



## Cambios en el comportamiento epidemiológico de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana causada por *Leishmania Panamensis* en Colombia (1986-2018) y variaciones en el número de copias de genes asociados con virulencia

Changes in the epidemiological behavior of American Tegumentary Leishmaniasis caused by *Leishmania Panamensis* in Colombia (1986 - 2018) and variations in the number of copies of genes associated with virulence

Tatiana Pineda\*, Andrés Montoya\*\*, Sara M. Robledo\*\*\*, Diana C. Grajales\*\*\*\*, Iván D. Vélez\*\*\*\*\*

### Resumen

**Introducción.** Los cambios moleculares que ocurren en *Leishmania* spp. pueden reflejar variaciones en la patogenicidad del parásito, pero también en la epidemiología de la enfermedad.

**Objetivo.** Este estudio tuvo como objetivo describir las características epidemiológicas de los casos de leishmaniasis cutánea diagnosticados entre 1986 y 2018 e identificar los cambios ocurridos a lo largo de estos años, así como también las variaciones en el número de copias (CNV) de genes asociados a virulencia GP63, HSP83, HISH4 y H2B, BTUB, ATG8, PHOSP, SERP y PTR1 en cepas de *Leishmania panamensis* aisladas de dichos casos.

**Métodos.** Se construyó una base de datos con las historias clínicas de casos atendidos entre 1986 y 2018 en la cual se incluyeron variables sociodemográficas, clínicas y farmacológicas. Se identificaron cambios en el comportamiento de la enfermedad a lo largo del tiempo, agrupando los casos por periodos de 10 años. Las CNV se determinaron en el 9,3% (n = 125) de los aislados clínicos de *L. panamensis*. Por último, se sugirieron relaciones entre las CNV y los cambios observados en las variables clínicas tales como: tamaño de la lesión, aparición de recaídas/reactivaciones y respuesta al tratamiento.

El estudio retrospectivo incluyó la información obtenida de 1351 casos procedentes de 26 departamentos de Colombia. El 77% eran hombres y la edad promedio fue de 23 años. El 97% de los casos presentó LC con un 72% de úlceras; y el 7% tenía antecedentes de leishmaniasis. El 32% presentaron una lesión y el 68% tuvieron 2 o 3 lesiones; el 50% con un tiempo de evolución  $\leq 2$  meses; un tamaño  $\leq 4$  cm<sup>2</sup> y el 16%  $> 4$  cm<sup>2</sup>. No se encontró correlación entre el tipo de ocupación y la aparición de reinfección, así como tampoco entre la edad, el tipo de lesión, el número de lesiones, el tiempo de evolución, la aparición de reactivación o reinfección, ni los ciclos de tratamiento adicionales. No obstante, sí se observaron cambios en las variables entre el periodo 3 en comparación con los otros dos periodos estudiados, con mayor número de casos en pacientes con actividades en espacios interiores, compromiso mucoso e infección diseminada, recaídas y mayor tamaño de las lesiones. Al comparar los cambios en el número de copias (CNV) de

\* Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales – PECET, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. [cindy.pineda@udea.edu.co](mailto:cindy.pineda@udea.edu.co)

\*\* PECET-Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. [edwin.montoya@udea.edu.co](mailto:edwin.montoya@udea.edu.co)

\*\*\* PECET-Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. [sara.robledo@udea.edu.co](mailto:sara.robledo@udea.edu.co)

\*\*\*\* PECET-Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. [decarolina@grajales@udea.edu.co](mailto:decarolina@grajales@udea.edu.co)

\*\*\*\*\* PECET-Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. [ivan.velez@udea.edu.co](mailto:ivan.velez@udea.edu.co)

Recepción: 22/09/2021. Aceptación: 20/04/2022

**Cómo citar este artículo:** Pineda, T., Montoya, A., Robledo, S., Grajales, D., Vélez, I.D. Cambios en el comportamiento epidemiológico de la Leishmaniasis Tegumentaria Americana causada por *Leishmania Panamensis* en Colombia (1986-2018) y variaciones en el número de copias de genes asociados con virulencia. Hechos Microbiol. 2021;12(2):35-47. DOI: 10.17533/udea.hm.v12n2a04

los genes asociados con virulencia entre los aislados de *L. panamensis* de los tres periodos de estudio, se observó un incremento en el número de copias de los genes evaluados en los periodos 2 y 3 en comparación con el periodo 1, siendo el gen PHOSP el que mostró mayor variación.

**Resultados.** Estos resultados sugieren que *L. panamensis* ha sufrido cambios genómicos asociados a la virulencia a lo largo del tiempo que podrían estar aumentando su potencial patogénico, ocasionando lesiones más grandes y formas más complejas de LC incluyendo reactivaciones y reinfecciones. No obstante, se necesitan más estudios para ampliar la información sobre la variabilidad genética de *L. panamensis* y su asociación con los mecanismos de virulencia, resistencia y patogenicidad.

**Palabras clave.** Leishmaniasis; epidemiología; genómica.

### Abstract

**Introduction.** Molecular changes occurring in *Leishmania* spp. may reflect variations not only in the pathogenicity of the parasite but also in the epidemiology of the disease.

**Objective.** This study aimed to describe the epidemiological characteristics of cutaneous leishmaniasis cases diagnosed between 1986 and 2018 and to identify the changes that occurred over these years, as well as variations in the copy number (CNV) of virulence-associated genes GP63, HSP83, HISH4, and H2B, BTUB, ATG8, PHOSP, SERP, and PTR1 in *Leishmania panamensis* strains isolated from these cases.

**Methods.** A database was constructed with the clinical histories of cases attended between 1986 and 2018 in which sociodemographic, clinical, and pharmacological variables were included. Changes in disease behavior over time were identified, grouping cases by 10-year periods. CNVs were determined in 9.3% (n = 125) of the clinical isolates of *L. panamensis*. Finally, CNVs were suggested between CNVs and observed changes in clinical variables such as lesion size, the occurrence of relapses/reactivations, and response to treatment.

The retrospective study included information obtained from 1351 cases from 26 departments of Colombia. Seventy-seven percent were men and the average age was 23 years old. Ninety-seven percent of the cases presented LC with 72% of ulcers, and 7% had a history of leishmaniasis. Thirty-two percent had one lesion and 68% had two or three lesions; 50% with an evolution time < 2 months; size < 4 cm<sup>2</sup> and 16% > 4 cm<sup>2</sup>. No correlation was found between the type of occupation and the appearance of reinfection, nor between age, type of lesion, number of lesions, size of lesions, time of evolution, the occurrence of reactivation or reinfection, or additional treatment cycles. However, changes in the variables were observed between Period 3 compared to the other two Periods studied, with a greater number of cases in patients with indoor activities, mucosal involvement and disseminated infection, relapses and reactivations, and larger lesion size. When comparing the changes in the copy number (CNV) of genes associated with virulence among *L. panamensis* isolates from the three study periods, an increase in the number of copies of the genes evaluated was observed in Periods 2 and 3 compared to Period 1, with the PHOSP gene showing the greatest variation.

**Results.** These results suggest that *L. panamensis* has undergone virulence-associated genomic changes over time that could be increasing its pathogenic potential, causing larger lesions and more complex forms of LC, including relapses, reactivations, and reinfections. However, further studies are needed to expand information on the genetic variability of *L. panamensis* and its association with virulence, resistance, and pathogenicity mechanisms.

**Key words** Leishmaniasis; epidemiology; genomic.

## Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad infecciosa causada por varias especies de parásitos del género *Leishmania* y constituye un importante problema de salud pública en varios países de diferentes regiones del mundo, siendo endémica en 98 países y dos territorios<sup>[1]</sup>. Se estiman más de 350 millones de personas en riesgo de infección y cerca de 15 millones de personas con diagnóstico de leishmaniasis. Entre las diferentes formas clínicas de la enfermedad, la leishmaniasis cutánea (LC) es la forma clínica más prevalente con 0,7 - 1,2 millones de nuevos casos anuales<sup>[2]</sup>.

En la región de las Américas cada año se registran en promedio 55.000 casos de LC y leishmaniasis mucosa (LM) y es endémica en Argentina, Bolivia, Brasil, Colombia, Costa Rica, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Guyana Francesa, Guyana, Honduras, Nicaragua, México, Panamá, Paraguay, Perú, Surinam y Venezuela. En esta región la situación es más compleja debido principalmente a la variedad de especies de *Leishmania* (con 15 de las 22 especies patógenas circulando en la región) pero también de flebotomos vectores y de reservorios, y por la ocurrencia de diferentes ciclos de transmisión, manifestaciones clínicas y respuesta al tratamiento<sup>[3]</sup>.

Colombia es el segundo país con mayor número de casos, después de Brasil [3], con cerca de 11 millones de personas en riesgo de infección y entre 5.000 y 10.000 casos registrados anualmente, siendo Antioquia el departamento que aporta el 20% de los casos registrados<sup>[4]</sup>. Así mismo, Colombia es el país con mayor número de especies de *Leishmania* registrando a la fecha la presencia de 6 especies de *Leishmania* circulando en diferentes regiones de manera endémica como son *L. panamensis*, *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. infantum*<sup>[2]</sup>, de las cuales *L. panamensis* y *L. braziliensis* son especies muy importantes en términos clínicos y epidemiológicos no solo porque están ampliamente distribuidas en Colombia y en otros países de América latina, sino también porque las infecciones por estas especies, junto con *L. guyanensis*, tienen un potencial de causar LM y por su disminuida sensibilidad a los antimoniales pentavalentes<sup>[5]</sup>.

Las características epidemiológicas de la leishmaniasis en las diferentes regiones endémicas están determinadas, en gran medida, por las particularidades genéticas y

fisiológicas de las especies de *Leishmania* circulantes en la zona de transmisión toda vez que el análisis genómico permite describir las características genéticas que podrían explicar la patogénesis y las manifestaciones clínicas entre diferentes especies de *Leishmania* como también entre diferentes cepas de una misma especie. Así, por ejemplo, los cambios moleculares que ocurran en los genes del parásito ya sean asociados a la evolución o a la expresión y función de dichos genes (actividad enzimática o factor de virulencia, entre otros), podrían reflejar cambios en la patogenicidad del parásito y, por tanto, en la epidemiología de la enfermedad<sup>[5-7]</sup>.

Debido a la falta de control transcripcional en *Leishmania*, se ha sugerido que las variaciones genómicas, como lo es la variación del número de copias (CNV), pueden afectar a la presencia y expresión de los alelos de los genes relacionados con la supervivencia del parásito, y la infectividad tanto en el flebotomo vector como en el huésped mamífero<sup>[8,9]</sup>. En *L. panamensis* se han reportado CNV en genes asociados con la generación de resistencia a alopurinol y a los antimonio trivalente y pentavalente<sup>[10,11]</sup>, y con la gravedad de la enfermedad<sup>[12,13]</sup>, así como también en genes asociados con virulencia en cepas con diferente patogenicidad en ratones Balb/c<sup>[7]</sup>. No obstante, no se dispone de estudios que relacionen las CNV de los genes asociados con virulencia con cambios en las características epidemiológicas de la LC en cuanto a variables clínicas y farmacológicas.

Las anotaciones funcionales de los genes asociados con virulencia incluyen la glicoproteína 63 (gp63) o leishmanolisina, la proteína de choque térmico 83 (hsp83), las histonas H4 y H2b, la  $\beta$ -tubulina, la ATG8, tuzina, fosfatasa de ácido fosfatídico, serina peptidasa y el transportador de pteridina<sup>[10]</sup>, los cuales están implicados en procesos de infección de los macrófagos<sup>[14]</sup>, generación de resistencia del parásito a la lisis por el complemento<sup>[15]</sup> y termorregulación en condiciones de estrés por choque térmico<sup>[16]</sup>, todos ellos procesos implicados en el desarrollo clínico de la LC.

El estudio de las alteraciones en los genes del parásito asociados con virulencia permitirá identificar las posibles causas relacionadas con los cambios epidemiológicos de la LC a lo largo del tiempo como contribución al diseño de medidas de intervención que aboguen por un mejor manejo de la enfermedad en Colombia y otros países de la región de las Américas.

Dada la importancia de los factores de virulencia en el desarrollo de la LC, el presente estudio tuvo como objetivo identificar CNV de genes asociados con virulencia en *L. panamensis* obtenidos de pacientes de diferentes regiones geográficas de Colombia en los últimos 30 años.

## Materiales y métodos

### BASE DE DATOS

Se incluyeron las historias clínicas de los pacientes con diagnóstico positivo para LC causada por *L. panamensis* que consultaron entre 1986 y 2018 al Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) de la Universidad de Antioquia (Medellín, Colombia). De cada historia clínica se extrajo la información correspondiente a las diferentes variables. A su vez, las variables se clasificaron en tres categorías: i) *sociodemográficas* (edad, origen, ocupación y sexo); ii) *clínicas* (forma clínica, número de lesiones, características de la lesión, tamaño de la lesión, tiempo de evolución, historia previa de leishmaniasis, y nuevo episodio de la enfermedad: recaída o reinfección; y iii) *farmacológicas* (respuesta al tratamiento y necesidad de ciclos de tratamiento adicionales); no se incluyó como variable el tiempo de seguimiento pos-tratamiento, toda vez que en Colombia el programa de manejo de la leishmaniasis solo incluye el diagnóstico y el tratamiento y además, porque los pacientes cuando se ven curados no regresan a consulta.

### ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los casos se dividieron en tres periodos: en el periodo 1 (P1) se incluyeron pacientes atendidos entre 1986 y 1996 (n=457); en el periodo 2 (P2) se agruparon los pacientes atendidos entre 1997 y 2007 (n=463) y en el periodo 3 (P3) se incluyeron los pacientes atendidos entre 2008 y 2018 (n=431). Se realizaron análisis estadísticos descriptivos univariados y bivariados según la naturaleza de las variables. Para las variables cualitativas se usaron tablas de frecuencias y gráficos de barras; para las variables cuantitativas discretas se usaron tablas de frecuencias, medias y gráfico de barras; para las variables cuantitativas continuas se usaron histogramas. La mediana y el rango intercuartil (IQR) se estimaron para las variables con distribución no nor-

mal, mientras que la media y la desviación estándar se estimaron para las variables con distribución normal. Para el análisis de dos variables cualitativas se realizó una tabla de contingencia y un gráfico de barras agrupadas, mientras que para el análisis de dos variables cuantitativas se realizaron gráficos de dispersión y coeficiente de correlación. Por su parte, para el análisis de una variable cuantitativa y las variables cualitativas se realizó cajas y bigotes y medidas de resumen. Todos los análisis se realizaron también por periodos. El análisis de los datos se realizó con los softwares R (versión 7.8) y Microsoft Excel (versión 2016).

### SELECCIÓN DE AISLADOS

Se seleccionaron 125 aislados de *L. panamensis* criopreservados en nitrógeno líquido del banco de cepas del PECET de la Universidad de Antioquia. Se realizó muestreo aleatorizado con el fin de asegurar la representación regional y temporal de los casos evaluados durante el periodo de estudio. La procedencia de los pacientes con LC causada por *L. panamensis* se ilustra en la [Figura S1](#). A su vez, la [Tabla S1](#) resume las características de las regiones geográficas de Colombia.

### DESCONGELACIÓN DE LOS PARÁSITOS

Se descongelaron 125 cepas de *L. panamensis* crioconservadas en nitrógeno líquido. El contenido de los viales se transfirió a un tubo cónico estéril de 15 mL y, se añadió lentamente solución salina fría tamponada con fosfatos (PBS, del inglés phosphate buffer saline) hasta completar 4 mL y se centrifugó el tubo a 2500 rpm durante 10 minutos; se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 500  $\mu$ L de PBS suplementado con 1% de antibiótico (penicilina – estreptoamicina, 10.000 U/mL); luego, 250  $\mu$ L se cultivaron en medio de cultivo NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) a 26°C y los 250  $\mu$ L restantes se utilizaron para extraer el DNA del parásito.

### EXTRACCIÓN DEL DNA

Para la extracción del DNA se añadieron 500  $\mu$ L de tampón de lisis y 10  $\mu$ L de proteinasa K; el vial se incubó a 50 °C durante 30 minutos; se añadió 1 mL de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) y el tubo se centrifugó a 1700 g durante 10 minutos. La fase acuosa se transfirió a un vial de 1,5 mL y se añadió 1 mL de etanol frío; el vial se centrifugó a 1700 g

durante 2 minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó con 500  $\mu\text{L}$  de etanol frío; se centrifugó el vial a 1700 g durante 2 minutos, las muestras se concentraron en un concentrador SpeedVac. Por último, se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de tampón de elución y las muestras se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### VARIACIÓN DEL NÚMERO DE COPIAS

Para cada uno de los genes asociados con virulencia seleccionados (Tabla S2) se diseñaron cebadores específicos utilizando el software Primer3. V4.0 (<https://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), con los siguientes criterios: i) 18 a 24 nucleótidos de longitud; ii)  $T_m$   $55^{\circ}\text{C}$ - $60^{\circ}\text{C}$ ; iii) 40% - 60% de porcentaje de GC y, iv) 100bp a 200bp de tamaño del amplicón. Para cada uno de los cebadores diseñados se comprobó la temperatura de alineación, así como también la posible formación de estructuras secundarias tipo homodímeros y heterodímeros utilizando la herramienta OligoAnalyzer (<https://www.idtdna.com/>). Por último, se realizó un *blast* para determinar la especificidad *in silico* de la amplificación. Como gen de copia única se eligió el DNA POL II.

La qPCR para cada gen se realizó utilizando el kit AccuPower<sup>®</sup> 2X GreenStar qPCR Master Mix (Bio-neer Inc. Daejeon, Corea del Sur). Las concentraciones de cebadores evaluadas fueron 100 nM, 125 nM, 150 nM y 200 nM. El volumen de reacción final fue de 20  $\mu\text{L}$ , que contenía 10  $\mu\text{L}$  de mezcla maestra, 0,5  $\mu\text{L}$  de cada cebador, 8  $\mu\text{L}$  de agua y 1  $\mu\text{L}$  de DNA de cada cepa de *L. panamensis*. Las concentraciones de DNA evaluadas fueron 20, 50 y 100 ng. La qPCR se realizó en el LigthCycler96 (Roche, Basilea, Suiza) con el siguiente protocolo: 1 ciclo de desnaturalización inicial y activación de la enzima a  $94^{\circ}\text{C}$  durante 900 segundos seguido de 45 ciclos de 10 segundos de desnaturalización a  $95^{\circ}\text{C}$ , 20 segundos a  $55^{\circ}\text{C}$  -  $60^{\circ}\text{C}$  (dependiendo de los cebadores utilizados) y 20 segundos a  $72^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, 1 ciclo de 300 segundos a  $72^{\circ}\text{C}$  y una curva de fusión entre  $52^{\circ}\text{C}$  y  $90^{\circ}\text{C}$ . Para cada gen se determinó la temperatura óptima de alineación, así como la concentración adecuada de DNA.

Para validar la amplificación del gen de copia única se utilizaron  $50 \times 10^6$  promastigotes de *L. panamensis* MHOM/CO/87/UA140 (cepa de referencia) cultivados en el medio NNN. El DNA se extrajo utilizando el kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Hilden-Ale-

mania) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizó una curva estándar en una escala logarítmica de base cinco empezando por 1 parásito hasta 390.625. La curva se realizó por triplicado en tres experimentos independientes.

Las qPCRs se realizaron como sigue: 10  $\mu\text{L}$  de mezcla maestra, 0,5  $\mu\text{L}$  de cada cebador (100 nM), 8  $\mu\text{L}$  de agua y 1  $\mu\text{L}$  de DNA (20 ng/mL). Las condiciones de amplificación fueron 1 ciclo de 900 segundos a  $94^{\circ}\text{C}$ , 45 ciclos de desnaturalización de 10 segundos a  $95^{\circ}\text{C}$ , 20 segundos a  $60^{\circ}\text{C}$  y 20 segundos a  $72^{\circ}\text{C}$ , seguido de un ciclo final de 300 segundos a  $72^{\circ}\text{C}$  y una curva de fusión entre  $52^{\circ}\text{C}$  y  $90^{\circ}\text{C}$ .

Se estandarizó una qPCR para cada uno de los genes bajo las mismas condiciones de concentración de DNA, cebadores y, temperatura de alineación. Igualmente, se construyó una curva estándar en escala logarítmica base cinco a partir de concentraciones entre 1 y 390.625 parásitos. Las diferencias en las CNV se analizaron por el método  $\Delta\Delta\text{CT}$ , teniendo como referencia para la comparación el DNA aislado a partir de cepas procedentes de casos del P1.

**Aspectos éticos.** La confidencialidad de los datos de los pacientes fue preservada de acuerdo con los lineamientos establecidos en las Buenas Prácticas Clínicas.

## Resultados

### CAMBIOS EN EL COMPORTAMIENTO EPIDEMIOLÓGICO DE LA LEISHMANIASIS TEGUMENTARIA AMERICANA CAUSADA POR LEISHMANIA PANAMENSIS EN COLOMBIA

El estudio retrospectivo incluyó la información obtenida de 1351 pacientes atendidos entre 1986 y el 2018. Las características sociodemográficas de la población del estudio se resumen a continuación. El 77% eran hombres; la mediana de edad fue de 23 años, con un IQR de 15 años (rango de cinco meses a 91 años); el 75% de los pacientes tenían 34 años o menos y, el 25% tenían 19 años o menos. Los pacientes procedían de 26 departamentos de Colombia: Antioquia (69%), Chocó (11%) y Caldas (4,1%); el 15,9% restante de los casos procedía de otras regiones (Figura S1).

El 42% de los pacientes tenían ocupación en ambientes externos y el 34% en ambientes internos. En el 24% restante no había datos disponibles. Del total de casos, 1318 (97%) tenían LC, 23 pacientes (2%) tenían

leishmaniasis mucosa, ocho pacientes (1%) tenían LC diseminada (LD), un paciente tenía LCD con afectación de las mucosas y un paciente tenía LC en coinfección con VIH. En el 7% (93 pacientes) se describió una historia previa de leishmaniasis. El 50% (676 pacientes) presentaban una lesión y el 68% (919 pacientes) tenían 2 o 3 lesiones; un paciente con LD presentó 294 lesiones. En el 25% (338 pacientes) el tiempo de evolución fue de tres meses y el 50% (676 pacientes) consultaron con un tiempo de evolución igual o inferior a 2 meses. El 72% (973 pacientes) tenían úlceras, el 4% (54 pacientes) presentaron nódulos, 13 pacientes (1%) presentaron pápulas, otros 13 pacientes (1%) mostraron lesiones verrugosas y en 13 casos (1%) se registraron lesiones mixtas. El 50% (676 pacientes) tenían lesiones con un área de 4 cm<sup>2</sup> o menos, y el 16% (216 pacientes) tenían lesiones mayores de 4 cm<sup>2</sup> (Tabla 1). De los 1.351 casos atendidos, 81 pacientes tuvieron reactivación, 15 pacientes tuvieron reinfección y 5 pacientes presentaron tanto reactivación como reinfección. Ocho pacientes requirieron dos ciclos adicionales de tratamiento (con edades entre 5 y 52 años) y tres pacientes

requirieron tres ciclos adicionales de tratamiento (con edades entre 3 y 29 años).

No se encontró correlación entre el tipo de ocupación (interior y exterior) y la aparición de reinfección o reactivación, así como tampoco entre la edad, el tipo de lesión, el número de lesiones, el tamaño de las lesiones, el tiempo de evolución, la aparición de reactivación o reinfección, ni los ciclos de tratamiento adicionales. No obstante, si se observaron cambios en las variables para los casos del P3 en comparación con los otros dos periodos; es así como mientras que en P1 y P2 la mayoría de los casos ocurrieron en pacientes con actividades en ambientes exteriores, en el P3 la mayoría de los casos ocurrieron en pacientes con actividades en espacios interiores. Así mismo, en el P3 se observaron más casos de LM y DL con compromiso mucoso, también en pacientes que realizaban actividades en espacios interiores, como también más recaídas. Adicionalmente, en el P3 se presentó un mayor número de casos con lesiones verrucosas y mixtas y la media del tamaño de la lesión fue también mayor en los casos del P3 (37,5 cm<sup>2</sup>) en comparación con los casos del P1 (21 cm<sup>2</sup>) y del P2 (23 cm<sup>2</sup>) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Variables sociodemográficas y clínicas estudiadas según los periodos del estudio.

Variable	Periodo 1 (n=457)	Periodo 2 (n=463)	Periodo 3 (n=431)
	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Sexo</b>			
Femenino	119 (26)	81 (17,5)	109 (25,3)
Masculino	338 (74)	381 (82,3)	320 (74,2)
Sin dato	0 (0)	1 (0,2)	2 (0,5)
<b>Edad (en años)</b>			
Mediana (IQR)	23 (11)	23 (10)	27 (21)
<b>Procedencia (región)</b>			
Amazonia	0 (0)	13 (2,8)	7 (2)
Andina	386 (84,5)	383 (82,7)	319 (74)
Caribe	28 (6,1)	6 (1,2)	12 (2,8)
Orinoquia	0 (0)	14 (3,1)	6 (1)
Pacífica	39 (8,5)	34 (7,3)	82 (19)
Sin dato	4 (0,9)	13 (2,8)	5 (1,2)
<b>Ocupación (Tipo de ambiente)</b>			
Exterior	211 (46)	257 (56)	99 (23)
Interior	147 (32)	115 (25)	196 (45)
Sin dato	99 (22)	91 (20)	136 (32)

Variable	Periodo 1 (n=457)	Periodo 2 (n=463)	Periodo 3 (n=431)
	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Forma clínica</b>			
Cutánea	446 (98)	458 (99)	414 (96)
Mucosa	11 (2,4)	4 (0,9)	8 (1,9)
Cutánea Diseminada	0 (0)	1 (0,2)	7 (1,6)
Sin dato	0 (0)	0 (0)	2 (0,5)
<b>Tipo de lesión</b>			
Ulcera	333 (73)	356 (77)	277 (64)
Pápula	7 (1,5)	4 (0,86)	4 (0,9)
Nódulo	26 (5,7)	19 (4,1)	7 (1,6)
Verrucosas	2 (0,4)	2 (0,4)	8 (1,9)
Mixtas	1 (0,2)	1 (0,2)	5 (1,2)
Sin dato	88 (19)	81 (17)	130 (30)
<b>Tamaño de la lesión</b>			
>4 cm <sup>2</sup>	58 (12,7)	63 (13,6)	94 (21,8)
≤ 4 cm <sup>2</sup>	221 (48,4)	251 (54,2)	173 (40,1)
Sin dato	178 (38,9)	149 (32,2)	164 (38,1)
<b>Respuesta a 1 ciclo de tratamiento</b>			
Cura	3 (30)	13 (72,2)	17 (56,7)
Falla	0 (0)	0 (0)	9 (30)
Mejoría	6 (60)	2 (11,1)	4 (13,3)
Sin dato	1 (10)	3 (16,7)	0 (0)
<b>Recaídas y/o reinfecciones</b>			
Recaídas	15 (3,3)	27 (5,8)	40 (9,3)
Reinfecciones	3 (0,66)	6 (1,3)	5 (1,4)

Aunque el porcentaje de curación fue mayor en el P3, el número de casos que requirieron ciclos de tratamiento adicionales también fue mayor, con 30 (7%) pacientes que recibieron un ciclo de tratamiento adicional y 2 pacientes (0,5%) que recibieron tres ciclos de tratamiento, mientras que en el P2 y el P1 sólo 18 (3,9%) y 10 pacientes (2,2%), respectivamente, requirieron un ciclo de tratamiento adicional y un paciente (0,2%) en el P2 requirió tres ciclos de tratamiento. Las reinfecciones y reactivaciones también fueron más frecuentes en el P3; mientras que quince pacientes (3,3%) en el P1 y 27 pacientes (5,8%) en el P2 mostraron reactivaciones; en el P3 se observó reinfección en 40 pacientes (9,3%). El mayor número de reinfecciones se produjo en hombres, con 3 casos (0,66%) en el P1, 6 casos (1,3%) en el P2 y 5 casos (1,4%) en el P3.

La mediana de edad de los pacientes también aumentó, pasando de 21 años en los periodos 1 y 2 a 27 años para el P3. En los tres periodos, el 75% de los pacientes consultaron con una evolución menor o igual a 3 meses. En los tres periodos, el 75% de los pacientes tenían entre 1 y 3 lesiones y el 25% restante tenían 4 o más lesiones.

#### VARIACIONES EN EL NÚMERO DE COPIAS DE GENES ASOCIADOS CON VIRULENCIA

Al comparar los CNV de los genes asociados con virulencia entre los aislados de *L. panamensis* de los tres periodos de estudio, se observó un mayor incremento en el número de copias de los genes evaluados en el P2 en comparación al P1 con aumentos entre 0,8 y 7 copias. Por su parte, los aumentos en el número de copias de los genes asociados con virulencia en el

P3 respecto al P1 oscilaron entre 0,1 y 3,6 y respecto al P2 oscilaron entre 0,1 y 1,8 copias (Tabla 2). Los genes que mostraron aumentos mayores o iguales a 1 copia al comparar los aislados de *L. panamensis* del P2 con los aislados del P1 fueron los genes PHOSP, HISH2B,  $\beta$ -tubulina, HSP83, transportador de pteridina y HISH4. Por su parte, al comparar los aislados de

*L. panamensis* del P3 con los aislados del P1 los genes PHOSP, HISH2B, y HISH4 fueron los que mostraron aumentos mayores o iguales a 1 copia, mientras que en los aislados del P3 en comparación con el P2 solo los genes PHOSP y HISH4 mostraron aumentos mayores o iguales a 1 copia.

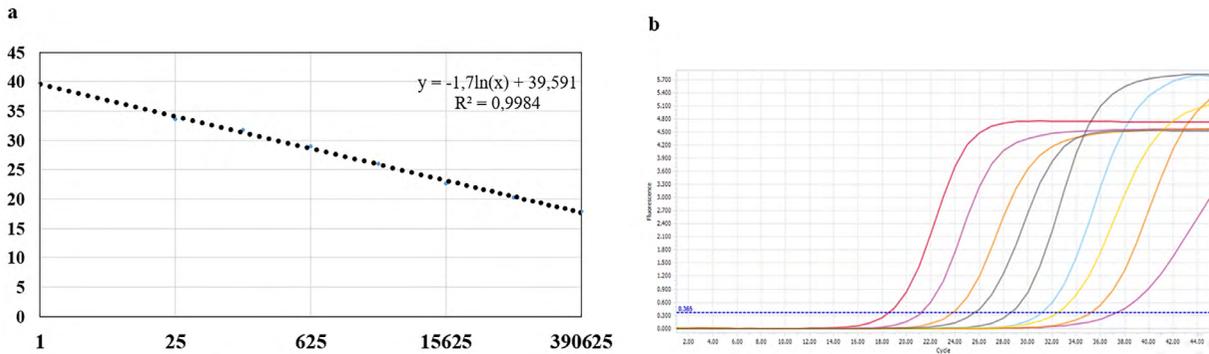
**Tabla 2.** Variaciones en el número de copias de los genes asociados con virulencia en cepas de *Leishmania panamensis*

Gen	Proteína anotada	CNV		
		P2 vs P1	P3 vs P1	P3 vs P2
LpanUA.18.0500	Fosfatasa ácida	7.0	3.6	1.8
LpanUA.09.0180	ATG8	0.9	0.1	0.1
LpanUA.27.2750	Peptidasa de serina	0.8	0.5	0.6
LpanUA.04.0060	Pteridina	1.0	0.2	0.2
LpanUA.33.0340.HSP83-2	Proteína de choque térmico 83	1.1	0.2	0.2
LpanUA.09.1400	Histone 2B	1.4	1.3	0.9
LpanUA.10.0560.GP63-4	gp63	0.8	0.3	0.4
LpanUA.35.0130	Histona H4	1.0	1.0	1.0
LpanUA.33.0960	$\beta$ -tubulina	1.3	0.5	0.4

Los datos representan el número de copias que los genes en estudio aumentaron en entre los periodos de comparación. CNV: variaciones en el número de copias; P1: periodo 1 (cepas de *Leishmania panamensis* aisladas entre 1986 to 1996); P2: periodo 2 (cepas aisladas entre 1997 y 2007); P3: periodo 3 (cepas aisladas entre 2008 y 2018).

El gen PHOSP mostró la mayor variación con aumentos en el número de copias en los 3 periodos evaluados de 7 y 3,6 copias en el P2 y en el P3 en comparación al P1 y de 1,8 copias al comparar el P3 con el P2 (Tabla 2); por su parte, el gen HISH4 mostró aumentos en 1 copia en cada uno de los periodos comparados. El gen HISH2B aumentó el número de copias en los periodos 2 y 3 respecto al P1 en 1,4 y 1,3 copias, respectivamente, mientras que el gen PTR1 y HSP83 aumentaron el número de genes en tan solo

0,2 copias y el gen de la BTUB aumentó el número de copias en 0,5 y 0,4 copias en el P3 respecto al P1 y al P2, respectivamente. Para los genes SERP, ATG8 y GP63 las CNV fueron menores para los periodos 2 y 3 respecto al periodo 1, pasando de 0,8 en el P2 a 0,5 en el P3 con respecto al P1, y a 0,6 en el P3 respecto al P2 (Tabla 2). En la figura 1 se muestra la linealidad de la curva estándar construida, con un  $R^2 =$  de 0,9984 y un límite de detección a partir de 1 parásito.



**Figura 1.** Curva de amplificación del gen de la DNA pol II de *Leishmania panamensis*. A. Curva estándar de amplificación en función de la concentración de parásitos para el gen DNA pol II con una escala logarítmica base 5 y detección desde 1 copia hasta 390.625 copias. B. Curva de amplificación correspondiente a cada punto de la curva estándar construida para el gen DNA pol II.

### Discusión

Las primeras descripciones clínicas de la LC en Colombia datan de 1872, para unas lesiones en la piel llamadas “marranas”, que aparecían en todas las edades, no respetando sexo y siendo frecuente en los agricultores e hipotéticamente se señalaba que eran de naturaleza parasitaria. Para esa época las zonas endémicas se habían circunscrito a los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y Santander. En 1903 se describe como agente etiológico al protozooario del género *Leishmania* y para 1949 ya se hablaba de una amplia distribución en el país de focos de leishmaniasis, especialmente alrededor de las cuencas hidrográficas de los ríos Cauca, Atrato y Magdalena<sup>[17]</sup>.

Hasta antes de los 80’s la LC se consideraba una enfermedad de transmisión selvática que afectaba hombres adultos, en edad laboral activa, quienes se infectaban cuando ingresaban a zonas boscosas por su actividad laboral (madereros, constructores de carreteras, mineros, entre otros)<sup>[18]</sup>. Ya en los años 1983 y 1987 se describieron los primeros focos de LC en el municipio de Montebello, Antioquia<sup>[19]</sup> y San Roque, Antioquia<sup>[20]</sup> (municipios situados en la región andina), siendo en ambos focos la transmisión intra-domicilio.

Si bien este trabajo constituye un valioso aporte a la descripción de los cambios en la historia de la leishmaniasis en el país, es necesario aclarar que por la naturaleza del estudio (siendo este de tipo descriptivo retrospectivo) no se puede aplicar inferencia y se presentan algunas limitaciones que no pueden ser re-

sueltas, tales como el papel de las migraciones en el desarrollo de la enfermedad, la implicaciones de los determinantes sociales y el papel de las actividades humanas sobre la enfermedad; sin embargo, constituye un estudio generador de hipótesis en donde se encontró que similar a lo observado en los años 80s y a lo reportado por otros autores<sup>[21]</sup>, los adultos, especialmente los hombres, continúan siendo la población más afectada por la LC; esto al parecer debido a razones económicas, sociales, culturales y de otro tipo que hacen que los hombres acudan en busca de atención médica mientras que las mujeres y los niños se quedan relegados al manejo empírico de la enfermedad<sup>[22]</sup>.

Contrario a lo observado en estudios previos, en el presente trabajo se encontró que hubo un mayor número de casos en personas realizando actividades laborales en espacios interiores. Adicionalmente, se observó un mayor porcentaje de casos con reinfecciones y reactivaciones, tanto en hombres como en mujeres, al igual que un mayor número de casos de formas más complejas de la enfermedad, como la LM y la LCD en los últimos 10 años, la mayoría en personas que trabajaban en espacios interiores. Estos resultados sugieren que la ocupación podría no ser un factor determinante para el desarrollo de la LC como lo fue descrito en estudios previos<sup>[23]</sup>. Esto podría deberse a cambios en la interacción del ser humano con el ecosistema y por lo tanto con los vectores, muy posiblemente por la adaptación de los vectores a nuevas condiciones ecológicas que favorecen su contacto con el humano y aumentan por lo tanto el riesgo de infección<sup>[24]</sup>. La ocurrencia de

ciclos de transmisión en el intra- y peri-domicilio, además del extra-domicilio, permite que las personas que permanecen en sus hogares tengan un riesgo similar al de las personas que trabajan en ambientes exteriores<sup>[25]</sup>. Aunque la mediana del número de lesiones y el número máximo de lesiones no mostraron variaciones a lo largo del tiempo, si se observó un aumento en el tamaño de las lesiones en los casos con un tiempo de evolución menor o igual a tres meses. El aumento de los casos de leishmaniasis con mayor complejidad en los últimos diez años y el aumento en el tamaño de las lesiones en un menor tiempo de evolución sugieren cambios en la susceptibilidad de los humanos a las infecciones por *L. panamensis* o en la patogenicidad de las cepas del parásito que circulan en Colombia<sup>[6, 7, 26]</sup>.

Así mismo, la ausencia de correlación entre la edad y el sexo con las variables clínicas (forma clínica; número de lesiones; características de la lesión; tamaño de la lesión; tiempo de evolución; historia previa de leishmaniasis; recaída o reinfección) sugiere que la edad y el sexo actualmente no son factores clave en el desarrollo de la LC<sup>[27]</sup>. Por otro lado, la ausencia de correlación entre las variables clínicas y la ocupación sugiere que la ocupación ligada a la exposición no influye en las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Las características, el tamaño de la lesión y el tiempo de evolución no influyeron en la respuesta al tratamiento como tampoco en la necesidad de ciclos adicionales de tratamiento. Sin embargo, el aumento en los últimos 10 años de los casos con reactivación de la enfermedad sugiere una menor eficacia de los fármacos disponibles que puede estar asociada a fallas en la adherencia al tratamiento por parte de los pacientes o a la generación de resistencia a los fármacos en las cepas de *L. panamensis* que circulan actualmente<sup>[28]</sup>, reafirmando la necesidad de desarrollar nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de la LC.

Con el fin de sugerir relaciones entre los cambios en las variables sociodemográficas, clínicas y farmacológicas determinantes de LC y cambios genéticos en cepas de *L. panamensis* causantes de LC, en el presente trabajo se evaluaron posibles cambios en el número de copias de los genes asociados con virulencia PHOSP, ATG8, GP63, PTR1, HSP83, HISH2B, HISH4 y BTUB en 125 cepas de *L. panamensis* aisladas de casos de LC ocurridos entre 1986 y 2018. El gen PHOSP codifica para la fosfatasa ácida, una enzima capaz de

hidrolizar grupos fosfato pertenecientes a otras moléculas y facilita la supervivencia del parásito al interior de la vacuola parasitofora del macrófago<sup>[29]</sup>; la proteína ATG8 participa en la regulación de la autofagia y en el proceso de remodelación celular<sup>[30]</sup>, mientras que el gen GP63 codifica por la leishmanolisina o gp63 que corresponde a una proteína de superficie que interacciona con las proteínas del complemento facilitando la entrada de los promastigotes al macrófago hospedero y por ende, está involucrada en la patogénesis de la leishmaniasis<sup>[29,30]</sup>. Por su parte, la serina proteasa, debido a su actividad peptidasa, está implicada en los procesos de invasión y en la supervivencia del parásito al interior del macrófago<sup>[31]</sup>. Los genes PTR1, HSP83, HISH2B, HISH4 y BTUB codifican proteínas que desempeñan funciones importantes en las células. Así, PTR1, una proteína transportadora en los parásitos, participa en los procesos de diferenciación y virulencia durante la evolución y también podría estar implicada en los mecanismos de resistencia a los fármacos como el antifolato<sup>[32]</sup>; la HSP83 actúa con mecanismos homeostáticos como termorregulador en condiciones de estrés, mientras que las proteínas HISH4 y H2b son histonas presentes en los nucleosomas y, junto con la b-tubulina, actúan como determinantes antigénicos patógenos que corresponden a epítomos únicos a menudo presentes dentro de moléculas citoplasmáticas altamente conservadas<sup>[33]</sup>.

Todos los genes asociados con virulencia evaluados en el presente estudio mostraron aumentos en el número de copias, aumentos que oscilaron entre 0,1 y 7 copias. Sin embargo, el mayor aumento se observó para el gen PHOS P sugiriendo la presencia de cepas más virulentas, ya que se ha evidenciado un aumento significativo de los niveles de fosfatasa ácida en cepas virulentas de diferentes especies de *Leishmania*<sup>[29]</sup>. Así mismo, los mayores cambios en el número de copias para los genes asociados con virulencia se observaron para las cepas de *L. panamensis* aisladas de los casos ocurridos en el P2 y el P3 en relación al P1 en los cuales hubo mayor número de casos de LM y LCD con compromiso mucoso, mayor número de casos con lesiones de mayor tamaño, mayor número de casos que requirieron ciclos de tratamiento adicionales y mayor número de casos con reinfecciones y reactivaciones. Los cambios ocurridos en el tiempo podrían representar una expresión clínica de las variaciones genéticas en

las cepas de *L. panamensis* que actualmente circulan en las zonas de transmisión de la infección.

Estos resultados concuerdan con reportes previos en los cuales el aumento en el número de copias de estos genes se asocia con la expresión de mayor virulencia<sup>[7]</sup>. Por otro lado, el aumento en el número de copias en los genes BTUB y ATG8 podría estar relacionado con mecanismos de resistencia, como se ha reportado en cepas de *L. panamensis* resistentes a los antimoniales pentavalentes<sup>[11,13]</sup>. Así mismo, se han demostrado aumentos en el número de copias en los genes de  $\alpha$ - y  $\beta$ -tubulina, dominio WW/dedo de zinc C-x8-C-x5-C-proteína tipo x3-H, fosfoglicano- $\beta$ -1, 3-galactosil-transferasa, tuzin, factor de elongación 1- $\alpha$ , HSP83, peptidasas, GP63 y ATG8 tanto en las cepas con resistencia natural al antimonio trivalente (SbIII) como en las cepas con resistencia inducida in vitro<sup>[11,13]</sup>. En nuestro estudio, el aumento en el número de reactivaciones independiente del tipo de tratamiento utilizado y el aumento en el número de ciclos de tratamiento adicionales concuerda con esta hipótesis.

### Conclusiones

En el presente estudio se identificaron variaciones genéticas en genes asociados a virulencia en 125 cepas de *L. panamensis* circulando en Colombia en las últimas tres décadas. Aunque estos resultados necesitan ser validados en un número mayor de aislados, la información aquí obtenida complementa la información genómica disponible para *L. panamensis*, una de las dos especies más prevalentes en Colombia y otros países de Centroamérica. Por otra parte, el estudio permitió comparar las características epidemiológicas de los casos de leishmaniasis cutánea y mucosa ocurridos durante ese período, permitiendo así identificar, de manera general, las implicaciones de estos cambios genéticos en el comportamiento de la enfermedad en términos de características clínicas y epidemiológicas de los casos ocurridos durante el período de estudio. Los resultados demuestran los cambios ocurridos en el tiempo para muchas de las características epidemiológicas de la LC, así como las propiedades genéticas de las cepas circulantes de *L. panamensis*.

El aumento del número de copias de los genes evaluados en las cepas de *L. panamensis* procedentes de

casos de LC se relacionaron con cambios en la patogenicidad y la resistencia al tratamiento, evidenciados en la presentación de lesiones más grandes, formas más complejas y graves de la LC, aumento de las reactivaciones y aumento de los ciclos de tratamiento adicional. Sin embargo, es necesario realizar investigaciones adicionales que permitan identificar los mecanismos y las asociaciones entre la genómica de *L. panamensis* y el desarrollo de la LC.

### Conflicto de Interés

Ninguno

### Referencias

1. **Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Janin J, den Boer M**, WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One 2012;7(5):e35671.
2. **Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis & Organización Mundial de la Salud**. Control de las leishmaniasis: Informe Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010.
3. **Pan American Health Organization**. Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas. 2020; 9. Washington, D.C.
4. **Sivigila**. Boletín epidemiológico Semana epidemiológica 53 27 de dic. de 2020 al 2 de enero de 2021. Disponible en [https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2020\\_Boletin\\_epidemiologico\\_semana\\_53.pdf](https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/BoletinEpidemiologico/2020_Boletin_epidemiologico_semana_53.pdf)
5. **Bañuls AL, Hide M, Tibayrenc M**. Molecular epidemiology and evolutionary genetics of *Leishmania* parasites. Int J of Parasitol 1999;29(8): 1137-1147.
6. **Saravia N, Segura I, Holguin AF, Santrich C, Valderrama L, Ocampo C**. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania (Viannia)* in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 1998;59(1):86-94. doi: 10.4269/ajtmh.1998.59.86.
7. **Urrea DA, Duitama J, Imamura H, Álzate JF, Gil J, Muñoz N, Villa JA, Dujardin JC, Ramirez-Pineda JR, Triana-Chavez O**. Genomic Analysis of Colombian *Leishmania panamensis* strains with different level of virulence. Sci Rep. 2018;8(1):17336. DOI: 10.1038/s41598-018-35778-6

8. **Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates PA, Depledge DP, Harris D, Her Y, Herzyk P, Imamura H, Otto TD, Sanders M, Seeger K, Dujardin JC, Berriman M, Smith DF, Hertz-Fowler C, Mottram JC.** Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Res.* 2011;21(12):2129-2142. DOI: 10.1101/gr.122945.111
9. **Reis-Cunha JL, Valdivia HO, Bartholomeu DC.** Gene and Chromosomal Copy Number Variations as an Adaptive Mechanism Towards a Parasitic Lifestyle in Trypanosomatids. *CG.* 2018;19(2):87-97. DOI: 10.2174/1389202918666170911161311
10. **Yasur-Landau D, Jaffe CL, David L, Doron-Faigenboim A, Baneth G.** Resistance of *Leishmania infantum* to allopurinol is associated with chromosome and gene copy number variations including decrease in the S-adenosylmethionine synthetase (METK) gene copy number *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2018;8(3):403-410. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2018.08.002.
11. **Patino LH, Imamura H, Cruz-Saavedra L, Pavia P, Muskus C, Méndez C, Dujardin JC, Ramírez JD.** Major changes in chromosomal copy number, gene expression and gene dosage driven by SbIII in *Leishmania braziliensis* and *Leishmania panamensis*. *Sci Rep.* 2019; 9(1):9485. DOI: 10.1038/s41598-019-45538-9
12. **Ghouila A, Guerfali FZ, Atri C, Bali A, Attia H, Sghaier RM, Mkannez G, Dickens, NJ, Laouini D.** Comparative Genomics of Tunisian *Leishmania major* isolates causing human cutaneous leishmaniasis with contrasting clinical severity *HHS Public Access. Infect Genet Evol.* 2017; 50:110-120. DOI: 10.1016/j.meegid.2016.10.029.
13. **Restrepo CM, Llanes A, Cedeño EM, Chang HJ, Álvarez J, Ríos M, Penagos H, Suárez JA, Leonart R.** Environmental conditions may shape the patterns of genomic variations in *Leishmania panamensis*. *Genes (Basel)* 2019;10(11):838. DOI: 10.3390/genes10110838
14. **Joshi PB, Kelly BL, Kamhawi S, Sacks DL, McMaster WR.** (2002). Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;120(1):33-40. DOI: 10.1016/s0166-6851(01)00432-7
15. **Brittingham A, Morrison CJ, McMaster WR, McGwire BS, Chang KP, Mosser DM.** Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol.* 1995;155(6):3102-11
16. **Salotra P, Ralhan R, Bhatnagar R.** Differential expression of stress proteins in virulent and attenuated promastigotes of *Leishmania donovani*. *Biochem Mol Biol Int.* 1994;33(4):691-7
17. **Puello García MJ.** Leishmaniasis. *Rev fac med.* 1948. 17(7):338-359. Disponible en: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/revfacmed/article/view/30921>
18. **Corredor A, Kreutzer RD, Tesh RB, Boshell J, Palau MT, Caceres E, Duque S, Pelaez D, Rodriguez G, Nichols S, et al.** Distribution and etiology of leishmaniasis in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 1990;42(3):206-14. DOI: 10.4269/ajtmh.1990.42.206.
19. **Vélez ID, Wolff M, Valderrama R, Escobar JP, Osorio L.** Community and environmental risk factors associated with cutaneous leishmaniasis in Montebello, Antioquia, Colombia. In: *Leishmaniasis Control Strategies. A Critical Evaluation of IDRC-Supported Research* (P. Wijeyaratne, T. Goodman & C. Espinal, eds.), 1991; 261-274, Ottawa: Editorial International Development Research Center.
20. **Vélez ID, Ospina S, Jaramillo L.** Epidemiología de la leishmaniasis cutánea en San Roque (Antioquia). *Boletín Epidemiológico de Antioquia* 1987; 12:354-359.
21. **Machado-Alba JE, Machado-Duque ME, Medina-Morales DE.** Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in a Colombian Municipality. *Am J Trop Med Hyg.* 2017; 97(5):1503-1507. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0233.
22. **Velez ID, Hendrickx E, Robledo SM, del Pilar Agudelo S.** Leishmaniasis cutánea en Colombia y género Gender and cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Cad Saude Publica.* 2001; 17(1):171-80. DOI: 10.1590/s0102-311x2001000100018.
23. **Alexander B, Agudelo LA, Navarro JF, Ruiz JF, Molina J, Aguilera G, Klein A, Quiñones, ML.** Relationship between coffee cultivation practices in Colombia and exposure to infection with *Leishmania*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009; 103(12):1263-8. DOI: 10.1016/j.trstmh.2009.04.018.
24. **Ferro C, López M, Fuya P, Lugo L, Cordovez JM, González G.** Spatial distribution of sand fly vectors and eco-epidemiology of cutaneous leishmaniasis transmission in Colombia. *PLoS One.* 2015;10(10):e0139391. DOI: 10.1371/journal.pone.0139391
25. **Gutierrez JD, Martínez-Vega R, Ramoni-Perazzi J, Diaz-Quijano FA, Gutiérrez R, Ruiz FJ, Botello HA, Gil M, González J, Palencia M.** Environmental and socio-economic determinants associated with the occurrence of cutaneous leishmaniasis in the northeast of Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2017; 111(12):564-571. DOI: 10.1093/trstmh/try011.
26. **Barkati S, Ndao M, Libman M.** Cutaneous leishmaniasis in the 21st century: From the laboratory to the bedside. *Curr Opin Infect Dis.* 2019; 32(5):419-425. DOI: 10.1097/QCO.0000000000000579.
27. **Weigle KA, Santrich C, Martinez F, Valderrama L, Saravia NG.** Epidemiology of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: Environmental and Behavioral Risk Factors for Infection, clinical manifestations, and pathogenicity. *J Infect Dis.* 1993; 168(3):709-14. DOI: 10.1093/infdis/168.3.709.

- 28. Capela R, Moreira R, Lopes F.** An overview of drug resistance in protozoal diseases. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 15;20(22):5748. DOI: 10.3390/ijms20225748.
- 29. Soulat D, Bogdan C.** Function of Macrophage and Parasite Phosphatases in Leishmaniasis. *Front Immunol.* 2017; 8:1838. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01838.
- 30. Besteiro S, Williams RAM, Morrison LS, Coombs GH, Mottram JC.** Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. *J Biol Chem.* 2006; 281(16):11384-96. DOI: 10.1074/jbc.M512307200.
- 31. Silva-Almeida M, Pereira BAS, Ribeiro-Guimarães ML, Alves CR.** Proteinases as virulence factors in *Leishmania* spp. infection in mammals. *Parasit Vectors.* 2012; 5:160. DOI: 10.1186/1756-3305-5-160.
- 32. Cunningham ML, Beverley SM.** Pteridine salvage throughout the *Leishmania* infectious cycle: implications for antifolate chemotherapy. *Mol Biochem Parasitol.* 2001; 113(2):199-213. DOI: 10.1016/s0166-6851(01)00213-4.
- 33. Chang KP, McGwire BS.** Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2002;1(1):1. DOI: 10.1186/1475-9292-1-1.