

FORMULACIÓN EN CREMA A BASE DE GLICIRRICINA PARA EL TRATAMIENTO TÓPICO DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA.

SECTOR TÉCNICO

La presente invención relaciona el desarrollo de una formulación en crema conteniendo glicirricina para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Las leishmaniasis son un grupo de enfermedades parasitarias causadas por diferentes especies de un parásito protozoo perteneciente al género *Leishmania*. Constituye un amplio espectro de enfermedades que van desde lesiones cutáneas crónicas que pueden ser únicas o múltiples (leishmaniasis cutánea) hasta la forma generalmente fatal (leishmaniasis visceral) [Murray HW et al., 2005]. Este grupo de enfermedades es endémico en 99 países, la mayoría de ellos países en desarrollo. La carga anual global para todas las formas de leishmaniasis es de aproximadamente 12 millones por año con 350 millones de personas en riesgo de infección [Sundar S. et al., 2014]. Más de 90% de los casos de leishmaniasis cutánea ocurren en ocho países: Afganistán, Argelia, Arabia Saudita, Siria, Irán, Brasil, Perú y Colombia mientras que el 90% de los casos de leishmaniasis visceral (VL) se reportan en cinco países: India, Bangladesh, Nepal, Sudán y Brasil. La propagación de la leishmaniasis en diferentes regiones es multifactorial y no hay medidas de control eficaces tanto para el parásito como para el vector [Alvar J. et al., 2012].

El tratamiento básico consiste en la administración de antimoniales pentavalentes, que desafortunadamente son tóxicos y causan efectos secundarios graves a los pacientes [Frézard F. et al., 2009]. Ante la falta de disponibilidad de tratamientos químicos seguros, eficaces y económicos se ha hecho necesario aumentar la investigación sobre fármacos antileishmaniales novedosos y eficaces. Las personas que viven en zonas donde la leishmaniasis es endémica acuden a los sistemas médicos tradicionales [Sundar S. et Chakravarty J., 2013]. Por esta razón, los productos naturales son una fuente de nuevos y prometedores medicamentos para luchar contra esta enfermedad tropical desatendida [Croft SL et Olliaro P., 2011]. Los metabolitos secundarios de las plantas son activos contra diversos grupos de patógenos (virus, bacterias y hongos) y otros organismos (artrópodos). En este sentido, los metabolitos como quinonas, alcaloides, terpenos y sus derivados, presentes en numerosas plantas han mostrado ser beneficiosos para los seres humanos debido a las propiedades antiparasitarias, anti- inflamatorias y el modo selectivo de acción [Singh N. et al., 2014].

Los triterpenoides constituyen la familia más grande de productos naturales. Este tipo de moléculas desempeña diversos roles funcionales en las plantas como las hormonas

(giberelinas, ácido abscísico), pigmentos fotosintéticos (phytol, carotenoides), portadores de electrones (ubiquinona, plastoquinona), mediadores del ensamblaje de polisacáridos y componentes estructurales de las membranas (fitoesteroides) [Camargos HS., et al., 2014]. Además de estas funciones fisiológicas, metabólicas y estructurales, muchos compuestos terpenoides desempeñan papeles en la comunicación y mecanismos de defensa [Tholl D, 2006]. Por lo tanto, esas moléculas se han estudiado para buscar la actividad biológica contra virus, bacterias, células tumorales y organismos protozoarios [Begum S., et al., 2014; Sasidharan S., et al., 2011; Barrera P., et al., 2013; Hay A-E., et al., 2007].

Un ejemplo es el terpenoide 11 α , 19 β -dihidroxi-acetoxi-7-deoxichangin aislado de *Raputia heptaphylla* (Rutaceae), que ha mostrado actividad anti-leishmanial contra la forma intracelular de *L. (V). panamensis*. Específicamente, el ensayo con el compuesto informa una Concentración Efectiva media (CE₅₀) de 7,9 μ M y 25,5 μ M utilizando el modelo de infección in vitro de J774.2 y hDCs respectivamente [Wink M, 2012]. Otro seco-limonoide mostró un aumento de IL-12, TNF- α y producción de NO (óxido nítrico) en macrófagos humanos y células dendríticas. Esto elevó la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y MHC de clase II, induciendo una resolución favorable de las lesiones cutáneas en hámsteres infectados [Granados-Falla D., et al., 2013].

Otros compuestos similares a los terpenoides han mostrado actividad contra diversas enfermedades. Los triterpenoides tipo limonoide: Ichangine, una molécula aislada de *Citrus* spp. y un principal metabolito de *Meliaceae* y *Rutaceae* familia es un buen ejemplo [Geissman TA. et Tulagin V., 1946; Mahato SB et Sen S., 1997]. Este compuesto mostró actividad contra *Escherichia coli* y mostró toxicidad en las células de cáncer de riñón [Bhatti HN et Khera RA., 2014]. Nomilina es otro compuesto cuyo probable modo de acción está relacionado con la inducción de la muerte celular vía apoptosis [Poulouse SM. Et al., 2006]. Este compuesto ha mostrado actividad contra artrópodos como *Aedes albopictus*, con valores de concentración letal media (CL₅₀) alrededor de 176 μ M [Sasidharan S. et al., 2011]. Otro compuesto triterpenoide, tipo oleano: ácido oleónico, se deriva del isopreno y ha reportado actividad contra *Plasmodium falciparum* (EC₅₀ = 1.66 μ g / mL) [Bero J. et al., 2013] y *Trypanosoma cruzi* (IC₅₀ = 45.2 μ M) [da Silva Ferreira D. et al., 2010].

A pesar de la promisorio actividad antileishmanial reportada para estos productos naturales, debido a su origen vegetal, presentan problemas asociados con su proyección como prototipo industrial: un bajo rendimiento, dificultad para su extracción y purificación, alta variabilidad entre lotes; lo que limita el escalado, las fases de evaluación y desarrollo preclínico y clínico del nuevo principio farmacéutico [Sasidharan S., et al., 2011]. Por esta razón, el uso de análogos sintéticos son una estrategia adecuada para ensayos *in vitro* contra parásitos debido a la homogeneidad entre lotes de los compuestos sintéticos y la alta disponibilidad [Szychowski J., et al., 2014].

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 relaciona la Expresión relativa factores de crecimiento en respuesta al tratamiento con Glicirricina. La gráfica presenta los niveles de inducción respecto a inicio del tratamiento calculados por el método del $\Delta\Delta CT$, respecto al resultado clínico, las barras representan el promedio $\pm$ la desviación estándar, la barra negra representa niveles al inicio del tratamiento, la barra gris niveles en animales con mejoría.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La Glicirricina es un compuesto triterpenoide tipo saponina glicosilada, el cual se caracteriza por tener dos grupos glucósidos adicionales en el anillo A' de la estructura (Feng X., et al., 2015). Exhibe diferentes actividades farmacológicas, incluyendo antialérgicas, antivirales, inmunoregulatorias, anti-inflamatorias y antiparasitarias (Roy A. et Saraf S., 2006).

Convencionalmente, las formulaciones empleadas para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea hacen uso de inyecciones de sales pentavalentes aplicadas por vía de administración sistémica, para las que se han reportado serios efectos adversos, relacionados con la alta toxicidad de las formas trivalentes de éste activo. Dado que las lesiones asociadas a la forma cutánea de la leishmaniasis están restringidas (compartimentalizadas) a la piel, es deseable disponer de alternativas de aplicación tópica, que se espera conserven la eficacia en la eliminación de la infección y subsecuente proceso de restauración del tejido afectado, limitando la distribución sistémica del activo, reduciendo la posibilidad de efectos adversos asociados a toxicidad.

La invención aquí reivindicada hace referencia central al uso de una formulación para aplicación tópica en crema cuyo ingrediente farmacéutico activo es la glicirricina, un triterpeno al cual le encontramos capacidad leishmanicida, mediante la aproximación experimental que soporta esta solicitud de patente. Además de su función parasitocida, el tratamiento con la formulación de glicirricina, indujo un adecuado control de la lesión, que macroscópicamente representa una resolución de la úlcera, acompañada de la inducción de factores de crecimiento epidermal (asociados a adecuados procesos de cicatrización y reorganización del tejido cutáneo), lo que en conjunto favorece el proceso de cicatrización.

La formulación terapéutica aquí reivindicada se constituye en una alternativa eficaz, segura y económica (comparativamente con las formulaciones de administración sistémica) para el tratamiento de la Leishmaniasis cutánea asociada con parásitos del Nuevo Mundo. Se caracteriza por ser una emulsión de aceite en agua (O/W) cuya formulación comprende:

- a) 5.00% Glicirricina (por peso);
- b) 71.32% Agua (por peso);
- c) 0.10% de Metilparabeno de sodio (por peso);

- d) 0.02% Propilparabeno de sodio (por peso);
- e) 0.96% Fosfato de sodio monobásico (por peso);
- f) 5.00% Alcohol cetílico (por peso);
- g) 4.00% Aceite mineral ligero (por peso);
- h) 2.90% Emulium delta® mezcla de alcohol cetílico, estearato de glicerilo, estearato de polietilenglicol y éter de polioxietileno (por peso)(Alcohol cetílico y Gliceril estearato y PEG-75 estearato y Ceteth- 20 y Steareth-20)(por peso);
- i) 10.00% petrolato blanco (por peso); y
- j) 0.70% Glicerol monoestearato (por peso).

EVIDENCIAS DE UTILIDAD DE LA GLICIRRINA EN EL TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA

Ejemplo 1: Actividad de la glicirricina sobre promastigotes de *Leishmania panamensis* *in vitro*

Promastigotes de *Leishmania* (V). *panamensis* (M/HOM/CO/88/UA140) transfectados con la proteína verde fluorescente (GFP), de 4 días de crecimiento (Fase exponencial) en medio RPMI-1640 suplementado con 10% Suero Fetal Bovino y 1X de L-glutamina (medio completo) se ajustaron a una concentración de 5×10^6 parásitos/mL del mismo medio. En cada pozo de un plato para cultivo celular de 96 pozos se adicionaron 100 μ L de parásitos y 100 μ L de cada concentración de Glicirricina (diluciones 1:5 desde 200 hasta 1.6 μ M). Los promastigotes se incubaron en presencia de la glicirricina durante 72 horas a 26°C. La viabilidad celular se determinó usando el ensayo colorimétrico Alamar Blue, donde se adicionaron 100 μ L/pozo de Resazurina 44 μ M. Los platos se incubaron 4 h a 26°C. Se leyó la absorbancia a 540 y 630 nm con un espectrofotómetro. Se determinó el porcentaje de mortalidad de los parásitos para cada concentración y con estos valores se calculó la Concentración Efectiva media (CE₅₀) usando el análisis Probit [Finney, J.D., 1978]. Las evaluaciones se realizaron por triplicado y los resultados están expresados como media $\pm$ desviación estándar de la CE₅₀.

Se obtuvo una CE₅₀ de 63.18 μ M lo que equivale a 51.99 μ g/mL. Estos resultados sugieren que la glicirrina es capaz de matar los promastigotes de *L. (V) panamensis* a concentraciones iguales o mayores a 50 mg/mL.

Ejemplo 2: Actividad de la glicirrina sobre amastigotes de *Leishmania panamensis* *in vitro*

Macrófagos humanos derivados de monocitos de sangre periférica (huMDM) previamente aislados de individuos sanos fueron infectados con promastigotes de *L. (V) panamensis* de 5 días de crecimiento a una proporción de infección 1:10 (macrófagos: parásitos) durante 24 horas y mantenidos a 35°C y 5% de CO₂. Se confirmó la infección por la tinción de Giemsa y con el uso de SYBER® Safe. Se

contaron 100 macrófagos por campo y se determinó el porcentaje de huMDM infectados vs. huMDM no infectados.

Los huMDM infectados fueron tratados con diferentes concentraciones de Glicirricina (diluciones 1:5 entre 100 y 0.8 μM). Las células infectadas y expuestas a la glicirricina se incubaron durante 72 horas a 35°C, 5% CO_2 . Pasado este tiempo se retiró el sobrenadante y se adicionó SYBR® Safe a una concentración 1X y examinado bajo el microscopio de fluorescencia. El porcentaje de macrófagos infectados fue determinado contando 100 macrófagos por pozo, discriminando el porcentaje de macrófagos infectados vs. No infectados tanto para las células tratadas con glicirrina como para las células infectadas y sin tratar; también se analizó la carga parasitaria (número de parásitos intracelulares por macrófago). Los resultados se expresan como porcentaje de la tasa de infección en comparación con el control no tratado. La CE_{50} fue determinada usando la curva dosis-respuesta. Las evaluaciones fueron llevadas a cabo por triplicado y los resultados fueron expresados como media desviación estándar por triplicado.

Se obtuvo una CE_{50} de 46.31 μM lo que equivale a 35.10 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados sugieren que la glicirrina es capaz de matar los amastigotes de *L. panamensis* presentes en macrófagos tisulares a concentraciones inferiores a 50 $\mu\text{g/mL}$.

El índice de selectividad (IS) fue determinado considerando la concentración citotóxica en macrófagos humanos y la Concentración efectiva en macrófagos humanos infectados. Teniendo en cuenta que la toxicidad de la glicirrina para huMDM fue de 231.6 μM , es decir, 201.74 mg/mL, el IS obtenido para glicirrina es de 5.74 lo cual sugiere que es un IS promisorio para considerar la glicirricina como un compuesto Hit en el desarrollo de un medicamento.

Ejemplo 3: Respuesta terapéutica de la glicirrina en hámsters con leishmaniasis cutánea experimental.

Hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*), machos y hembras, de 6-8 semanas de edad, previamente anestesiados con ketamina (40 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg), fueron inoculados en la piel del dorso con 50×10^7 promastigotes of *L. braziliensis*- EGFP en 100 μL PBS y monitoreados diariamente hasta que desarrollaron la ulcera [29]. Los hámsteres con leishmaniasis cutánea se trataron con glicirricina a una dosis de 3.8 mg/kg/día x 10 días, administrada tópicamente. Luego del tratamiento, los hámsteres fueron supervisados durante tres meses y se registró la evolución de las lesiones como respuesta al tratamiento.

Se encontró que luego de 10 días de tratamiento se logró la mejoría de las lesiones, con una reducción en el tamaño de las mismas que varió entre el 67.93% y el 88.63%. Aunque no se logró cura completa, el tamaño de las lesiones continuó reduciéndose durante los tres meses de seguimiento.

Ejemplo 4: Respuesta terapéutica de una formulación en crema de glicirrina al 5% en hámsteres con leishmaniasis cutánea experimental.

Se preparó una formulación en crema (aceite en agua-O/W) conteniendo 5% de glicirrina (este porcentaje del activo en la crema fue el óptimo, luego de haber usado otras concentraciones de glicirricina). Los hámsteres con leishmaniasis cutánea en este caso causada por *L. (V). panamensis*, se trataron con esta formulación para aplicación tópica, a una dosis de 30mg/día durante 28 días. Luego del tratamiento, los hámsteres fueron supervisados durante tres meses y se registró la evolución de las lesiones como respuesta al tratamiento.

El tratamiento de hámsteres con una crema base al 5 % de glicirrina, una vez al día durante 28 días resultó en mejoría clínica en todos los hámsteres tratados con una reducción del área de la lesión 14.6% al 93.9%) (Tabla 1), con una carga parasitaria de 345 ± 131 parásitos/mg de tejido.

Tabla 1. Porcentaje de reducción del tamaño de la lesión luego del tratamiento con una formulación tópica conteniendo glicirricina al 5%

Final tratamiento	15 días post- tto	30 días post- tto	45 días post- tto	60 días post- tto	75 días post- tto	90 días post- tto
18,7	76,5	48,1	53,3	80,5	50,3	67,1
-0,4	49,0	80,2	68,7	70,2	81,0	87,0
-41,9	65,1	80,1	93,2	80,1	87,6	87,0
6,1	50,8	21,0	81,7	14,6	54,9	68,7
-22,7	52,3	78,6	91,0	39,5	82,6	59,6
26,4	93,9	64,2	64,2	60,2	91,6	68,5

Este tratamiento se comparó con el tratamiento de hámsters con antimonio de meglumina intralesional a una dosis de 200 mg dos veces a la semana durante 4 semanas.

Este tipo de tratamiento (con antimonio de meglumina intralesional) produjo mejorías clínicas con un porcentaje de reducción de las lesiones mucho menores que el obtenido con la formulación de glicirricina. En este caso, las lesiones redujeron su tamaño al final del estudio en porcentajes que variaron entre 19 y el 68%. En tres hámsteres las lesiones aumentaron de tamaño en lugar de disminuir, con porcentajes de reducción negativos, que oscilaron entre -37% y -87% (Tabla 2), con una carga parasitaria de 3.244 parásitos/mg de tejido.

Tabla 2. Porcentaje de reducción del tamaño de la lesión luego del tratamiento intralesional con antimonio de meglumina.

Final tratamiento	15 días post- tto	30 días post- tto	45 días post- tto	60 días post- tto	75 días post- tto	90 días post- tto
----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------	----------------------

0						
33,64	-39,21	-58,39	-65,45	-29,08	-48,90	19,10
90,22	-63,68	27,98	54,35	-90,38	6,89	-37,87
100,00	29,55	68,84	32,30	71,47	24,75	64,19
0,00	64,26	-90,91	-22,31	-61,11	48,67	44,63
16,40	55,15	74,92	-26,75	-34,03	-41,82	-68,3
74,19	-52,80	88,87	-96,84	8,35	-80,68	-87,88

Ejemplo 5: Inducción del proceso de cicatrización de una formulación en crema de glicirrina al 5% en hámsteres con leishmaniasis cutánea experimental.

En los hámsteres que presentaron mejoría, los niveles de inducción del factor de crecimiento epidermal (EGF) aumentó con respecto a los niveles obtenidos previos al tratamiento.

Teniendo en cuenta que el EGF es un componente esencial durante el proceso de cicatrización, estos resultados sugieren que la formulación en crema conteniendo glicirricina al 5% puede favorecer la curación de la leishmaniasis cutánea potenciando el proceso de cicatrización a través del EGF (Figura 1).

Por su parte, se evidenció que el tratamiento no aumenta los niveles de TGF β y que no induce la expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) ni el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

REFERENCIAS

1. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG: Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005, 366:1561–1577.
2. Sundar S, Singh A, Singh OP: Strategies to Overcome Antileishmanial Drugs Unresponsiveness. *J Trop Med* 2014, 2014:1–7.
3. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Boer M den: Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One* 2012, 7:e35671.
4. Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR: Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. *Molecules* 2009, 14:2317–2336.
5. Sundar S, Chakravarty J: Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother* 2013, 14:53–63.
6. Croft SL, Olliaro P: Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect* 2011, 17:1478–1483.
7. Singh N, Mishra BB, Bajpai S, Singh RK, Tiwari VK: Natural product based leads to fight against leishmaniasis. *Bioorganic Med Chem* 2014, 22:18–45.
8. Camargos HS, Moreira RA, Mendanha SA, Fernandes KS, Dorta ML, Alonso A: Terpenes increase the lipid dynamics in the *Leishmania* plasma membrane at concentrations similar to their IC50 values. *PLoS One* 2014, 9.
9. Tholl D: Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Curr Opin Plant Biol* 2006, 9:297–304.
10. Begum S, Ayub A, Zehra SQ, Siddiqui BS, Choudhary MI, Sciences B: Leishmanicidal Triterpenes from *Lantana camara*. *Chem Biodivers* 2014, 11:709–718.
11. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga Latha L. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *Afr J Tradit Complement Altern Med*. 2011;8(1):1-10.
12. Barrera P, Sülsen VP, Lozano E, Rivera M, Beer MF, Tonn C, Martino VS, Sosa M a: Natural Sesquiterpene Lactones Induce Oxidative Stress in *Leishmania mexicana*. *Evidence-Based Complement Altern Med* 2013, 2013:1–6.
13. Hay A-E, Ioset J-R, Ahua KM, Diallo D, Brun R, Hostettmann K: Limonoid orthoacetates and antiprotozoal compounds from the roots of *Pseudocedrela kotschyi*. *J Nat Prod* 2007, 70:9–13.

14. Wink M: Medicinal plants: A source of anti-parasitic secondary metabolites. *Molecules* 2012, 17:12771–12791.
15. Granados-Falla D, Coy-Barrera C, Cuca L, Delgado G: Seco-limonoid 11 α ,19 β -dihydroxy-7-acetoxy-7-deoxoichangin promotes the resolution of *Leishmania panamensis* infection. *Adv Biosci Biotechnol* 2013, 04:304–315.
16. Geissman TA, Tulagin V: Some observations on the structure of limonin. *J Org Chem* 1946, 11:760–770.
17. Mahato SB, Sen S: Advances in triterpenoid research, 1990–1994. *Phytochemistry* 1997, 44:1185–1236.
18. Bhatti HN, Khera RA: Biotransformations of diterpenoids and triterpenoids: a review. *Journal of Asian Natural Products Research* 2014:70–104.
19. Poulouse SM, Harris ED, Patil BS: Antiproliferative Effects of Citrus Limonoids Against Human Neuroblastoma and Colonic Adenocarcinoma Cells. *Nutr Cancer* 2006, 56:103–112.
20. Sasidharan S, Chen Y, Saravanan D, Sundram KM, Yoga Latha L: Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African J Tradit Complement Altern Med* 2011, 8:1–10.
21. Bero J, Hérent M-F, Schmeda-Hirschmann G, Frédérich M, Quetin-Leclercq J: In vivo antimalarial activity of *Keetia leucantha* twigs extracts and in vitro antiplasmodial effect of their constituents. *J Ethnopharmacol* 2013, 149:176–83.
22. da Silva Ferreira D, Esperandim VR, Toldo MPA, Saraiva J, Cunha WR, de Albuquerque S: Trypanocidal activity and acute toxicity assessment of triterpene acids. *Parasitol Res* 2010, 106:985–989.
23. Szychowski J, Truchon JF, Bennani YL: Natural products in medicine: transformational outcome of synthetic chemistry. *J Med Chem* 2014, 57:9292–9308.
24. Feng X, Ding L, Qiu F. Potential drug interactions associated with glycyrrhizin and glycyrrhetic acid. *Drug Metab Rev.* 2015:1-10.
25. Roy A, Saraf S. Limonoids: overview of significant bioactive triterpenes distributed in plants kingdom. *Biol Pharm Bull.* 2006; 29(2):191-201.
26. Mao Y, Wang B, Xu X, Du W, Li W, Wang Y. Glycyrrhizic Acid Promotes M1 Macrophage Polarization in Murine Bone Marrow-Derived Macrophages Associated with the Activation of JNK and NF-kappaB. *Mediators Inflamm.* 2015;2015:372931.

27. Dai JH, Iwatani Y, Ishida T, Terunuma H, Kasai H, Iwakura Y, et al. Glycyrrhizin enhances interleukin-12 production in peritoneal macrophages. *Immunology*. 2001;103(2):235-43.
28. Finney, J.D. *Statistical Method in Biological Assay*. 3. Ed. Charles Griffin & Co., London and High Wycombe, 1978, 508 pp.
29. Robledo SM, Carrillo LM, Daza A, Restrepo AM, Muñoz DL, Tobón J, Murillo JD, López A, Ríos C, Mesa CV, Upegui YA, Valencia-Tobón A, Mondragón-Shem K, Rodríguez B, Vélez ID. Cutaneous leishmaniasis in the dorsal skin of hamsters: a useful model for the screening of antileishmanial drugs. *J Vis Exp*. 2012;(62). pii: 3533.