

UNIVERSIDAD DEL VALLE

Parámetros del hemograma pre y postratamiento, como  
biomarcadores tempranos de desenlace terapéutico en  
pacientes con leishmaniasis cutánea atendidos en el centro y  
el suroccidente colombiano (2007-2020)

---

Documento de tesis para optar al título de Magister en Epidemiología

David Esteban Rebellón Sánchez. MD.

Escuela de Salud Pública  
Maestría en Epidemiología  
2022

**PARAMETROS DEL HEMOGRAMA PRE Y POSTRATAMIENTO, COMO  
BIOMARCADORES TEMPRANOS DE DESENLACE TERAPÉUTICO EN  
PACIENTES CON LEISHMANIASIS CUTÁNEA ATENDIDOS EN EL CENTRO Y  
EL SUROCCIDENTE COLOMBIANO (2007-2020)**

David Esteban Rebellón Sánchez  
Médico

**Directoras de tesis:**

Lyda Osorio, MD PhD

María Adelaida Gómez, PhD

**UNIVERSIDAD DEL VALLE  
ESCUELA DE SALUD PÚBLICA  
MAESTRÍA EN EPIDEMIOLOGÍA  
2022**

## **RECONOCIMIENTOS**

El estudiante de maestría fue parcialmente financiado por el Fogarty International Center de los Institutos Nacionales de Salud de los Estado Unidos (NIH) bajo el grant número D43TW006589. El contenido es responsabilidad exclusiva del estudiante de maestría y no representa necesariamente la opinión oficial de los Institutos Nacionales de Salud.

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a todo el personal clínico y de investigación del Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) por su orientación y compañía a lo largo de todos estos años.

A la Dra. Nancy Saravia por acogerme en la familia CIDEIM; su apoyo, motivación, y retroalimentación permanente han sido determinantes para mi formación. A María Adelaida Gómez y Lyda Osorio por su excelente proceso de mentoría e inspiración para el inicio de mi carrera científica. A Alexandra Cossio por sus enseñanzas, acompañamiento y amistad durante todos estos años. A Jonny García, Yaset Caicedo, Alejandra del Castillo, Jimena Jojoa, Lina Giraldo, Kathleen Agudelo, Laura Aguirre y Darling Córdoba por su compañía, amistad y colaboración durante todo este proceso.

A Ithzayana Madariaga por motivarme a mejorar cada día.

A mi mamá y Luciana por ser la luz en mi vida y mi todo.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	7
<b>GLOSARIO</b> .....	8
<b>RESUMEN</b> .....	10
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	12
<b>ESTADO DEL ARTE</b> .....	15
<b>MARCO TEÓRICO</b> .....	21
<b>OBJETIVOS</b> .....	27
<b>Objetivo general</b> .....	27
<b>Objetivos específicos</b> .....	27
<b>METODOLOGÍA</b> .....	28
<i>Tipo de estudio</i> .....	28
<i>Área de estudio</i> .....	28
<i>Población y muestra</i> .....	29
<i>Variables</i> .....	32
<i>Recolección, control de calidad y manejo de datos</i> .....	44
<i>Análisis estadístico</i> .....	48
<b>CONSIDERACIONES ÉTICAS</b> .....	53
<b>RESULTADOS</b> .....	56
<b>Selección de los participantes de estudio y pérdidas al seguimiento</b> .....	56
<b>Descripción de la población de estudio</b> .....	57
<b>Incidencia de falla terapéutica por etapa del seguimiento</b> .....	60
<b>Descripción de los parámetros del hemograma</b> .....	61
<i>Parámetros del hemograma pre-tratamiento</i> .....	61
<i>Parámetros del hemograma post-tratamiento</i> .....	61
<i>Razones de cambio post-tratamiento</i> .....	62
<b>Selección de parámetros del hemograma con capacidad para discriminar grupos de desenlace terapéutico</b> .....	65
<b>Análisis bivariado de factores asociados con falla terapéutica</b> .....	68
<b>Análisis multivariado de los factores asociados con falla terapéutica</b> .....	76
<i>Análisis multivariado de los factores pre-tratamiento asociados a falla terapéutica</i> ....	76

<i>Análisis multivariado de los factores post-tratamiento asociados a falla terapéutica..</i>	76
<i>Análisis post-regresión .....</i>	77
<b>DISCUSION.....</b>	82
<i>Incidencia de falla terapéutica y factores clínicos y sociodemográficos asociados.....</i>	82
<i>Potencial de los parámetros del hemograma como predictores tempranos del desenlace terapéutico .....</i>	86
<i>Fortalezas y debilidades del estudio .....</i>	88
<i>Implicaciones en salud pública.....</i>	89
<i>Estudios futuros .....</i>	90
<b>CONCLUSIONES.....</b>	91
<b>REFERENCIAS .....</b>	92
<b>ANEXOS .....</b>	105

## LISTA DE ABREVIATURAS

BIC	Bayesian information criterion
BPC	Buenas prácticas clínicas
CIDEIM	Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas
CIOMS	Consejo de las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas
FRC	Formato de reporte de caso
ICH GCP E6	Anexo integrado a las buenas prácticas clínicas, adoptado mediante directriz E6, del Consejo Internacional para la Armonización
IC95%	Intervalo de confianza al 95%
IFN $\gamma$	Interferon gamma
IL	Interleuquina
INS	Instituto Nacional de Salud
LC	Leishmaniasis cutánea
LRT	Likelihood ratio test
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPS	Organización Panamericana de la Salud
OR	Odds Ratio
RR	Riesgo relativo
Th	Linfocitos T helper
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa

## GLOSARIO

**Agente etiológico:** en el caso de las enfermedades infecciosas es generalmente un organismo capaz de producir infección y enfermedad en el hospedero.

**Biomarcador:** es un parámetro biológico medible y cuantificable que sirve como indicador en evaluaciones relacionadas con la fisiología y la salud.

**Biomarcador temprano:** para el propósito de este estudio se considera biomarcador temprano aquel que puede ser medido en el periodo comprendido entre la consulta de evaluación de base y la consulta de fin de tratamiento

**Cura:** es un diagnóstico clínico posterior al tratamiento con antileishmaniales definido en el día 90 o más a partir del inicio de dicho tratamiento, se entiende como la re-epitelización completa con ausencia de signos inflamatorios en todas las lesiones cutáneas, sin aparición de otras nuevas lesiones o de recaídas.

**Falla terapéutica:** es un diagnóstico clínico posterior al tratamiento con antileishmaniales, puede ser definida en cualquier momento del seguimiento y se entiende como la aparición de nuevas lesiones cutáneas después de fin de tratamiento, o un incremento del área > 50% respecto a la inicial, o una disminución del área en menos de un 50% a la semana 8 de seguimiento, o una re-epitelización incompleta y/o la presencia de endurecimiento, bordes elevados o enrojecimiento de la lesión después del día 90 (semana 13), o pacientes con recaídas (reactivación de las lesiones después de la cura inicial),

**Hemograma:** es un análisis de sangre que ayuda al médico a conocer la cantidad total de varios tipos distintos de células sanguíneas pertenecientes a los los glóbulos rojos, los glóbulos blancos y las plaquetas.

**Leishmaniasis:** son un conjunto de enfermedades parasitarias zoonóticas y antroponóticas producidas por un flagelado del género *Leishmania spp* que pueden presentarse en formas clínicas diversas y se clasifican en tres grandes grupos de acuerdo a los tejidos comprometidos: leishmaniasis cutánea, mucocutánea y visceral.

**Reservorio:** especies o poblaciones que son capaces de mantener en la naturaleza un determinado agente infeccioso.

**Respuesta inmunológica:** serie de procesos que ocurren dentro de un organismo con el propósito de defenderse frente a invasores extraños, puede ser mediada mediada por células o humoralmente

**Tratamiento antileishmanial sistémico de primera línea:** son aquellos grupos de medicamentos sistémicos empleados como primera línea para el tratamiento de las



leishmaniasis, incluyen tratamientos antimoniales inyectables como el Glucantime® o la pentamidina, o medicamentos orales como el Miltefosine.

**Vector:** describe a una o varias especies de invertebrados que sirven como transportadores del agente infeccioso de uno a otro individuo de la especie de vertebrados involucrados en la transmisión.

## RESUMEN

**Introducción:** La falla terapéutica puede ocurrir en un 9-40% de los pacientes tratados con antileishmaniales. Para confirmar la necesidad de re-tratamiento usualmente se necesitan entre 3 y 6 meses de seguimiento clínico. El uso temprano de biomarcadores de falla terapéutica podría permitir identificar pacientes con necesidad de ajuste al tratamiento de manera temprana, favoreciendo intervenciones oportunas y mejorando la calidad de vida de los pacientes. El hemograma es una herramienta de fácil acceso y ampliamente disponible que no ha sido evaluada como potencial biomarcador de desenlaces terapéuticos.

**Objetivo:** Identificar los parámetros del hemograma pre y postratamiento con utilidad como biomarcadores tempranos de desenlace terapéutico en pacientes con LC tratados con antileishmaniales de primera línea y enrolados en estudios de CIDEIM en el centro y el suroccidente colombiano entre el 2007 y el 2020.

**Métodos:** Se realizó un estudio de cohorte retrospectiva. Se identificaron pacientes con LC, adherencia al tratamiento >90%, datos de respuesta terapéutica e información sobre sus hemogramas pre y/o postratamiento, que participaron en estudios realizados en CIDEIM entre 2007-2020 y autorizaron el uso de sus datos para estudios futuros. Se recolectó información sobre los parámetros del hemograma pre y postratamiento, además de co-variables sociodemográficas, clínicas y paraclínicas para controlar variables potencialmente confusoras. Se realizó un análisis descriptivo y se estimó la incidencia acumulada de falla terapéutica general y por subgrupos de interés clínico en diferentes momentos del seguimiento (semana  $8 \pm 1s$ , semana  $13 \pm 2s$  y semana  $26 \pm 2s$ ). Mediante análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales y análisis bivariados se seleccionaron los parámetros del hemograma de mayor importancia para la explicación de la variabilidad entre el desenlace clínico. Se construyeron modelos lineales generalizados mixtos para identificar los parámetros del hemograma y co-variables asociados a la falla terapéutica. Se realizaron análisis post-regresión para evaluar el rendimiento de los modelos.

**Resultados:** Se enrolaron 200 participantes. La incidencia de falla terapéutica fue del 15,5% sin diferencias significativas según el tipo de tratamiento. Aproximadamente el 95% de los participantes tenía definido el estado final a semana 13. Se encontró que edades más altas se asociaron a menor riesgo (RR 0,96 IC95% 0,93 - 0,98), mientras que la presencia de adenopatía (RR 2,19 1,17 - 4,11) y la infección concomitante pre-tratamiento (RR 2,51 1,12 - 5,61) y post-tratamiento (RR 6,14 1,15 - 32,71) se asociaron a falla. Los parámetros del hemograma asociados a falla terapéutica fueron un conteo de granulocitos pre-tratamiento  $\leq 0,01 \times 10^3 \mu L$  (RR 2,11 IC95%: 1,08 - 4,11), un porcentaje de eosinófilos  $\geq 14\%$  (RR 2,01 IC95% 1,05 - 3,82) y una razón de cambio de los

monocitos  $\geq 1,07$  (RR 3,15 IC95%: 1,63 – 6,10). Los modelos tuvieron una buena bondad de ajuste y se descartó apalancamiento.

**Conclusiones:** Los parámetros del hemograma tienen utilidad como biomarcadores tempranos de desenlaces terapéuticos en tratamientos antileishmaniales de pacientes del centro y suroccidente colombiano.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las leishmaniasis son zoonosis transmitidas por la picadura de mosquitos del género *Lutzomyia* que se encuentran infectados con *Leishmania spp.* Los síndromes clínicos en el ser humano se clasifican de acuerdo al compromiso de la piel, las mucosas o las vísceras [1]. La leishmaniasis cutánea (LC) representa entre el 95-97% de los casos en las Américas y es considerada un problema de salud pública, siendo Colombia el segundo país latinoamericano con mayor número de casos, con una incidencia aproximada de 8,000-12,000 casos por año [2–4].

Múltiples limitantes se han descrito para el control de la enfermedad, que abarcan aspectos geográficos, económicos, socioculturales y barreras propias de los sistemas de salud [5,6]. Se conoce que aproximadamente el 80% de los pacientes provienen de áreas rurales aisladas, con difícil acceso a los centros de atención, lo cual limita el diagnóstico, tratamiento y seguimiento adecuado de las leishmaniasis [7], con un posible deterioro de la calidad de vida de los afectados. Por ejemplo, se ha observado que aquellos pacientes que requieren invertir más de la mitad de un salario mínimo mensual en su enfermedad, tienen 3,5 (IC95%: 1,2-10,2) veces la oportunidad de tener un deterioro de alto impacto en su calidad de vida respecto a los que gastan menos de esta cantidad, situación que también se ve reflejada en aquellos que tienen que viajar en transporte público (OR=5,8 IC95%1,3-26,8) o dejar de asistir al trabajo por más de 6 días (OR=12,0 IC95%: 3,8-42,6) para asegurar el acceso al seguimiento de su patología [8].

Una vez realizado el diagnóstico de leishmaniasis, generalmente se requieren ciclos prolongados de medicamentos orales, intramusculares o intravenosos que oscilan entre los 20 y 28 días, con pocas alternativas que incluyen: Antimoniato de Meglumina, Miltefosina, Pentamidina y Anfotericina B[9], la mayoría de ellas con alta toxicidad y una elevada frecuencia de efectos adversos [10,11]. El esquema de seguimiento terapéutico incluye una valoración inicial pretratamiento (día 0), otra al finalizar el tratamiento (día 20-28), una nueva visita para descartar falla terapéutica entre el día 42-63 (contados desde el día de inicio del tratamiento), una visita al día 90 para definir cura inicial y una última visita después del día 180 para definir la cura definitiva [12,13].

En diferentes ensayos clínicos latinoamericanos, en los cuales se supone una mayor vigilancia y adherencia a los tratamientos, se ha evidenciado que la falla terapéutica ocurre en un 9 y 40% de los casos [10,14–19]. Ante este panorama, podría esperarse que la incidencia de falla sea aún mayor en las condiciones reales de los pacientes; sin embargo, esta hipótesis es difícil de comprobar por los sistemas de vigilancia, teniendo en cuenta que en centros de referencia se ha observado que de aquellos pacientes que no participan en estudios, el 60% nunca regresa a las valoraciones de seguimiento, un 20% solamente regresa a final de tratamiento, un 5% a día 45, un 7% a semana 13 y un 8% a los 6 meses o más [20].

Resultados que además concuerdan con otras estimaciones en las que se plantea que aproximadamente en uno de cada dos pacientes no se conoce el desenlace terapéutico [1,2].

La complejidad en el abordaje de la LC implica la necesidad de proponer nuevas estrategias para controlarla y eliminarla, partiendo desde la propuesta de nuevos métodos de control de reservorios, hasta el desarrollo de alternativas diagnósticas rápidas de buen desempeño o la formulación de terapias más costo-efectivas. Así mismo, resulta fundamental proponer nuevos esquemas de seguimiento que se adapten a las necesidades particulares de los pacientes y que permitan un manejo individualizado de sus condiciones con el objetivo de lograr una mayor cobertura en el seguimiento clínico y con ello en la valoración de la respuesta terapéutica [21,22].

La identificación de biomarcadores tiene el potencial de dar solución a varios de los desafíos anteriormente planteados. Un biomarcador es un parámetro biológico medible y cuantificable que sirve como indicador en evaluaciones relacionadas con la fisiología y la salud [23]. La identificación de biomarcadores en leishmaniasis sirve para proporcionar información sobre el estado inmunitario de los pacientes, la respuesta al tratamiento, el estado de exposición previa a los parásitos y/o la epidemiología de la infección en las poblaciones [24,25]. Al analizar las potenciales utilidades de estas herramientas se ha planteado la necesidad de encontrar nuevos biomarcadores que evalúen la efectividad de los tratamientos en periodos más cortos [26,27], facilitando el abordaje clínico y seguimiento de los pacientes con leishmaniasis de una manera individualizada, permitiendo orientar la toma de decisiones clínicas de manera más temprana, y contrarrestando así, algunas de las limitantes que impactan directamente en la calidad de vida de los pacientes [8,24].

La respuesta inmune ha demostrado un rol fundamental para definir el desenlace terapéutico [28], por lo que la búsqueda de biomarcadores relacionados a la respuesta inmune parece ser una alternativa promisorio. Una herramienta fácilmente disponible que podría proporcionar biomarcadores de respuesta terapéutica tempranos es el hemograma, ya que provee mediciones de diferentes líneas celulares que sirven como subrogados de la respuesta inmune del hospedero, es una prueba ampliamente disponible y de fácil acceso (inclusive en áreas rurales), y puede proporcionar información a bajo costo cuando es interpretado de manera correcta [29,30]. En otras condiciones fisiopatológicas con un fuerte componente inmunológico, se ha demostrado la utilidad del cuadro hemático como predictor de gravedad y respuesta terapéutica. Por ejemplo, en el caso de la sepsis, se ha encontrado que la relación de recuento de linfocitos y neutrófilos es superior a la proteína C reactiva, y equivalente a la procalcitonina como biomarcadores de sepsis grave y shock séptico, y puede ser utilizada como predictor temprano de mortalidad o para orientar el uso de antibioticoterapia [31,32]. Así mismo, en otras condiciones que incluyen leucemias, anemia aplásica, enfermedades autoinmunes y hasta en casos de falla cardíaca, se ha encontrado

que varios de los parámetros del hemograma predicen desenlaces no favorables como mortalidad o no respuesta a tratamientos [33–36].

En el caso de la leishmaniasis, las guías de práctica clínica nacionales e internacionales recomiendan la toma de hemogramas antes y después de realizar el tratamiento con antileishmaniales sistémicos [1,2,9]. Se ha encontrado que varios de los parámetros del hemograma pueden verse alterados tras el uso de estos medicamentos, con incrementos significativos en el número de eosinófilos o disminuciones significativas en los conteos de neutrófilos, linfocitos, leucocitos, plaquetas y hemoglobina [37,38]. A pesar de ello, el significado clínico de estas variaciones y su relación con el desenlace terapéutico (entendido como cura o falla) no ha sido dilucidado, por lo que en la práctica clínica el reconocimiento de estas alteraciones solo suele conducir a la descripción de los hallazgos en la historia clínica, sin generar ningún tipo de interpretación adicional respecto al estado actual o posible evolución de los pacientes en el contexto de su leishmaniasis.

La caracterización de parámetros en el hemograma como biomarcadores tempranos de desenlace terapéutico, podría proveer una herramienta útil y fácilmente asequible para el médico de atención, facilitando no solo la toma de decisiones respecto a la conducta terapéutica, sino que además tendría potencial utilidad en el acortamiento de los periodos de seguimiento terapéutico, asegurando quizás, una mayor disponibilidad de información sobre la respuesta al tratamiento que la que se tiene en la actualidad.

Este proyecto responde la pregunta de investigación ¿Cuáles de los parámetros del hemograma pre y postratamiento, tienen utilidad como biomarcadores tempranos (fin de tratamiento +7 días) de desenlace terapéutico en pacientes con LC del centro y el suroccidente colombiano atendidos en CIDEIM en el periodo 2007-2020? Los resultados contribuirán a un mejor entendimiento de la respuesta terapéutica, además de que podrían facilitar la caracterización de respuestas de cura o falla de manera temprana, suministrar información valiosa para la optimización al seguimiento terapéutico mediante ajustes individualizados al esquema de seguimiento guiados por la respuesta inmunitaria particular de cada paciente, y/o contribuir en la construcción de algoritmos predictivos de desenlace terapéutico a futuro.

## ESTADO DEL ARTE

### **Generalidades**

Las leishmaniasis son un conjunto de enfermedades parasitarias zoonóticas y antroponóticas producidas por un protozoo flagelado del género *Leishmania spp.* y transmitidas por vectores de la familia *Psychodidae* de los géneros *Phlebotomus spp.* en el viejo mundo y *Lutzomyia spp.* en el nuevo mundo [1]. Son consideradas enfermedades tropicales desatendidas, y pueden presentarse en formas clínicas diversas que se clasifican en tres grandes grupos de acuerdo a los tejidos comprometidos: las formas cutánea, mucocutánea y visceral [1,39]. Así mismo, presentaciones atípicas de la forma cutánea pueden presentarse en algunos pacientes, que incluyen desde cuadros asintomáticos de la infección, pasando por presentaciones leves con lesiones nodulares no ulceradas de pequeño tamaño, hasta formas severas como la leishmaniasis diseminada, leishmaniasis difusa o leishmaniasis visceral con manifestaciones cutáneas [39,40]. Dentro de las manifestaciones de la LC destacan la presencia de una o múltiples pápulas, nódulos, o úlceras ovaladas, de aspecto crateriforme, que no suelen ser dolorosas (salvo cuando cursan con sobreinfección bacteriana) y que aparecen en los sitios de picadura del vector, asociándose o no a compromiso linfático regional o distal [41–43].

### **Etiología y Reservorios**

*Leishmania spp.* es un protozoo perteneciente a la familia *Trypanosomatidae* y comprende cerca de 22 especies patógenas para el hombre que se subdividen en dos subgéneros, *Leishmania* y *Viannia*, el primero distribuido ampliamente en el mundo asociado a cuadros que abarcan desde la infección asintomática hasta la forma visceral grave, mientras que el segundo es exclusivo del nuevo mundo, caracterizado principalmente por cuadros con afección cutánea y mucocutánea. En la región de las Américas hasta la fecha se han identificado al menos quince especies con diferente tropismo (visceral, cutáneo y mucoso), siendo más prevalentes aquellas relacionadas con las presentaciones cutáneas [1,43,44]. En Colombia, se han descrito una mayor distribución de *Leishmania viannia panamensis*, *L. (V) braziliensis* y *L. (V) guyanensis* [45]. Entre los reservorios destacan los mamíferos domésticos y selváticos como perros, gatos, roedores, marsupiales, primates, carnívoros, entre otros [46].

### **Situación actual y epidemiología de las leishmaniasis**

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, las leishmaniasis son endémicas en todos los continentes. Para el año 2018, se habían reportado 89 países endémicos para LC, y seis de ellos (Afganistán, Algeria, Brasil, Colombia,

Irán, and Iraq) representaban más del 95% de los casos. Se estima que cada año ocurren cerca 700,000 a 1 millón de casos nuevos de LC a nivel global; sin embargo, esta cifra probablemente está subestimada debido al sub-reporte de la enfermedad [47]. En la actualidad, se estima que cerca de 350 millones de personas están en riesgo de adquirir la infección globalmente [48].

Colombia es el segundo país con mayor incidencia de casos en la región de las Américas [49]. Para el año 2019, se reportaron 5,105 casos de LC, que correspondían al 98% de todas las leishmaniasis, el 67,2% de los casos se reportaron en personas entre los 15-44 años, el 12,3% entre los 5-14 años, el 10,4% entre los 45 y los 59 años, y el resto se distribuyó entre los mayores de 60 años y los menores de 5 años. El 75,5% de los casos ocurrieron en el escenario rural, y de los grupos poblacionales, los más afectados fueron los militares (28,2%), seguidos por los agricultores (18,3%). La enfermedad fue más común en los hombres, representando el 76% de todos los casos [49].

### ***Control y tratamiento***

En la actualidad, el control de la transmisión de la enfermedad se fundamenta principalmente en el control vectorial y de los reservorios (en los lugares donde la forma visceral es endémica) [50,51], además del tratamiento a la población enferma [52]. Para los tratamientos de la LC se pueden utilizar alternativas locales y sistémicas, que incluyen termoterapia, infiltraciones locales, crioterapia y medicamentos orales o parenterales [1,9,40,50]. Uno de los principales problemas relacionados con el tratamiento es que aproximadamente uno de cada dos pacientes no es elegible para tratamientos locales [53], y el uso de medicamentos sistémicos está relacionado con una alta frecuencia de eventos adversos, además de alcanzar un porcentaje importante de fallas terapéuticas en ensayos clínicos controlados, en los que las condiciones de administración y seguimiento farmacológico son en teoría más óptimas, llegando a reportar porcentajes de falla entre el 9 - 40% de los casos [10,14–19].

El medicamento de primera línea para el tratamiento de la LC en Colombia y gran parte del mundo es el antimonio pentavalente. A pesar de usarse para el tratamiento de esta condición desde hace casi un siglo, su mecanismo de acción aún no se ha determinado con exactitud. Existen dos presentaciones de antimonio: el estibogluconato de sodio (Pentostam®) y el antimoniato de meglumina (Glucantime®). En Colombia, se utiliza con mayor frecuencia el Glucantime® a dosis de 20 mg/kg/día por ciclos de 20-28 días dependiendo de la presentación clínica de la leishmaniasis [9,54]. Dentro de las principales reacciones adversas a la medicación resaltan cefalea, mialgias, artralgias, náusea, vómito, mareos y alteraciones en los paraclínicos de función orgánica de los pacientes [55,56]. Adicionalmente, con el objetivo de mejorar las tasas de curación, estudios recientes han evaluado la administración concomitante de Glucantime® con otros medicamentos con efectos



inmunomoduladores, sin embargo combinaciones como Glucantime ® mas Pentoxifilina no han demostrado beneficios clínicos [57], por lo que aunque podrían encontrarse reportadas en estudios de investigación, no son terapias de uso rutinario en la práctica clínica.

Otro de los tratamientos utilizados con mayor frecuencia es el Miltefosine, un alquilfosfolípido oral aprobado para el uso en tratamientos antileishmaniales de población mayor de dos años, que ha demostrado no ser inferior a Glucantime ® en ensayos clínicos controlados en población pediátrica de Colombia, a dosis de 1,8 – 2,5 mg/kg/día por 28 días [58]. Actualmente este medicamento se incluye dentro de los de segunda línea, junto a la Pentamidina y la Anfotericina B. La Pentamidina es un antiprotozoario que interfiere con la síntesis de ácidos nucleicos y la fosforilación oxidativa, estudios en Colombia han demostrado una eficacia cercana al 85% con un porcentaje modesto de efectos adversos [59]; sin embargo, en un meta-análisis que comparaba Antimoniato de Meglumina vs Pentamidina encontró que esta última se asociaba con menor eficacia y seguridad que la primera opción [60].

Finalmente, la Anfotericina B es un antifúngico que ha probado ser efectivo para el tratamiento de las leishmaniasis complicadas (mucosas, diseminadas, difusas o viscerales), tiene dos presentaciones, desoxicolato y liposomal, siendo esta última menos tóxica por lo que es la de preferencia para administración intrahospitalaria a dosis de 3 mg/kg/día por personal experto en el manejo del medicamento [1,9,50,61].

### ***Definiciones y momentos para la evaluación del desenlace terapéutico***

La respuesta al tratamiento en la LC se encuentra determinada tanto por la eliminación del parásito como por el proceso inflamatorio y de cicatrización cutánea, siendo estos últimos los que definen el desenlace clínico entendido como cura o falla terapéutica [12,13]. En la actualidad, los lineamientos nacionales para la evaluación de desenlace terapéutico involucran un seguimiento al día 45 contado a partir de la fecha de inicio de tratamiento, otro al día 90, e idealmente hasta los 6 meses o más (> día 180) para confirmar la cura definitiva [9].

Desde el año 2013, las definiciones clínicas de cura y falla terapéutica han sido armonizadas y unificadas para el contexto de ensayos clínicos en leishmaniasis, adaptándose a los contextos particulares del viejo y del nuevo mundo. En la actualidad cada momento del seguimiento tiene una finalidad específica que ha sido adoptada para la región de las Américas [12,13]: a) entre el día 42-63 a partir de la fecha de inicio de tratamiento se define la respuesta inicial como mejoría clínica o falla terapéutica, b) en el día 90 se determina la cura aparente o puede determinarse falla terapéutica, y c) entre los días 180-360 se establece la curación definitiva o la falla terapéutica.

Se entiende como cura la re-epitelización completa con ausencia de signos inflamatorios en todas las lesiones cutáneas, sin aparición de otras nuevas o de recaídas después del día 90 contado a partir de la fecha de inicio de tratamiento. Mientras que la falla terapéutica puede ser definida en cualquier momento del seguimiento después del tratamiento y hace referencia a la aparición de nuevas lesiones cutáneas en la valoración de final de tratamiento, o una disminución del área en menos de un 50% a la semana 8 de seguimiento, o una reepitelización incompleta y/o la presencia de endurecimiento, bordes elevados o enrojecimiento de la lesión después del día 90 (semana 13), o pacientes con recaídas (reactivación de las lesiones después de la cura inicial) [12,58,62,63]. Estas mismas definiciones han sido adoptadas para la práctica rutinaria de valoración de pacientes con LC por diferentes guías de manejo [1,9,40].

### ***La falla terapéutica***

Tras el surgimiento de las nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de las leishmaniasis una nueva problemática emergió casi en simultáneo: la falla terapéutica. Es importante aclarar que la falla terapéutica no es sinónimo de resistencia al medicamento (in vitro/ex vivo); la falla terapéutica va mucho más allá de la resistencia antimicrobiana, y responde a la interacción de múltiples determinantes que abarcan aspectos propios del huésped (estado nutricional, respuesta inmune, etc.), el parásito (especie, virulencia, carga...), el entorno (contaminación, barreras geográficas...) y el medicamento propiamente; mientras que la resistencia al medicamento hace referencia a la tolerancia del parásito frente a la exposición a las drogas independientemente de cual sea la respuesta clínica del paciente [64,65].

En la actualidad la falla terapéutica a los antileishmaniales representa un problema de salud pública a nivel global ya que limita el control de la enfermedad en las poblaciones, deteriora la calidad de vida de la población afectada, y favorece el incremento de los costos de atención de la enfermedad [66]. Para la región del pacífico colombiano, la incidencia de falla terapéutica se ha estimado entre un 9-22% y se han identificado factores de riesgo que incluyen la edad  $\leq 8$  años (OR 3,29 IC 95% 1,37–7,89), la duración de los síntomas menor o igual a 4 semanas (OR 2,85 IC 95% 1,29 – 6,28), la presencia de linfadenopatía regional pre-tratamiento (OR 2,72 IC95% 1,10 – 6,70), el estado nutricional deficiente y el tipo de tratamiento utilizado (OR 40,82 IC95% 2,45 – 677,85), [62]. Estudios similares latinoamericanos reportan otros factores asociados que incluyen tiempo de evolución  $\leq 5$  semanas (OR 4,39 IC95% 1,12 – 17,23), estadía en zona endémica  $\leq 72$  meses (OR 30,45 IC95% 2,38 – 389,25), número de lesiones cutáneas (OR 2,06 IC95% 1,30 – 3,28 por cada lesión adicional), especie parasitaria infectante (*Leishmania (Viannia) braziliensis* (OR 22,36 (1,89 – 262,96)), presencia de lesiones concomitantes distales (OR 30,5 IC95% 1,67–558,56), tratamiento irregular (OR 12,5 IC95% 2,1 -

75,4) entendido como pacientes que completaron solo un 20-90% de las dosis ordenadas o más de dos días consecutivos sin administrar el tratamiento, o demoras de más de 30 días en completar los esquemas, o aquellos con historia de tratamiento previo con antileishmaniales (OR 4,5 IC95% 1,1 - 17,5) [63,67,68].

### ***El papel de la respuesta inmune en la falla terapéutica***

Diferentes mecanismos se han descrito en el proceso fisiopatológico de la falla terapéutica. Por un lado, la resistencia intrínseca o adquirida del parásito a la droga es uno de los factores que puede influir de manera importante en el desenlace [45,69,70]; sin embargo, cada vez son más los factores inmunológicos y a nivel de cascadas de señalización que son descritos dentro de la gama de fenómenos que conducen a falla terapéutica.

De manera clásica, se ha descrito que la respuesta mediada por linfocitos T colaboradores tipo 1 (Th1) y tipo 2 (Th2), favorece resistencia o susceptibilidad natural a la infección. En el primer caso, las respuestas mediadas por linfocitos Th1 conducen a una expresión de IL-12, interferón gamma (IFN $\gamma$ ) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) que favorecen la eliminación de los parásitos a nivel intracelular promoviendo la cura. Contrariamente, los linfocitos Th2 que interactúan con el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) sobre-expresan IL-4, IL-5, IL-10, e IL-13, que conllevan a respuestas de tipo inhibitorio haciendo que el control inmunológico de las cargas parasitarias se torne inefectivo, y finalmente favoreciendo la cronicidad de la infección [71,72]. Estas interacciones a nivel molecular involucran cambios en la respuesta inmunitaria que favorecen la quimioatracción y/o la diferenciación de diferentes líneas celulares que podrían representarse en cambios evidenciables en los hemogramas.

En este sentido, estudios realizados en CIDEIM con macrófagos primarios de donantes sanos han encontrado que tras la infección por cepas de *L. panamensis* aisladas de pacientes con infecciones crónicas se aprecia un patrón consistente de regulación positiva para la producción de citoquinas quimioatrayentes de neutrófilos y de monocitos, que no se produce en macrófagos infectados por *L. panamensis* de pacientes con infecciones autocurativas, sugiriendo que las LCs crónicas están relacionadas con regulación al alta de factores quimioatrayentes de neutrófilos y monocitos [72]. Estudios con células mononucleares de sangre periférica encontraron que perfiles de expresión génica “amortiguadores” de la respuesta de monocitos y neutrófilos caracterizan la curación clínica después del tratamiento, apoyando la participación de la inflamación sostenida o las respuestas inmunes innatas desreguladas en el fracaso del tratamiento [28]. A la luz de estos hallazgos, podría existir algún grado de correlación entre las variaciones en el hemograma de

líneas celulares como los neutrófilos o los monocitos que se asocian a desenlaces terapéuticos diferenciales.

### ***Parámetros del hemograma y leishmaniasis***

En un estudio previo publicado en 2019 que incluyó 168 pacientes se evaluó el efecto de los antimonios pentavalentes en los parámetros del hemograma y algunos exámenes de bioquímica sanguínea, los resultados muestran una disminución estadísticamente significativa en las medias de los leucocitos (-1,440 cel/ml;  $p < 0.001$ ), neutrófilos (-860 cel/ml ;  $p < 0.001$ ), linfocitos (-520 cel/ml;  $p < 0.001$ ), recuento de plaquetas (-26,400 cel/ml ;  $p < 0.001$ ), hemoglobina (-0.16 g/dL /  $p < 0.001$ ) y nitrógeno ureico en sangre (-2.5 mg/dL ;  $p < 0.001$ ) al día 14 del tratamiento en comparación con los valores pre-tratamiento [37]. Así mismo, en una cohorte publicada por un grupo de investigación de la escuela de medicina de la Universidad de Dicle (Turquía), se analizaron las diferencias entre los parámetros del hemograma de pacientes con LC y los de población sana. Encontraron que, en los pacientes con la enfermedad, había elevaciones significativas en el promedio del ancho de distribución de plaquetas (+6.52% ;  $p < 0.001$ ), el ancho de distribución de glóbulos rojos (+2.46% ;  $p < 0.001$ ), la relación de neutrófilos / linfocitos (+0.57 ;  $p = 0.002$ ) y la relación de plaquetas / linfocitos (+59.37 ;  $p < 0.001$ ) en comparación con los sujetos sanos. Así mismo se observaron disminuciones significativas en los promedios de los recuentos de glóbulos blancos (-1,000 cel/uL  $p < 0.001$ ), linfocitos (-510 cel/uL  $p < 0.001$ ) y plaquetas (-22,000 cel/uL ;  $p = 0.018$ ) posterior al tratamiento [38].

Dentro de las limitantes de ambos estudios destacan su validez en el contexto de las leishmaniasis del nuevo mundo y la ausencia de información sobre el desenlace terapéutico de los pacientes. La generación de este tipo de conocimiento contribuirá al entendimiento del fenómeno de la falla terapéutica en los tratamientos antileishmaniales mediante la identificación de biomarcadores tempranos de falla, de fácil obtención por los profesionales de la salud, a bajo costo, y que contribuirán a un seguimiento más individualizado de los pacientes contrarrestando algunas de las limitantes geográficas, sociales y económicas que les impiden un seguimiento adecuado de su enfermedad.

## MARCO TEÓRICO

Esta sección se ha dividido en tres partes, primero se discuten los modelos explicativos de desenlace terapéutico en tratamientos antileishmaniales y su relación con el descubrimiento de biomarcadores; posteriormente, se aborda la utilidad de los biomarcadores para el seguimiento terapéutico y estrategias para su descubrimiento y validación, y finalmente, se aborda el estado teórico actual en el descubrimiento de biomarcadores en leishmaniasis y la potencial utilidad de los hemogramas como biomarcadores de falla terapéutica.

### ***Modelos explicativos de desenlace terapéutico en tratamientos antileishmaniales y su relación con el descubrimiento de biomarcadores***

En el proceso de identificación de un biomarcador se torna fundamental la comprensión del modelo teórico que mejor se adapta a la condición o enfermedad en estudio. Esta comprensión facilita entender la utilidad del biomarcador y su relación con los demás componentes del modelo explicativo [73].

Algunas cuestiones que surgen al estudiar la falla terapéutica en leishmaniasis incluyen ¿por qué personas que viven en la misma área, con las mismas formas de la enfermedad, infectados por las mismas especies de *Leishmania spp.* y tratados con el mismo régimen y dosis de medicamento, difieren en su respuesta al tratamiento? ¿Cuáles son los factores que pueden actuar como desencadenantes de falla terapéutica? ¿Es posible identificar de manera temprana aquellos pacientes que van a fallar al tratamiento? ¿Se pueden realizar intervenciones tempranas para modificar la respuesta al tratamiento?

Para responder a estas preguntas, clásicamente se ha propuesto que el desenlace terapéutico responde a la interacción de *la tríada huésped, patógeno, medicamento* [54,74], triada explicativa que se ha descrito no solo en leishmaniasis sino en otras enfermedades parasitarias como la malaria [75]. En este sentido, autores como Alicia Ponte-Sucre [64,66] describen la complejidad de las interacciones que se producen para favorecer desenlaces diferenciales como falla o cura terapéutica. Estas interacciones se pueden dar entre diferentes combinaciones de factores que incluyen:

- Factores intrínsecos del huésped que incluyen el sexo, la edad, variaciones en la respuesta inmune propios de cada individuo (Ej: híper o hipo estimulación de respuesta inflamatoria), estados de inmunosupresión (por medicamentos, patologías o desnutrición), alteraciones fisiológicas intrínsecas que favorecen la supervivencia de los parásitos, o incluso variaciones de la farmacocinética y la farmacodinamia secundarias a la diversidad genética entre individuos.
- Factores de los agentes infecciosos que pueden alterar el desenlace clínico e incluyen variaciones de la respuesta inducidas por diferentes especies de *Leishmania spp.*, reinfecciones, infecciones concomitantes con otros agentes (como Virus de la Inmunodeficiencia humana o Leishmania RNA virus) y la resistencia intrínseca o adquirida frente a los medicamentos que puede estar mediada por alteraciones genéticas, del proteoma y el metaboloma.
- Factores relacionados al medicamento como la exposición a regímenes terapéuticos subóptimos (mala adherencia) o medicamentos de mala calidad (falsificados, vencidos) que no ejercen adecuadamente sus mecanismos de acción.

A esta perspectiva de Ponte-Sucre se suman las consideraciones de Jean Claude Dujardin, quien plantea que la falla terapéutica no solamente se encuentra mediada por dicha triada, sino que existen además otros factores del entorno que pueden inducir modificaciones del epi-fenotipo de los parásitos y/o conllevar al desarrollo de la falla terapéutica a través de diferentes alteraciones [65].

Algunos de los ejemplos de Dujardin [65,66] incluyen: 1) factores ambientales como la contaminación por agentes químicos, que en el caso particular del arsénico han demostrado inducir tolerancia a los medicamentos en especies de *Leishmania spp* del viejo mundo [76]; 2) las migraciones humanas (producidas en muchos casos como consecuencia de inequidades económicas, sociales y políticas), que pueden favorecer la adaptación de especies parasitarias provenientes del entorno rural, selvático o lugares con alta incidencia de resistencia hacia regiones urbanas con poca prevalencia de la enfermedad, o que en algunos casos puede trascender incluso a otros continentes [64,66,77]. 3) La función de los humanos y algunos animales utilizados en agricultura, como reservorios de especies parasitarias intrínsecamente resistentes, y 4) El papel de los equipos de salud, quienes, en algunos casos no tienen un entrenamiento adecuado en el manejo de la enfermedad, retrasando el inicio de tratamientos antileishmaniales o realizan formulaciones a dosis subóptimas, entre otros.

Ante esta amplia gama de factores relacionados (ver figura 1), la construcción de un modelo teórico único que explique la falla terapéutica no es una tarea sencilla, y

como lo da a entender el mismo Dujardin, es importante replantear los modelos explicativos conforme se realizan nuevos descubrimientos [66].

Para Ponte-Sucre y Dujardin, una mejor comprensión de los factores que interactúan y determinan la falla terapéutica, estará ligada a una mayor capacidad en el descubrimiento de biomarcadores, que facilitarán el diagnóstico, tratamiento y seguimiento clínico de la enfermedad [65,66]. Dentro de las limitantes en el proceso de descubrimiento de biomarcadores estos autores resaltan la amplia variabilidad genética de las especies parasitarias, los altos costos de algunas de las técnicas requeridas, la falta de inversión en investigación, además de la baja disponibilidad de personal capacitado para desarrollar las técnicas de identificación en zonas endémicas. Si bien, se plantea que los biomarcadores más promisorios son aquellos relacionados con la identificación de variaciones en la respuesta inmune del huésped y los efectos de la interacción patógeno-hospedero (que a mediano plazo pueden verse favorecidos con el mejor desarrollo de las técnicas de secuenciación de genoma completo) [64–66], estos nuevos biomarcadores podrían seguir presentando varias de las limitantes que se describieron anteriormente.

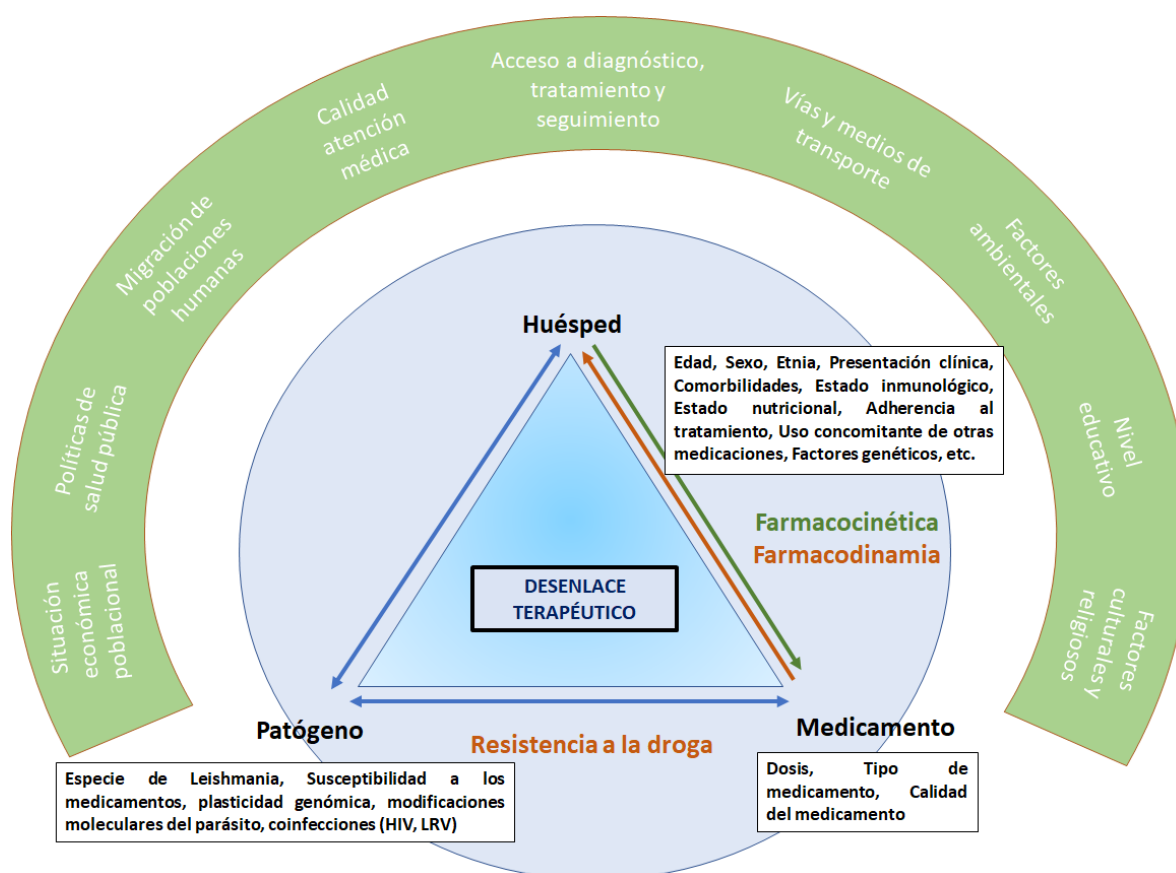


Figura 1. Interacciones en el desenlace terapéutico en tratamientos antileishmaniales. *HIV* (*Virus de la Inmunodeficiencia Humana*). *LRV* (*Leishmania RNA virus*). Modificada de: Castro MdM [54].

## ***Utilidad de los biomarcadores para el seguimiento terapéutico y estrategias para su descubrimiento y validación***

Los biomarcadores son parámetros medibles que sirven como indicadores de procesos biológicos normales, patológicos, o respuestas farmacológicas a intervenciones terapéuticas [78,79]. Estos pueden clasificarse en tres tipos, biomarcadores de exposición (sustancias exógenas, o sus metabolitos, o el producto de una interacción entre un agente xenobiótico y alguna molécula o célula diana, que pueden ser medidos en un compartimento dentro de un organismo), biomarcadores de susceptibilidad (indicadores de la capacidad inherente o adquirida de un organismo para responder a la exposición a un xenobiótico específico) y biomarcadores de efecto (alteraciones bioquímicas, fisiológicas, de comportamiento o de otro tipo mensurables dentro de un organismo que, dependiendo de la magnitud, pueden reconocerse como asociadas con una enfermedad o un deterioro de la salud establecido o posible) [80].

Múltiples aplicaciones han sido descritas en torno al descubrimiento de biomarcadores [73,80]. En el campo de la terapéutica se sabe que pueden favorecer el desarrollo de drogas y vacunas, seleccionar y optimizar esquemas de dosificación de medicamentos, además de identificar combinaciones de fármacos con interacciones aditivas o sinérgicas [81]. En el seguimiento terapéutico de enfermedades como la tuberculosis, la identificación de biomarcadores ha sido de utilidad para identificar tempranamente pacientes con mayor probabilidad de falla terapéutica, planteando una posible utilidad de este tipo de herramientas durante las fases tempranas del seguimiento terapéutico, al favorecer intervenciones que disminuyan el riesgo de desenlaces negativos en estos pacientes [82,83].

Se ha propuesto que un esquema general de descubrimiento y validación de biomarcadores se divide en 5 grandes fases (ver figura 2). Este proyecto de tesis se enfocará en los procesos de descubrimiento, calificación y verificación

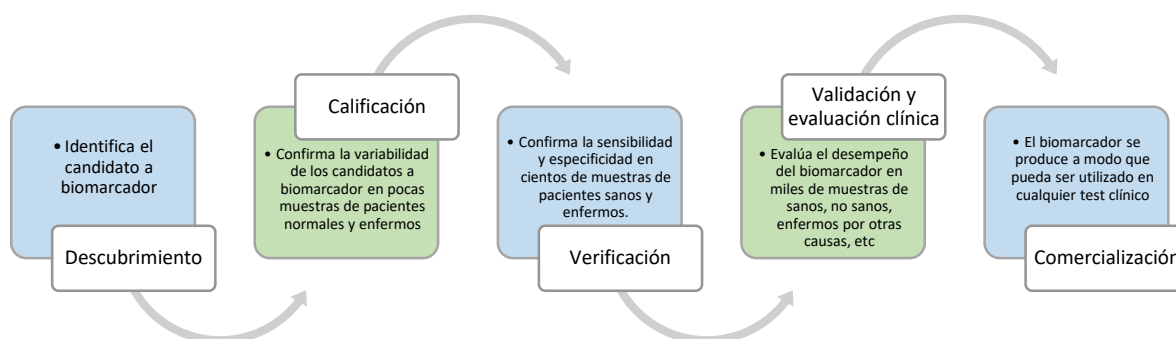


Figura 2. Fases de desarrollo y validación de un biomarcador para una enfermedad.  
Modificada de Rifai 2006 [84].



### ***Estado teórico actual en el descubrimiento de biomarcadores en leishmaniasis y potencial utilidad de los hemogramas como biomarcadores de falla terapéutica***

Como se ha descrito anteriormente el descubrimiento de biomarcadores acarrea problemáticas distintivas para las leishmaniasis [27]. Por ejemplo, aunque durante el seguimiento de las leishmaniasis viscerales del viejo mundo se ha identificado que la producción de anticuerpos IgG1 anti-*Leishmania* es un buen predictor de recaídas [85], este tipo de anticuerpos no han demostrado utilidad como biomarcadores tempranos de cura en el caso de las LCs [86]. Igualmente, en el contexto de la leishmaniasis visceral, la normalización de los hemogramas (como un indicador de la recuperación de las funciones de la médula ósea) ha sido propuesta como biomarcador de cura. Para el caso de la LC los indicadores de respuesta se centran en el análisis de características clínicas de la lesión, y a la fecha no existen marcadores paraclínicos ampliamente disponibles que sean útiles para el seguimiento de la enfermedad y la respuesta al tratamiento; sumado al hecho de que la mayoría de los sustitutos que podrían tener utilidad, si bien se centran en la medición de parámetros inmunológicos, requieren del uso de técnicas y equipos complejos que no están disponibles en la práctica clínica rutinaria [27].

Complementariamente, el uso métodos moleculares como la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real se ha utilizado para la identificación de genes de resistencia de manera temprana en un intento por identificar biomarcadores relacionados con el patógeno; sin embargo, estos intentos han tenido limitaciones debido a que los parásitos de *Leishmania spp.* poseen característica intrínseca conocida como “*los múltiples caminos a la resistencia a los medicamentos*”, la cual consiste en que el patógeno presenta innumerables polimorfismos de nucleótido único que pueden afectar la funcionalidad de diferentes genes, o en varias ocasiones delecciones completas de su material genético, haciendo que encontrar un ensayo molecular capaz de detectar todo tipo de alteraciones moleculares relacionadas al patógeno sea improbable [66,87].

A la luz de estos hallazgos, y teniendo en cuenta que la respuesta inmunológica tiene una relación directa con los desenlaces terapéuticos [28,72], se plantea que tal vez la mejor alternativa en la búsqueda de biomarcadores sea a través de la caracterización de las variaciones inmunológicas que favorecen desenlaces terapéuticos diferenciales, buscando además que puedan ser medidas a través de test clínicos y/o moleculares de fácil aplicación en laboratorios de baja complejidad, garantizando el acceso de las poblaciones mayormente afectadas por las LCs [66].

Clásicamente, se ha propuesto que el hemograma puede servir como un indicador indirecto de la respuesta inmunológica en tiempo real. Algunos autores exponen que las variaciones en los conteos celulares pueden ser subrogados de alteraciones orgánicas como cáncer, infecciones o patologías crónicas, que se producen como una respuesta a cambios en los perfiles inmunofenotípicos del microambiente

celular [88]. En el contexto de las LCs, revisiones sistemáticas como la de Anke E. Kip [27] han encontrado reportadas diferentes alteraciones de la inmunidad celular, especialmente relacionadas con la respuesta de macrófagos, las cuales parecen ser promisorias para la predicción de desenlaces terapéuticos, mostrando potencial en el estudio de las células inmunológicas como biomarcadores tempranos de falla. Sin embargo, prácticamente el total de estos biomarcadores requieren de métodos complejos y /o equipos poco disponibles para lograr la cuantificación o identificación de dichos biomarcadores, los cuales en general corresponden a citoquinas, proteínas y/o metabolitos.

El potencial de la identificación de biomarcadores al analizar las variaciones en la respuesta inmune responde al hecho de que el amastigote de *Leishmania spp.* existe y prolifera en el sistema fagocítico mononuclear, generando modificaciones de las células de este sistema, con subsecuentes alteraciones en los órganos portadores de fagocitos, que finalmente se expresarán en manifestaciones hematológicas diversas, algunas de las cuales podrían detectarse en el hemograma [89].

A estas observaciones se suman los hallazgos de algunos de los estudios realizados en CIDEIM, en los cuales mediante experimentos *in vitro* y *ex vivo* se ha encontrado que la regulación positiva de neutrófilos y monocitos, los cambios inflamatorios sostenidos, y las respuestas inmunes innatas desreguladas podrían asociarse con mayor probabilidad de cuadros crónicos o falla terapéutica [28,72]. Parece razonable pensar que dichas variaciones en el inmunofenotipo podrían reflejarse en alteraciones de los conteos celulares en el hemograma.

Esta hipótesis se soporta además por observaciones recientes en las que se confirmaron que existen variaciones de los recuentos celulares pre y post-tratamiento con antimoniales [90], sugiriendo que la farmacocinética intracelular y plasmática podría favorecer cambios en el microambiente celular que conllevan a modificaciones en las tasas de recambio inmunológico que se manifiesten en los conteos del hemograma. Aunque esta hipótesis podría resultar intuitiva, no se encontraron descripciones que relacionen los desenlaces terapéuticos de los antileishmaniales con parámetros específicos del hemograma (estrategia de búsqueda resumida en Anexo 1).

Se propone que los parámetros del hemograma podrían ser utilidad como biomarcadores tempranos de desenlace terapéutico, y conferirían ventajas adicionales como ser herramientas de fácil acceso, bajo costo y fácilmente medibles durante el seguimiento clínico de pacientes con LC, contribuyendo a contrarrestar algunas de las barreras que impiden un seguimiento óptimo de los tratamientos.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general**

Identificar parámetros del hemograma pre y post tratamiento con utilidad como biomarcadores tempranos de desenlace terapéutico en pacientes con leishmaniasis cutánea en el centro y el suroccidente colombiano entre el 2007 y el 2020.

### **Objetivos específicos**

1. Estimar la incidencia de falla terapéutica en pacientes con leishmaniasis cutánea tratados con antileishmaniales en el centro y suroccidente colombiano entre el 2007 y el 2020.

Indicadores: Incidencia de cura y falla en la población de estudio, estimada.

2. Identificar parámetros del hemograma con capacidad explicativa de la variabilidad entre grupos clínicos.

Indicadores: Capacidad explicativa de variabilidad de parámetros del hemograma entre grupos, calculada.

3. Describir las diferencias entre los pacientes con cura y falla terapéutica respecto a los parámetros del hemograma seleccionados y las características clínicas y paraclínicas.

Indicador: Medidas de frecuencia y tendencia central de parámetros del hemograma, características clínicas y paraclínicas entre pacientes con cura y falla terapéutica, descritas.

4. Evaluar la asociación entre parámetros del hemograma pre y postratamiento y el desenlace clínico de falla terapéutica en la población de estudio

Indicadores: Medidas de asociación ajustadas entre parámetros del hemograma y falla terapéutica, calculadas

## **METODOLOGÍA**

### ***Tipo de estudio***

Para identificar los parámetros del hemograma pre y post tratamiento con potencial utilidad como biomarcadores tempranos de desenlace terapéutico en pacientes con LC del centro y suroccidente colombiano, se realizó un estudio de cohorte retrospectiva utilizando información secundaria obtenida de las historias clínicas y bases de datos de estudios previos realizados en adultos y niños con diagnóstico de LC en el CIDEIM entre 2007 y 2020. El estudio es de cohortes porque el investigador no realiza ninguna intervención (estudio observacional) y se realizó seguimiento a los participantes para evaluar la respuesta terapéutica. El seguimiento se realizó en los siguientes tiempos:

- Pre-tratamiento: evaluaciones médicas antes del inicio del tratamiento, incluida la toma de hemograma.
- Post-tratamiento: evaluación realizada al finalizar el tratamiento (día 21 +7/-3 días después del inicio de tratamiento con Glucantime®, o día 28 +7/-3 días después del inicio de tratamiento con Miltefosine), incluida la toma del hemograma.
- Semana 8 (Día 42-63 desde el inicio de tratamiento)
- Semana 13 (día 90 ± 14 días desde el inicio de tratamiento)
- Semana 26 (día 180 ± 14 días desde el inicio de tratamiento)
- Última visita que se haya recolectado del paciente después de finalizar tratamiento.
- Visita adicional: incluye otras visitas no contempladas en el protocolo de los estudios originales pero que fueron realizadas por los pacientes por motivos clínicos de fuerza mayor (Ej. signos de falla terapéutica, o la incapacidad para haber asistido a uno de los controles programados originalmente en el estudio). En los casos en que ocurrió más de una visita adicional, se tomó como visita adicional la última valoración de este tipo realizada.

### ***Área de estudio***

Los estudios a partir de los cuales se extrajeron los datos de los participantes que fueron incluidos en esta investigación se realizaron en tres ciudades de Colombia (Cali, Tumaco y Chaparral) entre los años 2007 y 2020.

Cali es la capital del departamento del Valle del Cauca ubicada en el suroccidente colombiano y tiene una superficie total de 560.3 Km<sup>2</sup>. Está organizada en 22 comunas en el área urbana y 15 corregimientos en el área rural [91,92]. En esta ciudad se encuentra la sede principal de CIDEIM, un centro de investigación en enfermedades infecciosas con más de 50 años de experiencia en investigación y atención de pacientes con enfermedades tropicales, actualmente reconocido como

centro colaborador de la Organización Mundial de la Salud en leishmaniasis y centro de referencia para la atención de estos pacientes en la región pacífica [54,93].

Tumaco es un municipio del departamento de Nariño que se localiza sobre la costa pacífica, es reconocido por ser un área endémica para la transmisión de LC presentando una de las incidencias más altas a nivel nacional (20,6 casos nuevos por cada 100.000 habitantes para el año 2019 [49]), en este sitio se ubica otra de las sedes de CIDEIM que ha contribuido históricamente en el enrolamiento de pacientes con la enfermedad a diferentes estudios clínicos. Finalmente, Chaparral es un municipio del departamento del Tolima ubicado en la región andina, donde entre el año 2003 y 2007 se presentó un brote de leishmaniasis que requirió intervención por los organismos de vigilancia en colaboración con CIDEIM, permitiendo la conducción de una investigación [54,94]. Posteriormente, en esta misma región geográfica, entre el año 2007 y 2009 se realizó un ensayo clínico de no inferioridad de Miltefosine vs Glucantime® que avaló su uso como alternativa terapéutica para el manejo de las leishmaniasis en niños [54,58].

## ***Población y muestra***

### *Población de estudio*

La población de estudio corresponde a los adultos y niños con LC que participaron en estudios clínicos de CIDEIM entre los años 2007 - 2020 y de quienes se tiene disponibilidad de datos sobre las variables de interés para este estudio.

### *Criterios de inclusión*

Se incluyeron los registros de todos los pacientes que cumplieran las siguientes características:

- Confirmación parasitológica de LC
- Tratamiento antileishmanial sistémico con adherencia a tratamiento >90%. Adherencia definida como días de tratamiento ordenados sobre recibidos y/o número de ampollas ordenadas sobre número de ampollas administradas para Glucantime® y número de capsulas ordenadas sobre administradas Miltefosine.
- Al menos un hemograma pretratamiento (hasta - 30 días) o postratamiento: día 20 (hasta +7/-3 días) para Glucantime®, o 28 (hasta + 7/-3 días) para Miltefosine)
- Disponibilidad de información sobre respuesta terapéutica
- Haber participado en estudios de CIDEIM entre enero 2007 y diciembre de 2020
- Pacientes que, en el consentimiento informado escrito, autorizaron el uso de datos en estudios futuros.

### *Criterios de Exclusión:*

Se excluyeron los registros de pacientes con las siguientes características:

- Leishmaniasis mucosa, visceral, difusa o diseminada
- Participantes con enfermedades o tratamientos inmunosupresores

### *Cálculo del tamaño muestral*

Ya que no se encontraron estudios que reporten medidas de asociación entre los parámetros del hemograma y los desenlaces terapéuticos con antileishmaniales, no es posible establecer un tamaño muestral para una medida de asociación como un riesgo relativo con base en estimados de estudios previos [95]. Para el propósito de este estudio, se proyectaron diferentes tamaños de muestra que podían ser alcanzados de acuerdo con las tasas de enrolamiento conocidas en CIDEIM. A partir de estos tamaños se calculó el poder estadístico para este estudio en dos escenarios (“desfavorable” y “favorable”) teniendo en cuenta el número de pacientes potencialmente incluidos.

Anualmente en CIDEIM se enrolan entre 30-40 pacientes con LC a los diferentes estudios clínicos, por lo que para un periodo de 14 años se esperaba un enrolamiento aproximado de al menos 525 pacientes históricos. Ya que el hemograma no es un examen rutinario para todos los pacientes, sino que habitualmente solo se indica en pacientes mayores de 45 años, y teniendo presente que la mediana de la edad en los pacientes de los últimos dos años ha sido de 42 años (datos no publicados); el primer cálculo sugeriría que menos de un 50% de los pacientes tendría datos sobre el hemograma y por lo tanto sería elegible para el estudio. Sin embargo, se conoce que en CIDEIM se han realizado estudios de farmacocinética de los antileishmaniales (que incluyen poblaciones de diferentes grupos etarios), así como ensayos clínicos en población infantil, cohortes en población infantil y adulta, además de algunos estudios de fármaco-metabolómica (que incluyen niños y adultos), en los cuales se espera encontrar un porcentaje importante de pacientes a los que también se les haya tomado hemograma rutinario y/o según los protocolos de los estudios, por lo que se asumió que al menos un 60% de los pacientes tendría datos de hemograma.

Así mismo, para realizar los cálculos se tuvo en cuenta el hecho de que, en los pacientes de estudios de los últimos tres años, en más del 90% de los casos se conocía el desenlace terapéutico, y más de un 95% han autorizado el uso de sus datos para estudios futuros. Para las estimaciones del poder estadístico, se esperaba una incidencia de falla terapéutica entre el 9 y 22% según un artículo de CIDEIM que analizó los datos de diferentes estudios realizados entre 2007 y 2013 [54,62].

En un escenario “desfavorable”, se esperó que, de un total aproximado de 525 participantes históricos, el 50% tendrían datos del hemograma, lo que correspondería a 262 participantes elegibles, de estos el 20% no se conocería desenlace terapéutico, dejando 210 participantes, y de estos, si se toma el supuesto de que el 95% autorizarán el uso de sus datos en estudios futuros, se obtendría un tamaño muestral de 200 participantes. En un escenario “favorable”, se identificarían 600 pacientes históricos, de los cuales el 60% tendrían datos de hemograma (360 participantes), un 90% tendrían desenlace definido (324 participantes), y el 95% habría autorizado el uso de sus datos para estudios futuros logrando un total de 307 participantes.

Los cálculos de poder para  $n=200$  (Figura 3) y  $n=300$  (Figura 4) se realizaron utilizando el software STATA 16.0 con el comando *power*. Se estimó el poder para dos proporciones teniendo en cuenta diferentes incidencias de falla terapéutica en el rango entre 9 y 22%, diferentes razones entre no expuestos y expuestos (1:1, 3:1 y 5:1), y diferentes riesgos relativos (1,5; 2; y 2,5) entre las variables de exposición y desenlace.

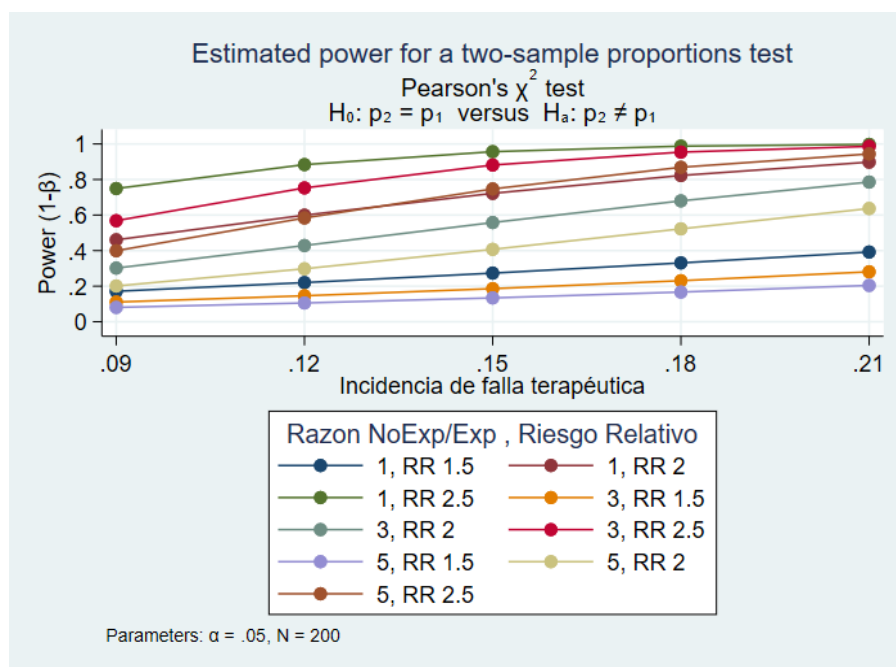


Figura 3. Poder alcanzado con un tamaño de 200 participantes según la razón No expuesto/Expuesto, la incidencia de falla, y la fuerza de asociación obtenida. Comando STATA: *power twoproportions (0.09(0.03)0.22), n(200) nratio(1(2)5) risk (1.5(0.5)2.5) graph*

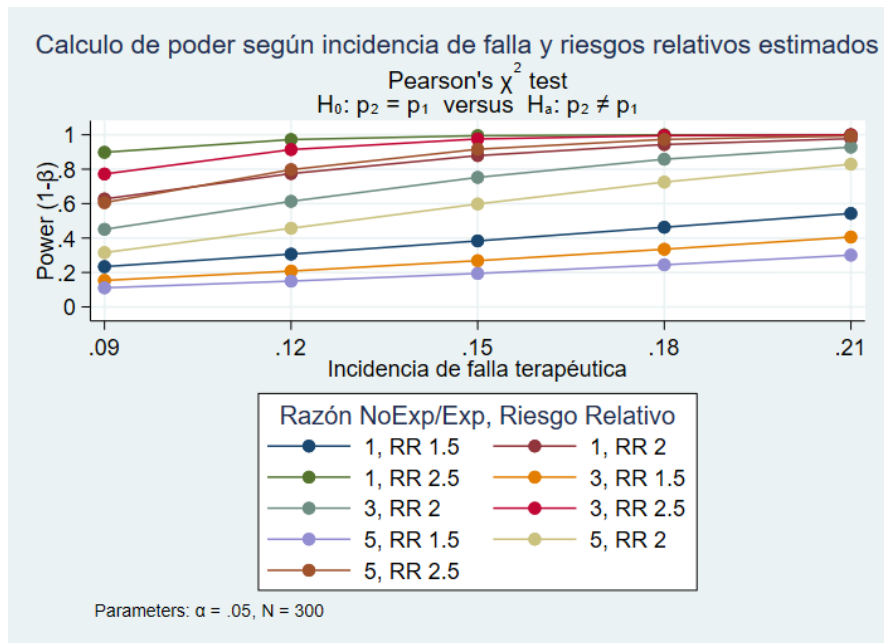


Figura 4. Poder alcanzado con un tamaño de 300 participantes según la razón de No expuesto/Expuesto, la incidencia de falla, y la fuerza de asociación obtenida. Comando STATA: *power twoproportions (0.09(0.03)0.22), n(300) nratio(1(2)5) rrisk (1.5(0.5)2.5) graph*

Se estimó entonces que un tamaño de muestra de 200 participantes alcanza un poder estadístico del 80% o mayor para identificar factores con riesgos relativos (RR) superiores o iguales a 2.35, con una incidencia de falla terapéutica del 15% o más y una razón de no expuestos / expuestos de 3 a 1 o inferiores.

## Variables

Variable dependiente (resultado): se consideró como variable resultado el desenlace terapéutico (“*Estado final*”) definido por el médico en los estudios clínicos originales en los que participaron los pacientes, se plantearon dos posibles resultados que corresponden a cura o falla terapéutica (Tabla 1).

Las variables de exposición son los parámetros del hemograma antes y después del tratamiento, los cuales incluyen:

- 1) Conteos absolutos y porcentajes de líneas celulares (plaquetas, glóbulos rojos y leucocitos (normoblastos, neutrófilos, linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, granulocitos inmaduros)).
- 2) Mediciones de cuantificación de hematocrito (Hto) y hemoglobina (Hb).
- 3) Razones de dos linajes celulares utilizando los valores de conteo absoluto estimados en cada momento del seguimiento. Estos índices buscaban explorar si las diferencias en la distribución de diferentes líneas celulares del



hemograma podría impactar en el desenlace, algunos índices exploran solamente las relaciones entre diferentes células involucradas en la respuesta inmune innata (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, y granulocitos inmaduros), mientras que otros índices buscan explorar la relación entre células de la inmunidad innata (eosinófilos, neutrófilos, basófilos, granulocitos inmaduros) con células de la inmunidad adquirida (linfocitos) como un subrogado del “balance inmunológico”. Se analizaron: el índice neutrófilos/linfocitos, eosinófilos/linfocitos, basófilos/linfocitos, monocitos/linfocitos, neutrófilos/basófilos, neutrófilos/ monocitos, eosinófilos/monocitos, basófilos/monocitos, granulocitos inmaduros / linfocitos, neutrófilos / granulocitos inmaduros, eosinófilos / granulocitos inmaduros, basófilos / granulocitos inmaduros, y un índice compuesto: (neutrófilos + eosinófilos + basófilos + monocitos + granulocitos inmaduros) / linfocitos.

4) Razones (“deltas”) de la variación de cada línea celular e índice obtenidos al dividir el valor absoluto de cada línea postratamiento entre el valor absoluto pretratamiento.

Las co-variables incluyeron: 1) Datos sociodemográficos (edad, sexo, etnia). 2) Datos clínicos (Peso, talla, índice de masa corporal, tiempo de evolución de la leishmaniasis, presencia de comorbilidades, número de comorbilidades, presencia de infección concomitante, historia previa de leishmaniasis, número de lesiones, tipo de lesión, presencia de linfadenopatía regional, adherencia al tratamiento, tipo de tratamiento, respuesta evaluada en visitas médicas adicionales. y 3) Especies parasitarias.

Tabla 1. Variables de estudio.				
Variable	Definición operacional	Tipo de variable	Valores posibles	Momentos de la recolección
Estudio previo	Estudio previo en el que participó el paciente	Cualitativa nominal	WT = “Wellcome trust”  GT = Ganancia terapéutica”  TMRC = “Tropical Medicine Research Centers”  MT = “Metabolismo y transporte”  PK = Farmacocinética de Miltefosine”	Pre diligenciamiento del CRF
Código estudio previo	Código del participante en el estudio previo	Cualitativa nominal	...	Pre diligenciamiento del CRF
Fecha	Fecha de cada consulta realizada	Cuantitativa	DIA/MES/AÑO	Pre-tratamiento

		Continua	01/01/1900 = No dato	Post-tratamiento Semana 8 Semana 13 Semana 26
Visita realizada	Visita de interés realizada	Cualitativa Nominal	0 = No 1 = Si 8 = No dato	Pre-tratamiento Post-tratamiento Semana 8 Semana 13 Semana 26
Edad	Edad cumplida en años de los pacientes en la primera valoración médica	Cuantitativa Continua	0; 0,1; 0,2... n años	Pre-tratamiento
Sexo	Sexo del paciente	Cualitativa Nominal	1 = Masculino 2 = Femenino 8 = No dato 9 = No aplica	Pre-tratamiento
Etnia	Pertenencia étnica según autopercepción del paciente	Cualitativa Nominal	1 = Afrocolombiana 2 = Indígena 3 = Mestiza 4 = Blanca 10 = Otra 8 = No dato 9 = No aplica	Pre-tratamiento
Infección concomitante	Reporte en historia clínica en sección de revisión por sistemas y/o diagnósticos, o como reporte de evento adverso del estudio refiriendo infecciones concomitantes agudas o crónicas en cualquier sistema	Cualitativa Nominal	0 = No 1 = Si 8 = No dato	Pre-tratamiento Post-tratamiento
Comorbilidades	Presencia de comorbilidades crónicas	Cualitativa Nominal	0 = No 1 = Si 8 = No dato	Pre-tratamiento
Número de comorbilidades	Número de comorbilidades crónicas	Cuantitativa Discreta	0; 1; 2; ... n	Pre-tratamiento
Tipo de comorbilidad	Se define según el sistema principalmente afectado por cada comorbilidad. En comorbilidad cardiovascular se incluyen hipertensión, insuficiencia cardíaca, hipertensión pulmonar, antecedente de cardiopatía isquémica, anginas y/o arritmias. En enfermedad respiratoria se incluyen asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, enfermedad pulmonar intersticial difusa y	Cualitativa Nominal	Cardiovascular 0 = No 1 = Si 8 = No dato	Pre-tratamiento

	<p>otras neuropatías. En enfermedad gastrointestinal se incluyen las gastritis, colitis, colon irritable, trastornos de malabsorción, diarreas crónicas, enfermedad celiaca. En enfermedad endocrina se incluyen hipotiroidismo, trastornos hipotalámicos, hipofisarios, tiroideos, suprarrenales, de ovarios o de testículo. En enfermedad neurológica se incluyeron alteraciones del movimiento, epilepsias, secuelas neurológicas de accidentes cerebrovasculares. En otros se incluyeron las enfermedades no clasificadas en los anteriores grupos, las principales encontradas en el estudio fueron rinitis alérgica y dislipidemias.</p>		<p>Respiratoria</p> <p>0 = No</p> <p>1 = Si</p> <p>8 = No dato</p> <p>Gastrointestinal</p> <p>0 = No</p> <p>1 = Si</p> <p>8 = No dato</p> <p>Endocrina</p> <p>0 = No</p> <p>1 = Si</p> <p>8 = No dato</p> <p>Neurológica</p> <p>0 = No</p> <p>1 = Si</p> <p>8 = No dato</p> <p>Otra</p> <p>0 = No</p> <p>1 = Si</p> <p>8 = No dato</p>	
Historia de leishmaniasis	Antecedente de leishmaniasis tratada o no tratada	Cualitativa Nominal	<p>0 = No</p> <p>1 = Si</p> <p>8 = No dato</p>	Pre-tratamiento
Tiempo de sintomatología	Tiempo en semanas desde el inicio de los síntomas hasta la primera valoración clínica	Cuantitativa Discreta	1; 2; ... n	Pre-tratamiento
Peso	Peso en kilogramos en la primera valoración médica	Cuantitativa Continua	2, 3, 4... n Kg	Pre-tratamiento
Talla	Talla en centímetros en la primera valoración médica	Cuantitativa Continua	50, 51, 52... n cm	Pre-tratamiento
Índice de masa corporal	Índice de masa corporal obtenido de dividir el peso en kilogramos sobre la talla al cuadrado	Cuantitativa Continua	14, 15, ... n	Pre-tratamiento

Categorías según índice de masa corporal	Categorías de clasificación según el índice de masa corporal	Cualitativa nominal	0 = Normal (IMC entre 18 y 25)  1 = Peso bajo (IMC <18)  2= Sobrepeso (IMC >25 y hasta 30)  3 Obesidad grado I (IMC >30 y hasta 35)  4 Obesidad grado II (IMC > 35)  888= No dato	Pre-tratamiento
Número de lesiones	Conteo de lesiones en valoración inicial	Cuantitativa Discreta	1; 2; ... n	Pre-tratamiento  Post-tratamiento
Tipo de lesión	Tipo de lesión en aquella clasificada como la lesión número uno	Cualitativa nominal	1 = Úlcera  2 = Nódulo  3 = Pápula  4 = Placa  5 = Cicatriz con borde activo  6 = Otra  7 = Cicatriz  8 = No dato  9 = No aplica	Pre-tratamiento  Post-tratamiento
Linfadenopatía regional	Presencia de linfadenopatía regional pretratamiento y/o postratamiento	Cualitativa Nominal	0 = No  1 = Si  8 = NO DATO  9 = NO APLICA	Pre-tratamiento  Post-tratamiento
Tratamiento prescrito	Tratamiento prescrito	Cualitativa Nominal	1 = Glucantime ®  2 = Miltefosine  3 = Glucantime ® + Pentoxifilina  8 = No dato  9 = No aplica	Pre-tratamiento
Posología de Glucantime ® prescrita	Prescripción de Glucantime ® en mililitros por día	Cuantitativa Continua	5,6,7... 25 ml  888= No dato  999= No aplica	Pre-tratamiento

Posología de Miltefosine prescrita	Prescripción de Miltefosine en miligramos por día	Cuantitativa Continua	5, 6,7... n mg 888= No dato 999= No aplica	Pre-tratamiento
Días de tratamiento ordenados	Días de tratamiento prescritos	Cuantitativa Discreta	1; 2; ... n 888= No dato	Pre-tratamiento
Total de ampollas ordenadas	Total de ampollas de Glucantime ® ordenadas	Cuantitativa discreta	1,2,3,4 o 5 amp 888= No dato 999= No aplica	Pre-tratamiento
Total de cápsulas de 50 mg ordenadas	Total de capsulas de Miltefosine de 50 mg ordenadas	Cuantitativa discreta	1, 2, 3, 4 cap 888= No dato 999= No aplica	Pre-tratamiento
Total de capsulas de 10 mg ordenadas	Total de cápsulas de Miltefosine de 10 mg ordenadas	Cuantitativa discreta	1, 2, 3, 4 ... n cap 888= No dato 999= No aplica	Pre-tratamiento
Dosis de Glucantime ®	Dosis medida en miligramos por kilogramo formulados para cada día de tratamiento. Se obtuvo de multiplicar los mililitros de Glucantime ® formulados cada día (Posología de Glucantime ® prescrita) por 81 mg, y dividir el producto entre el peso del paciente (Peso).	Cuantitativa Continua	1, 2, 3, 4... 25 mg/kg 888= No dato 999= No aplica	Calculada Pre-tratamiento
Dosis de Miltefosine	Dosis medida en miligramos por kilogramo formulados para cada día de tratamiento. Se obtuvo de dividir los miligramos de Miltefosine prescritos para cada día (posología de Miltefosine prescrita) entre el peso del paciente (Peso).	Cuantitativa Continua	0,5; 1; 1,5; 2, ... 4 mg/kg 888= No dato 999= No aplica	Calculada Pre-tratamiento
Rango terapéutico de Glucantime ®	Definido como óptimo si se encuentra entre 10 y 20 mg/kg día. Infradosis < 10 mg. Supradosis si se encuentra > 20 mg.	Cualitativa Nominal	0 = Normodosis (10-20 mg/kg) 1 = Infradosis (< 10 mg/kg) 2= Supradosis (> 20 mg/kg)	Calculada Pre-tratamiento
Rango terapéutico de Miltefosine	Definido como óptimo si se encuentra entre 1,5 y 2,5 mg/kg día. Infradosis < 1,5 mg. Supradosis si se encuentra > 2,5 mg.	Cualitativa Nominal	0 = Normodosis: Entre 1,5-2,5 mg/kg 1 = Infradosis (< 1,5 mg/kg) 2= Supradosis (> 2,5 mg/kg)	Calculada Pre-tratamiento
Rango terapéutico de medicamento antileishmanial	Variable unificada incluyendo la clasificación del rango terapéutico definida según la dosis del medicamento antileishmanial que se formuló a cada paciente, independientemente de cuál fue el que se formuló. Se obtiene de unir las variables Rango terapéutico de	Cualitativa Nominal	0 = Normodosis 1 = Infradosis 2= Supradosis	Calculada Pre-tratamiento

Glucantime® y Rango terapéutico de Miltefosine				
Leucocitos	Conteo de leucocitos por unidad de volumen de sangre	Cuantitativa discreta	0; 0,1; 0,2... n x 103/μL	Pre-tratamiento
				Post-tratamiento
Normoblastos	Conteo de normoblastos por unidad de volumen de sangre	Cuantitativa discreta	0; 0,1; 0,2... n x 103/μL	Pre-tratamiento
				Post-tratamiento
Neutrófilos	Conteo de neutrófilos por unidad de volumen de sangre	Cuantitativa discreta	0; 0,1; 0,2... n x 103/μL	Pre-tratamiento
				Post-tratamiento
Linfocitos	Conteo de linfocitos por unidad de volumen de sangre	Cuantitativa discreta	0; 0,1; 0,2... n x 103/μL	Pre-tratamiento
				Post-tratamiento
Monocitos	Conteo de monocitos por unidad de volumen de sangre	Cuantitativa discreta	0; 0,1; 0,2... n x 103/μL	Pre-tratamiento
				Post-tratamiento
Eosinófilos	Conteo de eosinófilos por unidad de volumen de sangre	Cuantitativa discreta	0; 0,1; 0,2... n x 103/μL	Pre-tratamiento
				Post-tratamiento
Basófilos	Conteo de basófilos por unidad de volumen de sangre	Cuantitativa discreta	0; 0,1; 0,2... n x 103/μL	Pre-tratamiento
				Post-tratamiento
Granulocitos inmaduros	Conteo de granulocitos inmaduros por unidad de volumen de sangre	Cuantitativa discreta	0; 0,1; 0,2... n x 103/μL	Pre-tratamiento
				Post-tratamiento
Glóbulos rojos	Conteo de glóbulos rojos por unidad de volumen de sangre	Cuantitativa discreta	0; 0,1; 0,2... n x 106/μL	Pre-tratamiento
				Post-tratamiento
Hemoglobina	Concentración de hemoglobina por unidad de volumen de sangre	Cuantitativa Continua	0; 0,1; 0,2... gramos x dL	Pre-tratamiento
				Post-tratamiento
Hematocrito	Volumen de glóbulos con relación al total de la sangre expresado en porcentaje	Cuantitativa Continua	0; 0,1; 0,2... n %	Pre-tratamiento
				Post-tratamiento
Plaquetas	Conteo de plaquetas por unidad de volumen de sangre	Cuantitativa discreta	0; 0,1; 0,2... n x 103/μL	Pre-tratamiento
				Post-tratamiento
Relación neutrófilos-leucocitos	Razón entre neutrófilos y leucocitos	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/μL	Construida en el análisis para los momentos pre-tratamiento y post-tratamiento
Relación neutrófilos-linfocitos	Razón entre neutrófilos y linfocitos	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/μL	Construida en el análisis para los momentos pre-tratamiento y post-tratamiento
Relación eosinófilos-linfocitos	Razón entre eosinófilos y linfocitos	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/μL	Construida en el análisis para los momentos pre-tratamiento y post-tratamiento
Relación basófilos - linfocitos	Razón entre basófilos y linfocitos	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/μL	Construida en el análisis para los momentos pre-

Relación monocitos-linfocitos	Razón entre monocitos y linfocitos	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	tratamiento y post-tratamiento Construida en el análisis para los momentos pre-tratamiento y post-tratamiento
Relación neutrófilos - basófilos	Razón entre neutrófilos y basófilos	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis para los momentos pre-tratamiento y post-tratamiento
Relación eosinófilos-monocitos	Razón entre eosinófilos y monocitos	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis para los momentos pre-tratamiento y post-tratamiento
Relación neutrófilos-monocitos	Razón entre neutrófilos y monocitos	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis para los momentos pre-tratamiento y post-tratamiento
Relación basófilos - monocitos	Razón entre basófilos y monocitos	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis para los momentos pre-tratamiento y post-tratamiento
Relación eosinófilos - monocitos	Razón entre eosinófilos y monocitos	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis para los momentos pre-tratamiento y post-tratamiento
Relación eosinófilos - neutrófilos	Razón entre eosinófilos y neutrófilos	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis para los momentos pre-tratamiento y post-tratamiento
Relación eosinófilos - basófilos	Razón entre eosinófilos y basófilos	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis para los momentos pre-tratamiento y post-tratamiento
Relación granulocitos inmaduros – linfocitos	Razón entre granulocitos inmaduros y linfocitos	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis para los momentos pre-tratamiento y post-tratamiento
Relación neutrófilos - granulocitos inmaduros	Razón entre neutrófilos y granulocitos inmaduros	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis para los momentos pre-tratamiento y post-tratamiento

Relación eosinófilos - granulocitos inmaduros	Razón entre eosinófilos y granulocitos inmaduros	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis para los momentos pre-tratamiento y post-tratamiento
Relación basófilos - granulocitos inmaduros	Razón entre neutrófilos y granulocitos inmaduros	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis para los momentos pre-tratamiento y post-tratamiento
Índice compuesto respuesta innata / respuesta adaptativa	Razón entre la sumatoria de células innatas (neutrófilos + eosinófilos + basófilos + monocitos + granulocitos inmaduros) y los linfocitos	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis para los momentos pre-tratamiento y post-tratamiento
Razón de cambio de leucocitos	Razón de cambio de los leucocitos obtenida de dividir los leucocitos postratamiento entre los leucocitos pretratamiento	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis para los momentos pre-tratamiento y post-tratamiento
Relación basófilos - monocitos	Razón entre basófilos y monocitos	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis para los momentos pre-tratamiento y post-tratamiento
Razón de cambio de normoblastos	Razón de cambio de los normoblastos obtenida de dividir los normoblastos postratamiento entre los normoblastos pretratamiento	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis del hemograma post-tratamiento
Razón de cambio de neutrófilos	Razón de cambio de los neutrófilos obtenida de dividir los neutrófilos postratamiento entre los neutrófilos pretratamiento	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis del hemograma post-tratamiento
Razón de cambio de los linfocitos	Razón de cambio de los linfocitos obtenida de dividir los linfocitos postratamiento entre los linfocitos pretratamiento	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis del hemograma post-tratamiento
Razón de cambio de monocitos	Razón de cambio de monocitos obtenida de dividir los monocitos postratamiento entre los monocitos pretratamiento	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis del hemograma post-tratamiento
Razón de cambio de los eosinófilos	Razón de cambio de los eosinófilos obtenida de dividir los eosinófilos postratamiento entre los eosinófilos pretratamiento	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis del hemograma post-tratamiento
Razón de cambio de los basófilos	Razón de cambio de los basófilos obtenida de dividir los basófilos postratamiento entre los basófilos pretratamiento	Cuantitativa Continua	0; 0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis del hemograma post-tratamiento
Razón de cambio de los granulocitos inmaduros	Razón de cambio de los granulocitos inmaduros obtenida de dividir los granulocitos	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis del



	inmaduros postratamiento entre los granulocitos inmaduros pretratamiento			hemograma post-tratamiento
Razón de cambio de todos los índices o relaciones construidas	Razón de cambio de cada una de los índices celulares calculados en el análisis inicial, se calcula dividiendo el cálculo de cada índice con los datos del hemograma de final de tratamiento entre el cálculo del mismo índice a partir del hemograma pretratamiento. Incluye los siguientes índices: neutrófilos/linfocitos, eosinófilos/linfocitos, basófilos/linfocitos, monocitos/linfocitos, neutrófilos/basófilos, neutrófilos monocitos, eosinófilos/monocitos, basófilos/monocitos, granulocitos inmaduros / linfocitos, neutrófilos / granulocitos inmaduros, eosinófilos / granulocitos inmaduros, basófilos / granulocitos inmaduros, y el índice compuesto: (neutrófilos + eosinófilos + basófilos + monocitos + granulocitos inmaduros) / linfocitos.	Cuantitativa Continua	0,1; 0,2... n x 103/ $\mu$ L	Construida en el análisis del hemograma post-tratamiento
Evolución de la lesión principal	Definida como la variación en la lesión principal comparando la lesión pre-tratamiento versus la lesión post-tratamiento. Ejm: Un cambio "ulcera – placa" definiría a un paciente que tenía una úlcera pre-tratamiento y acude con una placa en la valoración post-tratamiento	Cualitativa Nominal	0 = Cambio Ulcera - Placa  1 = Cambio ulcera - ulcera  2 = Otros cambios  8 = No dato  9 = No aplica	Post-tratamiento
Días de tratamiento administrados	Días en los que se administró el tratamiento según lo prescrito	Cuantitativa Discreta	0; 1; 2; ... n  888= No dato	Post-tratamiento
Total de ampollas administradas	Total de ampollas de Glucantime <sup>®</sup> administradas	Cuantitativa discreta	1,2... n amp  888= No dato  999= No aplica	Post-tratamiento
Total de cápsulas de 50 mg administradas	Total de cápsulas de Miltefosine de 50 mg administradas	Cuantitativa discreta	1; 2... n cap  888= No dato  999= No aplica	Post-tratamiento
Total de cápsulas de 10 mg administradas	Total de cápsulas de Miltefosine de 10 mg administradas	Cuantitativa discreta	1,2... n cap  888= No dato  999= No aplica	Post-tratamiento
Porcentaje de Adherencia	Se obtiene de dividir el número de ampollas o cápsulas administradas sobre el número de ampollas o cápsulas ordenadas. Cuando no se disponga de estas variables se obtendrá del número de días en que se administraron dosis sobre el número de días ordenados	Cuantitativa Continua	90, 91, 92... 100 %	Post-tratamiento
Estado al final del tratamiento	Aplican las siguientes definiciones	Cualitativa Nominal	0 = Cura definitiva	Post-tratamiento

	<p>Mejoría: Re-epitelización del 50% o más de las áreas de la(s) lesión(es), sin aparición de otras nuevas</p> <p>Falla terapéutica: un incremento del área &gt; 50% respecto a la inicial</p>		<p>1 = Falla terapéutica</p> <p>2 = Mejoría</p> <p>3 = Sin cambios</p> <p>4 = Curación aparente</p> <p>8 = No dato</p> <p>9 = No aplica</p>	
Estado a semana 8	<p>Aplican las siguientes definiciones</p> <p>Mejoría: Re-epitelización del 50% o más de las áreas de la(s) lesión(es), sin aparición de otras nuevas. Incluye "cura aparente" registrada en base de datos por médico.</p> <p>Sin cambios: participantes que no tuvieran cambios en las características de sus lesiones respecto a la evaluación de fin de tratamiento</p> <p>Falla terapéutica: definida como la aparición de nuevas lesiones cutáneas después de fin de tratamiento, o un incremento del área &gt; 50% respecto a la inicial, o una disminución del área en menos de un 50% a la semana 8 de seguimiento</p>	Cualitativa Nominal	<p>1 = Falla terapéutica</p> <p>2 = Mejoría</p> <p>3 = Sin cambios</p> <p>4 = Curación aparente</p> <p>6 = Falla en otro momento</p> <p>8 = No dato</p> <p>9 = No aplica</p>	Semana 8
Estado a semana 13	<p>Curación aparente: re-epitelización completa con ausencia de signos inflamatorios en todas las lesiones cutáneas, sin aparición de otras nuevas o de recaídas. Incluye pacientes que hayan sido incluidos como mejoría, curación definitiva o curación aparente en otros estudios.</p> <p>Falla terapéutica: aparición de nuevas lesiones cutáneas, o una re-epitelización incompleta y/o la presencia de endurecimiento, bordes elevados o enrojecimiento de la lesión, o pacientes con recaídas (reactivación de las lesiones después de la cura inicial)</p>	Cualitativa Nominal	<p>0 = Curación definitiva</p> <p>1 = Falla terapéutica</p> <p>2 = Mejoría</p> <p>3 = Sin cambios</p> <p>4 = Curación aparente</p> <p>6 = Falla en otro momento</p> <p>8 = No dato</p> <p>9 = No aplica</p>	Semana 13
Desenlace terapéutico  Semana 26	<p>Curación definitiva: la re-epitelización completa con ausencia de signos inflamatorios en todas las lesiones cutáneas, sin aparición de otras nuevas o de recaídas. Incluye pacientes que hayan sido incluidos como mejoría, curación definitiva o curación aparente.</p> <p>Falla terapéutica: aparición de nuevas lesiones cutáneas, recaídas (reactivación de las lesiones después de la cura inicial). Se incluyen en esta categoría aquellos que en su estudio original hayan sido definidos como falla terapéutica o falla en otro momento.</p>	Categoría nominal	<p>0 = Curación definitiva</p> <p>1 = Falla Terapéutica</p> <p>2 = Mejoría</p> <p>3 = Sin cambios</p> <p>4 = Curación aparente</p> <p>6 = Falla en otro momento</p> <p>8 = No dato</p>	Semana 26

			9 = No aplica	
Última visita adicional realizada	¿Valoración adicional realizada en otro momento del seguimiento?	Cualitativa Nominal	0 = No 1 = Si 8 = No dato	Visita Adicional
Fecha última valoración adicional	Fecha de valoración adicional	Cuantitativa Continua	DIA/MES/AÑO 01/01/1900 = No dato	Visita Adicional
Desenlace terapéutico en última visita adicional realizada	<p>Cura aparente o definitiva: Definida en el día 90 o más, y entendida como la re-epitelización completa con ausencia de signos inflamatorios en todas las lesiones cutáneas, sin aparición de otras nuevas o de recaídas. Si la valoración ocurrió entre la semana 13 y 26 se define como curación aparente, si la valoración ocurrió en la semana 26 o posterior se define como curación definitiva.</p> <p>Falla terapéutica: definida en cualquier momento del seguimiento y entendida como la aparición de nuevas lesiones cutáneas después de fin de tratamiento, o un incremento del área &gt; 50% respecto a la inicial, o una disminución del área en menos de un 50% a la semana 8 de seguimiento, o una re-epitelización incompleta y/o la presencia de endurecimiento, bordes elevados o enrojecimiento de la lesión después del día 90 (semana 13), o pacientes con recaídas (reactivación de las lesiones después de la cura inicial)</p> <p>Mejoría: Re-epitelización del 50% o más de las áreas de la(s) lesión(es), sin aparición de otras nuevas, ocurrida antes del día 90.</p>	Categórica nominal	0= Curación definitiva 1 = Falla terapéutica 2 = Mejoría 3 = Sin cambios 4 = Curación aparente 8 = No dato 9 = No aplica	Visita Adicional
Aislamiento de cepa	Fue posible realizar un aislamiento de la cepa parasitaria infectante en cualquier momento del seguimiento. En caso de más de un aislamiento solo se tendrá presente el resultado del primero realizado.	Cualitativa Nominal	0 = No 1 = Si 8 = No dato	Estado final
Especie parasitaria	Especie de Leishmania aislada en cultivo. En caso de más de un aislamiento solo se tendrá presente el resultado del primero realizado.	Cualitativa ordinal	1 <i>L. V. panamensis</i> 2 <i>L. V. guyanensis</i> 3 <i>L. V. braziliensis</i> 4 Otra 5 <i>Leishmania Viannia sp</i> 6 <i>Leishmania complejo mexicana</i>	Estado final

Estado final del estudio	<p>Cura: Definida en el día 90 o más, y entendida como la re-epitelización completa con ausencia de signos inflamatorios en todas las lesiones cutáneas, sin aparición de otras nuevas o de recaídas.</p> <p>Falla terapéutica: definida en cualquier momento del seguimiento y entendida como la aparición de nuevas lesiones cutáneas después de fin de tratamiento, o un incremento del área &gt; 50% respecto a la inicial, o una disminución del área en menos de un 50% a la semana 8 de seguimiento, o una re-epitelización incompleta y/o la presencia de endurecimiento, bordes elevados o enrojecimiento de la lesión después del día 90 (semana 13), o pacientes con recaídas (reactivación de las lesiones después de la cura inicial)</p>	Catagórica nominal	<p>0 = Cura</p> <p>1 = Falla Terapéutica</p>	Estado final
--------------------------	--	--------------------	--	--------------

### ***Recolección, control de calidad y manejo de datos***

Los procedimientos que originaron los datos incluidos en este estudio fueron:

- Valoración médica: entendida como el acto de atención médica realizada por profesionales en medicina con entrenamiento en atención de pacientes con leishmaniasis. Dichas valoraciones se dieron dentro del marco de un estudio realizado en CIDEIM. Todos estos datos también reposan en la historia clínica de los pacientes como documento fuente de consulta que fue utilizada para corroborar la información.
- Diagnóstico parasitológico: entendida como la toma de muestras que permitieron confirmar la infección por parásitos de *Leishmania spp.* Incluyó examen para visualización directa (frotis), cultivo de aspirado de borde de la lesión y/o biopsia.
- Toma y procesamiento de muestras de sangre para hemogramas en dos momentos del seguimiento (pre y post-tratamiento). Más del 95% de los hemogramas reportados en este estudio corresponden a hemogramas de IV generación que se procesaron en los laboratorios de la Fundación Valle de Lili (Cali) utilizando la Plataforma XN3000 Sysmex, bajo los criterios y recomendaciones de *The American Society of Hematology*. En algunos pacientes no se enviaron muestras de sangre para procesamiento del hemograma en Cali por lo que se tuvieron en cuenta los reportes de hemograma procesados en los hospitales locales de Tumaco y Chaparral, en estos casos no se tiene dato acerca de la plataforma utilizada para el procesamiento de hemograma.
- Identificación de la especie de *Leishmania*: Identificación de la especie parasitaria infectante que fue aislada en los cultivos. Este procedimiento fue realizado mediante el uso de diferentes técnicas que incluyen electroforesis de isoenzimas y/o anticuerpos monoclonales, estas técnicas fueron realizadas de

manera estandarizada de acuerdo a los protocolos de los estudios de los que se obtuvo la información en el CIDEIM.

El control de calidad del dato se garantizó en cada estudio ya que los registros de cada estudio fueron sometidos a procesos de monitoria clínica según protocolos institucionales previo a su digitación en las bases de datos de las cuales se obtuvo la información para este estudio. Todos los datos aquí mencionados fueron digitalizados mediante doble digitación utilizando un software electrónico de recolección de datos diseñado por la Unidad de Epidemiología y Bioestadística de CIDEIM y almacenados en una Base de Datos Microsoft SQL server ®.

Para la importación de la información que se encontraba disponible en las bases de datos de estudios previos de CIDEIM, se comparó el diccionario de datos de cada uno de los estudios contra el listado de variables del presente estudio y se definió en un formato la forma en la que se realizaría la importación y/o conversión del dato para su posterior importación con la codificación estandarizada a la nueva base de datos (Anexo 2). En los casos en los que se requería información adicional no incluida en estudios previos, esta se obtuvo directamente desde documentos fuente como la Historia Clínica y/o los informes de resultados de paraclínicos, y se consignó por doble digitación en el formato de reporte de caso (CRF, por sus siglas en inglés) digital del presente estudio.

El CRF digital de este estudio fue creado por ingenieros de sistemas de la unidad de epidemiología y bioestadística de CIDEIM, utilizando como base para la creación el CRF aprobado por comité de ética. Este CRF cuenta con un sistema de protección de datos y aseguramiento de la calidad mediante ingreso por doble digitación, con restricción para la realización de cambios posterior al ingreso de los datos al sistema por los digitadores, sin el previo consentimiento por la unidad y personal de investigación responsable. En los casos en los que hubo inconsistencias los datos fuente fueron corroborados por el investigador responsable y se aplicaron los cambios directamente desde el área de sistemas previo diligenciamiento de formato de Query (Anexo 3). Posteriormente, toda la información recodificada y/o recolectada en el CRF del presente estudio se almacenó en bases de datos separadas en Microsoft SQL server® según disposición de la Unidad de Epidemiología y Bioestadística de CIDEIM.

#### *Proceso de limpieza de los datos*

Tras completar la importación e ingreso de los datos, se procedió a congelar la base y se generó una exportación de la misma dividida en doce documentos que se corresponden con cada sección del CRF: codificación de los participantes, Criterios de Inclusión y Exclusión, Evaluación de Base, Datos de Especie Parasitaria infectante, Hemograma pretratamiento, Evaluación de Fin de Tratamiento, Hemograma postratamiento, Valoración de semana 8, Valoración de semana 13, Valoración de semana 26, Datos de visitas adicionales, Estado Final en el Estudio.

Se utilizó R y R-Studio en su versión 4.1.0 para importar las bases de datos utilizando la librería *readxl*. Durante la importación de datos se especificaron los códigos de No dato y no aplica para transformarlos en *NA* y excluir este tipo de información al momento de correr los análisis. Adicionalmente, todas las variables de tipo fecha fueron definidas con la función *as.Date* del paquete de base de R. Así mismo, se procedió a la asignación de etiquetas a todas las variables cualitativas y se definieron como tipo “factor”. Para las variables cuantitativas se verificó que estuvieran almacenadas como dato numérico.

Para el análisis exploratorio de las variables cualitativas y cuantitativas se utilizaron funciones disponibles en las librerías *DataExplorer* y *PASWR* en R. Todas las variables cuantitativas se exploraron con la función *EDA* de la librería *PASWR*, la cual permite obtener las medias, medianas, desviaciones estándar, rangos, rangos intercuartiles, varianza, índices de kurtosis, coeficientes de asimetría, test de normalidad, además de generar un gráfico de cada variable que incluye el histograma, un diagrama de cajas y bigotes, un qq-plot y permite identificar valores atípicos. En los casos en los que se evidenciaron observaciones atípicas, se filtraron las bases de datos para identificar los códigos de los participantes con datos atípicos y se corroboraron los datos con lo consignado en la historia clínica y los reportes de los paraclínicos. Cuando hubo discrepancias se generaron reportes query (Anexo 3) y se procedió a realizar el cambio en la base de datos. Cuando se identificaron valores extremos pero los datos si correspondían con el reporte original no se realizó ninguna modificación, pero se revisaron las historias clínicas para analizar posibles causas de la observación atípica.

Para realizar el manejo de las bases de datos y la asignación de nuevas variables se utilizaron funciones de la librería *dplyr* en R como *select*, *filter* y *mutate*. Para la generación de gráficos o tablas exploratorias se utilizaron funciones de la librería *ggplot* y *gtsummary*.

### *Construcción de variables derivadas*

Para algunas variables cuantitativas de interés se crearon nuevas variables categóricas (tipo “factor”) incluyendo la edad, índice de masa corporal, rango terapéutico de las dosis de medicamento, tiempo de evolución y numero de lesiones cutáneas según valores de referencia descritos previamente en la literatura. Adicionalmente, se utilizaron las variables de tipo de lesión en la evaluación de base y de fin de tratamiento para generar una nueva variable que resumía el cambio ocurrido en las lesiones al finalizar el tratamiento (ej: variación ulcera – placa).

Para el hemograma, las primeras variables construidas fueron los porcentajes de linajes celulares respecto al total de los leucocitos, para eso se tomaron los conteos absolutos de neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos y granulocitos inmaduros

y se dividieron entre el conteo absoluto de leucocitos, el valor obtenido se multiplicó por 100.

Para la construcción y evaluación de las relaciones entre linajes celulares descritos en la tabla de variables, se calculó la razón entre el valor de cada línea celular en un momento dado del seguimiento y se dividió entre el valor de otra línea celular en ese mismo momento del seguimiento (ej: relación neutrófilos/linfocitos en hemogramas pretratamiento, relación neutrófilos/linfocitos en hemogramas postratamiento, relación eosinófilos/leucocitos pretratamiento, entre otras).

Así mismo, se construyeron variables resumen de las variaciones entre los hemogramas post tratamiento y pretratamiento obtenidas como una razón entre el valor de cada parámetro post-tratamiento dividido por el valor del mismo parámetro pretratamiento (ej: leucocitos postratamiento divididos entre leucocitos pretratamiento, neutrófilos postratamiento divididos entre neutrófilos pretratamiento, entre otros).

La construcción de estas nuevas variables fue de utilidad para lograr una mejor comprensión de las dinámicas del sistema inmune y entender si otro tipo de factores como la distribución de una línea celular respecto a otra línea con funciones diferentes puede ser tomada en cuenta como potencial biomarcador de desenlace terapéutico.

#### *Generación de bases de datos finales*

Una vez se completó la limpieza de los datos y la construcción de variables derivadas, se guardaron las bases con los datos post-limpieza y se construyeron tres grandes bases de resumen a partir de la unión (merge) de bases más pequeñas. Una base incluyó solamente los datos sociodemográficos y clínicos. Una segunda base combinó los parámetros del hemograma pre y postratamiento, además de las variables complementarias relacionadas a los hemogramas creadas en el procedimiento anterior. Una última base integró los datos del estudio en una sola base completa para ser analizada. Para la exportación de bases de datos se almacenaron en tres formatos, RData (para análisis en R), dta (para análisis en STATA) y .csv (editor de texto) para facilitar su conversión a cualquier software estadístico. Todos los comandos utilizados para el análisis exploratorio y limpieza de datos se encuentran en un R-script disponible para descarga en el siguiente enlace ( <https://cutt.ly/0LUEMUs> ).

## **Análisis estadístico**

### Análisis descriptivo

Las variables cualitativas se presentaron en frecuencias absolutas y relativas, y las variables cuantitativas con medidas de tendencia central (promedio o mediana) y dispersión (desviación estándar, rangos, rango intercuartil y/o coeficientes de variación) según su distribución. La normalidad fue analizada visualmente mediante el uso de quantil-quantil plots y con la prueba de Shapiro Wilk. Un análisis exploratorio para identificar colinealidad entre los parámetros del hemograma fue realizado mediante la construcción de scatterplots con los conteos pre-tratamiento y post-tratamiento.

### Estimación de incidencias

La incidencia de falla terapéutica se estimó con su correspondiente intervalo de confianza del 95% para el desenlace terapéutico final y para cada momento del seguimiento (fin de tratamiento, semana 8, semana 13, semana 26 y visita adicional posterior a semana 26). Se calculó la incidencia para cada momento del seguimiento tomando como denominador los pacientes que acudieron a la visita y que se encontraban a riesgo.

### Identificación de parámetros del hemograma relacionados al desenlace

Para reducir la dimensionalidad de los datos de los parámetros del hemograma, se realizó un análisis de componentes principales (PCA de sus siglas en inglés), el cual es de utilidad para describir el conjunto de datos en términos de nuevas variables (componentes) no correlacionadas entre sí y de manera no supervisada (es decir, sin tener en cuenta el conocimiento a priori de posibles variables de utilidad para la discriminación de los datos) [96]. Primero, se transformaron los datos de cada uno de los parámetros del hemograma a su valor Z con la siguiente fórmula:

$$z = \frac{\text{valor de conteo celular de cada paciente por mililitro} - \text{media de conteos para esa línea}}{\text{desviación estandar de los conteos para esa línea celular}}$$

Posteriormente, se construyó una matriz que permitió identificar la varianza de cada una de las variables y su covarianza respecto a cada una de las demás variables de análisis. A partir de esta matriz se construyeron los componentes principales, entendidos como variables que logran la maximización de la varianza entre las observaciones estudiadas. En este punto, se calcularon los vectores y valores propios (eigenvectors y eigenvalues) que permitían identificar aquellas variables con mayor representatividad de los diferentes componentes principales.

La calidad en la representatividad de los individuos y las variables fue evaluada mediante la suma de los cosenos cuadrados para cada una de las dimensiones (componentes principales), aquellos con valores cercanos a 1 se consideraron los de mejor calidad. Esta representatividad de los individuos y la correlación de las



diferentes variables con los componentes principales obtenidos se sintetizó utilizando gráficos de representación simultánea tanto para los individuos como para las variables en sus respectivos ejes factoriales.

Tras la estimación gráfica y numérica de la contribución de las variables y los individuos a cada componente principal se separaron por color las curas y fallas en los diferentes planos del análisis de componentes principales para explorar si este método era de utilidad para explicar los desenlaces. Además, se construyeron *scree plots* para determinar el número de componentes con mejor explicación de la variabilidad de los datos.

Dado que el abordaje mediante PCA no mostró ser de utilidad para discriminar entre curas y fallas, se decidió el uso de análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA de sus siglas en inglés) como estrategia de análisis supervisado. Este método puede ser alternativa cuando el PCA no logra discriminar el desenlace de interés y se está buscando una alternativa que permita identificar variables de importancia para la construcción de sistemas de clasificación (como curas y fallas) [97]. Sin embargo, como lo reporta Brereton y Lloyd [98], su uso debe ir acompañado de otros métodos y se debe tener rigurosidad para ejecutar el método paso a paso desde la transformación de los datos (para que todos queden en una misma escala) hasta la interpretación de los resultados. Para este estudio en particular se usó como una alternativa para reducir la dimensionalidad de las variables explicativas ya que esta técnica es de utilidad en los casos en los que puede haber colinealidad entre las variables explicativas de los modelos de clasificación [98] como puede esperarse con varios parámetros del hemograma.

El análisis de PLS-DA se condujo utilizando la librería *mixOmics* en R. Para reducir el riesgo de sesgos en la identificación de variables, el paquete incluye dentro de sus funciones la construcción de diferentes sub-sets de entrenamiento y otros de validación. Para este modelo, se incluyó como variable resultado el desenlace terapéutico final en el estudio (cura o falla) y como variables de exposición todos los parámetros del hemograma. Se realizaron 50 repeticiones ( $nrepeat = 50$ ) de construcción y evaluación modelos explicativos, en cada repetición se dividieron los participantes en 10 grupos ( $nfolds = 10$ ) en los cuales se tomaba un grupo como set de validación y 9 grupos como set de entrenamiento, se construía y evaluaba cada modelo hasta que los 10 grupos hubieran actuado como set de validación contra los otros 9 grupos como set de entrenamiento. En cada uno de los procesos mencionados, el paquete construye un modelo regresión de mínimos cuadrados en el que las variables explicativas son variables latentes (similares a los componentes principales generados en el PCA) y posteriormente se identificó cuáles de las variables explicativas incluidas en el modelo (parámetros del hemograma) se correlacionaban mejor con estas variables latentes construidas, y por lo tanto podrían tener utilidad para discriminar el desenlace. Para la evaluación del desempeño de este modelo de clasificación se evaluó el error de validación cruzada (*cross validation (CV) error*) para todas las muestras utilizando el comando *perf* de

la librería MixOmics, este comando permite realizar el cálculo del desempeño del modelo a través de la comparación de las clases predichas con las clases observadas para cada una de las observaciones, para este estudio, el método de predicción de las clases fue el de máxima distancia el cual es el método más simple de predicción de clase (resultado) asignando la categoría con el mayor valor predicho en la variable dummy de predicción [99]. Un CV error cercano a cero indica un mejor desempeño del modelo [100].

### *Análisis bivariados por desenlace terapéutico*

Una vez se seleccionaron los parámetros del hemograma, se realizó el análisis bivariado de factores asociados con falla terapéutica al final del estudio. Para este se estimaron los riesgos relativos (RR) con su correspondiente IC95% de falla terapéutica para cada variable sociodemográfica, clínica y parámetros del hemograma utilizando tablas de contingencia para las variables categóricas y regresiones log-binomial para las variables cuantitativas, de no lograrse convergencia se utilizó regresión robusta de Poisson [101,102]. Los parámetros del hemograma a comparar fueron aquellos seleccionados por el PLS-DA y por interés clínico definido por el investigador tanto como variables categóricas como cuantitativas. Las variables categóricas fueron comparadas mediante prueba de chi2 cuando se cumplieron los supuestos (más de 20 observaciones en la tabla de contingencia, las frecuencias esperadas eran mayor o igual a 1 en todas las celdas de la tabla de contingencia y mayores que 5 en más del 80% las celdas) y la prueba exacta de Fisher cuando no se cumplieron los supuestos de chi2. Para las variables continuas con distribución normal se utilizó la prueba t de Student o la Prueba U de Mann Whitney si tenían distribución sesgada. Los valores de p obtenidos en las regresiones log-binominal y/o robusta de Poisson corresponden al test de Wald.

Para disminuir el riesgo de falsas asociaciones por múltiples pruebas de significancia estadística, en el análisis de los parámetros del hemograma se estimó el valor q (q-value) el cual es una optimización del valor p que ajusta por la probabilidad de obtener falsas asociaciones en una distribución dada de valores de p [103] Se consideró un valor  $q < 0,05$  como estadísticamente significativo.

Adicionalmente, se exploró el grado de correlación entre los diferentes parámetros seleccionados por el PLS-DA para identificar posible colinealidad a tener en cuenta en las fases posteriores del análisis. Se construyeron entonces matrices scatterplot y se determinaron los coeficientes de correlación para los momentos pre-tratamiento, post-tratamiento y las razones de cambio. La correlación se evaluó según la siguiente escala: débil (0 – 0.3), moderada (>0.3 – 0.6), fuerte (> 0.6 a 0.9), muy fuerte (> 0.9 – 1), perfecta (1) [104]. Para este procedimiento solamente fueron incluidos los parámetros seleccionados por el PLS-DA.

### Estimaciones de puntos de corte para los candidatos a biomarcadores

Se estimaron puntos de corte para falla terapéutica de los parámetros del hemograma utilizando la librería *cutpointr* en R [105]. Estos puntos de corte se definieron con el objetivo de facilitar la interpretabilidad clínica de los biomarcadores por parte de los profesionales de la salud. Se generaron puntos de corte por tres métodos diferentes y se comparó el desempeño de cada punto de corte en términos de área bajo la curva (AUC, de sus siglas en inglés) característica operativa del receptor (ROC, de sus siglas en inglés), sensibilidad y especificidad.

El primer método de estimación utiliza la función *maximize\_boot\_metric*, la cual maximiza una función métrica resumen a partir de diferentes puntos de corte obtenidos por muestreo múltiple (bootstrap) de los datos de la cohorte y la construcción subsecuente de múltiples curvas ROC buscando maximizar la sensibilidad [105]. El segundo método utiliza los datos tanto de sensibilidad como de especificidad para calcular el índice de Youden [106] y suaviza las distribuciones en cada desenlace terapéutico, para posteriormente establecer el punto de corte con el AUC más grande. El último método consistió en generar puntos de corte arbitrarios a partir de la distribución de los datos o reportes previos explorados en la literatura, que además fueran fácilmente interpretables en la práctica clínica.

El mejor método a elegir para seleccionar los puntos de corte fue aquel que tuviera el mayor número de parámetros con la más alta sensibilidad, especificidad superior al 50%, y AUC más grande. Cuando el punto de corte por el método elegido no logró una sensibilidad mayor al 50% se evaluó el punto de corte definido por el segundo método con mejor desempeño, si este tampoco alcanzaba los parámetros de sensibilidad, especificidad y AUC planteados, se seleccionaron puntos de corte manuales. En el caso de variables en las que el punto de corte identificado por el método de mejor desempeño fuese de difícil interpretabilidad clínica, se buscó un punto de corte manual que fuese más fácilmente interpretable pero que lograra un desempeño similar al del punto de corte elegido por el método.

### Análisis multivariado

Para el análisis multivariado se obtuvieron RR ajustados con su correspondiente IC95% utilizando modelos lineales generalizados log-binomial y cuando se encontraron problemas de convergencia se utilizaron modelos de regresión robusta de Poisson [101,102]. La utilidad del modelo robusto de Poisson para el análisis de desenlaces dicotómicos ya ha sido demostrada y se logra a través de la aplicación de un método de cuasi-verosimilitud (del inglés quasi-likelihood) que ajusta los datos a un resultado binario de manera similar al método de máxima verosimilitud [107,108].

Utilizando los parámetros del hemograma categorizados según sus puntos de corte, se construyeron modelos multivariados separados para los parámetros del hemograma pre-tratamiento y post-tratamiento. Las razones de cambio entre el pre

y post-tratamiento se incluyeron en el modelo post-tratamiento. Los modelos base se construyeron con los parámetros del hemograma que habían sido seleccionados por el PLS-DA y además tuvieron un valor de  $q \leq 0,3$  en los análisis bivariados, y aquellas que tenían asociación importante con el desenlace demostrada en estudios previos (edad, tipo de tratamiento, tiempo de evolución menor a un mes y linfadenopatía regional [62,63]). Debido a que al construir el modelo multivariado base con todas las variables pre-seleccionadas, el tamaño muestral se reducía de manera importante, haciendo perder poder estadístico, se incluyeron solamente aquellas variables del modelo base que tenían menos de 20 datos faltantes.

Para descartar colinealidad en el modelo base se utilizó el comando *collin* en STATA 16, se consideró multicolinealidad ante la presencia de un factor de inflación de la varianza (VIF)  $>10$ . En los casos en los que hubo colinealidad entre dos o más parámetros, se eligió el parámetro de mayor importancia (por clínica y/o estadística) y se utilizó para la construcción del modelo base y durante la búsqueda del mejor modelo multivariado. Una vez definido cuál fue el mejor modelo con los métodos que se explican más adelante, se reemplazó el parámetro elegido por el/los parámetros con los que guardaba colinealidad para evaluar con cual parámetro se obtenía el mejor ajuste.

Tras definir los primeros modelos base multivariados pre-tratamiento y post-tratamiento, se obtuvo el modelo más parsimonioso mediante la combinación de estrategias backward y forward retirando todas las variables con valor de  $p > 0,2$  en el test de Wald y posteriormente reintroduciéndolas al modelo una a una. Para comparar cada nuevo modelo respecto al anterior se utilizaron el Bayesian Information Criteria (BIC) y el likelihood ratio test (LR test). En general, se prefirieron aquellos modelos con BIC más bajos y modelos base con LR test en los que se observó significancia estadística ( $p < 0,05$ ) frente al modelo de comparación. Una vez se obtuvieron estos modelos, se fueron incluyendo en orden descendente las otras variables que habían cumplido con los requisitos para ser ingresadas en el análisis multivariado pero que no habían sido incluidas en el modelo base por tener más de 20 datos faltantes. La comparación de cada nuevo modelo se realizó atendiendo los mismos principios descritos anteriormente.

### Análisis post-regresión

La bondad de ajuste de los modelos se evaluó mediante el estadístico D y  $X^2$ , los cuales son recomendados cuando se conducen regresiones con desenlaces dicotómicos, y pueden ser utilizadas tanto en regresiones de Poisson como en regresiones log-binomial [109], un valor de  $p > 0,05$  indica un buen ajuste del modelo. Así mismo, utilizando las funciones de STATA 16 “*predict dv, dev*” y “*predict hat, hat*” se estimó la desviación de los residuales (deviance residuals) y el apalancamiento. Posteriormente se evaluó gráficamente la presencia de observaciones atípicas que podrían estar afectando los modelos de regresión planteados. Aquellas observaciones fueron retiradas para comparar los coeficientes

beta obtenidos al correr la misma regresión. En los casos en los que hubo variaciones importantes en los coeficientes beta se analizaron los datos de cada una de las observaciones atípicas para tratar de determinar las causas de dicha desviación.

Finalmente, la especificación de los modelos fue evaluada utilizando el comando *linktest* en STATA 16 para evaluar la significancia estadística de la variable  $\text{hat}^2$ , un valor de  $p < 0,05$  se consideró significativo para mala especificación del modelo.

Una vez evaluado el modelo final, se realizó imputación múltiple utilizando el comando *mi impute mvn* en STATA 16, el cual complementa los datos faltantes mediante regresión normal multivariante y puede ser utilizado para variables continuas y categóricas [110]. Se compararon los RR de los modelos multivariados pre-tratamiento y post-tratamiento finales, utilizando el set con imputación y sin imputación para analizar el posible impacto de los datos faltantes. Se consideró como variación importante por presencia de datos faltantes, si la interpretación cualitativa de la fuerza de asociación era diferencial al correr el modelo con el set de datos imputados y sin el set de datos imputados [111].

## CONSIDERACIONES ÉTICAS

Este estudio fue realizado de acuerdo con los estándares éticos nacionales e internacionales para la investigación que involucra sujetos humanos. El protocolo fue revisado, aprobado y monitoreado por el Comité Institucional de Revisión Ética Humana de la Escuela de Salud Pública de la Universidad del Valle y el Comité de Ética de Investigación en Humanos del Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM) (Anexo 4 y Anexo 5). Las actividades cumplen con las normas éticas internacionales para la investigación biomédica donde participan sujetos humanos del Consejo de las Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS, 2016), la Declaración de Helsinki (WMA, 2013) y las “Normas Científicas, Técnicas y Administrativas para la Investigación en Salud, establecidas mediante la resolución # 008430 de 1993 del Ministerio de Salud y la Ley 29 de 1990. Así mismo se tuvieron en cuenta algunas definiciones y recomendaciones del Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos (Título 45, Sección 46, Subsección 102).

Dado que se trabajó con información secundaria obtenida de estudios previos realizados con seres humanos debidamente avalados por comités de ética nacionales e internacionales, se asegura que los procedimientos clínicos para la obtención de datos se acogieron a las pautas internacionales de BPC (Buenas Prácticas Clínicas) descritas en ICH GCP E6 y la Resolución 2378 de 2008 del Ministerio de la Protección Social de Colombia. Así mismo, se resalta que el equipo involucrado en esta investigación cuenta con entrenamiento y capacitación vigente

en protección de sujetos humanos en investigación y se garantizó la confidencialidad de los datos obtenidos de fuentes secundarias, asegurándose de utilizar solo aquellos que provienen de participantes que autorizaron el uso de sus datos para estudios futuros a través del consentimiento informado. Los datos de identificación de todos los participantes estaban protegidos por un código asignado a cada uno de los estudios y solamente podía accederse a esta información por personal autorizado de la Unidad Clínica y/o de la unidad de Epidemiología y Bioestadística de CIDEIM.

### ***Clasificación del riesgo***

Para la clasificación del riesgo del estudio se adoptaron las definiciones del Código de Regulaciones Federales de los Estados Unidos (Título 45, 46.102) y no las definiciones de la Resolución #8430 de 1993 del Ministerio de Salud, esto se debe a que para los fines de este estudio no se considera que exista alguna investigación sin riesgos. Esta investigación tiene un Riesgo mínimo, lo que significa que “la probabilidad y la magnitud del daño o malestar anticipado en la investigación no son mayores en sí mismos que los que se encuentran normalmente en la vida diaria o durante la realización de exámenes o pruebas físicas o psicológicas de rutina”. En este caso el riesgo de daño grave es muy poco probable dado que se trabajará con datos secundarios, sin embargo, existen algunos riesgos especialmente aquellos relacionados con violaciones a la confidencialidad de los datos que tratarán de controlarse.

### ***Análisis y gestión de riesgos***

Los riesgos identificados para la investigación incluyen: 1) Violación a la voluntariedad de participación en el estudio; 2) Mala calidad de los datos que conduzcan a resultados sesgados. 3) Violaciones a la confidencialidad y la privacidad. 4) Riesgo de filtración de datos a terceros. Para compensar dichos riesgos se diseñó un plan de gestión de riesgos desde el inicio de la investigación, el cual se encuentra resumido en la tabla 2.

<b>Tabla 2. Plan de gestión de riesgos</b>	
<b>Riesgo identificado</b>	<b>Estrategia de control</b>
<b>Violación a la voluntariedad de participación en el estudio</b>	Solamente se inició el proceso de obtención de la información relevante para este estudio tras haber obtenido la autorización de comité de ética en Universidad del Valle y CIDEIM, además de la autorización de la Unidad de Epidemiología y Bioestadística de CIDEIM y haber verificado la autorización de los participantes para uso de sus datos en estudios futuros.
<b>Mala calidad de los datos que condujeran a resultados sesgados.</b>	Toda la información recolectada que fue utilizada en este estudio se obtuvo a partir de procedimientos previamente establecidos de manera protocolaria en CIDEIM, fue recolectada por personal entrenado en investigación en el diligenciamiento de formatos de reporte de caso (CRF por sus siglas en inglés) que además fueron aprobados previamente por comité de ética. Los registros de cada estudio fueron sometidos a procesos de monitoria clínica según protocolos institucionales previo a su digitación en bases de datos digitales para favorecer el control y la calidad de los datos

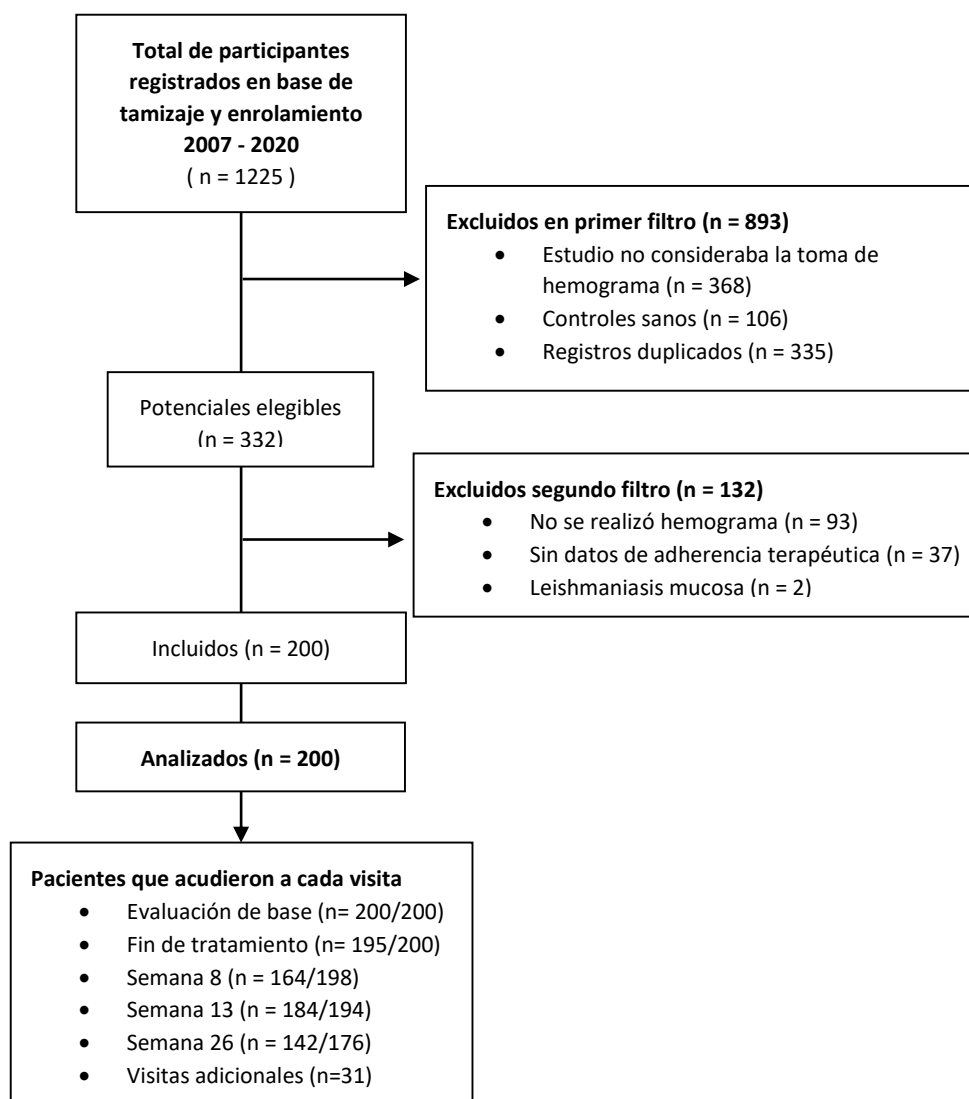
	<p>Todos los datos que se solicitaron para análisis en este proyecto han ingresados a medio digital mediante doble digitación, posteriormente fueron almacenados en el archivo central de la unidad de Epidemiología y Bioestadística de CIDEIM, en un motor de Base de Datos Microsoft SQL server ®.</p> <p>En el caso de discrepancias o información faltante requerida para el estudio en curso se diligenció un formato de discrepancias o Query form estandarizado según los requerimientos de la Unidad de Epidemiología y Bioestadística de CIDEIM. Este formato fue respondido por personal autorizado de la institución, para completar la construcción de las bases de datos a analizar en este proyecto.</p>
<b>Violaciones a la confidencialidad y la privacidad</b>	<p>Los datos de identificación de los pacientes estaban protegidos por un código de estudio y solamente pudo accederse a información de los mismos por personal autorizado de la Unidad Clínica y/o de la unidad de Epidemiología y Bioestadística de CIDEIM.</p> <p>Los datos están protegidos y salvaguardados por la Unidad de Epidemiología y Bioestadística de CIDEIM y personal de la Unidad Clínica de CIDEIM.</p>
<b>Riesgo de filtración de datos a terceros</b>	<p>El acceso a la información estuvo limitado a personal relacionado con la investigación, y se encuentra protegida en servidores y carpetas que requieren contraseña de seguridad para su revisión la cual conoce solamente dicho personal.</p> <p>El equipo involucrado en esta investigación contaba con entrenamiento y capacitación vigente en protección de sujetos humanos en investigación.</p>

## RESULTADOS

### Selección de los participantes de estudio y pérdidas al seguimiento

Se identificaron 1225 registros de participantes potencialmente elegibles que fueron enrolados en estudios previos de CIDEIM entre el año 2007 y el año 2020. En total, 893 registros fueron excluidos en un primer filtro de búsqueda por ser duplicados de participantes que habían sido enrolados en más de un estudio, controles sanos, participantes con LC tamizados pero no enrolados en otros proyectos, y debido a que en el protocolo del estudio original no se consideraba la toma de hemograma. De los 332 potenciales elegibles se incluyeron finalmente 200 y se excluyeron 93 participantes a quienes no se realizó la toma de hemograma, 37 por ausencia de datos de adherencia terapéutica y 2 tenían leishmaniasis mucosa. Las pérdidas al seguimiento fueron inferiores al 20%. El seguimiento de fin de tratamiento se realizó en el 97,5% de los participantes y el de semana 13 en el 94,8%, mientras que en semana 8 y semana 26 acudieron el 82,8% y 80,6% de los participantes citados, respectivamente (Figura 6).

**Figura 6. Flujograma de selección de participantes**





## Descripción de la población de estudio

Los participantes fueron en su mayoría de sexo masculino (79%), afrocolombianos (61%) y con mediana de edad de 32 años (RIQ 23 – 46). La cohorte en el rango de edad pediátrico fue menor a un cuarto (25%) de los participantes, siendo aún menor el grupo de pacientes entre 1 y 6 años (3,8%). Dentro de las características clínicas, más del 50% de los pacientes tenía alguna alteración en el índice de masa corporal (38% tenía sobrepeso u obesidad y un 14% se clasificó como peso bajo). Aproximadamente uno de cada dos participantes consultó antes de las cuatro semanas de evolución, la mitad de los casos presentaba lesión única en la evaluación de base, siendo más comúnmente una úlcera (85%), con 19% de linfadenopatía. Solo un participante refirió antecedente de LC. La prevalencia de infección concomitante en la evaluación de base fue del 3,5% y un 5% de los participantes tenía algún tipo de comorbilidad, siendo más frecuentes las de origen cardiovascular como la hipertensión arterial, seguidas de afecciones gastrointestinales como gastritis y endocrinas como trastorno de la glándula tiroides. (Tabla 3)

En más del 75% (n=153) de los participantes se obtuvo aislamiento de la especie, siendo las más frecuentes *L. (V) panamensis* (85%) y *L. (V) braziliensis* (11,7%). El 66% de los participantes recibieron Glucantime® solo o en combinación con Pentoxifilina, mientras que 34% recibió Miltefosine. Un 12% de las dosis indicadas para los antileishmaniales superaron el rango de recomendación (supradosis) y un 1% estuvieron por debajo (infradosis). Al finalizar el tratamiento, en el 60% de los pacientes se evidenció una evolución de las lesiones de úlcera a placa, un 22% se mantuvieron como úlceras sin cambio en el tipo de lesión y un 18% correspondió a otros cambios. La prevalencia de adenopatía regional cayó a un 0,5% en la evolución de fin de tratamiento y la de infección concomitante cayó a un 2,5%. (Tabla 3).

<b>Tabla 3. Características sociodemográficas y clínicas de la población de estudio</b>	
<b>Evaluación de base</b>	<b>N = 200</b>
<b>Características sociodemográficas</b>	
Sexo, n (%)	
Femenino	42 (21%)
Masculino	158 (79%)
Edad, Me (RIQ)	32 (23 - 46)
Edad por categorías, n (%)	n = 192
Entre 1 y 6 años	7 (3,8 %)
Entre 7 y 16 años	14 (7,4%)
Entre 17 y 44 años	118 (61%)
Entre 45 y 59 años	46 (24%)
Mayor o igual a 60 años	7 (3,8%)

Etnia, n (%)	n=199
Afrocolombianos	122 (61%)
Mestizos	63 (32%)
Indígenas	14 (7%)
<b>Características clínicas</b>	
Antecedente de Leishmaniasis, n (%)	
No	199 (99,5%)
Si	1 (0,5%)
Tiempo de evolución de los síntomas en semanas, Me (RIQ)	4 (2 - 12)
Peso en kg, Me (RIQ)	68 (58 - 76)
Medidas antropométricas	n= 192
Talla en cm, Me (RIQ)	167 (158 - 173)
Índice de masa corporal, Me (RIQ)	23,7 (21,6 – 27,2)
Categorías según índice de masa corporal, n (%)	
Entre 18 y 25 (Normal)	92 (48%)
Menor a 18 (Peso bajo)	26 (14%)
Mayor que 25 y hasta 30 (Sobrepeso)	56 (29%)
Mayor que 30 y hasta 35 (Obesidad grado I)	17 (8,5%)
Mayor que 35 (Obesidad grado II)	1 (0,5%)
Hallazgos relacionados a las lesiones	n=199
Número de lesiones pretratamiento, Me (RIQ)	1 (1 – 2,5)
Categorías según número de lesiones, n (%)	n=199
Una lesión	100 (50%)
Dos lesiones	49 (24,9%)
Tres o más lesiones	50 (25,1%)
Tipo de lesión principal pretratamiento, n (%)	N=199
Úlcera	171 (85%)
Nódulo	3 (1,5%)
Pápula	2 (1,25%)
Placa	21 (11%)
Otra	2 (1,25%)
Presencia de linfadenopatía pretratamiento, n (%)	38/199 (19%)
Co-infecciones y comorbilidades	
Infección concomitante pretratamiento, n (%)	7 (3,5%)
Presencia de comorbilidades, n (%)	10 (5%)
Numero de comorbilidades por paciente, Me (RIQ)	1 (1-2)
Tipo de sistema afectado por comorbilidades, n (%)	
Cardiovascular	6 (3,2%)
Respiratorio	1 (0,5%)
Gastrointestinal	5 (2,6%)
Endocrino	5 (2,6%)
Neurológico	2 (1,2%)
Otro tipo de comorbilidad	5 (2,6%)

Paraclínicos y resultados de test diagnósticos	
Hemograma pretratamiento realizado, n (%)	196 (98%)
Hemograma postratamiento realizado, n (%)	171 (86%)
Ambos hemogramas realizados, n (%)	167 (83,5%)
Pacientes con aislamiento de la especie, n (%)	153 (76,5%)
Especie parasitaria aislada, n (%)	n=153
<i>Leishmania (Viannia) panamensis</i>	130 (85%)
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	18 (11,7%)
<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	1 (0,7%)
<i>Leishmania Viannia spp.</i>	4 (2,6%)
Tratamiento prescrito, n (%)	
Glucantime	95 (48%)
Glucantime + Pentoxifilina	36 (18%)
Miltefosine	69 (34%)
Dosis de Glucantime en mg/kg/día, Me (RIQ)	19,88 (19,44 – 19,98)
Rango terapéutico alcanzado con la dosis de Glucantime, n (%)	n=131
Normal	111 (85%)
Supra dosis (>20 mg/kg/día)	20 (15%)
Infradosis (<10 mg/kg/día)	0
Dosis de Miltefosine en mg/kg/día, Me (RIQ)	2,20 (2,00 – 2,34)
Rango terapéutico alcanzado con la dosis de Miltefosine, n (%)	n=69
Normal	63 (91,3%)
Supra dosis (>2.5 mg/kg/día)	4 (5,8%)
Infradosis (<1.5 mg/kg/día)	2 (2,9%)
Rango terapéutico de medicamento antileishmanial, n (%)	
Normal	174 (87%)
Supra dosis (>20 mg/kg/día para Glucantime o >2.5 mg/kg/día para Miltefosine)	24 (12%)
Infradosis (<10 mg/kg/día para Glucantime o <1.5 mg/kg/día para Miltefosine)	2 (1%)
<b>Evaluación de fin de tratamiento</b>	
Visita de fin de tratamiento realizada, n (%)	195 (98%)
Días transcurridos hasta la valoración, Me (RIQ)	26 (21-28)
Evolución de la lesión principal (Variación pretratamiento - postratamiento), n (%)	n = 171
Úlcera - Placa	102 (60%)
Úlcera - Úlcera	38 (22%)
Otros cambios	31 (18%)
Presencia de linfadenopatía postratamiento, n (%)	n = 185
Si	1 (0,5%)
Infección concomitante postratamiento, n (%)	n=199
Si	5 (2.5%)
Porcentaje de adherencia al tratamiento, Media (SD)	99.93 (1,39)

## Incidencia de falla terapéutica por etapa del seguimiento

De los 200 participantes, se identificaron 31 (15,50%; IC95%: 11,09% – 21,23%) con falla terapéutica. En aquellos pacientes atendidos en la valoración de fin de tratamiento y en la de semana 8 menos del 2% fueron clasificados como falla terapéutica, mientras que un 9,78% (IC95%: 6,23% – 15,03%) y un 4,93% (IC95%: 2,35% – 15,03%) de los pacientes atendidos en semana 13 y 26, respectivamente se definieron como falla (Tabla 4). Si se hubiera realizado seguimiento solo hasta la semana 13, la frecuencia acumulada de fallas hubiera sido del 12,63% (IC95%: 8,59% – 18,19%).

<b>Tabla 4. Incidencia de falla terapéutica por etapa del seguimiento</b>		
<b>Evaluación de fin de tratamiento</b>	<b>N=200</b>	<b>IC95%</b>
Estado definido a fin de tratamiento (presencial o telefónico), n (%)	n=195	
Mejoría	193 (98,97%)	95,96% - 99,74%
Falla	2 (1,03%)	0,25% - 4,03%
<b>Evaluación de semana 8</b>	<b>N=198</b>	
Estado definido a semana 8 (presencial o telefónico), n (%)	n=164	
Mejoría	162 (98,78%)	95,21% - 99,69%
Falla	2 (1,21%)	0,30% - 4,78%
<b>Visitas adicionales antes de semana 13</b>	<b>N=196</b>	
Estado definido en visita adicional entre fin de tratamiento y semana 13, n (%)	n=9	
Mejoría	7 (77,78%)	35,52% - 95,69%
Falla	2 (22,22%)	4,30% - 64,47%
<b>Evaluación de semana 13</b>	<b>N=194</b>	
Estado definido a semana 13 (presencial o telefónico), n (%)	n=184	
Cura aparente	166 (90,22%)	84,96% - 93,76%
Falla	18 (9,78%)	6,23% - 15,03%
<b>Visitas adicionales entre semana 13 y semana 26</b>	<b>N=176</b>	
Estado definido en visitas adicionales entre semana 13 y semana 26, n (%)	n=10	
Cura aparente	10 (100%)	
<b>Evaluación de semana 26</b>	<b>N=176</b>	
Estado definido a semana 26 (presencial o telefónico), n (%)	n=142	
Cura definitiva	135 (95,07%)	89,96% - 97,64%
Falla	7 (4,93%)	2,35% - 10,03%
<b>Estado final en el estudio*, n (%)</b>	<b>N=200</b>	
Cura	169 (84,50%)	78,76% - 88,90%
Falla	31 (15,50%)	11,09% - 21,23%

## Descripción de los parámetros del hemograma

El hemograma pretratamiento se solicitó en el 98% (n=196) de los participantes, mientras que el postratamiento en el 86% (n=171). A un total de 167 participantes (83,5%) se les solicitó ambos hemogramas.

### *Parámetros del hemograma pre-tratamiento*

La mediana de los leucocitos fue de  $7,2 \times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$ , con aproximadamente un 10% de los participantes con leucopenia ( $< 5 \times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$ ) y otro 10% con leucocitosis ( $> 10 \times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$ ). El 25% de los pacientes tenían disminución del conteo de los neutrófilos ( $< 2,5 \times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$ ) y 75% un porcentaje  $< 55\%$  de neutrófilos; sin embargo, menos del 5% de esas neutropenias se encontraban en rangos clínicamente significativos ( $< 1,0 \times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$ ). Aproximadamente 1 de cada 4 participantes cursaba con neutrofilia ( $> 55\%$  de neutrófilos dentro de las células inmunológicas). Eosinofilia ( $> 0,5 \times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$ ) se encontró en más del 50% de los pacientes  $\mu\text{L}$  y 73% al cuantificarlo por porcentaje ( $> 4\%$  de eosinófilos). Aproximadamente, el 80% tuvieron eosinofilia leve (entre  $0,5$  y  $1,5 \times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$ ) y el 20% restante eosinofilia moderada ( $\geq 1,5$  y  $< 5 \times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$ ). Adicionalmente, más del 25% de los participantes cursaba con monocitosis ( $> 0,7 \times 10^3$  células/ $\mu\text{L}$ ) y esta cifra ascendió al 50% al medirla por porcentaje ( $> 8\%$  de monocitos). El resto de parámetros del hemograma estuvieron entre los rangos normales (Tabla 5).

### *Parámetros del hemograma post-tratamiento*

La proporción de pacientes con leucocitosis, leucopenia, neutropenia, neutrofilia o alteraciones de los monocitos fue similar a los del hemograma pre-tratamiento, excepto eosinofilia en la que se observó un incremento estadísticamente significativo ( $p < 0.001$ ), con más de un 70% (n=123) de los pacientes con eosinofilia por conteo y porcentajes (Tabla 5). De estos pacientes, el 18,7% presentaba eosinofilia moderada y un 81,3% eosinofilia leve.

Las demás células inmunológicas se mantuvieron en rangos similares a los del hemograma pre-tratamiento. En cuanto al análisis de los índices inmunológicos, los índices que comparaban células de la inmunidad innata como eosinófilos, neutrófilos o monocitos contra las demás líneas celulares incrementaron en comparación con los índices de los hemogramas pre-tratamiento (Tabla 5).

### *Razones de cambio post-tratamiento*

Las variaciones de cambio ocurrieron en el conteo de los eosinófilos (Mediana de la razón de cambio: 1,36 RIQ:1,00 – 2,03) y en porcentaje (Me 1,37 RIQ: 1,01 - 2,17). En los índices que incluían comparaciones de células de la inmunidad innata (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, o granulocitos inmaduros) contra la inmunidad adaptativa (linfocitos) se observó una tendencia a incrementar, con varios rangos intercuartiles por encima del 1, lo que indica que más del 75% de los pacientes presentó incrementos en dichos índices celulares.

Las mayores variaciones se encontraron en los índices eosinófilos/basófilos (Me 1,81 (RIQ 1,01 – 2,92), eosinófilos/linfocitos (Me 1,71 (RIQ 0,96 – 1,97), eosinófilos/monocitos (Me 1,45 (RIQ 0,99 – 2,27) y monocitos/linfocitos (Me 1,33 RIQ 0,97 – 1,81), sugiriendo un papel potencial de la respuesta inmune por parte de los eosinófilos y los monocitos tras la administración del tratamiento (Tabla 5).

**Tabla 5.** Descripción de los parámetros del hemograma pretratamiento, postratamiento y sus razones de cambio al final del tratamiento

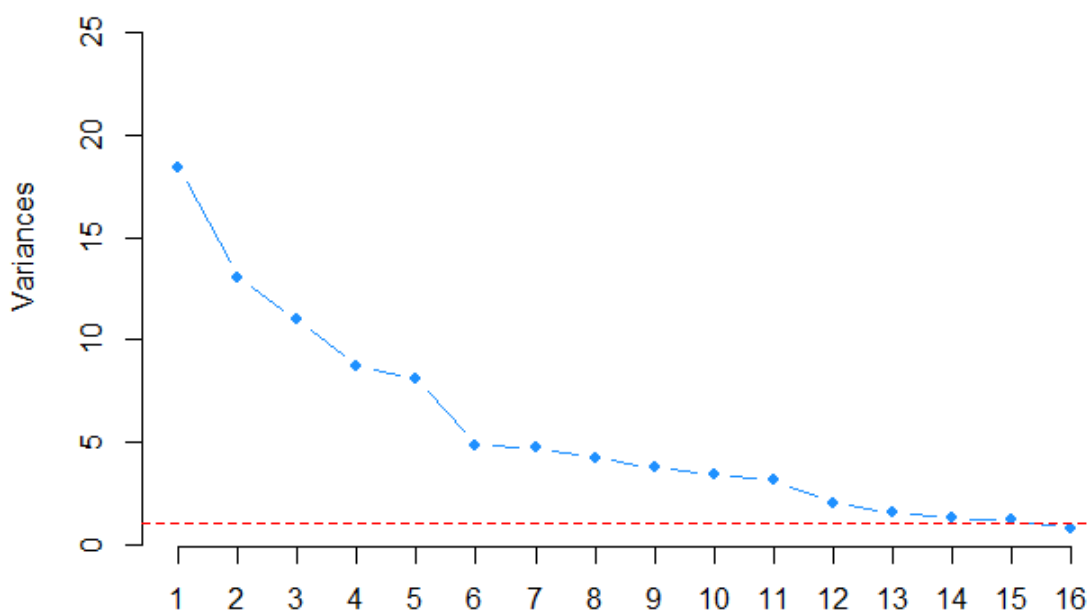
<b>Cuantificación y conteos absolutos por línea celular</b>	<b>Pre-tratamiento Me (RIQ)</b>	<b>Post-tratamiento Me (RIQ)</b>	<b>Razón de cambio Me (RIQ)</b>
Leucocitos, x 10 <sup>3</sup> células/μL	7,20 (5,74 - 8,54)	6,66 (5,53 - 8,72)	0,99 (0,81 - 1,15)
Neutrófilos, x 10 <sup>3</sup> células/μL	3,25 (2,40 - 4,25)	3,38 (2,46 - 4,50)	1,03 (0,82-1,34)
Eosinófilos, x 10 <sup>3</sup> células/μL	0,53 (0,27 - 0,86)	0,73 (0,41 - 0,71)	1,36 (1,00-2,03)
Basófilos, x 10 <sup>3</sup> células/μL	0,03 (0,03 - 0,05)	0,03 (0,02 - 0,04)	1,00 (0,50 - 1,00)
Monocitos, x 10 <sup>3</sup> células/μL	0,58 (0,46 - 0,70)	0,56 (0,46 - 0,71)	0,98 (0,79 - 1,17)
Granulocitos inmaduros, x 10 <sup>3</sup> células/μL	0,02 (0,01 - 0,02)	0,02 (0,01 - 0,03)	1,00 (0,99 - 1,01)
Linfocitos, x 10 <sup>3</sup> células/μL	2,47 (1,98 - 2,97)	1,86 (1,23 - 2,82)	0,75 (0,55 - 1,02)
Glóbulos rojos, x 10 <sup>6</sup> células/μL	5,05 (4,76 - 5,36)	4,76 (4,45 - 5,03)	0,94 (0,91 - 0,99)
Hemoglobina, g/dL	14,60 (13,40 - 15,50)	13,30 (12,50 - 14,30)	0,94 (0,89 - 0,99)
Hematocrito, %	43,20 (40,00 - 45,70)	39,0 (37,20 - 42,00)	0,93 (0,88 - 0,98)
Plaquetas, x 10 <sup>3</sup> células/μL	265 (226 - 310)	ND	ND
<b>Porcentajes de distribución de las células inmunológicas</b>	<b>Pre-tratamiento, Me (RIQ)</b>	<b>Post-tratamiento, Me (RIQ)</b>	<b>Razón de cambio, Me (RIQ)</b>
Porcentaje Neutrófilos, %	47 (37 - 53)	50 (41 - 59)	1,07 ( 0,92 - 1,26)
Porcentaje Eosinófilos, %	7,7 (3,9 - 12,3)	29 (20 - 37)	1,37 (1,01 - 2,17)
Porcentaje Basófilos, %	0,49 (0,35 - 0,69)	0,37 ( 0,27 - 0,59)	0,86 (0,61 - 1,23)
Porcentaje Monocitos, %	8,12 (7,02 - 9,74)	8,22 (6,96 - 9,84)	1,01 (0,87 - 1,23)
Porcentaje Granulocitos inmaduros, %	15,2 (11,8 - 18,3)	15,2 (11,8 - 18,3)	1,01 (0,87 - 1,23)
Porcentaje Linfocitos, %	36 (30 - 42)	29 ( 20 - 37)	0,80 (0,60 - 0,99)
<b>Índices inmunológicos</b>	<b>Pre-tratamiento, Me (RIQ)</b>	<b>Post-tratamiento, Me (RIQ)</b>	<b>Razón de cambio, Me (RIQ)</b>
Índice Neutrófilos/Linfocitos	1,32 (0,92 - 1,76)	1,73 (1,15 - 2,68)	1,35 (0,96 - 1,97)
Índice Eosinófilos/Linfocitos	0,20 (0,11 - 0,33)	0,39 ( 0,26 - 0,59)	1,71 (1,11 - 3,26)
Índice Basófilos/Linfocitos	0,014 (0,010 - 0,019)	0,014 (0,010 - 0,022)	1,11 (0,83 - 1,49)

Índice Monocitos/Linfocitos	0,24 (0,19 - 0,29)	0,28 (0,21 - 0,43)	1,33 (0,97 - 1,81)
Índice Neutrófilos/Basófilos	87 (58 - 136)	127 (75 - 205)	1,27 (0,84 - 1,90)
Índice Neutrófilos / Monocitos	5,40 (4,16 - 6,95)	5,89 (4,33 - 7,78)	1,10 (0,85 - 1,39)
Índice Basófilos / Monocitos	0,06 (0,04 - 0,08)	0,048 (0,032 - 0,075)	0,85 (0,60 - 1,16)
Índice Eosinófilos / Monocitos	0,92 (0,45 - 1,56)	1,36 (0,80 - 1,94)	1,45 (0,99 - 2,27)
Índice Eosinófilos / Neutrófilos	0,19 (0,07 - 0,31)	0,22 (0,14 - 0,35)	1,34 (0,86 - 2,18)
Índice Eosinófilos / Basófilos	16 (7 - 27)	27 (17 - 46)	1,81 (1,01 - 2,92)
Índice Granulocitos inmaduros exponenciados*/Linfocitos	0,41 (0,34 - 0,51)	0,55 (0,36 - 0,85)	1,32 (1,00 - 1,83)
Índice Neutrófilos/Granulocitos inmaduros exponenciados*	3,14(2,36 - 4,11)	3,30 (2,41 - 4,44)	1,04(0,82 - 1,35)
Índice Eosinófilos/Granulocitos inmaduros exponenciados*	0,52 (0,26-0,85)	0,75 (0,47 - 1,08)	1,36 (0,97 - 2,04)
Índice Basófilos/Granulocitos inmaduros exponenciados*	0,030 (0,028 - 0,049)	0,029 (0,02 - 0,039)	0,97 (0,51 - 1,03)
Índice compuesto: (Neutrófilos +Eosinófilos +Basófilos + Monocitos + Granulocitos) / Linfocitos	1,78 (1,39 - 2,33)	2,55 (1,65 - 3,90)	1,43 (1,02 - 2,04)
<p><b>ND:</b> No dato.</p> <p>* Dado que había algunos pacientes con granulocitos inmaduros que podrían presentar recuentos de granulocitos en cero (debido a límites de detección del equipo de laboratorio), se decidió exponenciar esta variable para el cálculo de los índices inmunológicos. Al realizar dicha transformación se verificó que la direccionalidad y fuerza de asociación con otras líneas celulares no se viera afectada al ser obtenidas por la variable exponenciada y debido que no se encontraron diferencias se decidió trabajar con la forma exponenciada.</p> <p><b>Valores de referencia estandarizados para mayores de 2 años y adultos:</b> Leucocitos (Conteos entre 5,0 - 10,0), Neutrófilos (Conteos = 2,5 - 8,0. Porcentaje (%): 55 - 70), Eosinófilos (Conteo: 0,05 - 0,50. %: 1 - 4), Basófilos (Conteo: 0,025 - 0,10. %: 0,5 - 1), Monocitos (Conteo: 0,1 - 0,7. %: 2 - 8), Granulocitos inmaduros (Conteo: 0,00 - 0,03. %: 0,00 - 0,43), Linfocitos (Conteos: 1,0 - 4,0. %: 20 - 40)), Glóbulos rojos (4,0 - 5,5), Hemoglobina (Varia por edad y sexo. <i>Entre 1-6 años:</i> 9,5 - 14,0. <i>Entre 6 - 18 años:</i> 10,0 - 15,5. <i>Mayor o igual a 18 años:</i> 14,0 -18,0 en hombres y de 12,0 - 16,0 en mujeres). Hematocrito (Varia por edad y sexo. <i>Entre 1-6 años:</i> 30,0 - 40,0. <i>Entre 6 - 18 años:</i> 32,0 - 44,0. <i>Mayor o igual a 18 años:</i> 42,0 -52,0 en hombres y 37,0 - 47,0 en mujeres). Plaquetas (150,0 - 400,0). Obtenidos de: Pagana KD, Pagana TJ, Pagana TN. Mosby's diagnostic and laboratory test reference. 15 Ed. ElSevier 2020 [112].</p>			



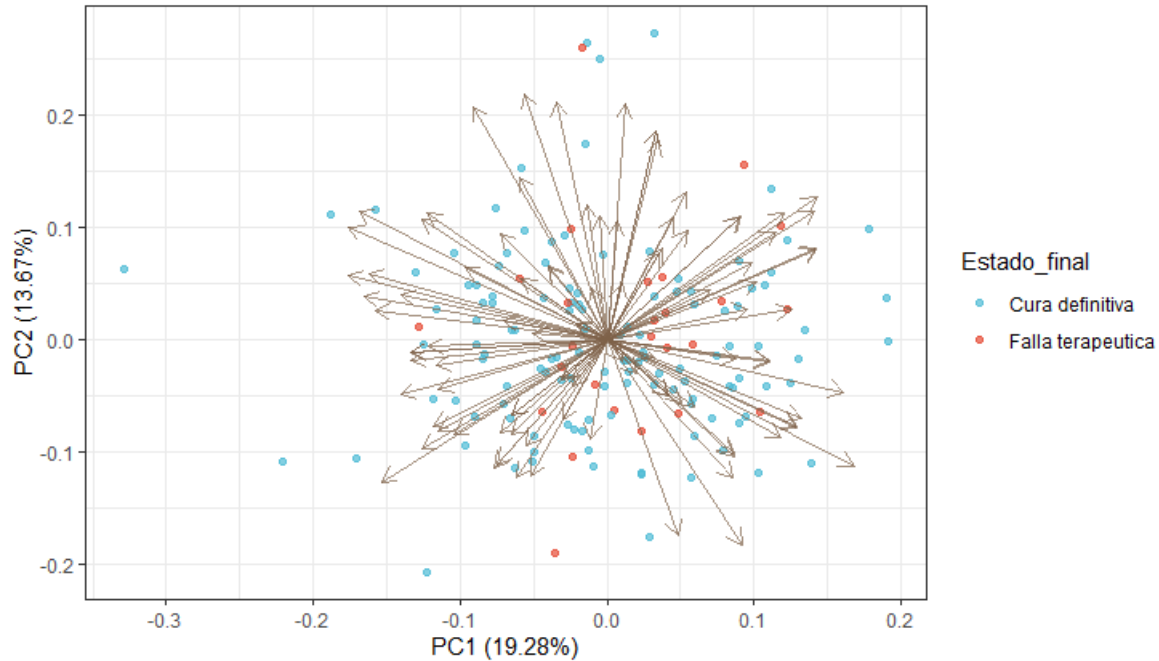
## Selección de parámetros del hemograma con capacidad para discriminar grupos de desenlace terapéutico

En el análisis PCA se obtuvieron un total de 95 componentes principales, de los cuales los primeros 15 componentes lograron explicar un 93% de la variabilidad de los datos. Estos 15 componentes fueron seleccionados a partir del screeplot (Figura 9) por lograr un porcentaje de explicación de la varianza mayor al 1%. Con un 5% de punto de corte en la explicación de la varianza se tendrían en cuenta los primeros 6 componentes principales que en conjunto lograrían explicar un 67% de la proporción acumulada de varianza explicada.



**Figura 9. Screeplot del PCA incluyendo todos los parámetros e índices del hemograma**

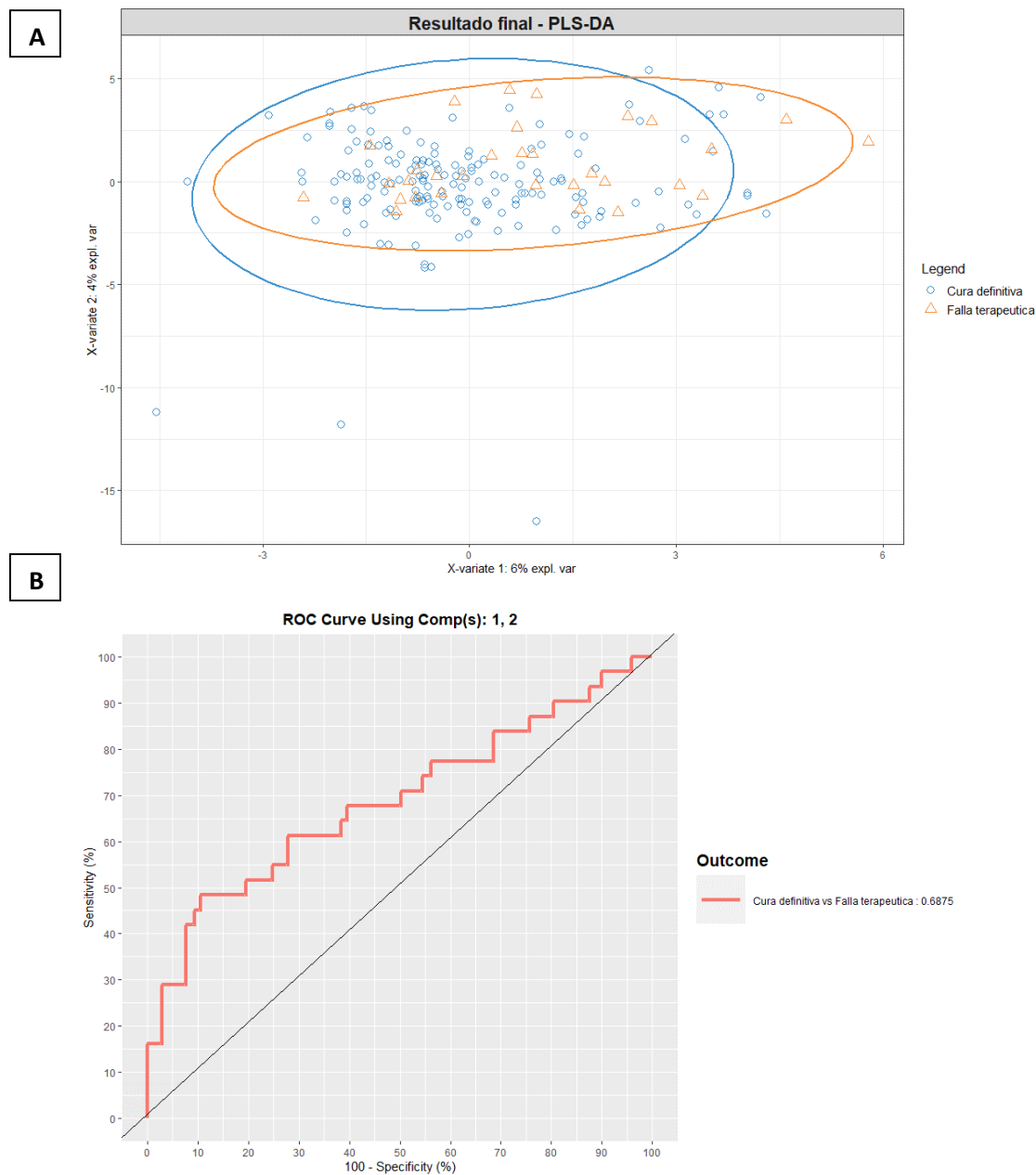
El PCA no logró disminuir la dimensionalidad de los datos ya que seleccionaba más de 50 parámetros del hemograma. Además, al graficar los componentes principales según el desenlace (cura o falla) no se observó que los parámetros del hemograma logaran discriminar el desenlace. (Figura 10).



**Figura 10. Gráfico de dispersión del PCA incluyendo todos los parámetros del hemograma y desenlace terapéutico.**

Al utilizar PLS-DA como método supervisado para la identificación de variables del hemograma asociadas a falla terapéutica, se identificó que se requerían dos componentes para lograr una discriminación aceptable del desenlace clínico con un AUC de 0,68 (Figura 11a y 11b) y un CV error de 0,16 y 0,17 para el primer y segundo componente respectivamente, los cuales sugieren un desempeño aceptable del modelo. De estos dos componentes, se identificaron 5 variables para el componente 1 (porcentaje de eosinófilos post-tratamiento, índice eosinófilos/neutrófilos post-tratamiento, plaquetas pre-tratamiento, eosinófilos post-tratamiento, e índice eosinófilos granulocitos post-tratamiento), y 9 variables para el componente 2 (razón de cambio de los leucocitos, razón de cambio de los monocitos, razón de cambio en el porcentaje de granulocitos, razón de cambio del índice granulocitos exponenciados / linfocitos, razón de cambio de eosinófilos pre-tratamiento, razón de cambio de los granulocitos pre-tratamiento, índice eosinófilos / granulocitos exponenciados pre-tratamiento, granulocitos pre-tratamiento exponenciados, y razón de cambio de los linfocitos). Por lo tanto, se seleccionaron

estos 14 parámetros del hemograma con potencial capacidad discriminatoria del desenlace clínico.



**Figura 11. Resultado del PLS-DA y desempeño del algoritmo de clasificación para predecir el desenlace terapéutico.** *Panel A)* Grupos de clasificación construidos por el PLS-DA. Cross validation error (CV error) de 0,16 para el primer componente y de 0,17 para el segundo componente por método de maximización de la distancia. *Panel B)* Curva ROC del modelo de clasificación generado por PLS-DA (AUC= 0.68)

## Análisis bivariado de factores asociados con falla terapéutica

El sexo, la edad, el tipo de lesión, la evolución de la lesión después del tratamiento y la infección concomitante pretratamiento fueron diferenciales entre los desenlaces terapéuticos (Tabla 6). El riesgo de falla fue superior en los hombres comparado con las mujeres (RR 3,85 IC95% 0,95-15,5) pero el intervalo de confianza no fue estadísticamente significativo, mientras que la edad medida como variable cuantitativa en años de vida cumplidos se asoció con un menor riesgo de falla (RR 0,97 IC95%: 0,95-1,00). Tener otro tipo de lesión diferente a placa o úlcera pretratamiento se asoció con un mayor riesgo en comparación con los que cursaban con una úlcera (RR 3,9 IC95% 1,87 – 8,16), además, aquellos que tenían úlcera pretratamiento y persistían con una úlcera al finalizar el tratamiento tuvieron mayor riesgo de fallar (RR 2,92 IC95%: 1,41 - 6,06). Así mismo, quienes tuvieron infección concomitante pretratamiento tuvieron un mayor riesgo (RR 2,95 IC95% 1,17 – 7,42).

No se encontraron diferencias significativas por tipo de tratamiento; sin embargo, la incidencia de falla fue menor con Miltefosine (12%) que con Glucantime® (16 %) o Glucantime® + Pentoxifilina (22%). Se observó un mayor riesgo de falla en pacientes con infecciones por *Leishmania (V) braziliensis* que *L. (V) panamensis* (RR 2,16; IC95%: 1,00 – 4,66) sin alcanzar significancia estadística. (Tabla 6).

**Tabla 6. Incidencias de falla terapéutica en subgrupos clínicos y análisis bivariado**

Características sociodemográficas	Cura (n = 169)	Falla (n = 31)	RR	IC	p
Sexo, n (%)					
Femenino	40 (95,2%)	2 (4,8%)	1		
Masculino	129 (81,7%)	29 (18,3%)	3,85	0,95 - 15,50	0,03
Edad, Me (RIQ)	34 (25 - 46)	26 (21 - 34)	0,97*	0,95 - 1,00	0,02
Edad por categorías, n (%)					
Entre 1 y 16 años	17 (80,95%)	4 (19,05%)	1,02	0,39 - 2,66	0,96
Entre 17 y 44 años	96 (81%)	22 (19%)	1		
Mayor o igual a 45 años	48 (90,57%)	5 (9,43%)	0,5	0,20 - 1,26	0,12
Etnia, n (%)					
Mestizos	56 (89%)	7 (11%)	1		
Afrocolombianos	100 (82%)	22 (18%)	1,62	0,73 - 3,59	0,21
Indígenas	12 (86%)	2 (14%)	1,28	0,29 - 5,54	0,72
<b>Características clínicas en la evaluación de base</b>					
Antecedente de Leishmaniasis, n (%)					
Si	1 (100%)	0			
No	168 (84%)	31 (16%)			
Tiempo de evolución de los síntomas en semanas, Me (RIQ)	4 (2 - 12)	4 (4 - 4)	0,92*	0,84 - 0,99	0,06

Tiempo de evolución categórica, n (%)					
Menor o igual a cuatro semanas con los síntomas	62 (83%)	13 (17%)	1,37	0,66 - 2,83	0,39
Más de cuatro semanas de síntomas	83 (87%)	12 (13%)	1		
Peso en kg, Me (RIQ)	68 (58 - 76)	67 (59 - 74)	1,00*	0,92 - 1,01	0,6
Talla en cm, Me (RIQ)	166 (158 - 172)	172 (161 - 174)	1,00*	0,98 - 1,03	0,8
Índice de masa corporal, Me (RIQ)	23.9 (21,8 - 27,5)	23.2 (21,0 - 25,4)	0,95	0,89 - 1,01	0,12
Categorías según índice de masa corporal, n (%)					
Entre 18 y 25 (Normal)	74 (80%)	18 (20%)	1		
Menor a 18 (Peso bajo)	22 (85%)	4 (15%)	0,78	0,29 - 2,12	0,62
Mayor que 25 (Sobrepeso y Obesidad)	65 (87,84%)	9 (12,16%)	0,62	0,29 - 1,30	0,19
Número de lesiones pretratamiento, Me (RIQ)	1 (1-3)	2 (1-2)	1,04*	0,88 - 1,22	0,63
Categorías según número de lesiones, n (%)					
Una lesión	85 (85%)	15 (15%)	1		
Dos lesiones	40 (82%)	9 (18%)	1,22	0,57 - 2,59	0,59
Tres o más lesiones	43 (86%)	7 (14%)	0,93	0,40 - 2,14	0,87
Tipo de lesión principal pretratamiento, n (%)					
Úlcera	146 (85%)	25 (15%)	1		
Placa	19 (90,5%)	2 (9,5%)	0,65	0,16 - 2,55	0,52
Otra	3 (42,86%)	4 (57,14%)	3,9	1,87 - 8,16	0,002
Presencia de linfadenopatía pretratamiento, n (%)					
No	139 (86%)	22 (14%)	1		
Si	29 (76%)	9 (24%)	1,73	0,86 - 3,45	0,12
Infección concomitante pretratamiento, n (%)					
No	165 (85%)	28 (15%)	1		
Si	4 (57%)	3 (43%)	2,95	1,17 - 7,42	0,04
Presencia de comorbilidades, n (%)					
No	161 (85%)	29 (15%)	1		
Si	8 (80%)	2 (20%)	1,31	0,36 - 4,73	0,68
Numero de comorbilidades por paciente, Me (RIQ)	1 (1-2)	1 (1-1,5)	0,82*	0,06 - 3,05	0,8
Especie parasitaria aislada, n (%)					
<i>Leishmania (Viannia) panamensis</i>	110 (85%)	20 (15%)	1		
<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	12 (67%)	6 (33%)	2,16	1,00 - 4,66	0,06
<i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	1 (100%)	0			
<i>Leishmania Viannia spp.</i>	4 (100%)	0			
Tratamiento prescrito, n (%)					
Glucantime®	80 (84%)	15 (16%)	1		
Glucantime® + Pentoxifilina®	28 (78%)	8 (22%)	1,4	0,65 - 3,03	0,38
Miltefosine®	61 (88%)	8 (12%)	0,73	0,32 - 1,63	0,44

Rango terapéutico de medicamento antileishmanial, n (%)					
Normal	148 (85%)	26 (15%)	1		
Supra dosis (>20 mg/kg/día para Glucantime® o >2.5 mg/kg/día para Miltefosine)	19 (79%)	5 (21%)	1,39	0,59 - 3,28	0,45
Infradosis (<10 mg/kg/día para Glucantime® o <1.5 mg/kg/día para Miltefosine)	2 (100%)	0			
<b>Evaluación de fin de tratamiento</b>					
Evolución de la lesión principal (Variación pretratamiento - postratamiento), n (%)					
Úlcera - Placa	91 (89%)	11 (11%)	1		
Úlcera - Úlcera	26 (68%)	12 (32%)	2,92	1,41 - 6,06	0,003
Otros cambios	25 (81%)	6 (19%)	1,79	0.67 - 4.33	0,2
Presencia de linfadenopatía postratamiento, n (%)	0	1 (100%)			
Infección concomitante postratamiento, n (%)					
No	165 (85%)	29(15%)	1		
Si	3 (60%)	2 (40%)	2,67	0,86 - 8,24	0,12
Porcentaje de adherencia al tratamiento, Media (SD)	99,74 (1,44)	99,72 (1,08)			
* Para las variables numéricas se calculó el RR utilizando un modelo regresión log-binomial o regresión robusta de Poisson					

Se determinó que las variables clínicas y sociodemográficas de importancia para la construcción de modelos multivariados fueron el sexo ( $p=0,03$ ), la edad ( $p=0,02$ ), el tipo de lesión pre-tratamiento ( $p=0,002$ ), la variación en las características de la lesión post-tratamiento ( $p=0,003$ ), la presencia de infección concomitante pre-tratamiento ( $p=0,04$ ), el tiempo de evolución ( $p=0,06$ ) y la especie parasitaria ( $p=0,06$ ). Adicionalmente, el tipo de tratamiento ( $p>0,2$ ), la presencia de linfadenopatía pre-tratamiento ( $p=0,12$ ) y la co-infección post-tratamiento ( $p=0,12$ ) fueron seleccionadas por plausibilidad biológica.

Dentro de las variables del hemograma pre-tratamiento seleccionadas por el PLS-DA, se encontró asociación estadística entre las plaquetas pre-tratamiento y la falla terapéutica (RR 0,99 IC95% 0,98 – 0,99). Además, aunque el intervalo de confianza del RR entre granulocitos pre-tratamiento y falla cruzó el punto de no significancia (RR 0,06 IC95% 0,003 – 1,06), el test de wald fue significativo ( $p=0,05$ ) con un valor de  $q=0,3$  para la diferencia de incidencia de falla. No se encontraron diferencias ni asociaciones estadísticamente significativas para los eosinófilos pre-tratamiento ni el índice eosinófilos/granulocitos ( $p>0,05$  y  $q>0,3$ ). En los hemogramas post-tratamiento se encontraron asociaciones significativas entre la falla y el porcentaje de eosinófilos (RR 1,05 IC95% 1,02 – 1,09), el conteo de eosinófilos (RR 1,54 IC95%: 1,03 – 2,30), el índice eosinófilos/neutrófilos (RR 3,72 IC95%: 1,60-8,62) y

el índice eosinófilos/granulocitos (RR 1,55 IC95% 1,02 – 2,34). Aunque la asociación entre la razón de cambio de los monocitos y la falla terapéutica cruzó el valor nulo por intervalo de confianza (RR 2,10 IC95% 0,90 – 4,89), el valor p del análisis bivariado fue de 0,04 en el test de U-Mann Whitney con un valor q=0,3 por lo que se decidió mantener esta variable para los modelos multivariados. El resto de razones de cambio sugeridas por el PLS-DA no demostraron diferencias ni asociaciones estadísticamente significativas (Tabla 7).

#### *Parámetros del hemograma finales seleccionados como potenciales discriminantes del desenlace terapéutico*

Tras completar el análisis bivariado de los parámetros del hemograma se seleccionaron para la construcción de modelos multivariados, solo aquellos que fueron sugeridos por el PLS-DA y además mostraron un grado importante de significancia estadística (valor p < 0.1 y/o valor q ≤ 0,3) en las tablas comparativas. Del hemograma pre-tratamiento se seleccionaron el conteo absoluto de granulocitos y el conteo de plaquetas. Del hemograma post-tratamiento se seleccionaron el conteo absoluto de eosinófilos, el porcentaje de eosinófilos, el índice eosinófilos/neutrófilos, el índice eosinófilos/granulocitos inmaduros exponenciados y la razón de cambio de los monocitos.

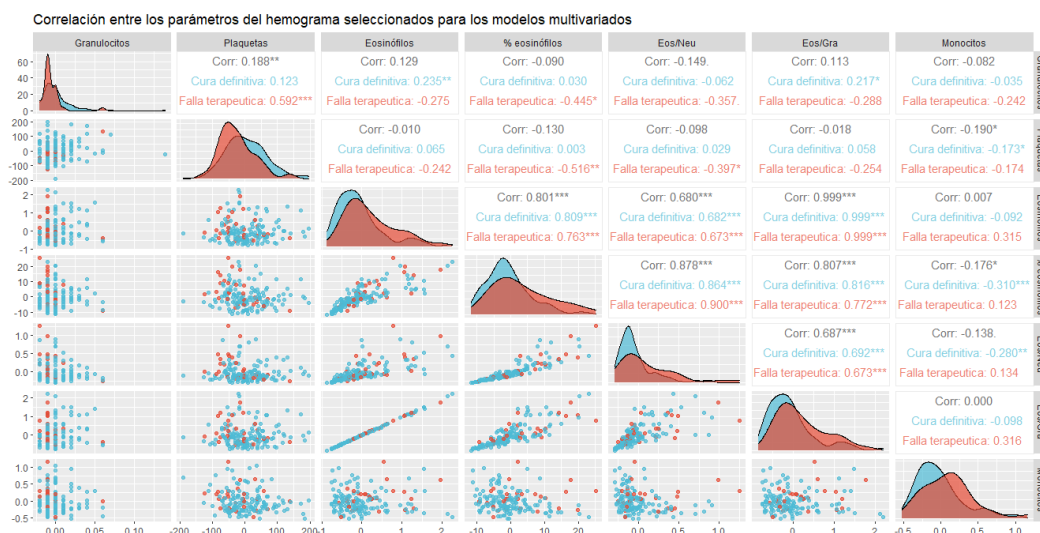
#### *Análisis de correlación entre los parámetros del hemograma seleccionados*

Independientemente del desenlace terapéutico, no se identificó colinealidad entre los parámetros del hemograma pre-tratamiento (granulocitos pre-tratamiento y plaquetas pre-tratamiento), ni de su combinación con cualquiera de las variables del hemograma post-tratamiento (índices de correlación  $r < 0,2$ ). Contrariamente, en los hemogramas post-tratamiento se identificó correlación fuerte entre el conteo absoluto de eosinófilos y el porcentaje de eosinófilos ( $r = 0,80$ ), conteo o porcentaje de eosinófilos con el índice eosinófilos/neutrófilos ( $r=0,68$  y  $r=0,87$ , respectivamente), y eosinófilos con el índice eosinófilos/granulocitos inmaduros exponenciados ( $r=0,99$  y  $r=0,80$ ), por lo que para la construcción de modelos multivariados se decidió incluir solamente el porcentaje de eosinófilos y el índice de variación de los monocitos, y una vez definido el modelo final evaluar el impacto de reemplazar el porcentaje de eosinófilos por sus parámetros colineales (Figura 12).

**Tabla 7.** Análisis bivariado de los parámetros del hemograma seleccionados por el PLS-DA

Variables	Cura definitiva Me (RIQ)	Falla terapéutica Me (RIQ)	RR (IC95%)	valor p	valor q
<b>Parámetros del hemograma correlacionados con el primer componente</b>					
<b>Parámetros pre-tratamiento</b>					
Conteo de plaquetas pre-tratamiento, x 10 <sup>3</sup> células/μL	270 (232 - 316)	242 (212 - 268)	0,99 (0,98 - 0,99)	0,01	0,3
<b>Parámetros post-tratamiento</b>					
Porcentaje de eosinófilos, %	11 (7 - 15)	14 (10 - 21)	1,05 (1,02 - 1,09)	0,02	0,3
Índice Eosinófilos / Neutrófilos	0,21 (0,14 - 0,33)	0,29 (0,17 - 0,58)	3,72 (1,60 - 8,62)	0,02	0,3
Conteo de eosinófilos post-tratamiento, x 10 <sup>3</sup> células/μL	0,73 (0,41 - 1,06)	0,92 (0,67 - 1,45)	1,54 (1,03 - 2,30)	0,02	0,3
Índice Eosinófilos/Granulocitos inmaduros exponenciados	0,73 (0,41 - 1,04)	0,91 (0,65 - 1,42)	1,55 (1,02 - 2,34)	0,02	0,3
<b>Parámetros del hemograma correlacionados con el segundo componente</b>					
<b>Parámetros pre-tratamiento</b>					
Conteo de eosinófilos pre-tratamiento, x 10 <sup>3</sup> células/μL	0,52 (0,25 - 0,86)	0,53 (0,30 - 0,84)	0,94 (0,64 - 1,65)	0,5	0,9
Conteo de granulocitos pre-tratamiento, x 10 <sup>3</sup> células/μL	0,02 (0,01 - 0,03)	0,01 (0,01 - 0,02)	0,06 (0,003 - 1,06)**	0,01	0,3
Índice eosinófilos / granulocitos inmaduros exponenciados	0,51 (0,25 - 0,85)	0,52 (0,29 - 0,84)	0,95 (0,53 - 1,68)	0,5	0,9
<b>Parámetros post-tratamiento</b>					
Razón de cambio de los leucocitos	0,97 (0,80 - 1,15)	1,02 (0,92 - 1,17)	2,78 (0,95 - 8,13)	0,1	0,5
Razón de cambio de los monocitos	0,94 (0,79 - 1,15)	1,11 (0,84 - 1,29)	2,10 (0,90 - 4,89)	0,04	0,4
Razón de cambio en el porcentaje de granulocitos inmaduros	1,02 (0,88 - 1,25)	0,97 (0,85 - 1,09)	0,34 (0,09 - 1,28)	0,2	0,6
Razón de cambio en el índice Granulocitos inmaduros exponenciados / Linfocitos	1,34 (1,00 - 1,87)	1,23 (1,01 - 1,56)	0,67 (0,36 - 1,25)	0,3	0,8
Razón de cambio de los linfocitos	0,74 (0,54 - 1,02)	0,81 (0,65 - 1,00)	1,49 (0,55 - 4,02)	0,4	0,8
* Valor del RR sin ajustar, calculado mediante regresión log-binomial univariada.					
** Para facilitar la interpretabilidad del RR, se modificó la unidad de medida, donde cada unidad equivale a 10 <sup>2</sup> células/μL en lugar de 10 <sup>3</sup> células/μL					





**Figura 12. Correlación entre los parámetros del hemograma finales seleccionados para la construcción de modelos multivariados.** Se presentan en orden las correlaciones entre Granulocitos pre-tratamiento, Plaquetas pre-tratamiento, Eosinófilos post-tratamiento, Porcentaje de eosinófilos post-tratamiento, Índice eosinófilos – neutrófilos post-tratamiento, Índice eosinófilos – granulocitos post-tratamiento, Razón de cambio de los monocitos. \* = algún grado de correlación débil. \*\* = correlación moderada. \*\*\* = correlación fuerte o muy fuerte.

De los parámetros del hemograma seleccionados se obtuvieron los siguientes puntos corte: granulocitos pretratamiento  $\leq 0,01 \times 10^3$  células/ $\mu$ L (método de Youden), plaquetas pretratamiento  $\leq 250 \times 10^3$  cél/uL (definición clínica), conteo de eosinófilos postratamiento  $\geq 0,92 \times 10^3$  cél/uL, porcentaje de eosinófilos postratamiento  $\geq 14\%$ , índice eosinófilos/granulocitos inmaduros postratamiento  $\geq 0,93$  y razón de cambio de los monocitos  $\geq 1,07$  (todos por método de Youden). El índice eosinófilos/neutrófilos  $\geq 0,3$  se seleccionó por método manual. Con excepción del conteo absoluto de eosinófilos post-tratamiento, todos los parámetros mostraron asociaciones estadísticamente significativas con falla terapéutica (Tabla 8). En la Tabla 9 se resume el desempeño de los puntos de corte.

<b>Tabla 8. Riesgo relativo de falla terapéutica según los puntos de corte definidos para cada potencial biomarcador del hemograma</b>			
<b>Parámetro del hemograma</b>	<b>RR</b>	<b>IC95%</b>	<b>valor p</b>
<b>Parámetros pre-tratamiento</b>			
Conteo de granulocitos $\leq 0,01 \times 10^3$ cél/ $\mu$ L	2,25	1,12 - 4,53	0,01
Conteo de plaquetas $\leq 250 \times 10^3$ cél/ $\mu$ L	2,13	1,09 - 4,15	0,02
<b>Parámetros post-tratamiento</b>			
Conteo de eosinófilos post-tratamiento $\geq 0,92 \times 10^3$ cél/ $\mu$ L	1,87	0,96 - 3,66	0,06
Porcentaje de eosinófilos $\geq 14\%$	2,28	1,17 - 4,46	0,01
Índice Eosinófilos / Neutrófilos $\geq 0,3$	1,98	1,01 - 3,85	0,04
Índice Eosinófilos/Granulocitos inmaduros exponenciados $\geq 0,93$	2,01	1,03 - 3,93	0,03
Razón de cambio de los monocitos $\geq 1,07$	2,47	1,23 - 4,99	0,008

**Tabla 9. Determinación de los puntos de corte para los potenciales biomarcadores predictores de falla terapéutica**

Variable del hemograma	Método	Punto de corte	AUC	AUC IC95%	Sensibilidad	Especificidad
<b>Parámetros pre-tratamiento</b>						
Conteo de granulocitos pre-tratamiento, x 10 <sup>3</sup> células/ $\mu$ L	maximize_boot_metric	$\leq 0,01$	0,63	0,54 - 0,73	67,74%	55,56%
	oc_youden_kernel	$\leq 0,01$	0,63	0,59 - 0,70	67,74%	55,56%
	oc_manual:	$\leq 0,02$	0,63	0,58 - 0,75	93,55%	25,93%
Conteo de plaquetas pre-tratamiento, x 10 <sup>3</sup> células/ $\mu$ L	maximize_boot_metric	$\leq 251,74$	0,64	0,55 - 0,74	61,59%	60,98%
	oc_youden_kernel	$\leq 259,06$	0,64	0,58 - 0,75	64,52%	57,32%
	oc_manual:	$\leq 250$	0,64	0,57 - 0,77	61,29%	60,98%
<b>Parámetros post-tratamiento</b>						
Conteo de eosinófilos post-tratamiento 10 <sup>3</sup> células/ $\mu$ L	maximize_boot_metric	$\geq 0,73$	0,63	0,53 - 0,69	64,29%	50,36%
	oc_youden_kernel	$\geq 0,92$	0,63	0,60 - 0,74	50,00%	70,50%
	oc_manual:	$\geq 0,9$	0,63	0,56 - 0,71	50,00%	66,91%
Porcentaje de eosinófilos, %	maximize_boot_metric	$\geq 15,26$	0,63	0,54 - 0,70	39,29%	77,70%
	oc_youden_kernel	$\geq 15,49$	0,63	0,54 - 0,81	39,29%	78,42%
	oc_manual:	$\geq 14$	0,63	0,62 - 0,79	53,57%	70,50%
Índice Eosinófilos / Neutrófilos	maximize_boot_metric	$\geq 0,39$	0,63	0,50 - 0,70	35,71%	80,88%
	oc_youden_kernel	$\geq 0,33$	0,63	0,52 - 0,74	42,86%	75,00%
	oc_manual:	$\geq 0,3$	0,63	0,53 - 0,70	50,00%	69,85%
Índice Eosinófilos/Granulocitos inmaduros exponenciados	maximize_boot_metric	$\geq 0,71$	0,63	0,55 - 0,75	67,86%	49,28%
	oc_youden_kernel	$\geq 0,93$	0,63	0,60 - 0,74	50,00%	70,29%
	oc_manual:	$\geq 0,7$	0,63	0,57 - 0,80	67,86%	49,28%
Razón de cambio de los monocitos	maximize_boot_metric	$\geq 1,09$	0,62	0,50 - 0,66	59,26%	70,29%
	oc_youden_kernel	$\geq 1,07$	0,62	0,52 - 0,73	59,26%	67,39%
	oc_manual:	$\geq 1,1$	0,62	0,50 - 0,74	59,26%	70,29%

**Puntos de corte estimados utilizando la librería de R "cutpointr"**

- A) maximize\_boot\_metric: Se maximizó una función métrica resumen a partir de diferentes puntos de corte óptimos que se obtuvieron por muestreo múltiple (bootstrap).
- B) oc\_youden\_kernel: Se maximizó el índice de Youden después de suavizar las distribuciones del desenlace
- C) oc\_manual: Se establece un punto de corte de manera arbitraria y se evalúa la sensibilidad y especificidad del modelo

## Análisis multivariado de los factores asociados con falla terapéutica

### *Análisis multivariado de los factores pre-tratamiento asociados a falla terapéutica*

De los parámetros del hemograma pre-tratamiento, el conteo absoluto de granulocitos y las plaquetas se asociaron en forma independiente con falla terapéutica. (Tabla 10). Un conteo de granulocitos pre-tratamiento  $\leq 0,01 \times 10^3 \mu\text{L}$  tuvo 2 veces el riesgo de falla terapéutica (RR 2,11 IC95%: 1,08 – 4,11) que un conteo mayor. Aunque las plaquetas se asociaron en el análisis univariado, al ajustar por las demás variables del modelo no se encontró significancia estadística para esta variable (RR 1,95: IC95% 1,00 – 3,79; valor p 0,04). Respecto a las variables clínicas y sociodemográficas, la presencia de infección concomitante incrementó 2,5 veces el riesgo de falla (RR 2,51 IC95%: 1,12 – 5,61), mientras que la edad actúa como un factor protector. Se encontró que cada año de vida adicional se asoció con una disminución del 4% en la probabilidad de falla terapéutica (RR 0.96 CI95%: 0.93 – 0.98) (Tabla 10). Otros modelos fueron menos parsimoniosos y no mostraron un mejor desempeño que el modelo multivariado elegido (Tabla Anexo 6)

<b>Tabla 10.</b> Modelo multivariado de factores pretratamiento asociados con falla terapéutica			
<b>Variables</b>	<b>RR Ajustado</b>	<b>IC</b>	<b>valor p</b>
Sexo masculino (Ref: Femenino)	3,06	0,81 - 11,56	0,09
Edad en años	0,96	0,93 - 0,98	0,001
Conteo granulocitos $\leq 0,01 \times 10^3 \text{ cél}/\mu\text{L}$	2,11	1,08 - 4,11	0,02
Plaquetas pre-tratamiento $\leq 250 \times 10^3 \text{ cél}/\mu\text{L}$	1,95	1,00 - 3,79	0,04
Presencia de adenopatía pretratamiento (Ref: No)	1,69	0,88 - 3,24	0,11
Infección concomitante pre-tratamiento (Ref: No)	2,51	1,12 - 5,61	0,02

### *Análisis multivariado de los factores post-tratamiento asociados a falla terapéutica*

Respecto a los parámetros del hemograma post-tratamiento, el porcentaje de eosinófilos  $\geq 14\%$  se asoció a dos veces el riesgo de falla (RR 2,01 IC95% 1,05 – 3,82) y la razón de cambio de los monocitos  $\geq 1,07$  se asoció a 3 veces el riesgo de falla terapéutica (RR 3,15 IC95%: 1,63 – 6,10). Al reemplazar el porcentaje de eosinófilos por los parámetros correlacionados, no se apreció un mejor desempeño del modelo y ninguno de los parámetros se asoció significativamente con la falla. Al igual que en el modelo pre-tratamiento, la edad se asoció con un menor riesgo de falla terapéutica y el sexo fue significativo para el modelo, pero no se asoció con el desenlace terapéutico. Adicionalmente, la presencia de adenopatía pre-tratamiento y tener co-infección al finalizar el tratamiento se asoció con un mayor riesgo de falla (RR 6,14 IC95% 1,15 – 32,71). Al igual que en el caso anterior, otros modelos no mostraron mejores desempeños y fueron menos parsimoniosos (Tabla anexo 7).

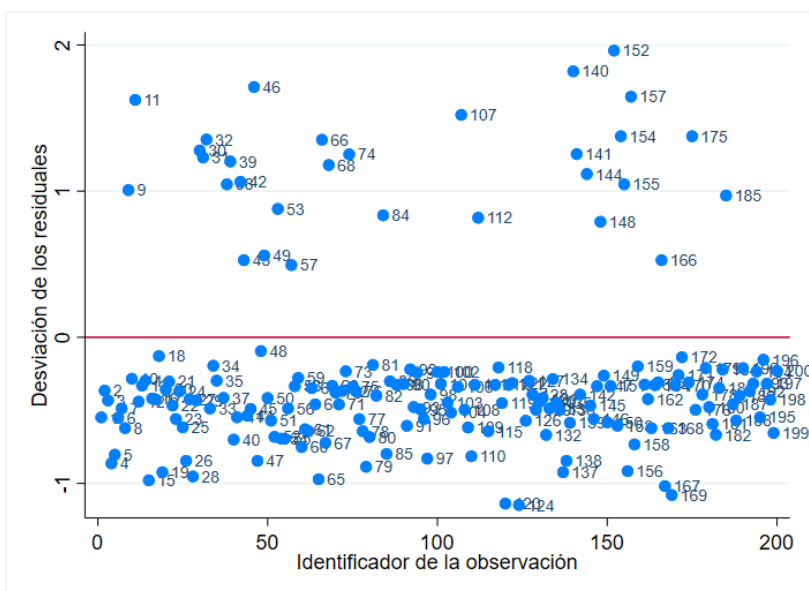
<b>Tabla 11. Modelo multivariado final para los parámetros del hemograma post-tratamiento</b>			
<b>Variables</b>	<b>Mejor modelo multivariado</b>		
	<b>RR</b>	<b>IC</b>	<b>valor p</b>
Sexo masculino (Ref: Femenino)	3,23	0,87 - 11,85	0,07
Edad en años	0,96	0,94 - 0,98	<0,001
Porcentaje de eosinófilos $\geq 14\%$	2,01	1,05 - 3,82	0,03
Razón de cambio de los monocitos $\geq 1,07$	3,15	1,63 - 6,10	0,001
Conteo de eosinófilos post-tratamiento $\geq 0,92 \times 10^3$ cél/ $\mu$ L	1,57**	0,75 - 3,27	0,22
Índice Eosinófilos/Granulocitos inmaduros exponenciados $\geq 0,93$	1,63**	0,77 - 3,43	0,19
Índice Eosinófilos / Neutrófilos $\geq 0,3$	1,79**	0,91 - 3,49	0,08
Infección concomitante al final del tratamiento , (Ref: No)	6,14	1,15 - 32,71	0,03
Presencia de adenopatía pretratamiento (Ref: No)	2,19	1,17 - 4,11	0,01
** RR obtenido al reemplazar esta variable por el porcentaje de eosinófilos y ajustar por las demás variables del modelo			

### *Análisis post-regresión*

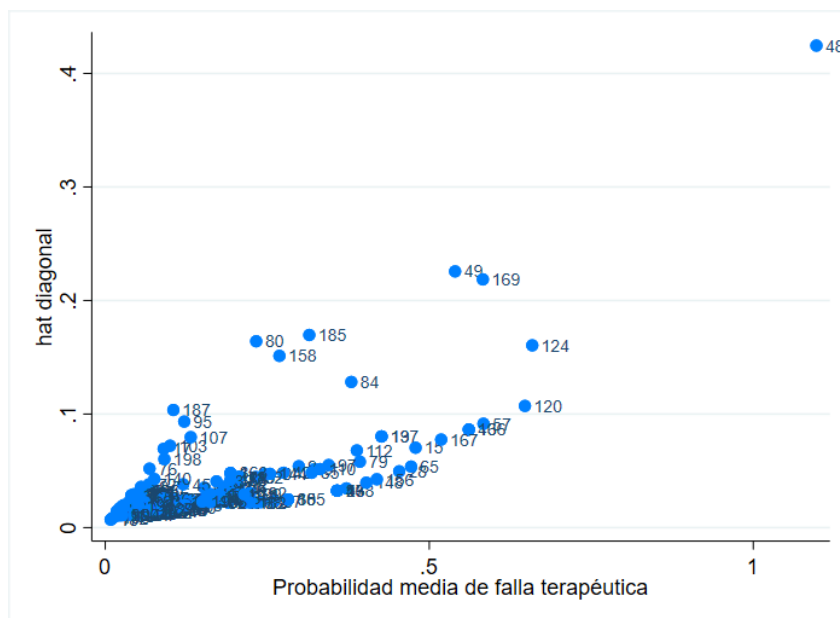
#### - Modelo multivariado pre-tratamiento

La bondad de ajuste del modelo multivariado pre-tratamiento (tabla 10) fue de 0,5 por el estadístico de desviación D (*deviance statistic D*) y de 0,72 por el estadístico  $X^2$  de Pearson, sugiriendo un buen ajuste. Al graficar la desviación de los residuales no se identificaron observaciones que se desviaran a más de dos desviaciones estándar (Figura 13), sin embargo, al comprobar el apalancamiento (Figura 14) se apreció que la observación 48 presentaba una probabilidad predicha de falla por encima de 1 (la cual es una de las limitantes descritas para los modelos de regresión robusta de Poisson cuando se trabajan variables con resultados dicotómicos [102]), por lo que se procedió a verificar los datos del participante. Correspondía a un paciente masculino de 21 años de edad, que consultó con cuadro de menos de 4 semanas de evolución, con una úlcera pre-tratamiento sobreinfectada, recibió tratamiento con Glucantime + Pentoxifilina en el contexto de un ensayo clínico, al finalizar el tratamiento seguía presentando la úlcera, no tuvo adenopatía concomitante pero si tenía granulocitos pre-tratamiento  $< 0,01 \times 10^3$  cél/uL, plaquetas pre-tratamiento  $< 250 \times 10^3$  cél/uL, eosinófilos post-tratamiento  $> 14\%$ , con un conteo de eosinófilos  $> 0,92 \times 10^3$  cél/uL, un índice eosinófilos/neutrófilos  $> 0,3$  y eosinófilos/granulocitos  $> 0,92$ , con una razón de cambio de monocitos  $< 1,07$ . El paciente presentó desenlace de falla terapéutica. Aunque todos los datos eran concordantes con los de la historia clínica, se retiró la observación y se volvió a correr el modelo multivariado, observando que no se produjo ninguna variación importante en los riesgos relativos estimados por el modelo (todas las variaciones fueron menores al 5%), por lo que se descartó que existiera apalancamiento por

esta observación y se decidió mantenerla en el modelo. Finalmente, al evaluar la especificación del modelo mediante el link test para modelos de una sola ecuación se obtuvo un valor de p en el  $\hat{h}^2$  de 0,12, confirmando una buena especificación.



**Figura 13. Desviación de los residuales en el modelo multivariado pre-tratamiento.**



**Figura 14. Análisis de apalancamiento para el modelo multivariado pre-tratamiento.** Se aprecia que la observación 48 tiene una probabilidad predicha de falla por encima de 1.

- Modelo multivariado post-tratamiento

La bondad de ajuste del modelo post-tratamiento fue de 0,49 por el estadístico D y de 0,75 por el estadístico  $X^2$  de Pearson, compatible con un buen ajuste. El análisis gráfico de los de los residuales no evidencia ninguna observación desviándose a más de 2 desviaciones estándar (Figura 15). Sin embargo, al revisar la gráfica de apalancamiento (Figura 16) se identificaron 4 observaciones que podrían estar afectando el modelo (obs 43, 57, 132 y 152). El primer y segundo paciente correspondieron a dos hombres de 28 y 27 años respectivamente, con probabilidades de falla cercanas a 1 según el modelo, quienes consultaron con cuadro clínico de más de 4 semanas de evolución, tenían adenopatía en la valoración pre-tratamiento, fueron tratados con Glucantime y Glucantime + Pentoxifilina respectivamente, y presentaron alteración tanto en los granulocitos y plaquetas pre-tratamiento, como en los eosinófilos, índices de eosinófilos y razón de cambio de los monocitos post-tratamiento. Los dos fallaron al finalizar el tratamiento. El tercer paciente correspondió a un hombre de 21 años de edad, infectado con *L (V) braziliensis*, que consultó con una ulcera sin adenopatía, tratado con glucantime, presentó sobreinfección a finalizar el tratamiento, sin ninguna alteración en el hemograma pre-tratamiento y post-tratamiento, quien presento cura al finalizar el seguimiento. Finalmente, el cuarto paciente fue un hombre de 50 años, con más de 4 semanas de síntomas, que consultó por una ulcera con presencia de adenopatía, con coinfección al finalizar el tratamiento, sin alteraciones en el hemograma pre y post-tratamiento, quien presentó falla al tratamiento con Miltefosine. Se retiraron las 4 observaciones del modelo y se generó uno nuevo sin encontrar variaciones de más del 10% en las estimaciones de los riesgos relativos, por lo que se descartó apalancamiento. Posteriormente, se calculó el valor de  $p$  del  $\text{hat}^2$  con un valor de 0,09 por lo que se consideró buena especificación del modelo post-tratamiento.

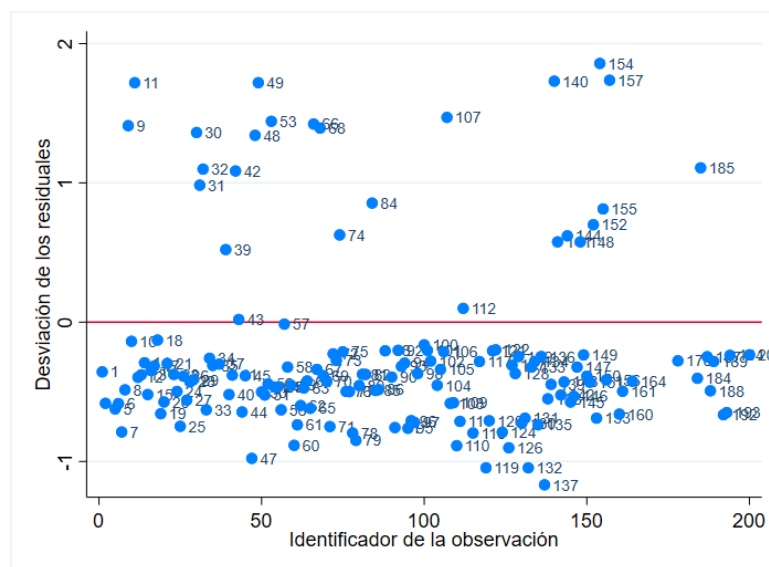
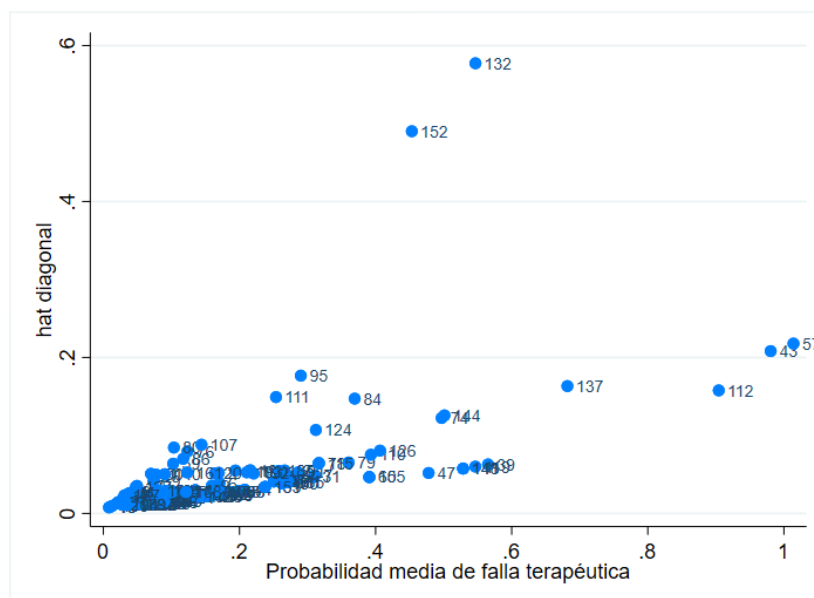


Figura 15. Desviación de los residuales en el modelo multivariado pre-tratamiento.



**Figura 16. Desviación de los residuales en el modelo multivariado pre-tratamiento.**

### **Imputación múltiple y comparación de modelos tras la imputación de datos faltantes**

Utilizando como variables independientes el sexo, tratamiento y estado final, se utilizó regresión multivariada para crear 20 sets con datos de imputación múltiple. Se imputaron datos de edad para ocho participantes, adenopatía e infección post-tratamiento para un participante, granulocitos pre-tratamiento para siete participantes, plaquetas pre-tratamiento para cinco participantes, eosinófilos post-tratamiento para treinta y tres participantes y razón de cambio de monocitos para treinta y cinco participantes.

Posteriormente se corrió el modelo multivariado pre-tratamiento y post-tratamiento con los sets de datos imputados ( $n=200$ ) y no se encontraron cambios en la direccionalidad de las fuerzas de asociación. Sin embargo, la significancia estadística de todas las variables desapareció al utilizar el set de datos imputados en el modelo pretratamiento (Tabla 12), mientras que en los modelos post-tratamiento, la significancia se mantuvo para los parámetros del hemograma, pero desapareció para los datos clínicos y sociodemográficos (Tabla 13).



**Tabla 12.** Modelo multivariado pre-tratamiento con el set de imputados

<b>Variables</b>	<b>RR ajustado</b>	<b>IC</b>	<b>valor p</b>
Sexo masculino (Ref: Femenino)	3,24	0,75 - 13,90	0,11
Edad, (Centrada sobre la media de 33 años)	0,95	0,93 - 0,98	0,005
Conteo granulocitos $\leq 0,01 \times 10^3$	2,02	0,94 - 4,34	0,07
Plaquetas pre-tratamiento $\leq 250 \times 10^3$ cél/uL	2,17	0,96 - 4,89	0,06
Presencia de adenopatía pretratamiento (Ref: No)	1,83	0,83 - 4,05	0,13
Infección concomitante pre-tratamiento (Ref: No)	2,60	0,75 - 8,95	0,13

**Tabla 13.** Modelo multivariado post-tratamiento con el set de datos imputados

<b>Variables</b>	<b>RR ajustado</b>	<b>IC</b>	<b>valor p</b>
Sexo masculino (Ref: Femenino)	3,73	0,87 - 16,02	0,07
Edad, (Centrada sobre la media de 33 años)	0,96	0,94 - 0,99	0,01
Porcentaje de eosinófilos $\geq 14\%$	2,24	1,05 - 4,79	0,03
Razón de cambio de los monocitos $\geq 1,07$	2,97	1,40 - 6,27	0,004
Presencia de adenopatía pretratamiento (Ref: No)	2,12	0,91 - 4,95	0,08
Infección concomitante post-tratamiento (Ref: No)	5,19	0,93 - 28,88	0,06

## DISCUSION

El objetivo de esta investigación era explorar la utilidad de los parámetros del hemograma como biomarcadores tempranos de desenlaces terapéuticos en las LCs. Se encontró que el conteo de granulocitos inmaduros pre-tratamiento, el porcentaje de eosinófilos post-tratamiento y la razón de cambio de los monocitos post-tratamiento se asocian con la falla terapéutica y podrían ser utilizados tempranamente para identificar pacientes con un mayor riesgo de falla.

### *Incidencia de falla terapéutica y factores clínicos y sociodemográficos asociados.*

La incidencia de falla en valoraciones de semana 13 o posteriores fue del 15,50% (IC95%: 11,09% – 21,23%), dato que concuerda con la incidencia reportada del 15,65% (IC95% 14,48 – 29,58) en otro estudio similar realizado en CIDEIM que incluía pacientes atendidos entre 2007 y 2013 [54,62], lo que sugiere poca variabilidad en las tasas de falla terapéutica durante los últimos siete años. En esta investigación se excluyeron pacientes que tuvieron poca adherencia (<90%) a los tratamientos antileishmaniales, por lo que los datos de incidencia aquí reportados hacen referencia a población con LC que ha sido adherente al tratamiento y puede estar subestimada debido a que la no adherencia es un factor de riesgo conocido para fallar [62,66].

Adicionalmente, en este nuevo estudio se exploró la incidencia de falla terapéutica para cada uno de los momentos de seguimiento en población del sur-occidente colombiano, el cual es un dato que no había sido reportado previamente en la literatura. Llama la atención que tan solo un 4,93% (IC95% 2,35 - 10,30) de los pacientes que habían curado a semana 13 presentaron falla terapéutica en la semana 26, sugiriendo que un momento informativo para evaluar la respuesta terapéutica en Colombia es la visita de semana 13 ya que hasta un 95% de los pacientes tendrán el desenlace terapéutico definitivo en esta valoración.

Respecto al tipo de tratamiento, no se encontraron diferencias significativas en la incidencia de falla terapéutica entre los diferentes esquemas evaluados ( $p > 0,3$ ). La incidencia de falla en los pacientes tratados con Glucantime® (16%) fue similar a la reportada en un estudio previo realizado en el 2005 con pacientes del Urabá y Magdalena Medio en el que se reportó falla en el 19% de los pacientes valorados tras un primer ciclo de tratamiento con antimoniales [14], sin embargo fue menor a la reportada en un ensayo de no inferioridad realizado en CIDEIM con población pediátrica en el que se reportó un 31% de incidencia [58] y a la de otro estudio realizado en cuatro centros de atención ubicados en áreas endémicas de Colombia, en el que se reportó que el 8% de los pacientes que eran completamente adherentes

al tratamiento presentaban falla, mientras que en los que recibían tratamiento subóptimo la cifra ascendía hasta un 50% [113].

En los pacientes que recibieron Glucantime® más Pentoxifilina, la incidencia de falla fue del 22%. Aunque esta combinación no es un tratamiento de uso rutinario en la práctica clínica, su uso ha sido propuesto en estudios clínicos debido al potencial efecto inmunomodulador de la Pentoxifilina sobre el TNF y una aparente reducción en el proceso de vacuolización de los macrófagos, induciendo una destrucción más efectiva del parásito y disminuyendo la inflamación [114]. En un estudio reciente realizado en Brasil se reportó una tasa de curación del 66,66% en pacientes con antimoniales más Pentoxifilina [115], lo que sugiere una mayor incidencia de falla que en nuestra población. Sin embargo, dado que la incidencia de falla en el grupo de Pentoxifilina fue superior a la de Glucantime® y Miltefosine su uso no parece ser una alternativa prometedora.

La incidencia de falla en los pacientes que recibieron Miltefosine y fueron incluidos en este estudio (12%) fue considerablemente más baja que la reportada en un ensayo clínico colombiano realizado en población militar en el que se reportó un porcentaje de falla entre un 30-40% en los pacientes atendidos con Miltefosine [116], pero ligeramente superior a la estimada en la cohorte previa de CIDEIM (8,92%) en la que se incluían pacientes atendidos entre 2007 y 2013 [54,62]. Esta variación en la incidencia probablemente se explica por el hecho de que esa cohorte incluía una mayor proporción de pacientes pediátricos que usualmente responden mejor al tratamiento con Miltefosine que con Glucantime®, mientras que el estudio actual incluye una mayor proporción de adultos.

Respecto a la incidencia por subgrupos clínicos de interés, se apreció que los hombres tuvieron una incidencia de falla terapéutica significativamente más alta que las mujeres. Aunque al estimar los riesgos relativos en los análisis bivariados y multivariados no se encontró una asociación significativa entre el sexo y la falla terapéutica, varios estudios previos realizados en modelos murinos y poblaciones humanas han reportado diferencias en la respuesta inmunológica entre hombres y mujeres que conducen a tasas más altas de falla y eventos adversos en población masculina [117]. Un estudio realizado en Colombia reportó que en los hombres hay una mayor tendencia a mantener cargas parasitarias detectables después del tratamiento con Miltefosine o antimoniales, y aunque esos resultados no fueron estadísticamente significativos [118], se relacionan con el hallazgo de otro estudio en Brasil en el que la tasa de relapso posterior al tratamiento fue más alta en población de sexo masculino respecto al femenino (11,59% vs 7,20%), sin embargo el hazard ratio en este estudio tampoco fue significativo [119]. Se ha descrito que diferencias en las cargas hormonales de estrógenos y variaciones en la expresión génica de moléculas involucradas en la inmunidad innata (ej: *Toll like receptors* tipo 7 que se encuentran en el cromosoma X) parecen favorecer respuestas curativas en el sexo femenino y una tendencia a peores desenlaces en la población masculina [117].

Similar a lo reportado en estudios previos, la incidencia de falla fue más alta en niños y adultos jóvenes, respecto a poblaciones de mayor edad. Estos hallazgos concuerdan los de un reporte previo en Perú en el que la mediana de la edad fue significativamente menor en los pacientes con falla respecto a las curas (Me 12 (RIQ: 7-21) vs Me 25,5 (22-33),  $p=0,001$ ) [68]. En el estudio actual, cada año adicional de vida se asoció con una disminución aproximada del 4% en el riesgo de falla terapéutica (RR ajustado de 0,96 (IC95% 0,93-0,98)). Esta estimación es compatible con lo reportado por Llanos-Cuentas y cols [68] (OR ajustado de 0,95 (IC95% 0,92-0,99)) y Castro y cols [120] (OR ajustado en población pediátrica de 0,30 (IC95% 0,09-0,97)), con la ventaja de haber estimado directamente la razón de riesgos en lugar de una razón de oportunidades evitando la sobreestimación de los efectos que puede ocurrir cuando se calculan los odds. El hecho de que los niños y poblaciones jóvenes tengan un mayor riesgo de falla, parece estar mediado por una mayor eliminación renal del medicamento antileishmanial, que conduce a una disminución en la concentración intracelular y plasmática, alterando el efecto de la droga sobre la respuesta inmune y el control de las cargas parasitarias, los cuales son determinantes para la respuesta clínica frente a la infección [120,121].

Así mismo, se apreció un mayor riesgo de falla en pacientes que tenían co-infección pre-tratamiento y/o post-tratamiento respecto a los que no. En este sentido, aunque el tratamiento de la co-infección es ampliamente recomendado [122], pocos estudios se han enfocado en entender el papel de las co-infecciones en el desenlace terapéutico y no está claro el rol que podrían desempeñar en la modificación de la respuesta inmune frente al parásito. Se plantea que el incremento evidenciado en el riesgo de falla podría ser explicado por una mayor tendencia a co-infecciones de tipo bacteriano. Aunque la presencia de otros patógenos como las bacterias podría inducir una diferenciación de las células T orientada a respuestas Th1 y Th17 [123] que son favorables para la cura [124], también se sabe que en muchos casos conducen a la disminución en algunos de los mecanismos involucrados en la activación de monocitos y la mediación de respuestas por eosinófilos frente a infecciones parasitarias, conduciendo a un posible desbalance pro-inflamatorio citotóxico que no permite la adecuada cicatrización de las lesiones [123,124]. En este sentido, se identificó un estudio previo realizado en Brasil en el que se reportó que los pacientes con co-infecciones por helmintos tuvieron una velocidad de cicatrización más lenta que la de aquellos sin co-infección (HR 0,43 IC95%: 0,24 – 0,77) [125], validando la hipótesis de que la presentación simultánea con otras infecciones tiene la capacidad de modificar la respuesta inmune y la velocidad de curación. Se requieren estudios que evalúen el papel del microbioma en los desenlaces terapéuticos en leishmaniasis.

Adicionalmente, la presencia de adenopatía pre-tratamiento como un indicador de severidad de la infección antes de la administración del medicamento, se asoció con un incremento de dos veces el riesgo de falla en el modelo post-tratamiento (RR 2,19 (IC95%: 1,17 - 4,11)). Hallazgo similar al que ya había sido reportado por Castro

y cols (OR ajustado 2,72 IC95% 1,10 – 6,70) [62], y compatible con los resultados de un estudio realizado en Brasil en el que se encontró una mayor proporción de pacientes con adenopatía en el grupo que tenía desenlaces desfavorables respecto al grupo con desenlace favorable [126]. Aunque a la fecha se desconoce un mecanismo fisiopatológico bien definido que pueda explicar esta asociación, podría plantearse la hipótesis de que el proceso inflamatorio involucrado en la linfadenopatía podría conducir a una activación ineficaz de los linfocitos Th1 y CD8+ (la cual ocurre dentro los ganglios linfáticos), favoreciendo una mayor supervivencia de los parásitos de *Leishmania spp* [62,124,126]. Debido a que no se han explorado estos mecanismos fisiopatológicos, se requieren nuevas investigaciones que permitan caracterizar mejor los procesos asociados a linfadenopatía y su rol con el desenlace.

Así mismo, aunque no mejoró el desempeño de los modelos multivariados finales, se encontró consistencia en la observación de que menores tiempos de evolución de la sintomatología se asociaron a mayores riesgos de falla terapéutica. Contrario a lo encontrado por Llanos-Cuentas [68] y Castro y cols [62], no se encontró una asociación significativa al dicotomizar la variable entre aquellos que tenían  $\leq 4$  semanas de evolución y los que no (RR 1,37 IC95% 0,66 - 2,83). Respecto a este mecanismo, estudios previos han reportado que aquellos pacientes que son tratados más tempranamente tienen una menor respuesta celular (medida en la intradermorreacción de Montenegro) y concentraciones más bajas de citoquinas relacionadas con la respuesta Th1 (TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$ ), lo cual se asocia con un menor control de las cargas parasitarias y por lo tanto un mayor riesgo de falla terapéutica [124,125].

Respecto a las características de las lesiones, los pacientes que tenían lesiones diferentes a úlceras y placas (<10% de la población de estudio) tuvieron un mayor riesgo de falla en el análisis bivariado (RR 3,9 IC95% 1,87 – 8,16), al igual que aquellos que iniciaban el curso de su enfermedad con una úlcera y continuaban con una úlcera en la valoración de fin de tratamiento (RR 2,92 IC95% 1,41 – 6,06). Debido a la baja proporción de casos con estas características, y a una alta relación de no expuestos y expuestos, se considera que hay un bajo poder estadístico para estas estimaciones. Además, aunque ninguna de estas variables mejoró el rendimiento de los modelos multivariados y por lo tanto no fueron incluidas en los modelos finales, estos datos son comparables con los reportes del grupo de investigación de Carvalho y cols [125], en donde plantean que las características de la lesión pueden predecir el tiempo de evolución y el desenlace terapéutico, encontrando que aquellos pacientes que consultaban por ulceraciones clásicas curaban más rápido que aquellos que no (HR 5,33 IC95%1,67–16,99). En este sentido, un estudio reciente realizado por el grupo de Scott y cols [127], reportó perfiles de expresión génica diferenciales en biopsias de lesiones tomadas de pacientes con cura y falla al tratamiento, encontrando que las lesiones de aquellos pacientes con falla tenían una mayor expresión de genes citotóxicos que se

correlacionaban con una mayor abundancia predicha de células T CD8+ y células natural killer. Este hallazgo confirma la hipótesis de que variaciones en las lesiones y la respuesta inmune dentro de las mismas influye en el desenlace terapéutico. Se requieren más estudios que exploren esta relación y puedan determinar si el tipo de lesión se asocia con respuestas inmunológicas diferenciales.

A pesar de que en el análisis univariado la infección por *L. (V) braziliensis* se asoció con un incremento en el riesgo de falla terapéutica respecto a las infecciones por *L. (V) panamensis* (RR 2,16 IC95% 1,00 – 4,66), su inclusión en los modelos multivariados no fue significativa y debido a la poca representatividad en la muestra, se limitó la capacidad de este estudio para determinar su efecto en el desenlace.

#### *Potencial de los parámetros del hemograma como predictores tempranos del desenlace terapéutico*

Dentro de los parámetros del hemograma pre-tratamiento, niveles bajos de granulocitos inmaduros ( $\leq 0,01 \times 10^3 \mu\text{L}$ ) se asociaron significativamente con un mayor riesgo de falla terapéutica en los análisis multivariados (RR 2,11 IC95%: 1,08 – 4,11). Los granulocitos inmaduros incluyen los metamielocitos, mielocitos y promielocitos, y estos últimos se dividen en precursores de neutrófilos, eosinófilos y basófilos. La subpoblación precursora de neutrófilos es la más representativa, mientras que los granulocitos eosinofílicos y basofílicos representan menos del 10% de los leucocitos [128]. Estudios recientes han identificado que los niveles granulocitos inmaduros medidos en el hemograma, son directamente proporcionales al grado de respuesta inflamatoria sistémica mediada principalmente por un incremento de las funciones de neutrófilos [129–131]. En el caso de las LC, se ha descrito que en las fases tempranas de la enfermedad el neutrófilo desempeña funciones orientadas a la eliminación del parásito como la producción de trampas extracelulares de neutrófilos [132,133] y la activación de células dendríticas [134]. Se plantea que una posible explicación al incremento en el riesgo de falla terapéutica de pacientes con conteos bajos de granulocitos inmaduros, está relacionada con una disminución en las funciones efectoras del neutrófilo debido a tasas bajas de recambio en la médula ósea (manifestadas como una disminución en los conteos de granulocitos). Se requieren estudios que puedan explorar esta hipótesis y determinar la relación entre los niveles sistémicos de granulocitos y la abundancia local a nivel de las lesiones.

Adicionalmente, aunque las plaquetas se asociaron con un mayor riesgo de falla terapéutica en los análisis univariados, esta era una asociación espuria que desapareció al ajustar por otras variables relacionadas con el desenlace (RR ajustado 1,95 1,00 - 3,79). Este resultado es esperable, debido a que no se conoce un rol determinante de las plaquetas en la respuesta inmune frente a la infección por *Leishmania spp.* y estudios previos que comparaban los parámetros del

hemograma de población sana versus pacientes con LC tampoco encontraron diferencias en los conteos de plaquetas pre-tratamiento ni post-tratamiento ( $p > 0,2$ ) [38,135]

Dentro de los parámetros post-tratamiento los eosinófilos se relacionaron de manera importante con el desenlace terapéutico. Aunque el conteo, los porcentajes y algunos índices celulares que involucraban a los eosinófilos mostraron asociación con la falla terapéutica, se consideró que el porcentaje de eosinófilos representa con mayor fiabilidad lo que está ocurriendo en la respuesta inmunológica a nivel sistémico, ya que es un indicador tanto de la abundancia de los eosinófilos como de su relación respecto a las demás líneas celulares que también están involucradas en la respuesta inmune, por lo que un porcentaje más elevado sugiere una mediación más importante de los mecanismos ligados a este tipo de células inmunológicas.

Al ajustar por confusores, un porcentaje de eosinófilos post-tratamiento  $\geq 14\%$  se asoció con dos veces el riesgo de falla terapéutica (RR 2,01 IC95% 1,05 - 3,82), contrario a lo observado con los eosinófilos pre-tratamiento que no demostraron asociación con el desenlace (RR 0,94 IC95% 0,64 - 1,65). Esto puede explicarse en parte por los hallazgos de modelos murinos en los que los eosinófilos ejercen una función protectora en las fases iniciales de la infección que favorece la destrucción parasitaria, con altas cargas eosinofílicas durante las primeras 3-24 horas que continúan siendo detectables tras varios meses de la infección pero en concentraciones menores, sugiriendo un rol diferencial en el control de la infección según el momento de seguimiento [136].

A lo anterior se suman las observaciones de que los eosinófilos pueden inducir modificaciones en la respuesta inmune adaptativa modulando las respuestas Th1 y favoreciendo las Th2 [137]. En este sentido, la síntesis de IL-4 por los eosinófilos puede facilitar la diferenciación de las células T CD4 + hacia un fenotipo Th2, al mismo tiempo que la producción de IL-4 por parte de las células Th2 puede facilitar el reclutamiento de más eosinófilos, sugiriendo una retroalimentación positiva [137–140]. Este mecanismo podría explicar el hallazgo de este y otros estudios en los que se reportan niveles más altos de eosinófilos post-tratamiento en comparación con los pre-tratamiento [38,90] y al mismo tiempo, la relación de dicha elevación con respuestas Th2 podría explicar que los pacientes con grandes elevaciones de eosinófilos al final del tratamiento tengan un mayor riesgo de falla. Además, el hecho de que el riesgo aumente cuando los eosinófilos post-tratamiento están elevados, pero no lo haga cuando los pre-tratamiento lo están, probablemente se relaciona a que en el primer grupo la exposición al medicamento debería estar induciendo una modulación del sistema inmune, y el hecho de que los eosinófilos persistan elevados puede ser un indicador de la instauración de un estado pro-inflamatorio crónico que no permite un desenlace terapéutico favorable [90].

Adicionalmente, el incremento de los monocitos a final de tratamiento, medido como una razón de cambio  $\geq 1,07$ , se asoció con un mayor riesgo de falla terapéutica (RR 3,15 IC95% 1,63-6,10). Este hallazgo es compatible con el de estudios previos realizados en CIDEIM en los que a través de modelos *in vitro* y *ex vivo* se ha encontrado que la regulación positiva de monocitos y neutrófilos, junto a cambios inflamatorios sostenidos, y las respuestas inmunes innatas desreguladas se asocian con mayor probabilidad de cuadros crónicos y falla terapéutica [28,72]. Aunque la activación y el reclutamiento de monocitos parece promover la eliminación del parásito en las fases tempranas de la enfermedad [124], es necesaria una posterior regulación a la baja que se favorece por la administración del medicamento, induciendo respuestas antiinflamatorias que finalmente promueven el proceso de cicatrización y cura [28]. Se ha encontrado que algunos pacientes presentan polimorfismos de único nucleótido y alteraciones en la expresión génica de CCL2, la cual es una citoquina necesaria para la migración de monocitos hacia los tejidos durante la infección por *Leishmania spp.* Estas alteraciones parecen favorecer la retención a nivel sistémico de los monocitos con una inadecuada migración hacia la piel, favoreciendo los procesos de falla terapéutica [28,141] y explicando la asociación encontrada en este estudio.

#### *Fortalezas y debilidades del estudio*

Este es el primer estudio que explora la asociación entre los parámetros del hemograma y los desenlaces terapéuticos en las LC. Al ser un estudio de cohorte permite evaluar la direccionalidad de las asociaciones y plantear posibles relaciones causales, además de que facilita el cálculo de los riesgos relativos como medida directa de la fuerza de asociación, evitando la sobreestimación que puede ocurrir cuando se calculan las razones de oportunidad [102]. Adicionalmente, aunque el carácter retrospectivo de esta investigación podría ser una limitante para la recolección de datos de buena calidad, el hecho de que toda la información haya sido recolectada de manera estandarizada, en un único centro de investigación, con un control periódico de la calidad de los datos, disminuye el riesgo de sesgos de información. Además, para asegurar una mejor calidad de los datos, el ingreso de nueva información se hizo mediante doble digitación y la información proveniente de estudios previos fue sometida a procesos de monitoria clínica por personal externo a la institución.

Así mismo, las definiciones de respuesta terapéutica utilizadas para esta investigación se corresponden con las recomendaciones de Olliaro y cols para la armonización de estudios clínicos en leishmaniasis [12,13], mientras que para las variables de exposición (parámetros del hemograma) el procesamiento en más del 95% de las muestras se realizó en un único laboratorio, ubicado en un hospital de cuarto nivel de atención, utilizando el mismo dispositivo de medición, con una



metodología estandarizada que se acopla a los estándares internacionales, y atendiendo a las recomendaciones de buenas prácticas de laboratorio y buenas prácticas clínicas. Adicionalmente, aunque los datos corresponden a pacientes enrolados en el contexto de estudios clínicos, la inclusión de pacientes provenientes de diferentes centros de atención ubicados en áreas endémicas para LC, aporta validez externa y permite la generalización de los resultados a población colombiana atendida en el sur y centro del país.

Dentro de las limitantes del estudio se identifica que no cuenta con un poder estadístico suficiente para encontrar asociaciones débiles. Además, para el caso de algunos subgrupos clínicos de interés como niños y adultos mayores, o ciertas especies parasitarias, no se logró una adecuada representatividad de la muestra, por lo que la validez de las asociaciones encontradas debería ser explorada en estudios futuros con tamaños muestrales más grandes probablemente obtenidos a través de colaboraciones y estudios multicéntricos. Así mismo, el hecho de que algunas de las asociaciones perdieran significancia estadística tras realizar la imputación de datos faltantes puede ser indicativo de que algunos de los modelos podrían estar afectados por la ausencia de información, por lo que se requieren estudios futuros que validen el desempeño de los mismos en otro grupo de pacientes que no hayan sido incluidos en este estudio.

Otra posible limitante es que por la gran cantidad de variables del hemograma incluidas en el estudio y el hecho de realizar testeo múltiple se identificaran falsas asociaciones. Para disminuir este riesgo se ajustó el abordaje metodológico y se establecieron criterios más estrictos para definir que una variable realmente estaba asociada, por lo que para ser incluida en los modelos finales tuvo que demostrar consistencia entre los diferentes análisis estadísticos además de tener plausibilidad biológica.

### *Implicaciones en salud pública*

El cálculo de la incidencia de cura y falla terapéutica en este estudio, contribuye a la estimación nacional de los desenlaces terapéuticos en Colombia, los cuales que actualmente se desconocen en el 100% de los reportes oficiales, según los reportes de la organización panamericana de la salud [142]. Adicionalmente, este es el primer reporte en el que se especifica la incidencia de desenlaces por subgrupos clínicos que pueden ser de interés para la salud pública como sexo, etnia, grupo etario, comorbilidades, tipo de especie parasitaria, entre otros; por lo que se considera que estos hallazgos pueden ser de utilidad para el diseño y desarrollo de programas de intervención comunitaria enfocados al control de las LC. Así mismo, dado que este estudio reporta la incidencia de falla terapéutica en población del centro y el suroccidente colombiano que a pesar de ser adherente al tratamiento presenta desenlaces desfavorables, esto permite una mejor estimación del efecto de otras

variables clínicas y paraclínicas en la falla terapéutica sin la confusión que puede dar la no adherencia. La identificación de estas variables por parte del personal clínico en zonas endémicas colombianas, debería alertarlo a realizar un seguimiento más exhaustivo de los pacientes y en caso de requerirse modificar la conducta terapéutica de acuerdo a la evidencia clínica disponible.

Adicionalmente, a pesar de que el hemograma se encuentra dentro de las recomendaciones nacionales para el seguimiento de las LC [9], y de que es una prueba ampliamente disponible y solicitada por personal clínico en áreas endémicas, su interpretabilidad clínica en el contexto de LC no había sido explorada, y se desconocía la relación de los parámetros allí reportados con el desenlace terapéutico. El conocimiento generado por este proyecto de investigación, puede ser utilizado por personal clínico para la interpretación de los resultados de sus pacientes y orientar la toma de decisiones en áreas endémicas del país.

Los hallazgos de este estudio muestran la importancia de profundizar en la investigación en LC en poblaciones colombianas. Así mismo, la comprensión de la falla terapéutica como un problema multicompartmental invita a integrar la investigación básica, clínica y de salud pública para proponer soluciones a esta problemática en salud.

### *Estudios futuros*

Los hallazgos de este estudio sugieren que además de las características sociodemográficas y clínicas ya descritas en otros estudios, el tipo de lesión, sus variaciones, la co-infección y algunos parámetros del hemograma pueden influir en el desenlace terapéutico por lo que deberían ser tenidos en cuenta en investigaciones clínicas futuras.

Se requieren estudios complementarios que validen los biomarcadores y modelos explicativos multivariados propuestos por esta investigación en otras poblaciones colombianas con LC. Así mismo, dado que existen limitaciones en cuanto a la comprensión de los mecanismos fisiopatológicos que explican algunas de las asociaciones encontradas, nuevas investigaciones de tipo translacional son requeridas.

Los estudios futuros de tipo cohorte o ensayos clínicos deberían contemplar el uso de técnicas de análisis estadísticas más robustas que permitan hacer mejores aproximaciones a los riesgos estimados, esto debido a que muchos de los reportes encontrados no establecían fuerzas de asociación, no ajustaban por variables confusoras, y/o los que lo hicieron generalmente estimaron razones de oportunidad que pueden sobre-estimar los riesgos en situaciones en las que la incidencia del evento de interés es superior al 10% [101,102], como suele ocurrir en el caso de la falla terapéutica en leishmaniasis.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este estudio demuestran que parámetros de los hemogramas pre-tratamiento como los granulocitos inmaduros, y parámetros post-tratamiento como el porcentaje de eosinófilos y la variación de los monocitos pueden ser utilizados como biomarcadores tempranos de falla terapéutica en pacientes con LC tratados con antileishmaniales en el centro y sur-occidente colombiano.

Estos hallazgos sugieren un rol determinante de la respuesta inmune en el desenlace terapéutico de las leishmaniasis y enfatizan la necesidad de estudiar las relaciones huésped - patógeno – medicamento a fin de dilucidar los mecanismos fisiopatológicos implicados.

La identificación de potenciales biomarcadores de falla dentro de los reportes del hemograma provee una herramienta valiosa, económica y de fácil acceso para el personal clínico laborando en áreas endémicas de LC y contribuye a la optimización del seguimiento clínico de los pacientes con leishmaniasis.

El hallazgo de alteraciones en los parámetros del hemograma, junto con la identificación de variables clínicas y sociodemográficas asociadas a falla terapéutica debería alertar al personal clínico y motivar un seguimiento más estricto de los pacientes adaptado a sus necesidades individuales. Las características clínicas de las lesiones y la presencia de co-infecciones son variables que han sido poco estudiadas y parecen relacionarse con el desenlace.

La incidencia de falla terapéutica fue similar a la reportada en estudios previos del suroccidente colombiano, con variaciones identificadas en subgrupos clínicos de interés agrupados según sexo, grupo etario, manifestaciones clínicas y hallazgos paraclínicos. Se requieren estudios complementarios que exploren estas asociaciones.

## REFERENCIAS

- [1] Organización Panamericana de la Salud. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. Washington, D.C.: 2019.
- [2] Organización Panamericana de la Salud. Leishmaniasis en las Américas. Recomendaciones para el tratamiento. Washington, D.C.: 2013.
- [3] OPS/OMS. Plan de acción para fortalecer la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas 2017-2022. [Http://WwwPahoOrg](http://www.paho.org) 2017:70.
- [4] Padilla JC, Lizarazo FE, Murillo OL, Mendigaña FA, Pachón E, Vera MJ. Epidemiología de las principales enfermedades transmitidas por vectores en Colombia, 1990-2016. *Biomédica* 2017;37:27–40. <https://doi.org/https://doi.org/10.7705/biomedica.v34i2.3769>.
- [5] Weigle KA, Santrich C, Martinez F, Valderrama L, Saravia NG, Weigle KA, et al. Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: Environmental and Behavioral Risk Factors for Infection, Clinical Manifestations, and Pathogenicity. *J Infect Dis* 1993;168:709–14. <https://doi.org/10.1093/infdis/168.3.709>.
- [6] Figueroa RA, Lozano LE, Romero IC, Cardona MT, Prager M, Pacheco R, et al. Detection of Leishmania in Unaffected Mucosal Tissues of Patients with Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania (Viannia) Species . *J Infect Dis* 2009;200:638–46. <https://doi.org/10.1086/600109>.
- [7] Instituto Nacional de Salud de Colombia. Informe de evento leishmaniasis cutánea, mucosa y visceral, Colombia, 2018. 2018.
- [8] Galvão EL, Pedras MJ, Cota GF, Rabello A, Simões TC. How cutaneous leishmaniasis and treatment impacts in the patients' lives: A cross-sectional study. *PLoS One* 2019;14:1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211374>.
- [9] Ministerio de Salud de Colombia. Lineamientos para la atención clínica de Leishmaniasis en Colombia. Bogotá D.C: 2018.
- [10] Palacios R, Osorio LE, Grajales LF, Ochoa MT. Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2001;64:187–93. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2001.64.187>.
- [11] Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira R V., Marzochi MC, et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop* 2011;118:87–96. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.02.007>.
- [12] Olliaro P, Vaillant M, Arana B, Grogl M, Modabber F, Magill A, et al. Methodology of Clinical Trials Aimed at Assessing Interventions for

Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2013;7:1–19.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002130>.

- [13] Oliaro P, Grogl M, Boni M, Carvalho EM, Chebli H, Cisse M, et al. Harmonized clinical trial methodologies for localized cutaneous leishmaniasis and potential for extensive network with capacities for clinical evaluation. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;12:1–12.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006141>.
- [14] Soto J, Toledo J, Vega J, Berman J. Short report: Efficacy of pentavalent antimony for treatment of Colombian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2005;72:421–2. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.72.421>.
- [15] Soto J, Rea J, Balderrama M, Toledo J, Soto P, Valda L, et al. Short report: Efficacy of Miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2008;78:210–1. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.78.210>.
- [16] Navin TR, Arana BA, Arana FE, Berman JD, Chajón JF. Placebo-Controlled Clinical Trial of Sodium Stibogluconate (Pentostam) versus Ketoconazole for Treating Cutaneous Leishmaniasis in Guatemala. *J Infect Dis* 1992;165:528–34. <https://doi.org/10.1093/infdis/165.3.528>.
- [17] Navin TR, Arana BA, Arana FE, De Merida AM, Castillo AL, Pozuelos JL. Placebo-controlled clinical trial of meglumine antimonate (Glucantime) vs. localized controlled heat in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg* 1990;42:43–50.  
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.1990.42.43>.
- [18] Vélez I, López L, Sánchez X, Mestra L, Rojas C, Rodríguez E. Efficacy of Miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2010;83:351–6. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0060>.
- [19] López L, Vélez I, Asela C, Cruz C, Alves F, Robledo S, et al. A phase II study to evaluate the safety and efficacy of topical 3% amphotericin B cream (Anfoleish) for the treatment of uncomplicated cutaneous leishmaniasis in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis* 2018;12:1–12.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006653>.
- [20] Castro M del M, Martinez Valencia AJ, Cossio A, Jojoa SJ. Seguimiento de pacientes con leishmaniasis tegumentaria: una experiencia en un centro de referencia. (IX Encuentro Nacional de Investigadores en Enfermedades Infecciosas, Barranquilla 2014). *Infectio* 2014;18:71.
- [21] Rijal S, Sundar S, Mondal D, Das P, Alvar J, Boelaert M. Eliminating visceral leishmaniasis in South Asia: The road ahead. *BMJ* 2019;364.  
<https://doi.org/10.1136/bmj.k5224>.
- [22] Matlashewski G, Arana B, Kroeger A, Be-Nazir A, Mondal D, Nabi SG, et al. Research priorities for elimination of visceral leishmaniasis. *Lancet Glob Heal* 2014;2:e683–4. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(14\)70318-3](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(14)70318-3).

- [23] National Center for Biotechnology Information (NCBI). Biomarkers - MeSH n.d.
- [24] Carrillo E, Moreno J. Editorial: Biomarkers in Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol* 2019;9:1–4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00388>.
- [25] Bahrami F, Harandi AM, Rafati S. Biomarkers of cutaneous leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol* 2018;8:222. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00222>.
- [26] Ibarra-Meneses A V., Moreno J, Carrillo E. New Strategies and Biomarkers for the Control of Visceral Leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2020;36:29–38. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.10.005>.
- [27] Kip AE, Balasegaram M, Beijnen JH, Schellens JHM, De Vries PJ, Dorloa TPC. Systematic review of biomarkers to monitor therapeutic response in leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;59:1–14. <https://doi.org/10.1128/AAC.04298-14>.
- [28] Navas A, Fernández O, Gallego-Marín C, Del Mar Castro M, Rosales-Chilama M, Murillo J, et al. Profiles of local and systemic inflammation in the outcome of treatment of human cutaneous leishmaniasis caused by leishmania (viannia). *Infect Immun* 2020;88. <https://doi.org/10.1128/IAI.00764-19>.
- [29] Farkas JD. The complete blood count to diagnose septic shock. *J Thorac Dis* 2020;2:S16–21. <https://doi.org/10.21037/jtd.2019.12.63>.
- [30] Huaynate CFA, Travezaño MJP, Correa M, Malpartida HM, Oberhelman R, Murphy LL, et al. Diagnostics barriers and innovations in rural areas: Insights from junior medical doctors on the frontlines of rural care in Peru. *BMC Health Serv Res* 2015;15:454. <https://doi.org/10.1186/s12913-015-1114-7>.
- [31] Ljungström L, Pernestig A-K, Jacobsson G, Andersson R, Usener B, Tilevik D. Diagnostic accuracy of procalcitonin, neutrophil-lymphocyte count ratio, C-reactive protein, and lactate in patients with suspected bacterial sepsis. *PLoS One* 2017;12:e0181704. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181704>.
- [32] Djordjevic D, Rondovic G, Surbatovic M, Stanojevic I, Udovicic I, Andjelic T, et al. Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio, Monocyte-to-Lymphocyte Ratio, Platelet-to-Lymphocyte Ratio, and Mean Platelet Volume-to-Platelet Count Ratio as Biomarkers in Critically Ill and Injured Patients: Which Ratio to Choose to Predict Outcome and Nature of Bacte. *Mediators Inflamm* 2018;2018. <https://doi.org/10.1155/2018/3758068>.
- [33] Yoshida N, Yagasaki H, Hama A, Takahashi Y, Kosaka Y, Kobayashi R, et al. Predicting response to immunosuppressive therapy in childhood aplastic anemia. *Haematologica* 2011;96:771–4. <https://doi.org/10.3324/haematol.2010.032805>.
- [34] Papageorgiou N, Falconer D, Ioannou A, Wongwarawipat T, Barra S,

- Tousoulis D, et al. Full blood count as potential predictor of outcomes in patients undergoing cardiac resynchronization therapy. *Sci Rep* 2019;9:1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-49659-z>.
- [35] Gu C, Zhu X, Qiao X, Zhai X, Shi W, Xie X. Multivariate logistic analysis of predictors of response to immunosuppressive therapy in children with aplastic anemia: a double-center study. *Hematology* 2019;24:282–9. <https://doi.org/10.1080/16078454.2019.1565149>.
- [36] Muto T, Masuda Y, Numoto S, Kodama S, Yamakawa K, Takasu M, et al. White Blood Cell and Neutrophil Counts and Response to Intravenous Immunoglobulin in Kawasaki Disease. *Glob Pediatr Heal* 2019;6:2333794X1988482. <https://doi.org/10.1177/2333794X19884826>.
- [37] An I, Harman M, Esen M, Çelik H. The effect of pentavalent antimonial compounds used in the treatment of cutaneous leishmaniasis on hemogram and biochemical parameters. *Cutan Ocul Toxicol* 2019;38:294–7. <https://doi.org/10.1080/15569527.2019.1610887>.
- [38] Sula B, Tekin R. Use of hematological parameters in evaluation of treatment efficacy in cutaneous leishmaniasis. *J Microbiol Infect Dis* 2015;5:167–72. <https://doi.org/10.5799/ahinjs.02.2015.04.0199>.
- [39] Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005;366:1561–77. [https://doi.org/https://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67629-5](https://doi.org/https://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67629-5).
- [40] República Bolivariana de Venezuela - Organización Panamericana de la Salud. Programa de Control de Leishmaniasis. Normas, pautas y procedimientos para el diagnóstico y control / Ministerio del Poder Popular para la Salud et al. – Caracas: Ministerio del Poder Popular para la Salud, 2019. 1st ed. 2019.
- [41] Weigle KA, Santrich C, Martinez F, Valderrama L, Saravia NG. Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia : A Longitudinal Study of the Natural History , Prevalence , and Incidence of Infection and Clinical Manifestations Published by : Oxford University Press Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/3011343>. *J Infect Dis* 1993;168:699–708.
- [42] Weigle K, Santrich C, Martinez F, Valderrama L. Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: Environmental and Behavioral Risk Factors for Infection, Clinical Manifestations, and Pathogenicity | The Journal of Infectious Diseases | Oxford Academic. *J Infect Dis* 1993;168:709–14.
- [43] Pan American Health Organization PAHO / WHO. Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis 2020. <https://www.paho.org/en/topics/leishmaniasis/cutaneous-and-mucosal-leishmaniasis> (accessed June 10, 2020).
- [44] Saravia NG, Weigle K, Navas C, Segura I, Valderrama L, Valencia AZ, et al. Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of

- Leishmania Viannia in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 2002;66:738–44. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2002.66.738>.
- [45] Fernández OL, Diaz-Toro Y, Ovalle C, Valderrama L, Muvdi S, Rodríguez I, et al. Miltefosine and Antimonial Drug Susceptibility of *Leishmania Viannia* Species and Populations in Regions of High Transmission in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8:e2871. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002871>.
  - [46] Organización Panamericana de la Salud - Organización Mundial de la Salud. Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas. 2019.
  - [47] Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One* 2012;7:35671. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0035671>.
  - [48] World Health Organization (WHO). Leishmaniasis 2020. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> (accessed March 20, 2020).
  - [49] Instituto Nacional de Salud - INS. Informe de Evento Leishmaniasis 2019 2020. [https://www.ins.gov.co/buscador/Informesdeevento/LEISHMANIASIS CUTÁNEA PE III 2019.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador/Informesdeevento/LEISHMANIASIS%20CUTANEA%20PE%20III%202019.pdf).
  - [50] Organización Panamericana de la Salud. Leishmaniasis en las Américas, recomendaciones para el tratamiento. Washington, D.C.: 2013.
  - [51] González U, Pinart M, Sinclair D, Firooz A, Enk C, Vélez ID, et al. Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. *Cochrane Database Syst Rev* 2015;2015. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008736.pub2>.
  - [52] Alvar J, Croft S, Olliaro P. Chemotherapy in the Treatment and Control of Leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2006;61:223–74. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)61006-8](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)61006-8).
  - [53] Uribe-Restrepo AF, Prieto MD, Cossio A, Desai MM, Del Mar Castro M. Eligibility for local therapies in adolescents and adults with cutaneous leishmaniasis from southwestern Colombia: A cross-sectional study. *Am J Trop Med Hyg* 2019;100:306–10. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.18-0643>.
  - [54] Castro-Noriega M del M. Factores Asociados a Falla Terapéutica en Niños y Adultos con Leishmaniasis cutánea en tres zonas endémicas de Colombia 2007-2013 [Tesis de Maestría]. Universidad del Valle, 2015.
  - [55] Esfandiarpour I, Farajzadeh S, Rahn timer Z, Fathabadi EA, Heshmatkhah A. Adverse effects of intralesional meglumine antimoniate and its influence on clinical laboratory parameters in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol* 2012;51:1221–5. <https://doi.org/10.1111/j.1365-4632.2012.05460.x>.
  - [56] Masmoudi A, Maalej N, Mseddi M, Souissi A, Turki H, Boudaya S, et al.



Glucantime® par voie parentérale: Bénéfice versus toxicité. *Med Mal Infect* 2005;35:42–5. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2004.07.032>.

- [57] Castro MDM, Cossio A, Navas A, Fernandez O, Valderrama L, Cuervo-Pardo L, et al. Pentoxifylline in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: A Randomized Clinical Trial in Colombia. *Pathog* 2022, Vol 11, Page 378 2022;11:378. <https://doi.org/10.3390/PATHOGENS11030378>.
- [58] Rubiano LC, Miranda MC, Muvdi Arenas S, Montero LM, Rodríguez-Barraquer I, Garcerant D, et al. Noninferiority of Miltefosine versus meglumine antimoniate for cutaneous leishmaniasis in children. *J Infect Dis* 2012;205:684–92. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir816>.
- [59] Robledo SM, Puerta JA, Muñoz DL, Guardo M, Vélez ID. Efficacy and tolerance of pentamidine for treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *L. (V) panamensis* in Colombia. *Biomedica* 2006;26 Suppl 1:188–93. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v26i1.1512>.
- [60] Sánchez-Fonseca S, Mendez-Fandiño Y, Caicedo-Ochoa Y, Fernandez-Niño S, Urrutia-Gómez A, Amaya-Sepulveda A. Eficacia del Antimoniato de Meglumina vs Isetionato de pentamidina en el tratamiento de leishmaniasis cutánea. Medellín: 2018.
- [61] Wortmann G, Zapor M, Ressler R, Fraser S, Hartzell J, Pierson J, et al. Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 2010;83:1028–33. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.10-0171>.
- [62] Castro M del M, Cossio A, Velasco C, Osorio L. Risk factors for therapeutic failure to meglumine antimoniate and Miltefosine in adults and children with cutaneous leishmaniasis in Colombia: A cohort study. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005515>.
- [63] Valencia C, Arévalo J, Dujardin JC, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, Zimic M. Prediction score for antimony treatment failure in patients with ulcerative leishmaniasis lesions. *PLoS Negl Trop Dis* 2012;6:1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001656>.
- [64] Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barrett MP, López-Vélez R, García-Hernández R, et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006052>.
- [65] Vanaerschot M, Dumetz F, Roy S, Ponte-Sucre A, Arevalo J, Dujardin JC. Treatment failure in leishmaniasis: Drug-resistance or another (epi-) phenotype? *Expert Rev Anti Infect Ther* 2014;12:937–46. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.916614>.
- [66] Ponte-Sucre A, Padrón-Nieves M. Drug resistance in *Leishmania* parasites: Consequences, molecular mechanisms and possible treatments. 2nd ed. Springer International Publishing; 2018. <https://doi.org/10.1007/978-3-319->

74186-4.

- [67] Rodrigues AM, Hueb M, Rodrigues Dos Santos TAR, Fernandes Fontes CJ. Fatores associados ao insucesso do tratamento da leishmaniose cutânea com antimoniato de meglumina. *Rev Soc Bras Med Trop* 2006;39:139–45. <https://doi.org/10.1590/s0037-86822006000200001>.
- [68] Llanos-Cuentas A, Tulliano G, Araujo-Castillo R, Miranda-Verastegui C, Santamaria-Castrellon G, Ramirez L, et al. Clinical and Parasite Species Risk Factors for Pentavalent Antimonial Treatment Failure in Cutaneous Leishmaniasis in Peru. *Clin Infect Dis* 2008;46:223–31. <https://doi.org/10.1086/524042>.
- [69] Obonaga R, Fernández OL, Valderrama L, Rubiano LC, Castro MDM, Barrera MC, et al. Treatment failure and Miltefosine susceptibility in dermal leishmaniasis caused by leishmania subgenus viannia species. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:144–52. <https://doi.org/10.1128/AAC.01023-13>.
- [70] Arevalo J, Ramirez L, Adai V, Zimic M, Tulliano G, Miranda-Verástegui C, et al. Influence of Leishmania (Viannia) Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. *J Infect Dis* 2007;195:1846–51. <https://doi.org/10.1086/518041>.
- [71] Shahi M, Mohajery M, Shamsian SAA, Nahrevanian H, Yazdanpanah SMJ. Comparison of Th1 and Th2 responses in non-healing and healing patients with cutaneous leishmaniasis. *Reports Biochem Mol Biol* 2013;1:43–8.
- [72] Navas A, Vargas DA, Freudzon M, McMahon-Pratt D, Saravia NG, Gómez MA. Chronicity of Dermal Leishmaniasis Caused by Leishmania panamensis Is Associated with Parasite-Mediated Induction of Chemokine Gene Expression. *Infect Immun* 2014;82:2872–80. <https://doi.org/10.1128/iai.01133-13>.
- [73] Aronson JK, Ferner RE. Biomarkers—a general review. *Curr Protoc Pharmacol* 2017;2017:9.23.1-9.23.17. <https://doi.org/10.1002/cpph.19>.
- [74] Gómez MA. Host cells in the antimicrobial effect of drugs. *PK/PD Symp. drugs against Intracell. Pathog., Cali: 2013*.
- [75] Rogerson SJ, Wijesinghe RS, Meshnick SR. Host immunity as a determinant of treatment outcome in Plasmodium falciparum malaria. *Lancet Infect Dis* 2010. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70322-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70322-6).
- [76] Perry MR, Wyllie S, Prajapati VK, Feldmann J, Sundar S, Boelaert M, et al. Visceral Leishmaniasis and Arsenic: An Ancient Poison Contributing to Antimonial Treatment Failure in the Indian Subcontinent? *PLoS Negl Trop Dis* 2011;5:e1227. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001227>.
- [77] Romero GAS, Boelaert M. Control of Visceral Leishmaniasis in Latin America—A Systematic Review. *PLoS Negl Trop Dis* 2010;4:e584. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000584>.

- [78] Atkinson AJ, Colburn WA, DeGruttola VG, DeMets DL, Downing GJ, Hoth DF, et al. Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001;69:89–95. <https://doi.org/10.1067/mcp.2001.113989>.
- [79] International Programme on Chemical Safety, World Health Organization (WHO). *Biomarkers and Risk Assessment: Concepts and Principles*. 1st ed. Vammala (Finland): 1993.
- [80] Gârban Z, Avacovici A, Gârban G, Ghibu GD, Velciov A-B, Pop C-I. Biomarkers: Theoretical Aspects and applicative peculiarities. Note I. General Characteristics of biomarkers. *Agroaliment Process Technol* 2005;XI:139–46.
- [81] Wallis RS, Doherty TM, Onyebujoh P, Vahedi M, Laang H, Olesen O, et al. Biomarkers for tuberculosis disease activity, cure, and relapse. *Lancet Infect Dis* 2009;9:162–72. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70042-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70042-8).
- [82] Girling DJ, Chan SL. Controlled trial of 2, 4, and 6 months of pyrazinamide in 6-month, three-times-weekly regimens for smear-positive pulmonary tuberculosis, including an assessment of a combined preparation of isoniazid, rifampin, and pyrazinamide: Results at 30 months. *Am Rev Respir Dis* 1991;143:700–6. [https://doi.org/10.1164/ajrccm/143.4\\_pt\\_1.700](https://doi.org/10.1164/ajrccm/143.4_pt_1.700).
- [83] Phillips PPJ, Davies GR, Mitchison DA. Biomarkers for tuberculosis disease activity, cure, and relapse. *Lancet Infect Dis* 2010;10:69–70. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(09\)70256-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(09)70256-7).
- [84] Rifai N, Gillette MA, Carr SA. Protein biomarker discovery and validation: The long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol* 2006;24:971–83. <https://doi.org/10.1038/nbt1235>.
- [85] Bhattacharyya T, Ayandeh A, Falconar AK, Sundar S, El-Safi S, Gripenberg MA, et al. IgG1 as a Potential Biomarker of Post-chemotherapeutic Relapse in Visceral Leishmaniasis, and Adaptation to a Rapid Diagnostic Test. *PLoS Negl Trop Dis* 2014;8. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003273>.
- [86] Fagundes-Silva GA, Vieira-Goncalves R, Nepomuceno MP, De Souza MA, Favoreto S, Oliveira-Nieto MP, et al. Decrease in anti- Leishmania IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. *Parasite Immunol* 2012;34:486–91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2012.01379.x>.
- [87] Hefnawy A, Berg M, Dujardin JC, De Muylder G. Exploiting Knowledge on Leishmania Drug Resistance to Support the Quest for New Drugs. *Trends Parasitol* 2017;33:162–74. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2016.11.003>.
- [88] Tefferi A, Hanson CA, Inwards DJ. How to interpret and pursue an abnormal complete blood cell count in adults. *Mayo Clin Proc* 2005;80:923–36. <https://doi.org/10.4065/80.7.923>.

- [89] Varma N, Naseem S. Hematologic changes in visceral Leishmaniasis/Kala Azar. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2010;26:78–82. <https://doi.org/10.1007/s12288-010-0027-1>.
- [90] Gómez MA, Navas A, Prieto M, Giraldo-Parra L, Cossio A, Alexander N, et al. Immuno-pharmacokinetics of meglumine antimoniate in patients with cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania Viannia*. *Clin Infect Dis* 2020. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa1206>.
- [91] Secretaría Departamental de Salud del Valle del Cauca. Análisis de Situación Integrado de Salud para el Valle del Cauca - Año 2019. Cali, Valle Del Cauca: 2019.
- [92] Secretaría de Salud Municipal de Santiago de Cali. Analisis de situación integrado de salud (ASIS) Municipio Santiago de Cali Año 2018. Santiago de Cali: 2018.
- [93] Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas. Historia - CIDEIM 2020. [https://www.cideim.org.co/historia\\_visual/](https://www.cideim.org.co/historia_visual/) (accessed June 20, 2020).
- [94] Valderrama-Ardila C, Alexander N, Ferro C, Cadena H, Marín D, Holford TR, et al. Environmental risk factors for the incidence of American cutaneous leishmaniasis in a sub-andean zone of Colombia (Chaparral, Tolima). *Am J Trop Med Hyg* 2010;82:243–50. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0218>.
- [95] Woodward M. *Epidemiology Study Design and Data Analysis*. 3rd editio. New York: Chapman & Hall/CRC; 2014.
- [96] Husson F, Le S, Pages J. Analisis de componentes principales. In: Escuela Colombiana de Ingeniería, editor. *Anal. datos con R*, 2013, p. 1–50.
- [97] Lê Cao KA, Boitard S, Besse P. Sparse PLS discriminant analysis: Biologically relevant feature selection and graphical displays for multiclass problems. *BMC Bioinformatics* 2011;12:1–17. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-253/TABLES/3>.
- [98] Brereton RG, Lloyd GR. Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away. *J Chemom* 2014;28:213–25. <https://doi.org/10.1002/CEM.2609>.
- [99] Rohart F, Gautier B, Singh A, Lê Cao KA. mixOmics: An R package for 'omics feature selection and multiple data integration. *PLOS Comput Biol* 2017;13:e1005752. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PCBI.1005752>.
- [100] Ruiz-Perez D, Guan H, Madhivanan P, Mathee K, Narasimhan G. So you think you can PLS-DA? *BMC Bioinformatics* 2020;21:1–10. <https://doi.org/10.1186/S12859-019-3310-7/FIGURES/6>.
- [101] McNutt LA, Wu C, Xue X, Hafner JP. Estimating the relative risk in cohort studies and clinical trials of common outcomes. *Am J Epidemiol* 2003;157:940–3. <https://doi.org/10.1093/AJE/KWG074>.

- [102] Knol MJ, Le Cessie S, Algra A, Vandenbroucke JP, Groenwold RHH. Overestimation of risk ratios by odds ratios in trials and cohort studies: Alternatives to logistic regression. *CMAJ* 2012;184:895–9. <https://doi.org/10.1503/CMAJ.101715/-/DC1>.
- [103] Storey JD. The positive false discovery rate: a Bayesian interpretation and the q-value. <https://doi.org/10.1214/AOS/1074290335> 2003;31:2013–35.
- [104] Akoglu H. User's guide to correlation coefficients. *Turkish J Emerg Med* 2018;18:91. <https://doi.org/10.1016/J.TJEM.2018.08.001>.
- [105] Thiele C, Hirschfeld G. cutpointr: Improved Estimation and Validation of Optimal Cutpoints in R. *J Stat Softw* 2021;98:1–27. <https://doi.org/10.18637/JSS.V098.I11>.
- [106] Fluss R, Faraggi D, Reiser B. Estimation of the Youden Index and its associated cutoff point. *Biometrical J* 2005;47:458–72. <https://doi.org/10.1002/bimj.200410135>.
- [107] Chen W, Qian L, Shi J, Franklin M. Comparing performance between log-binomial and robust Poisson regression models for estimating risk ratios under model misspecification. *BMC Med Res Methodol* 2018;18:1–12. <https://doi.org/10.1186/S12874-018-0519-5/FIGURES/2>.
- [108] McCullagh P. Quasi-Likelihood Functions. <https://doi.org/10.1214/AOS/1176346056> 1983;11:59–67.
- [109] Dobson AJ, Barnett AG. *An Introduction to Generalized Linear Models*. Chapman and Hall/CRC; 2018. <https://doi.org/10.1201/9781315182780>.
- [110] StataCorp. *STATA Multiple-Imputation Reference Manual Release 17*. College Station, TX: StataCorp LLC: 2021.
- [111] Jakobsen JC, Gluud C, Wetterslev J, Winkel P. When and how should multiple imputation be used for handling missing data in randomised clinical trials - A practical guide with flowcharts. *BMC Med Res Methodol* 2017;17:1–10. <https://doi.org/10.1186/S12874-017-0442-1/TABLES/2>.
- [112] Pagana KD, Pagana TJ, Pagana TN. *Mosby's diagnostic and laboratory test reference*. 15th ed. 2020.
- [113] Soto J, Toledo J, Soto P, Vega J, Casas L, Herrera R, et al. Respuesta a antimoniales pentavalentes para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea en Colombia | Revista de la Asociación Colombiana de Dermatología y Cirugía Dermatológica. *Rev Asoc Colomb Dermatología Cirugía Dermatológica* 2005;39–44.
- [114] Santarem AAA, Greggianin GF, Debastiani RG, Ribeiro JBP, Polli DA, Sampaio RNR, et al. Effectiveness of Miltefosine-pentoxifylline compared to Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in C57Bl/6 mice. *Rev*

Soc Bras Med Trop 2014;47:517–20. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0202-2013>.

- [115] Martins SS, Barroso DH, Rodrigues BC, da Motta J de OC, Freire GSM, Pereira LI de A, et al. A Pilot Randomized Clinical Trial: Oral Miltefosine and Pentavalent Antimonials Associated With Pentoxifylline for the Treatment of American Tegumentary Leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol* 2021;11:582. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2021.700323/BIBTEX>.
- [116] López L, Cruz C, Godoy G, Robledo SM, Vélez ID. Thermotherapy effective and safer than Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2013;55:197–204. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000300011>.
- [117] Lockard RD, Wilson ME, Rodríguez NE. Sex-Related Differences in Immune Response and Symptomatic Manifestations to Infection with *Leishmania* Species. *J Immunol Res* 2019;2019. <https://doi.org/10.1155/2019/4103819>.
- [118] Martínez-Valencia AJ, Daza-Rivera CF, Rosales-Chilama M, Cossio A, Casadiego Rincón EJ, Desai MM, et al. Clinical and parasitological factors in parasite persistence after treatment and clinical cure of cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2017;11:1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005713>.
- [119] Passos VM, Barreto SM, Romanha AJ, Krettli AU, Volpini AC, Lima e Costa MF. American cutaneous leishmaniasis: use of a skin test as a predictor of relapse after treatment. *Bull World Health Organ* 2000;78:968–74.
- [120] Castro M del M, Gomez MA, Kip AE, Cossio A, Ortiz E, Navas A, et al. Pharmacokinetics of Miltefosine in children and adults with Cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 2017;61:1–11. <https://doi.org/10.1128/AAC.02198-16>.
- [121] Cruz A, Rainey PM, Herwaldt BL, Stagni G, Palacios R, Trujillo R, et al. Pharmacokinetics of Antimony in Children Treated for Leishmaniasis with Meglumine Antimoniate. *J Infect Dis* 2007;195:602–8. <https://doi.org/10.1086/510860>.
- [122] Aronson N, Herwaldt BL, Libman M, Pearson R, Lopez-Velez R, Weina P, et al. Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). *Clin Infect Dis* 2016;63:e202–64. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw670>.
- [123] D’Elios MM, Benagiano M, della Bella C, Amedei A. T-cell response to bacterial agents. *J Infect Dev Ctries* 2011;5:640–5. <https://doi.org/10.3855/JIDC.2019>.
- [124] Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol* 2016 169 2016;16:581–92. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.72>.

- [125] Unger A, O'Neal S, Machado PRL, Guimarães LH, Morgan DJ, Schrieffer A, et al. Association of Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis Prior to Ulcer Development with High Rate of Failure in Northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 2009;80:574. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.80.574>.
- [126] Machado P, Araújo C, Da Silva AT, Almeida RP, D'Oliveira A, Bittencourt A, et al. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clin Infect Dis* 2002;34. <https://doi.org/10.1086/340526>.
- [127] Amorim CF, Novais FO, Nguyen BT, Misic AM, Carvalho LP, Carvalho EM, et al. Variable gene expression and parasite load predict treatment outcome in cutaneous leishmaniasis. *Sci Transl Med* 2019;11. <https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.AAX4204>.
- [128] Farrell AP. BLOOD | Cellular Composition of the Blood. *Encycl Fish Physiol* 2011;2:984–91. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00125-8>.
- [129] Incir S, Kant Calti H, Erhan Palaoglu K. The Role of Immature Granulocytes and Inflammatory Hemogram Indices in the Inflammation. *Int J Med Biochem* 2020;3:125–30. <https://doi.org/10.14744/IJMB.2020.02986>.
- [130] Georgakopoulou VE, Makrodimetri S, Triantafyllou M, Samara S, Voutsinas PM, Anastasopoulou A, et al. Immature granulocytes: Innovative biomarker for SARS- CoV- 2 infection. *Mol Med Rep* 2022;26:1–5. <https://doi.org/10.3892/MMR.2022.12733/HTML>.
- [131] Lipiński M, Rydzewska G. Immature granulocytes predict severe acute pancreatitis independently of systemic inflammatory response syndrome. *Prz Gastroenterol* 2017;12:140–4. <https://doi.org/10.5114/PG.2017.68116>.
- [132] Rochael NC, Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Desouza-Vieira TS, Oliveira MP, Garciae Souza LF, et al. Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by Leishmania parasites. *Sci Rep* 2015;5. <https://doi.org/10.1038/SREP18302>.
- [133] Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, Soares RPP, Morgado FN, Conceição-Silva F, et al. Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:6748–53. [https://doi.org/10.1073/PNAS.0900226106/SUPPL\\_FILE/SM2.AVI](https://doi.org/10.1073/PNAS.0900226106/SUPPL_FILE/SM2.AVI).
- [134] Charmoy M, Brunner-Agten S, Aebischer D, Auderset F, Launois P, Milon G, et al. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of Leishmania major inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog* 2010;6. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1000755>.
- [135] An I, Ayhan E, Aksoy M, Ozturk M, Erat T, Doni NY. Evaluation of inflammatory parameters in patients with cutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther* 2021;34. <https://doi.org/10.1111/DTH.14603>.

- [136] de Oliveira Cardoso F, da Silva Freitas de Souza C, Mendes V, Abreu-Silva A, da Costa S, da Silva Calabrese K. Immunopathological Studies of *Leishmania amazonensis* Infection in Resistant and in Susceptible Mice. *J Infect Dis* 2010;201:1933–40. <https://doi.org/10.1086/652870>.
- [137] Rodríguez NE, Wilson ME. Eosinophils and mast cells in leishmaniasis. *Immunol Res* 2014;59:129. <https://doi.org/10.1007/S12026-014-8536-X>.
- [138] Blanchard C, Rothenberg ME. Biology of the eosinophil. *Adv Immunol* 2009;101:81–121. [https://doi.org/10.1016/S0065-2776\(08\)01003-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2776(08)01003-1).
- [139] Jacobsen EA, Taranova AG, Lee NA, Lee JJ. Eosinophils: singularly destructive effector cells or purveyors of immunoregulation? *J Allergy Clin Immunol* 2007;119:1313–20. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2007.03.043>.
- [140] Akuthota P, Wang H, Weller PF. Eosinophils as antigen-presenting cells in allergic upper airway disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010;10:14–9. <https://doi.org/10.1097/ACI.0B013E328334F693>.
- [141] Pham MHT, Bonello GB, Castiblanco J, Le T, Sigala J, He W, et al. The rs1024611 regulatory region polymorphism is associated with CCL2 allelic expression imbalance. *PLoS One* 2012;7. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0049498>.
- [142] Pan American Health Organization. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas 2021:1–10. <https://iris.paho.org/handle/10665.2/55368> (accessed July 13, 2022).



## ANEXOS

### ANEXO 1. ESTRATEGIA DE BUSQUEDA DE LA LITERATURA

**PREGUNTA:** ¿Se han descrito parámetros del hemograma que se encuentren asociados con desenlaces terapéuticos diferenciales en tratamientos antileishmaniales de las leishmaniasis cutáneas y/o que puedan ser utilizados como biomarcadores de desenlaces terapéuticos?

**ESTRATEGIA DE BUSQUEDA:** Con el objetivo de hacer una búsqueda más sensible se incluyeron diferentes descriptores en ciencias de la salud (DECS) que podrían ser usados de manera indiscriminada como sinónimos de “hemogramas”, adicionalmente se incluyeron búsquedas alternativas de los DECS de cada “línea celular” por separado medida dentro del hemograma, así mismo se incluyeron DECS para encontrar cualquier tipo de “biomarcador” reportado en la literatura que pudieran incluir parámetros del hemograma y no hubieran sido obtenidos en las primeras búsquedas. La especificidad de la búsqueda se alcanzó haciendo obligatorio que todos los artículos encontrados incluyeran DECS representativos para los términos “leishmaniasis” y “respuesta terapéutica”.

(HEMOGRAMAS) OR (LINEAS CELULARES) OR (BIOMARCADORES) AND (RESPUESTA TERAPEUTICA) AND (LEISHMANIASIS)

**BASE DE DATOS EN LA QUE SE REALIZÓ LA BUSQUEDA:** MEDLINE

#### FORMULA DE BUSQUEDA

(((((Complete Blood Count) OR (Blood Cell Number)) OR (Blood Cell Counts)) OR (Blood Cell Numbers)) OR (Complete Blood Counts)

OR

((((((((((Leukocyte Count) OR (Leukocytes)) OR (Leukocytes, Mononuclear)) OR (Neutrophils)) OR (Monocytes)) OR (Eosinophils)) OR (Erythrocytes)) OR (Erythrocyte Count)) OR (Blood Platelets)) OR (Lymphocytes)) OR (Lymphocyte Count)) OR (Basophils)) OR (Erythroblasts)) OR (Hemoglobins)) OR (Erythrocyte Indices)

OR

(Biomarkers) OR (Markers, Biological) OR (Biologic Markers) OR (Markers, Biologic) OR (Biologic Marker) OR (Marker, Biologic) OR (Marker, Biological) OR (Biological Marker) OR (Biological Markers) OR (Markers, Laboratory) OR (Laboratory Markers) OR (Laboratory Marker) OR (Marker, Laboratory) OR (Serum Markers) OR (Markers, Serum) OR (Marker, Serum) OR (Serum Marker) OR (Surrogate Endpoints) OR (Endpoints, Surrogate) OR (Surrogate End Points) OR (End Points, Surrogate) OR (Surrogate End Point) OR (End Point, Surrogate) OR (Surrogate Endpoint) OR (Endpoint, Surrogate) OR (Markers, Clinical) OR (Clinical Markers) OR (Clinical Marker) OR (Marker, Clinical) OR (Viral Markers) OR (Markers, Viral) OR (Viral Marker) OR (Marker, Viral) OR (Biochemical Marker) OR (Biochemical Markers) OR (Markers, Biochemical) OR (Marker, Biochemical) OR (Markers, Immunologic) OR (Immune Markers) OR (Markers, Immune) OR (Marker, Immunologic) OR (Immunologic Markers) OR (Immune Marker) OR (Marker, Immune) OR (Immunologic Marker) OR (Surrogate Markers) OR (Markers, Surrogate) OR (Marker, Surrogate) OR (Surrogate Marker)

AND

(american tegumentary leishmaniasis) OR (cutaneous leishmaniasis)

AND

(Treatment Outcome)

**ULTIMA FECHA DE ACTUALIZACIÓN DE LA BÚSQUEDA:** 04 de Octubre de 2020

**RESULTADOS DE LA BUSQUEDA:** 96 ARTICULOS ELEGIBLES

History and Search Details						Download Delete	
Search	Actions	Details	Query	Results	Time		
#15	...	>	Search: (#13) AND (#14)	96	21:17:33		
#14	...	>	Search: Treatment Outcome	1,346,236	21:17:09		
#13	...	>	Search: (#12) AND (#10)	2,211	21:02:39		
#12	...	>	Search: ((#9) OR (#8)) OR (#11)	2,701,208	21:02:03		
#11	...	>	Search: (Biomarkers) OR (Markers, Biological) OR (Biologic Markers) OR (Markers, Biologic) OR (Biologic Marker) OR (Marker, Biologic) OR (Marker, Biological) OR (Biological Marker) OR (Biological Markers) OR (Markers, Laboratory) OR (Laboratory Markers) OR (Laboratory Marker) OR (Marker, Laboratory) OR (Serum Markers) OR (Markers, Serum) OR (Marker, Serum) OR (Serum Marker) OR (Surrogate Endpoints) OR (Endpoints, Surrogate) OR (Surrogate End Points) OR (End Points, Surrogate) OR (Surrogate End Point) OR (End Point, Surrogate) OR (Surrogate Endpoint) OR (Endpoint, Surrogate) OR (Markers, Clinical) OR (Clinical Markers) OR (Clinical Marker) OR (Marker, Clinical) OR (Viral Markers) OR (Markers, Viral) OR (Viral Marker) OR (Marker, Viral) OR (Biochemical Marker) OR (Biochemical Markers) OR (Markers, Biochemical) OR (Marker, Biochemical) OR (Markers, Immunologic) OR (Immune Markers) OR (Markers, Immune) OR (Marker, Immunologic) OR (Immunologic Markers) OR (Immune Marker) OR (Marker, Immune) OR (Immunologic Marker) OR (Surrogate Markers) OR (Markers, Surrogate) OR (Marker, Surrogate) OR (Surrogate Marker)	1,203,905	20:56:56		
#10	...	>	Search: (american tegumentary leishmaniasis) OR (cutaneous leishmaniasis)	11,717	20:52:57		
#9	...	>	Search: (((Complete Blood Count) OR (Blood Cell Number)) OR (Blood Cell Counts)) OR (Blood Cell Numbers)) OR (Complete Blood Counts)	270,334	20:51:33		
#8	...	>	Search: (((((((((((Leukocyte Count) OR (Leukocytes)) OR (Leukocytes, Mononuclear)) OR (Neutrophils)) OR (Monocytes)) OR (Eosinophils)) OR (Erythrocytes)) OR (Erythrocyte Count)) OR (Blood Platelets)) OR (Lymphocytes)) OR (Lymphocyte Count)) OR (Basophils)) OR (Erythroblasts)) OR (Hemoglobins)) OR (Erythrocyte Indices)	1,656,865	20:49:56		

**REVISION DE TÍTULOS Y ABSTRACTS:** Se revisaron títulos y abstracts de los **96** artículos elegibles y se encontraron **15** con información que podía ser relevante para esta tesis y/o responder a la pregunta planteada en esta breve revisión de la literatura, estos fueron seleccionados para revisión completa de los manuscritos.

**REVISIÓN DE TEXTO COMPLETO:** Se revisaron los **15** manuscritos y se encontró que contenían información relevante para el estado del arte, marco teórico y planteamiento del problema de este proyecto de investigación, sin embargo, ninguno de ellos respondía a la pregunta aquí planteada.

## ANEXO 2. Plantilla modelo utilizada para la importación de datos

En la tabla suplementaria número 1 se muestra un ejemplo de las plantillas de Excel compartidas con la unidad de epidemiología y bioestadística de CIDEIM. Estas plantillas fueron enviadas en un formato de solicitud en el que se especificaba el proyecto fuente a partir del cual se importarían los datos. Se procedía a identificar el nombre de la variable y la definición en el proyecto actual (utilizando el diccionario de datos del proyecto que se encuentra en línea en el siguiente enlace <https://docs.google.com/spreadsheets/d/1ZohJhwCifkf7csNJREvkbPo28D0vrUIb/e/dit?usp=sharing&ouid=104265590155742996449&rtpof=true&sd=true> ) y se verificaba si esta variable había sido recolectada en el proyecto fuente a partir del cual se importarían los datos.

Cuando se identificaba la variable en el proyecto fuente se procedía a corroborar la definición utilizada para la recolección de información en el diccionario de datos del proyecto fuente, cuando esta definición era la misma planteada para el proyecto actual se procedía a anotar el nombre de la variable en la columna dos y se solicitaba su importación sin ninguna modificación. Cuando la definición de la variable era similar, pero estaba dada en otras unidades de medida, se solicitaba su importación realizando un proceso de transformación según los lineamientos compartidos en la columna 3. Cuando la variable tenía una definición diferente o no se había recolectado en el formato de reporte de caso del proyecto fuente se solicitaba la “no importación de datos”, y se procedía a realizar la revisión manual de la historia clínica para la identificación del dato y la extracción mediante doble digitación en un software digital estandarizado.

Una de las ventajas de la estructura actual de las bases de datos de CIDEIM, es que se ha hecho un esfuerzo en la estandarización de la codificación de variables clave que suelen ser comunes entre diferentes proyectos (Ejm: Sexo, Etnia, Tipo de Lesiones, Tratamiento, Especies parasitarias, Desenlaces Terapéuticos, entre otras), facilitando los procesos de importación y unificación de datos provenientes de estudios diferentes. Para asegurar la calidad de los procesos de importación se corroboraron los datos importados con los registrados en la historia clínica.

**Tabla suplementaria 1. Plantilla modelo utilizada para la importación de datos**

Nombre de variable en Proyecto el proyecto actual	Nombre de la variable a importar en el proyecto anterior	Comentario para la importación del dato
codigo_paciente	-	Asignar siguiendo el consecutivo
codigo_historia	-	Se obtiene de la base de tamizaje y enrolamiento de CIDEIM
proyecto	-	Diligenciar la variable para todos los pacientes provenientes de este proyecto como WT

codigo_ant_pro	codigo_paciente	Importar la variable sin ninguna modificacion
fecha_evaluacion_ci	-	Asignar la fecha de evaluacion de los criterios de inclusion
criterio_inc_1_ci	-	Autodiligenciar como "si" en todos los pacientes importados ya que todos cumplieron el proceso de verificación manual previo
criterio_inc_2_ci	-	Autodiligenciar como "si" en todos los pacientes importados ya que todos cumplieron el proceso de verificación manual previo
criterio_inc_3_ci	-	Autodiligenciar como "si" en todos los pacientes importados ya que todos cumplieron el proceso de verificación manual previo
criterio_inc_4_ci	-	Autodiligenciar como "si" en todos los pacientes importados ya que todos cumplieron el proceso de verificación manual previo
criterio_inc_5_ci	-	Autodiligenciar como "si" en todos los pacientes importados ya que todos cumplieron el proceso de verificación manual previo
criterio_inc_6_ci	-	Autodiligenciar como "si" en todos los pacientes importados ya que todos cumplieron el proceso de verificación manual previo
criterio_exc_1_ci	-	Autodiligenciar como "no" en todos los pacientes importados ya que todos cumplieron el proceso de verificación manual previo
criterio_exc_2_ci	-	Autodiligenciar como "no" en todos los pacientes importados ya que todos cumplieron el proceso de verificación manual previo
paciente_enrolado_ci	-	Autodiligenciar como "si" en todos los pacientes importados ya que todos cumplieron el proceso de verificación manual previo
fechaHoraCreacion	-	Llenar la fecha en la que se realice la importacion de datos
fecha_evaluacion_eb	-	Llenar la fecha en la que se realice la importacion de datos
visita_eval_realizada_eb	-	Si la variable "eb_lc_fecha_eval" es diferente a no dato o no aplica, automaticamente esta pregunta se llena como un si
fecha_visita_eb	eb_lc_fecha_eval	Importar la variable sin ninguna modificacion
edad_eb	-	Esta variable se solicita en años. Se obtiene de restar dos fechas: eb_lc_fecha_eval - eb_lc_fecha_nacimiento
sexo_nacimiento_eb	eb_lc_sexo	Importar la variable sin ninguna modificacion
grupo_etnico_eb	eb_lc_etnia	Importar la variable sin ninguna modificacion
infeccion_concom_eb	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente

comorbilidades_eb	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
num_comorbilidades_eb	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
tipo_comorbilidad_1_eb	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
tipo_comorbilidad_2_eb	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
tipo_comorbilidad_3_eb	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
tipo_comorbilidad_4_eb	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
tipo_comorbilidad_5_eb	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
tipo_comorbilidad_6_eb	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
historia_previa_eb	eb_lc_dx_previo	Importar la variable sin ninguna modificación
tiempo_sin_actual_eb	eb_lc_tiempo_evolucion	Dado que esta variable se recolectó en meses y yo necesito el dato en semanas, solicito que se convierta a semanas multiplicando el valor exportado por 4,5.
peso_eb	eb_lc_peso	Importar la variable sin ninguna modificación
talla_eb	eb_lc_estatura	Importar la variable sin ninguna modificación
num_lesiones_pre_eb	eb_lc_numero_lc_activas	Importar la variable sin ninguna modificación
tipo_lesion_eb	eb_lc_tipo_lesion_1	Importar la variable sin ninguna modificación
linfa_regional_eb	eb_lc_adenopatía_reg_lesion_1	Importar la variable sin ninguna modificación
tto_prescrito_eb	eb_lc_tto_mcto	Importar la variable sin ninguna modificación
poso_glu_pres_eb	eb_lc_tto_mcto_gluca_n_dosis	Importar la variable sin ninguna modificación
poso_mil_pres_eb	eb_lc_tto_mcto_milte_dosis	Importar la variable sin ninguna modificación
dias_tto_ordenado_eb	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
total_amp_glu_eb	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente

total_amp_mil_50_eb	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
total_amp_cap_10_eb	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
fechaHoraCreacion	-	Llenar la fecha en la que se realice la importacion de datos
fecha_evaluacion_pre_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
fecha_hemo_pretra_pre_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
hemo_tomado_pre_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
recuen_leuco_pre_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
recuen_normo_pre_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
recuen_neutro_pre_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
recuen_linfo_pre_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
recuen_mono_pre_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
recuen_eosi_pre_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
recuen_baso_pre_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
recuen_granu_pre_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
recuen_glo_pre_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
concen_hemo_pre_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
porc_hemato_pre_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
recu_plaque_pre_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
fechaHoraCreacion	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
fecha_evaluacion_ftto	-	Llenar la fecha en la que se realice la importacion de datos
visita_eval_realizada_ftto	v3_lc_visita_realizada	Importar la variable sin ninguna modificacion

fecha_visita_ftto	v3_lc_fecha_evaluacion	Importar la variable sin ninguna modificacion
infeccion_concom_ftto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
num_les_pos_tto_ftto	v3_lc_numero_lc_activas	Importar la variable sin ninguna modificacion
tipo_lesion_ftto	v3_ls_lc_tipo_lesion_actual_1	Importar la variable sin ninguna modificacion
linfa_regional_ftto	v3_ls_lc_adeno_reg_lesion_1	Importar la variable sin ninguna modificacion
dias_tto_admido_ftto	-	Importar la variable sin ninguna modificación
total_amp_glu_ftto	v3_lc_amp_tab_tomadas v3_lc_amp_tab_tom_tipo	Acá solo se les importa dato numerico (v3_lc_amp_tab_tomadas) a los que recibieron ampollas (ver variable v3_lc_amp_tab_tom_tipo)
total_cap_milte_50_ftto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
total_cap_milte_10_ftto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
estado_fin_tto_ftto	v3_lc_resp_terapeutica_fin_tto	Importar la variable sin ninguna modificacion
fechaHoraCreacion	-	Llenar la fecha en la que se realice la importacion de datos
fecha_evaluacion_post_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
visita_eval_realizada_post_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
hemo_tomado_post_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
fecha_hemo_pretra_post_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
recuen_leuco_post_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
recuen_normo_post_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
recuen_neutro_post_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
recuen_linfo_post_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
recuen_mono_post_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
recuen_eosi_post_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente

recuen_baso_post_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
recuen_granu_post_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
recuen_glo_post_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
concen_hemo_post_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
porc_hemato_post_tto	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
fechaHoraCreacion	-	No se importa nada, dato se extraerá manualmente
fecha_evaluacion_s8	-	Llenar la fecha en la que se realice la importacion de datos
visita_eval_realizada_s8	v4_lc_visita_realizada	Importar la variable sin ninguna modificacion
fecha_visita_s8	v4_lc_fecha_evaluacion	Importar la variable sin ninguna modificacion
estado_fin_tto_s8	v4_lc_resp_terap_semana8_tto	Importar la variable sin ninguna modificacion
fechaHoraCreacion	-	Llenar la fecha en la que se realice la importacion de datos
fecha_evaluacion_s13	-	Llenar la fecha en la que se realice la importacion de datos
visita_eval_realizada_s13	v5_lc_visita_realizada	Importar la variable sin ninguna modificacion
fecha_visita_s13	v5_lc_fecha_evaluacion	Importar la variable sin ninguna modificacion
estado_fin_tto_s13	v5_lc_resp_terap_semana13_tto	Importar la variable sin ninguna modificacion
fechaHoraCreacion	-	Llenar la fecha en la que se realice la importacion de datos
fecha_evaluacion_s26	-	Llenar la fecha en la que se realice la importacion de datos
visita_eval_realizada_s26	v6_lc_visita_realizada	Importar la variable sin ninguna modificacion
fecha_visita_s26	v6_lc_fecha_evaluacion	Importar la variable sin ninguna modificacion
estado_fin_tto_s26	v6_lc_resp_terape_semana26_tto	Importar la variable sin ninguna modificacion
fechaHoraCreacion	-	Llenar la fecha en la que se realice la importacion de datos



fecha_evaluacion_va	-	Llenar la fecha en la que se realice la importacion de datos
visita_eval_realizada_va	-	Si la fecha de evaluacion vnp_lc_fecha_evaluacion es diferente a "no aplica" o a "no dato", es decir si existe una fecha de evaluacion no programada, esta pregunta se llena como 1. "Si". Si no hay visitas no programadas (vnp_lc_fecha_evaluacion = No aplica o a No dato) la variable se llena como 0. No
fecha_visita_va	vnp_lc_fecha_evaluacion	Importar la variable sin ninguna modificacion
estado_fin_tto_va	vnp_lc_resp_terape_vnp	Importar la variable sin ninguna modificacion
fechaHoraCreacion	-	Llenar la fecha en la que se realice la importacion de datos
fecha_evaluacion_especie	-	Llenar la fecha en la que se realice la importacion de datos
visita_eval_realizada_especie	eb_lc_cultivo_aspi_realizado	Importar la variable sin ninguna modificacion
fecha_visita_especie	eb_lc_fecha_eval	Importar la variable sin ninguna modificacion
especie_paras_especie	-	Exportar la especie de la base de datos de biobanco utilizando las fechas importadas
fechaHoraCreacion	-	Llenar la fecha en la que se realice la importacion de datos
fecha_evaluacion_ef	-	Llenar la fecha en la que se realice la importacion de datos
estado_fin_tto_ef	-	No se importa nada. Dato se llenará manualmente

### ANEXO 3. Formato de discrepancias de CIDEIM (Manual query form)



CENTRO INTERNACIONAL DE ENTRENAMIENTO E INVESTIGACIONES MEDICAS  
QUERY FORM FOR08008 - Ver 01

ID Query

Codigo del estudio

Fecha

Tipo de error

Nombre del estudio

Codigo del sitio

Nombre del Sitio

Problema Identificado

Respuesta por parte el sitio

Query Realizada por

Firma de autorización

Tipo de query

Query resuelta por

Fecha de respuesta

Firma quien resuelve

## ANEXO 4. Acta de aprobación, Comité de Revisión de Ética Humana – Universidad del Valle

Comité Institucional de Revisión de Ética Humana  
Facultad de Salud



Santiago de Cali, 2 de junio de 2021

### **Investigadores**

DAVID ESTEBAN REBELLÓN SÁNCHEZ

LYDA ELENA OSORIO AMAYA

MARIA ADELAIDA GÓMEZ

**Escuela de Salud Pública**

**Facultad de Salud**

**Universidad del valle**

**Asunto:** Aprobación a protocolo sin participación directa de seres humanos

Cordial saludo.

El Comité Institucional de Revisión de Ética Humana en sesión plenaria, deja constancia que en la propuesta “PARAMETROS DEL HEMOGRAMA PRE Y POSTRATAMIENTO, COMO BIOMARCADORES TEMPRANOS DE DESENLACE TERAPÉUTICO EN PACIENTES CON LEISHMANIASIS CUTÁNEA ATENDIDOS EN EL CENTRO Y EL SUROCCIDENTE COLOMBIANO (2007-2020)” Con código E 033-021, se trabajará con base de datos.

Esta propuesta fue revisada y aprobada. Se considera que no involucra la participación directa de seres humanos y cumple con los lineamientos éticos.

Se deja copia en nuestro archivo para futuras consultas o constancia de esta decisión.

Atentamente,

**BEATRIZ E. FERNÁNDEZ**

Presidente

Comité Institucional de Revisión de Ética Humana

Universidad del Valle – Sede San Fernando

Calle 4B N° 36 – 00 Edificio 100 oficina 222

Tel. 518 56 77

[eticasalud@correounivalle.edu.co](mailto:eticasalud@correounivalle.edu.co)

Cali, Colombia



Proyecto:

**“PARAMETROS DEL HEMOGRAMA PRE Y POSTRATAMIENTO, COMO BIOMARCADORES TEMPRANOS DE DESENLACE TERAPÉUTICO EN PACIENTES CON LEISHMANIASIS CUTÁNEA ATENDIDOS EN EL CENTRO Y EL SUROCCIDENTE COLOMBIANO (2007-2020)”**

Sometido Por:

**DAVID ESTEBAN REBELLÓN SÁNCHEZ/LYDA ELENA OSORIO AMAYA/MARIA ADELAIDA GÓMEZ**

Código Interno: (E 033-021)

Fecha:

DÍA	MES	AÑO
15	07	2022

El Consejo de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, ha establecido el Comité de Ética en Investigación en Salud (CEIS), el cual está regido por la Resolución 8430 de 1993 “por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”, del Ministerio de Salud, y ante el vacío de una norma específica para comités de ética que no revisen protocolos con medicamentos, se acogerá a la Resolución 2378 del 2008 “Por la cual se adoptan las Buenas Prácticas Clínicas para las instituciones que conducen investigación con medicamentos en seres humanos” del Ministerio de Protección Social, en los casos necesarios se adhiere a los principios de la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial en su última revisión en el 2013, las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos (CIOMS –OMS de 2016); y el Código de Regulaciones Federales, título 45, parte 46, para la protección de los participantes, del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos 2000.

X	Informe de avance
X	Protocolo de investigación
X	Carta de justificación de la renovación
X	Aval Anterior

1. Revisó y cumple con lo establecido por el comité para este trámite.
2. Según las categorías de riesgo establecidas en el artículo 11 de la Resolución N° 008430 de 1993 del Ministerio de Salud, el presente estudio tiene la siguiente **Clasificación de Riesgo**:

X	Riesgo mínimo
	Riesgo mayor del mínimo

3. Que las **medidas** que están siendo tomadas para proteger a los participantes son adecuadas.
4. La forma de obtener el **consentimiento** informado de los participantes en el estudio, es adecuada.
5. **Informará** inmediatamente a las directivas institucionales:
  - a. Todo **desacato** de los investigadores a las solicitudes del Comité.



- b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
- 6. La presente renovación del aval se **aprueba** por un periodo de un **(1) año**, a partir de esta fecha.
- 7. El **investigador principal** deberá informar al Comité:
  - a. Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité, excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los participantes.
  - b. Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos para los participantes u otros.
  - c. Cualquier evento adverso serio dentro de las primeras 24 horas de ocurrido, al secretario(a) y al presidente.
  - d. Cualquier conocimiento nuevo respecto al estudio, que pueda afectar la tasa riesgo/beneficio para los participantes.
  - e. Cualquier decisión tomada por otros comités de ética.
  - f. La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto.
- 8. El investigador principal deberá presentar un informe al final una vez terminada la ejecución de su proyecto.

Firma:

Nombre: BEATRIZ EUGENIA FERNÁNDEZ HURTADO

Capacidad Representativa: PRESIDENTE

Teléfono: 5185677

## ANEXO 5. Acta de aprobación, Comité Institucional de Ética en Investigación en Humanos



### COMITE INSTITUCIONAL DE ETICA DE INVESTIGACION EN SERES HUMANOS

#### ACTA DE EVALUACIÓN EXPEDITA

Registro en acta de reunión virtual 07-2021 del CIEIH

PROYECTO “Parámetros del hemograma pre y pos tratamiento, como biomarcadores tempranos de desenlace terapéutico en pacientes con leishmaniasis cutánea atendidos en el centro y el suroccidente colombiano (2007-2020)”.

IP David Esteban Rebellón, MD, candidato a Maestría en Epidemiología. Directoras de tesis Lyda Osorio, PhD y María Adelaida Gómez, PhD.

Fecha en que fue sometido: 31 MAY 2021

El CENTRO INTERNACIONAL DE ENTRENAMIENTO E INVESTIGACIONES MEDICAS (CIDEIM), ha establecido el Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos (CIEIH), el cual está regido por la Resolución 008430 del 4 de octubre de 1993 del Ministerio de Salud de Colombia por la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud; los principios de la Asamblea Médica Mundial expuestos en su Declaración de Helsinki de 1964 última revisión en 2013; las Pautas CIOMS actualización 2016 y el código de regulaciones federales, título 45, parte 46, para la protección de sujetos humanos, del departamento de salud y servicios humanos de los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos (Junio 18 de 1991).

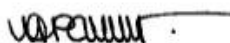
Este Comité certifica que:


1. La Presidente del CIEIH revisó y aprobó los siguientes documentos del presente proyecto:
  - (X) Protocolo, versión No. 1, 25 de mayo de 2021.
  - (X) Formato de recolección de datos, versión 1.0, 25 de mayo de 2021, revisado por la UEB.
  - (X) Carta de aprobación por parte del Comité Institucional de Revisión de Ética Humana de la Facultad de Salud de la Universidad del Valle, 2 de junio de 2021, clasificado como protocolo sin participación directa de seres humanos/trabajo con base de datos.
2. El comité informa que el estudio tiene una categoría de **Riesgo Mínimo (X)** según las categorías de riesgo establecidas por el código de regulaciones federales, título 45, parte 46 para la protección de sujetos humanos.
3. La Presidente del CIEIH informa que la información contenida en los documentos presentados no representa riesgos para los participantes.
4. El Comité informará inmediatamente a las directivas institucionales:
  - a. Todo desacato de los investigadores a las solicitudes del Comité.
  - b. Cualquier suspensión o terminación de la aprobación por parte del Comité.
6. El investigador principal deberá informar al Comité
  - a. Cualquier cambio que se proponga introducir en este proyecto. Estos cambios no podrán iniciarse sin la revisión y aprobación del Comité excepto cuando sean necesarios para eliminar peligros inminentes para los sujetos.
  - b. Cualquier problema imprevisto que involucre riesgos para los sujetos u otros.
  - c. Informar cualquier decisión tomada por otros comités de ética.
  - d. La terminación prematura o suspensión del proyecto explicando la razón para esto.



e. El investigador principal deberá presentar un informe al final del año de aprobación. Los proyectos de duración mayor a un año, deberán ser sometidos nuevamente con todos los documentos para revisión actualizados.

Para constancia se firma el presente certificado

Firma:   
Nombre: Gloria I. Palma  
Título: MD, PhD.  
Capacidad representativa: Presidente  
(CIEIH) Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos  
CIDEIM

Firma:   
Nombre: Elena Rey  
Título: MD, Mg. Bioética  
Capacidad representativa: Secretaria  
Comité Institucional de Ética de Investigación en Humanos CIEIH / CIDEIM

## ANEXO 6. Comparación de modelos multivariados para los parámetros del hemograma pre-tratamiento

Tabla Suplementaria Anexo 6. Comparación de modelos multivariados incluyendo los parámetros pre-tratamiento asociados a falla terapéutica												
Variables	Modelo 1 Modelo base incluyendo variables con >180 obs			Modelo 2 Modelo base sin las variables con p > 0,2 en test wald			Modelo 3 Modelo 2 + tipo de lesión			Modelo 4 Modelo 2 + tipo de tratamiento		
	RR	IC	valor p	RR	IC	valor p	RR	IC	valor p	RR	IC	valor p
<b>Variables sociodemográficas</b>												
Sexo masculino (Ref: Femenino)	2,78	0,66 - 11,73	0,16	3,06	0,81 - 11,56	0,09	3,02	0,80 - 11,43	0,102	2,81	0,67 - 11,76	0,15
Edad, (Centrada sobre la media de 33 años)	0,95	0,93 - 0,98	0,004	0,96	0,93 - 0,98	0,001	0,96	0,93 - 0,98	0,001	0,95	0,93 - 0,98	0,004
<b>Parámetros del hemograma</b>												
Conteo granulocitos $\leq 0,01 \times 10^3$	2,27	1,17 - 4,38	0,01	2,11	1,08 - 4,11	0,02	2,28	1,18 - 4,39	0,01	2,09	1,07 - 4,07	0,02
Plaquetas pre-tratamiento	1,87	0,96 - 3,62	0,06	1,95	1,00 - 3,79	0,04	1,96	1,00 - 3,83	0,04	1,86	0,97 - 3,57	0,06
<b>Variables clínicas</b>												
Tipo de lesión pretratamiento, (Ref: úlceras)												
Lesion no ulcerada	1,42	0,72 - 2,91	0,29				1,44	0,73 - 2,83	0,28			
Presencia de adenopatía pretratamiento (Ref: No)	1,57	0,80 - 3,06	0,18	1,69	0,88 - 3,24	0,11	1,69	0,88 - 3,24	0,11	1,67	0,86 - 3,25	0,12
Infección concomitante pre-tratamiento (Ref: No)	2,31	1,05 - 5,10	0,03	2,51	1,12 - 5,61	0,02	2,51	1,12 - 5,61	0,02	2,45	1,03 - 5,79	0,04
Tratamiento (Ref: miltefosine)												
Glucantime	1,3	0,49 - 3,39	0,59							1,28	0,50 - 3,29	0,59
Glucantime + Pentoxifilina	1,25	0,43 - 3,60	0,67							1,28	0,45 - 3,63	0,63
Tiempo de evolución menor a un mes (Ref: mayor)												
Especie parasitaria (Ref: Otras leishmanais viannias)												
L. (V) braziliensis												
n	183			183			183			183		
AIC	0,92			0,89			0,9			0,91		
BIC	-813,58			-828,39			-823,72			-818,25		
LR test				Modelo 1 vs Modelo 2: 0.84			Modelo 2 vs Modelo 3: 0.46			Modelo 2 vs Modelo 4: 0.86		



**Tabla Suplementaria Anexo 6. Comparación de modelos multivariados incluyendo los parámetros pre-tratamiento asociados a falla terapéutica**

Variables	Modelo 5			Modelo 6			Modelo 7		
	RR	IC	valor p	RR	IC	valor p	RR	IC	valor p
<b>Variables sociodemográficas</b>									
Sexo masculino (Ref: Femenino)				3,22	0,84 - 12,36	0,08	4,65	0,65 - 33,08	0,12
Edad, (Centrada sobre la media de 33 años)	0,96	0,93 - 0,98	0,001	0,97	0,94 - 0,99	0,01	0,96	0,94 - 0,98	0,004
<b>Parámetros del hemograma</b>									
Conteo granulocitos $\leq 0,01 \times 10^3$	2,2	1,14 - 4,25	0,01	2,37	1,14 - 4,92	0,02	1,43	0,69 - 2,97	0,33
Plaquetas pre-tratamiento	2,22	1,14 - 4,30	0,01	1,75	0,81 - 3,78	0,15	2,01	0,97 - 4,16	0,05
<b>Variables clínicas</b>									
Tipo de lesión pretratamiento, (Ref: úlceras)									
Lesión no ulcerada									
Presencia de adenopatía pretratamiento (Ref: No)	1,75	0,90 - 3,41	0,09	1,97	0,97 - 4,00	0,05	1,61	0,84 - 3,07	0,14
Infección concomitante pre-tratamiento (Ref: No)	2,54	1,10 - 5,87	0,02	2,11	0,80 - 5,53	0,12	2,23	0,65 - 7,66	0,2
Tratamiento (Ref: miltefosine)									
Glucantime									
Glucantime + Pentoxifilina									
Tiempo de evolución menor a un mes (Ref: mayor)				1,54	0,72 - 3,27	0,25			
Especie parasitaria (Ref: Otras leishmanais viannias)									
L. (V) braziliensis							1,85	0,93 - 3,64	0,07
n		183			155			139	
AIC		0,9			0,89			0,99	
BIC		-830,5			-669,1			-576,54	
LR test		Modelo 2 vs Modelo 5: 0.07			NA			NA	

## ANEXO 7. Comparación de modelos multivariados para los parámetros del hemograma post-tratamiento

Tabla Suplementaria Anexo 7. Comparación de modelos multivariados incluyendo los parámetros post-tratamiento asociados a falla terapéutica									
Variables	Modelo 1			Modelo 2			Modelo 3		
	RR	IC	valor p	RR	IC	valor p	RR	IC	valor p
<b>Variables sociodemográficas</b>									
Sexo masculino (Ref: Femenino)	2,78	0,68 - 11,25	0,15	3,23	0,87 - 11,85	0,07	3,24	0,87 - 12,06	0,07
Edad, (Centrada sobre la media de 33 años)	0,96	0,93 - 0,98	0,003	0,96	0,94 - 0,98	<0,001	0,96	0,94 - 0,98	<0,001
<b>Parámetros del hemograma</b>									
Porcentaje de eosinofilos $\geq 14\%$	1,93	0,99 - 3,73	0,05	2,01	1,05 - 3,82	0,03	2,04	1,06 - 3,93	0,03
Razón de cambio de los monocitos $\geq 1,07$	3,3	1,69 - 6,46	<0,001	3,15	1,63 - 6,10	0,001	3,17	1,65 - 6,10	0,001
<b>Variables clínicas</b>									
Infección concomitante al final del tratamiento, (Ref: No)	7,48	0,98 - 56,61	0,05	6,14	1,15 - 32,71	0,03	6,53	1,18 - 36,00	0,03
Tratamiento (Ref: miltefosine)									
Glucantime	1,34	0,53 - 3,39	0,53						
Glucantime + Pentoxifilina	1,93	0,65 - 5,75	0,23						
Lesion no ulcerada pretratamiento, (Ref: ulceras)	1,18	0,47 - 2,98	0,71				1,28	0,54 - 2,99	0,56
Presencia de adenopatía pretratamiento (Ref: No)	1,99	0,97 - 4,08	0,06	2,19	1,17 - 4,11	0,01	2,05	1,04 - 4,07	0,03
n		153			153			153	
AIC		0,94			0,91			0,93	
BIC		-648,13			-661,81			-656,99	
LR test				Modelo 1 vs Modelo 2: 0.70			Modelo 2 vs Modelo 3: 0.64		

**Tabla Suplementaria Anexo 7. Comparación de modelos multivariados incluyendo los parámetros post-tratamiento asociados a falla terapéutica**

Variables	Modelo 4			Modelo 5			Modelo 6		
	RR	IC	valor p	RR	IC	valor p	RR	IC	valor p
<b>Variables sociodemográficas</b>									
Sexo masculino (Ref: Femenino)	2,78	0,69 - 11,17	0,14	1.56e+07	7532773 - 3.23e+07	<0,001	1,96	0,60 - 6,36	0,25
Edad, (Centrada sobre la media de 33 años)	0,95	0,93 - 0,98	0,002	0,96	0,95 - 0,98	<0,001	0,95	0,92 - 0,98	0,001
<b>Parámetros del hemograma</b>									
Porcentaje de eosinofilos $\geq 14\%$	1,91	1,00 - 3,65	0,04	1,78	0,93 - 3,40	0,07	1,63	0,80 - 3,34	0,17
Razón de cambio de los monocitos $\geq 1,07$	3,33	1,71 - 6,48	<0,001	2,86	1,46 - 5,62	0,002	2,9	1,27 - 6,62	0,01
<b>Variables clínicas</b>									
Infección concomitante al final del tratamiento, (Ref: No)	7,32	0,98 - 54,66	0,05	11,58	4,29 - 31,25	<0,001	133,46	29,53 - 603,16	<0,001
Tratamiento (Ref: miltefosine)									
Glucantime	1,33	0,53 - 3,31	0,53						
Glucantime + Pentoxifilina	1,98	0,67 - 5,83	0,21						
Lesion no ulcerada pretratamiento, (Ref: ulceras)									
Presencia de adenopatía pretratamiento (Ref: No)	2,05	1,04 - 4,07	0,03	1,41	0,67 - 2,93	0,35	2,22	0,98 - 5,01	0,05
Tiempo de evolución menor a un mes (Ref: mayor)							3,74	1,84 - 7,62	<0,001
Variación de la lesión (Ref: Ulcera pre-tto - Placa post-tto)									
Ulcera pre-tto - Ulcera post-tto				1,7	0,83 - 3,50	0,14			
Otros cambios				2,1	0,80 - 5,48	0,12			
n	153			132			128		
AIC	0,93			0,93			0,89		
BIC	-653,06			-545,16			-524,33		
LR test	Modelo 2 vs Modelo 4: 0.52			NA			NA		

Tabla Suplementaria Anexo 7.. Comparación de modelos multivariados incluyendo los parámetros post-tratamiento asociados a falla terapéutica												
Variables	Modelo 7			Modelo 8			Modelo 9			Modelo 10		
	RR	IC	valor p	RR	IC	valor p	RR	IC	valor p	RR	IC	valor p
<b>Variables sociodemográficas</b>												
Sexo masculino (Ref: Femenino)	4,21	0,51 - 34,32	0,17	2,75	0,72 - 10,51	0,13	2,76	0,72 - 10,55	0,13	2,71	0,69 - 10,64	0,15
Edad, (Centrada sobre la media de 33 años)	0,96	0,93 - 0,98	0,004	0,96	0,93 - 0,98	0,005	0,96	0,93 - 0,99	0,007	0,96	0,93 - 0,98	0,005
<b>Parámetros del hemograma</b>												
Porcentaje de eosinófilos $\geq 14\%$	1,56	0,75 - 3,26	0,22									
Razón de cambio de los monocitos $\geq 1,07$	2,75	1,31 - 5,78	0,007	3,15	1,63 - 6,10	0,001	2,97	1,48 - 5,98	0,002	3,43	1,76 - 6,66	<0,001
Conteo de eosinófilos post-tratamiento $\geq 0,92 \times 10^3$ cel/uL				1,57	0,75 - 3,27	0,22						
Índice Eosinófilos/Granulocitos inmaduros exponenciados $\geq 0,93$							1,63	0,77 - 3,43	0,19			
Índice Eosinófilos / Neutrófilos $\geq 0,3$										1,79	0,91 - 3,49	0,08
<b>Variables clínicas</b>												
Infección concomitante al final del tratamiento , (Ref: No)	3,95	0,44 - 34,77	0,21	6,36	0,79 - 51,10	0,08	6,32	0,79 - 50,08	0,08	7,07	0,89 - 55,77	0,06
Lesión no ulcerada pretratamiento, (Ref: úlceras)												
Presencia de adenopatía pretratamiento (Ref: No)	2,22	0,98 - 5,01	0,05	1,9	0,93 - 3,87	0,07	1,88	0,92 - 3,80	0,08	1,9	0,92 - 3,92	0,07
Especie parasitaria (Ref: Otras leishmanias viannias)												
L. (V) braziliensis	1,6	0,81 - 3,15	0,16									
n		128			153			152			151	
AIC		1,06			0,95			0,96			0,91	
BIC		-432,74			-646,58			-641,09			-661,81	
LR test		NA			Modelo 2 vs Modelo 8: 1,00			NA			Modelo 1 vs Modelo 2: 0.70	