estan investigant diferents teràpies combinades donant resultats favorables. L'eficàcia de la combinació d'un gel de paromomicina i la miltefosina oral en ratolins BALB/c infectats per *L. major* va resultar molt eficaç, reduint significativament el tamany de la lesió, la carga de paràsits en pell i amb la curació completa de les úlceres, en comparació amb la miltefosina oral sola (Aguar i cols., 2009).

Altres fàrmacs com l'alopurinol i l'azitromicina, van ser objecte d'estudi en la recerca de noves teràpies combinades per la LC. En aquest cas, es va comparar l'eficàcia i la tolerància de l'azitromicina més alopurinol amb Glucantime[®] intramuscular, la qual cosa es va demostrar que eren molt similars. Un dels avantatges de l'alopurinol i l'azitromicina és que són menys costosos que el Glucantime[®] i més disponibles en els països subdesenvolupats. A més a més, s'administren per via oral, i per tant, es pot considerar una opció alternativa al tractament amb Glucantime[®] en pacients que no el toleren (Dastgheib i cols., 2012).

Un altre estudi va evaluar l'eficàcia de la combinació amb pentoxifilina i Glucantime[®]. La pentoxifilina és un inhibidor de TNF- α que ha demostrat potenciar els efectes beneficiosos dels compostos antimonials. Els resultats d'aquest estudi van indicar que el Glucantime[®] amb la pentoxifilina és més eficaç que el Glucantime[®] sol. Malgrat això, són necessaris més assajos amb diferents poblacions de pacients amb LC per demostrar si Glucantime[®] i pentoxifilina funciona bé i coneixer les pautes de tractament específiques (Sadeghian i cols., 2006).

Els resultats d'un estudi on s'evaluava l'eficàcia de la combinació d'estibogluconat sòdic intralesional amb ketoconazol oral pel tractament de la LC localitzada, van ser prometedors. A més a més, aquesta combinació és més fàcil d'utilitzar, menys agressiva i lliure d'efectes secundaris importants en comparació amb la teràpia intralesional sola amb compostos antimonials pentavalents (El-Sayed i cols., 2010).

Un compost anomenat imiquimod, inhibidor del factor de necrosis tumoral TNF- α , és útil en pacients amb psoriasis moderada o greu i altres malalties dermatològiques com és el cas de les verrugues del coll uterí. Aquest fàrmac ha demostrat ser un immunomodulador que activa els macròfags que alliberen óxid nítric matant així els amastigots intracel·lulars de *Leishmania* que aquests contenen. Es va realitzar un estudi que avaluava el tractament combinat de imiquimod amb antimoniat de meglumina en pacients amb LC que prèviament no havien respòs

al tractament amb l'antimoni de meglumina. Els resultats van ser molt bons, ja que tots els pacients van respondre bé a aquesta teràpia combinada (Arevalo i cols., 2001).

1.2. SISTEMES NANO-ESTRUCTURATS

En les últimes dècades la ciència ha viscut la revolució "nano", representada per dos noves disciplines denominades nanociència i nanotecnologia, àrees emergents de la ciència que s'ocupen de l'estudi de materials de dimensions molt petites que engloben des de l'escala de la micra fins a la nanomètrica i que s'apliquen en una varietat de sectors industrials tals com comunicacions, energia, informàtica, medicosanitari, etc. (Lasic, 1998; Cebada, 2002).

En medicina i ciències de la salut en particular, el desenvolupament de sistemes per a la teràpia i el diagnòstic, l'alliberació de fàrmacs o l'enginyeria de teixits, biosensors, ha sigut objecte de gran interès i les investigacions en aquest camp han crescut enormement en els últims anys.

En el tractament d'un procés fisiopatològic, es pretén que l'administració de medicaments es realitzi de tal forma que el fàrmac arribi al seu lloc d'actuació (biofase), a una determinada concentració, dins un marge de dosis terapèutiques efectives i que aquesta romangui constant durant el temps necessari perquè alteri l'esmentat procés fisiopatològic. Aquesta administració moltes vegades es veu limitada per resistències al fàrmac, captura del medicament per altres cèl·lules de l'organisme, incapacitat del fàrmac per penetrar dins les cèl·lules diana, o per la manca d'un tropisme específic, distribuint-se així per tot l'organisme. En conseqüència, per obtenir una concentració suficient a nivell de les cèl·lules diana, és necessari administrar dosis relativament elevades que poden conduir a efectes toxicològics.

La solució a aquests problemes podria estar en l'associació química de les substàncies actives a un transportador apropiat, dotat d'un poder de reconeixement per a un determinat tipus de cèl·lules (citotropisme) i capaç de conferir al fàrmac especificitat d'acció, alliberant selectivament el principi actiu a l'òrgan o cèl·lules diana sense produir alteracions a teixits sans.

Un exemple són els biotransportadors per a l'alliberació controlada de fàrmacs, que per optimitzar la seva biocompatibilitat quan entren en contacte amb teixits cel·lulars, part de la seva composició ha de tenir algun dels components cel·lulars, és el cas dels fosfolípids que formen part dels liposomes, que han sigut utilitzats per a l'alliberació de vacunes, enzims i vitamines en el cos humà (Yatvin M. B. 1980; Lasic D. 1993).

1.2.1. LIPOSOMES

Els liposomes es van descobrir l'any 1961 per Bangham i col·laboradors (Bangham i cols., 1961), els quals van observar que alguns lípids formaven estructures membranoses quan estan en dissolució aquosa. Són estructures nanomètriques consistents en una o varies esferes concèntriques de bicapes fosfolipídiques que engloben compartiments aquosos. A les bicapes, els fosfolípids es distribueixen orientats amb les cadenes hidròfobes situades paral·lelament

entre sí i enfrontades a les cadenes hidròfobes de l'altra capa, aïllant així zones hidròfobes alternant-se concèntricament amb compartiments interns que poden contenir aigua o solucions aquoses d'un principi actiu, mentre que les substàncies lipòfiles se situen entre els fosfolípids de la paret (Figura 16).

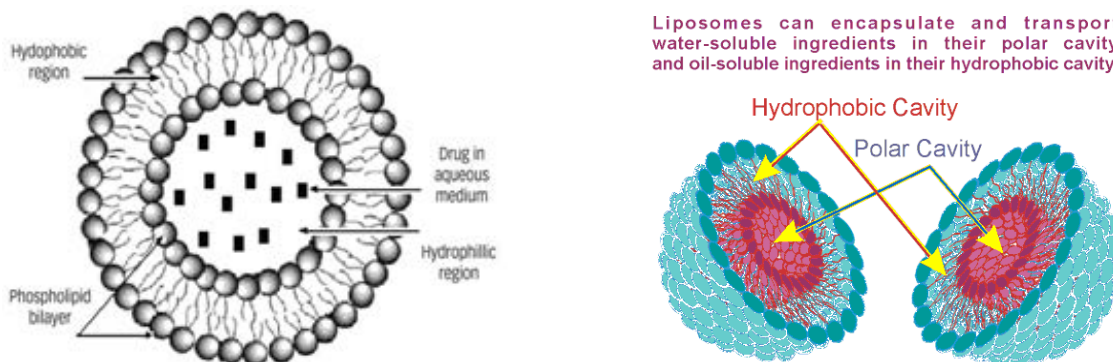


Figura 16. Esquemes de la distribució de les substàncies hidròfiliques i hidròfòbiques en les diferents regions de la bicapa d'un liposoma (Priyabrata i cols., 2009; http://www.aradigm.com/technologies_lipo.html)

Aquests vectors poden ser de forma, estructura, composició i mides diferents, donant lloc així a diferents classificacions dels liposomes, encara que les seves dimensions solen oscil·lar entre els 10 nm i els 10 µm. La seva arquitectura molecular els permet captar una gran varietat d'agents actius proporcionant així una via de transport que porti el fàrmac al seu lloc d'actuació, a concentracions adequades, amb l'objectiu d'obtenir una resposta farmacològica de forma efectiva i segura, tenint en compte el caràcter biodegradable, atòxic i no immunogènic que té. A més, existeixen diferents estratègies per tal de dirigir més adequadament el lloc d'actuació dels liposomes, modificant les seves característiques superficials, fixant anticossos a la superfície dels liposomes per encaminar aquests a determinats receptors antigènics específics de la superfície d'un tipus cel·lular en particular, etc. A tot això, també s'ha d'afegir la propietat dels liposomes d'aïllar la substància activa del medi durant el seu pas per l'organisme, protegint-la així d'accions enzimàtiques i per altra banda, també protegint l'organisme enfront dels seus efectes tòxics.

Totes aquestes propietats fan que els liposomes es considerin uns bons vehicles de substàncies actives. A més, en el cas de *Leishmania*, els liposomes tenen un cert tropisme (afinitat) per la cèl·lula diana, en aquest cas els macròfags, degut a la seva tendència natural a ser fagocitats.

1.2.2. ANTECEDENTS EN FÀRMACS ANTI-LEISHMANIA LIPOSOMALS

Com ja s'ha comentat anteriorment, els liposomes han estat utilitzats en varies ocasions com a sistemes d'alliberament de fàrmacs anti-*Leishmania*.

Estudis *in vitro* o *in vivo* realitzats inicialment amb liposomes contenint derivats de l'antimoni pel tractament de la leishmaniosi, varen demostrar un ample increment de l'índex terapèutic degut a un augment de l'activitat leishmanicida gràcies a la facilitat dels liposomes per a ser fagocitats

pels macròfags del sistema mononuclear fagocític. A més, es van poder disminuir molt els efectes tòxics de l'antimoni en reduir-se la dosi efectiva (Tempone i cols., 2004).

Altres estudis en gossos mostren que l'administració de l'antimoni en forma liposomal n'incrementa l'eficàcia i en disminueix la toxicitat (Valladares i cols., 1997 i 2001; Schettini i cols., 2005; Ribeiro i cols., 2008).

També existeix l'amfotericina B encapsulada en liposomes, AmBisome[®]. La part lipòfila de l'amfotericina B permet que aquest fàrmac s'integri dins la bicapa lipídica del liposoma. Els liposomes presenten un diàmetre de 60 nm (Ref. Prospecte AmBisome[®], Gador S.A.). Aquest fàrmac és capaç de romandre intacte a la circulació sistèmica durant un llarg període de temps i distribuir-se com a liposomes intactes en els teixits on pot haver-hi infeccions fúngiques o per *Leishmania*.

L'amfotericina B liposomal actua mitjançant la unió dels liposomes a la superfície externa de la membrana cel·lular. Quan el fàrmac s'allibera es creu que es transfereix a la membrana de la cèl·lula, rica en ergosterol, pel qual té una elevada afinitat.

L'AmBisome[®] presenta un perfil farmacocinètic significativament diferent al de l'Amfotericina B convencional. Les concentracions plasmàtiques màximes que s'obtenen amb l'AmBisome[®] són de 6 a 10 vegades més elevades que les obtingudes amb la formulació convencional. Aquest fet doncs, és un exemple clar de la gran importància que té la utilització de mètodes d'alliberament dirigit en el tractament de certes patologies.

L'inconvenient principal d'aquest fàrmac però és el gran ventall d'efectes adversos que presenta, amb una incidència freqüent, molt similar a l'amfotericina B convencional.

Diferents autors estan trobant resultats prometedors estudiant formulacions liposomals incluent sulfat de paramomicina pel tractament de la LC. En un estudi es van preparar formulacions liposòmiques amb paramomicina per tal d'avaluar el seu potencial antileishmanicida com a sistemes d'administració tòpica. Es va utilitzar dos tipus de liposomes: vesícules grans multilamelars (MLV) i vesícules grans unilamelars (LUV). Es va mostrar que l'atrapament de la paramomicina en les LUV va ser més elevada en comparació amb les MLV i una millor penetració a la pell amb l'encapsulació de PA en liposomes. Així doncs, els resultats finals d'aquest estudi van concloure que, les formulacions liposòmiques amb paramomicina són una interessant alternativa pel tractament de la LC ja que fa augmentar la penetració de la paramomicina per la pell (Ferreira i cols., 2004).

En un altre estudi (Jaafari i cols., 2009) es van desenvolupar unes formulacions liposomals amb un 10% i 15% de sulfat de paramomicina per tal d'avaluar l'activitat anti-*Leishmania* de la paramomicina contra *L. major* en ratolins BALB/c infectats. Per l'altra banda es va avaluar les propietats de penetració de la PM en la pell ja que és un antibiòtic amb un baix nivell de penetració. Aquest fet, disminueix l'eficàcia de la paramomicina pel tractament d'algunes lesions, sobretot d'aquelles que no estan ulcerades, i per tant, resulta un gran inconvenient. Carneiro y cols. van realitzar estudis similars, però varen incloure assajos en pell alterada

(*stripping skin*) (Carneiro i cols., 2010). Els resultats globals d'aquests estudis van mostrar que els liposomes són portadors interessants de paramomicina i que la PM liposomal pot ser un candidat adequat pel tractament de LC.

1.2.3. HIDROGELS

No existeix una definició precisa del terme hidrogel, la descripció més utilitzada es refereix a ells com uns materials polimèrics entrecreuat en forma de ret tridimensional d'origen natural o sintètic, que s'infla en contacte amb l'aigua formant materials tous i elàstics, d'un tamany que oscil·la entre 100 nm a 1 μm i que retenen una fracció significativa d'aquesta aigua en la seva estructura sense dissoldre's. (Qiu i cols., 2012).

Aquests polímers tenen unes característiques ben conegudes, com ser hidrófils, tous, elàstics i insolubles en aigua a més de que s'inflen en presència d'ella, augmentant apreciablement el seu volum mentre mantenen la forma fins assolir l'equilibri físicoquímic (Katime i cols., 2004). Addicionalment, poden tenir gran resistència mecànica (De Queiroz i cols., 2008) segons el mètode amb el qual s'obtinguin. La seva conformació tridimensional es dona en solucions aquoses concentrades quan el polímer inicial és capaç de gelificar amb la conseqüent formació de xarxes espacials no covalents (Lozinski i cols., 1998). El caràcter hidròfil es deu a la presència de grups funcionals hidrófils com són: OH, COOH, CONH, entre d'altres (Escobar i cols., 2003; Greenham i cols., 1993).

Aquests, degut a la seva biocompatibilitat, la seva estructura i propietats, són cada vegada més utilitzats com a biomaterials (Kopeček, 2007). A més, al tractar-se de materials inerts, les cèl·lules i les proteïnes no tendeixen a enganxar-se a la seva superfície (Pérez, 2006). Per tant, entre altres aplicacions biomèdiques, destaca la seva utilització com a vehicle per a l'alliberació controlada de fàrmacs.

Un tipus particular d'aquests hidrogels són els nanogels. Els nanogels són partícules col·loïdals entrecreuades que es poden inflar per absorció de grans quantitats de dissolvent, però que no es dissolen degut a l'estructura de la xarxa polimèrica física o químicament entrecreuada que els constitueix.

Els nanogels presenten un comportament que engloba des d'una dissolució polimèrica (estat inflat) fins al d'una partícula "dura" (estat col·lapsat). Poden respondre a estímuls físics (temperatura, força iònica, camps magnètics, elèctrics, etc), químics (pH, ions i molècules específiques, etc) i bioquímics (substrats enzimàtics, lligands d'afinitat, etc). L'exploració d'aquestes característiques ha donat lloc al disseny de nanogels intel·ligents i/o de multiresposta. Els majors estudis han estat dels efectes del pH (Lowman i cols., 1999; Morishita i cols., 2002) i la temperatura (Jeong i cols., 2002; Sershen i cols., 2003). Ambdues condicions es consideren molt importants pel fet que són variables inherents als sistemes fisiològics. Entre tots dos, la temperatura és el més estudiat ja que suposa un estímul molt efectiu en moltes aplicacions. Els nanogels capaços de patir un canvi volumètric de fase en canviar la temperatura del medi en el qual estan dispersos, o nanogels sensibles a la temperatura, són

molt interessants en aquelles aplicacions biotecnològiques en què es necessiti dosificar un principi actiu, molècula o material en medis on la principal variable sigui la temperatura. A més, s'ha constatat que les partícules de nanogel són capaces de respondre als estímuls d'una forma molt més ràpida que els seus homòlegs gels macroscòpics, els hidrogels, degut al seu petit tamany (Couvreur i cols., 1986). Per tant, la mida de les partícules que formen el nanogel és un paràmetre molt important ja que governa l'eficàcia del sistema d'alliberació.

Els nanogels emprats com a vehicles de transport i alliberació de molècules o material biològicament actiu han de romandre químicament inalterats i ser farmacològicament estables durant el seu trànsit des del lloc d'administració fins a la diana on van a exercir el seu efecte. Així mateix, les característiques del vehicle han de ser tals que no només sigui compatible amb el recorregut que hagi de realitzar, sinó també amb el lloc de dosificació, és a dir, que sigui "intel·ligent" i alliberi el principi actiu en el moment precís quan hagi arribat a la diana i que permeti la biodisponibilitat del mateix. D'altra banda, el portador o vehicle no només ha de mantenir les seves característiques i propietats en medi aquós sinó que també ha de ser capaç de mostrar de nou les seves propietats si per a l'aplicació i/o transport cal que s'emmagatzemi en estat sec (liofilitzat). És a dir, una vegada re-dispersat, ha de tornar a manifestar les seves propietats i comportament davant els canvis de temperatura.

S'han emprat gran quantitat de polímers que permeten el disseny d'aquests nanovehicles. Els de major freqüència en l'actualitat (Escobar i cols., 2002) són: poli (metacrilat de 2-hidroxietil) (PHEMA), poli (N-vinil pirrolidona) (PVP), poli (vinil alcohol) (PVA), poli (àcid acrílic) , poli (acrilamida) (PAA), polietilenglicol (PEG) i àcid poli (metacrílic). D'altra banda, hi ha un grup de polímers, majoritàriament biodegradable, que també han estat àmpliament utilitzats en sistemes d'alliberació (Escobar i cols., 2002), aquests són: l'àcid polilàctic (PLA), àcid poliglicòlic (PGA), àcid poli (làctico-glicòlic) (PLGA), polianhídrid i polièsters. Entre els hidrogels termorreversibles que s'han estudiat en aquesta última dècada hi ha els hidrogels de poli (N-isopropilacrilamida) (Heskins i cols., 2004, Mukae i cols., 2004), la metaacrilamida, la poliàcrilamida parcialment hidrolitzada (Cussler i cols., 2004), la agarosa (Aizawa i cols., 2004), el poli (vinil alcohol) (Wenxiu i cols., 2004; Burillo i cols., 2004) i el poli (vinil alcohol-co-acetat de vinil) entre d'altres. Actualment es consideren a les poli-N-alkilacrilamides com els hidrogels termosensibles més importants (Perez, 2006). No obstant això, la toxicitat de les poli (alkilacrilamides) impedeix la seva utilització en aplicacions biomèdiques. També s'han aconseguit resultats interessants des de diferents hidrogels copolímers. (Figura 17)

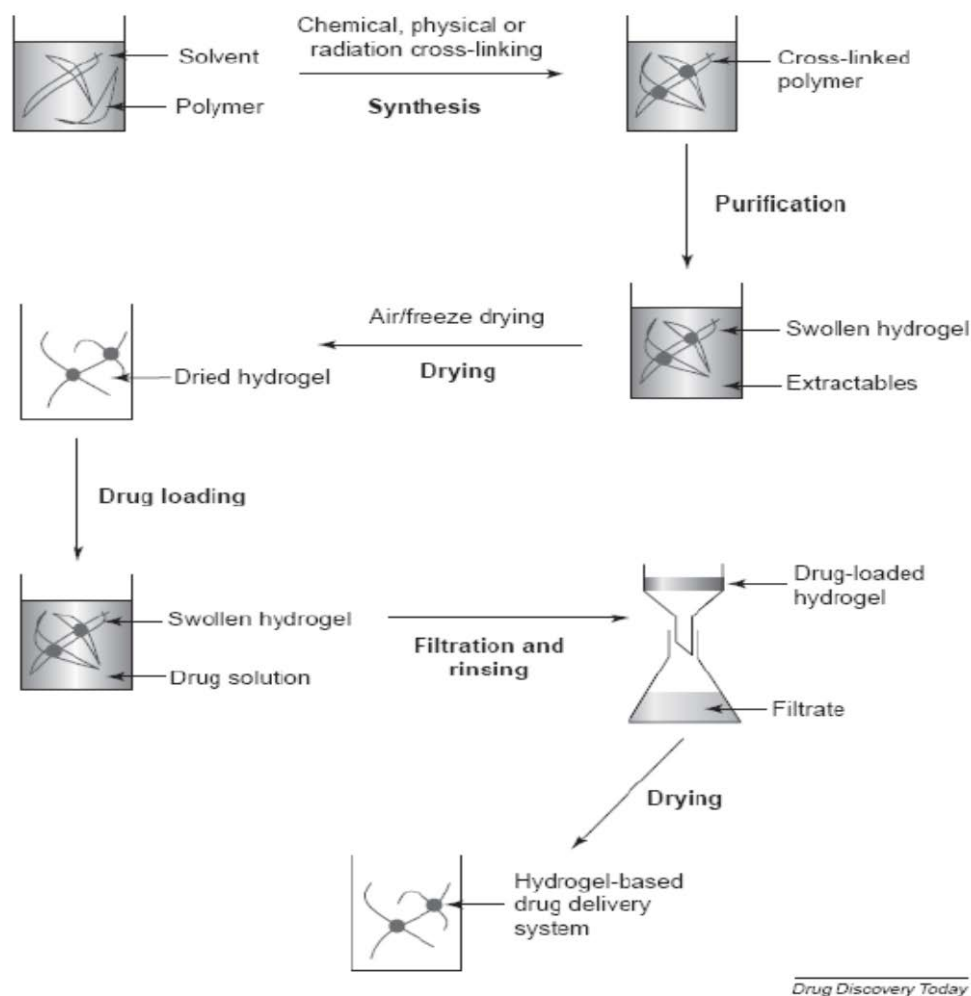


Figura 17. Esquema de l'obtenció d'un hidrogel per l'alliberació de medicaments (Gupta i cols., 2002)

Els copolímers en blocs estan formats per macromolècules constituïdes per blocs polimèrics disposats en una seqüència lineal. Entre els copolímers en blocs amb aplicacions farmacèutiques es destaquen els amfifílics, que posseeixen blocs lipofílics units a blocs hidrofílics. Els copolímers en blocs amfifílics posseeixen propietats tensioactives i formen diferents classes d'associacions, com ara micel·les i estructures líquid-cristal·lines, que poden actuar com excel·lents vehicles de principis actius.

Dins dels copolímers biocompatibles i sensibles a la temperatura es troben els poloxamers. Aquests polímers estan compostos per una triple cadena formada per dos òxids d'etilè envoltant a un òxid de propilè (Figura 18).

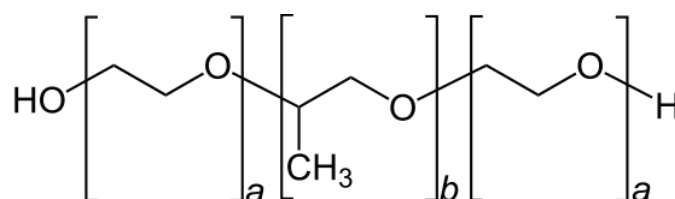


Figura 18. Estructura general dels poloxamer

Formen una àmplia família de tensioactius no iònics amb una mida de 2-20 kDa segons la longitud de les cadenes hidrofíliques de l'òxid d'etilè i les hidrofòbiques de l'òxid de propilè (Taula 2).

Pluronic®	Physical form	Ethylene oxide units	Propylene oxide units	Average molecular mass	Weight % of Oxyethylene		Unsaturation (mEq/g)
		(n) ^a	(n) ^a		PhEur 2005	USPNF 23	
		(a)	(b)	PhEur 2005/USPNF 23			USPNF 23
L 44	Liquid	10-15	18-23	2090-2360	44.8-48.6	46.7± 1.9	0.020±0.008
F 68	Solid	75-85	25-40	7680-9510	79.9-83.7	81.8± 1.9	0.026±0.008
F 87	Solid	60-68	35-40	6840-8830	70.5-74.3	72.4± 1.9	0.034±0.008
F108	Solid	137-146	42-47	12700-17400	81.4-84.9	83.1± 1.7	0.031±0.008
F127	Solid	95-105	54-60	9840-14600	71.5-74.9	73.2± 1.7	0.048±0.017

Taula 2. Diferents tipus de poloxamers y algunes de les seves característiques (Ramya i cols., 2013).

En ser solubles en aigua, permeten disminuir la tensió interfacial, emulsionar substàncies insolubles i formar micel·les i vesícules en solució aquosa atrapant diferents components en el seu interior.

Els poloxàmers també són coneguts pels noms comercials Synperonics, Pluronic, Lutrol i Kolliphor.

1.2.3.1 PLURONIC F-127

Pluronic F-127 (PF-127) o Poloxàmer 407 és un tensioactiu no iònic compost per copolímers de polioxietilè-polioxipropilè en una concentració compresa entre un 20 y 30%. PF-127 té una bona capacitat de solubilització, baixa toxicitat y una alta capacitat de càrrega de fàrmac, per tant, és considerat un bon medi per a sistemes d'administració de fàrmacs. PF-127 és un copolímer de tres blocs de polioxietilè-polioxipropilè disponible comercialment, de fórmula general E106 P70 E106 i amb una massa molar mitja de 13.000. (Miyazaki i cols., 1986; Hecht i cols., 1994).

Per sobre de la concentració micel·lar crítica (CMC) i la temperatura micel·lar crítica (CMT) té lloc una reducció de la solubilitat de l'òxid de propilè (PPO) en dissolució aquosa conduint a la formació de la micel·la. L'augment simultani de la concentració i la temperatura dóna lloc a la formació d'uns agregats multimoleculares que consten d'un nucli central hidrofòbic amb les seves cadenes de polioxietilè hidròfiles que enfronten el medi extern (Figura 19) (Guzmán i cols., 1994).

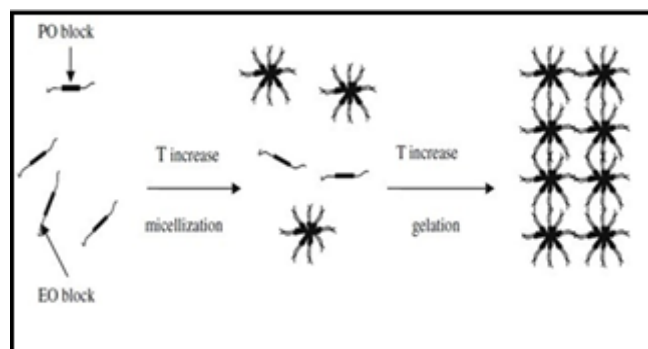


Figura 19. Il·lustració de la formació d'estructures micel·lars dels poloxàmers, (Ramya i cols., 2013)

En assajos d'un model *in vitro* d'alliberació, s'ha demostrat que l'alliberació de fàrmac disminueix amb l'augment de la concentració de poloxamer, que és probablement degut a un augment en el tamany i el número de micel·les i una disminució posterior en el tamany i número de canals aquosos (Gilbert i cols., 1986).

Pluronic F-127 pot formar nanogels termorreversibles, és a dir que és líquid a temperatura de refrigeració (4-5 °C) però gelifica a temperatura ambient (Yeon 2000; Escobar-Chávez 2006). Aquesta característica ha permès PF-127 ser utilitzat com a portador per a la majoria de vies d'administració inclouen la oral, tòpica (Morikawa i cols., 1987; Padilla i cols., 2000), intranasal (Jain i cols., 1998), vaginal, rectal (Miyazakis i cols., 1986; Ryu 1999), ocular (Li i cols., 2000) i vies parenterals (Koller i cols., 1987).

També s'ha reportat l'ús potencial de PF-127 com una pell artificial (DiBiase i cols., 1996). En els últims anys PF-127 ha atret un interès particular en el disseny de la dermis i sistemes d'administració transdèrmica, amb la finalitat de promoure, millorar o retardar la permeació de drogues a través de la pell, tenint en compte que per als sistemes d'aplicació tòpica, es desitja l'acumulació a la pell amb permeació mínima, mentre que per a l'administració sistèmica, es prefereix el comportament oposat.

1.2.3.2 PAPER DE LA GLICOPROEÏNA P EN LA RESISTÈNCIA A FÀRMACS VS POLOXAMERS

Existeixen dos grans manifestacions de resistència a medicaments en els microorganismes: la resistència intrínseca, relacionada amb la capacitat natural dels microorganismes per resistir la quimioteràpia, o bé la resistència adquirida, que es presenta quan un microorganisme inicialment és sensible al medicament però després es torna resistent al tractament. La resistència que mostren els agents infecciosos a medicaments però no està limitada a un medicament en particular, sinó a diversos medicaments, fenomen que es coneix com a resistència múltiple a medicaments. La manifestació de resistència a varis medicaments es coneix com a fenotip MDR (de l'anglès, *multidrug resistance*), un cas particular de resistència adquirida, descrit inicialment en cèl·lules tumorals de mamífers (Gottesman i cols., 1993) i, posteriorment, en bacteries (Zgurskaya, 2002; Borst i cols., 1995), protozous (Borst i cols., 1995) i fongs (Wolfger i cols., 2001).

Tant en el càncer com en malalties infeccioses, el fenotip MDR s'associa amb l'expressió exagerada de proteïnes que pertanyen a la subfamília ABC, una família de molècules transportadores de nucleòtids d'adenina, funció que es coneix com a tràfic de ATPases (Higgins C. 1992).

A la família de transportadors ABC s'inclou la Pgp, glicoproteïna P, que és una glicoproteïna de membrana que s'ha considerat com la proteïna responsable del transport de diferents compostos cap a l'exterior de la cèl·lula, que actua com una bomba capaç d'expulsar drogues, depenent de l'ATP i que porta a la disminució intracel·lular del medicament (Gottesman i cols., 1993).

L'aparició de resistències a medicaments en protozous es pot atribuir a diferents mecanismes, un dels quals és la sobreexpressió de la Pgp la qual cosa incrementa la sortida del medicament de l'interior del paràsit disminuint així la quantitat de compost actiu que estaria en contacte amb el paràsit (Ouellette i cols., 1991).

Nombroses investigacions suggereixen que la Pgp juga un paper important en la medició de resistències a diferents medicaments, inclosos l'antimoni trivalent (Sb^{III}) i pentavalent (Sb^V). (Pérez-Victoria i cols; 2011)

Tots els organismes que presenten el fenotip MDR expressen una o més Pgp, codificades per diferents gens de la família *MDR* els quals s'han identificat, clonat i seqüenciat en diferents protozous que inclouen varies espècies de *Leishmania* (Ouellette i cols., 1990; Ellenberger i cols., 1989; Callahan i cols., 1991; Chow i cols., 1998), *P. falciparum* (Chow i cols., 1998; Ullman, 1995), *T. cruzi* i *T. brucei* spp (Ullman, 1995) i *E. histolytica* (Ullman, 1995).

Els poloxamers han demostrat tenir poder per inhibir l'acció d'aquest grup de proteïnes conegudes com a glicoproteïnes P (Pgp). Com ja hem dit, aquestes proteïnes es troben sobreexpressades en cèl·lules canceroses i són les responsables de reduir l'acumulació de citostàtics en teixits cancerosos (Krishna i cols., 2000; Batrakova i cols., 2001) segurament degut a una depleció en els nivells d'ATP. Això ha donat lloc al desenvolupament de diverses formulacions amb poloxamers contenint citostàtics com doxorubicina (Rapaport i cols., 1999), vimblastina mitomicina, cisplatí (Alakhov i cols., 1996), paclitaxel i etopòsid (Batrakova i cols., 1999).

La comprensió dels mecanismes mitjançant els quals s'adquireix aquest tipus de resistència podria portar al disseny d'una estratègia per revertir-la que es podria utilitzar en el tractament dels malalts de càncer així com en el tractament de la leishmaniosi.

1.3. LA PELL I SISTEMES DE TRANSPORT CUTANI

La pell és una membrana gruixuda, amb diverses estructures annexes, que recobreix la superfície del cos. Li corresponen funcions diverses i variades que la converteixen en un òrgan molt important de l'organisme. Entre d'altres funcions, destaquen la de protecció del cos davant diversos agents externs, la participació activa en la regulació de la temperatura corporal i, fins i

tot, en la regulació del medi intern. D'altra banda, la pell ha d'ésser considerada un òrgan sensorial, perquè s'hi localitza el sentit del tacte i detecta diverses sensacions com el fred o l'escalfor (Ferrándiz, 1989).

La pell recobreix la superfície de l'organisme i continua, als orificis naturals, amb les mucoses. Es compon de tres capes de teixits diferenciats, de la qual la més externa és l'anomenada epidermis, la mitjana la dermis i la més profunda l'hipodermis. En conjunt, constitueix una membrana gruixuda, resistent i flexible que en la persona adulta té una superfície aproximada d'1,5 a 2 m², i si es considera només la dermis i l'epidermis, pesa uns 4 Kg.

El gruix de la pell varia d'una persona a una altra, i és diferent segons la zona del cos que es tracti. L'epidermis i la dermis, en conjunt tenen un gruix que oscil·la entre 0,5 i 4 mm. L'hipodermis és la capa que té un gruix més variable, ja que en algunes zones del cos gairebé és inexistent mentre que en d'altres ateny uns quants mil·límetres.

En la pell es localitzen els anomenats annexos cutanis, unes estructures formades per cèl·lules diferenciades que realitzen funcions específiques. Els annexos cutanis principals són les glàndules sudorípares, les glàndules sebàcies, els fol·licles pilosos que formen els pèls, i les unghes.

També s'hi troben nombrosos vasos sanguinis per on circula la sang que nodreix les cèl·lules. Igualment hi ha fibres nervioses algunes de les quals són sensibles i d'altres regulen les funcions dels diversos elements que la componen (Figura 20).

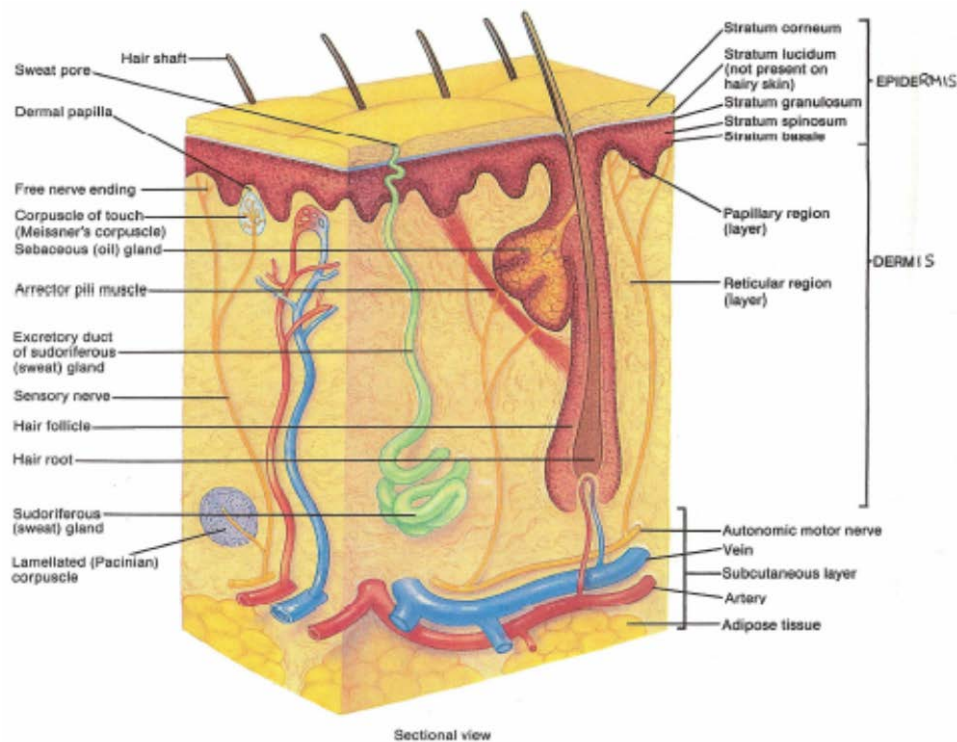


Figura 20. Estructura de la pell (Tortora i cols., 1993).

1.3.1. ANATOMIA DE LA PELL

Estructuralment la pell està formada per tres capes:

1- Epidermis: És la capa més superficial. Està formada per teixit estratificat escamós i conté quatre tipus de cèl·lules diferents: (Figures 21 i 22).

- Queratinòcits: són el 90% de les cèl·lules epidèrmiques. Aquestes són responsables de formar la queratina.
- Melanòcits: produeixen un pigment anomenat melanina, correspon un 8% de les cèl·lules epidèrmiques. La melanina és un pigment de color negre-marronós que contribueix a donar color a la pell i a absorbir els raigs ultraviolats (UV).
- Cèl·lules de Langerhans: aquestes cèl·lules es produeixen a la medul·la òssia i migren cap a l'epidermis. Elles interactuen amb els globus blancs anomenats cèl·lules T en la resposta immunitària.

La informació existent suggereix que en les infeccions per *Leishmania* aquestes cèl·lules participen activament en la iniciació i regulació de la resposta immune específica gràcies a la seva capacitat de migració i presentació d'antígens a les cèl·lules T, així com tenir l'habilitat única de retenir antígens del paràsit de forma immunogènica per períodes prolongats de temps (Moll i cols., 1995).

- Cèl·lules de Merkel: aquestes cèl·lules estan localitzades a la capa més profunda de l'epidermis, l'estrat basal, i estan ancorades al queratinòcits mitjançant desmosomes. Aquestes tenen un paper important en la transmissió de les sensacions cutànies.

Les diferents capes que componen l'epidermis són les següents, des de la més profunda a la més superficial:

- a) Estrat basal: Està representat per una única capa de cèl·lules que conté cèl·lules mare o *stem cells* que tenen una capacitat reproductora constant. Les cèl·lules mare per mitosi originen cèl·lules noves anomenades queratinòcits. Per aquesta raó, l'estrat basal també s'anomena estrat germinatiu.

Les cèl·lules són petites i de forma cuboide. Cada vegada que una cèl·lula de l'estrat basal es reproduïx, es genera una altra cèl·lula que desplaça a la resta a un nivell més superficial. Igualment les noves cèl·lules que es formen van empenyent les que són al damunt i les fan pujar de nivell. En aquest procés les cèl·lules passen a formar part de les altres capes cel·lulars epidèrmiques. Estan en contínua renovació i això possibilita el manteniment epidèrmic, és a dir, un recanvi cel·lular, que és la suma entre la renovació i la descamació.

- b) Estrat espinós: Format per 8 o 10 capes de cèl·lules polièdriques, que s'uneixen entre si a través d'unes prolongacions o espines. A mesura que les cèl·lules maduren i avancen cap a la superfície es tornen més planes.

- c) Estrat granulós: Format per 3 o 5 capes de cèl·lules. Aquestes cèl·lules contenen abundants grànuls de ceratohialina (precursor de la queratina). La queratina és una proteïna que forma part de les capes més externes de l'epidermis. La queratina forma una barrera que protegeix les capes més profundes de ferides i invasions microbianes i fa la pell impermeable.
- d) Estrat transparent o stratum lucidum: Normalment només es troba als palmell de la mà i a les plantes dels peus. Consisteix en fileres de cèl·lules transparents, aplanades i mortes.
- e) Estrat corni: Està compost entre 25 i 30 capes de cèl·lules aplanades i mortes completament plenes de ceratina. Aquestes cèl·lules contínuament es desprenen i són reemplaçades per cèl·lules de capes més internes.

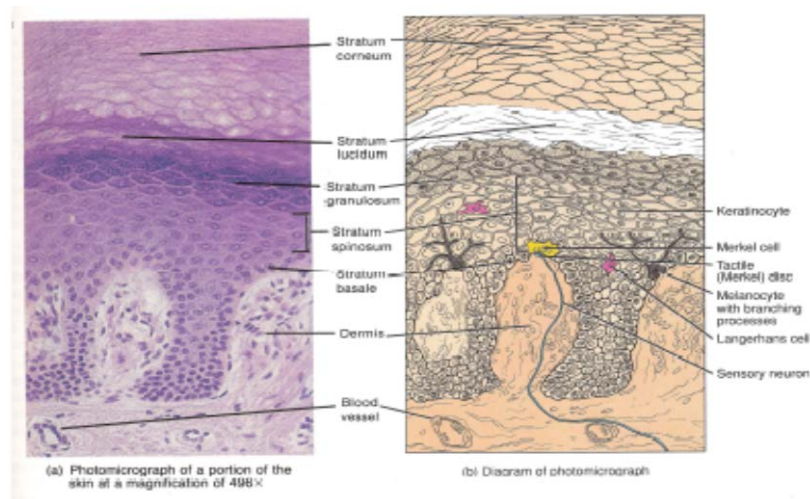


Figura 21. Tipus de cèl·lules i capes de l'epidermis (Tortora, 1993).

En el procés de queratinització, les noves cèl·lules formades a les capes basals experimenten un procés de desenvolupament essent empeses cap a la superfície. Així, durant el trajecte van acumulant queratina, mentre que al mateix temps desapareix el citoplasma, nucli i altres òrgans, i la cèl·lula mor. Eventualment la cèl·lula queratinitzada es desprèn i és reemplaçada per les cèl·lules de la capa inferior que es va queratinitzant.

Tot el procés des de que es forma una cèl·lula a l'estrat basal fins que surt a la superfície, queratinitzada, i es desprèn, té lloc entre dues i quatre setmanes (Tortora i cols., 1993).

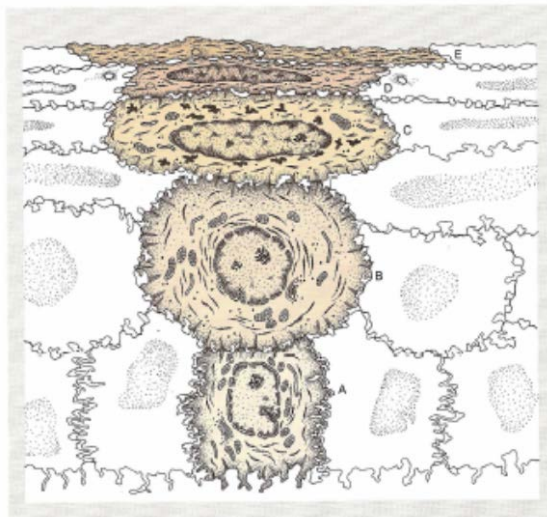


Figura 22. Epidermis: A, Estrat basal; B, Estrat espinós; C, Estrat granulós; D, Estrat transparent; E, Estrat corni (Ferrándiz, 1989).

2- Dermis: És la capa de la pell que es troba per sota l'epidermis, i en depenen sobretot la resistència i la flexibilitat de la pell. Aquesta capa està formada per una capa papil·lar i una capa reticular. També a la dermis s'hi localitzen els annexos cutanis, els vasos sanguinis i les fibres nervioses.

L'epidermis i la dermis es mantenen unides per la **membrana basal**, una capa de proteïnes i d'altres substàncies químiques secretades en part per les cèl·lules de l'epidermis. Així la dermis forma prominències còniques que s'introdueixen a l'epidermis, anomenades papil·les dèrmiques. Alhora, hi ha prominències de l'epidermis que penetren en el derma, les anomenades crestes interpapil·lars. Les **papil·les dèrmiques** i les **crestes interpapil·lars** encaixen entre sí i de la forma d'aquestes prominències en depèn la formació de solcs en la pell (veure figura 23).

La dermis està formada de **teixit conjuntiu lax**, de consistència tova, flexible i elàstica. Aquest teixit dèrmic es compon sobretot de **fibres**, unes estructures allargades i fines que s'entrecreuen i constitueixen l'estructura bàsica del teixit. Les fibres de la dermis són de tres tipus: fibres col·làgenes, fibres elàstiques i fibres reticulars.

Les cèl·lules principals que componen la dermis són els **fibroblasts**, unes cèl·lules aplanades, en forma de fus, que tenen diverses prolongacions i que es troben disperses pel derma. Són les encarregades de sintetitzar les proteïnes que formen les fibres i la substància intersticial de la dermis.

Els **macròfags o histiòcits** són cèl·lules amb funcions especialment defensives, ja que impedeixen que la pell sigui envaïda per gèrmens procedents de l'exterior o per substàncies estranyes a l'organisme. Són cèl·lules d'una grandària considerable, de forma globulosa, capaces d'ingerir els gèrmens que localitzen i destruir-los amb substàncies que contenen al seu interior. A més de microorganismes, els macròfags també poden ingerir restes de cèl·lules

mortes o productes de rebuig de les cèl·lules, desplaçant-se d'un punt de la dermis a un altre i detectant els gèrmens o substàncies estranyes.

Aquestes cèl·lules són els hostes de la *Leishmania*, les quals tenen la capacitat d'evadir els seus efectes defensius cosa que els permet viure i multiplicar-se al seu interior.

Els **mastòcits** són un altre tipus de cèl·lules completament plenes de grànuls que contenen diverses substàncies, com ara l'**heparina** i la **histamina**. Quan aquestes substàncies són alliberades des de l'interior del mastòcit, generen una vasodilatació dels vasos sanguinis i n'incrementen la permeabilitat, de manera que es provoca una reacció inflamatòria. Normalment, aquesta reacció és defensiva i es desencadena quan la pell és envaïda per gèrmens o bé per substàncies nocives.

L'espai que queda entre les cèl·lules i les fibres del derma és ocupat per la **substància intersticial**, d'una composició química complexa. Entre els seus components més abundants hi ha els **mucopolisacàrids** com l'**àcid hialurònic**, format per proteïnes i hidrats de carboni. A través de la substància intersticial, l'oxigen i les substàncies nutritives provinents dels vasos sanguinis difonen cap a les cèl·lules de la dermis i l'epidermis.

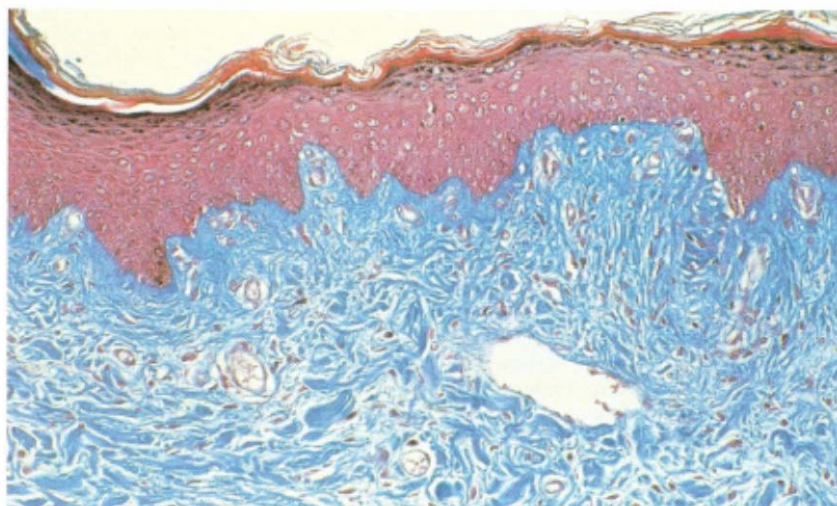


Figura 23. Tall de pell vist al microscopi que permet diferenciar l'epidermis del derma i observar les fibres de col·làgen tenyides de color blau (Ferràndiz, 1989).

3- Hipoderma: Anomenat teixit subcutani, és la capa més profunda de la pell i s'uneix als teixits subjacents. Aquesta unió és laxa i permet el lliscament de la pell sobre els òrgans que recobreix. L'hipoderma es compon bàsicament de cèl·lules grasses o adipòcits caracteritzades per la capacitat de sintetitzar i emmagatzemar greixos. De fet, el greix contingut en els adipòcits constitueix la principal font de reserva energètica de l'organisme. A més, l'hipoderma actua com encoixinat de la superfície del cos i proporciona aïllament tèrmic.

1.3.2. FISIOLOGIA DE LA PELL

La pell és l'òrgan més extens del nostre organisme i té una sèrie de funcions indispensables per a la vida: (Tortora i cols., 1993).

- **Funció homeostàtica o regulació de la temperatura corporal:** En resposta a elevades temperatures ambientals o a un exercici físic dur, l'evaporació de la suor de la superfície de la pell ajuda a disminuir una elevada temperatura corporal i canviar-la a una normal.

En canvi, en resposta a baixes temperatures ambientals, la producció de suor disminueix, cosa que ajuda a conservar la calor. Canvis en la pressió sanguínia de la pell ajuden també a regular la temperatura corporal.

- **Funció protectora:** La pell cobreix el cos i el proveeix d'una barrera física que protegeix les capes de teixits inferiors de l'abradió física, invasió bacteriana, deshidratació, i radiació ultraviolada (UV).
- **Funció sensorial:** La pell conté un abundant nombre de terminacions nervioses i receptors que detecten els estímuls relacionats amb la temperatura, tacte, pressió, i dolor. És a dir, que proporcionen informació relacionada amb el medi extern.
- **Funció excretora:** A través de les glàndules sudorícoles, a més d'eliminar calor i aigua del cos, la transpiració és un vehicle per eliminar petites quantitats de sal i alguns components orgànics.
- **Funció immunitària:** Algunes cèl·lules de l'epidermis són importants components del sistema immunitari, i ens defensen d'invasors estranys.
- **Reservori sanguini:** La dermis està formada per una extensiva xarxa de vasos sanguinis que transporten del 8 al 10% de la sang total d'una persona adulta.
- **Síntesi de vitamina D:** La síntesi de vitamina D comença amb l'activació d'una molècula precursora que es troba a la pell a través dels raigs ultraviolats de les radiacions solars.

1.3.3. PERMEACIÓ CUTÀNIA

1.3.3.1. VIES DE PENETRACIÓ A TRAVÉS DE LA PELL

El mecanisme de transport de substàncies actives a través de la pell segueix un procés de difusió passiva. Existeixen dues possibles vies per a la penetració transdèrmica: la primera a través dels apèndixs (fol·licles pilosos, glàndules sudorícoles o sebàcies) i la segona, a través de l'epidermis (via intracel·lular i intercel·lular).

- **Apèndix:** El pas a través dels apèndixs es realitza a través de glàndules o fol·licles, resultant superior a través de fol·licles, podent arribar a ser important per a molècules polars d'elevat pes molecular que penetren lentament a través de l'estrat corni.

- **Epidermis:** El pas de l'actiu a través de l'epidermis és el procés majoritari i depèn de les seves propietats fisicoquímiques (pKa, pes molecular, solubilitat, coeficient de repartiment, etc) i del seu metabolisme, de la integritat i de l'espessor de l'estrat corni, de la hidratació de la pell i del vehicle utilitzat. Les molècules polars utilitzen principalment la via intracel·lular i les lipòfiles la intercel·lular.

Un factor important a tenir en compte és que la pell és un òrgan metabòlicament actiu i, per tant, molts actius seran metabolitzats després de la seva penetració transdèrmica.

1.3.3.2. PROCÉS DE PERMEACIÓ CUTÀNIA

El procés de permeació cutània pot dividir-se en tres etapes: penetració, permeació i absorció.

1. **Penetració:** Indica l'entrada de qualsevol substància en una capa determinada o en algun òrgan. Perquè es produeixi la penetració es necessita, en primer lloc, que s'alliberi l'actiu del vehicle que el conté. Aquest actiu ha de dissoldre's, o bé ha d'estar dissolt (dissolució), i difondre cap a la interfase vehicle-estrat corni.

En aquesta primera fase la formulació galènica serà molt important donat que modularà el procés d'alliberació de l'actiu.

2. **Permeació:** Aquesta segona etapa està regida per un procés de difusió de l'actiu a través de la pell. La principal barrera que troben els actius per travessar la pell és l'estrat corni. Existeixen tres rutes principals del pas d'actius a través de l'estrat corni:
 - *Transapendicular:* En la que es produeix el pas a través dels fol·licles pilosos, o a través de glàndules sudorípares i a través de glàndules sebàcies.
 - *Transcel·lular:* A través de cèl·lules de l'epidermis.
 - *Intercel·lular:* Entre les cèl·lules de l'estrat corni, a través de la matriu lipídica de la mateixa.
3. **Absorció:** És el pas de la substància al sistema circulatori (vasos sanguinis o vasos limfàtics), considerat farmacocinèticament com part del compartiment central.

1.3.3.3. CINÈTICA DE LA PERMEACIÓ CUTÀNIA

El fenomen de permeació d'un actiu a través de la pell és un procés complex en el qual influeixen gran quantitat de factors. Vindrà limitat per la difusió de l'actiu a través de l'estrat corni (Chien, 1982), donat que aquest actua com a medi de difusió passiva, a través del qual les molècules penetrants migren un cop dissoltes en el vehicle seguint les *Lleis de Fick* de la difusió (Michaels i cols., 1975).

Com és conegut, la difusió passiva és un procés en el qual la matèria es transporta d'una regió d'un sistema a una altra, a favor de gradient de concentració d'acord amb un moviment aleatori de molècules. Aquest moviment aleatori posseeix una direcció preferencial, des de la regió de

concentracions elevades cap a la regió de concentracions menors, tractant-se d'un procés espontani i irreversible.

D'acord amb la primera *Llei de Fick* de difusió, la pell pot considerar-se com una membrana complexa en la qual la quantitat de substància (M) que difon a través d'una determinada àrea (S) per unitat de temps t és conegut com a flux (J) i la seva equació matemàtica és: (Eq. 1)

$$J = \frac{dM}{Sdt} \quad (\text{Eq. 1})$$

El flux serà proporcional al gradient de concentració dC/dX , és a dir:

$$J = -D \frac{dC}{dX} \quad (\text{Eq. 2})$$

On D és el coeficient de difusió i X és la distància que recorre la matèria perpendicular a la membrana. El signe menys indica que el flux es mou en el sentit de disminuir la diferència de concentracions.

En els estudis de permeació transdèmica s'estudia normalment la variació de la concentració d'actius en funció del temps per a una zona concreta del sistema.

L'equació que explica les variacions temporals de concentració d'actiu en una zona localitzada de la membrana es coneix com la segona *Llei de Fick*, la seva equació deriva de l'equació 1.

La concentració de l'actiu contingut en un determinat volum de pell, només canvia com a resultat del flux net de difusió de les seves molècules des de dins cap a fora de la zona considerada. La diferència de la concentració en el volum de referència és conseqüència de la sortida i entrada de solut (veure figura 24).

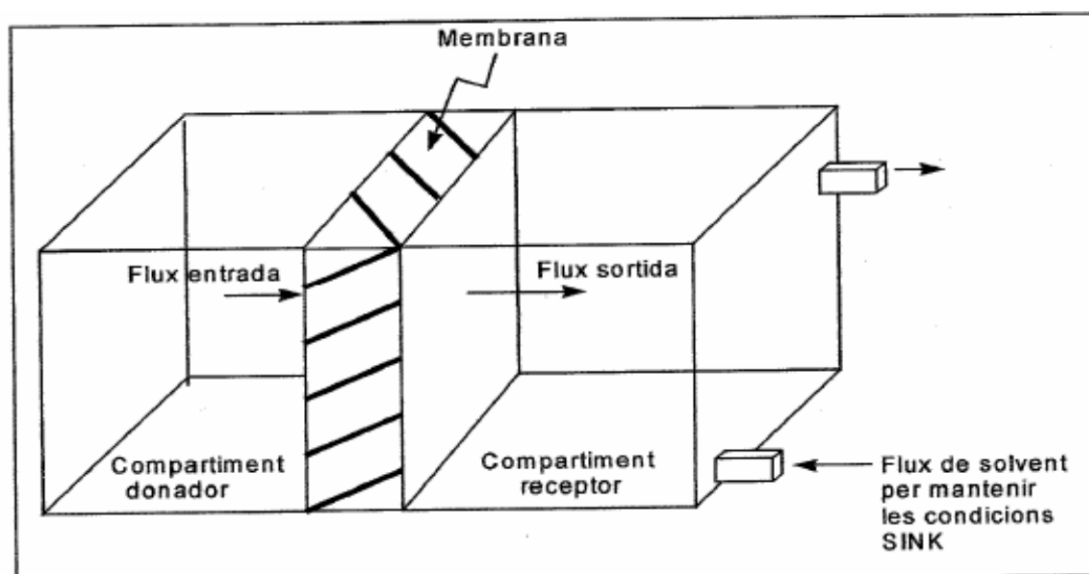


Figura 24. Model de difusió entre dos compartiments a través d'una membrana.

Els canvis de concentració de solut en el volum considerat en funció del temps (dC/dt) i el flux que difon de substància per unitat de distància recorreguda (dJ/dX) s'expressa mitjançant l'equació següent:

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{dJ}{dX} \quad (\text{Eq. 3})$$

Diferenciant l'equació de la primera *Llei de Fick* (Eq.2) respecte a la X, obtenim:

$$\frac{dJ}{dX} = -D \frac{d^2 C}{dX^2} \quad (\text{Eq. 4})$$

Substituint dC/dt de l'equació 3 en l'equació 4, s'obté l'expressió matemàtica de la segona *Llei de Fick*.

$$\frac{dC}{dt} = -\frac{d^2 C}{dX^2} \quad (\text{Eq. 5})$$

Aquesta expressió (segona *Llei de Fick*) estudia els estats en els quals els canvis de concentració de solut en funció del temps en una zona determinada són proporcionals als canvis de gradient en un punt del sistema.

El valor D ve afectat per la temperatura, la pressió, les propietats del solvent i de la naturalesa química de les substàncies que difonen. No obstant, a la pràctica, el coeficient de difusió s'assumeix que té un valor constant.

Quan s'inicia el procés de permeació, la quantitat d'actiu en pell és poc significativa i en funció del temps augmenta fins arribar a la quantitat màxima de dissoldre's en el substrat. En aquestes condicions s'estableix un estat d'equilibri estacionari, és a dir, la quantitat d'actiu permeat en funció del temps és constant. La primera *Llei de Fick* considera el flux (velocitat de difusió per unitat d'àrea) com un flux en estat d'equilibri estacionari i la segona *Llei de Fick* es refereix en general, als canvis de concentració d'actiu, en funció del temps durant el procés de permeació de la pell per qualsevol gruix, x quan el flux no es troba en estat d'equilibri estacionari.

Si es considera la difusió d'un actiu a través d'una àrea S de la pell d'un gruix h i a la vegada es consideren les concentracions d'actiu en la membrana en íntim contacte amb les solucions donadora i receptora, són C_1 i C_2 respectivament, d'acord amb la *Llei de Fick*, podem escriure:

$$J = \frac{dM}{Sdt} = -D \frac{C_1 - C_2}{h} \quad (\text{Eq. 6})$$

On $(C_1-C_2)/h$ és aproximadament dC/dX

El gradient de concentració d'actiu en el sistema pot assumir-se constant per un pseudoestat d'equilibri estacionari.

L'equació 6 indica que la part externa (límit) de les capes aquoses (suposadament estàtica i immòbil) a ambdós costats de la pell, no afecten significativament al procés global de transport de l'actiu.

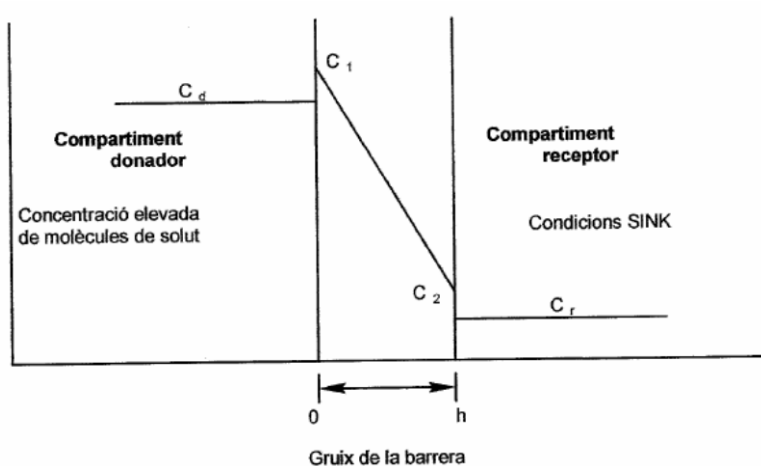


Figura 25. Model de difusió entre dos compartiments a través d'una membrana.

Les concentracions C_1 i C_2 d'actiu dins de la membrana normalment no són conegudes, però poden substituir-se pel producte del quocient de repartiment K , per la diferència de concentracions d'actiu en el compartiment donador C_d i el compartiment receptor C_R (veure figura 25).

El coeficient de repartiment K és igual a:

$$K = \frac{C_1}{C_d} = \frac{C_2}{C_R} \quad (\text{Eq. 7})$$

d'on:

$$K = \frac{C_1 - C_2}{C_d - C_R} \quad (\text{Eq. 8})$$

d'on:

$$C_1 - C_2 = K(C_d - C_R) \quad (\text{Eq. 9})$$

Substituint el valor de $(C_1 - C_2)$ de l'equació 9 en l'equació 6, s'obté:

$$\frac{dM}{dt} = DSK \frac{C_d - C_R}{h} \quad (\text{Eq. 10})$$

Si es compleixen les condicions SINK en el compartiment receptor, $C_R = 0$ llavors:

$$\frac{dM}{dt} = DSK \frac{C_d}{h} \quad (\text{Eq. 11})$$

O bé:

$$J = DSK \frac{C_d}{h} \quad (\text{Eq. 12})$$

Si tenim en compte la unitat de superfície ($S=1$) l'equació 12 queda:

$$J = DK \frac{C_d}{h} \quad (\text{Eq. 13})$$

On D , K i h són constants i configuren la constant de permeabilitat, K_p , el seu valor de la qual és:

$$K_p = \frac{DK}{h} \quad (\text{Eq.14})$$

Quan la concentració de solut en el compartiment donador és constant (C_0), és a dir, en el pseudoestat d'equilibri estacionari, el valor del flux equival a:

$$J = K_p C_0 \quad (\text{Eq. 15})$$

La constant de permeabilitat (K_p) i el flux (J) són els paràmetres més representatius de les característiques de permeació d'un actiu quan el procés es desenvolupa en estat d'equilibri estacionari. En general, a nivell experimental, són difícils els càlculs dels valors de la constant de difusió d'un actiu (D), dels seu coeficient de repartiment entre el vehicle i la pell (K), així com el gruix de la mateixa (h), i a partir d'aquests valors, estimar la constant de permeabilitat (K_p) i del flux (J) de l'actiu, mitjançant les equacions 14 i 15.

Malgrat això, el càlcul de K_p és possible si es coneix l'àrea de la pell utilitzada en l'experiència (S), la concentració d'actiu en el compartiment donador (C_d) i la quantitat d'actiu permeada (M) en el compartiment receptor, suposades les mateixes condicions SINK. Dites condicions suposen que la concentració d'actiu en el compartiment receptor sempre és inferior al 15-20%

de la seva concentració a saturació. En aquestes condicions, el valor de K_p es calcula a partir del pendent de la relació lineal entre la quantitat d'actiu permeada i el temps.

Si considerem que s'ha arribat a l'estat d'equilibri estacionari, la quantitat de solut que travessa la membrana per unitat de temps (dM/dt), és constant, fet que equival a considerar que el fenomen de difusió es desenvolupa d'acord amb un procés d'ordre zero. En aquestes condicions, segons l'equació 11, si s'assumeix que el coeficient de difusió de l'actiu (D), la superfície de la pell (S), el coeficient de repartiment de l'actiu entre el vehicle i la pell (K), la concentració de solut en el compartiment donador (C_d) i el gruix de la pell (h) romanen constants durant l'experiència, pot simplificar-se de la següent manera:

$$\frac{dM}{dt} = K_1 \quad (\text{Eq. 16})$$

Per integració d'aquesta equació s'obté:

$$\int_M dM = k_1 \int_0 dt \quad (\text{Eq. 17})$$

Que la seva resolució és :

$$M - M_0 = k_1(t - 0) \quad (\text{Eq. 18})$$

és a dir:

$$M = K_1 t + M_0 \quad (\text{Eq. 19})$$

Tenim en compte que a temps zero, la quantitat de fàrmac en el compartiment receptor és zero, l'equació 19 queda:

$$M = K_1 t \quad (\text{Eq. 20})$$

Aquesta és l'equació d'una recta que passa per l'origen i que relaciona la quantitat d'actiu permeada acumulada en funció del temps. El pendent de la recta (K_1), constant de proporcionalitat entre la quantitat permeada acumulada d'actiu i el temps equival al flux ($\text{mg} \cdot \text{h} \cdot \text{cm}^{-2}$) si la quantitat s'expressa en mil·ligrams, el temps en hores i la superfície en centímetres quadrats.

Coneixent així el valor del flux, i d'acord amb l'equació 15, pot estimar-se la constant de permeabilitat (K_p), sabent C_0 (la concentració d'actiu en el compartiment donador).

El coeficient de permeabilitat o difusió D caracteritza la capacitat d'un determinat actiu per travessar la membrana.

Per a una substància que difon a través de les diferents estructures de la pell, el coeficient de permeabilitat és el resultat dels diferents coeficients de permeabilitat per cada un dels estrats que ha de travessar (capa còrnia, epidermis i dermis) i que correspon a tres barreres diferents de difusió.

D'acord amb l'equació 6, el flux és proporcional al gradient d'activitat termodinàmica del solut per a la concentració a la que es troba. Aquesta activitat termodinàmica pot variar en funció del dissolvent i de la velocitat de difusió del solut a una determinada concentració. L'activitat termodinàmica d'un actiu pot considerar-se constant, per una determinada concentració si s'utilitza una concentració saturada.

En general, tant a nivell d'experiències de difusió *in vitro*, com en les formes de dosificació, l'activitat termodinàmica del solut, en les referides formes o en el compartiment donador no és constant a l'inici del procés encara que la concentració de solut romangui constant. Això és degut a que transcorre un cert temps fins que la pell es troba saturada d'actiu, temps que dependrà de les característiques fisicoquímiques de l'actiu, en particular en el que respecta al seu coeficient de repartiment entre el vehicle i la pell, K . Per aquest motiu, la representació gràfica entre les quantitats permeades acumulades de fàrmac i el temps no és una línia recta, sinó que en els primers temps és una corba convexa.

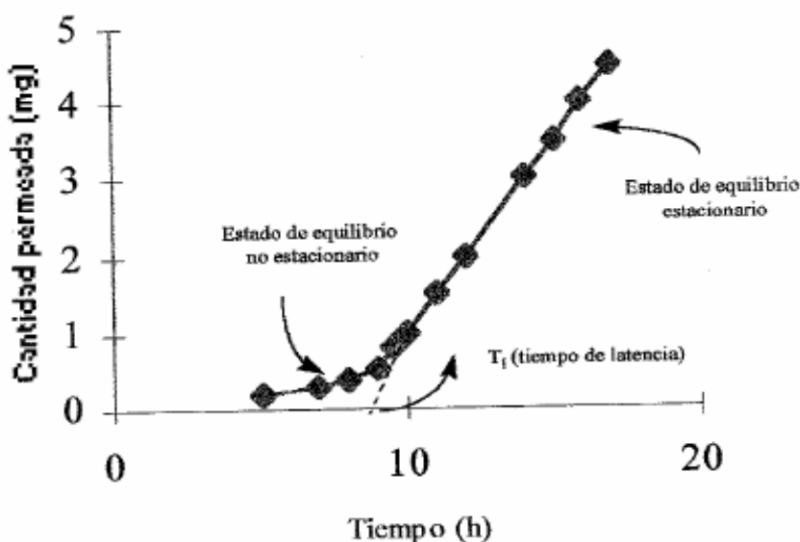


Figura 26. Representació de la funció de permeació simulada. Quantitat permeada acumulada en funció del temps, $Q(t)$, (Viayna, 2000).

Pot observar-se que la corba és convexa en els primers temps del procés i després es transforma en lineal. Lògicament, això és degut a que en els primers temps no es troba en estat d'equilibri estacionari. En funció del temps, la velocitat de permeació és constant, la corba és pràcticament lineal i s'arriba a l'estat d'equilibri estacionari (veure figura 26).

Si extrapolem la recta representativa del procés de permeació en estat d'equilibri estacionari fins a l'eix d'abscisses, el valor de la quantitat d'actiu permeada acumulada val zero, i el temps en el qual es compleix aquest fet equival al temps de latència (T_l).

En conseqüència, el temps de latència indica el temps que es tarda, des de l'inici de l'experiència, a arribar a l'estat d'equilibri estacionari.

1.3.3.4. FACTORS QUE INFLUEIXEN EN EL PAS DE LES SUBSTÀNCIES ACTIVES A TRAVÉS DE LA PELL

Existeixen diferents factors que influeixen en el pas dels actius a través de la pell.

Aquests factors els podem dividir en:

- Factors fisiològics i patològics.
- Factors fisicoquímics.

Factors fisiològics i patològics

a) Estat de la pell: La pell actua de barrera protectora i qualsevol agressió, erupció o lesió que alteri la seva integritat, farà augmentar la seva permeabilitat.

b) Edat de la pell: Existeix una variació de la permeabilitat en funció de l'edat. Així, en nens la permeabilitat a través de la pell és superior a la dels adults (Ritschel i cols., 1988), degut a un major contingut lipídic de la mateixa i a que l'estrat corni encara es troba en formació (Williams i cols., 1988), mentre que en edats avançades, la permeabilitat disminueix degut a una atròfia epidèrmica i una disminució del flux.

c) Patologies de la pell: Qualsevol patologia o lesió que alteri la integritat o continuïtat de la pell afectarà lògicament a l'efecte barrera i, en conseqüència, suposarà un augment de la permeabilitat.

d) Flux sanguini: Un increment del flux sanguini comporta un increment de la velocitat de les molècules que difonen degut a una diferència de gradient de concentració superior (Ritschel AW., 1971).

e) Zona d'aplicació: La permeabilitat intraindividual de la pell humana presenta diferències, segons les regions de l'organisme (Ritschel AW., 1971) degut a diferències de gruix i a la menor o major vascularització.

f) Metabolisme: L'epidermis presenta una activitat enzimàtica, i en la superfície de la pell trobem reaccions d'oxidació i reducció, reaccions hidrolítiques i reaccions de conjugació.

Factors fisicoquímics

a) *Hidratació de la pell*: La hidratació de l'estrat corni augmenta el percentatge d'absorció percutània (Ritschel AW., 1988). En qualsevol cas, el mecanisme a través del qual es produeix aquest efecte resta incert (Elias i cols., 1981).

b) *Temperatura de la pell*: Un increment de la temperatura de la pell suposa un augment del flux sanguini i, per tant, de la velocitat d'absorció de l'actiu.

c) *pH de la pell*: La pell té un pH de 5,5-6,0. Aquestes condicions de pH afecten a la magnitud de dissociació de l'actiu i, per tant, a la capacitat de penetració a través de la membrana. Les molècules no ionitzades presenten més facilitat de penetració, encara que la velocitat de permeació no és necessària proporcionalment a la concentració de la forma no ionitzada en el vehicle (Menzel i cols., 1978).

d) *Coefficient de repartiment*: El coeficient de repartiment entre la capa còrnia i el vehicle aplicat a la pell és un factor de gran importància, donat que l'estrat corni es comporta com una membrana lipídica (Leeson i cols., 1990). Generalment, amb el coeficient de repartiment pròxim a la unitat s'obtindrà una permeació adequada de l'actiu a través de la pell, mentre que amb coeficients per sota d'aquest valor, les molècules són massa solubles en aigua per poder-se dissoldre a la capa còrnia, i amb coeficients de repartiment molt elevats, aquestes molècules quedaran retingudes a nivell de la capa còrnia o presentaran dificultats per travessar les capes inferiors de caràcter més hidròfil (Leeson i cols., 1990).

e) *Constant de permeabilitat de l'actiu*: La constant de permeabilitat és una constant de velocitat (Shaw i cols., 1991) que depèn al mateix temps de la constant de difusió (D) i del coeficient de repartiment (K), d'acord amb la següent equació. Al mateix temps la constant de difusió (D) ve afectada pel pes molecular de l'actiu (Ritschel i cols., 1988). Aquesta constant disminueix si augmenta el pes molecular, segons la *Llei de Stokes-Einstein*:

$$D = \frac{KT}{6\pi r\eta}$$

On:

K és la constant de *Boltzmann*

T és la temperatura absoluta

r és el radi de les partícules

η és la viscositat del medi

f) *Concentració d'actiu*: La penetració de l'actiu es produeix per difusió passiva (Leeson TS., 1990) i, per tant, depèn del gradient de concentracions que es produeix entre el

vehicle i les capes de pell. Aquesta concentració es refereix a les molècules dissoltes en el medi.

g) Vehicle: El vehicle en l'experiència pot modificar l'absorció de l'actiu per dues raons. Per una part, la interacció del vehicle-actiu i per l'altra, degut a la capacitat d'alguns vehicles per provocar canvis a l'estructura de la pell, com el grau d'hidratació (Ritschel i cols., 1988).

CAPÍTOL 2

OBJECTIUS I PLA DE TREBALL

OBJECTIU I PLA DE TREBALL

Com ja s'ha comentat anteriorment, el tractament actual per a la leishmaniosi cutània encara té moltes mancances, sigui per l'alta toxicitat dels fàrmacs existents o pel baix compliment degut a la poca accessibilitat o aplicacions complicades i doloroses.

En la revisió bibliogràfica realitzada en aquest treball hem pogut observar que diferents autors consideren l'aplicació tòpica com la utilització més segura i fàcil pel tractament d'aquesta patologia, i en la majoria dels casos el fàrmac utilitzat en aquest tipus d'aplicacions ha sigut la paromomicina.

Per tant, el principal objectiu d'aquesta tesi doctoral ha sigut desenvolupar, caracteritzar i avaluar *in vitro* – *ex vivo* una nova formulació tòpica pel tractament de la leishmaniosi cutània.

Per aconseguir aquest objectiu, la part experimental d'aquest treball inclou els següents apartats:

1. Actualitzar el coneixement sobre les alternatives terapèutiques per a la leishmaniosi.
2. Desenvolupar i validar una metodologia analítica per quantificar la paromomicina en els estudis d'alliberació i permeació.
3. Dissenyar, elaborar i caracteritzar una nova formulació nanoestructurada en forma de gel utilitzant la paromomicina com a fàrmac anti-*Leishmania*.
4. Estudar comparativament la formulació dissenyada en front a altres de caràcter convencional o ja utilitzades en assajos clínics.
5. Realitzar estudis d'alliberació de la paromomicina en les formulacions desenvolupades mitjançant cèl·lules de difusió de Franz i membranes artificials.
6. Realitzar estudis de permeació de les formulacions desenvolupades a través de pell humana utilitzant cèl·lules de difusió de Franz.
7. Estudar *in vitro* la citotoxicitat i l'activitat anti-leishmanicida de les formulacions elaborades.
8. Estudar la localització subcel·lular i investigar el procés de captació de liposomes per part dels macròfags utilitzant *quantum dots* i altres marcadors cel·lulars mitjançant la microscòpia confocal

CAPÍTOL 3

RESULTATS

RELACIÓ DE TREBALLS CIENTÍFICS PUBLICATS

- **Alba Pujol** and Cristina Riera. Review and new therapeutic alternatives for the treatment of cutaneous Leishmaniasis. *Recent Advances in Pharmaceutical Sciences IV*, 2014; 0000-0000 ISBN: 978-81-308-0000-0.
- **A. Pujol-Brugués**, A.C. Calpena-Campmany, C. Riera-Lizandra, L. Halbaut-Bellowa, B. Clares-Naveros. Development of a liquid chromatographic method for the quantification of paromomycin. Application to in vitro release and ex vivo permeation studies. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 2014; 133, 657–662.
Revista de 2on quartil amb un índex d'impacte de 2.129.
- **Alba Pujol Brugués**, Beatriz Clares Naveros, Ana C. Calpena Campmany, Pilar Hernández Pastor, Roser Fisa Saladrigas, Cristina Riera Lizandra. Developing cutaneous applications of paromomycin entrapped into stimuli-sensitive block copolymer nanogel dispersions. *Nanomedicine* (Accepted 2014).
Revista del 1er quartil amb un índex d'impacte de 5.824.
- **Alba Pujol**, Patricia Urbán, Cristina Riera, Roser Fisa, Israel Molina, Fernando Salvador, Joan Estelrich, Xavier Fernández-Busquets. Application of Quantum Dots to the Study of Liposome Targeting in Leishmaniasis and Malaria. *International Journal of Theoretical and Applied Nanotechnology*, 2014; 2 (1), 163-170.

3.1 REVIEW AND NEW THERAPEUTIC ALTERNATIVES FOR THE TREATMENT OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS

Les leishmaniosis són un conjunt de malalties causades per protozous del gènere *Leishmania*. Depenent de l'especie de *Leishmania* causant de la infecció, la interacció entre paràsit i hoste i la resposta immune, cel·lular i humoral de l'hoste es poden presentar diferents manifestacions clíniques, la leishmaniosi cutània (LC), la leishmaniosi muco-cutània i la leishmaniosi visceral (LV).

Aquest treball s'ha centrat en la LC degut a la seva problemàtica socio sanitària, ja que és una malaltia no mortal però que pot deixar importants cicatrius i desfiguracions a la cara que estigmatitzen, la qual cosa porten a conseqüències socials i econòmiques contribuint així a incrementar la pobresa.

Per altra banda, el tractament de primera línia per aquesta malaltia consisteix en l'administració endovenosa o intramuscular i l'intralesional d'antimonials pentavalents, compostos que tenen una elevada toxicitat, la qual cosa és necessària la hospitalització dels pacients i resulta molt costós en els països en vies de desenvolupament.

Per aquesta raó s'han revisat diferents estudis sobre fàrmacs i tractaments més eficaços, amb menys efectes adversos i d'administració no complicada.

Les investigacions recents mostren que la via d'administració tòpica pot ser molt prometedora pel futur del tractament de la LC.



Research Signpost
37/661 (2), Fort P.O.
Trivandrum-695 023
Kerala, India

Recent Advances in Pharmaceutical Sciences IV, 2014: 0000-0000 ISBN: 978-81-308-0000-0
Editors: Diego Muñoz-Torrero, Manuel Vázquez-Carrera, and Joan Estelrich

12. Review and new therapeutic alternatives for the treatment of cutaneous Leishmaniasis

Alba Pujol and Cristina Riera

Unitat de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n. E-08028 Barcelona, Spain

Abstract. Leishmaniasis comprises a group of diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* and has two basic clinical forms, visceral *Leishmaniasis* and cutaneous *Leishmaniasis*. The clinical features of *Leishmaniasis* depend on the species of *Leishmania*, the interaction between host and parasite and the immune response.

This work focuses on cutaneous leishmaniasis because although it is not a deadly disease it results in significant scars and facial disfigurements, thus being clinically important. Furthermore, the first-line treatment consists of intravenous or intramuscular administration of intralesional pentavalent antimonials, which are highly toxic, making hospitalization of patients compulsory during treatment, with the associated financial costs. Herein, we review studies on drugs and treatments with fewer side effects and easier routes of administration such as topical administration. Recent research shows that the topical route of administration holds promise for the future treatment of cutaneous leishmaniasis.

Correspondence/Reprint request: Dr. Cristina Riera. Unitat de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain. E-mail: mcriteria@ub.edu

Introduction

1.1. Overview of leishmaniasis

Leishmaniasis comprises a group of diseases caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania*. There are two main clinical forms, visceral leishmaniasis (VL) and cutaneous leishmaniasis (CL). It is transmitted by vectors of the genus *Phlebotomus* and *Lutzomyia* in Europe and America respectively, and a large number of vertebrates act as reservoirs. It is considered a zoonosis in most cases, and can affect around 100 species of animals including humans [1].

The World Health Organization (WHO) has reported a wide distribution of leishmaniasis, extending from South America, Africa and Asia to Europe. The disease is endemic in 88 countries, 72 of which are developing countries (Fig. 1 and 2). According to the WHO, as many as 12 million people are believed to be currently infected, with about 1–2 million estimated new cases occurring every year of which 500,000 are VL (90% in India and Sudan) and 1,000,000 are CL (90% Afghanistan, Saudi Arabia, Algeria, Brazil, Iraq, Iran, Syria and Sudan). Furthermore, a total of 350 million people live in risk areas.

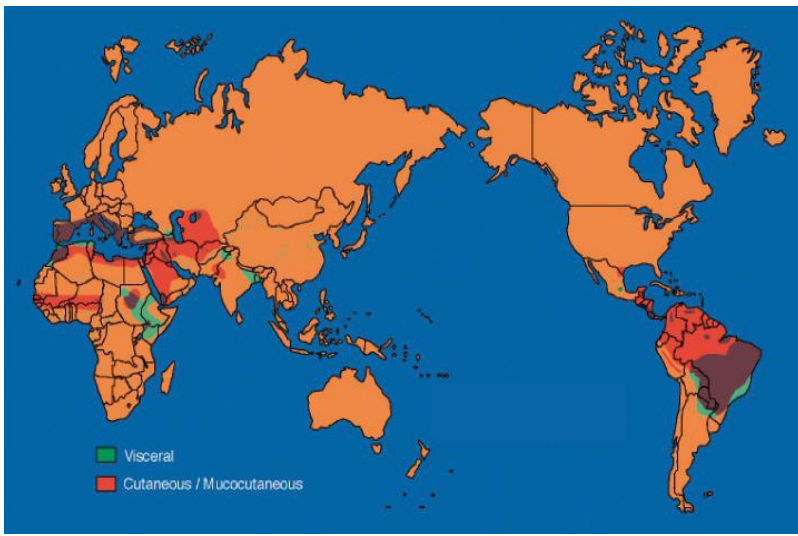


Figure 1. Areas of the world affected by leishmaniasis. The visceral form is shown in green and the cutaneous and mucocutaneous form in red (WHO).



Figure 2. Global distribution of cutaneous leishmaniasis (WHO).

Aetiological agent

The genus *Leishmania* contains a number of species. Its taxonomic status is as follows (Lainson and Shaw, 1987):

Phylum: *Sarcomastigophora* (Honigberg & Balamuth, 1963).

Subphylum: *Mastigophora* (Diesing, 1866).

Class: *Zoomastigophorea* (Calkins, 1909).

Order: *Kinetoplastida* (Vickerman, 1976).

Suborder: *Trypanosomatina* (Kent, 1880).

Family: *Trypanosomatidae* (Gobben, 1905).

Genus: *Leishmania* (Ross, 1903).

About 29 species of *Leishmania* have been described, of which 21 have been isolated from humans. These are responsible for producing the different clinical forms of the disease with a wide range of clinical symptoms. The species are grouped according to their geographical distribution in the Old and the New World, and their main clinical form: visceral, cutaneous or mucocutaneous. Cutaneous leishmaniasis is the most common form. Visceral leishmaniasis is the most severe form, in which vital organs of the body are affected. The same species can be found in both geographical areas, and can be responsible for more than one clinical form (Table 1).

Table 1. Classification of different species of *Leishmania* in human species, geographical distribution and clinical form (WHO, 2010).

<i>Leishmania</i> found in humans				
Subgenus	<i>L.(Leishmania)</i>	<i>L.(Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Old World	<i>L. donovani</i>	<i>L. major</i>		
		<i>L. tropica</i>		
		<i>L. killicki^a</i>		
		<i>L. aethiopica</i>		
		<i>L. infantum</i>		
New World	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i>	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. mexicana</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. pifanoi^a</i>	<i>L. panamensis</i>	
		<i>L. gamhami^a</i>	<i>L. shawi</i>	
		<i>L. amazonensis</i>	<i>L. naiffi</i>	
			<i>L. lainsoni</i>	
			<i>L. lindenbergi</i>	
			<i>L. peruviana</i>	
			<i>L. colombiensi^l</i>	
Principal tropism	Viscerotropic	Dermotropic	Dermotropic	Mucotropic

^aSpecies status is under discussion

^bTaxonomic position is under discussion

1.2. Morphology and life cycle

The life cycle of *Leishmania* involves transfer between a vertebrate host and an invertebrate host, with two main morphological forms:

- **Amastigote form:** it is reproduced within macrophages and cells of the mononuclear phagocyte system of vertebrate host. It is oval, without a flagellum, and is therefore immobile. It measures about 2.5 to 7 µm in diameter. The cytoplasm contains a nucleus and kinetosomes (Fig. 3).

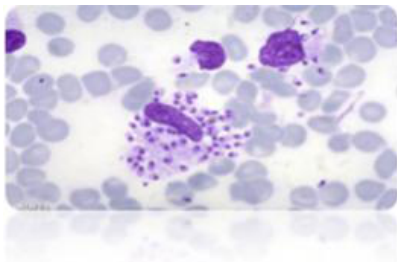


Figure 3. Amastigote form (WHO).

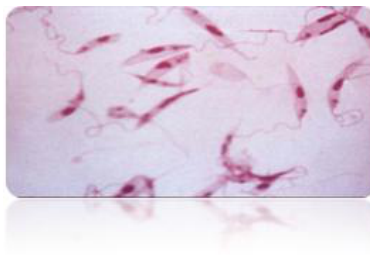


Figure 4. Promastigote form (WHO).

- **Promastigote form:** the parasite is a motile form with an anterior flagellum that develops in the sandfly, the insect vector. It is larger than the amastigote form. It has a central oval nucleus and prenuclear kinetoplasts (Fig. 4).

The cycle begins when the vector of female sand flies (invertebrate host) ingests blood of the vertebrate host and inoculates infective promastigotes, also called metacyclics. These promastigotes are phagocytized by macrophages in the skin, mucosal membranes and viscera. Within the cytoplasm of macrophages, the promastigotes transform into amastigotes. The amastigotes multiply until the cell explodes. Free parasites invade other macrophages or spread directly through the skin or the systemic circulation. Macrophages loaded with amastigotes can be re-ingested by the vector at a recent sting and then transform into promastigotes in the digestive tract. The promastigote form develops into a metacyclic infectious form over approximately 10 days.

1.3. Clinical manifestations of leishmaniasis

The clinical manifestations of leishmaniasis are varied and depend on the species of *Leishmania*, the interaction between host and parasite and the host immune response [2-4]. This polymorphism is grouped into three different clinical forms:

Cutaneous leishmaniasis

There is a wide variety of clinical presentations. A ‘classical’ lesion starts as a papule or nodule at the site of inoculation; it grows slowly, taking at least 1 week to reach its final size. Generally it is a single lesion located on the face, arms or legs. A crust develops centrally, which may fall away, exposing

an ulcer up to 5 cm in diameter with a raised edge and variable surrounding induration, which heals gradually over months or years, leaving a depressed scar with altered pigmentation. Satellite nodules at the edge of the lesion are common. Occasionally, it may be complicated with bacterial superinfection or regional lymphadenopathy [5] (Fig. 5A).

Mucocutaneous leishmaniasis

This clinical form occurs in just a few species of the New World. Studies in Brazil have shown that mucocutaneous leishmaniasis can present from several months to 20 or more years after a cutaneous lesion. Nasal lesions are always present, with nodules and infiltration of the anterior cartilaginous septum, leading to obstruction of the nostril and, later, perforation of the septum with collapse and broadening of the nose. In one third of patients, other sites are involved, in the following descending order of frequency: the pharynx, palate, larynx, trachea and upper lip. Mucocutaneous leishmaniasis almost never heals spontaneously. Secondary bacterial infections are frequent, intercurrent pneumonia being the commonest cause of death (Fig. 5B).

Visceral leishmaniasis or Kala azar

This is the most severe form of leishmaniasis. Clinically it is characterized by the appearance of fever, vomiting, shivering, diarrhoea, weight loss and anaemia. The common clinical signs are non-tender splenomegaly, with or without hepatomegaly, wasting and pallor of mucous membranes. In more advanced cases clotting disorders occur. Without treatment, it can lead to death (Fig. 5C).



Figure 5. Cutaneous leishmaniasis (A), mucocutaneous leishmaniasis (B), visceral leishmaniasis [6] (C).

1.4. Cutaneous leishmaniasis: its problematic healthcare

Cutaneous leishmaniasis is not deadly, and some forms may heal spontaneously with time, but others may leave significant scarring, resulting in disfigurements to the face that are a barrier to finding work or marriage, especially for women. This in turn leads to social and economic consequences and increased poverty [7].

Another important point to remember from health and epidemiological points of view is that patients with lesions act as reservoirs of infection, and thus without treatment the potential for transmission increases. Unfortunately the high cost of treatment means that in many cases it does not reach poor people [7].

According to the WHO (2010), the main problem with cutaneous leishmaniasis relates to access to treatment, because the cost of hospitalization is added to the drug and may not be affordable in developing countries. For this reason and because leishmaniasis is one of a group of neglected diseases, the Drugs For Neglected Disease Initiative (DNDi) has highlighted the urgent need for affordable and effective drugs with short treatment schedules and uncomplicated management (such as topical administration) that do not require complex health infrastructures.

The first-line treatment of cutaneous leishmaniasis is based on pentavalent antimonial drugs that can be administered in intravenous or intramuscular form or by intralesional injection, depending on the severity of the injury and the species responsible. These drugs are highly toxic, so it is necessary to hospitalize patients, which is very expensive in developing countries. Drugs with fewer toxic effects, such as liposomal amphotericin B (Ambisome®), can be administered in cases of complicated cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, but these are costly and are not widely available in countries with a high poverty index.

Herein we review existing conventional treatments currently available for cutaneous leishmaniasis and describe the different drugs and therapies currently used, as well as the different treatment regimens specific to the Old World and the New World. Also, we report on new treatments for cutaneous leishmaniasis that are currently being tested and studied: studies of new drugs, formulations, and drug combinations.

2. Conventional treatments for cutaneous leishmaniasis

There are currently several therapies for the treatment of leishmaniasis. The most commonly used compounds are pentavalent antimonials, and these are considered the drugs of first choice in the treatment and control of

leishmaniasis. Alternatives include the liposomal amphotericin B, the pentamidine paramomycin, drugs derived from imidazole, and an orally administered drug, miltefosine [8].

Treatment of cutaneous leishmaniasis involves a combination of topical, systemic and non-pharmacological approaches. The therapeutic decision depends on the infecting species and geographic region.

2.1. Pentavalent antimonials

Two pentavalent antimonials are available: sodium stibogluconate (SSG, Pentostam[®]) (Fig. 6A) and meglumine antimoniate (AMG, Glucantime[®]) (Fig. 6B). These have been used since the 1940s and are the first-line therapeutic agents for cutaneous leishmaniasis.

They cannot be administered orally. The recommended dose is 20 mg/kg/day sodium stibogluconate intramuscularly or intravenously for 20 days or 60 mg/kg/day of meglumine antimoniate. The principal problems encountered are their cost, toxicity and emergence of resistance. Intralesional administration at a dose of 0.5 to 5 mL injected at the base of the lesion is also an option [9].

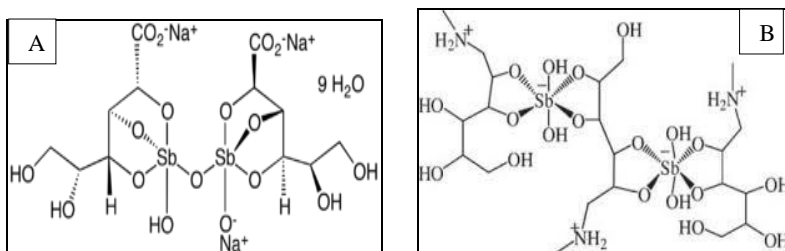


Figure 6. **A.** Sodium stibogluconate (Pentostam[®]). **B.** Meglumine antimoniate (Glucantime[®]).

2.2. Amphotericin B

This drug has low antifungal spectrum activity and is derived from *Streptomyces nodosus*. It shows high leishmanicidal activity by joining the parasite lipids. It is a second-line drug (Fig. 7).

A test dose of 1 mg, given by infusion, is recommended, followed by a full dose 4–6 h later. Infusion reactions are common. Nephrotoxicity is also common. Treatment should always be given in hospital to allow continuous monitoring of patients [9].

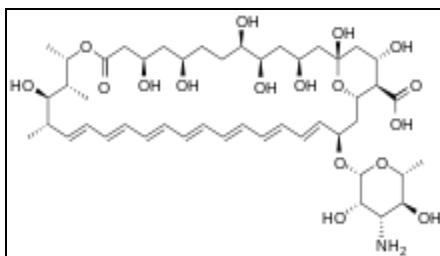


Figure 7. Amphotericin B.

2.3. Pentamidine

This drug is an antiprotozoal compound that is considered a second-line drug with significant toxic effects (damage to the pancreas, kidney and bone marrow). The drug is given intramuscularly or, preferably, by intravenous infusion (Fig. 8).

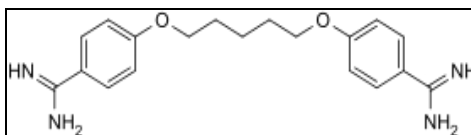


Figure 8. Pentamidine.

2.4. Paromomycin

Paromomycin (aminosidine) is an aminoglycoside antibiotic, first isolated from *Streptomyces krestomuceticus* in the 1950s. It is usually administered intramuscularly. Its mechanism of action is inhibition of mitochondrial activity of *Leishmania*. It acts synergistically with antimonials and is often used in combination or as the therapy of second choice (Fig. 9).

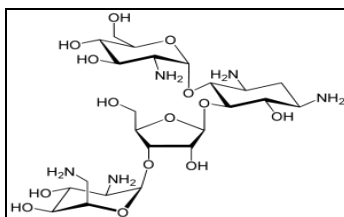


Figure 9. Paromomycin.

2.5. Medicines derived from imidazole

– **Ketoconazole**: This is an antifungal drug that inhibits the synthesis of ergosterol in the membrane of the parasite. It has been proven effective in the treatment of cutaneous leishmaniasis (Berman, 1997) (Fig. 10).

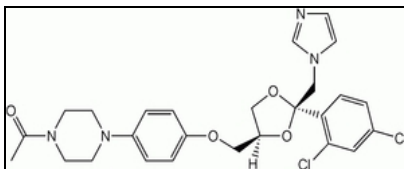


Figure 10. Ketoconazole.

– **Itraconazole**: This is another antifungal drug with a similar effect to ketoconazole (Davidson, 1998), but improved pharmacokinetics (Fig. 11).

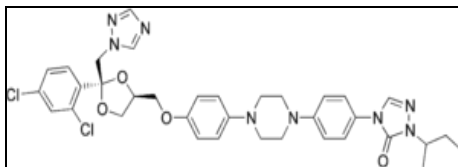


Figure 11. Itraconazole.

2.6. Miltefosine

This is an alkyl phospholipid (hexadecylphosphocholine) that was originally developed as an oral anticancer drug but was shown to have antileishmanial activity. It was the first oral agent effective against leishmaniasis and should only be administered once a day. Unlike other antileishmanial drugs, its mechanism of action involves disrupting cellular signaling pathways and the synthesis of cell membranes of the parasite through different mechanisms. Unfortunately the development of resistance is common [10, 11] (Fig. 12).

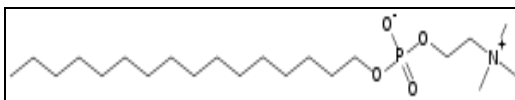


Figure 12. Miltefosine.

3. Treatment of cutaneous leishmaniasis in the Old and the New World

The choice of treatment is based mainly on the risk-benefit ratio for each patient, with different therapeutic interventions in the Old and the New World [8].

3.1. Cutaneous leishmaniasis in the Old World

Old World cutaneous leishmaniasis is caused by five species of *Leishmania*: *L. infantum*, *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica* and *L. donovani*. These are mainly species of the Mediterranean coast, the Middle East and Africa.

Cutaneous lesions caused by *L. infantum* are seen especially in the Mediterranean basin. *L. infantum* is the most frequent cause of cutaneous leishmaniasis in southern Europe. The lesions are usually single nodules, with little inflammation but triggering an ulcer. The lesions heal spontaneously within about 1 year and seem to confer immunity [8].

L. tropica, which causes anthroponotic or urban anthroponotic cutaneous leishmaniasis, is distributed mainly in Morocco, Saudi Arabia and West Asia. This leishmaniasis is characterized by the presence of multiple painless and dry ulcers of the skin. These generally heal spontaneously within a year, often leading to disfiguring scars [1].

Cutaneous leishmaniasis caused by *L. major* (previously known as zoonotic or rural zoonotic cutaneous leishmaniasis) is a rural zoonosis typical of North Africa, West Asia and Asia Minor. Like other forms of cutaneous leishmaniasis it is characterized by painless lesions and often severe inflammation and ulceration. These lesions heal after 2–8 months. Multiple lesions may occur, especially in nonimmune immigrants; these are slow to heal and can leave large disfiguring or disabling scars [1].

Finally, cutaneous leishmaniasis, caused by *L. aethiopica* (Ethiopia, Kenya and Sudan), results mainly in localized cutaneous nodular lesions. A less frequent complication is mucocutaneous lesions of the oropharynx, causing a distortion of the nostrils of the nose and lips. Most lesions develop slowly and can spread locally. Ulceration is late or absent. Spontaneous healing usually occurs within 2–5 years.

Established criteria for topical treatment

According to WHO guidelines, local treatment of the lesion is indicated in patients who meet the following requirements [8]:

- Confirmed or strongly suspected infection with *L. major*.
- Fewer than four lesions requiring immediate treatment.
- Lesions < 5 cm in diameter.
- No potentially disfiguring or disabling lesions (face, joints, toes, fingers).
- No immunosuppression.
- Possibility of follow-up.

The options for topical treatment are (Table 2) [8]:

Intralesional therapy with pentavalent antimonials: injected at a dose of 0.5 to 5 mL at the base and margins of the lesion between 3 and 7 days. Infiltration can be performed daily, on alternate days or weekly until healing of the lesion. These injections are effective but repetitive administration may lead to resistance.

Table 2. Recommendations for treatment and dosage of Old World cutaneous leishmaniasis (WHO 2010).

Recommended treatment regimens for Old World cutaneous leishmaniasis (not ranked for preference)	
Local therapy	
<i>L. major</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • 15% paromomycin/12% methylbenzethonium chloride ointment twice daily for 20 days. • Intralesional antimonials, 1-5 mL per session plus cryotherapy (liquid nitrogen: -195 °C), both every 3-7 days (1-5 sessions). • Thermotherapy, 1-2 sessions with localized heat (50 °C for 30 s). 	
<i>L. tropica, L. aethiopica* and L. infantum*</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • 15% paromomycin/12% methylbenzethonium chloride ointment, as above. • Intralesional antimonials plus cryotherapy, as above. • Thermotherapy, as above. • Intralesional antimonials, alone, as above. • Cryotherapy, alone, as above. 	
Systemic therapy	
<i>L. major</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Fluconazole, 200 mg oral daily for 6 weeks. • Pentavalent antimonials, 20 mg Sb⁵/kg per day intramuscularly or intravenously for 10-20 days. • Pentavalent antimonials, 20 mg Sb⁵/kg per day intramuscularly or intravenously plus pentoxifyline, 400 mg three times a day for 10-20 days. 	
<i>L. tropica and L. infantum*</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Pentavalent antimonials, 20 mg Sb⁵/Kg per day intramuscularly or intravenously for 10-20 days. • Pentavalent antimonials, 15-20 mg Sb⁵/Kg per day intramuscularly or intravenously for 15 days plus oral allopurinol 20 mg/Kg for 30 days, to treat leishmaniasis recidivans caused by <i>L. tropica</i>. 	
<i>L. aethiopica</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Pentavalent antimonials 20 mg Sb⁵/Kg per day intramuscularly or intravenously plus paromomycin, 15 mg (11 mg base)/kg per day intramuscularly for 60 days or longer to treat diffuse cutaneous leishmaniasis. 	
* Few data are available on therapy for cutaneous leishmaniasis due to <i>L. infantum</i> and <i>L. aethiopica</i> .	

Paromomycin ointments: either a formulation of 15% paromomycin plus 12% methyl benzethonium chloride (CLMB) or a formulation of 0.5% gentamicin and 15% paramomycin in paraffin, twice daily for up to 20 days.

Thermotherapy: it consists of one or two applications of localized heat at 50 °C for 30 seconds. One of the drawbacks of this therapy is the high cost of the device and also the second-degree burns that occur. Local anaesthesia is therefore necessary.

Cryotherapy: cryotherapy with liquid nitrogen (−195 °C) applied once or twice a week for up to 6 weeks. The application of liquid nitrogen requires specific devices and expensive specialist medical equipment. Although it is highly effective it is less effective than intralesional therapy with pentavalent antimony.

Local therapy is an attractive option with little toxicity, but thermotherapy and especially intralesional treatment cause significant discomfort.

3.2. Cutaneous leishmaniasis in the New World

Cutaneous leishmaniasis of the New World refers to infection caused by species found in Mexico, Central America and South America. These species belong to both the *Leishmania* and the *Vianna* subgenera, as follows: *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) panamensis*, *L. (V.) guyanensis* and *L. (V.) peruviana* [1].

The clinical manifestations are similar to cutaneous leishmaniasis in the Old World but are usually more aggressive and tend to become chronic. Lesions caused by *L. mexicana* generally have a benign evolution, whereas *L. amazonensis* causes a single or multiple lesions that are resistant to treatment and have a high tendency to evolve to diffuse lesions.

On the other hand, species of the subgenus *Vianna* tend to form mucocutaneous lesions. These are normally single or multiple lesions that heal routinely, in the case of *L. braziliensis*, or have a low cure rate (*L. panamensis*, *L. guyanensis*). If the lesion is located near a lymphatic chain or if treatment is inadequate the mucocutaneous form can develop.

Finally, *L. peruviana* is the most benign species because healing is spontaneous and there is no tendency to cause the mucocutaneous form.

Local therapy is considered inadequate for the treatment of cutaneous leishmaniasis in the New World when caused by *L. braziliensis* or

L. panamensis, due to the potential risk of spread to mucous membranes. Topical treatment is currently considered acceptable in specific cases of cutaneous leishmaniasis in the New World.

Experience with local therapy for cutaneous leishmaniasis in the New World is limited. The criteria for the use of local treatment are similar to those of the Old World. The proposed options are thermotherapy and paramomycin. One to three applications of localized heat (50 °C for 30 seconds) proved to be 70% effective in studies in Colombia and Guatemala, 3 months after treatment. On the other hand, 15% and 12% paramomycin ointment applied twice daily for 20 days was 70–90% effective against cutaneous leishmaniasis caused by *L. mexicana*, *L. panamensis* and *L. braziliensis* in Ecuador and Guatemala.

The options for systemic treatment are (Table 3) [8]:

Pentavalent antimonials: The cure rate is very high at around 77% and 90% when pentavalent antimonials are administered at a dose of 20 mg/kg/day for 20 days intravenously or intramuscularly respectively. They are most effective against cutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis* and *L. panamensis*.

Pentamidine: Administered at a dose of 3–4 mg/kg on alternate days for a total of three or four doses intramuscularly, and is as effective as pentavalent antimonials against cutaneous leishmaniasis caused by *L. panamensis* or *L. guayanensis*. However, it is less effective than antimonials in the case of *L. braziliensis*.

Miltefosine: Oral miltefosine at a dose of 2 mg/kg/day for 28 days is effective against cutaneous leishmaniasis caused by *L. panamensis* but not against *L. braziliensis* or *L. mexicana*, for which the cure rate is less than 60%. The response of *L. braziliensis* cutaneous leishmaniasis to miltefosine may vary depending on the area.

Ketoconazole: At a dosage of 600 mg daily for 28 days this is highly effective (76–90%) against *L. panamensis* and *L. mexicana* in Guatemala and Panama.

Table 3. Recommendations for treatment and dosage of New World cutaneous leishmaniasis (WHO, 2010).

Recommended treatment regimens for New World cutaneous leishmaniasis (not ranked for preference)**Local therapy, all species**

- 15% paromomycin and 12% methylbenzethonium chloride ointment twice daily for 20 days.
- Thermotherapy: 1-3 sessions with localized heat (50 °C for 30 s).
- Intralésional antimonials: 1-5 mL, per session every 3-7 days (1-5 infiltrations).

Systemic*L. mexicana*

- Ketoconazole: adult dose, 600 mg oral daily for 28 days.
- Miltefosine: 2.5 mg/Kg per day orally for 28 days

L. guyanensis and *L. panamensis*

- Pentamidine isothionate, intramuscular injections or brief infusions of 4 mg salt/kg per dose every other day for 3 doses*
- Pentavalent antimonials: 20 mg Sb⁷/Kg per day intramuscularly or intravenously for 20 days*
- Miltefosine: 2,5 mg/kg per day orally for 28 days.

L. braziliensis

- Pentavalent antimonials: 20 mg Sb⁷/kg per day intramuscularly or intravenously for 20 days.
- Amphotericin B deoxycholate: 0.7 mg/kg per day, by infusion, for 25-30 doses.
- Liposomal amphotericin B: 2-3 mg/kg per day, by infusion, up to 20-40 mg/kg total dose.

L. amazonensis, *L. peruviana* and *L. venezuelensis*

- Pentavalent antimonials: 20 mg Sb⁷/kg per day intramuscularly or intravenously for 20 days.

Relapse treatment:

- Amphotericin B deoxycholate, as above.
- Pentavalent antimonials: as above plus topical imiquimod every other day for 20 days.
- Liposomal amphotericin B: 3 mg/kg per day, by infusion, up to 20-40 mg/kg total dose may be considered.

* The efficacy of pentamidine, and pentavalent antimonials depends on the geographical area.

4. New treatments for cutaneous leishmaniasis

4.1. New drugs

Many of the drugs mentioned in the previous section have led to resistance in many species of *Leishmania* and consequently their effectiveness has diminished in areas in which the parasite was previously susceptible to such treatment. For this reason, many research groups have focused on investigating new therapeutic alternatives against leishmaniasis. The following table provides a summary of various natural products that have been reported to have leishmanicidal properties [12] (Table 4):

Table 4. Sources of essential oils with leishmanicidal properties [12].

Family	Species	<i>Leishmania</i> species
Lauraceae	<i>Ocotea duckei</i>	<i>L. infantum</i> and <i>amazonensis</i>
Rutaceae	<i>Dictyoloma peruviana</i>	<i>L. amazonensis</i> and <i>braziliensis</i>

Verbenaceae	<i>Lyppia alba</i>	<i>L. infantum</i>
Zingiberaceae	<i>Curcuma longa</i>	<i>Leishmania spp.</i>
Myristicaceae	<i>Myristica malabàrica</i>	<i>L. donovani</i>
Pinaceae	<i>Cedrus atlantica</i>	<i>Leishmania spp.</i>

Moreover, the importance of metal compounds in antiparasitic development is well known. For example, in vitro and in vivo studies of *L. major* and *L. tropica* showed greater susceptibility to zinc than pentavalent antimony [13].

Finally, a recent study examined the antileishmania effectiveness of a drug called buparvacuona, a hydroxynaphthoquinone used for the treatment of theileriosis in cattle. Specifically, the efficacy and toxicity of different topical formulations of buparvacuona against *L. major* were tested in vivo in BALB/c mice. The results of this study were encouraging, as parasite load and lesion size were reduced, and therefore the introduction of a topical formulation of this type would be a significant advance for the treatment of simple cutaneous lesions [14].

The search for new drugs with antileishmanial activity is essential for new treatment options for cutaneous leishmaniasis. Avoiding the use of parenteral antimony would greatly increase patient compliance and reduce treatment costs.

4.2. New formulations

As mentioned above, the standard topical treatment used at present is intralesional therapy with pentavalent antimony. However, this requires multiple injections, which are painful and not tolerated by most patients. Furthermore, they are not always effective, have many adverse effects and can lead to the development of resistance. Alternative topical therapies mainly contain paramomycin e.g. a formulation called WR 279,396, a hydrophilic formulation of paramomycin 15% and gentamicin 0.5% that is currently in a Phase III trial in Tunisia [15].

Other researchers studied the permeability of the skin and the leishmanicidal activity of a hydrophilic gel containing 10% paramomycin in vivo in experimental mice infected with *L. major* and compared its activity with parenteral pentavalent antimony. The gel showed higher efficiency than the pentavalent antimony administered intravenously. The same formulation was tested on hamsters infected with *L. braziliensis* and showed similar efficacy to that of parenteral antimony [16].

Other authors studied a new topical formulation containing amphotericin B and evaluated its leishmanicidal effectiveness in CBA mice as a model for

human cutaneous leishmaniasis. For the first time, they showed that amphotericin B administered topically as a complex with phospholipids or with cholesterol sulphate in the presence of ethanol can penetrate the skin and act in a localized manner even at very low concentrations, which therefore makes it less toxic [17].

Liposomes have been widely used as drug delivery systems to treat infections caused by bacteria, fungi, viruses and parasites. These are nanometric spherical vesicles containing one or more phospholipid bilayers [18]. Their molecular architecture can capture a wide variety of active agents, thus providing a means of transport to bring drugs to their sites of action at appropriate concentrations, in turn ensuring a safe and effective pharmacological response. Furthermore, they are biodegradable, non-toxic and non-immunogenic. A further advantage is the ability of liposomes to isolate active substances during their passage through the organism, protecting them from enzymatic actions and also protecting the organism against toxic effects.

Liposomal formulations have demonstrated the ability to increase the penetration of drugs through the skin in comparison to conventional formulations. In addition, in open injuries, liposomes show the ability to accelerate healing [19].

Various studies have shown promising results when investigating liposomal formulations containing sulphate of paramomycin (PM). In one study liposomal formulations of PM were assessed as topical delivery systems. Two types of liposomes were used: large multilamellar vesicles (MLVs) and large unilamellar vesicles (LUVs). Skin permeation experiments across stripped and normally hairless mouse skin were performed in modified Franz diffusion cells, revealing higher entrapment of paramomycin in LUV compared to MLV and better penetration into the skin with paramomycin liposomal encapsulation. The study concluded that liposomal formulations of paramomycin are an interesting alternative for the treatment of cutaneous leishmaniasis as they increase the skin penetration of paramomycin [20].

In another study, liposomal formulations containing 10% and 15% paramomycin sulphate were developed to evaluate the antileishmanial activity of paramomycin against *L. major*-infected BALB/c mice. The study also evaluated the penetration properties of PM into the skin, as this antibiotic shows a low level of penetration. Such low penetration reduces the effectiveness of paramomycin treatment of some injuries, particularly those that are not ulcerated, and is therefore a major drawback. The overall results of the study showed that liposomes are interesting paramomycin carriers and that liposomal PM could be a suitable candidate for the treatment of cutaneous leishmaniasis [21].

4.3. Combined treatment

Combination therapy provides several advantages: it reduces the duration of treatment, increases compliance, and reduces the dose of each drug, which helps to reduce the cost and side effects of therapy, as well as reducing the risk of emergence of resistance. Various authors have investigated different combination therapies with favorable results. One study verified the effectiveness of a combination of paramomycin gel and oral miltefosine in BALB/c mice infected with *L. major* for the treatment of cutaneous leishmaniasis. Miltefosine was administered orally at 2 mg/kg/day for 10 days while the 10% paramomycin gel was applied twice daily for 10 days. This combination was highly effective, significantly reducing the size of the lesion and the load of parasites in the skin, and leading to complete healing of ulcers, in comparison with oral miltefosine alone [22].

Other drugs such as azithromycin and allopurinol have been studied in the search for new therapies for cutaneous leishmaniasis. One study compared the efficacy and tolerance of azithromycin plus allopurinol with intramuscular Glucantime[®], and found similar results. One of the benefits of allopurinol and azithromycin is that they are less expensive than Glucantime[®] and more readily available in developing countries. Furthermore, they are administered orally and therefore can be considered an alternative option to Glucantime[®] treatment in patients who do not tolerate the latter [23].

Another study evaluated the efficacy of combination with pentoxifylline and Glucantime[®]. Pentoxifylline is an inhibitor of TNF- α that has been shown to enhance the beneficial effects of antimonial compounds. The results of this study indicated that Glucantime[®] with pentoxifylline is more effective than Glucantime[®] alone. However, more tests are needed with different populations of patients with LC to demonstrate the real efficacy of the combination of pentoxifylline and Glucantime[®] and develop specific treatment guidelines [24].

The results of a study that evaluated the effectiveness of a combination of oral ketoconazole with intralesional estibogluconat sodium for the treatment of localized cutaneous leishmaniasis were promising. Furthermore, this combination is easier to use, less aggressive and free of side effects compared to treatment with intralesional pentavalent antimonial compounds [25].

A compound called Imiquimod, an inhibitor of tumor necrosis factor TNF-alpha, is useful in patients with moderate to severe psoriasis and other skin diseases and is currently used for the treatment of cervical warts caused by human papillomavirus infection. In vitro, this drug has proven to be an immunomodulator that activates macrophages to release nitric oxide, thus

killing intracellular *Leishmania* amastigotes. A study evaluating combination therapy with Imiquimod and meglumine antimoniate in patients with cutaneous leishmaniasis who previously had not responded to treatment with meglumine antimoniate alone showed promising results, as all patients responded well to combination therapy [26].

5. Conclusions

Intralesional and systemic therapy with pentavalent antimonials has been the treatment of choice for cutaneous leishmaniasis to date.

The application of paramomycin ointments to localized lesions and those less than 5 cm in diameter was the first attempt at local therapy and indicated the potential benefit of this type of administration.

The search for new drugs with anti-*Leishmania* activity is important for new treatments for CL. Avoiding the administration of derivatives of parenteral antimony greatly increases patient compliance and reduces treatment costs.

Studies of formulations based on liposomes and hydrophilic gels containing paramomycin indicate the effectiveness of these formulations in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis.

Combination treatment has the potential advantages of: shortening the duration of treatment, thereby increasing compliance; reducing the overall dose of medicines, thereby reducing their toxic effects and cost; and reducing the probability of selection of drug-resistant parasites, thereby prolonging the effective life of the available medicines.

Due to the importance of this parasitic disease and the low efficiency of the limited therapies available, the search for new therapeutic alternatives against leishmaniasis is very important for the future treatment of cutaneous leishmaniasis.

Acknowledgements

I would like to thank Marta Mas for her assistance in bibliographic searches, and Dra. Ana Cristina Calpena and Mireia Mallandrich (*Unitat de Tecnologia Farmacèutica, Departament de Farmàcia i Tecnologia Farmacèutica, Universitat de Barcelona*), for their encouragement and help regarding new formulations.

References

1. Alvar, J., Las leishmaniasis, de la biología al control. 1997. Ed. Junta de Castilla y León, Madrid

2. Cunningham, A.C., 2002, *Exp. Mol. Pathol.*, 72, 132.
3. Reed, S.G., Scott, P., 1993, *Curr. Opin. Immunol.*, 5, 524.
4. Mansueto, P., Vitale, G., Di Lorenzo, G., Rini, G.B., Mansueto, S., Cillari, E., 2007, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, 20, 435.
5. Pujol, A., Fisa, R., Riera, C., Rocamora, V., Boteller, D., 2012, *Piel Formacion continuada en Dermatologia*, 27, 527.
6. Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., Saravia, N.G., 2005, *Lancet*, 366, 1561.
7. Modabber, F., Buffet, P.A., Torreele, E., Milon, G., Croft, S.L., 2007, *Kinetoplastid Biol. Dis.*, 6:3.
8. WHO. CONTROL OF THE LEISHMANIASSES. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. WHO Technical Report Series
9. Richard, J.V., Werbovetz, K.A., 2010, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 14, 447.
10. Choudhury, K., Zander, D., Kube, M., Reinhardt, R., Clos, J., 2008, *Int. J. Parasitol.*, 38, 1411.
11. Seifert, K., Matu, S., Pérez-Victoria, F.J., Castanys, S., Gamarro, F., Croft, S.L., 2003, *Int. J. Antimicrob. Agents*, 22, 380.
12. Arévalo, Y., Robledo, S., Muñoz, D.L., Granados-Falla, D., Cuca, L.E., Delgado, G., 2009, *Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm.*, 38, 131.
13. Minodiera, P., Parolab, P., 2007, *Travel Medicine and Infectious Disease*, 5, 150.
14. Garnier, T., Mäntylä, A., Järvinen, T., Lawrence, J., Brown, M., Crofts, S., 2007, *J. Antimicrob. Chemother.*, 60, 802.
15. Ben Salah, A., Ben Messaoud, N., Guedri, E., Zaatour, A., Ben Alaya, N., Bettaieb, J., Gharbi, A., Belhadj Hamida, N., Boukthir, A., Chlif, S., Abdelhamid, K., El Ahmadi, Z., Louzir, H., Mokni, M., Morizot, G., Buffet, P., Smith, P.L., Kopydlowski, K.M., Kreishman-Deitrick, M., Smith, K.S., Nielsen, C.J., Ullman, D.R., Norwood, J.A., Thorne, G.D., McCarthy, W.F., Adams, R.C., Rice, R.M., Tang, D., Berman, J., Ransom, J., Magill, A.J., Grogl, M., 2013, *N. Engl. J. Med.*, 368, 524.
16. Gonçalves, G.S., Fernandes, A.P., Souza, R.C. Cardoso, J.E., de Oliveira-Silva, F., Maciel, F.C., Rabello, A., Ferreira, L.A., 2005, *Acta Tropica*, 93, 161.
17. Frankenburg, S., Glick, D., Klaus, S., Barenholz, Y., 1998, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 42, 3092.
18. Ball, E., 1995, *Derm. Venez.*, 33, 15.
19. Carneiro, G., Santos, D.C.M., Oliveira, M.C., Fernandes, A.P., Ferreira, L.S., Ramaldes, G.A., Nunan, E.A., Ferreira, L.A.M., 2010, *J. Liposome Res.*, 20, 16.
20. Ferreira, L.S., Ramaldes, G.A., Nunan, E.A., Ferreira, L.A., 2004, *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 30, 289.
21. Jaafari, M.R., Bavarsad, N., Bazzaz, B.S.F., Samiei, A., Soroush, D., Ghorbani, S., Lofti Heravi, M.M., Khamesipour, A., 2009, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 53, 2259.
22. Aguiar, M.G., Silva, D.L., Nunan, F.A., Nunan, E.A., Fernandes, A.P., Miranda Ferreira, L.A., 2009, *J. Antimicrob. Chemother.*, 64, 1234.

23. Dastgheib, L., Naseri, M., Mirashe, Z., 2012, *Int. J. Dermatol.*, 51, 1508.
24. Sadeghian, G., Nilforoushzadeh, M.A., 2006, *Int. J. Dermatol.*, 45, 819.
25. El-Sayed, M., Anwar, A.E., 2010, *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 24, 335.
26. Arevalo, I., Ward, B., Miller, R., Meng, T.-C., Najjar, E., Alvarez, E., Matlashewski, G., Llanos-Cuentas, A., 2001, *Clin. Infect. Dis.*, 33, 1847.

3.2 DEVELOPMENT OF A LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD FOR THE QUANTIFICATION OF PAROMOMYCIN. APPLICATION TO IN VITRO RELEASE AND EX VIVO PERMEATION STUDIES

La leishmaniosi és una infecció causada per protozous del gènere *Leishmania*. La paromomicina (PM) és un antibiòtic aminoglicòsid actualment utilitzat pel tractament de la leishmaniosi, però la seva pobre absorció oral ha portat al desenvolupament de formulacions tòpiques per al tractament de la leishmaniosi cutània.

Pel disseny i posterior avaluació dels sistemes de subministrament de fàrmacs dèrmics, és essencial duu a terme estudis d'alliberació in vitro així com estudis de permeació ex vivo, per tant, és una condició essencial disposar d'una adequada metodologia per a la quantificació de PM per a aquests estudis particulars.

El mètode prescrit per les Farmacopees Britànica, Europea i Nord-americana per la determinació dels aminoglicòsids és l'assaig microbiològic, però degut als grans desavantatges d'aquesta tècnica els autors recomanen canviar-la per un mètode amb majors avantatges.

Per aquest motiu, nosaltres hem desenvolupat una cromatografia líquida d'alta resolució en fase reversa amb detecció amperomètrica polsada (RPHPLC-PAD) per a la determinació de paromomicina. Es tracta d'una tècnica sensible, repetible i selectiva sense la necessitat de cap etapa de pretractament. El límit de detecció de paromomicina trobat va ser de 2 µg/ml i el límit de quantificació de 6 µg/ml. Els coeficients de regressió lineal van ser sempre superiors a 0,99 per a les concentracions estudiades, entre 6,25 i 200 µg /mL. La intra i inter-dia precisió (RSD) va ser inferior al 6,5%. Pel que fa a l'exactitud, les recuperacions mitjanes van estar entre 97,53-102,01%.

El mètode de HPLC-PAD proposat presenta característiques avantatjoses i pot ser considerat adequat per a l'avaluació de paromomicina inclosa en formulacions de nanogels i pels estudis d'alliberació in vitro i permeació ex vivo.



Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/saa

Development of a liquid chromatographic method for the quantification of paromomycin. Application to *in vitro* release and *ex vivo* permeation studies



A. Pujol-Brugués^a, A.C. Calpena-Campmany^b, C. Riera-Lizandra^a, L. Halbaut-Bellowa^b,
B. Clares-Naveros^{c,*}

^a Department of Medical Microbiology and Parasitology, School of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII Ave., 08028 Barcelona, Spain

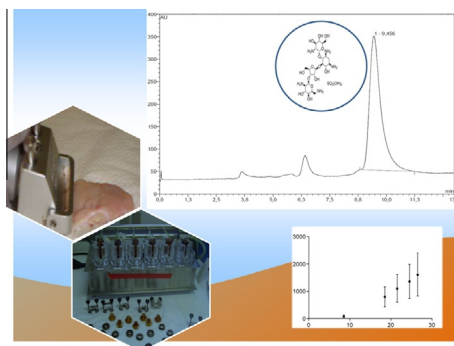
^b Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII Ave., 08028 Barcelona, Spain

^c Department of Pharmacy and Pharmaceutical Technology, School of Pharmacy, University of Granada, Campus of Cartuja St., 18071 Granada, Spain

HIGHLIGHTS

- A RPHPLC-PAD method has been developed for the determination of paromomycin.
- The paromomycin oxidizable groups can be detected electrochemically.
- This method allows the drug quantification for both *in vitro* and *ex vivo* studies.
- Results showed linear relationships, low limits of LOD and LOQ with good robustness.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 February 2014

Received in revised form 23 May 2014

Accepted 3 June 2014

Available online 14 June 2014

Keywords:

Paromomycin

RPHPLC

Pulsed amperometric detection

Cutaneous leishmaniasis

ABSTRACT

We have developed a reversed phase high performance liquid chromatography pulsed amperometric detection (RPHPLC-PAD) method for the determination of paromomycin. It is sensitive, repeatable, and selective without the pretreatment step.

Trifluoroacetic acid–water was utilized as the eluent and detected by PAD under NaOH alkaline conditions. The paromomycin detection limit ($S/N = 3.3$) was $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ and the quantification limit ($S/N = 10$) was $6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Coefficients of linear regression were higher than 0.99 for concentrations between 6.25 and $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. The intra and inter-day precision (RSD) was less than 6.5%. The average recoveries were 97.53–102.01%. The proposed HPLC-PAD method presented advantageous performance characteristics and it can be considered suitable for the evaluation of paromomycin loaded nanogel formulation in *ex vivo* permeation and *in vitro* release studies.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

Introduction

Leishmaniasis is an infection caused by hemoflagellate protozoa *Leishmania*, which are transmitted through the bite of infected

female sandflies of the genus *Phlebotomus*, which serve as a vector for the agent transmission to humans [1]. Paromomycin (PM), also known as aminosidine (Fig. 1) is an aminoglycoside antibiotic intended for the treatment of a number of bacterial infections isolated from fermentation of *Streptomyces rimosus*. Currently, it is being developed for the treatment of leishmaniasis [2], but poor oral absorption has led to the development of topical formulations

* Corresponding author. Tel.: +34 958 243904; fax: +34 958 248958.

E-mail address: beatrizclares@ugr.es (B. Clares-Naveros).

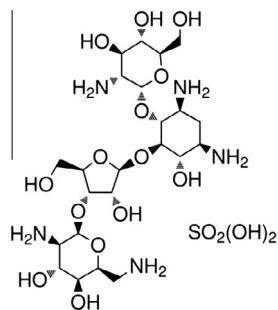


Fig. 1. Chemical structure of paromomycin.

for the cutaneous form [3]. The assessment of *in vitro* release and *ex vivo* human skin permeation studies is one of the main steps in the initial design and later in the evaluation and optimization of dermal or transdermal drug delivery systems [4]. However, it is an essential and basic condition to have available an appropriate method for the quantification of PM for these particular studies.

Microbiological assays (bioassays) historically have been used for the assay of aminoglycosides and other antibiotics. Microbiological assays are relatively inexpensive to perform, require little in the way of sophisticated equipment other than that used for handling the microorganisms, and are suitable for testing large numbers of samples. Microbiological assay is the method prescribed by British, European and US pharmacopoeias for the determination of aminoglycosides in bulk pharmaceuticals and their formulations [5–7]. The official assay may be performed either by agar diffusion or turbidimetrically but reported literature using the agar diffusion method concluded that the reproducibility of the microbiological assays deteriorated as the content of the aminoglycoside in the sample increased [8]. In this context authors recommended to change the microbiological assay for liquid chromatographic method in official monographs [9]. Inaccuracy was also reported in the determination of tobramycin by agar diffusion assay when compared with HPLC and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) [10,11], or when compared with HPLC and radioimmunoassay in the case of isepamicin. Microbiological assay also had the disadvantages of a narrow linear range, poor sensitivity and delay in obtaining the results.

Other chemical assay methods for PM have been reported in the literature. Gas–liquid chromatography did not bring a real solution to the bioanalysis of aminoglycosides since these are thermally unstable compounds therefore the analysis by gas-chromatography or gas-chromatography/mass spectrometry is difficult [12]. Equally as PM has not ultraviolet chromophores HPLC with ultraviolet or fluorescence detection requires the conversion of the amino groups into isoindole derivatives, and needs post-column derivatization with ortho-phthalaldehyde and 2-mercaptoethanol, but ortho-phthalaldehyde possess a low stability [13], in addition, derivatization methods have proved to be tedious, time consuming and may lead to reaction incompleteness and to formation of reaction by products leading to difficulties in quantification. Capillary zone electrophoresis has been also reported [14].

For the sake of simplicity and correct quantification, direct detection methods are preferred. In this way aminoglycosides contain groups that can be oxidized (e.g., amines and hydroxyls) and therefore directly detected electrochemically simplifying the analysis. Amperometric detection (PAD) has been used successfully to determine aminoglycosides because has broad linear range and very low detection limits for these sort of antibiotics [15,16]. In this study a specific, accurate, precise and robust reversed phase liquid chromatography (RPLC) method with PAD is described and validated. This method has been successfully applied to determine the concentration of PM obtained in both studies, the *ex vivo*

percutaneous permeation studies through human skin and release studies using automatic Franz type diffusion cells.

Material and methods

Reagents

Paromomycin sulphate (Ref. A7699) was obtained from Appli-Chem GmbH (Darmstadt, Germany), trifluoroacetic acid (TFA) was obtained from Panreac Química S.A.U. (Barcelona, Spain), 50% sodium hydroxide was purchased from Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany). Pluronic® F-127 (poloxamer 407; P407) was provided by Fagron Iberica (Terrassa, Spain). All other reagents and solvents used were of guaranteed or analytical grade. A Millipore® membrane filter (type HA, pore size 0.45 µm) was used for solvent filtration. Ultrapure water 18 MΩ cm used to prepare all the aqueous solutions was obtained from a MilliQ® Gradient A10 system apparatus (Millipore Iberica S.A.U., Madrid, Spain).

Preparation of reference standard solutions for the calibration curve

Working standard solutions for the calibration curves were prepared daily as follows; 20 mg of PM were accurately weighed and transferred to a 100 mL volumetric flask. Then it was dissolved in distilled water to obtain a final PM concentration of 200 µg mL⁻¹. From this solution, standard stocks of 100, 50, 25, 12.5 and 6.25 µg mL⁻¹ were prepared.

Sample preparation

Samples were obtained from the receptor chamber of Franz diffusion cells at different times after *in vitro* release and *ex vivo* human skin permeation studies.

Apparatus

Chromatographic analyses were carried out using a GS50 Gradient Pump, an AS50 autosampler and an AS50 Thermal Compartment, all from Dionex (Sunnyvale, CA, USA). When experiments provided more than 1 mL of sample the injection mode was full loop ($V = 50 \mu\text{L}$) but when there was limited sample volume ($<200 \mu\text{L}$) the injection mode was partial loop ($V = 20 \mu\text{L}$). The pulsed amperometric detector (PAD) model 2465 from Waters (Milford, MA, USA) was equipped with a gold working electrode with a diameter of 3 mm, an Ag/AgCl reference electrode and a stainless steel counter electrode. The detector cell was kept at 35 °C in a hot air oven. The column used was a Hamilton PRP-1, 5 µm, 250 mm × 4.1 mm I.D., Hamilton (Bonaduz, Switzerland).

Reversed phase liquid chromatography with pulsed amperometric detection

The mobile phase was prepared by adding 20.0 mL of TFA and 10.0 mL of NaOH 50% solution over 1000 mL of water. 940 mL of the solution were mixed with 40 mL of NaOH 0.5 M. The pH was in the range 1.55–1.65, otherwise adjusted with TFA or NaOH and then filtered. The temperature of the column was kept at 40 °C. In these conditions the main peak of paromomycin eluted at 9–10 min working at a flow rate of 0.6 mL/min. To enhance the detection at the working electrode, 0.5 M NaOH was added post column at a flow rate of 0.5 mL/min using a Kontron 322-system pump. The post-column addition of the base is necessary to raise a pH of approximately 12–13 to make possible the reaction in the electrochemical cell. The NaOH solution was prepared at least the day before to reach equilibrium of the carbonates. Data were

acquired and processed using the software Chromeleon® 6.5 (Dionex, Sunnyvale, CA, USA). The eluent reservoirs were pressurized with N₂ to avoid bubble formation and carbonate contamination in the post-column additive.

The time and voltage parameters for the detector were as follow: $E_1 = 0.00$ V, $t_1 = 400$ ms, $E_2 = 0.80$ V, $t_2 = 150$ ms, $E_3 = -0.85$ V, $t_3 = 500$ ms, $t_5 = 200$ ms, range = 10 μ A ($V = 50$ μ L), range = 5 μ A ($V = 20$ μ L), filter = 1 s, temperature = 30 °C.

It is necessary to clean the working electrode, the counter electrode and reference electrode, as well as to polish the working electrode when the current of the baseline increases. It takes about 2–3 h to obtain a stable baseline and response with a freshly polished electrode.

Validation of the method

Validation of the developed method was carried out as per the International Conference on Harmonization guidelines [17] and included an evaluation of the following characteristics: linearity, sensitivity, accuracy, precision, robustness and analyte stability. Moreover two volumes were validated 50 μ L and 20 μ L of standard solutions.

Linearity

The linearity of the present method was evaluated by constructing the calibration curve at six concentration levels in the range of 6.25–200 μ g mL⁻¹. The calibration curve was validated interday ($n = 6$) by different analysts and developed by plotting the instrument measurements versus the corresponding drug concentration. The least squares fit method was employed to statistically evaluate the results for linearity by a regression line and the corresponding slope, y -intercept and coefficient of linear correlation (r^2). Furthermore, linearity was determined by one-way analysis of variance (ANOVA) test to compare the electrode signal versus nominal concentrations of each standard, and differences were considered statistically significant when $p < 0.05$ [18]. The least square linear regression analysis and mathematical determinations were performed by the Prism®, V. 3.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Sensitivity

Sensitivity of the method was determined with respect to limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ). LOD provides information on minimum level at which the PM was reliably detected by the analysis of samples with known concentrations of PM and LOQ, in the same way, establishes the minimum level at which PM was quantified with acceptable accuracy and precision. Both parameters, LOD and LOQ were determined based on the standard deviation of the response and the slope of the calibration curve using the formula:

$$\text{LOD or LOQ} = k \times \text{SD}_{\text{Sa}}/\text{Sb} \quad (1)$$

where k is the a factor related to the level of confidence, its value is 3.3 for LOD and 10 for LOQ. SD_{Sa} is the standard deviation of the intercept and Sb is the slope.

Accuracy

Accuracy of the method was evaluated carrying the recovery study at three different known concentrations levels of PM corresponding to 20, 50 and 175 μ g mL⁻¹ in six replicates.

Precision

The precision of the assay was determined by the intraday repeatability using three different concentration levels, low, medium and high (20, 50 and 175 μ g mL⁻¹) during the same day (while keeping the operating conditions identical) in six replicates.

Equally, the interday precision (intermediate precision) was assessed by analyzing PM at these three levels with six replicates of each sample over six days. The data obtained were used to express as the percentage relative standard deviation (%RSD).

Robustness

Robustness of the procedures was assessed by evaluating the influence of small variation in experimental variables; in this case, standard solutions were elaborated with water obtained after permeation through human skin. The effects on the results were evaluated and robustness determined in triplicate and the mean and %RSD of responses were calculated.

Stability

Moreover, we studied the stability of a PM solution in different storage conditions. Frozen, in refrigerator and at room temperature (–20 °C, 4 °C and 25 °C, respectively) after 30 days. To measure this stability, we accept a difference of 10% (90–110%) compared to a control solution prepared the day of analysis.

Application of the method

An *in vitro* release rate can reflect the combined effect of several physical and chemical parameters, including solubility and particle size of the active ingredient and rheological properties of the dosage form [19]. On the other hand, *ex vivo* human skin is the tool recommended by regulators to provide information about potential risk from topical exposure to chemicals [4]. Moreover, such studies estimate the rank order of percutaneous absorption of drugs.

In vitro release studies

In vitro release studies were performed using vertical diffusion Franz cells (FDC-400) supplied by Vidra-Foc (Barcelona, Spain). It consists of two compartments with a membrane clamped between the donor and receiver chambers. The membranes were 45 mm in diameter and 0.45 μ m in pore size. Three types of membranes were tested: methylcellulose (MC) (Teknokroma, Barcelona, Spain), nylon (NYL) (Waters Corporation, Milford, MA, USA) and polysulfone (PS) (Pall Corporation, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA). The receiver compartment had a volume of 13 mL, an effective diffusional area of 2.54 cm² filled with double distilled water as receptor phase. It was constantly stirred with a small magnetic bar and thermostated at 32 \pm 1 °C throughout the experiments. On the donor phase, 1 mL of a 2 mg/mL PM solution (solution 1) was placed. Samples of 250 μ L were withdrawn from the receptor compartment at different times for 6 h and replaced with the same volume of double distilled water.

Ex vivo permeation studies

This assay was utilized to determine the *ex vivo* percutaneous penetration of PM through abdominal human skin using vertical amber glass Franz-type diffusion cells (FDC 400, Crown Glass, Somerville, NY, USA) with an effective diffusional area of 2.54 cm² and 13 mL of receptor chamber capacity in order to obtain the concentration time profiles of this drug. Human skin from abdominal plastic surgery of healthy patients was used as a permeation membrane. Skin was cut into 400 μ m thick and mounted between donor and receptor compartment of Franz diffusion cell, avoiding bubbles formation, with stratum corneum side facing the donor compartment and the dermis facing the receptor medium receiver compartment (water). Samples of 300 μ L of PM solution (0.78 g mL⁻¹) (solution 2) were applied to the donor compartment and sealed by Parafilm® immediately to prevent water evaporation. Temperature was kept at 32 \pm 0.5 °C to mimic *in vivo* conditions by a circulating-water jacket and stirred with a magnetic rotor at a

speed of 700 rpm. Aliquots of 200 μL were withdrawn at regular time intervals (up to 26 h) and replaced with the same volume of double distilled water after each collection with great care to avoid trapping air beneath the dermis.

The cumulative amount of PM permeated (Q_{26}) through excised human skin was plotted as function of time and determined based on the following equation:

$$Q_t = \frac{Vr \times Ct + \sum_{i=0}^{t-1} Vs \times Ci}{S} \quad (2)$$

where C_t is the drug concentration of the receiver medium at each sampling time, C_i the drug concentration of the i sample, and V_r and V_s the volumes of the receiver medium and the sample, respectively, S represents the skin surface area (2.54 cm^2).

The slope and intercept of the linear portion of the plot was derived by regression using the Prism[®], v. 3.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

PM flux (J , $\mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$) through the skin, was calculated from the slope of linear portion of the cumulative amounts permeated through the human skin per unit surface area versus time plot, and the extrapolation of this line will intercept with the X-axis at a time equal to lag time (T_l , h).

The permeability coefficient (K_p , cm h^{-1}) was obtained by dividing the flux (J) by the initial drug concentration (C_0) in the donor compartment, and it assumed that under sink conditions the drug concentration in the receiver compartment is negligible compared to that in the donor compartment.

$$K_p = \frac{J}{C_0} \quad (3)$$

Once parameters J_s , T_l and K_p are calculated, partition parameter P_1 and the diffusion parameter P_2 can be obtained from the following equations:

$$K_p = P_1 \times P_2 \quad (4)$$

$$T_l = 1/6 \times P_2 \quad (5)$$

At the end of the permeation study, the amounts of PM remaining on the skin were quantified. The skin was removed from the Franz cells, cleaned with gauze soaked in a 0.05% solution of dodecyl sulphate and washed in distilled water. The permeation areas of the skin were cut and weighed. PM contented in the skin was extracted with water during 20 min under cold sonication in an ultrasound bath. The resulting solutions were centrifuged (1500 rpm) for 10 min and PM levels (expressed as, $\mu\text{g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$) were measured by RPLC-PAD yielding the amount of PM retained in the skin [20].

Results and discussions

Validation of the method

The objective of the present study was to develop a simple and validated method to quantify PM. The quantitative determination of PM in the receptor side of diffusion cells required specific methods, since this kind of samples were usually contaminated with skin endogenous compounds. Moreover, the work diffusion cells provides little sample volumes and, therefore, the analytical method has to show enough sensitivity.

The linearity of an analytical procedure is its ability within a definite range to obtain results directly proportional to the concentrations (amount) of the analyte in the sample [17].

Six calibration curves were constructed under optimal conditions using six data points and triplicate injection of standards at each concentration level. These curves were useful to know the linearity, range, detection and quantitative limits. It was found that

the peaks areas (y) were proportional to that of the concentration of PM (x) in the range $6.25\text{--}200 \mu\text{g mL}^{-1}$. The equations and linear ranges are listed in Table 1. Determination coefficients were (r^2) > 0.99 in all curves. No statistically significant differences were found ($p > 0.05$). It was observed that the current of the baseline should be as low as possible to prevent saturation of the gold working electrode. It was also observed that the slope values for PM are strongly dependent on the detector conditions. Therefore, for accurate results, when performing analyses using PAD, standard solutions and solutions to be analyzed should be injected alternately. A representative PM chromatogram is shown in Fig. 2.

The LOQ, defined as the minimum concentration at which the analyte could be quantified with acceptable accuracy and precision (RSD $< 15\%$), was $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (confidence level of 10), and the LOD $2 \mu\text{g/mL}$ (confidence level of 3.3 for our system).

Accuracy is calculated as the percentage of recovery. Tables 2 and 3 illustrate the method accuracy for PM with recoveries from 97.53% to 102.01% or 102.01% to 106.40% (for 50 and 20 μL , respectively) with a coefficient of variation $\leq 10\%$.

The precision of this method was determined by repeatability within day, using three different concentrations of PM. Every concentration was analyzed in six replicates. Also, intermediate precision between days was evaluated using these three different concentrations. The results obtained are presented in Tables 2 and 3, repeatability values were less than 5% (RSD) for two volumes, and intermediate precision values less than 7% (RSD) confirming satisfactory results.

Robustness shows the reliability of an analyte with respect to deliberate variations in method parameters. The variation of water (after skin permeation or not) in solutions did not significantly affect the results. This gave an indication for the reliability of the proposed method during routine work. It was found that no interferences were observed due to endogenous components of the skin.

Table 1
Linear range, linear equation and correlation coefficients.

Curve	Linear range ($\mu\text{g/mL}$)	Linear equation	r^2
1	6.25–200	$y = 0.4593x - 1.4979$	0.9995
2	6.25–200	$y = 0.2305x - 0.8991$	0.9996
3	6.25–200	$y = 0.4558x - 1.5149$	0.9999
4	6.25–200	$y = 0.5414x - 1.1541$	0.9993
5	6.25–200	$y = 0.6041x - 1.8797$	0.9996
6	6.25–200	$y = 0.6444x - 1.0242$	0.9999

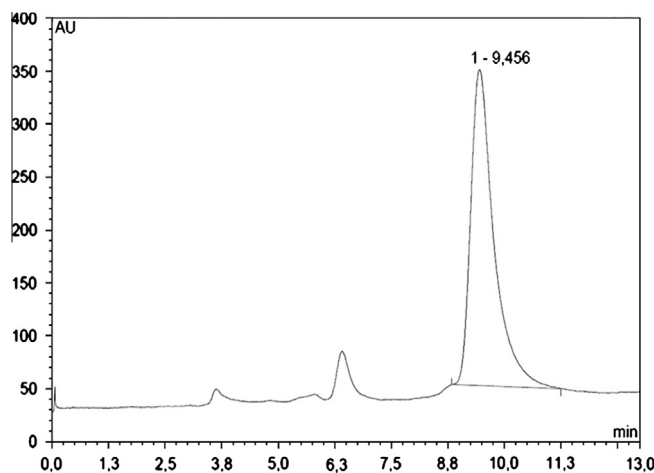


Fig. 2. Paromomycin chromatogram ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Table 2

Repeatability, reproducibility and accuracy of three concentrations of PM in water (50 μL) analysed by reverse-phase liquid chromatography with pulsed amperometric detection. The %RSD was calculated as the ratio between the SD and the mean value.

Sample	Theoretical value	Median	SD	%RSD repeatability	%RSD reproducibility	% Accuracy
Solution 1	175	177.93	9.31	1.52	5.23	101.68
	50	51.01	1.73	1.63	3.39	102.01
	20	19.51	0.94	2.95	4.82	97.53
Solution 2	175	176.84	10.70	2.72	6.05	101.05
	50	50.54	2.20	1.80	4.35	101.07
	20	19.71	0.76	3.73	3.83	98.54

Table 3

Repeatability, reproducibility and accuracy of three concentrations of PM in water (20 μL) analysed by reverse-phase liquid chromatography with pulsed amperometric detection. The %RSD was calculated as the ratio between the SD and the mean value.

Sample	Theoretical value	Median	SD	%RSD repeatability	%RSD reproducibility	% Accuracy
Solution 1	175	179.56	4.93	2.10	2.75	102.61
	50	52.23	1.99	2.19	3.81	104.46
	20	21.28	0.67	2.27	3.16	106.40
Solution 2	175	184.57	5.59	2.07	2.03	105.47
	50	51.00	1.94	2.23	3.81	102.01
	20	20.95	0.67	2.81	3.18	104.74

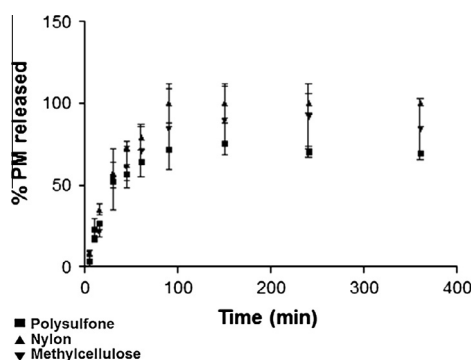


Fig. 3. *In vitro* release profile of paromomycin.

PM stability in water was determined after 30 days under a variety of temperature conditions. The stock solutions were shown to be stable when stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and no deterioration of PM was showed. At $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (refrigerator) remains stable according to our criteria (10% accuracy compared to a control solution) but slight degradation was observed. Contrary, stock solutions stored at $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ were not stable.

Application of the method

Fig. 3 shows the release of PM through three membranes studied. After 6 h, the maximum release rate was reached with polyethersulfone membrane, 69.50%. Methylcellulose membrane reached 84.20%, while nylon membrane was slightly faster and the release was complete after 2 h.

Table 4

Retained quantity (Q_{26}), lag time (T_l), permeability coefficient (Kp), flux (J), partition parameter (P_1) and the diffusion parameter (P_2). Results are shown as the median and range (min–max).

	Q_{26} (μg)	T_l (h)	Kp ($\times 10^{-5}$) (cm/h)	J ($\mu\text{g}/\text{h cm}^2$)	P_1 ($\times 10^{-4}$) (cm)	P_2 ($\times 10^{-3}$) (h^{-1})
Solution 2	1620 (265–2976)	10.44 (17.79–78.15)	5.02 (2.48–10.02)	39.15 (19.31–78.15)	3.14 (2.64–4.80)	1.59 (0.94–2.09)

The application of this method has been also demonstrated for the PM quantification in human skin layers and in the receptor compartment of the diffusion cells after *ex vivo* percutaneous studies. The amount of PM found in the receptor compartment during a percutaneous permeation experiment after the topical application of a PM solution is represented in the Supplementary data. During the experiment, the amount of PM in the receptor medium increased with time. Table 4 shows median values of permeation parameters obtained in the steady state range of the curve. The median PM amount remaining in the skin after 24 h was analyzed to be $1452.30\text{ }\mu\text{g cm}^{-2}\text{ h}^{-1}$ (1129.28–1625.26).

Conclusions

A simple HPLC-PAD method has been developed and validated to quantify PM. This method was successfully used to quantify this drug in release studies and skin permeation studies where passive diffusion was employed. The detection procedure was specific and efficient, showing good precision, accuracy and stability of the analyte.

Acknowledgements

The authors want to acknowledge Esther Miralles of the Department of Separation Techniques of the Scientific-Technical Centre of the University of Barcelona for her technical support. The research leading to these results has received funding from project of the Granada University Research Plan 2012, special actions (18th programme).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2014.06.017>.

References

- [1] WHO, Scientific Working Group on Leishmaniasis, Meeting Report, World Health Organization, Geneva, 2004.
- [2] R.X. Armijos, M.M. Weigel, M. Calvopina, M. Mancheno, *Acta Trop.* 91 (2004) 153–160.
- [3] S.L. Croft, V. Yardley, H. Kendrick, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 96 (2002) 127–129.
- [4] B. Godin, E. Touitou, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 1152–1161.
- [5] British Pharmacopoeia Commission, Biological assay of antibiotics, in: *British Pharmacopoeia*, vol. 2, HMSO, London, 1998.
- [6] European Pharmacopoeia Commission, Microbiological assay of antibiotics, in: *European Pharmacopoeia*, third ed., European Directorate for the Quality of Medicines, Strasbourg, 1997.
- [7] United States Pharmacopoeia, The National Formulary, The United States Pharmacopoeial Convention, Rockville, 2004.
- [8] D.A. Stead, *J. Chromatogr. B* 747 (2000) 69–93.
- [9] E. Adams, R. Schepers, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Chromatogr. A* 741 (1996) 233–240.
- [10] C.C. Lin, J. Veals, C. Korduba, M.J. Hilbert, A. Nomeir, *Ther. Drug Monit.* 19 (1997) 675–681.
- [11] S. Sachtelli, C. Beaulac, J. Lagace, *Biochim. Biophys. Acta* 1379 (1998) 35–41.
- [12] D.G. Kennedy, R.J. McCracken, A. Cannavan, S.A. Hewitt, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 77–98.
- [13] L. Šoltés, *Biomed. Chromatogr.* 13 (1999) 3–10.
- [14] M.T. Ackermans, F.M. Everaerts, J.L. Beckers, *J. Chromatogr.* 606 (1992) 229–235.
- [15] V.P. Hanko, J.S. Rohrer, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 1006–1012.
- [16] V.P. Hanko, J.S. Rohrer, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 131–141.
- [17] EMA, Committee for Medicinal Products for Human Use, Guideline on Bioanalytical Method Validation, European Medicines Agency, London, 2011. <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf> (accessed 03.02.14).
- [18] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, L.M.C. Buydens, S. De Jong, P.J. Lewi, J. Smeyers-Verbeke, *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A*, Elsevier, Amsterdam, 1997.
- [19] FDA, Nonsterile Semisolid Dosage Forms, Scale-up and Post-Approval Changes: Chemistry, Manufacturing and Controls, In-vitro Release Testing and In vivo Bioequivalence Documentation, 1997. <<http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070930.pdf>> (accessed 03.02.14).
- [20] F. Fernández-Campos, A.C. Calpena-Campmany, G. Rodríguez-Delgado, O. López-Serrano, B. Clares-Naveros, *J. Pharm. Sci.* 101 (2012) 3739–3752.

3.3 DEVELOPING CUTANEOUS APPLICATIONS OF PAROMOMYCIN ENTRAPPED INTO STIMULI-SENSITIVE BLOCK COPOLYMER NANOGEL DISPERSIONS.

L'objectiu d'aquest treball va ser desenvolupar una nova formulació basada en un nanogel micel·lar d'un poloxamer tri-bloc de co-polímer 407 (P407) per proporcionar un tractament d'aplicació tòpic per la leishmaniosi cutània.

La PM va ser incorporada dins del nanogel mitjançant el mètode de dissolució directa i posteriorment vam caracteritzar la formulació obtinguda. Es van realitzar estudis d'alliberació *in vitro*, estudis *ex vivo* de permeació i retenció, estudis de citotoxicitat en front a dos línies diferents de cèl·lules, RAW 264.7 i VERO i vam avaluar la seva activitat en front a promastigots de dos espècies diferents de *Leishmania*, *L. infantum* i *L. major*. La tolerància *in vivo* es va assajar per la pèrdua d'aigua transepidermica (TEWL).

La grandària de les partícules va ser de 9,19 nm amb un 99% d'eficiència de càrrega que exhibeix un comportament newtonià a 4 °C i pseudoplàstic als 25 i 40 °C (equació de Bingham). L'alliberació de la PM del nanogel vam observar que seguia un model Weibull i el fàrmac que queda retingut a la pell va ser de 31.652 µg/g·cm². La tolerància *in vivo* aconseguí excel·lents resultats. El nanogel té una toxicitat cel·lular insignificant i una millor eficiència anti-*Leishmania*.

Per tant, el nanogel desenvolupat és eficaç i proporciona una alliberació segura de PM per al tractament de LC.



[Home](#)

[User Guide](#)

[About Us](#)

[Contact Us](#)

[My Details](#)

submissions

Title	Submission Date	Submission Status
Developing cutaneous applications of paromomyci...	29/12/2013	Accepted

[Submit New](#)

[Future Medicine](#)

[Future Science](#)

- Home ▾
- User Guide
- About Us
- Contact Us
- My Details

- Future Medicine ▾
- Future Science

manuscript progress tracker

Journal Nanomedicine

Article Title Developing cutaneous applications of paromomycin entrapped into stimuli-sensitive block copolymer nanogel dispersions

Article Type Primary/Research

Editor Le, Duc →



→

Document Versions

Original Manuscript

Figure 8.pptx	View
Figure 11.pptx	View
Figure captions.doc	View
Figure 10.pptx	View
Figure 12.pptx	View
Figure 13.pptx	View
Figure 6.pptx	View
Figure 1.pptx	View
Figure 2.ppt	View
Figure 7.pptx	View
Figure 4.pptx	View
Tables.doc	View
Figure 3.pptx	View
Manuscript.doc	View
Figure 9.pptx	View
Figure 5.pptx	View
Cover letter.doc	View

Developing cutaneous applications of paromomycin entrapped into stimuli-sensitive block copolymer nanogel dispersions

Alba Pujol Brugués¹, Beatriz Clares Naveros^{*2}, Ana C. Calpena Campmany³, Pilar Hernández Pastor⁴, Roser Fisa Saladrigas¹, Cristina Riera Lizandra¹.

¹ *Health Microbiology and Parasitology Department. Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII Avenue, 08028 Barcelona, Spain.*

² *Pharmacy and Pharmaceutical Technology Department. Faculty of Pharmacy, University of Granada, Campus of Cartuja Street, 18071 Granada, Spain.*

³ *Biopharmaceutical and Pharmacokinetics Unit. Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Joan XXIII Avenue, 08028 Barcelona, Spain.*

⁴ *Independent Health Consultant in Bolivia for the Carmen Pampa Fund, 1821 University Avenue West, St Paul, MN 55113, USA.*

***Author for correspondence**

Tel.:

Fax:

E-mail:

Abstract

Aim: A new paromomycin micellar nanogel based on poloxamer 407 was developed.

Materials & methods: *In vitro* release and *ex vivo* permeation/retention studies were conducted. *In vivo* tolerance was assayed by trans-epidermal water loss. *Ex vivo* cytotoxicity on RAW and VERO cells and anti-leishmanial activity on *Leishmania* promastigotes were tested.

Results: Particle size was 9.19 nm (99% loading efficiency) exhibiting newtonian behavior at 4 °C and pseudoplastic at 25 and 40 °C. Drug release followed a Weibull model and drug remaining in the skin was 31.652 $\mu\text{g}\cdot\text{g}\cdot\text{cm}^2$. *In vivo* tolerance achieved excellent results with a negligible cellular toxicity and the best anti-leishmanial efficiency.

Conclusion: The nanogel provided controlled, effective and safe delivery of paromomycin for treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Polymeric micelles, nanogel, poloxamer 407, cutaneous leishmaniasis, paromomycin.

1. Introduction

Leishmaniasis is a disease extended widely worldwide caused by different species of protozoan parasite of the genus *Leishmania*. The disease may be cutaneous, mucocutaneous or visceral depending on the species of parasite involved and the host immune response [1]. Cutaneous leishmaniasis (CL) is the most common form with an incidence of 1.5 million new cases. It and appears first as a papule, erythematous plaque or nodule, which then evolves into ulcerative granulomatous in areas of skin exposed to the bite of the vector (face, ears, arms and neck) [2].

At present, the pentavalent antimonials are first-line drugs [3]. Its administration requires intramuscular, intravenous or multiple intralesional injections of 20 mg/kg/day for 20 days, which are very painful, poorly tolerated by many patients and not always effective [4]. Moreover, resistance and high frequency of side effects (anorexia, myalgia, arthralgia, chemical pancreatitis, leucopenia, cardiotoxicity, etc.) are still relevant problems associated with this treatment [5].

Current therapeutical research efforts are focused towards the design and evaluation of alternative topical approaches offering significant advantages as easy administration and attractive cost-benefit ratio, considering that CL mainly occurs in areas of scarce medical assistance [6].

Paromomycin (PM) is a broad spectrum aminoglycoside antibiotic produced by *Streptomyces rimosus* var. *paromomycinus*. A multistep model of action was proposed involving antibiotic uptake, mistranslation by chain-elongating ribosomes, membrane damage, and subsequent ribosomal blockade preventing further protein synthesis [7]. PM is the most commonly studied drug for the topical treatment of CL since decades [8] showing promising results, but acceptable efficacy was not always observed [6].

PM formulations possess problems of toxicity [9] and low efficacy related to poor penetration of PM into the lesion. PM is a hydrophilic drug with a high molecular weight. Therefore the stratum corneum (SC) of the skin will represent a formidable barrier for reaching the infected macrophages in the deep dermal layer of the skin [10]. Nanogels are small hydrogel particles formed by physically or chemically cross-linked polymer networks in which drugs can be loaded via a spontaneous process forming particles with high dispersion stability [11]. At recent years, copolymer designs by many combinations between hydrophilic and hydrophobic polymers were developed to give them multi-functionality [12]. They have very small size (from 10 nm to 100 nm) with high structural stability provided by the entanglement of polymer chains in the inner core. Amphiphilic block copolymers consisting of hydrophilic and hydrophobic segments have attracted much attention because of their unique phase in aqueous media [13]. Particularly, poloxamer 407 (P407) a thermoreversible co-polymer with amphiphilic nature consisting of a central hydrophobic block of polypropylene oxide flanked with hydrophilic polyethylene blocks (PEG-PPO-PEG), has interest in the design of dermal and transdermal delivery systems, with a view to promoting, improving or retarding drug permeation through the skin with healing properties [14]. Its utilization in targeting PM for the treatment of CL has been exploited here for the first time, to our knowledge. Thus the aim of this research was to develop a controlled transdermal PM delivery system for the treatment of CL to reduce cytotoxicity and enhance efficacy of the drug. Equally the physicochemical characterization and the biological evaluation of this new antileishmanial delivery system were investigated. The *ex vivo* PM permeation and retention studies were performed on human skin as relevant model.

2. Materials & methods

2.1. Reagents

Paromomycin sulfate was obtained from AppliChem GmbH (Darmstadt, Germany), poloxamer 407 (Pluronic[®] F127) was purchased from BASF (Ludwigshafen, Germany). Vaseline and sodium citrate were obtained from Panreac Química S.A. (Barcelona, Spain). Double distilled water was obtained from a Millipore system home supplier (resistivity under 18.2 M Ω \times cm). All other chemical and biological reagent suppliers are reported in the supplementary information.

2.2. Preparation of the nanogel formulation

Briefly, 5 g of PM were diluted in 100 ml water, and then 20 g of P407 were added to the solution at 4 °C. After stirring for 24 h under refrigeration the volume was corrected with distilled water.

Additionally, for comparison purposes, a PM ointment was prepared. The pre-weighted PM was dispersed in an appropriate amount of liquid paraffin, and then the dispersion was dispersed in the ointment vehicle with a homogenizer operated by an appropriate manufacturing procedure of typical oleaginous ointment at a final concentration 5% (w/w).

2.3. Physicochemical characterization of PM-nanogels

2.3.1. Droplet size, ζ -potential and morphology

Particle size and its distribution expressed as polydispersity index (PI) were determined by DLS with a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). Values are reported as the mean \pm SD of six replicates. The hydrodynamic diameters were also determined at 4 , 25, 37 and 40 °C after 6 months. The ζ -potential was obtained by using

a disposable capillary cell in automatic mode on the same instrument for samples at 25 °C.

The shape and morphology were also examined by transmission electron microscopy (TEM) using a Zeiss 902 microscope (Carl Zeiss, Göttingen, Germany).

Characterization was performed with samples 24 h and 6 months after preparation.

2.3.3. pH measurements

pH values were measured by immersing the probe directly into the sample using a Crison 501 digital pH/mV-meter (Crison Instruments, Barcelona, Spain). All measurements were performed initially and subsequently after 6 months storage at different temperatures.

2.3.4. Rheological study

The rheological characterization was conducted in triplicate at 4, 25 and 40 °C in a rotational rheometer HAAKE Rheostress 1 (Thermo Fisher Scientific, Karlsruhe, Germany) equipped with cone-plate geometry (diameter 35 mm and 2 ° angle) with a sensor C60/2 Ti° and a separation between plates of 0.106 mm. Each sample was characterized 24 h after its preparation and subsequently after 6 months storage at different temperatures.

The models of Newton, Bingham, Ostwald-De-Waele, Herschel-Bulkley and Casson, were fitted to the rheological data obtained using the Prism[®], v. 3.00 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

2.3.5. Spreadability test

The spreadability of formulations was determined in triplicate using the following technique: 0.5 g formulation was placed within a circle of 1 cm diameter premarked on a glass plate over which a second glass plate was placed without sliding of plates. A

weight of 500 g was allowed to rest on the upper glass plate for 5 min. Diameters of spreaded circles were measured in cm and were taken as comparative values for spreadability.

2.3.6. Measurement of gelation time

Four ml of the sample solution and a magnetic bar were put into a transparent vial that was placed in a low temperature water bath. The solution was then heated at 32 ± 0.1 °C under stirring (500 rpm). The gelation time was measured in triplicate when the magnetic bar stopped moving due to gelation.

2.3.7. Drug loading efficiency and stability study

The nanogel containing PM 5% (w/v) was suspended in double distilled water and sonicated for 20 min. The extracted PM amount was quantified by Reverse-Phase Liquid Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (*RPLC-PAD*) analysis. Furthermore, samples were stored for 30 days at -20 , 4 and 25 °C and then re-analyzed to ensure drug content.

2.3.8. Thermal analysis

PM was also characterized by thermoanalytical techniques (thermogravimetry, TG; and differential scanning calorimetry, DSC) using a Mettler Toledo TGA/DTA 851e (Mettler Toledo, Wien, Austria). Prior to the analysis, samples were subjected to the following temperature-time conditions, 50 °C 6 h, 60 °C 20 h and 100 °C 48 h.

2.4. *In vitro* PM release test and kinetic evaluation

In vitro release studies were performed using vertical diffusion Franz cells (FDC-400, Vidra-Foc, Barcelona, Spain). Three types of membranes were tested: methylcellulose, nylon and polysulfone. Double distilled water constantly stirred at 32 ± 1 °C was utilized as receptor phase obtaining perfect sink conditions. 100 mg of each formulation

were placed on the donor phase. Samples of the receiver compartment were extracted at preselected times for 6 h, and replaced with an equal volume of double distilled water to ensure sink conditions. PM was quantified using by *RPLC-PAD*.

The obtained data were fitted to five kinetic models (zero order, first order, Higuchi, Weibull and Korsmeyer-Peppas). A nonlinear least-squares regression was performed using the WinNonLin[®] Professional edition software and the model parameters calculated. The Akaike's Information Criterion (AIC) was used to discriminate the best model.

2.5. Human skin *ex vivo* permeation experiment

Human skin from abdominal plastic surgery of healthy patients was used as a permeation membrane. Skin was cut into 400 μm thick pieces at room temperature. The experimental protocol was approved by the Bioethics Committee of the Barcelona SCIAS Hospital (Spain), and written informed consent forms were provided by volunteers.

Each skin sample was measured in triplicate using a trans epidermal water loss (TEWL) measurement DermaLab[®] module (Cortex Technology, Hadsund, Denmark) to check the skin integrity. Skin with TEWL value higher than 10 $\text{g}/\text{m}^2/\text{h}$ was discarded from the experiment.

Permeation study was also performed using vertical amber glass Franz-type diffusion cells at 32 ± 0.5 °C to mimic *in vivo* conditions by mounting the excised skin as diffusion membrane with stratum corneum side facing the donor compartment and the dermis facing the receptor medium (double distilled water stirred at 700 rpm). Barrier integrity of skin samples was evaluated by transepidermal water loss (TEWL) measurements (Dermalab, Cortex Technology, Hadsund, Denmark). 300 μg of each

vehicle were applied to the donor compartment. Aliquots of 200 μL were withdrawn at regular time intervals (up to 26 h) and replaced with the same volume of medium. Six parallel determinations were analyzed by RPLC-PAD.

The drug retained in the skin (expressed as $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{cm}^2$ of skin) was calculated by the method previously described in literature [15].

2.7. *In vivo* tolerance study

TEWL was performed on 10 female and 10 male volunteers with healthy skin. Mean age was 34.5 years (24–55 range). The study was approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona; all subjects provided signed a written informed consent form. Exclusion criteria were: skin conditions, known allergy to any of the components, pregnancy and lactation. Subjects were also instructed for not to use skin cleansing or skin care products on the test sites during the week before and during study.

One circular test area 3 cm in diameter was marked using a template on the flexor sides of both forearms. An adjacent untreated site was used as the baseline standard for each determination. After baseline readings were obtained, the subjects themselves applied 0.5 ml of each study formulation using a syringe once a day for 3 days. The order of application of formulations was rotated in such a way that the sides treated with the test formulations and the control sides varied from subject to subject. After a 24 h application, the formulation was removed, and the application site was gently cleaned using a cotton wool swab. The measurement was determined each morning in a climate-controlled chamber (ambient temperature 25 ± 2 °C, relative humidity 45%). Subjects were allowed a 30 min adaptation period prior to the measurements. Abnormalities in the structures related to disruption of the epidermal permeability barrier function were assayed by TEWL ($\text{g}/\text{cm}^2\cdot\text{h}$).

2.8. *Ex vivo* cytotoxicity assay

The cytotoxicity of unloaded nanogel, PM loaded nanogel and drug solution on RAW 264.7 cultured in RPMI medium and VERO cells cultured in MEM medium was evaluated by the cell proliferation reagent WST-1.

Individual wells of 96-well microtiter culture plates (Costar Corning Inc., NY, USA) were seeded with 5×10^4 cells in 100 μ l of growth medium, and incubated for 24 h at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere. Cells were treated with various doses of each compound. Thereafter, 10 μ l of WST-1 was added to cells and blank samples, hence the incubation was continued for 4 h at 37 °C in the 5% CO₂ incubator. The samples were then shaken for 1 min and absorbance was measured at 450 nm with a Titertek Multiskan Plus MK II 314 microplate reader (Flow Laboratories, McLean, VA, USA). WST-1 was used as blank. Samples were prepared in triplicate for each experiment. Finally, the viability was also corroborated by the trypan blue dye exclusion staining.

2.9. *Ex vivo* promastigote assay

The effects of unloaded nanogel, PM loaded nanogel and a PM solution on the viability of *L. infantum* and *L. major* promastigotes were assessed by the cell growth of parasite. Promastigotes were cultured at 26 °C in Schneider's medium (pH 7.0) supplemented with 20% heat-inactivated FBS, 25 μ g/ml gentamycin, and 1% penicillin-streptomycin (100 μ g/ml). Then, were collected during stationary phase at a concentration of 1×10^6 parasites/ml. Serial dilutions to test in promastigotes culture (100 μ L) were performed in 96-well microtiter plates. Then, 100 μ l of culture medium with 10^5 promastigotes in their logarithmic growth phase of *L. infantum* and *L. major* were added to each well and incubated at 26 °C for a 48 h and 72 h, respectively. Then, 40 μ l of culture from each well was transferred to a new microtiter plate, and cells were lysed by the addition

of 100 μl /well of sodium citrate lysis buffer, 90 mM 1% Triton X-100, pH 4.8, at 37 °C. Growth of parasite was measured through acid phosphatases activity by the addition of 100 μl /well of 10 mM *p*-nitrophenyl phosphate (*p*-NPP). After 2 h, the enzymatic reaction was stopped with 60 μl /well of 1 N NaOH, and the optical density was determinate at 405 nm. Each plate contained a blank of drug and a blank of parasite. PM solution and PM loaded nanogel were studied at serial dilutions from 500 to 0.49 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Besides, different dilutions of the unloaded micellar nanogel were also tested. Each sample was analyzed in triplicate.

The concentration that produced a 50% reduction in growth (IC_{50}) was determined using a least-squares linear regression of growth rate versus log component concentration.

2.10. Statistical analysis

One-way analysis of variance was used to assess the significance of the differences among various groups. In the case of a significant F value, the multiple-comparison Bonferroni's test was used to compare the means of the different treatment groups. Results with *P* values < 0.05 were considered statistically significant.

3. Results & discussion

3.1. Physicochemical Characterization of PM-Nanogels

3.1.1. Droplet size, ζ -potential and morphological examination

As shown in TABLE 1 at 24 h mean micelle sizes were 27.02 ± 0.261 and 9.19 ± 0.251 nm for unloaded nanogel and drug loaded nanogel, respectively at 25 °C. The average size of the micelles decreased when PM was formulated. This supports the fact that there was a considerable change in the structure of the loaded nanogel, probably due to electrostatic interactions or to an even greater extent, hydrogen bonds between PM and

the polymer chains regarding their chemical structures during the process of PM nanogel formation. This was also corroborated by the change in the ζ -potential after the incorporation of PM from -4.32 to -0.49 mV, respectively, suggesting that PM is bound on the outer surface of micelles (hydrophilic PEO chains).

Micelles showed narrow and unimodal distributions in all samples (FIGURE 1) and the incorporation of PM in the micellar system did not affect this distribution, although the hydrodynamic size decreased. Size distribution showed a narrow peak indicating that the micelle population is homogenous in size. DLS showed that solutions at higher temperatures induced an intrinsic change in the micellar properties such as aggregation number or micellar symmetry, sizes > 20 – 30 nm, whereas scattering from solutions at low temperatures was relatively small micelles. Similar scattering effects have been investigated for other authors. Studies by light-scattering on the P407 solutions clearly indicated the unimers-to-micelles transition and thermo-induced changes in micellar properties [16]. No statistically significant differences ($P > 0.05$) were found in the micelle sizes over time (6 months) confirming good stability properties.

FIGURE 2 provides TEM direct images of micelles and insight into shape, which is generally spherical in nature. Generally, when the hydrophilic segment is longer than the core block, the shape of the resulting micelles is spherical. Conversely, increasing the length of the core segment beyond that of the corona-forming chains may generate various non-spherical structures, including rods and lamellae [11]. The micellar size observed was in accordance to DLS results. FIGURE 2A-B also confirmed the changes in size between the drug loaded and unloaded nanogel, which coincided with results depicted in FIGURE 1. Likewise, the nanogel sizes were similar between 24 h and 6

months (FIGURE 2C-D). The average micelle size observed is in accordance to the results obtained by other authors for those systems [17, 18].

3.1.2. pH measurements

pH of dermal formulations is an important factor to avoid skin irritation or make the skin susceptible to bacterial infections. pH was slightly acidic in all formulations (5.82–6.28). No significant changes were observed over time ($P > 0.05$). Natural acidity of the skin ranges from 4 to 6, depending on the skin area and the age of the individual, due to the buffer system in the skin to reduce irritation [19]. Thus the findings make this formulation suitable for topical application.

3.1.3. Rheological study

Rheological properties of the nanogels exhibit an exclusive temperature-sensitivity. The phase transition temperature gives an insight into the nature of microstructures that form the gelling cross-linked network. FIGURE 3A illustrates the temperature-induced viscosity. When the temperature was increased from 4 to 37 °C, the nanogel was formed via self-assembly based on hydrophobic interactions. Firstly, P407 copolymers in the presence of water and after passing a critical micellar concentration and temperature, supramolecular core-shell structures called polymeric micelles are formed. As temperature increased, the aggregation conformation of nanogels changed from the spherical micelles closely-packed in a cubic lattice into the rod-like micelles packed in a hexagonal system. The system became more rigid as a result and thus showed gelling [20].

For thermosetting gels, the viscosity at various conditions is an important rheological parameter involved in its utilization and *in vivo* performance. If viscosity is too high it will lead to difficult application; on the contrary, if viscosity is too low it will give rise

to decreased efficiency. These are precisely the main disadvantages of PM formulations based on ointment vehicle (FIGURE 3B). However, our formulation exhibited considerable viscosity and partial rigidity. Moreover, exist as a sol state at storage temperature but form a gel at the physiological.

The flow and viscosity curves of the PM formulations are shown in FIGURE 4. By the perusal, it appears evident that a complete shear-thinning response is present at 25 and 40 °C. Both samples exhibited pseudoplastic flow, the hysteresis area can be also observed in the rheograms obtained. The decrease of the viscosity with the increasing of the shear rate is observed and it results in a shear-induced orientation, with deformed and elongated micelles aligned parallel to direction of the shear field [14]. Incorporation of PM did not change the pseudoplastic flow behaviors; however the hysteresis phenomenon was different for the unloaded nanogel at 25 °C. These results may be explained by the interactions between PM and polymer. Finally, newtonian flow was also shown for the PM-nanogel at 4 °C, which is a transparent solution. In this case the formulation was found to be easily spreadable and non-dripping in nature.

Currently, PM is compounded into vehicles type ointment. However, patients often prefer to treat weeping ulcers with spray formulations. This is especially important when infections involve large areas of the body surface. Furthermore it could reach the entire surface without rubbing, avoiding the infection spreading. Indeed, the Newtonian behavior of the nanogel at low temperature makes it suitable for its application as spray or roll-on.

In the supplementary information is shown the mathematical models, values of each parameter and the coefficient of regression (r^2). As expected, the model that best fitted the experimental data was the Bingham equation, with an r^2 of 0.977 in ascending

stretches and 0.9954 in descending stretches. The yield stress quantifies the amount of stress that the fluid may experience before it yields and begins to flow (5.01 Pa).

3.1.4. Spreadability test

Spreadability is an important property of topical formulation and shows the behavior of formulation extraction from the container. The spreadability formulations was found to be 3.1 ± 0.05 and 2.2 ± 0.04 cm for the nanogel and ointment, respectively, which revealed that the presence of P407 increases the spreadability of formulation, it can break down for easy spreading, and the applied film can gain viscosity instantaneously to resist running.

3.1.5. Gelation time

Thermal gelation process seemed not to be affected by the presence of the PM, however the gelation properties could be modified by adding PM or due to the conservation time. Unloaded nanogel gelation times were 2.00 min and 1.10 min at 25 and 37 °C respectively. Even the gelation of PM nanogel took place; it was relatively slower, 2.45 and 1.20 min for these temperatures. Furthermore the conservation of nanogels (6 months) led to an even shorter gelation times, less than 0.5 min. All results indicated that, to obtain a thin film over the lesion is necessary a short time after application.

3.1.6. Drug loading efficiency and stability study

The drug content was found to be $99 \pm 0.5\%$. Results indicated that PM was properly and uniformly dispersed. The optimized formulation was subjected to stability studies at three different temperatures (-20, 4 and 25 °C). It was found that more than 98% of drug was present in all formulations after 10 days, whereas after 30 days the hydrogels stored at low temperature showed higher PM loading efficiency compared to hydrogels stored at room temperature. Concretely, the decline percentages in consecutive order

were 1.5%, 8% and 17% ($-20\text{ }^{\circ}\text{C} < 4\text{ }^{\circ}\text{C} < 25\text{ }^{\circ}\text{C}$). PM thermograms (thermal analysis data are shown as supplementary information) showed the broad endotherm for the loss of moisture starting from $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ and ending at $185\text{ }^{\circ}\text{C}$ approximately, which is attributed to the loss of adsorbed water of PM. Peak observed above $230\text{ }^{\circ}\text{C}$ correspond to pyrolysis of PM with drastic signal drop. These results were further confirmed by TG. Equally, the physical stability of micelles was confirmed by observation of their size and polydispersity index over time **FIGURE 1**. The ratios between the initial sizes and those observed after 6 months stored at different temperatures were in a narrow range, the micelles were considered stable. This fact suggested that the PEO chains are sufficiently extended and prevent any aggregation of micelles. Furthermore, pH values remained constant at different temperatures. Equally no significant changes were observed in rheological profiles (data not shown) or parameters τ_0 and η_p ($P < 0.05$).

3.2. *In vitro* release study and kinetic evaluation

All membranes allowed the passage of PM, however after 1.5 h the nylon and methylcellulose membranes had reached 100% and 84% respectively. In contrast, transfer was smaller through the polysulfone membrane. Approximately 70% of the dose had crossed the membrane after 6 h. Therefore, nylon was the selected as membrane for the release studies (Graph provided in the supplementary information). Prior to the release study, the solubility of the PM in different solvents was tested, namely, water, methanol, ethanol, acetonitrile and 2-propanol, showing that the PM was soluble only in water. The saturation solubility (C_s) of PM in the receptor compartment was determined to be 1 g/ml at room temperature. During the release study, $C_1 < C_s \times 0.2$ was maintained, where C_1 would be the final concentration of PM in the medium if

a complete release in the acceptor media was achieved, in compliance with sink conditions.

Release profiles of the PM loaded in nanogel and the ointment (provided as supplementary information) showed that only $1.17 \pm 0.92\%$ of PM was released from the vaseline ointment after 6 h, while $36.93 \pm 3.41\%$ PM was released from the aqueous medium nanogel during the same time period. This result clearly indicated that nanogel played an important role in the *in vitro* PM release profiles from polymeric micellar systems. The plot demonstrated that PM entrapment in the nanogel slowed down the drug release and provided a sustained release for about 5 h. Such liberation could be due to the formation of micelles and larger micelle-like aggregates, which are quite useful in drug delivery.

The modeling of drug release from delivery systems is important for the understanding and the elucidation of the transport mechanisms. Model fitting (provided as supplementary information) showed that both formulations followed the Weibull model, which had the smaller value of AIC (data available in supplementary information) and thus, statistically described best the drug release mechanism, with a total release drug ($\%Q_{\infty}$) of 36.18% (CV = 1.42%) from the nanogel and of 1.21% (CV = 4.72%) from the ointment. It has been typically considered as an empirical equation, in which, the value of the exponent β has been proposed as indicator of the mechanism of diffusion release [21]. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms, estimates for $\beta \leq 0.75$ indicate Fickian diffusion in either fractal or euclidian spaces while a combined mechanism (Fickian diffusion and swelling controlled release) is associated with β values in the range $0.75 < \beta < 1$. For values of β higher than 1, the drug transport follows a complex release mechanism. For the assayed

formulations, β values ranged from 0.79 to 0.89. t_d represents the time interval necessary to dissolve or release 63.2% of the drug present in the pharmaceutical dosage form meaning that 63.2 % of PM was released in 41.67 h, what conventional ointment took 33.33 h. The measured release rate from nanogel was significantly slower than that from the conventional formulation. This suggests that structure present in gel promotes prolonged drug release.

Korsmeyer-Peppas exponent (n) has been typically used to describe the drug release mechanism from the dosage form. Taking into account the value of the diffusional exponent obtained (from 0.22 to 0.32), a Fickian diffusion seemed to be involved in the release mechanism of PM from formulations ($n \leq 0.43$), this means that PM release from the both formulations followed a concentration gradient pattern, based on the first Fick's law, where the released amounts are directly proportional to the amounts remaining into the dosage form offering a sustained drug release.

Although PM has a high activity both *in vitro* and in animal models, its clinical efficacy is generally quite variable, which may be related to drug-delivery problems. On the basis of reported facts and *in vitro* data of this manuscript, it is expected our nanogel to solve these problems.

3.3. *Ex vivo* permeation experiments through human skin

To date *ex vivo* permeation experiments with different vehicles PM have been performed using hairless skin mice and pig ear skin as membranes [22, 23]. These models cannot be easily extrapolated to human skin. Thus, we aimed to investigate the potential of PM loaded nanogel in the delivery of PM by conducting permeation studies on human skin. No amounts of PM were detected in the receptor chamber from nanogel and ointment, therefore, neither flux nor permeation parameters could be calculated.

Considering that parasites in CL are located mainly in the dermis, the median PM amount remaining in the skin after 24 h of ointment formulation was $268.096 \mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{cm}^2$, a quantity markedly higher than from nanogel formulation ($31.652 \mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{cm}^2$).

The higher retention of PM observed from the ointment could be due to the occlusive nature of the excipient and its high lipophilicity. It is also possible to speculate that our data of retention in human skin could be attributed to different solubility properties of the PM among vehicles.

CL most commonly appears first as a localized papule, which then evolves into an ulcer upon the loss of the epidermis, resulting in a great impairment of the skin barrier.

Formulations can be applied either to thickened lesions or open lesions. In the first variant, with an additional barrier to absorption, then the drug must be able to target the *Leishmania* parasites within the phagolysosome of the infected macrophages in the deep dermal layer of the skin: in this case, PM ointments possess problems of varying efficacy and toxicity [24]. The low efficacy of these formulations can be related to poor penetration of the PM into the CL lesion. For this reason petrolatum ointments containing PM, associated with methylbenzethonium chloride, an ammonium quaternary with antileishmanial activity, have been elaborated. However, the local side effects of this ointment have given rise to the search for alternative topical formulations for the treatment of CL [25]. In addition, these preparations have a greasy consistency that can affect the adhesion of the appliance to the skin, especially in tropical climates or temperate zones. On the other hand, open lesions, in which the barrier properties of the epidermis have been completely lost, it is more likely to be found significant PM concentrations in blood, resulting in toxic effect. Thus an occlusive effect would strengthen this effect and promote the maceration of the skin, which could cause

irritation and microbial growth [26]. An ideal formulation for the topical treatment of CL should be used to provide improved topical delivery in all antagonistic situations (i.e., intact, partially, or completely damaged barrier) and should be directed toward the eradication of the parasites and reduction of the size of the lesions with minimal scarring and toxicity. In this way, poloxamers micellar carriers have attracted particular interest in the design of dermal nanogels, with a view to promoting drug permeation and possessing healing properties [27]. Moreover, these polymeric gels offer several advantages over traditional oleaginous bases in terms of ease of application and cosmetic acceptability (colorless and water-washable) and desirable drug release characteristics [28]. Thus, our findings suggest that the PM micellar nanogel could be an interesting alternative to improved topical delivery of PM in both conditions.

3.4. *In vivo* tolerance study by TEWL determination

TEWL was performed to assess stratum corneum damage and thus to examine the tolerance of the skin. As shown in FIGURE 5, the TEWL determined over 3 days was evaluated. In practice, TEWL values less than $10 \pm 5 \text{ g/m}^2 \cdot \text{h}$ made it possible to accept the membrane, and any important increase would reflect a loss of intactness for the sample being tested. Ointment treated areas versus untreated control sites comparison showed that TEWL was significantly smaller ($P < 0.001$). On the other hand, no statistically significant differences were observed between nanogel and untreated control sites ($P > 0.05$). Treatment with ointment produced significant stratum corneum hydration, as expected while nanogel did not show differences with untreated skin. It is universally acknowledged that drug penetration occurs more rapidly through occluded hydrated skin. But occlusion has been reported to increase the incidence and severity of skin irritation [26]. The prevention of evaporation of water from the skin hydrates the

stratum corneum and makes it swell. This may lead to occlusion of poral orifices and follicular obstruction causing inflammatory papules, or even an acneiform reaction and serious skin infections. The potential use of P407 as an artificial skin has also been reported by the inherent ability of gels to cover wound surfaces thereby reducing infection and allowing the natural tissue repair process to take place [29]. From the present observations, it appears that P407 gel application is favorable for fast healing in the early days of healing. P407 gel might be of substantial used in stimulating re-epithelization and maturation of wounds. Recent studies have concluded that P407 gel enhances cutaneous wound healing by stimulating expression of VEGF and TGF- β_1 during inflammatory and proliferative phases of healing rats [30].

3.5. *In vitro* cytotoxicity assay

RAW cell lines as the experimental cells with P-glycoprotein expressed on its surface were utilized. This cell line is known to exhibit multiple drug resistance properties. VERO cells are normal mammalian cells extracted from African monkey kidney which are generally used in pharmaceutical research. From our findings, it was observed that the cell viability of RAW and VERO cells was maintained above 80% with concentration of P407 as high as 3.1 and 12.5 mg/ml respectively (FIGURE 6). As shown in TABLE 2 the unloaded nanogel formulation has negligible *ex vivo* toxicity and demonstrate their usefulness for application *in vivo* with IC_{50} value of $80 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ in RAW cells and $40 \times 10^3 \mu\text{g/ml}$ in VERO cells. According to US National Cancer Institute, IC_{50} value above 20 $\mu\text{g/ml}$ is considered as safe and not active. In fact, P407 triblock-copolymer micelles are considered as one of the most studied biocompatible polymer nanocarriers for *in vivo* studies. These P407 based micelle particles meet all

requirements for therapeutic and biomedical applications *in vitro* and *in vivo*, such as biocompatibility, biodegradability and low toxicity [17].

As can be seen in FIGURE 7, PM concentrations of 12.2 µg/ml exhibited 100% viability. It also represents the toxicity study of PM loaded nanogel compared to PM plain solution. Both, micelles and solution did not show any important toxicity (less than 20% mortality) with concentration up to 195.3 µg/ml. PM solution had the highest cytotoxicity in VERO cells, in particular from 390 µg/ml (40% mortality) to 12500 µg/ml (100% mortality), while for the same concentration range, PM nanogel significantly improved VERO cell viability. Contrary, with RAW cells, PM nanogel showed the highest cytotoxicity when compared with PM solution. This could be due to P407 copolymers can reduce multidrug resistance reducing its efflux from cells mediated by P-glycoprotein as RAW cells. This result clearly indicates that the incorporated PM in the nanogel induced significant cytotoxic effect. Nevertheless PM nanogel exhibited high value of IC₅₀ (TABLE 2), confirming that these biodegradable formulation have excellent biocompatibility. Trypan blue technique results corroborated these findings (data not shown).

3.6. *Ex vivo* promastigote assay

The *ex vivo* antileishmanial effects of PM, PM loaded and unloaded nanogel are presented in TABLE 3, in which results are expressed as IC₅₀. The estimation of this parameter showed that PM loaded in the micellar nanogel was the most active agent against *L. infantum* promastigotes with an IC₅₀ of 12.16 µg/ml. Similarly, this formulation was much more active against *L. major* when compared with the free drug, exhibiting IC₅₀ values of 23.31 and 37.19 µg/ml, respectively. In particular, the PM loaded nanogel was about two times more effective than PM in solution. The

leishmanicidal activity of the PM loaded nanogel exhibited IC₅₀ values less than that previously reported by other authors with liposomes [10]. PM nanogel is formulated with poloxamer, an amphipathic polymer in alternating hydrophilic and hydrophobic chains along the polymer. Poloxamers have been shown to have the ability to inhibit the action of a group of proteins known as P-glycoproteins [31]. *Leishmania* has P-glycoproteins expressed mainly on its surface and is known that this group of proteins have a role in the measurement of drug resistance. For this reason our micellar gel is shown to be very interesting for the development of anti-*Leishmania* agents. In view of our results, it could be pointed out a synergy between the PM and the micellar nanogel in terms of activity that could result in an efficient strategy for treatment of LC. The dose currently used for topical treatment of CL is about 1 mg/mm², which corresponds to 100–150 mg/cm² [32]. This dose is extremely high when compared with that assayed in this study (300 µl micellar nanogel containing 5% PM). Taking into account the skin hydrated density (0.964 g/ml) [33], the resulted skin retention value of 31.652 µg/g·cm² and the calculated IC₅₀, we can establish that the assayed dose equivalent to 5.9 mg/cm² would be sufficient to achieve 50% reduction on *L. major* and *L. infantum* promastigote growth. Equally, according to the cytotoxicity assay results, this dose is safe, which corroborates the development of the PM loaded nanogel as an interesting alternative for topical treatment of CL.

4. Conclusions

CL is an increasingly prevalent disease causing ulcerative lesions that are often disfiguring and can leave permanent scars for which drug therapy is largely inadequate. Topical treatment offers few adverse effects, better compliance, reduced costs and is

feasible for a rural setting. Our results suggest that although the time required for the clinical healing of ulcerated lesions takes longer, topical PM may be an acceptable therapeutic alternative for lesions measuring less than 5 cm in endemic areas where meglumine antimoniate is not available, is too costly or medically contraindicated. Several therapeutic options of PM formulations have been addressed by different authors in recent years. However, some of those displayed disadvantages such as requiring complicated steps and long hours of preparation, and intrinsic instability of the formulation that will lead to the breakdown. In contrast, we have prepared a stimuli-sensitive PM nanogel with multiples advantages, such as simple drug formulation and administration procedures, organic solvent free, site-specific, sustained drug release behavior, less systemic toxicity and ability to reduce multidrug resistance to PM through the internalization mechanism of the drug and reducing its efflux from cells mediated by P-glycoprotein expressed mainly on *Leishmania* surface. Thus, the reported PM nanogel could potentially be translated from clinical research into *Leishmania* therapy to overcome multidrug resistance in parasites and markedly increase therapeutic efficiency. Such properties of this class of polymers represent an opportunity for furthering the topical *Leishmania* therapy concept.

Future perspective

Amphiphilic polymers assemble into nanoscopic supramolecular core-shell structures, termed polymeric micelles, which are under extensive study for transdermal drug delivery considers P407 as stimuli-sensitive block copolymer. The use of this system loading paromomycin was first developed and evaluated as anti-cutaneous leishmania agent improving the cellular toxicity and leishmanicidal activity when compared with

the drug plain solution and ointment avoiding undesirable pain of parenteral administration, organic solvent free and the ability to reduce multidrug resistance to PM through the internalization mechanism of the drug and reducing its efflux from cells mediated by P-glycoprotein expressed mainly on *Leishmania* surface.

The CL remains a worldwide severe public health problem affecting disproportionately least developed countries, mainly poor rural and suburban areas.

First-line treatments are intralesional administration of parenteral pentavalent antimonials, which besides being expensive the patient compliance is almost nule. PM ointments are commercially available but their use is limited by either toxicity or lack of efficacy, therefore, from a nanotechnological point of view alternative cheaper and simpler drug delivery system and administration procedures should be developed maintaining safety and avoiding complicated steps of preparation and administration are promising perspectives for the future advance in the treatment of CL, and then increased research and funds have an important role for mitigating the dreadful effects of this kind of disease.

Executive summary

Micellar nanogel preparation & characterization

*Paromomycin (PM) can be efficiently loaded on poloxamer 407 (P407) nanogel by direct dissolution method resulting in negatively charged micelles exhibiting 9.19 nm mean particle size, 99% loading efficiency.

* Both newtonian and pseudoplastic (Bingham equation) behaviors were observed as a function of temperature.

*PM micellar nanogel was stable for 6 months, highlighting good pharmaceutical aspects.

In vitro release & permeation studies of PM micellar nanogel

*PM followed a controlled release model $\%R_t/\%R_\infty = 1 - e^{-\left(t/41.67\right)^{0.89}}$ (Weibull model)

from polymeric nanogel.

*A quantity of 31.652 $\mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{cm}^2$ of PM was retained in the skin when applied micellar nanogel.

PM micellar nanogel tolerance study in vivo

*P407 triblock-copolymer micelles are considered as one of the most studied biocompatible polymer nanocarriers for *in vivo* studies.

*No statistically significant differences occurred between nanogel and untreated control sites after trans-epidermal water loss measurements in volunteers.

Ex vivo toxicity of PM micellar nanogel in RAW and VERO cells

*PM incorporation in polymeric micelles led to a significant reduction of its toxicity towards VERO cell.

Ex vivo activity of PM micellar nanogel towards Leishmania infantum and

Leishmania major intracellular promastigotes

*PM loaded in the micellar nanogel was the most active agent against *L. infantum* and *L. major* promastigotes with IC_{50} values of 12.16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and 23.31 $\mu\text{g}/\text{ml}$ respectively when compared with a plain solution of the drug.

Conclusion

*Results of this investigation open the door to the research of new more effective, suitable and available drug delivery system for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

References

Papers of special note have been highlighted as either of interest (*) or of considerable interest (**) to readers.

1. Alvar J, Vélez ID, Bern C *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE* 7(5), e35671 (2012).
 2. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366 (9496), 1561–1577 (2005).
 3. Costa Lima SA, Resende M, Silvestre R *et al.* Characterization and evaluation of BNIPDaoct-loaded PLGA nanoparticles for visceral leishmaniasis: in vitro and in vivo studies. *Nanomedicine* 7(12), 1839–1849 (2012).
 4. Mishra J, Saxena A, Singh S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr. Med. Chem.* 14(10), 1153–1169 (2007).
- * This report is a descriptive paper identifying drugs utilized for leishmaniasis treatment and future perspectives.
5. Schwartz E, Cristoph H, Blum J. New world cutaneous leishmaniasis in travelers. *Lancet Infect. Dis.* 6(6), 342–349 (2006).
 6. Gonçalves GS, Fernandes AP, Souza RC *et al.* Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Acta Trop.* 93(2), 161–167 (2005).
 7. Fernandez MM, Malchiodi EL, Algranati ID. Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55, 86–93 (2011).

8. Carneiro G, Aguiar MG, Fernandes AP, Ferreira LA. Drug delivery systems for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *Expert Opin. Drug Deliv.* 9(9), 1083–1097 (2012).

**This is a representative review of specific drug delivery systems for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

9. Kim DH, Chung HJ, Bleys J, Ghohestani RF. Is paromomycin an effective and safe treatment against cutaneous leishmaniasis?. A meta-analysis of 14 randomized controlled trials. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3(2), e381 (2009).

10. Jaafari MR, Bavarsad N, Bazzaz BSF *et al.* Effect of topical liposomes containing paromomycin sulfate in the course of *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53(9), 2259–2265 (2009).

11. Vinogradov SV. Nanogels in the race for drug delivery. *Nanomedicine* 5(2),165–168 (2010).

12. Kedar U, Phutane P, Shidhaye S, Kadam V. Advances in polymeric micelles for drug delivery and tumor targeting. *Nanomedicine* 6(6),714–729 (2010).

13. Chiellini F, Piras AM, Errico C, Chiellini E. Micro/nanostructured polymeric systems for biomedical and pharmaceutical applications. *Nanomedicine* 3(3), 367–393 (2008).

** Excellent contribution dealing with new trends in drug-delivery technology based on polymeric micro/nanostructured advanced systems.

14. Antunes FE, Gentile L, Rossi CO, Tavano L, Ranieri GA. Gels of Pluronic F127 and nonionic surfactants from rheological characterization to controlled drug permeation. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 87(1), 42–48 (2011).

15. Fernández-Campos F, Calpena-Campmany AC, Rodríguez-Delgado G, López-Serrano O, Clares-Naveros B. Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: ultrastructural effects and release studies. *J. Pharm. Sci.* 101(10), 3739–3752 (2012).
16. He C, Kim SW, Lee DS. In situ gelling stimuli-sensitive block copolymer hydrogels for drug delivery. *J. Control. Release* 127, 189–207 (2008).
17. Chaibundit C, Ricardo NM, Costa Fde M, Yeates SG, Booth C. Micellization and gelation of mixed copolymers P123 and F127 in aqueous solution. *Langmuir* 23(18), 9229–9236 (2007).
- ** Provides a concise description of the poloxamer block copolymer micelles behavior in aqueous solution.
18. Lam VD, Walker LM. A pH-induced transition of surfactant-polyelectrolyte aggregates from cylindrical to string-of-pearls structure. *Langmuir* 26(13) 10489–10496 (2010).
19. Sierra AF, Ramirez ML, Campmany AC, Martinez AR, Naveros BC. In vivo and in vitro evaluation of the use of a newly developed melatonin loaded emulsion combined with UV filters as a protective agent against skin irradiation. *J. Dermatol. Sci.* 69(3), 202–214 (2013).
20. Ruiz MA, Clares B, Morales ME, Gallardo V. Preparation, rheological study, and characterization of an organogel as a system for transdermal release of active principles. *Pharm. Dev. Technol.* 12(6), 637–644 (2007).
21. Papadopoulou V, Kosmidis K, Vlachou M, Macheras P. On the use of the Weibull function for the discernment of drug release mechanisms. *Int. J. Pharm.* 309(1–2), 44–50 (2006).

22. Bavarsad N, Fazly Bazzaz BS, Khamesipour A, Jaafari MR. Colloidal, in vitro and in vivo anti-leishmanial properties of transfersomes containing paromomycin sulfate in susceptible BALB/c mice. *Acta Trop.* 124(1), 33–41 (2012).
23. Nogueira IR, Carneiro G, Yoshida MI, de Oliveira RB, Ferreira LA. Preparation, characterization and topical delivery of paromomycin ion pairing. *Drug. Dev. Ind. Pharm.* 37(9), 1083–1089 (2011).
24. Ben Salah A, Buffet PA, Morizot G *et al.* WR279,396, a third generation aminoglycoside ointment for the treatment of *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis: a phase 2, randomized, double blind, placebo controlled study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3(5), e432 (2009).
25. Aguiar MG, Silva DL, Nunan FA, Nunan EA, Fernandes AP, Ferreira LA. Combined topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) major* leads to reduction in both lesion size and systemic parasite burdens. *J. Antimicrob. Chemother.* 64(6), 1234–1240 (2009).
26. Tanner T, Marks R. Delivering drugs by the transdermal route: review and comment. *Skin Res. Technol.* 14(3), 249–260 (2008).
27. Almeida H, Amaral MH, Lobão P, Lobo JM. Pluronic® F-127 and Pluronic Lecithin Organogel (PLO): main features and their applications in topical and transdermal administration of drugs. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 15(4), 592–605 (2012).
28. Escobar-Chávez JJ, López-Cervantes M, Naik A, Kalia YN, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. Applications of thermo-reversible pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 9(3), 339–358 (2006).

29. Nalbandian RM, Henry RL, Balko KW, Adams DV, Neuman NR. Pluronic F-127 gel preparation as an artificial skin in the treatment of third-degree burns in pigs. *J. Biomed. Mater. Res.* 21(9), 1135–1148 (1987).
30. Kant V, Gopal A, Kumar D *et al.* Topical pluronic F-127 gel application enhances cutaneous wound healing in rats. *Acta Histochem.* (2013)
doi:10.1016/j.acthis.2013.04.010
31. Shaik N, Giri N, Elmquist WF. Investigation of the micellar effect of pluronic P85 on P-glycoprotein inhibition: cell accumulation and equilibrium dialysis studies. *J. Pharm. Sci.* 98(11), 4170–4190 2009.
32. Mitropoulos P, Konidas P, Durkin-Konidas M. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. *J. Am. Acad. Dermatol.* 63(2), 309–322 (2010).
33. Rins M, Diez I, Calpena AC, Obach R. Skin density in the hairless rat. Evidence of regional differences. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 3, 456–457 (1991).

Acknowledgments

The authors are thankful to Dr. Humet from Hospital Barcelona-SCIAS (Barcelona, Spain) for providing skin samples.

Financial & competing interest disclosure

This study has received funding from project of the Granada University Research Plan 2012, special actions (18th programme). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or

financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

Table 1. Droplet size (nm) and Polydispersity index (PI) of unloaded and drug loaded micellar nanogel .

T (°C)	Unloaded nanogel				Paromomycin loaded nanogel			
	24 hours		6 months		24 hours		6 months	
	Droplet Size (nm)	PI	Droplet Size (nm)	PI	Droplet Size (nm)	PI	Droplet Size (nm)	PI
4	12.67 ± 3.91	0.26 ± 0.05	19.97 ± 3.44	0.47 ± 0.02	8.86 ± 1.9	0.3 ± 0.08	6.63 ± 0.16	0.27 ± 0.01
25	27.02 ± 0.26	0.37 ± 0.02	26.54 ± 0.14	0.48 ± 0.03	9.19 ± 0.25	0.35 ± 0.01	10.75 ± 1.93	0.24 ± 0.07
37	32.55 ± 0.36	0.06 ± 0.01	34.96 ± 0.44	0.50 ± 0.02	23.87 ± 0.34	0.03 ± 0.00	23.69 ± 0.38	0.03 ± 0.01
40	32.31 ± 0.25	0.05 ± 0.01	34.78 ± 1.49	0.47 ± 0.03	23.78 ± 0.01	0.02 ± 0.01	23.33 ± 0.13	0.02 ± 0.01

Data are expressed as the mean ± standard deviation (n = 6).

Table 2. Nanogel and paromomycin IC₅₀ with and without the inclusion for P407 block copolymers.

Formulation	IC ₅₀ (µg/ml) RAW 264.7 Cells	IC ₅₀ (µg/ml) VERO Cells
Paromomycin solution	1210.24	353.98
Paromomycin-micellar nanogel	>1000	>1000
Micellar nanogel	80 × 10 ³	40 × 10 ³

Table 3. *In vitro* antileishmanial activity of plain paromomycin, paromomycin loaded nanogel and unloaded nanogel on *L. major* and *L. infantum* promastigotes.

Formulation	IC ₅₀ (µg/ml) <i>L. infantum</i> ± SD	IC ₅₀ (µg/ml) <i>L. major</i> ± SD
Paromomycin	19.66 ± 1.75	37.19 ± 1.59
Paromomycin-micellar nanogel	12.16 ± 1.07	23.31 ± 1.71
Micellar nanogel	> 50 × 10 ³	> 12 × 10 ³

Data are expressed as the mean ± standard deviation (n = 3).

Figure 1. Micelle size distribution of micellar unloaded nanogel and paromomycin loaded nanogel at different temperatures. PM: paromomycin.

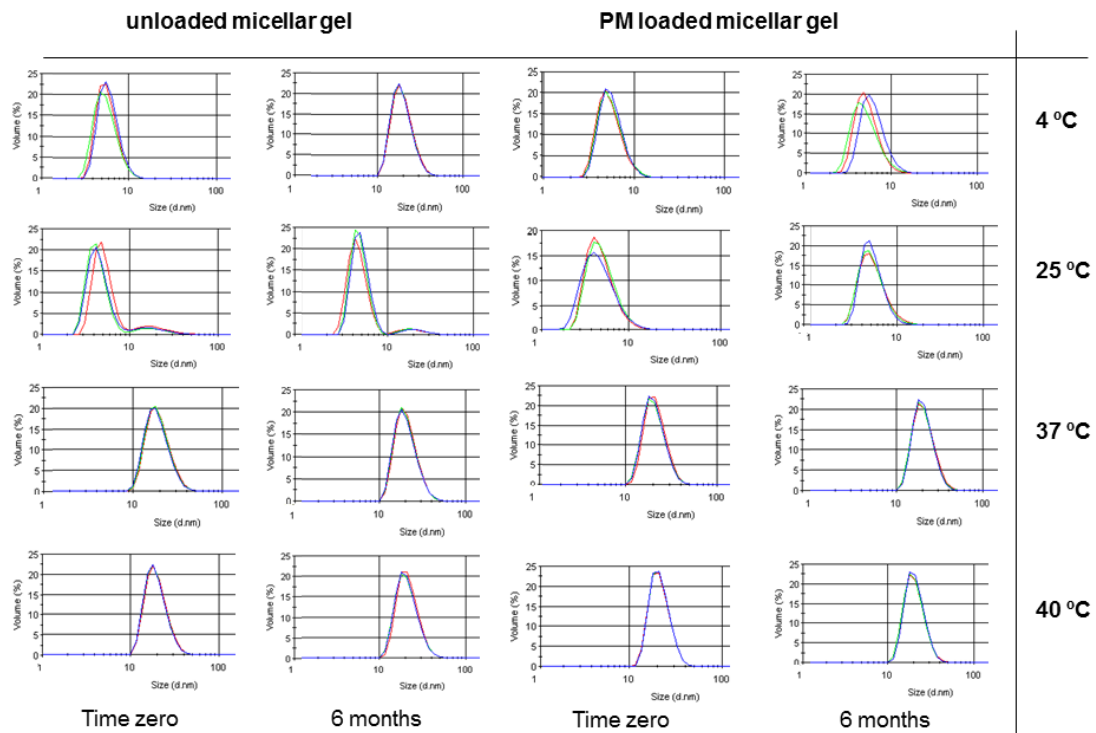


Figure 2. Transmission electron microscopy images showing (A) paromomycin loaded micellar nanogel 24 h after elaboration, (B) unloaded micellar nanogel 24 h after elaboration, (C) paromomycin loaded micellar nanogel 6 months after preparation, and (D) unloaded micellar nanogel 6 months after preparation. All samples were stored at 25 °C. Bar length 50 nm.

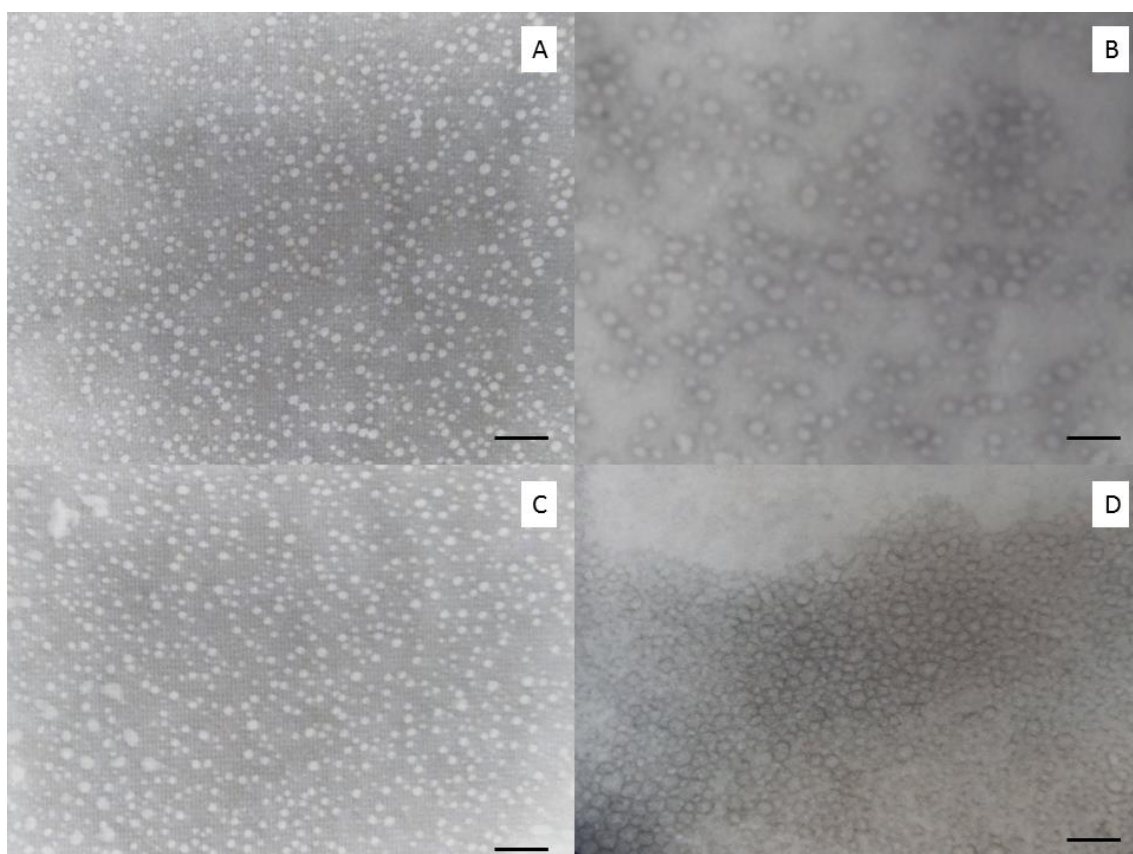


Figure 3. Graphs of viscosity as a function of temperature showing (A) the micellar nanogel vehicle and (B) the ointment vehicle.

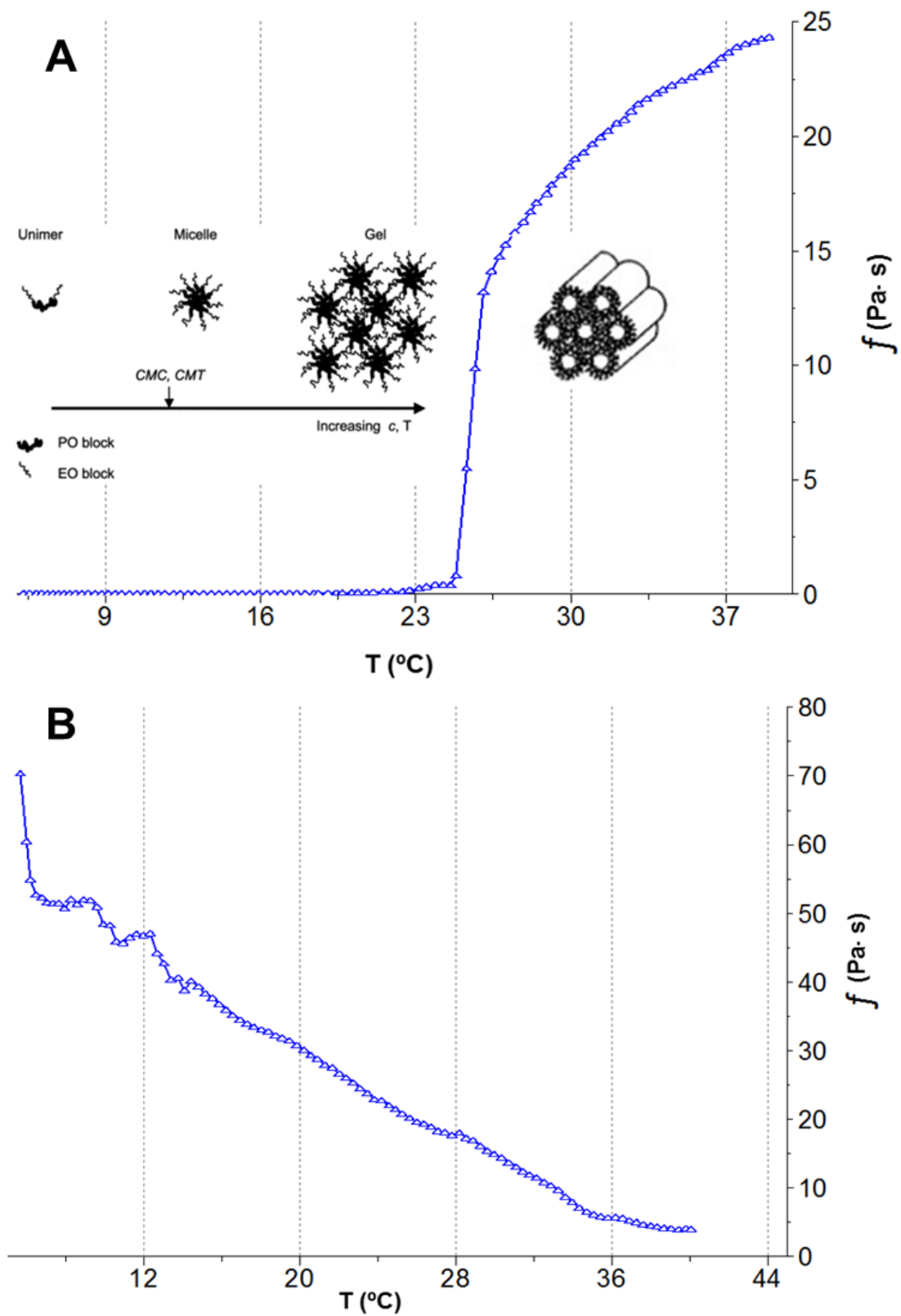


Figure 4. Drug loaded and unloaded micellar nanogel rheograms at different temperatures. Graphs show the shear stress (Pa) (in red) and the viscosity (Pa·s) (in blue).

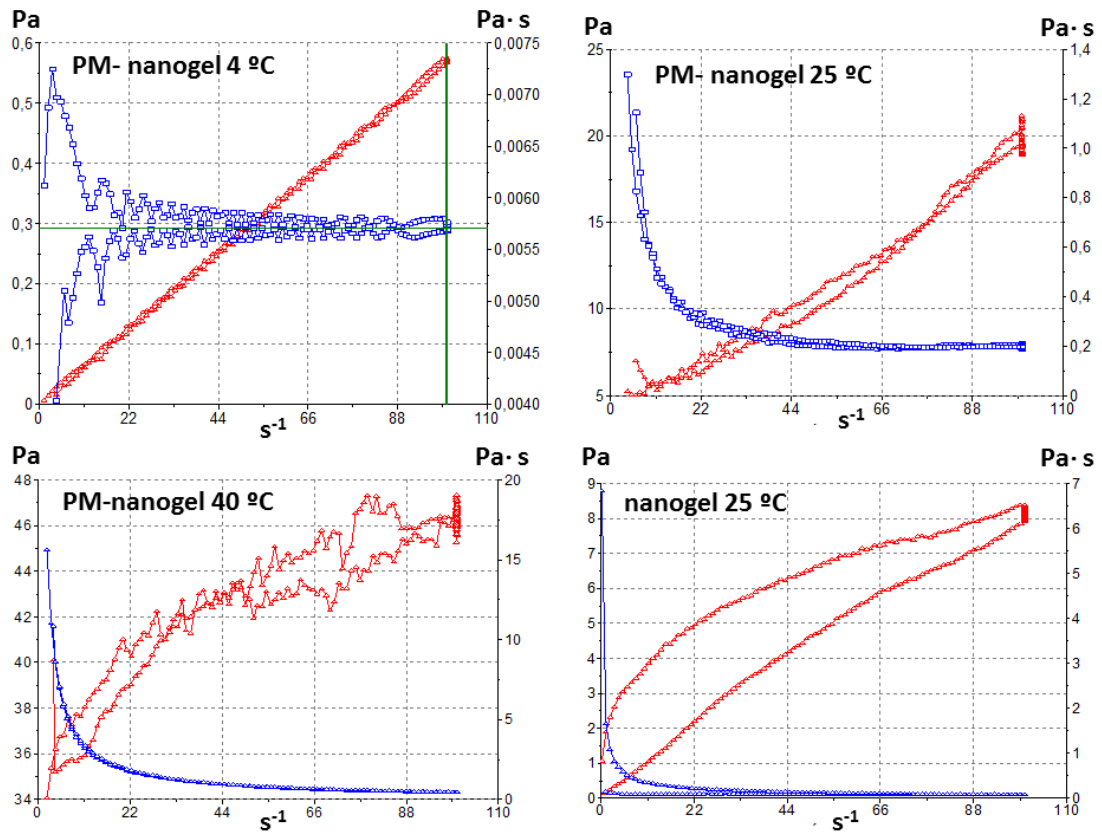


Figure 5. Trans epidermal water loss (TEWL) to assess stratum corneum damage after treatment with the paromomycin formulations.

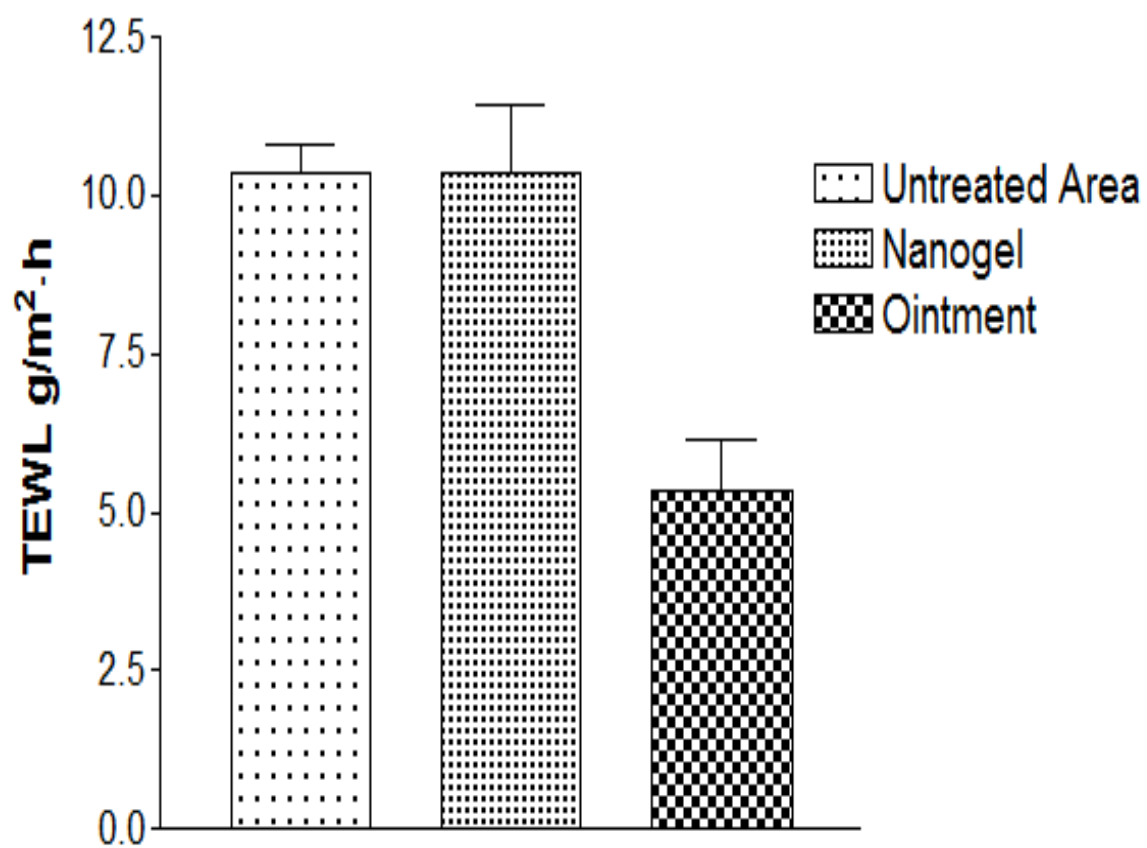


Figure 6. Cell viability (%) in RAW and VERO cell lines of P407 at different concentrations.

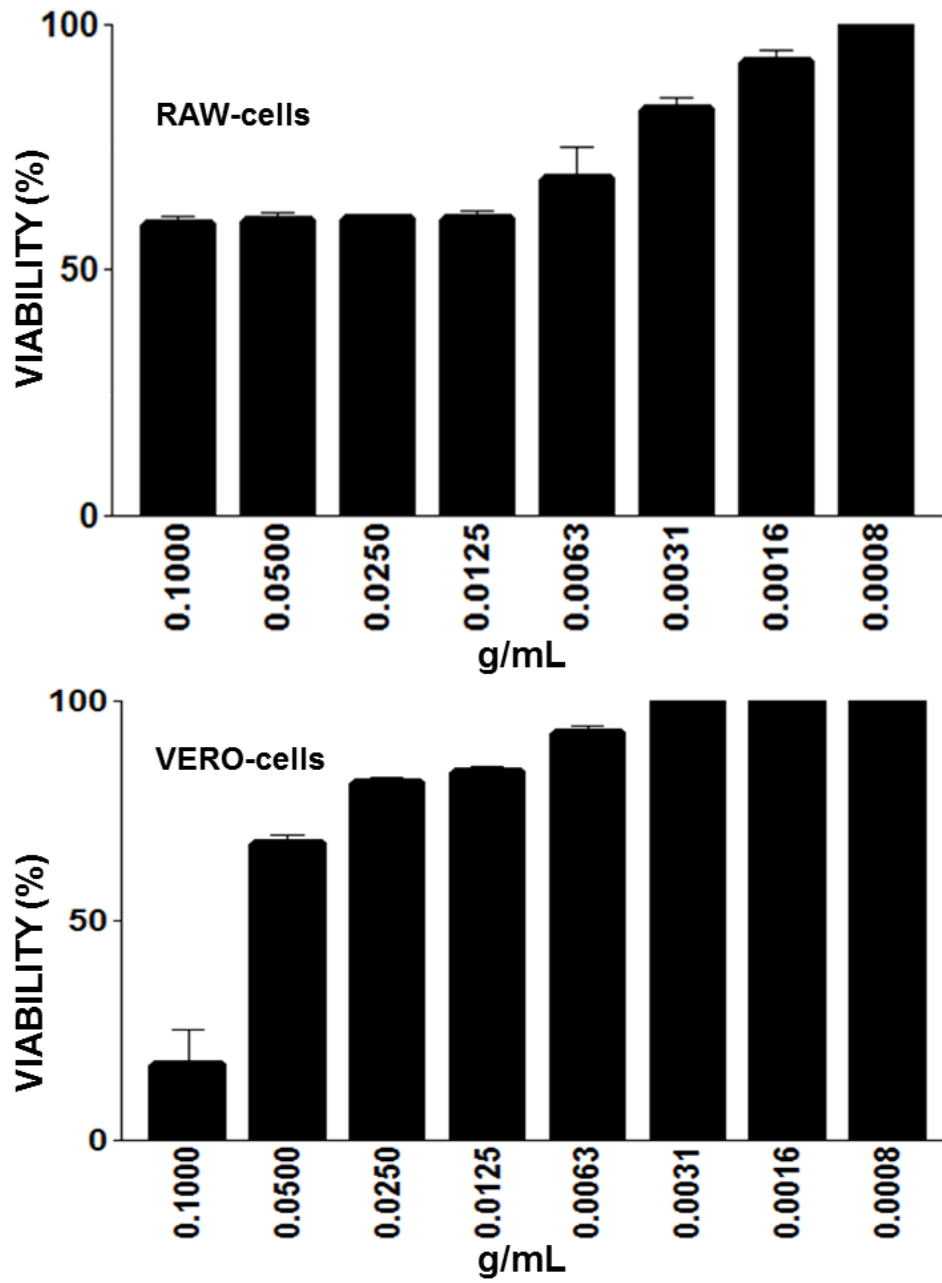
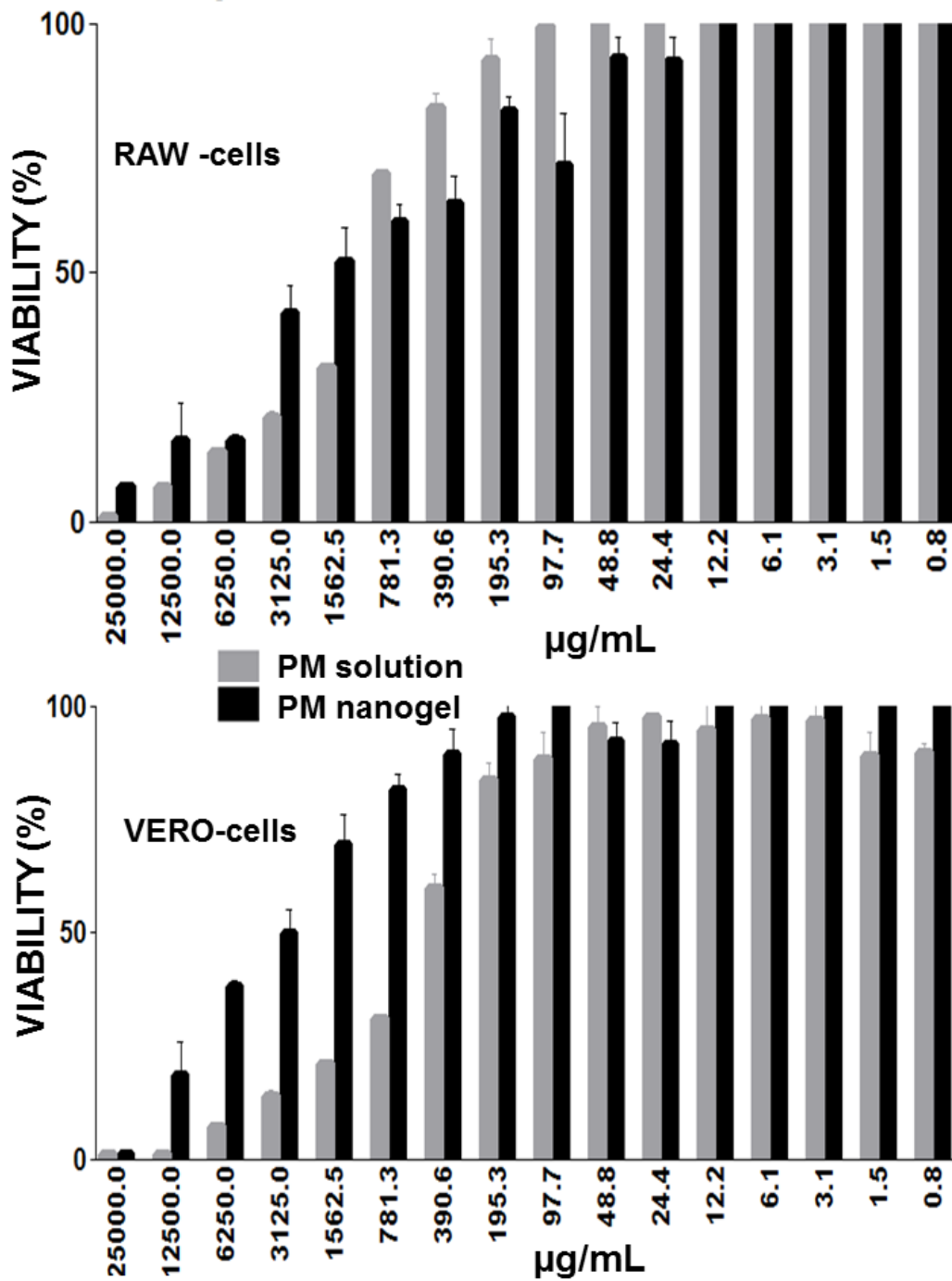


Figure 7. Cell viability (%) in RAW and VERO cell lines of paromomycin plain solution and paromomycin loaded micellar nanogel at different concentrations.



INFORMACIÓ SUPLEMENTÀRIA

Reagents and chemicals

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM medium), Minimal essential medium (MEM), dimethyl sulfoxide (DMSO), Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium, Schneider's insect medium (S9895), Triton X-100 and *p*-nitrophenyl phosphate were obtained from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate (Cell Proliferation Reagent WST-1) was purchased from Roche Diagnostics GmbH (Mannheim, Germany). Fetal bovine serum (FBS) was obtained from Sera Laboratories International (West Sussex, United Kingdom). Gentamycin solution (50 mg/ml) from Serva Electrophoresis GmbH (Heidelberg, Germany). All other chemicals were of analytical grade.

Membranes utilized for release studies were: methylcellulose (Teknokroma, Barcelona, Spain), nylon (Waters Corporation, Milford, MA, USA) and polysulfone (Pall Corporation, Gelman Sciences, Ann Arbor, MI, USA).

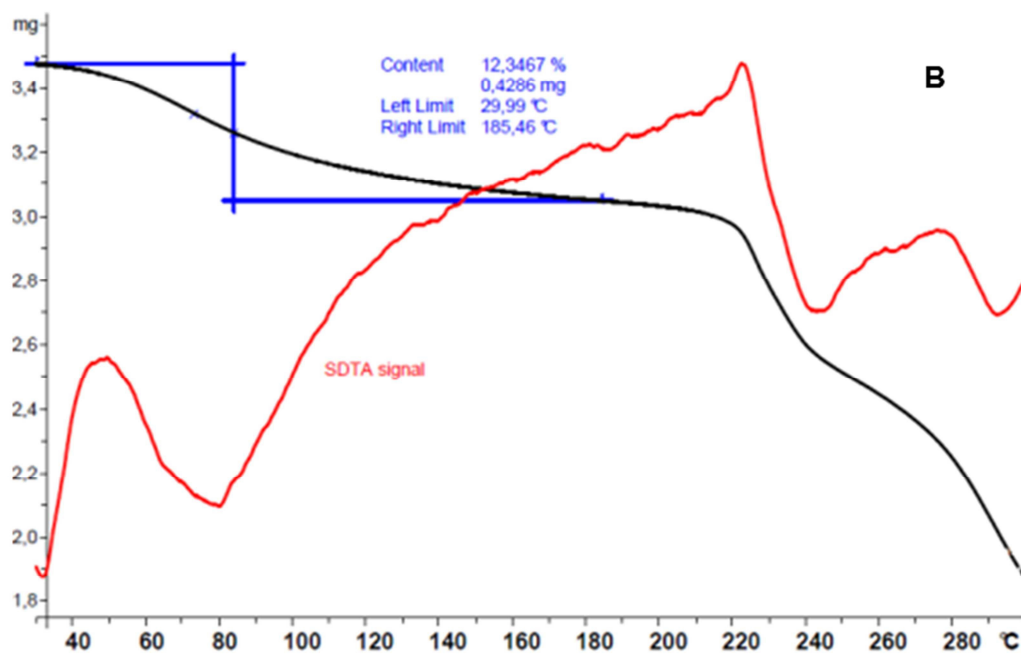
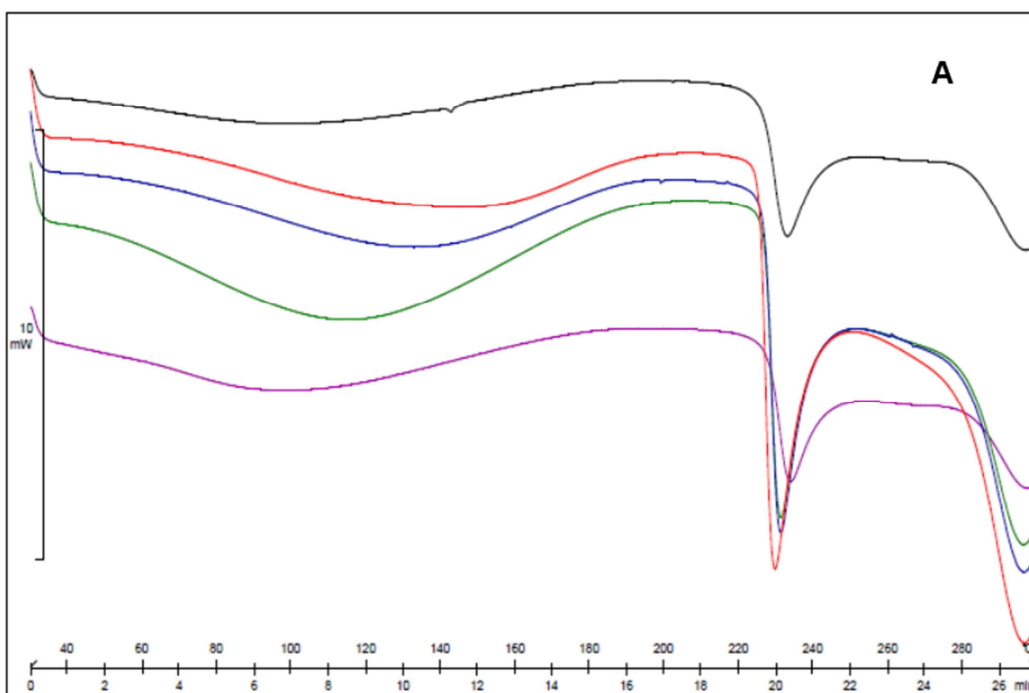
Strains of *Leishmania infantum* (MCAN/ES/92/BCN83) and *Leishmania major* (MHOM/SU/73/5ASKH) were provided by the Parasitology Laboratory Cryobank of the Faculty of Pharmacy, University of Barcelona (Spain).

RAW 264.7 and VERO cell lines were obtained from the bank of the Faculty of Biology (University of Barcelona, Spain).

INFORMACIÓ SUPLEMENTÀRIA

Thermal analysis

Differential scanning calorimetry curves (A) for paromomycin after different storage conditions; purple curve (reference) 25 °C; green, 6 h, 50 °C; blue, 20 h, 60 °C; and black 48 h 100 °C. The graph also shows (B) the thermogravimetric curve of paromomycin.



INFORMACIÓ SUPLEMENTÀRIA

Rheological studies

Mathematical equations corresponding to the rheological models:

$$\tau = \eta \times \dot{\gamma} \quad \text{Newton}$$

$$\tau = \tau_0 + \eta_p \times \dot{\gamma} \quad \text{Bingham}$$

$$\tau = k \times (\dot{\gamma})^n \quad \text{Ostwald-De-Waele}$$

$$\sqrt{\tau} = \sqrt{\tau_0} + k_1 \times \sqrt{\dot{\gamma}} \quad \text{Casson}$$

Where η is the viscosity, τ is the shear stress, $\dot{\gamma}$ is the shear rate (1/s), τ_0 is the yield shear stress (Pa), η_p constant plastic viscosity (Pa·s), K is the consistency (s) and n is the flow index, the different values of n indicate the fluid behavior. For a Newtonian fluid, $n = 1$. If $n < 1$, the fluid is called pseudoplastic; if $n > 1$, the fluid is dilatant.

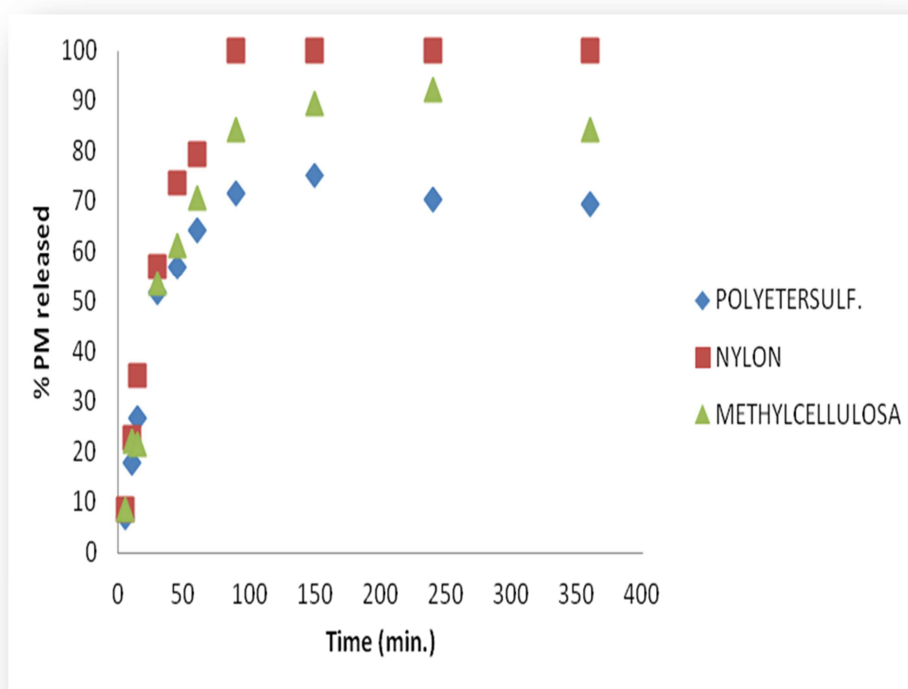
Rheological parameters of the paromomycin micellar nanogel obtained by fitting the experimental data to rheological mathematical models for the ascendant and descendent stretches are represented bellow.

	Ascendant stretch						Descendent stretch					
	η	τ_0	η_p	n	K	r^2	η	τ_0	η_p	n	K	r^2
Newton	0.27	–	–	–	–	0.8864	0.26	–	–	–	–	0.9569
Bingham	–	5.01	0.19	–	–	0.9770	–	3.49	0.21	–	–	0.9954
Ostwald de Waele	–	–	–	0.64	1.24	0.9614	–	–	–	0.74	0.79	0.9849
Casson	–	1.89	0.12	0.5	–	0.9707	–	0.98	0.15	0.5	–	0.9908

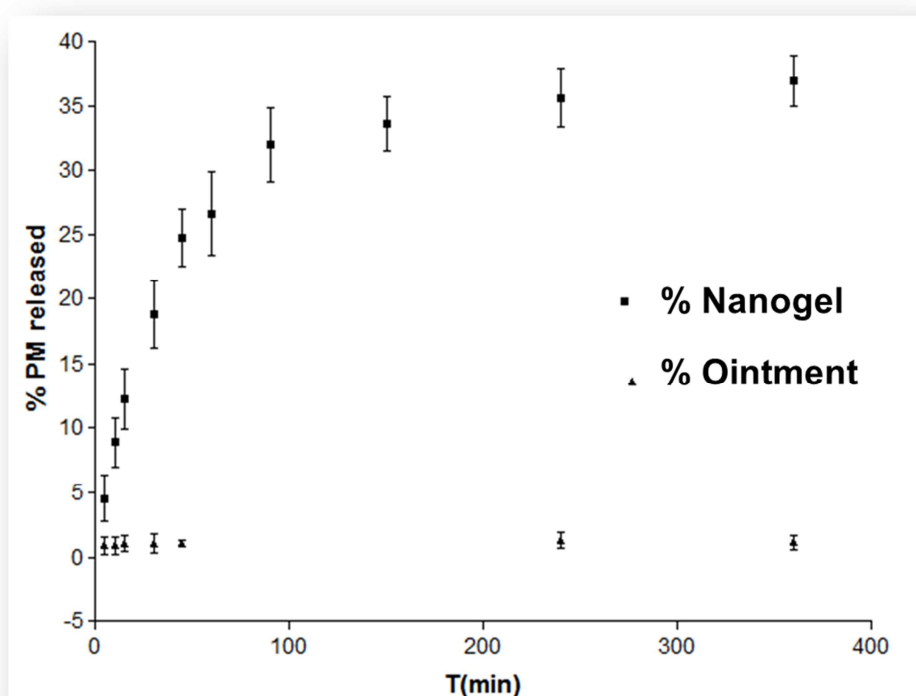
INFORMACIÓ SUPLEMENTÀRIA

Release studies

Membrane selection for in vitro release studies: amount of paromomycin (PM) (%) transferred through each type of membrane: polysulfone, nylon and methylcellulose.



Release profiles of paromomycin (PM) from vehicles, micellar nanogel and ointment.



Mathematical equations corresponding to the release models:

$\%R_t/\%R_\infty = K \times t$	Zero order
$\%R_t/\%R_\infty = 1 - e^{-k \times t}$	First-order
$\%R_t/\%R_\infty = K \times t^{1/2}$	Higuchi's equation
$\%R_t/\%R_\infty = 1 - e^{-(t/t_d)^\beta}$	Weibull's equation
$\%R_t/\%R_\infty = K \times t^n$	Korsmeyer–Peppas's equation

where $\%Q_t$ is the percentage drug released at time t , $\%Q_\infty$ is the total percentage drug released, $\%Q_t/\%Q_\infty$ is the fraction of drug released at time t , k is the release rate constant, n is the diffusion release exponent that could be used to characterize the different release mechanisms; $n \leq 0.43$ (Fickian diffusion), $0.43 < n < 0.85$ (anomalous transport), and $n \geq 0.85$ (case II transport; i.e. zero-order release), t_d is the time in which the 63.2% of the drug is released and β is the shape parameter.

The Akaike's Information Criterion (AIC) was calculated from the following equation:

$$AIC = n \times \ln SSQ + 2p$$

where n is the number of pairs of experimental values, SSQ is the residuals sum of squares and p is the number of parameters in the fitting function.

Release parameters obtained after fitting experimental data to different release mathematical models were:

Sample	Parameter	Zero Order	First Order	Higuchi	Weibull	Korsmeyer-Peppas
PM-Nanogel	K (CV)	0.14 h ⁻¹ (19.90)	0.026 (4.74)	2.52 h ^{-1/2} (7.78)	–	6.11 h ⁻ⁿ (24.19)
	%Q _∞ (CV)	–	35.57 (1.53)	–	36.18 (1.42)	–
	n (CV)	–	–	–	–	0.32 (14.98)
	t _d (CV)	–	–	–	41.67 h (4.58)	–
	β (CV)	–	–	–	0.89 (4.33)	–
	AIC	76.74	23.28	60.49	18.85	53.28
PM-Ointment	K (CV)	0.004 h ⁻¹ (31.24)	0.039 (13.70)	0.079 h ^{-1/2} (15.53)	–	0.34 h ⁻ⁿ (24.95)
	%Q _∞ (CV)	–	1.19 (4.66)	–	1.21 (4.72)	–
	n (CV)	–	–	–	–	0.22 (22.59)
	t _d (CV)	–	–	–	33.33 h (17.20)	–
	β (CV)	–	–	–	0.79 (22.31)	–
	AIC	4.91	-17.85	-1.77	-18.15	-10.99

3.4 APPLICATION OF QUANTUM DOTS TO THE STUDY OF LIPOSOME TARGETING IN LEISHMANIASIS AND MALARIA

Tant la leishmaniosi com la malària són malalties causades per paràsits intracel·lulars obligats. En aquest treball hem utilitzat l'aplicació de quantum dots per estudiar a nivell subcel·lular el lliurament del contingut dels liposomes dins d'eritròcits infectats pel paràsit de la malària, *Plasmodium falciparum* (pRBCs), i dins de macròfags infectats per l'agent causant de la leishmaniosi, *Leishmania infantum*.

Per seguir la destinació en pRBCs i macròfags de quantum dots encapsulats en liposomes, així com els lisosomes, nuclis, fagosomas i els propis paràsits hem utilitzat diferents marcadors i la microscòpia de fluorescència confocal.

Les nostres dades indiquen que els liposomes es fusionen amb la bicapa lipídica de les membranes plasmàtiques dels pRBC i que són fagocitats pels macròfags, on es fusionen amb els lisosomes. Quan els fagosomes només contenen un sol paràsit de *Leishmania*, no s'observa aquesta unió amb els lisosomes, mentre que en els fagosomas on el paràsit s'ha dividit sí s'observa aquesta unió amb una desaparició concomitant de lisosomes des del citosol.

Aquesta incorporació de contingut liposomal (QDs) en els lisosomes citosòlics i la posterior fusió fagosoma-lisosoma, mostren l'existència d'una fusió liposomes-lisosomes com un esdeveniment previ a la formació del fagolisosoma, suggerint que els lisosomes podrien dirigir medicaments liposomals anti-*Leishmania* cap als fagosomes que contenen el paràsit.

En etapes posteriors, el marcatge lisosoma-específic es troba dins dels fagosomes mentre que la cadaverina, marcador fagosomal, tenyeix fortament el nucli dels macròfags, el que suggereix que la infecció per *Leishmania* indueix en les últimes etapes degeneració nuclear i, possiblement, l'apoptosi de la cèl·lula hoste segurament com una possible estratègia utilitzada per *Leishmania* per preparar la seva sortida.

Application of Quantum Dots to the Study of Liposome Targeting in Leishmaniasis and Malaria

Alba Pujol¹, Patricia Urbán^{2,3,4}, Cristina Riera¹, Roser Fisa¹, Israel Molina⁵, Fernando Salvador⁵,
Joan Estelrich^{4,6}, Xavier Fernàndez-Busquets^{2,3,4}

¹Laboratori de Parasitologia, Departament de Microbiologia i Parasitologia Sanitàries
Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, E08028 Barcelona, Spain
apujolbrugues@gmail.com, mcriteria@ub.edu, rfisa@ub.edu

²Institute for Bioengineering of Catalonia

Baldiri Reixac 10-12, E08028 Barcelona, Spain

³Centre for International Health Research (CRESIB, Hospital Clínic-Universitat de Barcelona)
Centre Esther Koplowitz, planta 1, CRESIB, Rosselló 149-153, E08036 Barcelona, Spain

⁴Institut de Nanociència i Nanotecnologia (IN2UB), Universitat de Barcelona

Martí i Franquès 1, E08028 Barcelona, Spain

urban.patricia@gmail.com, xfernandez_busquets@ub.edu

⁵Infectious Diseases Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, PROSICS Barcelona
Pg. Vall d'Hebron 119-129, E08035 Barcelona, Spain

israelmolina@ymail.com, medinano@yahoo.es

⁶Departament de Físicoquímica, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona
Av. Joan XXIII s/n, E08028 Barcelona, Spain

joanestelrich@ub.edu

Abstract- *Nanotechnological devices for therapeutic applications are massively addressed to diseases prevalent in the developed world, particularly cancer, because of the wrong assumption (for both ethical and technical reasons) that nanomedicines are too expensive and thus they can not be applied to diseases of poverty. Here we have applied quantum dots to study at the cellular level the delivery of the contents of liposomes to erythrocytes infected by the malaria parasite Plasmodium falciparum, and to macrophages infected by the leishmaniasis causative agent Leishmania infantum. A number of works have reported on the encapsulation in liposomes of drugs against both diseases as a strategy to increase therapeutic efficacy and decrease unspecific toxicity. Liposome-carried drugs end up inside Plasmodium-infected red blood cells (pRBCs) and in the phagolysosome system of Leishmania-infected macrophages but some knowledge gaps still obscure subcellular events related to these processes. As a proof of concept, we have used confocal fluorescence microscopy to follow the fate in pRBCs and infected macrophages of quantum*

dots encapsulated in liposomes, and of lysosomes, leishmaniasis and malaria parasites, nuclei, and phagosomes. Our data indicate that liposomes merge their lipid bilayers with pRBC plasma membranes but are engulfed by macrophages, where they fuse with lysosomes. Lysosomes have not been observed to join with phagosomes harboring single Leishmania parasites, whereas in phagosomes where the parasite has divided there is lysosome-specific fluorescence with a concomitant disappearance of lysosomes from the cytosol. In later stages, all the lysosome-specific label is found inside phagosomes whereas the phagosomal marker cadaverine strongly stains the macrophage nucleus, suggesting that Leishmania infection induces in its later stages nuclear degeneration and, possibly, apoptosis of the host cell. These results indicate that induction of macrophage apoptosis should be explored as a possible strategy used by Leishmania to prepare its egress.

Date Received: 2013-09-04

Date Accepted: 2013-12-11

Date Published: 2014-01-31

Keywords: *Leishmania infantum*, leishmaniasis, liposomes, malaria, nanomedicine, nanotechnology, *Plasmodium falciparum*, quantum dots.

© Copyright 2014 Authors - This is an Open Access article published under the Creative Commons Attribution License terms <http://creativecommons.org/licenses/by/3.0>. Unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium are permitted, provided the original work is properly cited.

1. Introduction

Leishmania parasites have two morphological forms, termed amastigotes and promastigotes, which are found in the mammalian and sandfly hosts, respectively [1]. Amastigotes are largely intracellular stages that mainly live in the phagolysosomal system of macrophages, the predominant host cell. Macrophages are phagocytic and readily engulf amastigotes, followed by phagosome-lysosome fusion. This microbial defence mechanism is lethal to most foreign organisms, as it results in exposure to an acidic pH of 4.5 to 5.5 and attack by a battery of lysosomal enzymes. However, *Leishmania* can survive this experience, and indeed thrives in this environment [2]. Parasites within the phagolysosome grow and divide, such that an individual macrophage may eventually contain many tens of amastigotes. There is no specific escape mechanism known, and it is assumed that in most cases the host cell simply ruptures when it cannot accommodate any more parasites, which are then taken up by further macrophages.

The treatment of leishmaniasis will depend on its clinical form, but it is based mainly on pentavalent antimonial compounds. Amphotericin B and its modern liposomal formulation have an important role in current treatment schedules, although high costs limit their use in most endemic countries. New drugs such as miltefosine, the first orally administered treatment against *Leishmania*, represent attractive alternatives that have been evaluated in several clinical trials [3]. The hidden location of amastigotes inside the macrophage's phagolysosomes is responsible for impairing the accession of therapeutic drugs, rendering these poorly selective, or forcing their administration in repeated and high doses by parenteral routes [4, 5]. These facts contribute to the high toxicity and in most cases to the limited compliance and efficacy of current conventional medication used against all the clinical forms [6, 7, 8]. Drug delivery systems should allow avoiding the adverse effects caused by problematic routes of administration as well as enhancing the antileishmanial activity and reducing the toxicity of the medication [9].

Liposomes, when administered *in vivo* by a variety of routes, rapidly accumulate in the mononuclear phagocyte system, a phenomenon that can be used to target drugs for the treatment of intracellular parasites that reside in

macrophages, such as *Leishmania* [10]. A number of studies have been conducted to exploit liposomes as drug vehicles for the treatment of leishmaniasis [11-18], but data about the subcellular fate of liposome-encapsulated drugs are scarce.

Current administration methods of antimalarial drugs deliver the free compound in the blood stream, where it can be unspecifically taken up by all cells, and not only by *Plasmodium*-infected red blood cells (pRBCs). Nanosized carriers have been receiving special attention with the aim of minimizing the side effects of malaria therapy by increasing drug bioavailability and selectivity [19]. To follow the delivery of liposomal contents into pRBCs and *Leishmania*-infected macrophages we have used luminescent semiconductor nanocrystals termed quantum dots [20]. Quantum dots (QDs) provide unique intrinsic photophysical properties for potential medical, diagnostic and basic research applications, among them high quantum yields and high molar extinction coefficients along with exceptional resistance to both chemical and photodegradation. QD encapsulation into liposomes can be studied by electron microscopy and their release to pRBCs and macrophages can be conveniently followed by fluorescence microscopy over a wide concentration range, a versatility that can not be matched by small fluorochromes.

2. Materials and Methods

Except where otherwise indicated, all reagents were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

2.1. Liposome Formation

Liposomes were prepared by the lipid film hydration method [21]. Different lipid combinations were tested in order to establish a liposomal formulation with low hemolytic activity and low general cytotoxicity. Lipids (1,2-dioleoyl-*sn*-glycero-3-phosphatidylcholine, DOPC; 1,2-dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-[4-(*p*-maleimidophenyl)butyramide], MPB-PE; Avanti Polar Lipids Inc., Alabaster, AL, USA; both $\geq 99\%$ purity according to thin layer chromatography analysis) were dissolved in chloroform:methanol (2:1 v/v) in a round-bottomed flask. Organic solvents were removed by rotary evaporation under reduced pressure at 37 °C to yield a thin lipid film on the walls of the flask, and remaining solvent traces were eliminated by drying under N₂ flow for 30 min. Films were left overnight in a desiccator to ensure the complete removal of chloroform. The dry lipids were hydrated in phosphate-buffered saline (PBS) buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7.4) at 37 °C to obtain a concentration of 10 mM and multilamellar liposomes were formed by 3 cycles of constant vortexing followed by bath sonication for 4 min each. Multilamellar liposomes were downsized to form uni- or oligolamellar vesicles by extrusion through 200-nm polycarbonate membranes (Poretics, Livermore, CA, USA) in an extruder device (LiposoFast; Avestin, Ottawa, Canada). Liposome size was determined by

dynamic light scattering using a Zetasizer NanoZS90 (Malvern Ltd, Malvern, UK). Liposomes encapsulating 120 nm 655 ITK™ carboxyl quantum dots (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) were prepared by dissolving QDs in the hydration buffer. At the concentrations used in macrophage and pRBC cultures, QDs were neither cytotoxic nor hemolytic. Immunoliposomes bearing on their surfaces specific antibodies against pRBCs were prepared following established protocols [22]. Liposomes were pelleted by ultracentrifugation ($100,000\times g$, $2\times$, 45 min, 4 °C), and finally resuspended in 10 volumes of PBS and kept at 4 °C for up to 2 weeks before adding them to cultures.

2.2. Cryogenic Transmission Electron Microscopy (cryo-TEM)

For cryo-TEM analysis of the preparations of liposomes loaded with quantum dots, a thin aqueous film was formed by placing a 5- μ l sample drop of the liposome suspension on a glow-discharged holey carbon grid and then blotting the grid against filter paper. The resulting thin sample films spanning the grid holes were vitrified by plunging the grid (kept at 100% humidity and room temperature) into ethane, which was maintained at its melting point with liquid nitrogen, using a Vitrobot (FEI Company, Eindhoven, The Netherlands). The vitreous films were transferred to a Tecnai F20 TEM (FEI Company) using a Gatan cryotransfer (Gatan, Pleasanton, CA), and the samples were observed in a low dose mode. Images were acquired at 200 kV at a temperature between -170 and -175 °C and low-dose imaging conditions below 20 $e^-/\text{\AA}^2$, with a 4096 \times 4096 pixel CCD Eagle camera (FEI Company).

2.3. Assay on Intracellular *Leishmania infantum* Amastigotes

Promastigotes of the MCAN/ES/92/BCN503 *L. infantum* strain were cultured at 26 °C in Schneider's medium, pH 7.0, supplemented with 20% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS; SLI Barcelona Antibody), 25 μ g/ml gentamycin and 1% penicillin (100 U/ml)-streptomycin (100 μ g/ml), and were collected during stationary phase at a concentration of 1×10^8 cells/ml. Subsequently, the parasites were labelled with 2.5 μ g/ml carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE) solution in PBS, for 5 min at 26 °C. Labelling was quenched with an equal volume of supplemented Schneider's culture medium. Peritoneal macrophages were obtained after stimulation of female Swiss mice with 3 ml of 3% sodium thioglycolate. After 48 h, 4 ml of physiological serum at 4 °C was injected intraperitoneally, and after 15 min peritoneal fluid was collected and centrifuged. Suspensions of 5×10^4 cells/ml in RPMI-1640 medium supplemented with 10% FBS and 1% penicillin (100 U/ml)-streptomycin (100 μ g/ml) solution were prepared and 0.3 ml was seeded in a LabTek 8 chamber slide system (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) and incubated at 37 °C for 24 h in a 5% CO₂ atmosphere. After incubation the medium was removed and 0.3 ml of late stationary phase CFSE-stained promastigotes

was added at a concentration of 5×10^6 cells/ml. After 4 h of incubation at 35 °C, extracellular parasites were removed by washing with sterile PBS, and 0.2 ml of liposome-encapsulated QD suspension in PBS was mixed with 0.2 ml of RPMI-1640 medium and the resulting 0.4 ml (containing 60 nM QDs) was added to each well and incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere for the times indicated. The cells were subsequently washed and slides were prepared for confocal fluorescence microscopy.

2.4. *Plasmodium falciparum* Cell Culture

The *P. falciparum* 3D7 strain was grown *in vitro* in group B human RBCs using previously described conditions [23]. Treatment of cultures with QD-containing liposomes was done following established protocols [22].

2.5. Cytotoxicity and Hemolysis Assays

For cytotoxicity assays, serial dilutions of QD solution in RPMI-1640 medium were added to 100 μ l of the murine monocyte-macrophage cell line Raw 264.7 cultured in 96-well plates (Costar Corning Inc.) at a concentration of 5×10^4 cells/well. After incubation for 24 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere, 10 μ l of 4-[3-(4-iodophenyl)-2-(4-nitrophenyl)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene disulfonate labelling reagent (WST-1; Roche Diagnostics GmbH) was added to each well, and the plate was incubated in the same conditions for 4 h. After thoroughly mixing for 1 min on a shaker, the absorbance of the samples was measured at 450 nm using a Titerek Multiskan Plus MK II 314 (Bio-Rad Laboratories Inc.). WST-1 in the absence of cells was used as blank and samples were prepared in triplicate for each experiment. Hemolysis assays were performed as described elsewhere [22].

2.6. Confocal Microscopy

Macrophage and *Leishmania* nuclei were stained for 10 min with either 1 μ g/ml Hoechst 33342 (Molecular Probes) or 1 μ M TOPRO-3 (Invitrogen), lysosomes for 30 min with 50 nM Lyso Tracker Red (DND-99; Molecular Probes), and phagosomes for 10 min with 0.05 nM mono dansyl cadaverine. RBC membranes, *Plasmodium* nuclei, and secondary antibodies were stained following established protocols [22]. After the corresponding incubations and PBS washing steps, the samples were fixed for 20 min with 3% (v/v) paraformaldehyde in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4, and finally mounted with Prolong Gold (Invitrogen) following standard protocols. Samples were imaged with a Leica TCS SP5 laser scanning confocal microscope equipped with an acoustic optical beam splitter, a DMI6000 inverted microscope, blue diode (405 nm), Ar (458/476/488/496/514 nm), diode pumped solid state (561 nm), and HeNe (594/633 nm) lasers, and APO 63 \times oil (NA 1.4) or glycerol (NA 1.3) immersion objective lenses. Hoechst 33342 (or 4',6-diamino-2-phenylindole, DAPI), quantum dot, CFSE (or fluorescein-labelled secondary antibody), DND-99 (or WGA-rhodamine), TOPRO-3, and mono dansyl cadaverine

images were acquired sequentially using 405, 458, 488, 561, 633 and 405 nm laser lines, and emission detection ranges 415–480, 643–735, 500–545, 571–630, 643–735 and 500–545 nm, respectively, with the confocal pinhole set at 1 Airy units. Images were acquired at 400 Hz in a 512×512 pixels format, 8× zoom, and pixel size of 60×60 nm.

3. Results

According to cryo-TEM analysis, 655 ITK™ carboxyl QD-loaded liposomes contained variable numbers of QDs that were either associated to the membrane or free in the liposomal lumen (Figure 1). Under the preparation conditions used in this work, approximately half of the liposomes contained at least one QD. QDs were observed to be ca. 5×10 nm rods, in agreement with the maker's information (Web-1). They have a CdSe core encapsulated in a crystalline shell of ZnS and an external amphiphilic polymer coating to prevent formation of free Cd, and are widely used in live-cell *in vitro* assays (Web-1).

QDs have been explored as an aid to characterize the targeting of immunoliposomes designed for the delivery of antimalarial drugs to pRBCs. A prototype nanovector was constructed consisting of 120 nM 655 ITK™ carboxyl QDs encapsulated in immunoliposomes with the formulation DOPC:cholesterol:MPB-PE 77.5:20:2.5, which carried a specific antibody against pRBCs. QD-loaded immunoliposomes were added to 3% hematocrit living cultures of the *P. falciparum* 3D7 strain at a concentration in the dish of 1 mM lipid and 60 nM QD to analyze whether they exhibited the expected targeting towards pRBCs. At this concentration QD-containing liposomes did not induce detectable hemolysis. After incubating for 90 min with gentle stirring the samples were processed for detection by confocal fluorescence microscopy of cell membranes, QDs, targeting antibody, and parasite nuclei. The results obtained showed an invariable colocalization of the four signals only in late form-containing pRBCs, but not in the early forms also called ring stages (Figure 2). QD signal in pRBCs was scattered throughout the cell, without evidence of containment inside any particular organelles or vesicular structures. No intracellular QD fluorescence was observed when free 60 nM QDs were added to cultures (data not shown).

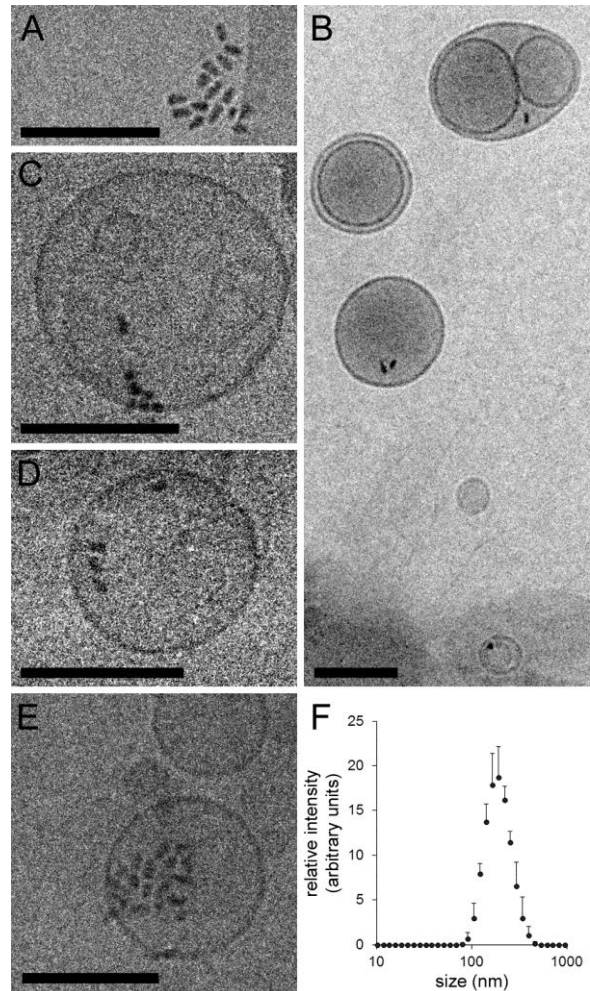


Figure 1. Encapsulation of QDs in liposomes. (A) Cryo-TEM image of 655 ITK™ carboxyl QDs. (B-E) Cryo-TEM images of the QD-containing liposomes obtained with the protocol described in the Methods. (F) Typical dynamic light scattering plot of a QD-containing liposome sample, with a mean diameter of 179 nm and a mean polydispersity index of 0.08. Scale bar: 100 nm.

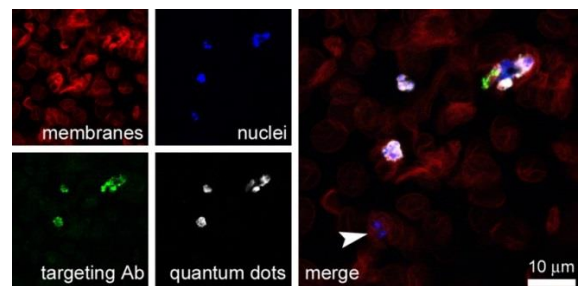


Figure 2. Analysis of the delivery of immunoliposome cargo to pRBCs. Confocal fluorescence microscopy section of a suspension of RBCs containing ca. 5% pRBCs that had been treated, for 90 min and prior to fixation, with a preparation of immunoliposomes loaded with QDs. RBC membranes were stained with WGA-rhodamine, *Plasmodium* nuclei with DAPI, and the secondary antibody against anti-pRBC antibodies with fluorescein. The arrowhead in the merge panel indicates a non-targeted early stage pRBC.

In a preliminary approach to the application of QD-loaded liposomes to leishmaniasis research, we analyzed by fluorescence confocal microscopy the subcellular localization of QDs encapsulated in DOPC:cholesterol 80:20 liposomes that were delivered to *Leishmania*-infected macrophages. At their final concentration present in the cultures (60 nM), QDs did not induce detectable cytotoxicity in macrophage assays (Figure 3).

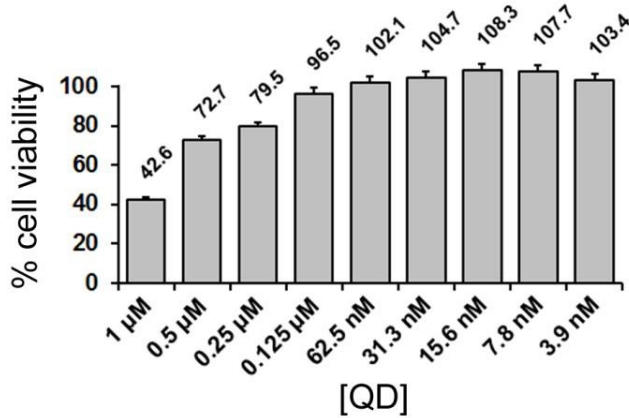


Figure 3. Cell viability assay of the effect of QDs on macrophages.

One hour after the addition of the liposome suspension to a macrophage culture the QD fluorescence could be already observed inside the cells as whole internalized liposomes fused with lysosomes (Figure 4A). Figure 1B shows a macrophage 27 h post-infection with three phagosomes (arrowheads), or parasitophorous vacuoles, in whose interior the green fluorescence corresponding to the prior labelling of *Leishmania* parasites with CFSE can be observed. The punctate pink fluorescence corresponds to lysosomes labelled with the lysosome tracker DND-99. Colocalization analysis of QDs and lysosomes confirmed that internalized liposomes fuse with lysosomes (Figure 4C). Because of the lack of significant QD fluorescence not colocalizing with lysosomes, we conclude that any fraction of QDs not encapsulated in liposomes will also end up in the lysosome system, in agreement with previous data [24]. The arrowhead in the *merge* panel shows the parasitophorous vacuole, which does not contain QDs. In the early stages of infection, up to 27 h, single parasites could be observed inside the phagosome, and numerous lysosomes were found scattered throughout the macrophage cytosol (Figure 4D). In Figure 4E is shown a macrophage in a more advanced stage of infection containing two vacuoles, one probably with a single parasite (arrowhead), and a second vacuole where *Leishmania* had replicated, as suggested by lighter CFSE staining of the individual amastigotes (arrow). Here, lysosomes were essentially absent from the cytosol and their specific fluorescence was strongly localized inside the vacuole where *Leishmania* had already divided, but not in the vacuole containing only one parasite. In later stages, 52 h post-

infection, we have observed strong staining of the macrophage nucleus with mono dansyl-cadaverine (Figure 4F), a phagosome marker. As in Figure 4C, also corresponding to a sample 52 h post-infection, the macrophage nucleus appeared swollen.

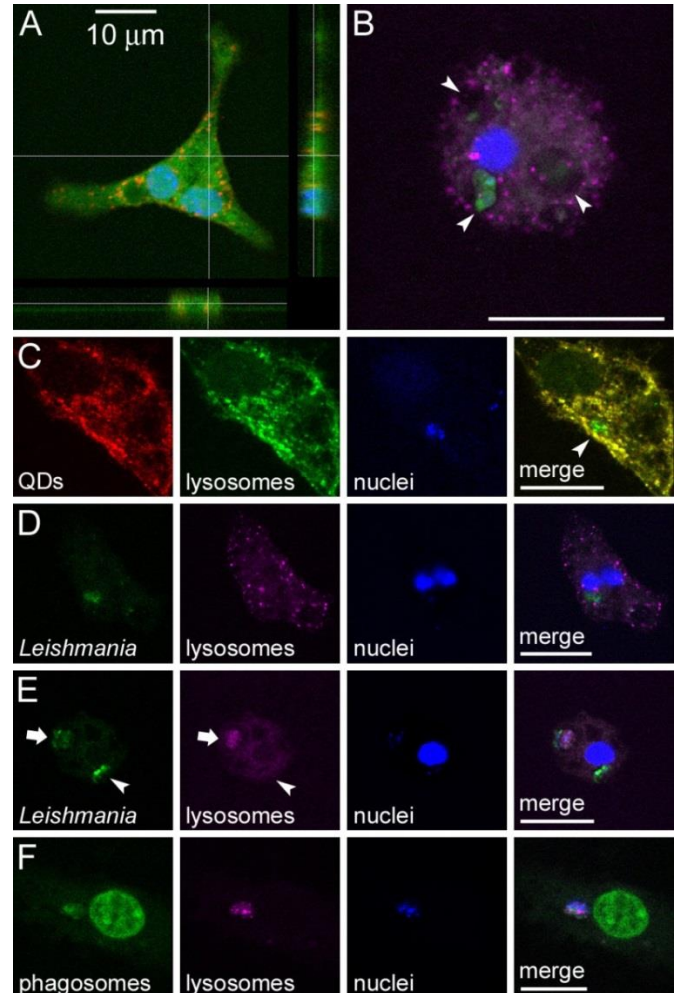


Figure 4. Confocal fluorescence analysis of *L. infantum*-infected macrophages treated with QD-containing liposomes. (A) Non-infected macrophage showing QD fluorescence in red 1 h after addition of QD-loaded liposomes to the cell culture; the macrophage nucleus and cytosol have been stained with Hoechst and CFSE, respectively. (B) A macrophage stained with Hoechst (nucleus, blue), DND-99 (lysosomes, purple), and CFSE (*Leishmania*, green), 27 h after infection. The arrowheads indicate three phagosomes. (C) Colocalization analysis of QDs that had been administered encapsulated in liposomes 1 h before, of lysosomes, and of *Leishmania* nuclei stained with TOPRO-3, 52 h after infection. For an easier interpretation of the merge panel, lysosomes are here shown in green color. (D,E) Colocalization analysis of *Leishmania*, lysosomes, and macrophage nuclei, 27 h after infection. (F) Colocalization analysis of cadaverine (a phagosomal marker also staining here the macrophage's nucleus), lysosomes, and TOPRO-3-stained parasite nuclei, 52 h after infection. Scale bar: 10 μm.

Likely, the progression of infection was at an earlier stage in panel C, as suggested by abundant lysosomes still present in the cytosol.

4. Discussion

In leishmaniasis, the interactions of phagosomes harboring *L. donovani* promastigotes with late endosomes and lysosomes are inhibited until the promastigote has fully differentiated into an amastigote [25]. Lipophosphoglycan, the major surface glycoconjugate on *L. donovani* promastigotes, is transferred from the parasite to the host macrophage membrane during phagocytosis and induces periphagosomal actin accumulation correlating with an inhibition of phagosomal maturation [26]. The resulting increased membrane rigidity has been shown to reduce phago-lysosomal fusion [27], suggesting that alteration of the biophysical properties of membranes may be the reason for the reduced ability of the host macrophages to accomplish phagosomal maturation upon infection.

In the nuclei of macrophages that had been infected by *L. infantum* ca. 52 h earlier, we have observed signs compatible with apoptosis, such as cadaverine-positive labelling and nuclear swelling. Because these symptoms of nuclear degeneration are coincident with the disappearance of lysosomes from the cytosol, it is likely that the phagosome-lysosome fusion triggers alterations in the macrophage nucleus. This in turn suggests that a signal should travel from the phagosome to the nucleus to start the process. Since we have observed that phago-lysosomal fusion proceeds only after intraphagosomal replication of *L. infantum*, some event related to the promastigote-amastigote transition might be ultimately responsible for the release of the predicted chemical signal(s). Although it has been reported that *Leishmania* infection protects macrophages from exogenously-induced apoptosis, the corresponding data were obtained 16 h [28] and 24 h post-infection [29]. Our results suggest that at longer times the parasite might be inducing macrophage apoptosis, perhaps as a strategy to prepare its egress. The quantitative incorporation of liposomal contents (QDs) into cytosolic lysosomes and the subsequent phagosome-lysosome fusion, show that lysosomes can target liposomal anti-*Leishmania* drugs towards the parasite-containing phagosomes. The data presented here indicate that liposome-lysosome fusion is then a prior event to phagolysosome formation and this knowledge can be of use for the design of new targeted drug delivery strategies against leishmaniasis.

In the case of malaria, the homogeneous distribution within pRBCs of QDs delivered inside liposomes suggests that the liposomal contents enter the cell through a process of fusion of the liposome lipid bilayer with the cell plasma membrane. RBCs have poor endocytic processes, and for this reason liposomes docked by specific antibodies can be an efficient system to deliver drugs into the cell by such membrane fusion process [30], which occurs on a time scale

of milliseconds [31]. The remarkable capacity of liposomes to inject their contents into pRBCs presumably has its basis on alterations of the pRBC plasma membrane rendering it less elastic [32], and thus limiting the rebounding of colliding liposomes. The resulting slightly longer interactions, a phenomenon exacerbated if targeting molecules are present, likely allow enough time for the physical phenomenon of lipid bilayer fusion to occur.

Finally, since QDs have a size similar to that of a large protein, the data presented here indicate that immunoliposomes can be a valid system for the delivery to pRBCs of possible future macromolecular antimalarial drugs.

5. Conclusion

Liposomes encapsulating QDs have provided valuable information regarding the subcellular localization of their contents once target cells are reached, i.e. the *Plasmodium*-infected erythrocyte and the *Leishmania*-parasitized macrophage (Figure 5). This knowledge can be of use for the design of new therapies specifically targeting particular molecular components of the cell. The above results highlight the potential of nanomedicine for the treatment of infectious diseases of poverty, and advocate for a determined entry of nanotechnology in the fight against widespread pathologies in low per capita income regions.

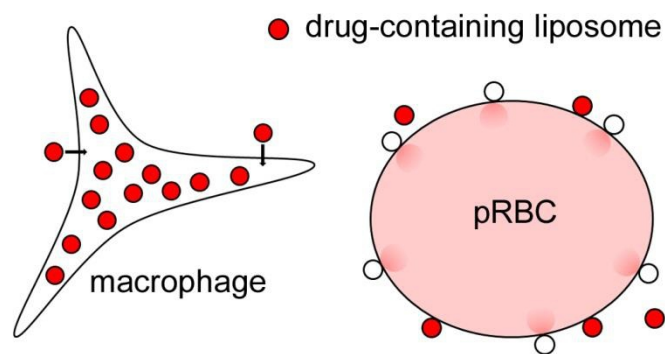


Figure 5. Cartoon depicting the different fates of liposome contents upon interaction with either *Leishmania*-infected macrophages or pRBCs, which result respectively in liposome internalization and subsequent fusion with lysosomes, or in fusion with the pRBC plasma membrane and injection of liposome cargo into the cytosol.

Acknowledgements

This work was supported by grants BIO2008-01184 and BIO2011-25039, from the Ministerio de Economía y Competitividad, Spain, which included FEDER funds, and by grant 2009SGR-760 from the Generalitat de Catalunya, Spain. We acknowledge the support of the Confocal Microscopy and Cryo-Electron Microscopy Units at the Scientific and Technological Centres from the University of Barcelona (CCiT-UB).

References

- [1] P.A. Bates, M.E. Rogers "New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*" 2004, *Current Molecular Medicine*, 4, 601-609.
- [2] D. Zilberstein, M. Shapira "The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites" 1994, *Annual Review of Microbiology*, 48, 449-470.
- [3] C.R. Davies, P. Kaye, S.L. Croft, S. Sundar "Leishmaniasis: new approaches to disease control" 2003, *British Medical Journal*, 326, 377-382.
- [4] H.W. Murray, J.D. Berman, C.R. Davies, N.G. Saravia "Advances in leishmaniasis" 2005, *Lancet*, 366, 1561-1577.
- [5] S. Sundar, M. Rai "Treatment of visceral leishmaniasis" 2005, *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 6, 2821-2829.
- [6] S. Sundar, T.K. Jha, C.P. Thakur, J. Engel, H. Sindermann, C. Fischer, K. Junge, A. Bryceson, J. Berman "Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis" 2002, *New England Journal of Medicine*, 347, 1739-1746.
- [7] S. Sundar, H. Mehta, A.V. Suresh, S.P. Singh, M. Rai, H.W. Murray "Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: conventional versus lipid formulations" 2004, *Clinical Infectious Diseases*, 38, 377-383.
- [8] C.P. Thakur, S. Narayan "A comparative evaluation of amphotericin B and sodium antimony gluconate, as first-line drugs in the treatment of Indian visceral leishmaniasis" 2004, *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 98, 129-138.
- [9] E.L. Romero, M.J. Morilla "Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question" 2008, *Expert Opinion on Drug Delivery*, 5, 805-823.
- [10] A.K. Agrawal, C.M. Gupta "Tuftsin-bearing liposomes in treatment of macrophage-based infections" 2000, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 41, 135-146.
- [11] R.R. Ribeiro, E.P. Moura, V.M. Pimentel, W.M. Sampaio, S.M. Silva, D.A. Schettini, C.F. Alves, F.A. Melo, W.L. Tafuri, C. Demicheli, M.N. Melo, F. Frezard, M.S. Michalick "Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate" 2008, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52, 2564-2572.
- [12] D.A. Schettini, A.P. Costa Val, L.F. Souza, C. Demicheli, O.G. Rocha, M.N. Melo, M.S. Michalick, F. Frezard "Pharmacokinetic and parasitological evaluation of the bone marrow of dogs with visceral leishmaniasis submitted to multiple dose treatment with liposome-encapsulated meglumine antimoniate" 2005, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 1879-1883.
- [13] A.G. Tempone, D. Perez, S. Rath, A.L. Vilarinho, R.A. Mortara, H.F. de Andrade, Jr. "Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine" 2004, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 54, 60-68.
- [14] J.E. Valladares, J. Freixas, J. Alberola, C. Franquelo, C. Cristofol, M. Arboix "Pharmacokinetics of liposome-encapsulated meglumine antimonate after intramuscular and subcutaneous administration in dogs" 1997, *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 57, 403-406.
- [15] N.A. Kshirsagar, P.C. Gokhale, S.K. Pandya "Liposomes as drug delivery system in leishmaniasis" 1995, *Journal of the Association of Physicians of India*, 43, 46-48.
- [16] G. Banerjee, S. Medda, M.K. Basu "A novel peptide-grafted liposomal delivery system targeted to macrophages" 1998, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42, 348-351.
- [17] A.J. Coukell, R.N. Brogden "Liposomal amphotericin B. Therapeutic use in the management of fungal infections and visceral leishmaniasis" 1998, *Drugs*, 55, 585-612.
- [18] C.R. Alving "Liposomes as drug carriers in leishmaniasis and malaria" 1986, *Parasitology Today*, 2, 101-107.
- [19] P. Urbán, X. Fernández-Busquets "Nanomedicine against malaria" 2014, *Current Medicinal Chemistry*, 21, 605-629.
- [20] J.B. Delehanty, H. Mattoussi, I.L. Medintz "Delivering quantum dots into cells: strategies, progress and remaining issues" 2009, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, 1091-1105.
- [21] R.C. MacDonald, R.I. MacDonald, B.P. Menco, K. Takeshita, N.K. Subbarao, L.R. Hu "Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles" 1991, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1061, 297-303.
- [22] P. Urbán, J. Estelrich, A. Cortés, X. Fernández-Busquets "A nanovector with complete discrimination for targeted delivery to *Plasmodium falciparum*-infected versus non-infected red blood cells *in vitro*" 2011, *Journal of Controlled Release*, 151, 202-211.
- [23] S.L. Cranmer, C. Magowan, J. Liang, R.L. Coppel, B.M. Cooke "An alternative to serum for cultivation of *Plasmodium falciparum in vitro*" 1997, *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 91, 363-365.
- [24] L.W. Zhang, N.A. Monteiro-Riviere "Mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake" 2009, *Toxicological Science*, 110, 138-155.
- [25] R. Lodge, A. Descoteaux "Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*" 2005, *Clinical Immunology*, 114, 256-265.
- [26] M.E. Winberg, A. Holm, E. Sarndahl, A.F. Vinet, A. Descoteaux, K.E. Magnusson, B. Rasmusson, M. Lerm "*Leishmania donovani* lipophosphoglycan inhibits

phagosomal maturation via action on membrane rafts” 2009, *Microbes Infection*, 11, 215-222.

- [27] E. Hayakawa, F. Tokumasu, G.A. Nardone, A.J. Jin, V.A. Hackley, J.A. Dvorak “A *Mycobacterium tuberculosis*-derived lipid inhibits membrane fusion by modulating lipid membrane domains” 2007, *Biophysical Journal*, 93, 4018-4030.
- [28] M.J. Donovan, B.Z. Maciuba, C.E. Mahan, M.A. McDowell “*Leishmania* infection inhibits cycloheximide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner” 2009, *Experimental Parasitology*, 123, 58-64.
- [29] K.J. Moore, G. Matlashewski “Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis” 1994, *Journal of Immunology*, 152, 2930-2937.
- [30] P. Urbán, J. Estelrich, A. Adeva, A. Cortés, X. Fernández-Busquets “Study of the efficacy of antimalarial drugs delivered inside targeted immunoliposomal nanovectors” 2011, *Nanoscale Research Letters*, 6, 620.
- [31] J.C. Shillcock, R. Lipowsky “Tension-induced fusion of bilayer membranes and vesicles” 2005, *Nature Materials*, 4, 225-228.
- [32] Q. Chen, M. Schlichtherle, M. Wahlgren “Molecular aspects of severe malaria” 2000, *Clinical Microbiology Reviews*, 13, 439-450.

Web sites:

Web-1:

<http://tools.lifetechnologies.com/content/sfs/manuals/mp19020.pdf>, consulted 25 Nov. 2013.

CAPÍTOL 4

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

La leishmaniosi, tot i ser una malaltia que afecta a una important part de la població mundial, forma part del grup de Malalties Oblidades (Neglected Diseases). Són malalties pròpies de la pobresa, i pel segment de població a la que afecten, no interessen a la indústria farmacèutica ni al món occidental en el grau que es necessitaria. Darrera de la malària, la leishmaniosi és la segona d'aquest grup de malalties que més mata.

Les manifestacions clíniques inclouen lesions cutànies (leishmaniosi cutània), mucocutànies (leishmaniosi mucocutània) i viscerals (leishmaniosi visceral o Kala-azar). Les formes clíniques més greus són les viscerals, que poden ocasionar la mort en la majoria dels casos si no es tracten a temps, mentre que les formes cutànies no fan perillar la vida del pacient però en canvi influeixen en la qualitat de vida. Aquesta característica fa que molts governs la considerin un mal menor i que els tractaments i la investigació sobre nous fàrmacs sigui en l'actualitat molt baixa. Les recomanacions del Comitè d'Experts de l'OMS (Ginebra, 2010) per a la investigació i el control d'aquesta malaltia, inclouen la investigació de nous fàrmacs i estudis clínics per dissenyar un règim terapèutic basat en l'evidència per a la leishmaniosi cutània i mucocutània i la leishmaniosi cutània post-kala-azar (LDPK).

La leishmaniosi cutània es presenta com a pàpules, plaques o nòduls eritematosos així com formes ulceroses granulomatoses i autoimmunitàries de la pell que poden curar-se de forma espontània en un any però que deixen cicatrius de per vida. Les formes cutànies i mucocutànies més extenses poden afectar a la cara, cos i extremitats, podent envair la mucosa oral i/o nasal, arribant fins i tot a tenir efectes mortals, en casos de sobreinfecció o obstrucció nasogàstrica.

Tots aquest fets porten a conseqüències socials i econòmiques de forma que la leishmaniosi cutània (LC) contribueix a incrementar la pobresa. Un altre aspecte important des del punt de vista sanitari i epidemiològic, és que els pacients amb lesions actuen de reservoris de la infecció i per tant, sinó es tracten s'incrementa la possibilitat de la transmissió.

Des del punt de vista terapèutic, hi ha diferències en el desenvolupament de fàrmacs per el tractament de la LV i la LC. Aquestes dos manifestacions s'han de tractar de forma separada. Els fàrmacs actualment disponibles per al tractament de la leishmaniosi tant visceral com cutània inclou antimonials pentavalents, amfotericina B, miltefosina i paromomicina entre altres, molts d'ells amb grans limitacions relatives a la seva toxicitat, elevat cost i administració. En el cas de la leishmaniosi cutània, els antimonials pentavalents segueixen sent els fàrmacs d'elecció, però la seva administració tant intravenosa, intramuscular com intralesional segons la importància de la lesió i l'espècie responsable, requereix múltiples injeccions que són doloroses i mal tolerades per molts pacients, i no sempre efectives (Mishra i cols., 2007; Markle i cols., 2004).

Òbviament són necessaris nous compostos anti-*Leishmania* més segurs, més barats i més fàcil d'administrar que els medicaments actuals (Santos i cols., 2008).

El pla estratègic de DNDi (Drugs for Neglected Diseases initiative) inclou nous i millors tractaments per a les malalties oblidades (<http://www.dndi.org/diseases/vldndi-strategy.html>), i estableix com a prioritats a curt, mitjà i llarg termini: a) Fer un millor ús dels tractaments existents, assajar noves combinacions de fàrmacs i fer-los disponibles en àrees geogràfiques més extenses. b) Provar noves formulacions a partir dels compostos existents per millorar la seva eficàcia terapèutica i c) Identificar noves dianes terapèutiques i sintetitzar nous compostos actius enfront del paràsit.

Tot i ser conscients de la gravetat, incidència i llacunes que representa el seu tractament, la leishmaniosi en general i la LC en particular estan incloses dins del grup de les Malalties Rares i Oblidades, no disposant fins al moment de cap formulació tòpica comercialitzada.

En el cas de la leishmaniosi cutània, un tractament efectiu reduirà el temps de durada de la infecció activa així com la gravetat de les lesions.

La recerca de nous fàrmacs amb activitat anti-*Leishmania* és important per als nous tractaments per a la LC. Evitar l'administració de derivats d'antimoni parenteral augmenta enormement el compliment del pacient i redueix els costos de tractament.

El tractament de combinació té els avantatges potencials d'escurçar la durada del tractament, el que augmenta el compliment; la reducció de la dosi total dels medicaments, reduint així els seus efectes tòxics i costos; i la reducció de la probabilitat de selecció de paràsits resistents als medicaments, perllongant així la vida efectiva dels medicaments disponibles.

L'aplicació d'ungüents de paramomicina a lesions localitzades i de menys de 5 cm de diàmetre ha sigut el primer intent de la teràpia local, indicant en molts estudis, els beneficis potencials d'aquest tipus d'administració.

Des de 1960 es reconeix l'activitat leishmanicida del sulfat de paramomicina per al tractament de la LC i LV. No obstant això, es tracta d'un aminoglicòsid de pobre absorció per via oral, és per aquest motiu que s'ha d'administrar per via parenteral. Davant els obvis inconvenients de les vies convencionals d'administració, els tractaments tòpics representen una interessant alternativa oferint diversos avantatges en comparació amb la via oral i parenteral. Un dels primers passos en el disseny, optimització i avaluació de qualsevol vehicle d'aplicació tòpica, inclou assajos d'alliberament in vitro així com assaigs de permeació ex vivo. Aquest tipus d'estudis pot contaminar les mostres a causa de components intrínsecs de la pell. A més, el volum de mostra és molt petit i la tècnica analítica hauria de mostrar una apropiada sensibilitat. Per tot això, una condició bàsica i fonamental per a la consecució d'aquests assaigs és disposar d'un mètode apropiat de quantificació del fàrmac.

Històricament, l'assaig microbiològic és el mètode prescrit per Farmacopees Britàniques, Europees i Nord-americans per a la determinació dels aminoglicòsids en productes farmacèutics a granel i les seves formulacions. Aquest tipus d'assaigs són barats, requereixen aparells poc sofisticats i són adequats per a l'avaluació d'un gran nombre de mostres. Davant d'aquests avantatges són nombrosos els inconvenients que al llarg dels anys s'han anat

trobant, com ara baixa reproductibilitat, inexactitud, estret marge de linealitat, pobra sensibilitat i demora en l'obtenció dels resultats. Per tot això, el principal objectiu d'aquest treball ha estat el desenvolupament d'un mètode de detecció directa per a la determinació de PM. Atès que aquest aminoglicòsid conté grups que poden ser oxidats (amines i hidroxils) i per tant, directament detectats electroquímicament, s'ha treballat amb una tècnica de cromatografia líquida d'alta resolució amb detecció amperomètrica polsada.

El mètode desenvolupat es va validar segons la normativa ICH en termes de linealitat, precisió, exactitud, robustesa i sensibilitat.

Les solucions estàndard van ser elaborades amb mostres obtingudes del compartiment receptor de les cel·les de difusió de Franz a diferents temps, tant per als estudis d'alliberació in vitro com per als estudis de permeació ex vivo. Segons un o altre assaig van ser validats dos volums de mostra, 50 μ l i 20 μ l. A més, es va estudiar l'estabilitat de la PM solució en diferents condicions d'emmagatzematge, congelada, en nevera i a temperatura ambient, durant un període de 30 dies. Les diferents mostres es van considerar estables si el contingut de principi actiu estava dins de l'interval d'acceptació $\pm 10\%$ de la concentració original.

D'acord amb els resultats obtinguts en la validació, el mètode analític escollit va resultar ser lineal ($p > 0,05$), exacte i precís per als valors de concentració entre 6.25 μ g/ml i 200 μ g/ml. Els coeficients de regressió lineal van ser sempre majors de 0.999.

Durant la posada a punt de la tècnica es va observar que el corrent de la línia de base havia de ser el més baixa possible per així evitar la saturació de l'elèctrode d'or. També es va observar que els valors obtinguts depenen en gran mesura de les condicions del detector, per tant, per obtenir resultats exactes va ser necessari alternar la injecció de les solucions estàndard amb aquelles corresponents a les mostres.

Els límits de quantificació i detecció definits com la mínima concentració a la qual l'analit podria ser quantificat o detectat es van poder quantificar amb exactitud i precisió acceptables (RSD $<15\%$), sent de 6 μ g/ml i 2 μ g/ml, respectivament.

Pel que fa referència a termes d'exactitud, el mètode va donar lloc a "*recoveries*" compresos entre 97.53% a 102.01% i 102.01% a 106.40% (per a 50 i 20 μ l, respectivament) amb un coeficient de variació menor a $\pm 10\%$.

Els valors obtinguts, expressats com a percentatge de la desviació estàndard relativa, inferiors a 5% i 7%, per la repetitivitat intradia i interdia, respectivament, confirmen els satisfactoris resultats de la precisió del mètode.

Els resultats sobre el comportament de la PM en solució aquosa mostren l'estabilitat d'aquesta quan es conserva a -20° C i 4° C, en aquest últim cas es van observar lleugers signes de degradació, encara que dins dels nostres criteris de $\pm 10\%$ de concentració d'analit comparat amb la solució inicial. En canvi les solucions sotmeses a 25° C van mostrar evidents signes de degradació.

Pel que fa a l'aplicació del mètode analític, es van estudiar els perfils d'alliberació de la PM a través de tres membranes sintètiques (polisulfona, metilcel·lulosa i niló). D'entre totes elles la membrana seleccionada va ser aquesta última, amb la qual s'aconsegueix una alliberació més elevada i ràpida, sent del 100% a menys de dues hores de l'experiment.

Aquest mètode també té aplicació en la quantificació de PM després de la seva permeació a través de pell humana. Es van obtenir els paràmetres de permeació, així como valors de quantitats retingudes i permeades de principi actiu en funció del temps, reflectint una elevada permeació de la solució de PM.

Les dades fins aquí obtingudes reflecteixen la necessitat d'un vehicle que actui com a reservori i que dificulti el pas de PM a través de la pell i per tant dels seus possibles efectes sistèmics.

Malgrat els prometedors resultats de l'aplicació tòpica de paromomicina (PM) a excipients convencionals encara hi ha alguns inconvenients per resoldre, com problemes de toxicitat deguts a l'elevada concentració de fàrmac utilitzada o relatius a altres excipients incorporats en la formulació per formar unguents. Aquestes formes de dosificació han estat causa d'infeccions degudes a l'oclusió i/o humitat. D'altra banda la majoria de les formulacions assajades necessiten de la incorporació d'un promotor, sovint tòxic i irritant, ja que qualsevol fàrmac d'aplicació tòpica hauria de ser capaç de dirigir-se als paràsits dins del fagolisosoma dels macròfags infectats a la capa més profunda de la dermis. No obstant això cal tenir en compte que la pell suposa una barrera infranquejable a fàrmacs molt hidrosolubles o amb elevat pes molecular com és el cas de la PM.

En referència a tot lo explicat anteriorment, el disseny de vehicles innocus, capaços de travessar la pell gràcies a una estructura nanomètrica i al mateix temps evitar o disminuir l'absorció del fàrmac podria constituir un important èxit en la lluita contra aquesta malaltia.

Per tant un altre dels objectius d'aquesta Tesi Doctoral ha estat el desenvolupament, caracterització i avaluació biològica d'un nanogel com a sistema d'alliberació transdèrmica de PM.

Hem desenvolupat una formulació de nanogel en base de Pluronic F-127 o Poloxàmer 407.

La caracterització fisicoquímica del nanogel demostra la petita grandària de les micel·les, menors a 30 nm, mida que es va veure disminuïda després de la incorporació de la PM (98%) fins $9.19 \pm 0,251$ nm, probablement a causa de les interaccions electrostàtiques o fins i tot en major mesura, a enllaços d'hidrogen entre la PM i les cadenes de polímer durant el procés de formació del nanogel.

Diferències similars van ser observades per al potencial zeta confirmant la incorporació del principi actiu en les cadenes hidrofíliques del co-polímer i per tant, a la part més superficial de la micel·la. La incorporació de PM en el sistema micel·lar no va afectar a la seva distribució, sent en ambdós casos estreta i unimodal.

Les microfotografies de microscopia de transmissió electrònica mostren una geometria esfèrica i confirmen els valors obtinguts mitjançant dynamic light scattering.

Els estudis reològics van demostrar la sensibilitat a la temperatura característica d'aquest tipus de co-polímers. Les corbes de flux i viscositat mostren diferents comportaments respecte a la temperatura. De manera que a mesura que augmenta la temperatura es produeix un augment de la viscositat i un comportament pseudoplàstic. En primer lloc, en presència d'aigua i després de superar la temperatura i concentració micel·lar crítica les unitats de copolímer s'uneixen formant micel·les polimèriques. Un addicional increment de temperatura produeix l'agregació d'aquestes micel·les quedant empaquetades com una xarxa cúbica en un sistema hexagonal. Fet que queda recolzat amb l'augment de mida observat mitjançant DLS en mostres assajades a diferents temperatures.

Encara que la OMS recomani només el tractament tòpic en lesions < de 5 mm, creiem que aquesta propietat pot ser especialment útil quan les lesions causades pel paràsit impliquen grans àrees de la superfície corporal. Es podria tractar tota la superfície sense fregar, evitant la propagació d'infeccions bacterianes secundàries. De fet, el comportament newtonià del nanogel a baixa temperatura (4 °C) fa que sigui adequat per a la seva aplicació com a polvorització o roll-on. Precisament els assajos de sprayabilitat reflecteixen la millorada extensibilitat del nanogel en front de l'ungüent. A més, el seu caràcter termorreversible el fa especialment idoni per a la clínica d'aquesta malaltia, mostrant temps de gelificació molt curts (al voltant de 2 minuts).

Paral·lelament a la caracterització fisicoquímica es van realitzar estudis d'estabilitat durant 6 mesos a diferents temperatures. Aquests van evidenciar la pèrdua d'actiu, per al primer mes, en el següent ordre: 1.5%, 8% i 17% per -20°C, 4°C i 25°C, respectivament. L'estabilitat de les micel·les va ser addicionalment estudiada en base a la seva mida, índex de polidispersió, pH, paràmetres reològics i temps de gelificació. En cap dels assaigs realitzats es van observar diferències estadísticament significatives, a excepció del temps de gelificació, amb valors de 0.5 minuts per a les mostres conservades 6 mesos.

Els estudis d'alliberació *in vitro* van realçar novament les excel·lents propietats del nanogel amb un $36.93 \pm 3.41\%$ de PM alliberada en front del $1,17 \pm 0,92\%$ de PM alliberada des de la pomada. A més, el perfil d'alliberació obtingut des del nanogel mostra una alliberació lenta i sostinguda de la substància activa durant 5 hores, probablement deguda a la formació de micel·les i agregats. En ambdues formulacions els perfils van seguir una cinètica de Weibull. Segons aquest model, l'alliberament de PM des del nanogel seguir un complex mecanisme que combina la difusió fickiana amb una alliberació controlada basada en la inflor de l'estructura polimèrica. També va resultar seguir un mecanisme fickià quan les dades experimentals es van ajustar al model de Korsmeyer-Peppas.

Sens dubte, per afrontar el disseny d'aquests i altres vehicles tòpics, els estudis de permeació *ex vivo* constitueixen una eina fonamental per al seu desenvolupament. Així mateix ens han permès conèixer el grau de penetració cutània dels fàrmacs després de la seva aplicació tòpica

i l'efectivitat o no del vehicle transportador. Cap de les formulacions (nanogel o pomada) va mostrar evidències del seu pas a través de pell humana amb quantitats retingudes en pell per al vehicle oliós molt superiors respecte al nanogel.

Davant d'aquests resultats hauríem de tenir en compte que la LC es manifesta primer com una pàpula localitzada, que després es converteix en una úlcera. Així doncs, les formulacions poden aplicar-se a les lesions engrossides o lesions obertes. Durant el primer estadi de la lesió, el fàrmac ha de poder dirigir-se als paràsits de *Leishmania* dins el fagolisosoma dels macròfags infectats a la capa dèrmica profunda de la pell; en aquest cas, els ungüents de PM provats per diferents autors posseeixen problemes d'eficàcia variable i toxicitat (Ben Salah i cols., 2009). La baixa eficàcia d'aquestes formulacions pot estar relacionada amb l'escassa penetració de la PM en la lesió per LC. Per aquesta raó aquest tipus de formulacions s'associen amb clorur de metilbencetonio, promotor de la permeació que ha donat lloc a efectes secundaris locals (Aguiar i cols., 2009). A més, aquestes preparacions tenen una consistència grassa que pot afectar l'adherència del tractament, especialment en climes tropicals o zones temperades. D'altra banda, en les lesions obertes, on les propietats de barrera de l'epidermis s'han perdut completament, és més probable trobar concentracions de PM en sang, resultant en efectes tòxics. Addicionalment l'efecte oclusiu de l'ungüent, com bé ha demostrat l'assaig de TWEL, reforça aquest efecte tòxic i promou la maceració de la pell, el que podria causar irritació i creixement microbià (Tanner i cols., 2008). Davant totes aquestes limitacions i malgrat la major quantitat retinguda en pell de PM-Ungüent, el nanogel es presenta com una formulació ideal davant totes les situacions antagòniques (és a dir, barrera intacta, parcialment, o completament danyada). De fet els nanogels micel·lars derivats del poloxamer han atret un interès particular en el disseny de nanogels dèrmics, amb la finalitat de promoure la permeació de drogues i la possessió de propietats curatives (Almeida i cols., 2012). Estudis recents han conclòs que el gel P407 millora la cicatrització de ferides cutànies mitjançant l'estimulació de l'expressió de VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) i les fases inflamatòries i proliferatives TGF- β 1 durant la curació de les rates (Kant i cols., 2013). D'altra banda, aquests nanogels polimèrics ofereixen diversos avantatges sobre bases olioses tradicionals en termes de facilitat d'aplicació, acceptabilitat cosmètica i alliberament de fàrmac (Escobar-Chávez i cols., 2006). Per tant, els resultats suggereixen que el nostre nanogel podria ser una alternativa interessant per millorar l'administració tòpica de PM en qualsevol estadi de la lesió.

Un cop caracteritzat el nanogel es van iniciar els estudis de citotoxicitat sobre dos línies cel·lulars i els assajos de susceptibilitat sobre promastigots de *Leishmania*. Pel que fa als estudis de citotoxicitat, es va provar el nanogel sense fàrmac, la PM inclosa dins el nanogel i una solució de PM sobre dos línies cel·lulars, les RAW 264.7 i les VERO. El test de viabilitat/toxicitat es va avaluar utilitzant el test de proliferació cel·lular WST-1. La formulació de nanogel sense fàrmac va presentar baixa toxicitat amb % de viabilitat superiors al 80% tant per les cèl·lules RAW 264.7 com per les VERO en concentracions de 3,1 i 12,5 mg/ml de Poloxameer 407 respectivament. Aquests resultats estan d'acord amb estudis previs i demostren així la seva ja coneguda aplicació in vivo.

Les IC_{50} dels estudis de citotoxicitat de la PM en solució i del gel amb PM donen valors $>$ a 1000 $\mu\text{g/ml}$ per les cèl·lules RAW, indicant una molt baixa toxicitat. En canvi, per les cèl·lules VERO les IC_{50} de la PM són inferiors, amb un valor de 353 $\mu\text{g/ml}$ respecte als valors $>$ 1000 $\mu\text{g/ml}$ trobats en el nanogel amb PM. Això ens indica que l'administració de la PM en el nanogel fa disminuir la toxicitat del fàrmac.

En les cèl·lules VERO la solució mostrava una mortalitat del 40% amb una concentració de 390 $\mu\text{g/ml}$ de PM i una mortalitat del 100% amb una concentració del 12500 $\mu\text{g/ml}$, viabilitat sempre millorada si la comparàvem amb la PM inclosa dins el nanogel. Contràriament amb el que passava amb les cèl·lules RAW, on la PM dins del nanogel mostrava una major citotoxicitat en comparació amb la PM en solució.

La mateixa formulació amb i sense fàrmac i la PM en solució, es van provar sobre promastigots de dos espècies de *Leishmania*, la *L. infantum* i la *L. major*. En ambdues espècies la PM en el nanogel va ser l'agent més actiu sent aproximadament dues vegades més eficaç que la PM en solució. L'activitat leishmanicida del nanogel carregat amb PM trobada en aquest treball ha mostrat valors de IC_{50} menors que la reportada prèviament per altres autors amb liposomes (Jaafari i cols., 2009), siguent de 12,16 $\mu\text{g/ml}$ per *L. infantum* i 23,31 $\mu\text{g/ml}$ per *L. major*. Probablement aquesta disminució de la IC_{50} pot ser degut a la presència de poloxamer en la formulació del nanogel, el qual podria produir una inhibició de la Pgp del paràsit permetent així que entri més el fàrmac quan està inclòs dins la micel·la del copolímer que en solució.

A la vista dels nostres resultats, es podria assenyalar una sinergia entre la PM i el nanogel micel·lar en termes d'activitat, que podrien donar lloc a una estratègia eficaç per al tractament de LC, pel fet de que el nostre nanogel està formulat amb poloxamer amb la seva ja comentada acció per inhibir les Pgp de la membrana del paràsit.

La dosi utilitzada actualment per al tractament tòpic de la LC és d'aproximadament 1 mg/mm^2 , que correspon a 100–150 mg/cm^2 (Mitropoulos i cols., 2010). Aquesta dosi és extremadament alta en comparació amb la que es va assajar en aquest estudi (300 μl de nanogel micel·lar que conté 5% de PM). Tenint en compte la densitat de la pell hidratada (0,964 g/ml) (Rins i cols., 1991), el valor de retenció a la pell de 31.652 $\mu\text{g/g}\cdot\text{cm}^2$ i la IC_{50} calculada, podem establir que la dosi assajada equivalent a 5,9 mg/cm^2 seria suficient per assolir el 50% de reducció en el creixement de promastigots de *L. major* i *L. infantum*.

Aquests resultats juntament amb els resultats obtinguts en l'assaig de citotoxicitat, indiquen que aquestes partícules micel·lars basades en P407 compleixen tots els requisits per a aplicacions terapèutiques i biomèdiques in vitro i in vivo, com ara biocompatibilitat, biodegradabilitat i baixa toxicitat i que la dosi de PM utilitzada és segura, el que corrobora el desenvolupament de la PM en nanogel com una alternativa interessant per al tractament tòpic de CL.

En aquest sentit, els liposomes han estat àmpliament utilitzats com a sistemes d'alliberació de fàrmacs per tractar processos infecciosos produïts per bacteris, fongs, virus i paràsits. Diversos treballs han reportat els avantatges de l'encapsulació de fàrmacs en liposomes, com són

l'estratègia per augmentar l'eficàcia terapèutica i la disminució de la seva toxicitat inespecífica. Sabem que els fàrmacs inclosos en liposomes arriben dins dels macròfags infectats per *Leishmania*, lloc on la *Leishmania* és capaç de sobreviure, transformar-se a forma amastigota i dividir-se evadint els atacs enzimàtics de defensa de la cèl·lula; però encara existeixen algunes llacunes de coneixement dels esdeveniments subcel·lulars relacionats amb aquests processos així com hi ha molt poca informació respecte al destí subcel·lular de fàrmacs encapsulats en liposomes.

Per aquesta raó, en la part final d'aquesta tesis hem utilitzat els *quantum dots* (QDs) per estudiar, a nivell cel·lular, l'alliberació del contingut dels liposomes dins de macròfags infectats per l'agent causant de la leishmaniosi en el nostre entorn, la *Leishmania infantum*.

Per tal de determinar la localització, dins dels macròfags, dels QDs encapsulats dins de liposomes, hem utilitzat diferents marcadors cel·lulars, que ens han permès diferenciar els lisosomes, fagosomes, nuclis i el propi paràsit mitjançant la tècnica de microscopia confocal de fluorescència.

Els *quantum dots* o punts quàntics són cristalls col·loïdals semiconductors, constituïts per centenars o milers d'àtoms ordenats en una estructura cristal·lina de forma habitualment esfèrica i de dimensions entre nanomètriques i algunes micres, amb potencials propietats intrínseques fotofísiques juntament amb una excepcional resistència a químics i fotodegradació, cosa que els fa molt útils per diferents aplicacions biomèdiques i de diagnòstic

Aquets estudis preliminars amb liposomes varen posar en evidència que després de una hora de contacte dels liposomes amb els macròfags aquets ja havien estat fagocitats pels macròfags i estaven dins la cèl·lula i que els liposomes, després de la seva internalització, fusionaven amb els lisosomes. En macròfags infectats amb *Leishmania*, també varem observar que els fagosomes o vacuoles parasitòfores que contenien un sol paràsit (inici de la transformació del promastigot en amastigot y posterior divisió) no s'havien unit a lisosomes, mentre que en els fagosomes on el paràsit s'havia dividit com a forma amastigota, sí hi havia hagut la fusió amb els lisosomes, ja que s'observava una fluorescència específica de lisosoma dins la vacuola juntament amb una desaparició de lisosomes del citosol. Aquest fet estaria confirmant les dades aportades per Lodge i Descoteaux (2005) que observen que la forma promastigota dins la cèl·lula hoste evita el reconeixement per part dels lisosomes gràcies a la presència del lipofosfoglicà (LPG). És quan el paràsit es transforma en amastigot que perd el LPG i és reconegut pels lisosomes.

Durant aquets estudis també varem poder observar i constatar que els nuclis dels macròfags, que havien estat infectats per *L. infantum* 52 h abans, presentaven signes compatibles d'apoptosi, com ara la inflor nuclear i l'observació del marcatge positiu de cadaverina (marcador habitualment de fagosomes). Aquestes observacions indicaven que aquestes modificacions podrien ser degudes a una alteració de la membrana nuclear que precedeix a la mort cel·lular permetent així l'entrada d'aquest marcador.

Com que aquests símptomes de la degeneració nuclear són coincidents amb la desaparició dels lisosomes del citosol, és probable que la fusió fagosoma-lisosoma provoqui alteracions en el nucli dels macròfags. Això al seu torn suggereix que un senyal ha de viatjar des del fagosoma al nucli per començar aquest procés de degeneració. Com hem observat que la fusió fagosoma-lisosomal procedeix només després de la replicació intra-fagosomal de *L. infantum*, algun esdeveniment relacionat amb la transició promastigot-amastigot podria ser en última instància la responsable de l'alliberament del senyal químic suposat. Encara que s'ha reportat que la infecció per *Leishmania* protegeix els macròfags de l'apoptosi induïda exògenament, les dades corresponents es van obtenir a les 16 h (Donovan i cols., 2009) i 24 h després de la infecció (Moore i cols., 1994). Els nostres resultats (52 h post infecció) suggereixen que en temps més prolongats el paràsit pot estar induint l'apoptosi dels macròfags, potser com una estratègia per preparar la seva sortida.

La incorporació quantitativa de contingut liposomal (QDs) en els lisosomes citosòlics i la posterior fusió fagosoma-lisosoma, mostren l'existència d'una fusió liposomes-lisosomes com un esdeveniment previ a la formació del fagolisosoma, suggerint que els lisosomes podrien dirigir medicaments liposomals anti-*Leishmania* cap als fagosomes que contenen el paràsit. Tenint en compta aquestes observacions considerem que les dades aportades en aquest estudi poden ser molt importants en el disseny de noves teràpies i de noves estratègies d'administració de fàrmacs dirigits contra la leishmaniosi i d'altres microorganismes intracel·lulars.

Els resultats anteriors posen en relleu el potencial de la nanomedicina per al tractament de malalties infeccioses. A més, les formulacions liposòmiques han demostrat la capacitat d'augmentar la penetració del fàrmac a través de la pell a diferència de les formulacions convencionals, i en les lesions obertes, els liposomes mostren la capacitat d'accelerar la cicatrització de les ferides (Ball E., 1995). Per tant, tenint en compte que la nostra recerca es centra en trobar una nova estratègia pel tractament de la leishmaniosi cutània, aquest tipus de formulacions tenen un gran interès per estudis futurs.

CAPÍTOL 5

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

L'objectiu principal d'aquesta Tesis Doctoral ha sigut desenvolupar, caracteritzar i avaluar una nova formulació tòpica per un tractament efectiu, fàcil i segur per la Leishmaniosi cutània (LC). Per arribar a aquest objectiu en primer lloc s'ha fet una revisió bibliogràfica del tractament existent per a la LC; gràcies a això, vam seleccionar el fàrmac més propici i recomanat per més autors per incloure dins un tractament tòpic, la paromomicina. Prèviament a la seva caracterització vam posar a punt una tècnica d'anàlisis basada en una cromatografia líquida d'alta resolució en fase reversa. Posteriorment es va elaborar un nanogel de poloxamer incloent paromomicina, es va caracteritzar i es van fer assajos *in vivo-ex vivo* en membranes artificials i pell humana, assajos de citotoxicitat en dos línies cel·lulars i es va avaluar la seva eficàcia en front de promastigots de dos espècies de *Leishmania*.

Per últim, hem iniciat estudis de localització subcel·lular amb liposomes contenint *quantum dots* i diferents marcadors cel·lulars, per tenir més coneixement dels esdeveniments que succeeixen dins la cèl·lula infectada per *Leishmania* quan és tractada amb fàrmacs utilitzant la nanotecnologia.

En base als resultats obtinguts en la present memòria, hem pogut obtenir les següents conclusions que s'han desglossat segons els objectius plantejats:

CAPÍTOL 1. Revisió i noves alternatives terapèutiques pel tractament de la leishmaniosi cutània:

- La teràpia intralesional i sistèmica amb antimonials pentavalents ha estat el tractament d'elecció de la leishmaniosi cutània fins a la l'actualitat. La recerca de nous fàrmacs amb activitat anti-*Leishmania* és important per als nous tractaments per a la CL. Evitar l'administració de derivats d'antimoni parenteral augmenta enormement el compliment del pacient i redueix els costos de tractament. Actualment diferents formulacions tòpiques estan sent analitzades, però fins on sabem, cap d'ells han demostrat ser eficaços contra *Leishmania*.

CAPÍTOL 2. Posada a punt i validació d'un mètode per a la determinació de la paromomicina.

- S'ha desenvolupat i validat un mètode d'HPLC-PAD senzill per quantificar la paromomicina. Aquest mètode va ser utilitzat amb èxit per quantificar aquest fàrmac en els estudis d'alliberació i estudis de permeació en pell humana. El procediment de detecció va ser específic i eficaç, mostrant una bona precisió, exactitud i estabilitat per l'analit.
- Els estudis de permeació de la solució saturada de PM mostren que la quantitat de PM augmenta amb el temps i que la quantitat retinguda a la pell després de 24 h

expressada com a mediana és de $1452.30 \mu\text{g cm}^{-2} \text{h}^{-1}$ compresa en el rang de (1129.28–1625.26).

CAPÍTOL 3. Desenvolupament, caracterització i avaluació d'una nova formulació cutània de paromomicina atrapada dins un nanogel.

- El tamany i potencial-z de les partícules de les micel·les formades del nanogel basat en Poloxamer 407 lliure de PM mesurat mitjançant la tècnica dynamic light scattering (DLS), van resultar tenir un diàmetre mig de 30 nm, una distribució estreta i un potencial-z negatiu.
- S'ha observat una disminució de la mida de les nanopartícules pel nanogel descarregat (27.02 ± 0.261 nm) en vers el nanogel carregat pel fàrmac ($9.19 \pm 0,251$ nm), segurament a causa de les interaccions electrostàtiques o a enllaços d'hidrogen entre la PM i les cadenes de polímer durant el procés de formació del nanogel.
- Els valors i les diferències en el potencial zeta entre el nanogel amb i sense paromomicina, -0.498 i -4.32 mV respectivament, confirmen la incorporació del principi actiu en les cadenes hidrofíliques del co-polímer i per tant, a la part més superficial de la micel·la.
- La tecnica del dynamic light scattering mostra un pic de distribució de mida estret, indicant que la població de micel·les és homogeni en grandària. Aquesta tècnica també es va utilitzar per mostrar que les solucions a temperatures més baixes (4 i 25 °C) contenen partícules petites (9-10 nm), mentre que les micel·les a altes temperatures (37 i 40 °C) eren relativament més grans (> 20-30 nm), segurament degut a agregats micel·lars. Aquestes dades es confirmen amb les microfotografies de microscopia de transmissió electrònica (TEM).
- Es va observar una bona estabilitat a 6 mesos tant amb els nanogels carregats amb PM com amb els lliures, ja que no es van trobar diferències estadísticament significatives ($p > 0,05$) en la mida de les micel·les.
- Els estudis de reologia demostren el caràcter termorreversible típica d'aquest grup de co-polímers, augmentant la viscositat a mesura que augmenta la temperatura, donant un comportament pseudoplàstic.
- Els estudis de sprayabilitat reflecteixen la millorada extensibilitat del nanogel en front de l'ungüent fent que el nanogel sigui adequat per a la seva aplicació com a polvorització o roll-on.
- En els estudis d'estabilitat a -20 °C, 4 °C i 25°C es va observar que més del 98% del fàrmac estava present en totes les formulacions després de 10 dies, mentre que després de 30 dies només es mantenia aquest percentatge en els hidrogels emmagatzemats a -20 °C. L'estabilitat de les micel·les va ser corroborada en base a la seva mida, índex de polidispersió, pH, paràmetres reològics i temps de gelificació, i en

cap dels assaigs realitzats es van observar diferències estadísticament significatives, a excepció del temps de gelificació.

- Els estudis d'alliberació in vitro per el nanogel van ser del $36.93 \pm 3.41\%$ de PM alliberada en front del $1,17 \pm 0,92\%$ de PM alliberada des de la pomada. En ambdues formulacions els perfils van seguir una cinètica de Weibull.
- No s'han detectat quantitats permeades en el compartiment receptor dels estudis amb cèl·les de Franz, ni amb el nanogel ni amb la pomada, la qual cosa ens mostra la seguretat d'aquests vehicles al no arribar a circulació sistèmica. Les quantitats retingudes en pell humana han sigut superiors amb la pomada ($268.096 \mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{cm}^2$) que amb el nanogel ($31.652 \mu\text{g}/\text{g}\cdot\text{cm}^2$).
- Els estudis de citotoxicitat de la PM en solució i del gel amb PM van indicar una molt baixa toxicitat amb les dos línies cel·lulars estudiades.
- L'activitat leishmanicida de la PM en el nanogel va ser l'agent més actiu sent aproximadament dues vegades més eficaç que la PM en solució. Les IC₅₀ trobades en els nostres estudis d'efectivitat anti-Leishmania, han sigut menors que les trobades per altres autors, probablement degut a la presència de poloxamer en la formulació del nanogel, el qual podria produir una inhibició de la Pgp del paràsit, permetent una major penetració del fàrmac. Això podria assenyalar una sinergia entre la PM i el nanogel micel·lar.
- Els nostres resultats indiquen que aquest nanogel basat en poloxamer 407 compleix els requisits de biocompatibilitat, biodegradabilitat i baixa toxicitat necessaris per a ser una alternativa interessant per al tractament tòpic de CL.

CAPÍTOL 4. Estudis de localització subcel·lular i investigació del procés de captació de liposomes per part de macròfags.

- Els QDs encapsulats dins de liposomes varen començar a ser alliberats uniformement per tota la cèl·lula després de una hora de contacte amb els macròfags, el que ens indicaria que en el cas de fàrmacs encapsulats dins dels liposomes aquets es començarien a alliberar en un temps curt.
- En macròfags infectats per *Leishmania*, a l'inici de la infecció els liposomes co-localitzen amb els liposomes en el citoplasma del macròfag. Quan s'inicia la divisió de les formes amastigotes, els liposomes fusionats amb els liposomes es localitzen dins la vacuola parasitòfora. Aquestes observacions suggereixen que els liposomes podrien ser útils per dirigir medicaments liposomals anti-*Leishmania* cap als fagosomes que contenen el paràsit.
- Els diferents marcatges utilitzats ens han permès visualitzar que quan els liposomes es troben dins la vacuola parasitòfora, observem una alteració de la membrana nuclear, que indicaria l'inici del procés d'apoptosi del macròfag.

- Els liposomes encapsulant QDs han proporcionat valuosa informació sobre la localització subcel·lular del seu contingut una vegada que s'assoleixen les cèl·lules diana, és a dir, els macròfags. Aquest coneixement pot ser de gran utilitat per al disseny de noves teràpies dirigides específicament a determinats components moleculars de la cèl·lula.

Tots aquests estudis han permès el desenvolupament d'una nova i més eficaç forma de dosificació per al tractament de la leishmaniosi cutània així com un major coneixement sobre el possible mecanismes d'acció de futures teràpies dirigides.

CAPÍTOL 6

BIBLIOGRAFIA ADDICIONAL

Aguilar MG, Silva DL, Nunan FA, Nunan EA, Fernandes AP, Ferreira LAM. Combined topical paromomycin and oral miltefosine treatment of mice experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) major* leads to reduction in both lesion size and systemic parasite burdens. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009; 64: 1234–1240.

Aizawa M, Suzuki S. *Bulletin Chemical Society Journal Public Health*, 1971; 44, 2967. Citado por Katime IA, Katime O, Katime D. *Los materiales inteligentes de este milenio*, 2004.

Alakhov VY, Moskaleva EY, Batrakova EV, Kabanov AV. Hypersensitization of multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by Pluronic P85 copolymer. *Bioconjugate Chemistry*, 1996; 7; 209–216.

Almeida H, Amaral MH, Lobão P, Lobo JM. Pluronic® F-127 and Pluronic Lecithin Organogel (PLO): main features and their applications in topical and transdermal administration of drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2012; 15(4):592-605.

Alvar J. Las leishmaniasis. de la biología al control, *InterVet S.A.*; 2ª ed., 2001; 236 págs.

Arévalo Y, Robledo S, Muñoz DL, Granados-Falla D, Cuca LE, Delgado G. Evaluación in vitro de la actividad de aceites esenciales de plantas colombianas sobre *Leishmania braziliensis*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 2009; 38: 131-141.

Arevalo I, Ward B, Miller R. Successful Treatment of Drug-Resistant Cutaneous Leishmaniasis in Humans by Use of Imiquimod, an Immunomodulator. *Clinical Infectious Diseases*, 2001; 33:1847–51.

Ball E. Liposomas en Dermatología. *Dermatología Venezolana*, 1995; 33: 15-23.

Bangham AA. Correlation between Surface Charge and Coagulant Action of Phospholipids. *Nature*, 1961; 23: p. 1.

Batrakova EV, Li S, Elmquist WF, Miller DW, Alakhov VY, Kabanov A.V. Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: Selective energy depletion. *British Journal of Cancer*, 2001; 85; 1987–1997.

Batrakova EV, Li S, Miller DW, Kabanov AV. Pluronic P85 increases permeability of a broad spectrum of drugs in polarized BBMEC and Caco-2 cell monolayers. *Pharmaceutical Research*, 1999; 16; 1366–1372.

Ben Salah A, Buffet PA, Morizot G, Ben Massoud N, Zâatour A, Ben Alaya N, Haj Hamida NB, El Ahmadi Z, Downs MT, Smith PL, Dellagi K, Grögl M. WR279,396, a third generation aminoglycoside ointment for the treatment of *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis: a

phase 2, randomized, double blind, placebo controlled study. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2009; 3(5):e432.

Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clinical Infectious Diseases*, 1997; 24(4):684-703.

Borst P, Ouellette M. New mechanisms of drug resistance in parasitic protozoa. *Annual Review of Microbiology*, 1995; 49:427-60.

Burillo G, Canizal G, Ogawa T. Radiation Physics and Chemistry, 1989; 33, 351. Citado por Katime IA, Katime O, Katime D. *Los materiales inteligentes de este milenio*, 2004.

Callahan H, Beverley S. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1991; 266:18427-30.

Carneiro G, Santos CM, Oliveira MC, Fernandes AP, Ferreira LS, Ramaldes GA, Nunan EA, Ferreira LAM. Topical delivery and in vivo antileishmanial activity of paromomycin-loaded liposomes for treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Liposome Research*, 2010; 20:16-23

Cebada, TT. Nanoquímica y nanotecnología: Nuevos materiales, polímeros y máquinas moleculares. *Encuentros multidisciplinares*, 2002; 4(12): p. 21.

Centro Nacional de Epidemiología, 2004

Chien YW. Novel drug delivery systems. Fundamentals development concepts and biomedical application. *Marcel Dekker, New York*, 1982.

Choudhury K, Zander D, Kube M, Reinhardt R, Clos J. Identification of a *Leishmania infantum* gene mediating resistance to miltefosine and SbIII. *International Journal for Parasitology*, 2008; 38(12):1411-23.

Chow L, Volkman S. *Plasmodium* and *Leishmania*: the role of *mdr* genes in mediating drug resistance. *Experimental Parasitology*, 1998; 90:135-41.

Couvreur P, Guiot, P. Polymeric nanoparticles and Microspheres. Ed. *CRC Press, Boca Ratón*, 1986; 27-93.

Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Experimental and Molecular Pathology*, 2002; 72(2):132-41.

Cussler EL, Stokar MR, Varberg JE. *American Institute of Chemical Engineers Journal*, 1984; 30, 578. Citado por Katime IA, Katime O, Katime D. *Los materiales inteligentes de este milenio*, 2004.

Dastgheib L, Naseri M, Mirashe Z. Both combined oral azithromycin plus allopurinol and intramuscular Glucantime yield low efficacy in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a randomized controlled clinical trial. *International Journal of Dermatology*, 2012; 51:1508–1511.

Davidson RN. *Practical Guide for the Treatment of Leishmaniasis*. December 1998, Volume 56, Issue 6, pp 1009-1018.

De Queiroz A, Passos ED, De Brito Alves S, Silva GS, Higa OZ, Vitolo M. Alginate-Poly(vinyl alcohol) core-shell microspheres for lipase immobilization. *Wiley InterScience*, 2005.

DiBiase M, Rhodes C. Formulation and evaluation of Epidermal Growth Factor in Pluronic-127 Gel. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1996; 22(8): 823-831.

Donovan MJ, Maciuba BZ, Mahan CE, McDowell MA. *Leishmania* infection inhibits cycloheximide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner. *Experimental Parasitology*, 2009; 123: 58-64.

El-Sayed M, Anwar AE. Intralesional sodium stibogluconate alone or its combination with either intramuscular sodium stibogluconate or oral ketoconazole in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: a comparative study. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 2010; 24: 335–340.

Elias PM, Cooper ER, Korc A, Brown BE. Percutaneous Transport in Relation to Stratum Corneum Structure and Lipid Composition. *Journal of Investigative Dermatology*, 1981; 76: 297–301.

Ellenberger T, Beverley M. Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989; 264:15094-103.

Escobar JL, Garcia DM, Zaldivar D, Katime I. Hidrogeles. Principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 2002; 3(3): 1-25.

Escobar JL, Zaldivar D, Aguero L, Fernandez S, Katime I. Liberación de cefazolina sodica a partir de hidrogeles de copolímeros de poli (acrilamida-co-acido metacrílico). *Revista Iberoamericana de Polímeros*, 2003; 1-10.

Escobar-Chávez JJ, López-Cervantes M, Naik A, Kalia Y, Quintanar-Guerrero D, Ganem-Quintanar A. Applications of thermoreversible Pluronic F-127 gels in pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences*, 2006; 9 (3): 339-58.

Ferrándiz C. Enciclopèdia de Medicina i salut: pell i aparell locomotor. *Enciclopèdia Catalana*, S.A., 1989. Vol. 1; Cap. 1: 15-38.

Ferreira LS, Ramaldes GA, Nunan EA, Ferreira LAM. *In vitro* skin permeation and retention of paromomycin from liposomes for topical treatment of the cutaneous leishmaniasis. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2004; 30: 289-296.

Frankenburg S, Glick D, Klaus S, Barenholz Y. Efficacious Topical Treatment for Murine Cutaneous Leishmaniasis with Ethanolic Formulations of Amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1998; 42: 3092–3096.

Garnier T, Mäntylä A, Järvinen T, Lawrence J, Brown M, Croft S. In vivo studies on the antileishmanial activity of buparvaquone and its prodrugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007; 60: 802–810.

Gilbert JC, Hadgraft J, Bye A, Brookes LG. Drug release from Pluronic F-127 gels. *International Journal of Pharmaceutics*, 1986 ; 3 (1-2): 223–228.

Gonçalves GS, Fernandes AP, Souza RCC, Cardoso JE, Oliveira-Silva F, Maciel FC, Rabello A, Ferreira LAM. Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Acta Tropica*, 2005; 93: 161–167.

González U, Pinart M, Reveiz L, Alvar J. Interventions for Old World cutaneous leishmaniasis. *The Cochrane Collaboration*. Review October 2008.

Gottesman M, Pastan I. Biochemistry of multidrug resistance mediated by the multidrug transporter. *Annual Review of Biochemistry*, 1993; 62: 385-427.

Greenham NC, Moratti SC, Bradley DDC, Friend RH, Holmes AB. Efficient light-emitting diodes based on polymers with high electron affinities. *Nature*, 1993; 365 (6447): 628-630.

Gupta P, Vermani K, Garg S. Hydrogels: from controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discovery Today*, 2002; 7(10): 569-579.

Guzmán M, Aberturas MR, Garcia F, Molpeceres J. Gelatine gels and polyoxyethylene-polyoxypropylene gels: Comparative study of their properties. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 1994; 20: 2041-2048.

Hecht E, Hoffmann H. Interaction of ABA copolymers with ionic surfactants in aqueous solution. *Langmuir*, 1994; 10: 86-91.

Heskins M, Guillet JE. *Journal of Macromolecular Science, Part A*, 1441, 1968. Citado por Katime IA, Katime O, Katime D. *Los materiales inteligentes de este milenio*, 2004.

Higgins C. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annual Review of Cell Biology*, 1992; 8: 67-113.

http://www.aradigm.com/technologies_lipo.html

<http://www.dndi.org/diseases/vldndi-strategy.html>

<http://www.gador.com/np/vademecum/pdf/G00072600-06%20Ambisome.pdf>

<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>

Jaafari MR, Bavarsad N, Bazzaz BS, Samiei A, Soroush D, Ghorbani S, Heravi MML, Khamesipour A. Effect of Topical Liposomes Containing Paromomycin Sulfate in the Course of *Leishmania major* Infection in Susceptible BALB/c Mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009; 53: 2259-2265.

Jain NK, Shah B K, Taneja LN. Nasal absorption of metoprolol tartrate. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1991; 53: 16-19.

Jeong B, Kim SW, Bae YH. Thermosensitive sol-gel reversible hydrogels. *Advanced drug delivery reviews*, 2002; 54(1): 37-51.

Kant V, Gopal A, Kumar D, Gopalkrishnan A, Pathak NN, Kurade NP, Tandan SK, Kumar D. Topical pluronic F-127 gel application enhances cutaneous wound healing in rats. *Acta Histochemica*, 2014; 116(1) :5-13.

Katime D, Katime O, Katime IA. Los materiales inteligentes de este milenio: los hidrogeles macromoleculares. Síntesis, propiedades y aplicaciones. Servicio editorial de la Universidad del País Vasco, 2004; Capítulos 1; 7, 15-20, 121-228.

Kharrat N, Aissa I, Sghaier M, Bouaziz M, Sellami M, Laouini D, Gargouri Y. Lipophilization of ascorbic Acid: a monolayer study and biological and antileishmanial activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014; 17;62(37): 9118-27.

Koller C, Buri P. Propriétés et intérêt pharmaceutique des gels thermoréversibles à base de poloxamers et poloxamines. *S.T.P. Pharma*, 1987; 3(2):115-124.

Kopeček Jindřich. Hydrogel Biomaterials: A Smart Future?. *Biomaterials*, 2007 ;28(34): 5185-92

Krishna R, Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanism, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2000; 11: 265–283.

Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. The leishmaniases in biology and medicine. *Volume I. Biology and epidemiology*, 1987; 1-120

Lasic D. Liposomes from Physics to Applications. *Elsevier*, Amsterdam, 1993.

Lasic D. Novel applications of liposomes. *Trends in Biotechnology*, 1998; 16: p. 14.

Leeson TS, Leeson CR, Paparo AA. Texto/atlas de histología. *Ed. Interamericana Mc Graw Hill*, 1990; Pàg: 363-380.

Li H, Sung KC. Carbopol/pluronic phase change solutions for ophthalmic drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 2000; 69: 379-388.

Lodge R, Descoteaux A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clinical Immunology*, 2005; 114(3): 256-65.

Lowman AM, Morishita M, Kajita M, Nagai T, Peppas NA. Oral delivery of insulin using pH-responsive complexation gels. *Journal of pharmaceutical science*, 1999; 88(9): 933-937.

Lozinski VI, Plieva FM. Poly(vinyl alcohol) cryogels employed as matrices for cell immobilization. 3. Overview of recent research and developments. *Enzyme and microbial technology*, 1998; 23: 227-242.

Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D, Opperdoes FD. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2000; 111: 1-14.

Markle WH, Makhoul K. Cutaneous Leishmaniasis: Recognition and Treatment. *American Family Physician*, 2004; 69(6):1455-1460.

Menzel E, Golbery S. Ph effect of the percutaneous penetration of lignocaine hydrochloride. *Dermatologica*, 1978; 156: 8-14.

Michaels AS, Chandrasekaran SK, Shaw JE. Drug permeation through human skin: Theory and in vitro experimental measurement. *American Institute of Chemical Engineers (AIChE) Journal*, 1975; 21: 985-996.

Minodiera P, Parolab P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 2007; 5: 150–158.

Mishra J, Saxena A, Singh S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Current Medicinal Chemistry*, 2007; 14 (10): 1153–1169.

Mitropoulos P, Konidas P, Durkin-Konidas M. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 2010; 63(2): 309-22.

Miyazaki S, Yokouchi Ch, Nakamura T, Hashiguchi N, Hou W-M, Takada M. Pluronic F-127 gels as a novel vehicle for rectal administration of indomethacin. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1986; 34: 1801-1808.

Modabber F, Buffet PA, Torreele E, Milon G, Croft S. Consultative meeting to develop a strategy for treatment of cutaneous leishmaniasis. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 2007; 24;6:3.

Moll H, Flohe S, Rollinghoff M. Dendritic cells in *Leishmania* major-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. *European Journal of Immunology*, 1995; 25: 693-9.

Moore KJ, Matlashewski G. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *Journal of Immunology*, 1994; 152: 2930-2937.

Morikawa K, Okada F, Hosokawa M, Kobayashi H. Enhancement of therapeutic effects of recombinant interleukin 2 on a transplantable rat fibrosarcoma by the use of a sustained release pluronic gel vehicle. *Cancer Research*, 1987; 47: 37-41.

Morishita M, Lowman AM, Takayama K, Nagai T, Peppas NA. Elucidation of the mechanism of incorporation of insulin in controlled release systems based on complexation polymers. *Journal of controlled release*, 2002; 81(1-2): 25-32.

Mukae K, Bae YH, Okano T, Kim SW. A New Thermo-Sensitive Hydrogel: Poly(ethylene oxide-dimethyl siloxane-ethylene oxide)/Poly(*N*-isopropyl acrylamide) Interpenetrating Polymer Networks I. Synthesis and Characterization. *Polymer Journal*. 1990; 22, 206.

Murray HW, Berman JD, Davies CR. Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 2005; 366: 1561-77.

Neal RA. The effect of antibiotics of the neomycin group on experimental cutaneous leishmaniasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 1968; 62(1): 54-62.

Ouellette M, Fase FF, Borst P. The amplified H circle of methotrexate resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. *EMBO Journal*, 1990; 9: 1027-33.

Ouellette M, Hettema E, Wust D, Fase FF, Borst P. Direct and inverted DNA repeats associated with P-glycoprotein gene amplification in drug resistant *Leishmania*. *EMBO Journal*, 1991; 10: 1009-16.

Padilla M, Clar GT, Merrill RL. Topical medications for orofacial neuropathic pain: a review. *Journal of the American Dental Association*, 2000; 131(2):184-95.

Pérez IP. Sistemas polimericos inteligentes con entrecruzamiento biodegradable. Tesis de grado. Instituto de ciencia y tecnología de polímeros, Universidad Complutense de Madrid, 2006.

Pérez-Victoria JM, Bavchvarov BI, Torrecillas IR, Martínez-García M, López-Martín C, Campillo M, Castanys S, Gamarro F. Sitamaquine overcomes ABC-mediated resistance to miltefosine and antimony in *Leishmania*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011; 55(8): 3838-44.

Pérez-Victoria JM, Pérez-Victoria FJ, Parodi-Talice A, Jiménez IA, Ravelo AG, Castanys S, Gamarro F. Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001; 45(9): 2468-74.

Priyabrata P, Tathagata R. Improving liposome integrity and easing bottlenecks to production. *Pharmaceutical Technology Europe*, 2009; 22, (6).

Qiu Y, Park K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2012; 64, 49–60.

Ramos EH, Moraes MM, Nerys LL, Nascimento SC, Militão GC, de Figueiredo RC, da Câmara CA, Silva TG. Chemical Composition, Leishmanicidal and Cytotoxic Activities of the Essential Oils from *Mangifera indica* var. Rosa and Espada. *BioMed Research International*, 2014; 734946. doi: 10.1155/2014/734946.

Ramya Devi D, Sandhya P, Vedha Hari BN. Poloxamer: A Novel Functional Molecule For Drug Delivery And Gene Therapy. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review*.,2013; 5(8): 159–165.

Rapaport NY, Herron JN, Pit WG, Pitina L. Micelar delivery of doxorubicine and its paramagnetic analog, ruboxil, to HL-60 cells: Effect of micelle structure and ultrasound on the intracelular drug uptake. *Journal of Controlled Release*, 1999; 58: 153–162.

Ribeiro RR, Moura EP, Pimentel VM, Sampaio WM, Silva SM, Schettini DA, Alves CF, Melo FA, Tafuri WL, Demicheli C, Melo MN, Frézard F, Michalick MS. Reduced tissue parasitic load and infectivity to sand flies in dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi* following treatment with a liposome formulation of meglumine antimoniate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008; 52(7): 2564-72.

Richard JV, Werbovetz KA. New antileishmanial candidates and lead compounds. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2010; 14: 447–455.

Rins M, Diez I, Calpena AC, Obach R. Skin density in the hairless rat. Evidence of regional differences. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 1991; Spec No 3:456-7.

Ritschel AW. Applied bipharmaceutics II. University of Cincinnati, USA, 1971; Pàgs: 1229-1244.

Ritschel AW, Hussain AS. The principles of permeation of substances across the skin. *Methods & Findings in Experimental & Clinical Pharmacology*, 1988; 10: 39-56.

Ryu JM, Chung SJ, Lee MH, Chang-Kook K, Chang-Koo S. Increased bioavailability of propranolol in rats by retaining thermally gelling liquid suppositories in the rectum. *Journal of Controlled Release*, 1999; 59: 163-172.

Sadeghian G, Nilforoushzadeh MA. Effect of combination therapy with systemic glucantime and pentoxifylline in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *International Journal of Dermatology*, 2006; 4,: 819–821.

Salah AB, Messaoud NB, Guedri E, Zaatour A, Alaya NB, Bettaieb J, Gharbi A, Hamida NB, Boukthir A, Chlif S, Abdelhamid K, El Ahmadi Z, Louzir H, Mokni M, Morizot G, Buffet P, Smith PL, Kopydlowski KM, Kreishman-Deitrick M, Smith KS, Nielsen CJ, Ullman DR, Norwood JA, Thorne GD, McCarthy WF, Adams RC, Rice RM, Tang D, Berman J, Ransom J, Magill AJ, Grogil M. Topical Paromomycin with or without Gentamicin for Cutaneous Leishmaniasis. *New England Journal of Medicine*, 2013; 368: 524-532.

Sánchez JD, Serrano SB, Mañas SM. Leishmaniasis cutània. *Formación Médica Continuada en Atención Primaria*, 2012; 19: 117-28.

Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, Bernardino A, Bourguignon SC, Corte-Real S, Pinho RT, Rodrigues CR, Castro HC. Leishmaniasis treatment a challenge that remains: a review. *Parasitology Research*, 2008; 103(1): 1-10.

Schettini DA, Costa Val AP, Souza LF, Demicheli C, Rocha OG, Melo MN, Michalick MS, Frézard F. Pharmacokinetic and parasitological evaluation of the bone marrow of dogs with

visceral leishmaniasis submitted to multiple dose treatment with liposome-encapsulated meglumine antimoniate. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 2005; 38(12): 1879-83.

Seaman J, Pryce D, Sondorp HE, Moody A, Bryceson AD, Davidson RN. Epidemic visceral leishmaniasis in Sudan: a randomized trial of aminosidine plus sodium stibogluconate versus sodium stibogluconate alone. *The Journal of Infectious Diseases*, 1993; 168(3):715-20.

Seifert K, Matu S, Javier Pérez-Victoria F, Castanys S, Gamarro F, Croft SL. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2003; 22(4),380-7.

Sershen S, West J. Implantable polymeric systems for modulated drug delivery. *Biomedical micro and nano technology*, 2003; 55(3): 439.

Shaw JE, Prevo M, Sale R, Yum SII. Physiology biochemistry and molecular biology of skin. Ed. Goldsmith, LA. *University Press Oxford*, 1991; 1447-1475.

Tanner T, Marks R. Delivering drugs by the transdermal route: review and comment. *Skin Research and Technology*, 2008; 14(3): 249-60.

Tempone AG, Perez D, Rath S, Vilarinho AL, Mortara RA, De Andrade HF JR. Targeting *Leishmania (L.) chagasi* amastigotes through macrophage scavenger receptors: the use of drugs entrapped in liposomes containing phosphatidylserine. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2004; 54(1): 60-8.

Tortora G, Grabowski S. Principles of anatomy and physiology: The integumentary system. *Harper Collins*, 1993; Cap. 5: 126-143.

Ullman B. Multidrug resistance and P-glycoproteins in parasitic protozoa. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 1995; 27: 77-84.

Valladares JE. Estudi farmacocinètic i clínic de l'antimonial de N-Metilglucamina en el tractament de la leishmaniosi canina. Tesi Doctoral. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona, 1998.

Valladares JE, Freixas J, Alberola J, Franquelo C, Cristofol C, Arboix M. Pharmacokinetics of liposome-encapsulated meglumine antimonate after intramuscular and subcutaneous administration in dogs. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1997; 57(4): 403-6.

Valladares JE, Riera C, González-Ensenyat P, Díez-Cascón A, Ramos G, Solano-Gallego L, Gállego M, Portús M, Arboix M, Alberola J. Long term improvement in the treatment of canine leishmaniasis using an antimony liposomal formulation. *Veterinary Parasitology*, 2001; 97(1):15-21.

Viayna C. Aportació a l'estudi de permeació d'escopolamina en tres formulacions. Màster Experimental en Ciències Farmacèutiques, 2000; Pàg: 15.

Wenxiu C, Huaying B, Manwei Z. Effect of gamma radiation on gelation in polyvinyl alcohol solutions. *The Journal of Physical Chemistry*, 1985; 26, 43. Citado por Katime IA, Katime O, Katime D. *Los materiales inteligentes de este milenio*, 2004.

WHO. Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. *WHO Technical Report Series*, Geneva, 22–26 March 2010.

Williams ML, Hincenbergs M, Holbrook KA. Skin lipid content during early fetal development. *Journal of Investigative Dermatology*, 1988; 91 (3): 263-268.

Wolfger H, Mamnun Y, Kuchler K. Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. *Research in Microbiology*, 2001; 152: 375-89.

Yatvin MB, Kreutz W, Horwitz BA, Shinitzky M. pH-sensitive Liposomes: possible clinical implications. *Science*, 1980; 210: p. 2.

Yeon S, Chul J, Moo Y. Poly(ethylene oxide)-poly(ethylene oxide)/ poly(ϵ -caprolactone) (PCL) amphiphilic block copolymeric nanospheres: Thermo-responsive release behaviors. *Journal of Controlled Release*, 2000; 65: 345-358.

Zgurskaya H. Molecular analysis of efflux pump based antibiotic resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, 2002; 292: 95-105.

ANNEX

ALTRES MÈRITS

1. COMUNICACIONS EN FORMA DE PÒSTER

- Jimenez-Marco T, Riera C, Fisa R, Mercant C, Guillen C, **Pujol A**, Girona-Llobera E, Sedeño M, Muncunill J. The usefulness of pathogen inactivation technology a real life example: Inactivation of *Leishmania Infantum* in platelet from a donor with asymptomatic infection using riboflavin and ultraviolet light. The International Journal of Transfusion Medicine. Abstracts of the 21st regional Congress of the ISBT, Europe Lisbon, Portugal. June 18-22, 2011. Journal compilation 2011 International Society of Blood Transfusion *Vox Sanguinis* (2011) 101 (Suppl. 1), 1-352.
- Jimenez-Marco T, Fisa R, Riera C, Mercant C, **Pujol A**, Guillen C, Tebar S, Girona-Llobera E, Sedeño M, Muncunill J. Follow-up of asymptomatic *Leishmania infantum* infection in blood donors from an endemic area. The International Journal of Transfusion Medicine. Abstracts of the 21st regional Congress of the ISBT, Europe Lisbon, Portugal. June 18-22, 2011. Journal compilation 2011 International Society of Blood Transfusion *Vox Sanguinis* (2011) 101 (Suppl. 1), 1-352.
- V. Rocamora, **A. Pujol**, C. Riera, R. Fisa, T. Serra. Diagnòstico de leishmaniosis cutànea mediante test de PCR-RT en papel de filtro a partir de muestras de exudado y/o sangre obtenida de pacientes con sospecha de esta patologia. 39 Congreso Nacional de Dermatología y venerología. Santiago de Compostela. 8-11 Juny 2011.
- **Alba Pujol**, Cristina Riera, Joan Estalrich, Israel Molina Roser Fisa and Xavier Fernàndez-Busquets. *Leishmania infantum* infection induces in its later stages several nuclear degeneration of the host cell. 7th European Congress on Tropical Medicine and International Health. Barcelona october 2011.
- **A. Pujol**, C. Riera, B. Clares, I. Camarasa, E. Miralles, R. Prohens, D. Sanchez, A. C. Calpena. Transdermal permeation study of new paromomycin formulations for the treatment of cutaneous leishmaniasis in human skin. 8th World Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology. Istanbul, Turkey from 19th to 22nd March 2012
- Iniesta L, Jimenez-Marco T, Fisa R, Girona-Llobera E, Guillen C, **Pujol A**, Tomas-Perez M, Saura A, Sedeño M, Riera C. Cytokine profile in asymptomatic *Leishmania infantum* infection in blood donors. Transfusion transmitted infections - 4.6 Parasites.
- Fisa R, Riera C, Girona-Llobera E, Iniesta L, Sedeño M, Guillen C, **Pujol A**, Saura A, Tomas-Perez M, Jimenez-Marco T. Reference values for *Leishmania infantum* parasitemia in asymptomatic infected blood donors and leishmaniasis patients from an endemic region. Transfusion transmitted infections - 4.6 Parasites.

- **A. Pujol**, C. Riera, B. Clares, I. Camarasa, A. C. Calpena. Human skin permeation and release of a new formulation with paromomycin for the treatment of cutaneous leishmaniasis. "Skin and Formulation 4th Symposium" June 4-5, 2012 Palais des Congrès, Lyon – France
- **Pujol, A. C. Calpena**, B. Clares, R. Fisa, C. Riera. Estudio de nuevas formulaciones topicas con antimoniato de meglumina para el tratamietno de la leishmaniosis cutanea. XVIII Congreso de la sociedad española de parasitología (SOCEPA) Gran Canarias 17-20 de septiembre 2013
- Míriam Tomás-Pérez, **Alba Pujol**, Ibeth Bula, Laura Oliver, Mónica Lama, Laura Iniesta, Vicenç Rocamora, Cristina Riera y Roser Fisa. Utilidad de dos métodos moleculares de detección e identificación de Leishmania sobre muestras cutáneas no invasivas conservadas en papel de filtro. XVIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología (SOCEPA) Gran Canaria, 17-20 de setembre del 2013.
- **Alba Pujol Brugués**, Cristina Riera Lizandra, Roser Fisa Saladrigas, Ana Cristina Calpena-Campmany, Pilar Hernández-Pastor, Beatriz Clares-Naveros. Evaluation of polymeric micellar carriers for meglumine antimoniate. Xth Spanish-Portuguese Conference on Controlled Drug Delivery. 10th.-12th November 2013. Centro de Investigación Peincipe Felipe, Valencia, Spain.

2. PROJECTES D'INVESTIGACIÓ

- Membre investigador del projecte: Assessorament i la investigació aplicada en camp de la diagnosi, tipació molecular i assaig de fàrmacs per *Leishmania spp* i *Trypanosoma spp*. Codi del projecte de la Fundació Bosch i Gimpera (FBG): 306525
Directores del projecte: Cristina Riera i Roser Fisa.
- Membre investigador del projecte: Noves tecnologies d'inactivació de patògens per la eliminació de paràsits en els components sanguinis. Estratègies de millora de la qualitat i la seguretat de la sang. Còdi del projecte: PI10/00533. Duració del projecte: 2010-2013.
Directora principal: Teresa Jimenez Marco.
- Membre investigador del projecte: "Permeación transdèrmica en piel humana de formulaciones semisólidas." Codi del projecte FBG: 306800. Empresa/Institució: Laboratorio Reig Jofré, S.A.
Directora del projecte: Anna Cristina Calpena Campmany.
- Membre investigador del projecte: "Evaluación de una formulación tópica para el tratamiento de leishmaniasis cutánea en los yungas de bolivia". Codi del projecte: 231/2011. Convocatoria/Entitat financiadora: Plan Propio de Investigación "Acciones

Especiales" del Vicerrectorado de Política Científica e Investigación. Data d'inici: 01/01/2013 Data de fi: 31/12/2014

Investigador principal: Beatriz Clares Naveros.

- Participació en el projecte: Consolider-Ingenio 2010. Nanotecnologies en Biomedicina. Investigador principal: Amilcar Labarta Rodriguez.

3. ALTRES PUBLICACIONS

- **Alba Pujol**, Roser Fisa, Cristina Riera, Vicens Rocamora y David Boteller. Diagnóstico de la leishmaniosis cutánea. Valor de una técnica de reacción en cadena de la polimerasa para la detección de *Leishmania infantum* en muestras recogidas sobre papel de filtro versus la histología convencional y la inmunohistoquímica. Piel (barc). 2012; 27 (9): 527–531.