

LA LEISHMANIA SPP. COMO ESTRATEGIA DE DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIASIS, UN ARTÍCULO DE REVISIÓN

Martha Cecilia Beltrán Cifuentes* cMSc.
Patricia Durán Ospina** Msc.
Luisa Fernanda Corredor Arias *** cMSc.

Resumen

Introducción: Algunas enfermedades emergentes y reemergentes han venido en aumento de manera casi impredecible, en cuanto al sitio de origen. Tal es el caso de la enfermedad de Chagas, malaria, dengue, fiebre amarilla, rabia, leishmaniasis, debido entre otros a factores de movilidad poblacional, demográficos, sociales y económicos que han llevado a que los microorganismos generen adaptaciones al medio cambiante, dificultando su diagnóstico y tratamiento por métodos convencionales.

Métodos: Se realizó una búsqueda exhaustiva en las bases de datos relacionadas con genómica y proteómica como el NCBI (National Center for Biotechnology Information), auspiciado por la U.S National Library of Medicine y el National Institute of Health, donde se cuenta con acceso a PubMed.

Resultados: En la actualidad se han venido aplicando técnicas de marcadores moleculares, PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) que complementan las pruebas bioquímicas y microbiológicas empleadas comúnmente en el diagnóstico. Conociendo la expresión genómica de estos parásitos, se podrán diseñar métodos nuevos más efectivos contra cepas resistentes a los fármacos disponibles en la actualidad y de prevención temprana.

Conclusiones: En este artículo se presenta una revisión bibliográfica, donde la información clínica del paciente es determinante para el diagnóstico, el cual puede ser confirmado con técnicas moleculares desarrolladas en tiempo real, para aportar al conocimiento molecular de la *Leishmania spp.*, como estrategia de diagnóstico y tratamiento de esta patología.

Palabras clave: Leishmania; diagnóstico; métodos diagnósticos.

* Docente Biociencias Fundación Universitaria del Área Andina

** Docente de Microbiología y Farmacología Ocular. Fundación Universitaria del Área Andina

*** Docente de Biociencias Fundación Universitaria del Área Andina

LEISHMANIA SPP. AS A DIAGNOSTIC STRATEGY AND AS A TREATMENT OF LEISHMANIASIS; AN ARTICLE OF REVISION.

Abstract

Introduction: Some emerging and reemerging infirmities have been increasing in an almost unpredictable manner as far as site of origin. Such is the case with such diseases as Chagas, malaria, dengue, yellow fever, rabies, and leishmaniasis. Various demographic, social, and economic factors, as well as population mobility have allowed microorganisms to generate adaptations to changing environments and thus make diagnosis and treatment by conventional methods more difficult.

Methodology: An exhaustive search was undertaken in the data bases related to genome and protein sequence information found at the NCBI (National Center for Biotechnology Information), part of the United States National Library of Medicine and the National Institutes of Health, all with direct access to PubMed.

Results: Today techniques using molecular markers, PCR (Polymerase Chain Reaction), are being used to complement the biochemical and microbiological tests commonly used in diagnoses. Understanding the genome of parasites allows researchers to design new more effective methods against strains resistant to current drugs and to enable early prevention.

Conclusions: This article presents a bibliographical revision where the clinical information of the patient is a major determinant in a diagnosis which can be confirmed through molecular techniques developed in real time to contribute to molecular knowledge of Leishmania spp. as a diagnostic strategy and treatment of this pathology.

Key words: Leishmania, diagnosis, diagnostic methods

A LEISHMANIA SPP. COMO ESTRATÉGIA DE DIAGNÓSTICO E TRATAMIENTO DA LEISHMANIASIS, UM ARTIGO DE REVISÃO

Resumo

Algumas enfermidades emergentes e reemergentes têm aumentado de maneira quase indecifrável, quanto ao lugar de origem. Tais são os casos do Mal de Chagas, malária, dengue, febre amarela, raiva e leishmaniose, devido entre outros, a fatores de mobilidade populacional, demográficos, sociais e econômicos que levam microrganismos a gerarem adaptações ao meio mutante, dificultando seu diagnóstico e tratamento por métodos convencionais.

Métodos

Realizou-se uma busca exaustiva nas bases de dados relacionadas com genômica e proteômica, como o NCBI (National Center for Biotechnology Information), auspiciada pela U.S National Library of Medicine e o National Institute of Health, onde se conta com acesso a PubMed.

Resultados

Na atualidade aplicam-se técnicas de marcadores moleculares, PCR (Reação em cadeia da polimerasa) que complementam as provas bioquímicas e microbiológicas empregadas comumente no diagnóstico. Conhecendo a expressão genômica destes parasitas, se poderão desenhar métodos novos mais efetivos contra cepas resistentes aos fármacos disponíveis na atualidade e de prevenção rápida.

Conclusões

Neste artigo se apresenta uma revisão bibliográfica, onde a informação clínica do paciente é determinante para o diagnóstico, o qual pode ser confirmado com técnicas moleculares desenvolvidas em tempo real, para contribuir ao conhecimento molecular da Leishmania spp, como estratégia de diagnóstico e tratamento desta patologia.

Palavras chave: Leishmania; diagnóstico; métodos diagnósticos.

Introducción

El diagnóstico de la Leishmaniasis se basa en una buena anamnesis y hallazgos clínicos, confirmándose con pruebas microbiológicas que comprenden: aislamiento e identificación del parásito, examen directo, estudio histopatológico de una muestra tomada por biopsia, las cuales sólo reportan el género, pero no arrojan datos sobre las especies ni la multiresistencia a los fármacos. Las pruebas moleculares, como la reacción en cadena de polimerasa (PCR) y la identificación de segmentos específicos de ADN, DNA mitocondrial, tienen gran valor como herramienta para el diagnóstico rápido y eficiente de enfermedades infecciosas de las diferentes cepas de *Leishmania spp.* proporcionando la selección del tratamiento adecuado. Esta alternativa en la tecnología diagnóstica es definitiva porque se reporta una reaparición de enfermedades como la Enfermedad de Chagas, Malaria, Dengue, Leishmaniasis, Fiebre Amarilla, Rabia, planteando un serio desafío para su control¹.

Con relación a la Leishmaniasis, el número de casos reportados en Colombia durante 2005 fue cuatro veces mayor que el reportado en el 2001 y han surgido focos de transmisión en lugares que no reportaban casos en el pasado. Aunque la población más afectada siguen siendo hombres jóvenes que se introducen en el ciclo selvático por exposición ocupacional (militares, agricultores, grupos armados ilegales), la enfermedad también gana importancia en el contexto doméstico, y afecta a un número creciente de mujeres y niños. Se especula que estos patrones cambiantes en la dinámica de transmisión son consecuencia de la alteración de ecosistemas, como resultado del desplazamiento de poblaciones en áreas boscosas².

En Risaralda, según el Informe Quincenal Epidemiológico Nacional (IQEN) de la Dirección General de Salud Pública del Ministerio de la Protección Social y de la Subdirección de Vigilancia y Control en Salud Pública del Instituto Nacional de Salud, son 37 los casos reportados a Marzo del 2007 por la Secretaría de salud de Risaralda³.

En las manifestaciones clínicas de Leishmaniasis, la forma cutánea adquiere importancia por ser la de mayor prevalencia. Históricamente el control de la Leishmaniasis Cutánea se ha limitado a la detección pasiva de casos y al tratamiento ambulatorio con antimonio pentavalente, a pesar de que es un medicamento costoso y de administración parenteral (intramuscular), por 20 días².

Aunque la manifestación cutánea de Leishmaniasis se reporta en lesiones de piel,^{4,5,6,7,8} hay otras lesiones severas que presentan compromiso en el área ocular, principalmente como lesiones en párpado, proptosis mecánica, lagoftalmos y blefaroconjuntivitis; para su diagnóstico se debe observar el tamaño de la lesión, la proximidad al borde palpebral, si hay presencia de triquiasis, opacidad corneal, queratitis, entre otros. Se ha reportado incluso conjuntivitis bulbar eritematosa^{9,10}.

La investigación en esta patología se enfoca en la interacción huésped-parásito y en los diferentes factores (respuesta inmune, virulencia, resistencia a medicamentos) que determinan distintas manifestaciones de la enfermedad y la falla terapéutica. Hay interés particular por la búsqueda de terapias alternativas como sales de antimonio, más seguras y de sencilla administración, en especial para la población infantil que ha demostrado una

baja respuesta terapéutica. Adicionalmente, ante el creciente número de pacientes que no responden al tratamiento con antimoniales, se desarrollan estudios para entender la resistencia del parásito a los medicamentos anti-*Leishmania* como factor contribuyente en las fallas terapéuticas, al igual que la implementación de métodos de diagnóstico rápidos y efectivos, que por los hallazgos clínicos, una buena anamnesis, exploración física, los cultivos directos, los estudios histológicos, hacen el diagnóstico muy lento, mientras que con el conocimiento molecular de la *Leishmaniasis*, se tendrá una nueva herramienta como estrategia para el diagnóstico y control de la enfermedad más efectivo en menor tiempo¹¹.

Materiales y métodos

Se realizó una búsqueda en las bases de datos relacionadas con genómica y proteómica como el NCBI (National Center for Biotechnology Information), auspiciado por la U.S National Library of Medicine y el National Institute of Health, donde se cuenta con acceso a PubMed, un servicio que incluye citas de MEDLINE y otras revistas científicas dedicadas a las ciencias biomédicas. Igualmente, proporciona información taxonómica de secuencias genéticas y proteicas, como estructura, función y comportamiento de cualquier tipo de biomolécula de interés. Trabaja con un nivel mínimo de redundancia y un alto nivel de integración con otras bases de datos relacionadas.

Se consultaron otras bases de datos especializadas como Hinari, Proquest, Science Direct, para acceder a revistas y artículos de investigación que brindan una visión amplia de la historia científica en el estudio de la *leishmaniasis*, sus

manifestaciones, tratamiento y diagnóstico. Otros sitios de consulta fueron los reportes de la OMS (Organización Mundial de la Salud).

Los criterios de selección de artículos se fundamentaron en los estudios moleculares para el diagnóstico y tratamiento de la *Leishmaniasis*; se descartaron las revisiones relacionadas con aspectos morfológicos, ciclos reproductivos, manifestaciones clínicas y distribución geográfica.

Resultados de la revisión

Características generales del genoma

La *Leishmania* posee un genoma con características poco ortodoxas en su organización y expresión, en comparación con la mayoría de los eucariotes^{13,30}. En *Leishmania* muchos genes se encuentran agrupados en unidades de transcripción policistrónicas y hacen que cada transcrito primario sea un ARNm precursor policistrónico¹⁵. Los ARNm individuales son escindidos del precursor por medio de una reacción de trans-empalme, durante la cual una secuencia líder de 39 nucleótidos (miniexón, ME) se une a cada uno de los transcritos en el extremo 5', donándoles la estructura cap (residuo 7- metilguanosina) al mismo tiempo que el extremo 3' de cada mRNA es poliadenilado, y generan así los ARNm maduros^{16,31}. Las unidades policistrónicas pueden contener múltiples copias de un gen en tandem, así como también genes relacionados o no relacionados entre sí¹⁵.

El **genoma** de *Leishmania* muestra una carencia acentuada de los factores conocidos de iniciación de la transcripción y la expresión génica está regulada casi

completamente a nivel postranscripcional, a través del empalme de los ARNm y los mecanismos que involucran el procesamiento diferencial de la región no traducida 3' del ARNm (3'UTR). El genoma de *Leishmania* contiene secuencias de iniciación de la transcripción divergentes de las conocidas en otros eucariotes y éstas han sido explotadas como herramientas en el diseño de vectores de transfección¹².

Las especies de *Leishmania* causan un espectro de enfermedades humanas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. En estudios a partir de *Leishmania major* se han reportado la secuenciación de **36 cromosomas** de su genoma haploide que presenta un **tamaño de 32.8 megabases** y se han predicho **911 genes del RNA**, **39 pseudogenes**, y **8272 genes codificantes de proteínas**, de los cuales al 36% se le atribuye una supuesta función³².

Genes relacionados con la patogenicidad

La transfección o introducción de ácidos nucleicos al interior del microorganismo, facilita la cuantificación de células de *Leishmania* y permite realizar ensayos para el desarrollo de la terapia con drogas. El gen bacteriano *lacZ* (alfa - galactosidasa) permite la detección de parásitos en tejidos de ratón hasta 4 semanas después de la infección por medio de una reacción colorimétrica visualizada bajo el microscopio de luz³³. Por otro lado, existe una correlación lineal entre el número de parásitos recombinantes que expresan el gen reportero *luc* (luciferasa de la luciérnaga *Photynus pyralis*) y la actividad luciferasa; por ello, la transfección con *luc* resulta muy útil para vigilar la progresión de infecciones dentro de macrófagos y tejidos hospederos, y la

cuantificación rápida y sensible en pruebas de citotoxicidad de drogas por medio de luminometría^{34,35}.

Además, la transfección estable en *Leishmania* permite estudiar algunos aspectos de la interacción del parásito con el sistema inmune. Los parásitos que expresan ovoalbúmina y alfa - galactosidasa fueron capaces de dirigir estas proteínas reporteras hacia el fagolisosoma, donde se procesaron para el reconocimiento por células CD4+, lo cual sugiere que el estudio de las vías procesadoras del complejo mayor de histocompatibilidad clase II utilizando parásitos de *Leishmania* modificados, podría ser una aproximación valiosa para estudiar aspectos de la interacción parásito-hospedero³⁶.

Mediante experimentos de eliminación de genes se han identificado **genes relacionados con la patogenicidad**, importantes en el conocimiento del parásito dentro del insecto vector o del hospedero mamífero, pero no para su crecimiento en los medios rutinarios de cultivo³⁷. Por ejemplo, el gen A2 fue esencial para la supervivencia de *L. donovani* en el macrófago, así como lo fueron la fosfomanomutasa (PMM) para *L. mexicana* y la proteína de choque térmico HSP100 para *L. major*^{38,39,40}.

En la categoría de virulentos entran genes que están involucrados en la virulencia pero no la explican totalmente, cuya eliminación muestra pérdida cuantitativa pero no completa de virulencia y se puede retener la capacidad de producir lesiones aunque a una tasa más lenta que la de los parásitos de tipo silvestre^{41,42}. Por ejemplo, la eliminación del arreglo de genes de cisteína proteinasa (LmCPb) en *L. mexicana* redujo la supervivencia intracelular en 80%⁴¹.

En otro estudio se observó que las lesiones inducidas por parásitos mutantes *lmcpb*-se curan acompañadas de respuesta inmune Th1, a diferencia de las inducidas por parásitos de tipo silvestre, lo cual sugiere que las cisteína proteinasas de *L. mexicana* suprimen la respuesta inmune antileishmania⁴³. Además, cuando *L. major* fue transfectada con un cósmido que expresa múltiples genes de CPB de *L. mexicana*, estos parásitos indujeron una respuesta IFN γ significativamente inferior comparada con *L. major* silvestre. Estos datos indican que la inhibición de CPB podría probarse como estrategia inmunorreguladora para formas crónicas de leishmaniasis.

En otros ensayos, la eliminación de GP63, la proteína de superficie más abundante en el promastigote, produjo un efecto pequeño en el fenotipo de *L. major in vitro* (afectó el depósito del complemento) pero

no tuvo efecto en las infecciones al insecto, al macrófago o al ratón⁴⁴.

De igual manera, la eliminación de los genes que codifican para las proteínas SHERP/HASP (proteína hidrofílica en membrana del retículo endoplásmico y mitocondria/proteína de superficie hidrofílica acilada), abundantes en estadio metacíclico infectivo⁴⁵, y la ausencia de proteínas que intervienen en la síntesis de diferentes glicoconjugados implicados en la virulencia, tuvieron un efecto pequeño en la pérdida de virulencia⁴⁶⁻⁵⁰.

Acción de fármacos sobre proteínas o genes del parásito

Se ha reportado el uso de diferentes medicamentos para tratar la leishmaniasis según la situación clínica u organismos (Ver Tabla 1)⁵².

Cuadro No 1. Medicamentos para tratar la Leishmaniasis.

Fuente: Protocolos Secretaría de Salud. Departamento de Risaralda 2007

Situación Clínica u Organismo	Fármacos de Elección	Fármacos Alternativos
Leishmaniasis Visceral (L.donovani, L.chagasi, L.infantum) O mucosa (L.braziliensis)	Estibogluconato sódico 20 mg/Kg/d IV o IM por 28 días o Pentamidina o Anfotericina B	Meglumina antimonato
Cutánea (L. major, L. tropica, L. mexicana, L.braziliensis)	Estibogluconato sódico++ 20mg/Kg/d IV o 20 días	Meglumina antimonato+ o Ketoconazol o Pentamidina o Tratamiento intralesional o tópico

Las diferentes formas clínicas y manifestaciones del parásito, requieren de un tratamiento prolongado para la forma mucosa y visceral (Ver Cuadro 2). Los ajustes de tratamiento por Kilogramo de peso también deben ser tenidos en cuenta para la posología (Ver Cuadro

3). La administración de isotianato de pentamidina requiere de ajustes en la dosificación (Ver Cuadro 4). La Secretaría de Salud del Departamento de Risaralda establece como tratamiento a seguir ante esta parasitosis:⁵³

Cuadro 2. Tratamiento de Leishmaniasis.

Fuente: Protocolos Secretaría de Salud. Departamento de Risaralda 2007

Forma Clínica	Cutánea	Mucosa	Visceral
Dosis de antimonio pentavalente (Sb5+)	20 mg/Kg/día	20 mg/Kg/día	20 mg /Kg/día
Vía de administración	IM	IM	IM
Frecuencia	Diaria	Diaria	Diaria
Duración del tratamiento	20 Días	28 Días	28 Días

Cuadro 3. Tratamiento de Leishmaniasis por Kilogramo.

Fuente: Protocolos Secretaría de Salud. Departamento de Risaralda 2007

Peso en Kg	Cantidad en Cc Glucantime	Cantidad en Cc Pentostam	Cantidad en Cc Pentacarinat
15	3.5	3.0	1
25	6.0	5.0	1.6
35	7.5	7.0	2,3
45	10.0	9.0	3.0
55	12.5	11.0	3.6
65	15.0	13.0	4.2
75	17.5	15.0	4.9
85	20.0	17.0	5.5
95	22.5	19.0	6.2

Cuadro 4. Duración del tratamiento de Leishmaniasis.

Fuente: Protocolos Secretaría de Salud. Departamento de Risaralda 2007

Administración del Isotianato de Pentamidina (Pentacarinat)	
Forma Clínica	Cutánea
Dosis	3 mg/Kg/día
Vía de Administración	IM
Frecuencia	Días alternos
Duración del tratamiento	4 dosis en días alternos (1 semana)

En *Leishmania* la acción de los fármacos sobre proteínas o los genes del parásito está asociada a su resistencia a drogas y relacionada con la amplificación génica. Gran parte de los estudios de transfección se han enfocado a aclarar los mecanismos de resistencia a drogas⁶¹⁻⁷⁴. El locus H, una región de 40 kb en el ADN genómico, se encuentra amplificado en forma de grandes círculos extracromosómicos, luego de la exposición de las células a varias drogas no relacionadas entre sí⁷⁵. Para identificar los genes que confieren resistencia al arsénico y a los antimoniales, se clonaron fragmentos de la región H de *L. major* en un vector de expresión y luego se reintrodujeron al parásito en un alto número de copias, confirmando la asociación entre la presencia del gen *lmpgp A* en los constructos y el nivel de resistencia^{55,56}.

Discusión

Las técnicas moleculares brindan un acercamiento al conocimiento del genoma de la *Leishmania*, técnicas consideradas como herramienta relevante para el diagnóstico y tratamiento, pues permiten selectividad al escoger el fármaco adecuado para cada especie. Ante los fallidos tratamientos por multiresistencia de las cepas, se dilucida la aparición de nuevas especies producto de mutaciones ante procesos de recombinación genética, fruto de la movilidad de las poblaciones.

El uso de herramientas y técnicas moleculares, al igual que el análisis de restricción e hibridación molecular con sondas específicas, permite conocer la distribución geográfica de las especies de *Leishmania* que originan la Leishmaniasis en las diferentes zonas del país. La inmunofarmacología está tomando fuerza para el tratamiento bacteriano; en parasitología se empieza a abordar en la última década, gracias a estos hallazgos de la biología molecular.

Los reportes referentes a pruebas bioquímicas y microbiológicas para la detección de *Leishmania* resultan numerosos, comparativamente con las pruebas basadas en técnicas moleculares; sin embargo, de manera complementaria éstas podrían ser de primera elección en los Institutos de Salud, donde se requiere capacitación de personal idóneo para la ejecución e interpretación de estas técnicas moleculares, y la asignación de un presupuesto por parte de entidades gubernamentales.

Agradecimientos

Al Doctor Gustavo Adolfo Vallejo PhD. en Parasitología. Universidade Federal De Minas Gerais, UFMG, Brasil. Docente – Investigador Universidad del Tolima, por la revisión y asesoría sobre el tema. Publica v.6 n.3 Washington Sept. 1999

BIBLIOGRAFÍA

1. Weissenbacher M., Salvatella R. Hortal M. *El desafío de las enfermedades emergentes y reemergentes*. Publicación Innovación, confiabilidad y gestión gremial. 2006. Uruguay
2. Centro Internacional de Entrenamiento e investigaciones médicas CIDEM. 2007. Cali-Colombia.
3. Ministerio de la Protección Social. Instituto Nacional de Salud. Volumen 12, número 7- Abril 2007. Bogotá, DC.
4. World Health Organization. WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases. 2000. WHO/CDS/CSR/ISR.
5. Abrishami M, Soheiliani M, Farahi A. Dowlati successful treatment of ocular leishmaniasis Eur J dermatol 2002; 12: 88-9
6. Aouchiche, Hartani D. ophthalmic involvement in cutaneous leishmaniasis med trop (mars) 1981 Sep-Oct; 41(5): 519-22.
7. García Almagro D. *Leishmaniasis cutánea*. En: España Alonso A, editor. Fisiopatología de las enfermedades cutáneas IV. 2004.
8. Madrid: Aula Médica; Quesada Cortés A, Campos Muñoz L, Rubio Flores C, Martín Díaz MA,
9. Nondy A, Addy M, Chowdhury AB. *Leishmaniasis blepharo – conjunctivitis*. Trop Ceogr med 1991;43: 303-6.
10. Neil DP, Deusch J, comichael AJ, Taylor R. *Eyelid leishmaniasis in a patient with neurogenic ptosis*. Br J ophtalmol 1991; 75: 506-7.
11. Cortázar TM. & Walker J. 2004. *Manipulación genética y el estudio del parásito Leishmania*. Biomédica. 24(4): 438 – 455 (Biomédica 2004_24_4_438-455 Tania Cortázar)
12. Gay L, Wilson M, Donelson J. *The promoter for the ribosomal RNA genes of Leishmania chagasi*. Mol Biochem Parasitol 1996;77:193-200.
13. Curotto de Lafaille M, Laban A, Wirth D. Gene expression in *Leishmania*: analysis of essential 5' DNA sequences. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:2703-7.
14. Kumar PV, Roozitalab MH, Lak P, Sadeghi E. *Ocular Leishmaniasis, a cause of blindness*. Irn J Med Sci 1993; 18: 106-11.
15. Graham SV. Mechanisms of stage-regulated gene expression in Kinetoplastida. Parasitol Today 1995;11: 217-23.
16. Papadopoulou B, Huang XF, Boucher N, McNicoll F. Stage-specific regulation of gene expression in *Leishmania*. ASM News 2003;69:282-8.
17. Brittingham A, Miller M, Donelson J, Wilson M. Regulation of GP63 mRNA stability in promastigotes of virulent and attenuated *Leishmania chagasi*. Mol Biochem Parasitol 2001;112:51-9.
18. Burchmore RJ, Landfear S. Differential regulation of multiple glucose transporter genes in *Leishmania mexicana*. J Biol Chem 1998;273:29118-26.
19. Flinn H, Smith D. Genomic organization and expression of a differentially-regulated gene family from *Leishmania major*. Nucleic Acids Res 1992;20:755-62.
20. Argaman M, Aly R, Shapira M. Expression of heat shock protein 83 in *Leishmania* is regulated posttranscriptionally. Mol Biochem Parasitol 1994;64:95-110.
21. Charest H, Zhang W, Matlashewski G. The developmental expression of *Leishmania donovani* A2 amastigote-specific genes is post-transcriptionally mediated and involves elements located in the 3' untranslated region. J Biol Chem 1996;271:17081-90.
22. Kelly BL, Nelson T, McMaster R. Stage-specific expression in *Leishmania* conferred by 3' untranslated regions of *L. major* leishmanolysin genes (GP63). Mol Biochem Parasitol 2001;116:101-4.
23. Brooks DR, Denise H, Westrop G, Coombs G, Mottram J. The stage-regulated expression of *Leishmania mexicana* CPB cysteine proteases is mediated by an intercistronic sequence element. J Biol Chem 2001;276:47061-9.
24. Soto M, Requena J, Jimenez-Ruiz A, Alonso C. The mRNA coding for the nucleosomal protein H2A of *Leishmania* is polyadenylated and has stem-loops at the 3' - end. Nucleic Acids Res 1991;19:4554.
25. Boucher N, Wu Y, Dumas C, Dube M, Sereno D, Breton M et al. A common mechanism of stateregulated gene expression in *Leishmania* mediated by a conserved 3'-untranslated region element. J Biol Chem 2002;277:19511-20.

26. Wu Y, El-Fakhry Y, Sereno D, Tamar S, Papadopoulou B. A new developmentally regulated gene family in *Leishmania* amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. *Mol Biochem Parasitol* 2000;110:345-57.
27. Mishra K, Holzer T, Moore L, LeBowitz J. A negative regulatory element controls mRNA abundance of the *Leishmania mexicana* paraflagellar rod gene PFR2. *Eukaryot Cell* 2003;2:1009-17.
28. Myung K, Beetham J, Wilson M, Donelson J. Comparison of the post-transcriptional regulation of the mRNAs for the surface proteins PSA (GP46) and MSP (GP63) of *Leishmania chagasi*. *J Biol Chem* 2002;277: 16489-97.
29. Gutiérrez JA, Puentes F, Moreno A, Patarroyo ME, Murillo L. Identification of a differentially expressed mRNA in axenic *Leishmania panamensis* amastigotes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:835-8.
30. Mundodi V, Somanna A, Farrell P, Gedamu L. Genomic organization and functional expression of differentially regulated cysteine protease genes of *Leishmania donovani* complex. *Gene* 2002;282:257-65.
31. Sturm N, Campbell D. The role of intron structures in trans-splicing and cap 4 formation for the *Leishmania* spliced leader RNA. *J Biol Chem* 1999;274:19361-7.
32. Alasdair C. Ivens,^{1*} Christopher S. Peacock,¹ Elizabeth A. Worthey,² The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. Vol. 309. no. 5733, pp. 436 – 442 DOI: 10.1126/science.1112680
33. Okuno T, Goto Y, Matsumoto Y, Otsuka H, Matsumoto Y. Applications of recombinant *Leishmania amazonensis* expressing egfp or beta-galactosidase gene for drug screening and histopathological analysis. *Exp Anim* 2003;52:109-18.
34. Sereno D, Roy G, Lemesre J, Papadopoulou B, Ouellette M. DNA transformation of *Leishmania infantum* axenic amastigotes and their use in drug screening. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45: 1168-73.
35. Roy G, Dumas C, Sereno D, Wu Y, Singh A, Tremblay MJ et al. Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania spp.* infections in macrophages and in animal
36. Kelly JM. *Trypanosomatid shuttle vectors: new tools for the functional dissection of parasite genomes*. *Parasitology Today* 1995;11:447-51.
37. Chang KP, McGwire B. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biology and Disease* 2002;1:1-7.
38. Garami A, Mehlert A, Ilg T. Glycosylation defects and virulence phenotypes of *Leishmania mexicana* phosphomannomutase and dolicholphosphatemannose synthase gene deletion mutants. *Mol Cell Biol* 2001;21:8168-83. 1989;86:9119-23.
39. Zhang W, Matlashewski G. Loss of virulence in *Leishmania donovani* deficient in an amastigote-specific protein, A2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:8807-11.
40. Hubel A, Krobitsch S, Horauf A, Clos J. *Leishmania major* Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. *Mol Cell Biol* 1997;17:5987-95.
41. Mottram J, Souza A, Hutchison E, Carter R, Frame M, Coombs G. Evidence from disruption of the *lmcpb* gene array of *Leishmania mexicana* that cysteine proteinases are virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:6008-13.
42. Alexander J, Coombs G, Mottram J. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. *J Immunol* 1998;161:6794-801.
43. Buxbaum L, Denise H, Coombs G, Alexander J, Mottram J, Scott P. Cystein protease B of *Leishmania mexicana* inhibits host Th1 responses and protective immunity. *J Immunol* 2003;171:3711-7
44. Joshi P, Kelly B, Kamhawi S, Sacks D, MacMaster W. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol Biochem Parasitol* 2002;120:33-40.
45. McKean P, Denny P, Knuepfer E, Keen J, Smith D. Phenotypic changes associated with deletion and overexpression of a stage-regulated gene family in *Leishmania*. *Cell Microbiol* 2001;3:511-23.
46. Ilg T. Lipophosphoglycan is not required for infection of macrophages or mice by *Leishmania mexicana*. *EMBO J* 2000;19:1953-62.
47. Turco S, Späth G, Beverley S. Is lipophosphoglycan a virulence factor? A surprising diversity between *Leishmania* species. *Trends Parasitol* 2001;17:223-6.
48. Hilley JD, Zawadzki JL, McConville MJ, Coombs GH, Mottram JC. *Leishmania mexicana* mutants lacking glycosyl phosphatidyl inositol (GPI): protein transamidase

- provide insights into the biosynthesis and functions of GPI-anchored proteins. *Mol Biol Cell* 2000; 11:1183-95.
49. Garami A, Mehlert A, Ilg T. Glycosylation defects and virulence phenotypes of *Leishmania mexicana* phosphomannomutase and dolicholphosphatemannose synthase gene deletion mutants. *Mol Cell Biol* 2001;21:8168-83.
 50. Wilson K, Collart FR, Huberman E, Stringer JR, Ullman B. *Amplification and molecular cloning of the IMP dehydrogenase gene of Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 1991;266:1665-71.
 51. Borda, C. Edgardo - Rea, María J. F. - Rosa, Juan R. *Diagnóstico y tratamiento de la Leishmaniasis Tegumentar Americana en el Nordeste Argentino*. Centro Nacional de Parasitología y Enfermedades Tropicales (CENPETROP) - Facultad de Medicina - UNNE.Santa Fe 1432 - (3400) Corrientes - Argentina.
 52. *Isaza Diana M., Restrepo Berta. La leishmaniasis: conocimientos y prácticas en poblaciones de la costa del Pacífico de Colombia*. Rev Panam Salud
 53. Secretaria de Salud de Risaralda. Protocolos de tratamientos 2006
 54. Kündig C, Leblanc E, Papadopoulou B, Ouellette M. Role of the locus and the resistance gene on gene amplification frequency in methotrexate resistant *Leishmania tarentolae*. *Nucleic Acids Res* 1999; 27:3653-9.
 55. Ouellette M, Haimeur A, Grondin K, Légaré D, Papadopoulou B. Amplification of ABC transporter gene *pgpA* and of other heavy metal resistance genes in *Leishmania tarentolae* and their study by gene transfection and gene disruption. *Meth Enzymol* 1998; 292:182-92.
 56. Anacleto C, Abdo MC, Ferreira AV, Murta S, Romanha A, Fernández A et al. Structural and functional analysis of an amplification containing a PGPA gene in a glucantime-resistant *Leishmania (Viannia) guyanensis* cell line. *Parasitol Res* 2003;90:110-8.
 57. Coelho AC, Beverley S, Cotrim P. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 2003;130:83-90.
 58. Callahan HL, Beverley SM. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. *J Biol Chem* 1991;266:18427-30.
 59. Papadopoulou B, Roy G, Ouellette M. A novel antifolate resistance gene on the amplified H circle of *Leishmania*. *EMBO J* 1992;11:3601-8.
 60. Ouellette M, Borst P. Drug resistance and Pglycoprotein gene amplification in the protozoan parasite *Leishmania*. *Res Microbiol* 1991;142:737-46.
 61. Arrebola R, Olmo A, Reche P, Garvey EP, Santi DV, Ruiz-Perez LM. Isolation and characterization of a mutant dihydrofolate reductase-thymidylate synthase from methotrexate-resistant *Leishmania* cells. *J Biol Chem* 1994;269:10590-6.
 62. Cotrim PC, Garrity LK, Beverley SM. Isolation of genes mediating resistance to inhibitors of nucleoside and ergosterol metabolism in *Leishmania* by overexpression/selection. *J Biol Chem* 1999;274:37723-30.
 63. Liu X, Chang KP. The 63-kilobase circular amplicon of tunicamycin-resistant *Leishmania amazonensis* contains a functional N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase gene that can be used as a dominant selectable marker in transfection. *Mol Cell Biol* 1992;12: 4112-22.
 64. Henderson DM, Sifri CD, Rodgers M, Wirth DF, Hendrickson N, Ullman B. Multidrug resistance in *Leishmania donovani* is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian *mdr1* gene. *Mol Cell Biol* 1992;12:2855-65.
 65. Romero IC, Saravia NG, Walker J. Selective action of fluoroquinolones against intracellular mastigotes of *Leishmania (Viannia) panamensis in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004 (enviado para publicación).
 66. Segovia M. *Leishmania* gene amplification: a mechanism of drug resistance. *Ann Trop Med Parasitol* 1994;88:123-30.
 67. Beverley SM. Gene amplification in *Leishmania*. *Annu Rev Microbiol* 1991;45:417-44.
 68. McKean P, Denny P, Knuepfer E, Keen J Smith D. Phenotypic changes associated with deletion and overexpression of a stage-regulated gene family in *Leishmania*. *Cell Microbiol* 2001;3:511-23.
 69. Bello AR, Nare B, Freedman D, Hardy L. PTR1: a reductase mediating salvage of oxidized pteridines and methotrexate resistance in the protozoan parasite *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91: 11442-6.
 70. Légaré D, Papadopoulou B, Roy G, Mukhopadhyay R, Haimeur A, Dey S et al.

- Efflux systems and increased trypanothione levels in arsenite resistant *Leishmania*.
Exp Parasitol 1997;87:275-82.
71. Ouellette M. Biochemical and molecular mechanisms of drug resistance in parasites. *Trop Med Intern Health* 2001;6:874-88.
 72. Papadopoulou B, Roy G, Ouellette M. Frequent amplification of a short chain dehydrogenase gene as part of circular and linear amplicons in methotrexate resistant *Leishmania*. *Nucleic Acids Res* 1993; 21:4305-12.
 73. Vasudevan G, Ullman B, Landfear S. Point mutations in a nucleoside transporter gene from *Leishmania donovani* confer drug resistance and alter substrate selectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:6092-97.
 74. Kink JA, Chang KP. Tunicamycin-resistant variants from five species of *Leishmania mexicana amazonensis*: expression of virulence associated with an increased activity of N-acetyl glucosaminyl transferase and amplification of its presumptive gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:1253-7.
 75. Vasudevan G, Ullman B, Landfear S. Point mutations in a nucleoside transporter gene from *Leishmania donovani* confer drug resistance and alter substrate selectivity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:6092-97.