



Valor pronóstico de los cambios fisiológicos asociados a la quimio-resistencia en Leishmania

Maritza Padrón Nieves¹.

Emilia Díaz².

Amarilis Romero³.

Claudia Machuca⁴.

Alicia Ponte Sucre⁵.

¹Laboratorio de Fisiología Molecular, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

²Laboratorio de Fisiología Molecular, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

³Laboratorio de Fisiología Molecular, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

⁴Laboratorio de Fisiología Molecular, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

⁵Laboratorio de Fisiología Molecular, Instituto de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela
aiponte@rgmail.ve

Correspondencia: Instituto de Medicina Tropical - Facultad de Medicina - Universidad Central de Venezuela.

Consignado el 14 de Marzo del 2008 a la Revista Vitae Academia Biomédica Digital.

RESUMEN

El fracaso terapéutico en leishmaniasis es común en áreas endémicas. Ocurre debido al compromiso inmunológico del paciente, a cambios en la farmacocinética de las drogas o a

infecciones recurrentes. La resistencia a drogas juega un papel fundamental en este fracaso terapéutico, y hasta ahora no existen marcadores de resistencia fáciles de utilizar en la clínica. El único método confiable lo constituye el modelo in vitro macrófago-amastigote, que es laborioso y de alto costo. Debido a ello es fundamental la descripción de indicadores celulares y moleculares que puedan ser usados para identificar parásitos con fenotipo quimio-resistente. En esta revisión proponemos evaluar propiedades particulares evidenciadas en parásitos de referencia seleccionados como quimio-resistentes, en parásitos aislados de pacientes; adicionalmente planteamos un enfoque alternativo en la lucha contra la leishmaniasis donde, además de las estrategias de protección individual, control del vector y diagnóstico adecuado, se incluyan herramientas para el pronóstico del éxito de la quimioterapia en los pacientes infectados.

PALABRAS CLAVE: Resistencia a drogas, marcadores de resistencia, adaptación metabólica, Leishmania.

PROGNOSTIC VALUE OF PHYSIOLOGICAL CHANGES ASSOCIATED WITH THE CHEMO-RESISTANCE IN LEISHMANIA

SUMMARY

Therapeutic failure in leishmaniasis is a common problem in endemic areas. This could be attributed to altered drug pharmacokinetics, re-infection, or immunologic compromise of the host. However, strong indicators suggest that it may be partly due to drug resistance. Until now, there are no markers of chemo-resistance against leishmanicidal drugs, and the only reliable method for monitoring resistance of individual isolates is the in vitro amastigote-macrophage model. It is thus necessary to find cellular and molecular indicators that can be used to identify the drug-resistant phenotype of the infecting parasites. Herein we postulate that drug resistance in Leishmania is a phenomena accompanied by physiological changes that might serve as markers of chemo-resistance and helpful for designing strategies to circumvent Leishmania drug-resistance and successfully treating leishmaniasis. If this conclusion holds true in particularly, in isolates obtained from patients, its prognostic value for the treatment outcome might be extremely useful.

KEY WORDS: Drug resistance, resistance markers, metabolic adaptation, Leishmania

VALOR PRONÓSTICO DE LOS CAMBIOS FISIOLÓGICOS ASOCIADOS A LA QUIMIO-RESISTENCIA EN LEISHMANIA. (REVISIÓN INVITADA)

INTRODUCCIÓN

Las infecciones producidas por parásitos constituyen un problema de salud pública en países de clima tropical y subtropical. Estas infecciones afectan el estado físico, psíquico y social de las comunidades que las padecen (Evans y Albornoz, 2000) y a excepción de la Antártida, el resto de las zonas geográficas del mundo se consideran en riesgo (OMS, 2002).

Millones de personas están infectadas por diversas parasitosis. En el caso de la leishmaniasis, padecimiento que nos ocupa, se calcula que unas 350 millones de personas en el mundo están en riesgo de contraer la enfermedad, con unas 12 millones de personas afectadas y una

ocurrencia anual de 1,5 a 2 millones de casos de la forma cutánea y 500.000 casos de la forma visceral (Croft y col, 2006).

Leishmaniasis es el término que se refiere a las expresiones clínicas de la dolencia causada por al menos 20 especies diferentes de un parásito intracelular obligado del género *Leishmania*, que se aloja en las células del sistema fagocítico monocítico. Doce de estas especies afectan a los humanos. Es una enfermedad endémica propia de nichos ecológicos que incluyen desiertos y selvas tropicales en las áreas tropicales y subtropicales y en el sur de Europa, así como áreas rurales y sub-urbanas (Locksley, 1994; Zepa y col, 2003; Croft y col, 2006).

Desde el punto de vista epidemiológico la leishmaniasis se considera una zoonosis transmitida por animales pequeños, silvestres o domésticos al hombre, por la picada de la hembra de la mosca de arena (*Lutzomyia*), de la cual se han descrito 30 especies diferentes (Mendoza-León y col, 1996). En algunas áreas del mundo como en La India, se considera que la leishmaniasis es una antroponosis, donde los humanos son también hospederos incidentales (OMS, 2001). Según datos de la Organización Mundial de la Salud, en los últimos 15 años la incidencia de leishmaniasis ha aumentado 42 veces; actualmente constituye la segunda causa de muerte a nivel mundial, causada por enfermedades parasitarias. El vertiginoso aumento de la frecuencia de leishmaniasis se correlaciona con el riesgo de co-infección con el virus de inmunodeficiencia adquirida, principalmente en países del sur de Europa, africanos y asiáticos, donde las terapias retrovirales contra el virus de inmunodeficiencia adquirida no están disponibles (o son insuficientes), debido a su alto costo para la población local (OMS, 2001). Las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad dependen de la especie de protozoo infectante. Estas entidades clínicas se manifiestan en cuatro formas: cutánea, cutánea difusa, mucocutánea y visceral, siendo las tres primeras, las más frecuentes en Venezuela. La patogenia se fundamenta en la destrucción celular provocada por la ruptura de los ?nidos? de amastigotes (estadio intracelular en el macrófago), acompañado de una reacción inflamatoria muy intensa. En la forma visceral se altera el funcionamiento de diferentes órganos como el hígado y el bazo (Locksley 1994; Neghme y col, 1999). Estas patologías producen respuestas inmunológicas bien definidas, cuya comprensión es útil para impulsar el desarrollo de una inmunoterapia efectiva.

La condición natural de *Leishmania* durante su ciclo de vida digenético es alternar entre dos situaciones extremas a las cuales el parásito debe adaptarse. El hospedero mamífero y el insecto vector ostentan condiciones fisiológicas con características bioquímicas específicas que difieren entre sí. Entre ellas podemos mencionar temperatura, pH, osmolaridad, y cantidad y calidad de nutrientes. Este hecho pone de relieve la importancia fundamental de la membrana celular del parásito en el mantenimiento de la homeostasis celular y la supervivencia de *Leishmania* dentro del macrófago, así como en el insecto vector (Zilberstein y Shapira, 1994).

El diagnóstico de la leishmaniasis incluye aspectos clínicos, epidemiológicos y parasitológicos entre los que se cuentan la anamnesis, y pruebas inmunobiológicas, serológicas y moleculares; estas últimas permiten la identificación precisa de la especie de parásito asociado (OMS, 2006), ya que infecciones concomitantes con, por ejemplo el virus de la inmunodeficiencia humana, enmascaran las primeras tres pruebas diagnósticas y pueden producir resultados falsos (Tracy y Webster, 2003).

La caracterización genética (Mendoza-León y col, 1996; Ravel, 1998), bioquímica (Rascón 1998; Sandoval y col, 1998) e inmunológica (Locksley 1994; Bogdan y col, 1996) de *Leishmania*, ha permitido el avance en la identificación precisa del parásito causante de la enfermedad y de los mecanismos de interacción parásito-hospedero, evasión del sistema inmune y supervivencia intracelular de estos parásitos. Este conocimiento es fundamental en la búsqueda de

herramientas terapéuticas alternativas para el control efectivo de la enfermedad. Desde 1940 se utilizan como medicamentos leishmanicidas los antimoniales pentavalentes Glucantime® (el más utilizado en Venezuela) y Pentostam®, y las diamidinas (Pentamidina); posteriormente se incorporaron los antimicóticos anfotericina B (como deoxicolato o en forma liposomal) y el ketoconazol, y los antibióticos paromicina y dapsona, y más recientemente el análogo de fosfocolina la miltefosina, primer medicamento leishmanicida de uso oral (Croft y col, 2006). El tratamiento intravenoso y prolongado, necesario durante la administración de todos los medicamentos excepto ketoconazol y miltefosina, produce múltiples efectos adversos, incluyendo dolor en el sitio de inyección, arritmias cardíacas, erupciones, etc. Los efectos secundarios a menudo conducen al abandono (parcial o total) del tratamiento por parte del paciente, escenario que favorece la selección de parásitos resistentes a los fármacos. Es decir, que la toxicidad hepática y renal exhibida por la mayoría de estos compuestos, y el costo de tratamiento de alguno de ellos, ha incentivado la búsqueda de medicamentos alternativos que cumplan con las siguientes condiciones: puedan ser administrados en forma oral, produzcan menos efectos secundarios, y sean menos tóxicos y mas económicos (Murray, 2001; Melby, 2002). El fracaso terapéutico en la leishmaniasis puede estar asociado a múltiples factores que dependen tanto del parásito como del hospedero mamífero. Sin embargo, en la mayoría de los casos, donde la aplicación de la quimioterapia no se traduce en la cura del paciente, la sensibilidad natural de los parásitos a los medicamentos es baja o, alternativamente, el parásito infectante expresa quimio-resistencia. La quimio-resistencia es un fenómeno multifactorial vinculado al aumento en la expresión de las proteínas transportadoras de drogas (MDR por las siglas en inglés, multidrug-resistant) o glicoproteína-P (P-gp), y (MRP por las siglas en inglés, multi-drug resistant associated protein). Ambos tipos de transportadores modulan la acumulación intracelular de agentes quimio-terapéuticos. Hasta ahora el único método disponible para monitorear quimio-resistencia en parásitos aislados de pacientes es el modelo *in vitro* amastigote-macrófago. Esta es una técnica laboriosa, que requiere de mucho tiempo y es de alto costo, condiciones que desestiman su aplicación en el laboratorio de rutina. Debido a ello y al aumento de la incidencia de casos de leishmaniasis que no responden eficazmente a los medicamentos urge identificar marcadores moleculares de resistencia, fáciles de utilizar en el laboratorio de rutina y que puedan guiar la terapia leishmanicida (Croft, 2006; Natera y col, 2007). La expresión de quimio-resistencia se asocia a cambios bioquímicos y fisiológicos claves para la supervivencia e infectividad del parásito (Figarella y col, 2003; Ponte-Sucre, 2003), que han sido exhaustivamente estudiados *in vitro* (Ponte-Sucre y col, 1997, 1998, Silva y Ponte-Sucre, 2001, Silva y col, 2001, 2004), e *in vivo* (Serrano-Martín y col, 2006). No se ha evaluado sistemáticamente la utilidad de estos cambios como marcadores clínicos de la infección con cepas resistentes (Figarella y col, 2003; Ponte Sucre, 2003).

En esta revisión proponemos evaluar si propiedades particulares evidenciadas en parásitos de referencia seleccionados como quimio-resistentes, se presentan también en parásitos aislados de pacientes con fracaso terapéutico. Proponemos adicionalmente un enfoque alternativo del tratamiento de la enfermedad donde, además de las estrategias de protección individual, control del vector y diagnóstico adecuado, se incluyan herramientas para el pronóstico del éxito de la quimioterapia de los pacientes infectados con leishmaniasis.

LA LEISHMANIASIS EN VENEZUELA

Venezuela presenta una alta ocurrencia de parasitosis tropicales (MSDS, 2002). Mas aún, en Venezuela la leishmaniasis es un serio problema de salud pública; así, durante el período 1970 ? 2004 se ha observado un incremento continuo inter-anual de nuevos casos (MSDS, 2004). Las manifestaciones más frecuentes son la leishmaniasis cutánea y la mucocutánea (Hirst y Stapley, 2000). Mediante técnicas moleculares se han identificado casos de leishmaniasis cutánea en las distintas áreas endémicas del país como: los valles del sistema montañoso de la Costa, la depresión de Yaracuy, algunas regiones de los llanos y de los Andes, el sur del Orinoco, la zona montañosa y boscosa de Táchira, Mérida, Trujillo, Lara, Miranda y Sucre, además de los estados Carabobo y Aragua (Rodríguez y col, 2001, 2002a). La incidencia de leishmaniasis cutánea es de 10 casos por cada 100.000 habitantes; la leishmaniasis cutánea localizada representa el 98,8% de los casos positivos, con la aparición de una sola lesión en 69% de ellos (MSDS, 2004). La leishmaniasis visceral es menos frecuente en Venezuela; sin embargo, se han identificado casos en las zonas rurales y en los terrenos aluvionales por debajo de 7 metros del nivel del mar (Ulrich, 2004).

El Instituto de Biomedicina en su área de atención al paciente, atiende casos a nivel nacional (Zerpa, 2005). Los datos recolectados por su Departamento de Informática indican que el número total de casos a nivel nacional, en el año 2004, fue de 2489. El sexo masculino es más afectado que el femenino (60,7 % y 39,3%) y los casos se presentan a partir de los 3 años de edad.

Formas de Transmisión

En la transmisión de la leishmaniasis participan mosquitos hematófagos de los cuales se han descrito 30 especies. Su clasificación taxonómica está resumida en la Tabla 1 (Mendoza-León y col, 1996).

Tabla 1

Clasificación taxonómica de vectores asociados con la leishmaniasis

Reino **Animalia**

Subreino **Metazoa**

Phylum **Arthropoda**

Clase **Insecta**

Orden **Diptera**

Familia **Psychodidae**

Sub familia **Phlebotominae**

Género **Phlebotomus**

Lutzomyia

Especies: ***duboscqi, papatasi, perniciosus***

longipalpis, ovallesi, panamensis, yougi,

En el Viejo Mundo el género más común que sirve de vector para *Leishmania* es *Phlebotomus*, mientras que en América es *Lutzomyia* (Mendoza león y col, 1996).

En nuestro país, varias especies de mosquitos están asociados a la leishmaniasis tegumentaria y *Lutzomyia longipalpis* está asociada específicamente con la transmisión de la leishmaniasis visceral. Diversos nombres populares identifican a estos vectores, i.e., Moscas de arena, Tarayita, Palomilla y Anjoleta. Anatómicamente se describen de tórax arqueado, alas lanceoladas, cuerpo piloso, patas largas y delicadas, abdomen largo y tubular. Estos insectos son pequeños, miden entre 1,5 a 3 mm, son de color amarillento y ojos oscuros. Viven en sitios húmedos y sombríos y tienen actividad crepuscular. Abundan en los meses calurosos y lluviosos. Realizan vuelos cortos con períodos de reposo, en pequeños saltos, aunque pueden cubrir distancias largas, en vuelo fijo direccional. No son comunes en zonas urbanas (Felicangeli y col, 1998; Felicangeli y Rabinovich, 1998). Las hembras son hematófagas y necesitan sangre para la maduración de los huevos. Luego de la fecundación depositan entre 40 y 70 huevos en un sitio húmedo y oscuro con abundante material orgánico. En este ambiente se desarrollan las larvas que luego se transforman a pupas, las cuales se convierten en imago poco activos (insecto adulto que ha alcanzado su desarrollo completo y es capaz de reproducirse).

La profilaxis para evitar la infección de enfermedades transmitidas por insectos incluye control del vector (mediante insecticidas de acción residual ? DDT ? en zonas de transmisión), eliminación de los reservorios o protección individual (repelentes varias veces al día y mosquiteros) (Curtis, 1992; Neghme y col, 1999). Es decir, el control eficiente de la densidad de mosquitos en una zona geográfica es fundamental para la erradicación de la enfermedad. Sin embargo, no siempre es posible implementarlo en las zonas alejadas de las ciudades y zonas urbanas y por eso deben buscarse sistemas alternativos de control del vector (Thakur, 2006). En nuestro país la profilaxis a nivel del control del insecto vector, lamentablemente ha sido insuficiente. El estudio del papel del mosquito en la transmisión de la leishmaniasis se ha orientado en dos aspectos. Por una parte, Lerner y colaboradores (1991) analizaron los componentes de la saliva del insecto y describieron el maxadilan, péptido vasodilatador similar en estructura a la calcitonina. Estos autores demostraron que en macrófagos cultivados *in vitro*, estos péptidos tipo maxadilan inhiben los procesos metabólicos oxidativos y de presentación antigénica propios de los macrófagos, y sugieren que la presencia de maxadilan y otros péptidos favorecen la inoculación exitosa del parásito al hospedero mamífero. Así mismo, existen evidencias que indican que la saliva del insecto vector exacerba la enfermedad e incrementa el número de parásitos (viables) presentes en la lesión (Belkaid y col, 1998). Por otro lado, Guevara y colaboradores (2001) iniciaron el estudio por biología molecular de la interacción parásito-vector. Para ello utilizaron una línea celular transfectante de *Leishmania donovani* que expresa en forma estable marcadores fluorescentes útiles en la identificación de la presencia del parásito en el insecto en condiciones *in vivo*. La importancia epidemiológica de esta metodología es de gran relevancia. Finalmente, existen otras formas de transmisión menos frecuentes (en Venezuela, unos 12 casos en 73 años) que ocurren de manera accidental en el laboratorio, por el contacto inadvertido con un vector infectado debido al manejo inadecuado de cultivos de parásitos, o por contacto con muestras de animales o personas infectadas, con sangre contaminada, o por heridas ocasionadas con agujas contaminadas o a través de abrasiones preexistentes en la piel (Delgado y col, 1996; Reyes Romero y col, 2004). A pesar de su frecuencia tan baja, es fundamental enfatizar la importancia de utilizar los códigos y reglas de seguridad en el trabajo que garanticen la integridad y salud de los investigadores en el laboratorio.

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA DE LEISHMANIA

Los estudios morfológicos, bioquímicos, inmunológicos y genético-moleculares, así como de las características biológicas de *Leishmania* realizados en modelos experimentales han permitido elaborar una clasificación taxonómica exhaustiva del parásito. Las especies de *Leishmania* que causan la enfermedad en humanos, así como la manifestación clínica que producen y la distribución geográfica se resumen en la Tabla 2 (Locksley, 1994).

Ciclo de vida del parásito

El ciclo de vida de *Leishmania* se desarrolla entre dos hospederos; *Leishmania* se comporta como parásito intracelular en macrófagos de vertebrados mamíferos y como parásito extracelular en el tubo digestivo del insecto vector (Figura 1.) Los insectos ingieren sangre de un mamífero y regurgitan promastigotes en la piel del hospedero; estos son reconocidos por receptores de superficie de los macrófagos y células dendríticas y son fagocitados. Dentro de la célula hospedera los parásitos migran al fagolisosoma y se transforman a amastigotes, los cuales se multiplican intensamente por división binaria. La ruptura de los macrófagos infectados libera amastigotes, quienes son fagocitados por nuevos macrófagos; de esta forma se propaga la enfermedad. Los amastigotes ingeridos por nuevos insectos que chupan sangre de un hospedero infectado, se transforman en promastigotes en el tracto digestivo del insecto vector, donde permanecen de cuatro a siete días, se diferencian a infectivos, migran hacia la válvula cardíaca y bloquean la probosis del insecto (Molineux y Killick-Kendrick, 1987).

Tabla 2

Especies de *Leishmania* que causan la enfermedad en humanos

Especies^a	Manifestación Clínica^b	Distribución Geográfica
Subgénero <i>Leishmania</i>		
<i>Leishmania donovani</i>		
<i>L. donovani</i>	LV, (LDPK, LCVM)	China, Subcontinente Indio, Asia Sudoccidental, Etiopía, Kenya, Sudán.
<i>L. infantum</i>	LV (LCVM)	China, Asia Sudoccidental y Central Oriente Medio, Europa del Sur, África del Norte, Etiopía, Sudán.
<i>L. chagasi</i>	LV (LCNM)	América Central y del Sur.
<i>Leishmania mexicana</i>		
<i>L. mexicana</i>	LCNM (LCD)	Texas, México, América Central y del Sur
<i>L. amazonensis</i>	LCNM (LM,LCD,LV)	Panamá y América del Sur.
<i>Leishmania tropica</i>		
	LCVM (LV) ^c	Asia Central, India, Asia Sudoccidental, Oriente Medio, Turquía, Grecia, África del Norte, Etiopía, Kenya, Namibia.
<i>Leishmania major</i>		
	LCVM ^d	Asia Central, India, Asia Sudoccidental, Oriente Medio, Turquía, Grecia, África del Norte, Etiopía, Kenya, Namibia.
<i>Leishmania aethiopica</i>		
	LCVM (LCD)	Etiopía, Kenya.
Subgénero <i>Viannia</i>		
<i>L. (V.) braziliensis</i>	LCNM (LM)	América Central y del Sur
<i>L. (V.) guyanensis</i>	LCNM (LM)	América del Sur
<i>L. (V.) panamensis</i>	LCNM (LM)	América Central, Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú.
<i>L. (V.) peruviana</i>	LCNM ^e	Perú.

^a Existen otras especies no listadas que infectan humanos. ^b LV, leishmaniasis visceral; LDPK, leishmaniasis dérmica post-kala azar; LCVM, leishmaniasis cutánea del Viejo Mundo; LCNM leishmaniasis cutánea del Nuevo Mundo (Americana); LCD leishmaniasis cutánea difusa; LM, leishmaniasis mucosa. ^c *L. tropica* también causa leishmaniasis viscerotrópica y recidivas. ^d Organismos parecidos a *L. major* también causan leishmaniasis cutánea del Nuevo Mundo. ^e La leishmaniasis cutánea causada por esta especie se denomina UTA. (modificado de Locksley, 1994).

a Existen otras especies no listadas que infectan humanos. b LV, leishmaniasis visceral; LDPK, leishmaniasis dérmica post-kala azar; LCVM, leishmaniasis cutánea del Viejo Mundo; LCNM leishmaniasis cutánea del Nuevo Mundo (Americana); LCD leishmaniasis cutánea difusa; LM, leishmaniasis mucosa. c *L. tropica* también causa leishmaniasis viscerotrópica y recidivas. d Organismos parecidos a *L. major* también causan leishmaniasis cutánea del Nuevo Mundo. e La leishmaniasis cutánea causada por esta especie se denomina UTA. (modificado de Locksley, 1994).

Las variedades clínicas de la enfermedad están determinadas por la interrelación entre el parásito y su hospedero (tropismo de los parásitos). Las especies de *Leishmania* que producen manifestaciones cutáneas y mucocutáneas (dermotrópicas) son sensibles a temperaturas mayores de 35° C y se multiplican únicamente en áreas expuestas de la piel. Las especies que ocasionan las manifestaciones viscerales de la enfermedad (viscerotrópicas) requieren de 37° C para su diferenciación a amastigotes, por lo cual migran a la médula ósea, el bazo y el hígado (Ridley, 1999; Dos Reis, 2000; Chang y col, 2003).

Ciclo de vida de *Leishmania*

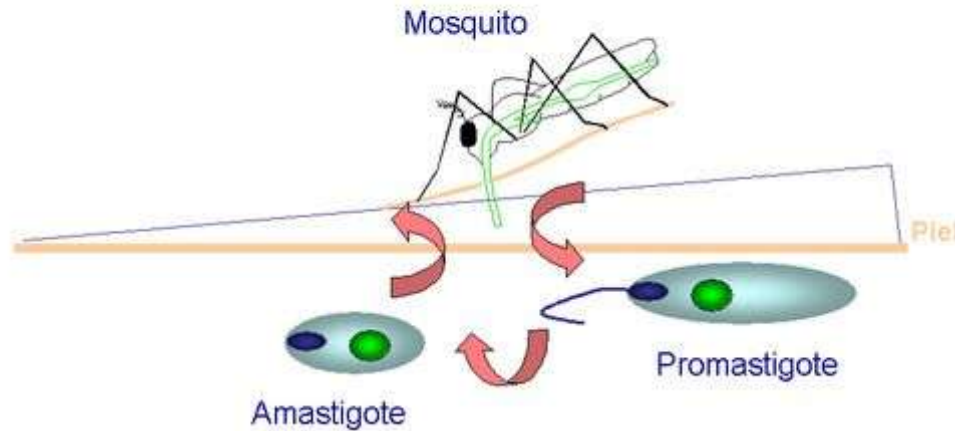


Figura 1. Ciclo de vida de *Leishmania*. El ciclo de vida comienza cuando el hospedero recibe la picada del insecto infectado. Los parásitos son inoculados a la piel y fagocitados por macrófagos y células dendríticas, en donde la forma intracelular del parásito (amastigote) se replica. La ruptura de los macrófagos infectados propaga la enfermedad. Cuando un nuevo insecto ingiere sangre de un hospedero vertebrado infectado, los amastigotes se diferencian a promastigotes en el intestino medio del vector donde permanecen de 4 a 7 días, migran a la válvula cardíaca y están listos para re-inocular a otro hospedero.

Características morfológicas y funcionales de amastigotes y promastigotes

Los parásitos de *Leishmania* transcurren a lo largo de su ciclo de vida por dos estadios con características morfológicas específicas. Los amastigotes de forma ovoide o esférica se alojan en el fagolisosoma (de pH ácido) de las células del sistema reticuloendotelial del hospedero. Miden de 2,0 a 6,0 μm de largo y 1,5 a 3,0 μm de ancho. Su núcleo es redondo y excéntrico, la mitocondria es rudimentaria y sus septos se continúan con el kinetoplasto en forma de bastón. Los promastigotes (de vida extracelular) son fusiformes; sus medidas varían de 10 a 20 μm de largo x 1,5 a 3,0 μm ancho, dependiendo de la etapa de diferenciación, procíclica o inmadura, y metacíclica o infectiva (Neghme y col, 1999; Zerpa y col, 2003) en la que se encuentren. Son flagelados, tienen núcleo central y citoplasma granulado. La superficie celular está cubierta de lipofosfoglicanos. Presentan un kinetoplasto cercano al bolsillo flagelar. Se alojan en el tubo digestivo del insecto vector y es el estadio que puede mantenerse en los cultivos *in vitro*. Esto quiere decir que durante su ciclo de vida, *Leishmania* está expuesta a condiciones físicas y químicas que supera debido a su capacidad de adaptación y a la activación de respuestas fisiológicas que garantizan su supervivencia. El cultivo fácil de los promastigotes en condiciones *in vitro* ha propiciado el estudio de los sistemas de transporte presentes en la membrana plasmática, probablemente involucrados en la respuesta rápida y eficiente de los promastigotes a los cambios ambientales, para mantener su homeostasis y promover la diferenciación del parásito. Así, se han descrito: a) varias ATPasas de membrana asociadas a la generación y mantenimiento del potencial de membrana, la regulación de calcio intracelular, el mantenimiento del pH y homeostasis osmótica (Zilberstein y Dwyer, 1985; Bakker-Grunwald, 1992; Jiang y col, 1994; Vieira y Cabantchik, 1995; Marchesini y Docampo, 2002; Rodríguez y col, 2002b), b) un sistema de transporte de Rb^{+86} isosmótico sensible a amilorida (Blum, 1992; Suffia y

col, 1997) y c) canales aniónicos inespecíficos (DiFranco y col, 1995). Además se ha demostrado la sensibilidad de *Leishmania sp.* a bloqueantes de canales de K^+ dependientes de ATP, de canales de Na^+ e intercambiador de Na^+/H^+ y canales de cloruro (Ponte Sucre y col, 1998). Por su parte, en la década de los noventa se demostró que la disminución del pH a 5.5 y el aumento de la temperatura de incubación por encima de 35 °C promueven la transformación de promastigotes a amastigotes en varias especies de *Leishmania*. La forma obtenida del parásito ha sido denominada íamastigotes axénicos? (Zilberstein y Shapira, 1994; Ismael y col, 1998). El análisis comparativo de ambos estadios de desarrollo ha permitido comprobar que *Leishmania* expresa enzimas del Ciclo de Krebs, del metabolismo glicólico, alanil-aminopeptidasas, aspartil proteinasas, cisteína proteinasas, fosfodiesterasas, fosfoquinasas, metaloproteinasa, proteasas, y diversas ATPasas (H^+ ; Ca^{+2} ; Na^+-K^+), que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis celular (Benaim y col, 1987, 1998; Vercesi y col, 1990; Rascón 1998 y 2001; Rodríguez y col, 2002b; Valdivieso y col, 2001); muchas de ellas presentan características únicas que varían con el estadio del ciclo de vida del parásito.

MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA LEISHMANIASIS

La patogenia de la leishmaniasis se debe a la destrucción celular provocada por la ruptura de los nidos de amastigotes acompañada de una reacción celular inflamatoria muy intensa. Se han descrito cuatro formas de leishmaniasis de acuerdo a la localización de las lesiones: leishmaniasis cutánea (LC) que produce ulceraciones en la piel expuesta, usualmente es autolimitante y confiere inmunidad. La leishmaniasis cutánea difusa (LCD) es rara, pero puede ser grave cuando el sistema inmune no reacciona a la infección. La leishmaniasis mucocutánea (LM) o (Espundia en Perú) se caracteriza por úlceras en piel que se extienden a las mucosas de la nariz, boca y faringe, destruyendo el tejido. Es incapacitante y desfigurante, limita el habla. Finalmente, la leishmaniasis visceral (LV) o kala azar es la más severa, produce fiebre, pérdida de peso, hepatomegalia y esplenomegalia. Debido a la inmunosupresión que produce favorece la aparición de tuberculosis, neumonía y diarrea. Tiene alta mortalidad incluso con tratamiento (Locksley, 1994; Neghme y col, 1999; Barret y col, 1999). En el Nuevo Mundo, la enfermedad es denominada leishmaniasis cutánea americana. Existen individuos inmuno-competentes con leishmaniasis cutánea localizada que presentan una respuesta inmune celular adecuada y lesiones bien definidas. Por otro lado, se encuentran individuos que presentan una anergia selectiva frente al parásito, la cual conduce a la diseminación del mismo y de la enfermedad y que al final resultan con leishmaniasis cutánea difusa, de frecuencia muy baja (Bryceson, 1972). La leishmaniasis tiene un amplio espectro clínico, histopatológico e inmunológico (Convit, 1974; Convit y col, 1993). En la leishmaniasis cutánea localizada, la lesión primaria es una pápula eritematosa que aparece de dos a ocho semanas después de la picadura del insecto vector, crece lenta y progresivamente, evolucionando a una o varias úlceras, las cuales aparecen, fundamentalmente, en las partes expuestas del cuerpo. Presentan bordes irregulares y son indoloras. Muchas de las úlceras involucionan sin tratamiento en un lapso de 8 meses, especialmente las ocasionadas por *Leishmania mexicana*. Por su parte, en las infecciones por *Leishmania braziliensis* aparecen lesiones cutáneas acompañadas de linfadenopatías. Las cicatrices, consecuencia de las úlceras, son moteadas, deprimidas y nacaradas (Reyes Romero y col, 2006). La leishmaniasis cutánea difusa es una variedad clínica descrita en Etiopía, Brasil, México y Venezuela. Evoluciona en brotes. Las lesiones son de aspecto nodular, semejantes a las observadas en la lepra lepromatosa. Aparecen en la piel de forma diseminada y tienen tendencia

a generalizarse. Compromete toda la superficie cutánea, excepto el cuero cabelludo y la región inguinal (Reyes Romero y col, 2006). Por último, en la leishmaniasis mucocutánea, después de una lesión cutánea inicialmente curada, se afectan especialmente la laringe, el septum nasal, la mucosa oral, etc. El tiempo entre una y otra localización puede ser de años. Las lesiones son destructivas y se inician con una infiltración del septum nasal. En esta forma de leishmaniasis se afecta la respiración, la deglución y la fonación. Como consecuencia, los pacientes son propensos a sufrir infecciones respiratorias y destrucción tisular deformante (Reyes Romero y col, 2006). Histológicamente se observa que la primera reacción en el sitio de inoculación, es un infiltrado de histiocitos llenos de parásitos, el cual aumenta de tamaño para dar cabida a la creciente cantidad de parásitos. Posteriormente, se forma un infiltrado de neutrófilos y por último ocurre necrosis. Poco a poco estos histiocitos quedan sin parásitos y se convierten en células epitelioides, después de lo cual la reacción madura a granuloma. Durante esta transición aparecen en el exudado cantidades cada vez mayores de linfocitos y plasmocitos, en tanto que a lo largo de los vasos linfáticos de drenaje se forman lesiones satélites. La cura comienza entre los 3 a 6 meses de la aparición de la lesión, y se completa dentro un año o más (Connor y Gibson, 1992).

La variedad de las manifestaciones clínicas de la enfermedad depende del desarrollo de inmunidad específica mediada por células, la hipersensibilidad retardada a numerosos antígenos del parásito y el diagnóstico diferencial con otras entidades clínicas como piodermatitis, sífilis, lepra, tuberculosis cutánea, histoplasmosis, entre otras, que cursan con lesiones cutáneas o mucosas (Reyes Romero y col, 2006).

Pruebas diagnósticas, identificación de especies

El diagnóstico definitivo de la leishmaniasis se fundamenta en la presencia del parásito en las lesiones de los pacientes y la identificación de la especie a la cual pertenece el parásito. A nivel clínico se diagnostica en el paciente la presencia de lesiones, signos y síntomas. A nivel epidemiológico, se analiza si la zona donde vive el paciente pertenece a alguna de las áreas endémicas conocidas. Por último, a nivel del laboratorio se utilizan diversos métodos de identificación. Por ejemplo, se utiliza la tinción con Giemsa o el colorante de Romanowski para identificar los parásitos en cortes del tejido infectado, o el cultivo *in vitro* y la infección de animales con tejidos aislados de los pacientes. Como métodos inmunológicos de identificación de los parásitos, se utilizan ensayos serológicos (inmunofluorescencia indirecta, ELISA, aglutinación) y pruebas de inmunidad celular (proliferación linfocitaria, síntesis de citoquinas y la prueba de hipersensibilidad retardada, específica para *Leishmania*). Sin embargo, en la actualidad el método más utilizado es la prueba de reacción en cadena de la polimerasa (Rodríguez y col, 1994). Para la identificación del parásito ha sido necesario desarrollar métodos muy selectivos y sofisticados, debido a que las especies de *Leishmania* que infectan a los humanos son morfológicamente similares, y a que co-infecciones como HIV-SIDA, *Cryptosporidium*, Criptococcosis diseminada, Citomegalovirus o Micobacterias en pacientes que presentan leishmaniasis, dificultan el diagnóstico de esta última. Por ejemplo, se realizan ensayos de isoenzimas, determinación de anticuerpos monoclonales especie específicos, reacción en cadena de la polimerasa con sondas especie-específicas, análisis por enzimas de restricción, hibridación con sondas específicas, para identificar el ADN del parásito infectante (Lainson y Shaw, 1972; Liew y O'Donnel, 1993; Finegold y Baron, 1992; Berman, 1997; Luis y col, 1998; Solbach y Laskay, 2000; Zerpa y col, 2003, Ulrich, 2004). Las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa acopladas a hibridación de sondas específicas contra ADN del kinetoplasto de *Leishmania*

mexicana y *Leishmania braziliensis*, han permitido determinar las principales especies causantes de la leishmaniasis cutánea en Venezuela (Rodríguez y col, 1999; 2001; 2005).

FÁRMACOS UTILIZADOS EN EL TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIASIS

El establecimiento de una quimioterapia idónea contra leishmaniasis ha resultado difícil, ya que el éxito de la misma varía con la especie de *Leishmania* y la severidad de la enfermedad, el lugar donde se infecta el individuo y el estado nutricional e inmunológico del paciente (Ramos y Brajtburg, 2001). Se han descrito más de 20 fármacos como eficientes para el tratamiento de la leishmaniasis; sin embargo, sólo algunos son utilizados en el manejo clínico de esta patología. Luego de la confirmación del diagnóstico y dependiendo de la especie encontrada, se inicia el tratamiento de acuerdo a lineamientos como los que se muestran en la Tabla 3. En Venezuela la droga de elección, independientemente del parásito infectante, es el antimonio de N-metilglucamina (Glucantime®) (MSDS, 2004) o la inmunoterapia (Convit y col, 1987). Los medicamentos más utilizados contra la leishmaniasis, están principalmente dirigidos al estadio intracelular del parásito. El Glucantime (Figura 2A) fue descrito en 1912 y el estibogluconato sódico ha sido utilizado desde 1945. Algunos autores proponen que el mecanismo de acción de estos fármacos está asociado al bloqueo de la glicólisis, el metabolismo de ácidos grasos y la formación de ATP. También, se ha propuesto que los antimoniales bloquean la formación de grupos sulfhidrilos de enzimas reguladoras de la actividad metabólica del parásito en los glicosomas (Tracy y Webster, 2003).

Medicamentos de primera línea

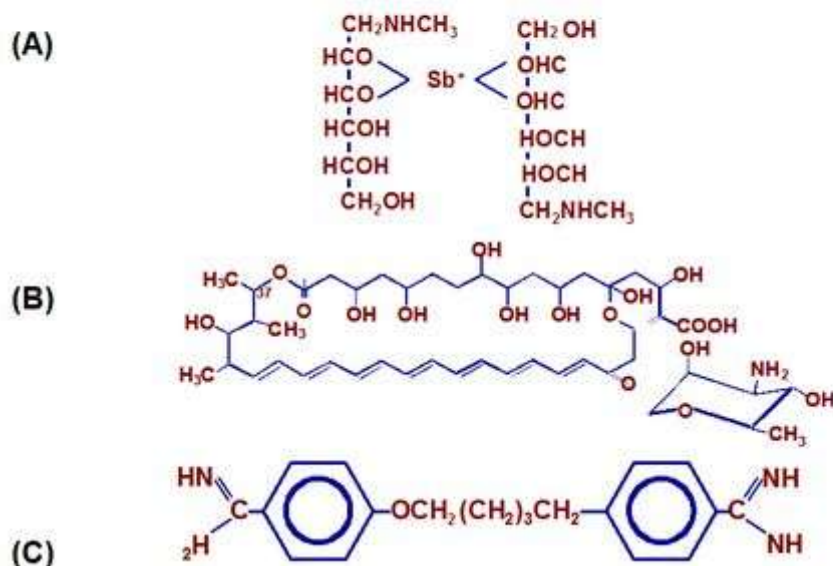


Figura 2. Medicamentos utilizados contra leishmaniasis 1: Estructuras químicas de (A) N-metil glucamina (B) Anfotericina B y (C) Pentamidina.

Los fármacos son altamente tóxicos (Tabla 4). Adicionalmente, algunos pacientes no responden al tratamiento patentado, presentan recidivas o muestran resistencia a estos medicamentos, y

finalmente, los enfermos con leishmaniasis cutánea difusa no responden a ninguna forma de quimioterapia (Ouellette y col, 2004). Más aún, una de las principales causas del fracaso de los tratamientos, es la frecuencia de casos que expresan resistencia a los medicamentos (Ouellette y col, 2004). Por ejemplo, en la India existen zonas (El Bihar) donde 30-65% de los casos tratados de leishmaniasis visceral son resistentes al Glucantime, con la consecuente aparición de cepas de *Leishmania donovani* resistentes a los antimoniales (Croft y col, 2006). Otro fármaco muy utilizado desde 1960 es la anfotericina B (Figura 2B). Este es un antibiótico poliénico que se administra por vía parenteral como deoxicolato, y desde 1997 en liposomas (Ambisome®). Este fármaco altera la permeabilidad de la membrana celular al unirse a grupos esteroides y formar poros, aumentando la salida de K^+ . La anfotericina B presenta una actividad selectiva contra *Leishmania* y *Trypanosoma cruzi*. Sin embargo, su uso en regiones endémicas tiene como limitaciones el costo del tratamiento, las dificultades de administración y su toxicidad. Como alternativas de tratamiento de segunda línea se utilizan la pentamidina (Figura 2C) y la paromicina (Figura 3A), desde 1987, y el ketoconazol (Figura 3B) y la dapsona, más recientemente.

Medicamentos de segunda línea y orales

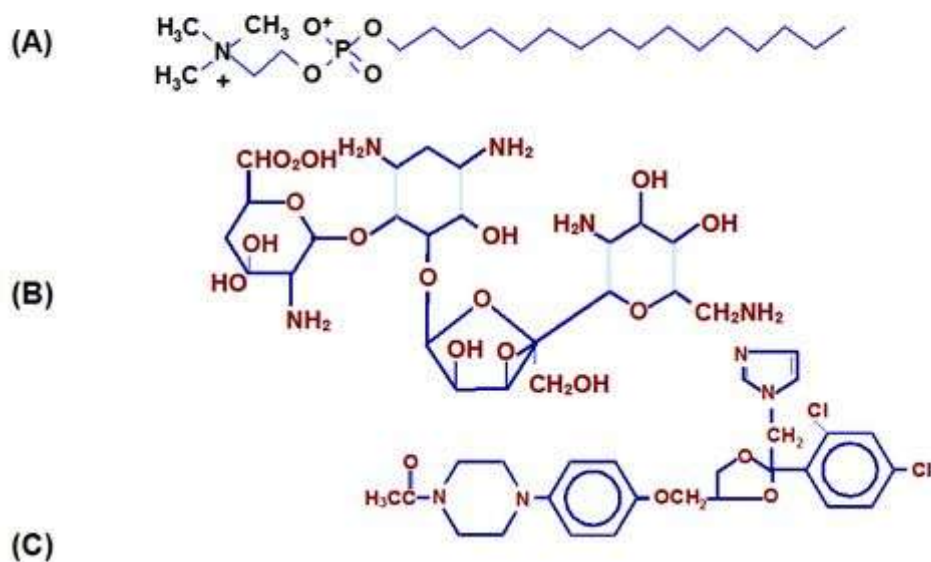


Figura 3. Medicamentos utilizados contra leishmaniasis 2: Estructuras químicas de (A) Paromicina (B) ketoconazol y (C) Miltefosina.

La pentamidina es una diamidina que bloquea la síntesis de poliaminas y del ADN del kinetoplasto del parásito; tiene un espectro relativamente amplio y es eficaz en la leishmaniasis visceral y la tripanosomiasis. Por su parte, la paromicina es un aminoglicósido que bloquea la síntesis de proteínas al disminuir la transducción de ARNm. El ketoconazol (imidazol) es un antimicótico que bloquea la C-14 desmetilasa, alterando la función de la membrana, y la dapsona es un antimetabolito. Ambos se utilizan como alternativas orales o tópicas en casos de leishmaniasis cutánea.

Fármacos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis

Síndrome clínico, droga	Vía de administración	Régimen
Leishmaniasis Visceral		
<i>Primera línea</i>		
Antimonio pentavalente	IV, IM	20 mg Sb ₅ /Kg qd por 28 d
Anfotericina B, formulación lipídica	IV	1-5 mg/Kg qd (total: usualmente 15-21 mg/Kg).
<i>Alternativas parenterales</i>		
Anfotericina B (deoxicolato)	IV	0,5-1 mg/Kg qod o qd (total: usualmente 15-20 mg/Kg).
Sulfato de paramomicina	IV, IM	15-20 mg/Kg qd por 21 d.
Isotionato de pentamidina	IV, IM	4 mg/Kg qod o tres veces al día hasta un total de 7 días
<i>Alternativas orales</i>		
Miltefosina	VO	En el país a partir de 2006 2,5 mg/d por 28 días
Leishmaniasis Cutánea		
<i>Primera línea</i>		
Antimonio pentavalente	IV, IM	20 mg Sb ₅ /Kg qd por 20 d.
<i>Alternativas parenterales</i>		
Isotionato de pentamidina	IV, IM	3 mg/Kg qod 4 dosis o 2 mg/Kg qod por 7 dosis.
Anfotericina B (deoxicolato)	IV	0,5-1 mg/Kg qod o qd (total: hasta 20 mg/Kg).
<i>Alternativas orales</i>		
Ketoconazol	Tópico	600 mg/d por 28 d.
Itraconazol	VO	200 mg bid por 28 d.
Dapsona	VO	100 mg/bid por 6 semanas.
Miltefosina	VO	2,5 mg/día por 28 días
Leishmaniasis Mucocutánea		
<i>Primera línea</i>		
Antimonio pentavalente	IV, IM	20 mg Sb ₅ /Kg qd por 28 d.
<i>Alternativas parenterales</i>		
Anfotericina B (deoxicolato)	IV	1 mg/Kg qod o qd (total: usualmente hasta 20-40 mg/Kg).
Isotionato de pentamidina	IV, IM	2-4 mg/Kg qod o tres veces a la Semana

IV: intravenoso, IM: intramuscular, VO: vía oral; qd: cada día; qod: día por medio; bid: dos veces al día (modificado de Tracy y Webster, 2003)

En esta última se ha probado además la administración sistémica de nifurtimox, deshidroemetina, rifampicina junto con isoniacida, metronidazol, cotrimazol, alopurinol e itraconazol. Sin embargo, la eficacia de estos fármacos no está del todo demostrada (Anadón, Martínez-Larrañaga, 2005; Croft y col, 2006; Consigli y col, 2006). En 1980, cuando estaba en evaluación para su uso como antineoplásico (Escobar y col, 2001), se demostró la actividad antiparasitaria de la miltefosina (Figura 3C) *in vitro* contra amastigotes de *Leishmania* alojados en macrófagos y en modelos de infección en ratones. En 2002, se aprobó su uso como primer fármaco oral activo la leishmaniasis visceral en la India y en 2005 fue aprobado su uso contra leishmaniasis cutánea en Colombia. Es un alquil-fosfolípido y se ha postulado que su mecanismo de acción se debe a que altera el metabolismo de estér-lípidos. Los estudios pre-clínicos sugieren más de un 95% de cura total en casos de leishmaniasis visceral y entre 53-91% en la forma cutánea. Como efectos adversos la miltefosina produce vómitos y diarrea hasta en 60% de los pacientes y aumento reversible de las transaminasas y de la creatinina. Está contraindicado en mujeres embarazadas y se deben tomar medidas de control anticonceptivo durante el tratamiento, e incluso 60 días después (Croft y col, 1987; Eibl y Unger, 1990; Croft y Coombs, 2003; Soto y col, 2004; Phillips y Stanley, 2006). Lamentablemente el tiempo de vida media de este

medicamento, relativamente largo, favorece la selección de parásitos quimio-resistentes, al menos en condiciones *in vitro* (Pérez-Victoria y col, 2003; Croft y col, 2006).

En resumen, la farmacopea en contra de leishmaniasis, está constituida por los mismos medicamentos utilizados desde comienzos siglo pasado, exceptuando la miltefosina (Urbina, 2006). En Fase II de evaluación clínica se encuentran actualmente el imiquimod (inmunomodulador), y una combinación de paromicina con gentamicina y surfactantes, para uso tópico (Buates y Matlashewski, 1999; Croft y col, 2006).

Tabla 4

Efectos adversos de los fármacos más usados en el tratamiento de leishmaniasis

Efectos	Antimoniales	Pentamidina	Anfotericina B
Gastrointestinales	+	+	+
Hepatotoxicidad	+ (raro)	+	±
Hipemea	+	+	+
Cefalea	+	+	+
Anemia	+ (raro)	+	+
Trombocitopenia	+	+	+
Nefrotoxicidad	+ (raro)	+	+ (reversible)
Fiebre	+	+	+
Leucopenia leve	+	+	+
Erupción cutánea	+	-	+
Hipotensión	+	-	+
Tromboflebitis	-	+	+
Neutropenia	-	+	+
Encefalopatía	-	+	+
Mialgia	+	-	-
Rigidez muscular	+	-	-
Alteraciones en ECG	+	-	-
Edema Facial	+	-	-
Pancreatitis aguda	+ (raro)	+	-
Taquicardia	-	+	-
Síncope	-	+	-
Hipocalcemia	-	+	-
Sabor metálico	-	+	-
Broncoespasmo	-	+	-
Diabetes	-	+	-

Se resalta en azul los efectos adversos que aparecen con los tres fármacos y en rosado los efectos característicos de pentamidina (Recopilado de Rosenthal y Golsmith, 2001; Tracy y Webster, 2003).

La disponibilidad reciente de la secuencia genómica de *Leishmania* ha favorecido la identificación y validación de nuevas dianas quimio terapéuticas. Es por esta razón que en la actualidad se están ensayando exhaustivamente inhibidores de la biosíntesis de ergosterol (Roberts y col, 2003), de diversas cisteínas-proteasas (Ponte-Sucre y col, 2006, 2007), del metabolismo del pirofosfato (Yardely y col, 2002), de la síntesis y metabolismo de la tripanotiona (Heby y col, 2007), de la incorporación de purinas y de la síntesis de fosfolípidos (Heby y col, 2007). Adicionalmente se han probado donadores de óxido nítrico (López-Jaramillo y col, 1998) y extractos de plantas medicinales (Plock y Presber, 2001, Ponte-Sucre y col, 2007). En un modelo experimental de leishmaniasis cutánea, se comprobó una alta eficacia de cura por el pamidronato, un bifosfato que inhibe la farnesil pirofosfato sintasa (Rodríguez y col, 2002c). El lento desarrollo de estos fármacos se debe fundamentalmente a la falta de estímulos económicos que ellos representan para la industria farmacéutica (Urbina, 2006). Por otra parte, se ha evaluado la posibilidad de realizar inmuno-terapia utilizando factores de virulencia como la glicoproteína gp63 (proteasa de superficie o leishmaniolisina en la *Leishmania mexicana*), la glicoproteína gp46/M2 y el complejo de proteínas protectoras P8 en el género *Leishmania*.

pifanoi, entre otros (Overath y Aerbischer, 1999). En Venezuela, se ha desarrollado una inmunoterapia basada en cultivos de promastigotes muertos que se inyecta junto con la vacuna contra la tuberculosis del bacilo Calmette Guérin (BCG) como coadyuvante. Mediante este procedimiento se han obtenido porcentajes de cura, similares al tratamiento con antimoniales pentavalentes (Convit y col, 1987; 2004 y 2005).

En conclusión, el fracaso terapéutico contra la leishmaniasis tiene causas diversas. Algunas están relacionadas con los fármacos, como son las propiedades farmacocinéticas, el uso de dosis sub-óptimas, el costo del tratamiento y la toxicidad de los compuestos. Las causas relacionadas con el parásito incluyen la quimio-resistencia y la tolerancia. Finalmente, las causas imputables al hospedero estarían constituidas por el estatus inmunológico del paciente, la reinfección y su interrelación con el parásito.

QUIMIORESISTENCIA

La resistencia a fármacos es definida como la disminución de la eficacia a compuestos en una población que previamente era susceptible a los mismos. En el caso de los parásitos, esta definición asume que se conoce su susceptibilidad inicial, situación que no siempre se cumple para las cepas de *Leishmania* (Ponte-Sucre, 2003). Existen al menos tres mecanismos celulares asociados a la expresión de quimio-resistencia: amplificación de los genes de la enzima blanco del fármaco (Beverly y col, 1984); cambios estructurales y funcionales de las enzimas blanco de las drogas (Chen y col, 1987) y disminución de los niveles intracelulares de la droga a través de transportadores específicos (Ellenberger y Beverly, 1989). Concretamente, los transportadores ABC (por *ATP binding cassette*) (Fig. 4), utilizan energía de la hidrólisis del ATP para disminuir los niveles citoplasmáticos de sus sustratos y uno de los representantes más estudiados en la superfamilia de transportadores ABC, asociado a quimio-resistencia, es la glicoproteína P ([*P-glicoprotein*, P-gp], o MDR por las siglas en inglés, *multi drug resistance*) (Borst y Ouellette, 1995).

Moléculas ABC asociadas a resistencia a drogas en *Leishmania*



Figura 4. Modelo esquemático propuesto de las características de funcionamiento de MDR y MRP.

En *Leishmania* se han descrito dos tipos de quimio-resistencia, la natural, como la que presenta *Leishmania braziliensis* al ketoconazol, y la adquirida, que surge cuando los parásitos son expuestos a dosis sub-óptimas de fármacos que seleccionan los parásitos aptos para vivir en esas condiciones de stress (Ouellette y col, 2004; Croft y col, 2006). Dos clases de genes relacionados con moléculas ABC de transporte de drogas se han identificado en *Leishmania* (Tabla 5) (Ponte-Sucre, 2003). Un tipo en el cual los parásitos resistentes presentan amplificación del círculo H. Las proteínas de transporte codificadas en el círculo H son diferentes a las P-gp asociadas a transporte de drogas descrita en células de mamíferos que expresan el fenotipo MDR ([Ouellette y col, 1990](#)) y se denominan proteínas tipo MRP (por *multidrug resistance associated protein*). El otro tipo de genes, se asocia a la expresión de proteínas de transporte que confieren fenotipos similares al MDR (Hendrickson y col, 1993) (Figura 4).

Al igual que en células tumorales, la quimio-resistencia en *Leishmania* ha sido asociada a una disminución de la acumulación celular de fármacos, mediado por transportadores de membrana tipo ABC (Higgins, 1992). Adicionalmente, ocurren cambios de permeabilidad de membrana que involucran a su vez cambios funcionales y bioquímicos adicionales.

Tabla 5

Genes asociados a quimio-resistencia en *Leishmania*

Especies	Genes	Resistencia a	Resistencia cruzada
<i>L. amazonensis</i>	<i>Lamdr</i> ¹	vinblastina vinblastina doxorubicina actinomicina-D	adriamicina
<i>L. donovani</i>	KDNA ² Gen de la ribo nucleotido reductasa Gen de NAGT ³ <i>IdNT1</i> , <i>1</i> ⁴ <i>Idmdr1</i> ⁵	pentamidina hidroxiurea tunicamicina tuberimicina vinblastina	puromicina antraciclinas
	IMPDPH ⁶	metotrexato	ácido micofenólico Puromicina
<i>L. enrietti</i>	<i>Lemdr</i> ⁷	vinblastina	
<i>L. infantum</i>	círculo-H ⁸	metotrexato	
<i>L. major</i>	círculo-H	primaquina terbinafina terbinafina itraconazol	metotrexato
	SQS1 ⁹	tuberidina tuberidina antifolatos antifolatos	
<i>L. tarentolae</i>	TOR ¹⁰ TUB2 ¹¹ DHFR-TS ¹² PTR1 ¹³ círculo-H <i>ltppgA-E</i> ¹⁴	metotrexato vinblastina arsenito antimoniales	
	<i>gsh</i> ¹⁵ Cyb ¹⁶ DHFR-TS Ltdh ¹⁷ PTR1	arsenito antimicina-A folatos metotrexato	
<i>L. tropica</i>	<i>ltppgE</i> ¹⁸ <i>ltmdr</i> ¹⁹	metotrexato daunomicina	

1, 5, 7 y 19, genes asociados con P-gp para cada especie. 2, DNA del kinetoplasto. 3, NAGT, n-acetilglucosamina-1-fosfato-transferasa. 4, transportador ATP/ADP. 6, inosina monofosfato deshidrogenasa. 8, genes extracromosómicos. 9, escualeno sintetasa. 10, locus de resistencia a nucleósido tóxico. 11, locus de hipersensibilidad a allopurinol. 12, dihidrofolato reductasa. 13, pteridina reductasa. 14, primer gen homólogo descrito en *Leishmania* de P-gp. 15, gamma glutanilcisteína sintetasa. 16, apocitocromo b. 17, gen de resistencia a metrotexato y otros folatos. 18, gen homólogo de P-gp (modificado de Ponte-Sucre, 2003).

Por ejemplo, *Leishmania mexicana* resistente a anfotericina B y pentamidina presenta alteraciones en los niveles de ácidos grasos saturados y por ende en la fluidez de la membrana (Mbongo y col, 1998), así como en la actividad de enzimas mitocondriales y expresión de lipofosfoglicanos (Basselín y Robert-Gero, 1998). Estos cambios no necesariamente son una consecuencia directa del aumento de la expresión de los transportadores ABC. Los mecanismos de quimio-resistencia característicos pueden ser múltiples y no ser exclusivos para un solo tipo de droga. Es decir, se pueden generar reacciones cruzadas con otros fármacos, hecho que sugiere la coexistencia de múltiples mecanismos de resistencia en la misma célula, actuando de forma sinérgica. Adicionalmente, existen una serie de parámetros fisiológicos que se modifican en parásitos quimio-resistentes (Fig. 5). Además del incremento de la expresión de los transportadores MDR y MRP, se ha descrito la disminución de la expresión de la enzima fosfatasa ácida, del marcador de metaciclogenesis meta-1 y de los lipofosfoglicanos de superficie, así como de la incorporación de folato y nucleósidos (Ponte-Sucre, 2003). Finalmente, a nivel intracelular se ha descrito en *Leishmania* un aumento de la fosforilación de tubulina, de los niveles de pterina y tripanotona y de la actividad de dihidrofolato reductasa y timidilato sintetasa (Ponte Sucre,

2003). Estos cambios sugieren una modificación de la fisiología del parásito que podría ser explotada como herramienta de pronóstico de la terapia planteada.

Cambios funcionales asociados a resistencia a drogas en *Leishmania*

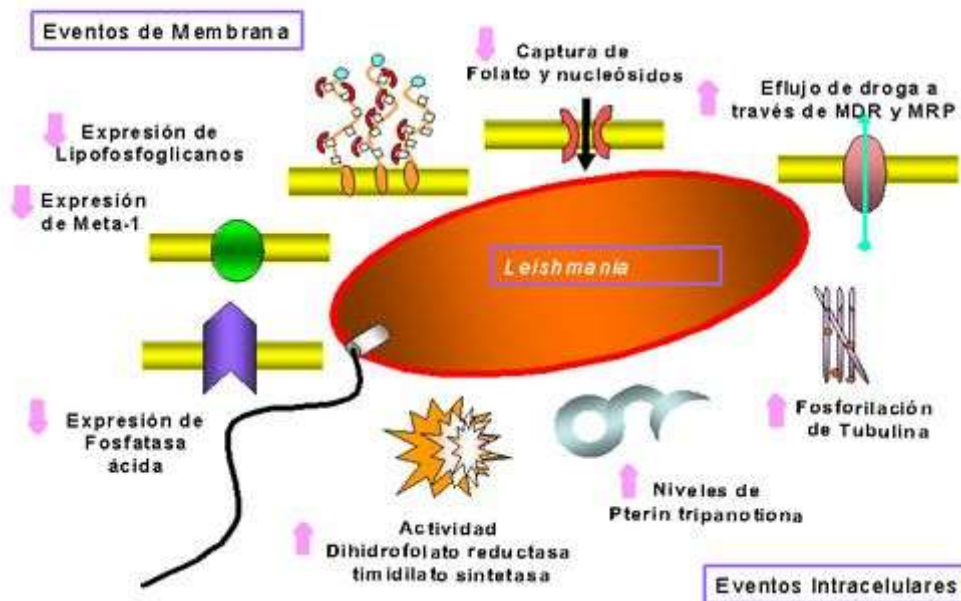


Figura 5 Eventos fisiológicos asociados con quimio-resistencia en *Leishmania* que pudieran estar relacionados con un costo de adaptación?. Las flechas moradas indican si el parámetro aumenta o disminuye en el parásito resistente.

COSTO DE ADAPTACIÓN EN LEISHMANIA, VÍNCULOS CON LA QUIMIO-RESISTENCIA

Debido a su flexibilidad, *Leishmania* adapta su metabolismo e infectividad a diversas condiciones de estrés, como es el caso de la presión constante de dosis sub-óptimas de fármacos (García y col, 2000; Uzcátegui y col, 2005; Machuca y col, 2006). Como consecuencia, el parásito desarrolla quimio-resistencia. Al igual que los virus y las bacterias, los parásitos implementan mecanismos para adaptarse a las diferentes condiciones adversas en las que les toca vivir y sobrevivir en ellas exitosamente (por ejemplo hacerse quimio-resistentes). La implementación de estos mecanismos implican un costo de adaptación que en la literatura internacional se denomina en general "fitness cost" (Natera y col, 2007). En *Leishmania*, el concepto de "fitness cost" describe con frecuencia asociada a cambios en la virulencia, marcador fundamental para la supervivencia y patogénesis del parásito, tanto en el vector como en el hospedero (Beverley, 2001). El concepto de "fitness cost" también se ha relacionado en *Leishmania* con la inducción de muerte celular programada que ocurre luego de ser inoculados los parásitos al hospedero mamífero; en este caso, el costo de adaptación se interpreta como una manera de permitir la supervivencia del "más apto" y garantizar la transmisión al próximo hospedero (Debrabant y Nakhasi, 2003). Como mencionamos anteriormente, el único método confiable para monitorear quimio resistencia en parásitos aislados de pacientes es el modelo *in vitro* amastigote-macrófago. Debido a que ésta es una técnica laboriosa y costosa, así como al aumento de la incidencia de casos de leishmaniasis que no responden eficazmente a los medicamentos, urge

identificar marcadores moleculares de resistencia fáciles de utilizar en el laboratorio de rutina y que puedan guiar la terapia leishmanicida (Croft, 2006; Natera y col, 2007). Los cambios funcionales que ocurren en *Leishmania* como consecuencia del desarrollo de quimio-resistencia pudieran ser el resultado de un costo de adaptación y su evaluación sistemática podría orientarnos a identificar si los mismos pudieran ser usados como marcadores clínicos de la presencia de cepas resistentes en los pacientes infectados (Ponte Sucre, 2003; Natera y col, 2007). Debido a ello, en el Laboratorio de Fisiología Molecular hemos identificado fenómenos multifactoriales: genéticos, bioenergéticos y funcionales, que constituyen cambios que acompañan al desarrollo de resistencia del parásito en modelos de infección. Los resultados sugieren que los parásitos resistentes cambian sus preferencias metabólicas, la expresión de proteínas de superficie y su capacidad de diferenciación e infectividad con la finalidad de mantener el fenotipo quimio-resistente. Sería interesante desde el punto de vista farmacológico validar los resultados obtenidos en el laboratorio con estas cepas de referencia mantenidas en cultivo, en aislados de parásitos de lesiones de pacientes con su fenotipo silvestre intacto. Es decir, demostrar si los parásitos silvestres presentan algunas de las características evidenciadas en los parásitos de referencia seleccionados como quimio-resistentes. Para efectos de esta revisión mencionaremos algunas de estas herramientas que consideramos podrían ser las más valiosas por la sencillez de las metodologías de evaluación y su posible utilidad en el laboratorio de diagnóstico. Los eventos celulares que acompañan a la resistencia a drogas en *Leishmania* incluyen el aumento de la expresión de transportadores ABC, quienes modulan la salida y el tránsito intracelular de los agentes quimioterapéuticos, cambios en la diferenciación y la virulencia de la célula y cambios en vías metabólicas específicas del parásito. La evaluación de algunos de estos eventos es relativamente fácil y representan métodos rutinarios de laboratorio por lo cual sería extremadamente importante evaluar si cambios en la expresión de marcadores celulares se correlacionan con la expresión de resistencia a drogas en pacientes.

La acumulación celular de la calceína y su derivado hidrofóbico la calceína-acetoximetil ester (CAL AM), así como su inhibición por compuestos específicos como el verapamil permiten cuantificar la actividad de los transportadores ABC. Se ha propuesto que el aumento de la actividad de estos transportadores es confirmatorio del concepto de resistencia a drogas; sin embargo, en cepas de referencia de *Leishmania* se ha demostrado que estos sistemas están constitutivamente expresados (Essodaigui y col, 1994; Machuca y col, 2006), y no necesariamente validan el fenotipo de quimio-resistencia en este parásito, es decir, que no necesariamente representan lo que ocurre en las cepas silvestres. En *Leishmania*, la diferenciación celular y adquisición de la virulencia, o su equivalente, la metacicloogénesis, es un proceso durante el cual ocurren cambios coordinados del metabolismo y la morfología que se correlacionan con la transformación de parásitos de no infectivos a infectivos. La metacicloogénesis está vinculada a lapsos específicos de la cinética de crecimiento y a la densidad celular. Cuando los parásitos en fase logarítmica entran en la fase estacionaria ellos se transforman; la nueva forma recuerda ampliamente la fase metacíclica de crecimiento. Sería interesante evaluar si alteraciones de la cinética de crecimiento representan modificaciones en la diferenciación y la virulencia de la célula y si existe una asociación entre estos dos parámetros y la resistencia a drogas. Por ejemplo, la cinética de crecimiento de *L. amazonensis* sensibles a drogas difiere de la cinética de crecimiento de parásitos resistentes a drogas crecidos bajo la presión de la droga. (Uzcategui y col, 2005; Machuca y col, 2006). Al ser cultivados en ausencia de la droga, los parásitos resistentes crecen más rápidamente que los parásitos salvajes, implicando que tienen una mayor capacidad de replicación (Bates y col, 2003). Por otra parte, existen evidencias que sugieren que la

resistencia a drogas puede estar asociada a una disminución de la infectividad en algunas cepas. Este es el caso de las cepas de *L. mexicana* resistentes a anfotericina B (Al-Mohamed y col, 2005), *L. mexicana amazonensis* resistente a transportadores ABC (Gazola y col, 2001; Silva y col, 2004), *L. (V.) guyanensis* resistente a glucantime (Gazola y col, 2001), y *L. major* resistente a ricino (Elhay y col, 1990; Cappai y col, 1994). Al contrario, *L. mexicana amazonensis* resistente a tunicamicina, una droga no relevante para el tratamiento de la leishmaniasis, expresa una virulencia inmutable o aumentada al compararla con la cepa silvestre (Kink y col, 1987; Detke y col, 1988; Sereno y col, 1997a, 1997b). Como *Leishmania* exhibe un amplio rango de velocidad de replicación, aún en ausencia de cambios genéticos asociados a quimio-resistencia, la velocidad de replicación y cambios de la misma, constituye posiblemente un parámetro independiente no vinculado a la resistencia a drogas por lo cual, el ensayo de crecimiento no sería predictivo de la condición física del parásito. Los parásitos metacíclicos deben poseer cuerpos pequeños y delgados (Bates y Tetley, 1993; Zakai y col, 1997). Sin embargo, las células resistentes en fase estacionaria tienen una mayor longitud y área que las células sensibles (Prasad y col, 2000, Silva y col, 2001, 2004). Adicionalmente, las células resistentes en fase estacionaria son más sensibles al complemento del suero humano que las células sensibles. Esto sugiere una modificación de la expresión de los carbohidratos de superficie (Prasad y col, 2000, Silva y col, 2001, 2004). Finalmente, los parásitos resistentes expresan menos META-1 que las células sensibles (Silva y col, 2001, 2004). Este marcador es el producto del gen *meta-1* descrito originalmente en *L. major* (Nourbakhsh y col, 1996). Este es un marcador muy conservado en las cepas del Viejo y Nuevo mundo y esta predominantemente expresado en parásitos metacíclicos de *Leishmania* (Nourbakhsh y col, 1996; Berberich y col, 1998). Sería interesante analizar si en pacientes infectados con *Leishmania*, cambios en la expresión de estos marcadores se correlacionan con la ineficacia de la terapia y con la infección con parásitos resistentes.

Muchas vías metabólicas de *Leishmania* están íntimamente involucradas con la virulencia del parásito. Este es el caso de la enzimas pteridina reductasa y tripanotona reductasa (Figarella y col, 2003; Ponte-Sucre 2003). No se sabe a ciencia cierta si cambios en la expresión de estas u otras vías metabólicas pueden predecir cambios en la célula asociados a la resistencia a drogas. Por ejemplo, y en relación a la glicólisis, se ha descrito que parásitos quimio-resistentes en fase exponencial de crecimiento utilizan menos glucosa como sustrato energético, y presentan una menor expresión del transportador de glucosa. Sin embargo, los parásitos en fase estacionaria, utilizan mas amino ácidos como sustratos energéticos que los parásitos sensibles, y tienen aumentada la actividad de enzimas como la hexoquinasa, la fosfoglucoasa isomerasa y especialmente la glutamato deshidrogenada asociada a NAD^+ (Blum, 1993, 1994; Uzcategui y col, 2005; Machuca y col, 2006). Se podría postular entonces que la resistencia a drogas activa el uso de la fosforilación oxidativa, ya que la glutamato deshidrogenada regulada por NAD^+ reorienta los metabolitos de los amino ácidos hacia el ciclo de Krebs (Urbina, 1994). Sin embargo, la producción de ATP es similar en los parásitos sensibles y resistentes a drogas (Singh y Lee, 1999). Esta observación implica además que en parásitos en fase exponencial de crecimiento las actividades de las enzimas al comienzo de la vía glicolítica no dependen de la velocidad de incorporación de glucosa y por lo tanto no estarían relacionadas con la infectividad de la célula. Es decir, que la presión continua de drogas induce al parásito a seleccionar vías metabólicas específicas que le permiten compensar los defectos primarios producidos por la presión de la droga; esto implica que estos cambios en las vías metabólicas no servirían como predictores de resistencia a drogas. Sin embargo, sería interesante analizar si en aislados de parásitos obtenidos de pacientes infectados existe una correlación entre el éxito de la terapia y la infección con

parásitos resistentes a drogas y una menor tasa de incorporación de glucosa durante la fase exponencial de crecimiento.

Como conclusión final queremos resaltar que la identificación de marcadores de resistencia en *Leishmania* se hace cada día más importante debido al incremento constante de la frecuencia de aparición de casos de pacientes con fracaso terapéutico por causas imputables al desarrollo de quimio resistencia de los parásitos infectantes. Su valor de pronóstico para el resultado de tratamiento podría ser muy útil, especialmente si su implementación fuese confiable, económica y sencilla de implementar en el laboratorio diagnóstico.

Agradecimientos

Los autores agradecen el financiamiento de la Coordinación de Investigación de la Facultad de Medicina y el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la UCV a los proyectos que respaldan esta publicación. Así mismo agradecen el apoyo brindado por la Coordinación de Investigación de la Facultad de Medicina de la UCV y por FONACIT a Maritza Padrón Nieves, y el apoyo de la Fundación Humboldt a la Profesora Alicia Ponte-Sucre

REFERENCIAS

1. Al-Mohammed HI, Chance ML, Bates PA. Production and characterization of stable amphotericin-resistant amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana*. Antimicrob. Agents Chemother. 2005;49:3274-3280.
2. Anadón A, Martínez-Larrañaga MR. Fármacos Antiparasitarios. En: Velásquez Farmacología Básica y Clínica. P Lorenzo, A Moreno, JC Leza, I Lizasoain y Ma Moro, eds. 17ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. 2005. Cap. 53. pp.:881-905.
3. Bakker-Grunwald T. Ion transport in parasite protozoa. J. Exp. Biol. 1992; 172: 311-322.
4. Barret MP, Mottram JC, Coombs GH. Recent advances in identifying and validating drug targets in *Trypanosomes and Leishmanias*. Trends. Microbiol. 1999; 7 :82-88.
5. Basselin M, Robert-Gero M. Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity and lipophosphoglycan expression in pentamidine-resistant *Leishmania*. Parasitol. Res. 1998; 60:78-83.
6. Bates PA, Tetley L. *Leishmania mexicana*: induction of metacyclogenesis by cultivation of promastigotes at acidic pH. Exp. Parasitol. 1993;76:412-423.
7. Bates M, Wrin T, Huang W, y col. Practical applications of viral fitness in clinical practice. Curr. Opin. Infect. Dis. 2003;16:11-18.
8. Belkaid Y, Kamhawi S, Modo G, y col. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis, J. Exp. Med. 1998; 188:1941-1953.
9. Benaïm G, Szabo V, Cornivelli L. Isolation and characterization of calmodulin from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*. Acta Cient. Venezol. 1987; 38: 289-291.

10. Benaïm G, Cervino V, Salerno M, y col. Mecanismos de señalización, regulación iónica y resistencia a drogas en tripanosomátidos. Mem. IBE.1998;1:13-16.
11. Berberich C, Marín M, Ramírez JR, y col. The metacyclic stage-expressed Meta-1 gene is conserved between Old and New World *Leishmania* species. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1998;93:819-821.
12. Berman JD. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. Clin. Infect. Dis. 1997; 24:684-703.
13. Beverley SM, Coderre JA, Santi DV, y col. Unstable DNA amplification in methotrexate resistant *Leishmania* consists of extrachromosomal circles which relocalize during stabilization. 1984. Cell. 38:431-439.
14. Beverley SM. Genetic and genomic approaches to the analysis of *Leishmania* virulence. En: Molecular and Medical Parasitology. J Marr, T Nilsen, R Komunacki, eds. Academic Press, Elsevier, Amsterdam. 2001. Cap 6. pp.:111-123.
15. Borst P, Ouellette M. New mechanism of drugs resistance in parasitic protozoa. Ann. Rev. Microbiol.1995;49:427-460.
16. Blum JL. Effect of osmolality on 86Rb⁺ uptake and release by *Leishmania donovani*. J. Cell. Physiol. 1992;152:111-117.
17. Blum J. Intermediary metabolism of *Leishmania*. Parasitol. Today 1993;9:118-122.
18. Blum J. Energy metabolism in *Leishmania*. J. Bioenerg. Biomemb. 1994;26:147-154
19. Bogdan C, Gessner A, Solbach W, y col. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. Curr. Op. Immunol. 1996; 8: 517-525.
20. Bryceson ADM. Diffuse cutaneous leishmaniasis, the clinical and histopathological features of the disease in Ethiopia. Trans. R. Soc. Trop. Hyg Med. 1972;63:708-737.
21. Buates S, Matlashewski G. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod. J. Infect. Dis. 1999; 179:1485-1494.
22. Cappai R, Morris L, Aebischer T, y col. Ricin-resistant mutants of *Leishmania major* which express modified lipophosphoglycan remains infective for mice. Parasitology. 1994;108:397-405.
23. Connor DH, Gibson DW. Enfermedades infecciosas y parasitarias. En: Patología-Fundamentos. E Rubin y JL Farber, eds. Editorial Médica Panamericana. México DF. 1992. Cap.9. pp.:210-213.
24. Consigli J, Daniello C, Gallerazo V, y col. Cutaneous leishmaniasis: successful treatment with itraconazole. Int. J. Dermatol. 2006; 45:46-49.
25. Convit J. The Kellersberger Memorial Lecture: leprosy and leishmaniasis similar clinical immunological-pathological models. Ethiop. Med. J.1974; 12:187-95.
26. Convit J, Castellanos PL, Rondón A, y col. Immunotherapy versus Chemotherapy in localised cutaneous leishmaniasis. Lancet. 1987; 8530:401-405.

27. Convit J, Ulrich M, Fernández CT, y col. The immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1993; 87:444-448.
28. Convit J, Ulrich M, Polegre MA, y col. Therapy of Venezuelan patients with severe mucocutaneous or early lesions of diffuse cutaneous leishmaniasis with a vaccine containing pasteurized *Leishmania* promastigotes and bacillus Calmette-Guerin: preliminary report. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.* 2004;99:57-62.
29. Convit J, Ulrich M, Pérez M, y col. Atypical cutaneous leishmaniasis in Central America: possible interaction between infectious and environmental elements. *Tran. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2005; 99:13-17.
30. Croft SL, Pendergast W, y col. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem. Pharmacol.* 1987; 36:2633-2636.
31. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis: Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* 2003; 19:502-508.
32. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clin Microbiol. Rev.* 2006; 19:111-126.
33. Curtis CF. Personal protection methods against vectors of disease. *Rev. Med. Vet.* 1992; 80:543-553.
34. Chang KP, Reed SG, McGwire BS, y col. *Leishmania* model for microbial virulence: the relevance of parasite multiplication and pathoantigenicity. *Acta Trop.* 2003; 85:375-390.
35. Chen GX, Mueller C, Wendlinger M, y col. Kinetic and molecular properties of the dihydrofolate reductase from pyrimethamine-sensitive and pyrimethamine-resistant clones of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Mol. Pharmacol.* 1987; 31:430-437.
36. Debrabant A, Nakhasi H. Programmed cell death in trypanosomatids: is it an altruistic mechanism for survival of the fittest? *Kinetoplastid Biol. Dis.* 2003; 2:7.
37. Delgado O, Guevara P, Silva S, y col. Follow up of human accidental infection by *Leishmania braziliensis* using conventional immunologic techniques and polymerase chain reaction. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1996; 51:267-272.
38. Detke S, Chaudhuri G, Kink JA, y col. DNA amplification in tunicamycin-resistant *Leishmania mexicana*: multicopies of a single 63-kilobase supercoiled molecule and their expression. *J. Biol. Chem.* 1988; 263:3418-3424.
39. DiFranco M, Villaroel A, Ponte-Sucre A, y col. Incorporation of ion channels from the plasma membrane of *L. mexicana* into planar bilayers. *Acta Cient. Venez.* 1995; 46: 206-207.
40. Dos Reis G. Susceptible Hosts: a resort for parasites right in the eye of the immune response. *An. Acad. Bras. Cienc.* 2000; 72:79-52.
41. Eibl H, Unger C. Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug. *Cancer. Treat. Rev.* 1990; 17: 233-242.

42. Elhay M, Kelleher M, Bacic A, y col. Lipophosphoglycan expression and virulence in ricin-resistant variants of *Leishmania major*. Mol. Biochem. Parasitol. 1990;40:255-267
43. Ellenbeger TE, Beverly, SM. Multidrug resistance and conservative amplification of the H region in *L. major*. J. Biol. Chem. 1989;264:15094-15103.
44. Escobar P, Yardley V, Croft SL. Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), AmBisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice. Antimicrob. Agents Chemother. 2001;45:1872-5.
45. Essodaigui M, Frezard F, Moreira ES, y col. Energy-dependent efflux from *Leishmania* promastigotes of substrates of the mammalian multidrug resistance pumps. Mol. Biochem. Parasitol. 1999;100:73-84.
46. Evans R, Albornoz R. Principios de Epidemiología Moderna. Editorial EBVC. Caracas, 2000; pp. 233-240.
47. Feliciangeli MD, Zerpa O, Rodríguez N, y col. Hallazgo de *Lutzomyia longipalpis* (Diptera Psychodidae) naturalmente infectada con promastigotes en un foco endémico de leishmaniasis visceral en la Isla de Margarita, Venezuela. Bol. Dir. Malariol. Saneam. Amb. 1998;38:73-75.
48. Feliciangeli MD, Rabinovich J. Abundance of *Lutzomyia ovallesi* but not *Lu. gomezi* (Diptera: Psychodidae) correlated with cutaneous leishmaniasis incidence in north-central Venezuela. Med. Vet. Entomol. 1998;12:121-131.
49. Figarella K, Uzcátegui N, García N, y col. Molecular pharmacology of chemo-resistant *Leishmania*. Archiv. Venezol. Farmacol. Terap. 2003; 22:19-24.
50. Finegold SM, Barón EJ. Diagnóstico microbiológico 7ª Ed. SM Finegold, EJ Barón eds. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires. 1992. Cap 10. pp.:151-162.
51. García N, Figarella K, Mendoza-León A, y col. Changes in the infectivity, pyruvate kinase activity, acid phosphatase activity and P-glycoprotein expresión in glibenclamide-resistance *Leishmania mexicana*. Parasitol. Res. 2000; 86: 899-904.
52. Gazola KC, Ferreira AV, Anacleto C, y col. Cell surface carbohydrates and in vivo infectivity of glucantime sensitive and resistant *Leishmania (viannia) guyanensis* cell lines. Parasitol. Res. 2001;87:935-940.
53. Guevara P, Pinto-Santini D, Dias M, y col. Desarrollo y aplicación de herramientas moleculares para el estudio de la biología parásito-vector en los sistemas: *Leishmania*-Phlebotomo y *Tripanosoma cruzi* y *Tripanosoma rangeli*-Triatomino. Mem. IBE. 2001; 3:137-140.
54. Heby O, Persson L, Rentala M. Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis. Amino Acids. 2007 33:359-66.
55. Hendrikson N, Sifiri CD, Henderson DM, y col. Molecular characterization of the *Idmdr1* multidrug resistance gene from *Leishmania donovani*. Mol. Biochem. Parasitol. 1993;60:53-64.
56. Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. Ann. Rev. Cell. Biol. 1992;8:67-113.

57. Hirst, SI, Stapley, LA. Parasitology: the dawn of a new millennium. *Parasitol. Today.* 2000;16: 1-3.
58. Ismael AY, Garmson JC, Molyneux DH, y col. Transformation development and transmission of axenically cultured amastigotes of *L. mexicana in vitro* and in *Lutzomyia longipalpis*. *Am. J.Trop. Med. Hyg.* 1998;59:421-425.
59. Jiang S, Anderson SA, Winget GD, y col. Plasma membrane $K^+/H(+)$ -ATPase from *Leishmania donovani*. *J. Cell. Physiol.* 1994; 159:60-66.
60. Kink JA, Chang KP. Biological and biochemical characterization of tunicamycin-resistant *Leishmania mexicana*: mechanism of drug resistance and virulence. *Infect. Immun.* 1987;55:1692-1700.
61. Lainson R, Shaw JJ. Leishmaniasis of the New World: taxonomic problems. *Br. Med. Bull.* 1972; 28: 44-48.
62. Lerner EA, Ribeiro JM, Nelson RJ, y col. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatatory peptide from the salivary glands of the sandfly *Lutzomyia losgipalpis*. *J. Biol. Chem.* 1991; 261: 11234-11236.
63. Liew FY, O'Donnel CA. Immunology of leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* 1993; 32: 1172-1259.
64. Locksley RM. Leishmaniasis. En: Harrison's Principles of Internal Medicine. 13° edition. DL Kasper, E Braunwald, A Fauci, SL Hauser, DL Longo, JL Jameson, eds. Mc Graw Hill. New York. 1994. Cap.175. pp.:897-899.
65. López-Jaramillo P, Ruano C Rivera J y col. Treatment of cutaneous leishmaniasis with nitric-oxid donor. *Lancet.* 1998;351:1176-1177.
66. Luis L, Ramírez A, Aguilar CM, et al. The genomic fingerprinting of the coding region of beta-tubulin gene in *Leishmania* identification. *Acta Trop.* 1998; 69: 193-204.
67. Machuca C, Rodríguez A, Herrera M, y col. Metabolic adaptations induced by resistance to glibenclamide in *Leishmania amazonensis*. *Exp. Parasitol.* 2006; 114:1-9.
68. Marchesini N, Docampo R. A plasma membrane P-type H atpase regulates intracellular pH in *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2002; 119:225-236.
69. Mbongo N, Loiseau PM, Billion MA, y col. Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1998;42:352-357.
70. Melby P. Recent developments in leishmaniasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2002; 15:485-490.
71. Mendoza-León A, Shau JJ, Tapia FJ. A guide for the Cutaneous Leishmaniasis Connoisseur. En: Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. FJ Tapía; G Cáceres-Dittmar and MA Sánchez, eds. RG.1996; Cap 1. pp.:1-23.
72. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Anuarios Epidemiológicos 1994-2002. Caracas. 2002.
73. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Departamento de Informática. Instituto de Biomedicina. Caracas. 2004

74. Molineux W, Killick-Kendrick R. Leishmaniasis in Biology and Medicine. En: Leishmaniasis in Biology and Medicine. W Peters y R Killick-Kendrick, eds. New York. Academic Press. 1987; cap 20. pp.:794-845.
75. Murray H. Clinical and experimental advances in treatment of Visceral Leishmaniasis. Antimicrob. Agents Chemother. 2001; 45:2185-2197.
76. Natera S, Machuca C, Padrón-Nieves M, y col. Proficiency of drug-resistant parasites. Int. J. Antimicrob. Agents. 2007; 29:637-42.
77. Neghme A, Llanos A, Naquira C. Leishmaniasis. En: Parasitología Médica. A Atías, ed. Publicaciones Técnica Mediterráneo. Chile;1999. Cap. 29. pp.:248-254.
78. Nourbakhsh F, Uliana SR, Smith DF. Characterisation and expression of a stage-regulated gene of *Leishmania major*. Mol. Biochem. Parasitol. 1996;76:201-213.
79. Organización Mundial de la Salud (OMS). Communicable disease surveillance and response. Leishmaniasis and *Leishmania*/HIV co-infection. 2001.
80. Organización Mundial de la Salud (OMS). Communicable disease. 2002; 104-150.
81. Organización Mundial de la Salud (OMS). Control de la leishmaniasis. Informe de la Secretaría 118º Reunión. 2006:1-7.
82. Ouellette M, Fase-Fowler F, Borst P. The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarantolae* contains a novel P-glycoprotein gene. EMBO J.1990;9:1027-1033.
83. Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. Drug. Resist. Update. 2004; 7:257-66.
84. Overath P, Aerbischer T. Antigen presentation by macrophages harbouring intravesicular pathogens. Parasitol. Today. 1999; 15:325-331.
85. Pérez-Victoria FJ, Gamarro F, Oullette M, y col. Functional cloning of the miltefosine transport. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. J. Biol. Chem. 2003;278:49965-49971.
86. Phillips MA, Stanley SL. Quimioterapia de infecciones por protozoos. En: Goodman & Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica 11ª Edición. JG Hardman, LE Limbird, AG Gilman Eds. Mc Graw Hill México. 2006; Cap. 40. pp.: 1049-1071.
87. Plock A, Presber W. Application of flow cytometry and microscopical methods to characterize the effect of herbal drugs on *Leishmania sp.* Exp. Parasitol. 2001;97:141-153.
88. Ponte-Sucre A, Campos Y, Vazquez J, y col. Sensitivity of *Leishmania spp.* to glibenclamide and 4-aminopyridine: a tool for the study of drug resistance development. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1997;92:601-6.
89. Ponte-Sucre A, Campos Y, Fernandez M, y col. *Leishmania sp.*: growth and survival are impaired by ion channel blockers. Exp. Parasitol. 1998;88:11-19.

90. Ponte-Sucre A. Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for chemotherapy. *Kinetoplastid Biol. Dis.* 2003;28:2-14.
91. Ponte-Sucre A, Vicik R, Schultheis M, y col. Aziridine-2,3-dicarboxylates, peptidomimetic cysteine protease inhibitors with antileishmanial activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006 Jul;50(7):2439-47.
92. Ponte-Sucre A, Faber JH, Gulder T, y col. Activities of naphthylisoquinoline alkaloids and synthetic analogs against *Leishmania major*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007 Jan;51(1):188-94.
93. Prasad V, Kumar SS, Dey C. Resistance to arsenite modulates levels of α -tubulin and sensitivity to paclitaxel in *Leishmania donovani*. *Parasitol. Res.* 2000;86:838-842.
94. Ramos H, Brajtburg J. Evaluación de la actividad antileishmania de micelas mixtas de anfotericina B. *Mem. IBE.* 2001;3:17-20.
95. Rascon A. Intervención de la fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos en mecanismos de señalización celular. *Mem. IBE* 1998;1:29-32.
96. Rascon A. Fosfodiesterasas de AMPc en parásitos de la familia Trypanosomatidae. *Mem. IBE.* 2001;3:37-40.
97. Ravel C, Dubessay P, Bastien P, y col. The complete chromosomal organization of the reference strain of *Leishmania* genome project, *L.major*:Friedlin. *Parasitol. Today* 1998;14:301-303.
98. Reyes Romero H, Navarro Rojas P, y col. Infecciones por parásitos en trabajadores de la salud: transmisión y control. *Rev. Inst. Hig. ?Rafael Rangel?.* 2004; 35: 32-45.
99. Reyes Romero H, Navarro Rojas P, Ruiz Montufar H, y col. Leishmaniasis Tegumentaria Americana. *Informe Médico.* 2006; 8: 339-350.
100. Ridley D. The pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1999; 73:156-160.
101. Roberts CW, McLeod R, Rice DW, y col. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2003;126:129-142.
102. Rodríguez N, Guzman B, Rodas A, y col. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 1994;32:2246-2252.
103. Rodríguez N, Aguilar CM, Barrios MA, y col. Detection of *Leishmania braziliensis* in naturally infected individual sandflies by the polymerase chain reaction. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1999;93:47-49.
104. Rodríguez N, Cardona M, Zerpa O, Barrios M, y col. Aplicación de herramientas moleculares en el diagnóstico y caracterización de *Leishmania spp.* En áreas endémicas de Venezuela. *Bol. Malariol. Saneam. Amb.* 2001;XLI:21-26.

105. Rodríguez N, De Lima H, Aguilar CM, y col. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2002a;96:S1/105-S1/109.
106. Rodríguez N, Docampo R, Lu Hg HG, Scout DA. Overexpression of the *Leishmania amazonensis* Ca²⁺-ATPase gene *lmaa1* enhances virulence. *Cell. Microbiol.* 2002b;4:117-26.
107. Rodríguez N, Bailey BN, Martin MB, y col. Radical cure of experimental cutaneous leishmaniasis by biphosphate pamidronate. *J. Infect. Dis.* 2002c;186:138-140.
108. Rodríguez N, De Guglielmo Z, Marrios MA, y col. Genetic homogeneity within *Leishmania (L.) infantum* isolated from human and dogs: the relationship with the sandfly fauna distribution in endemic areas of Nueva Esparta State, Venezuela. *Parasitology.* 2005; 130:611-619.
109. Rosenthal PJ, Goldsmith RS. Fármacos antiprotozoarios. En *Farmacología Básica y Clínica* 8ª Edición. BG Katzung, ed. Editorial Manual Moderno. México. 2001; Cap 53. pp.:1007-1012.
110. Sandoval W, López C, Chiurillo M, y col. Análisis bioquímico y genético de las enzimas piruvato quinasa y fosfofructoquinasa de *Leishmania*. *Mem. IBE* 1998; 1:121-124.
111. Sereno F, Lemesre FJ. In vitro life cycle of pentamidine-resistant amastigotes: Stability of the chemoresistant phenotypes is dependent on the level of resistance induced. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1997a;41:1898-1903.
112. Sereno D, Michon P, Brajon N, y col. Phenotypic characterization of *Leishmania mexicana* pentamidine-resistant promastigotes. Modulation of the resistance during in-vitro developmental life cycle. *C. R. Acad. Sci. Ser III Sci. Vie.* 1997b;320:981-987.
113. Serrano-Martín X, González-Luna D, Fuentes J, et al. Evaluación de drogas en *Leishmania* sp.: Estudios genéticos y moleculares de nuevos blancos. Estudios in vitro e in vivo de la resistencia a drogas. *Mem.IBE.* 2005; 4:117-120.
114. Silva N, Ponte-Sucre A. ABC proteins in *Leishmania mexicana*: modulation of parasite-host cell interaction. *Arch. Venezol. Farmacol. Terap.* 2001;21:134-138
115. Silva N, Camacho N, Figarella K, y col. Cell differentiation and infectivity of *Leishmania mexicana* are inhibited in a strain resistant to an ABC-transporter blocker. *Parasitology.* 2004;28:629-34.
116. Singh AK, Lee ST. Status of respiration and ATP content in arsenite resistant *Leishmania mexicana amazonensis*. *Microb. Pathog.* 1999;26:171-174.
117. Solbach W, Laskay T. The host response to *Leishmania* infection. *Adv. Immunol.* 2000;74: 275.
118. Soto J, Arana BA, Toledo J, y col. Miltefosine for New World cutaneous leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 38:1266-1272.
119. Suffia I, Schmid-Antomarchi H, Kubar J. 86 Rb⁺ transport in *Leishmania infantum* promastigotes under various in vitro culture conditions. *Int. J. Parasitol.* 1997;27:1547-1553.
120. Sundar S, Reed SG, Sharma S, y col. Circulating T helper 1 (Th1) cell- and Th2 cell-associated cytokines in Indian patients with visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1997; 56:522-525.

121. Thakur CP. Leishmaniasis research- the challenges ahead. Indian J. Med. Res. 2006;123:193-194.
122. Tracy JW, Webster LT. Fármacos en la quimioterapia de infecciones causadas por protozoarios. En: Goodman & Gilman Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica 10ª Edición. JG Hardman, LE Limbird, AG Gilman Eds. Mc Graw Hill México. 2003; Cap. 41. pp.:1116-1136.
123. Ulrich M. Epidemiología y diagnóstico de la leishmaniasis. Ponencia en el Curso Latinoamericano del Instituto de Biomedicina. Caracas. 2004.
124. Urbina J. Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Today 1994; 10:107-110.
125. Urbina JA. Mechanisms of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatid parasites. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 2006;1001:S9-S16
126. Uzcategui NL, Figarella K, Camacho N, y col. Substrate preferences and glucose uptake in glibenclamide-resistant *Leishmania* parasites. Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol. 2005;40:395-402.
127. Valdivieso E, Dagger F, Rascón A. Identificación y caracterización bioquímica de una aspartil-proteinasa presente en promastigotes de *Leishmania mexicana*. Mem. IBE. 2001;3:17-20.
128. Vercesi AE, Macedo DV, Lima SA, y col. Ca^{2+} transport in digitonin-permeabilized trypanosomatids. Mol. Biochem. Parasitol. 1990; 42: 119-124.
129. Vieira LL, Cabantchik ZI. Amino acid uptake and intracellular accumulation in *Leishmania major* promastigotes are largely determined by an H(+)-pump generated membrane potential. Mol. Biochem. Parasitol. 1995; 75:15-23.
130. Yardley V, Khan AA, Martin MB, y col. *In vivo* activities of farnesyl pyrophosphate synthase inhibitors against *Leishmania donovani* and *Toxoplasma gondii*. Antimicrob. Agents Chemother. 2002;46:929-31.
131. Zakai HA, Chance ML, Bates PA. In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. Parasitology 1997;116:305-309.
132. Zerpa O, Ulrich M, Convit J. Programa Control de la Leishmaniasis Visceral en Venezuela. Publicación del Ministerio de Salud y Desarrollo Social, Universidad Central de Venezuela e Instituto de Biomedicina. 2003; pp. 8 -17.
133. Zerpa O. Terapia de leishmaniasis. Ponencia en el 1º Congreso Internacional de Terapéutica. Caracas. 2005.
134. Zilberstein D, Dwyer DM. Protonmotive force-driven active transport of D-glucose and L-proline in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1985 Mar;82(6):1716-20.
135. Zilberstein D, Shapira M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. Ann. Rev. Microbiol. 1994; 48:449-470.

