

***Leishmania sp.*: efecto de la glibenclamida, un bloqueador de canales de K^+_{ATP} sobre el ciclo de vida *in vitro*.**

Andrea Orué, José Luis Pérez C., José Fuentes, Imeria Odremán, Xenón Serrano-Martín, Alexis Mendoza-León.

RESUMEN

Estudios previos tanto *in vitro* como *in vivo* en *Leishmania sp.* muestran su gran susceptibilidad a glibenclamida, un bloqueador de canales de K^+_{ATP} recientemente descrito como un inhibidor de la proteína Pgp, la cual está involucrada en el fenotipo de resistencia múltiple a drogas (MDR). En este estudio desarrollamos cultivos de amastigotes axénicos del aislado venezolano *L. (L.) mexicana* M9012 y evaluamos el efecto de la glibenclamida sobre el crecimiento y el proceso de transformación *in vitro* de *Leishmania*. Los resultados muestran que la susceptibilidad de los axénicos a la glibenclamida fue mayor que la de los promastigotes. Líneas de promastigotes resistentes a la droga, genéticamente estables, son afectadas en su crecimiento en condiciones de transformación a amastigotes axénicos; sin embargo, su transformación no parece ser afectada por la droga. La mayor sensibilidad de los axénicos a la droga puede deberse a una remodelación en la membrana, con una mejor exposición de los blancos de la misma.

Palabras clave: *Leishmania*, amastigotes axénicos, resistencia, glibenclamida.

ABSTRACT

***Leishmania spp.*: effect of glibenclamide, a K^+_{ATP} channel blocker, on *in vitro* life cycle.**

Previous *in vitro* and *in vivo* studies showed a high susceptibility of *Leishmania sp.* to glibenclamide, a K^+_{ATP} channel blocker recently described as inhibitor of Pgp protein, which has been related with the multidrug resistant phenotype (MDR). In this study, we developed axenic amastigote cultures of the Venezuelan isolate *L. (L.) mexicana* M9012 and evaluated the effect of glibenclamide on growth and on the *in vitro* transformation of *Leishmania*. The results showed that the susceptibility of axenics to the drug was higher than promastigotes. Growth genetically stable resistant promastigote lines was affected during the transformation to axenic amastigotes; however, the transformations itself was apparently unaffected by the drug. The higher sensitivity of axenics to the drug may be due to remodeling of the membrane, with a better exposure of the drug targets.

Key words: *Leishmania*, axenic amastigotes, resistant, glibenclamide.

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Parásitos. Instituto de Biología Experimental (IBE). Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

Correspondencia: Alexis Mendoza-León. E-mail: amendoza50@cantv.net

Financiamiento: CDCH-UCV Pg030070002007 y A030069912007; FONACIT. La Lic. A Orué es becaria del Programa de Becas del FONACIT.

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad compleja causada por diferentes especies del parásito protozoario *Leishmania*. La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en el mundo y se presenta con un amplio espectro de manifestaciones clínicas, estimándose alrededor de 12 millones de humanos infectados, una incidencia de casos viscerales en humano de 0,5 millones y 2 millones de casos de la forma cutánea de la enfermedad (1,2,3). El tratamiento de la leishmaniasis se lleva a cabo principalmente mediante quimioterapia, a través de la administración de agentes antimoniales pentavalentes. Sin embargo, en los últimos años ha incrementado la demanda de nuevas drogas para el tratamiento de la enfermedad debido a la toxicidad de los antimoniales pentavalentes y al desarrollo y expansión de resistencia a estos agentes (4,5,6). En este sentido, el avance más significativo ha sido la incorporación de la miltefosina, un alquil liso-fosfolípido, como el primer tratamiento oral de la enfermedad, inicialmente utilizado en la forma visceral y posteriormente extendido su uso para la forma cutánea (4); sin embargo, su principal limitación es su teratogenicidad (4,7). Por otro lado, terapias combinadas de drogas han sido utilizadas como excelente alternativa para la prevención y control del desarrollo de resistencia en algunas especies de *Leishmania* (5,8,9).

Leishmania presenta un ciclo de vida digenético, donde se encuentra sometido a un conjunto de condiciones naturales de estrés tanto en el hospedero vertebrado, en su forma intracelular o amastigote, como en el mosquito vector, en su forma flagelada o promastigote. La sobrevivencia del parásito depende de su capacidad en dar respuestas efectivas a tales condiciones de estrés, como por ejemplo su capacidad para adaptarse a ambientes que difieren entre sí en condiciones de temperatura, pH, disponibilidad de nutrientes y osmolaridad, entre otras características. Particularmente, en su forma amastigote, tales propiedades sugieren un rol importante de la membrana celular del parásito en el mantenimiento de la homeostasis celular para su sobrevivencia en el interior de la vacuola parasitófora del macrófago, donde el pH es ácido (10). Esto justifica el estudio de proteínas de membrana implicadas en estructuras relacionadas con sistemas de transporte, tales como canales iónicos, que a su vez pudiesen ser evaluados como potenciales blancos farmacológicos.

Interesados en la evaluación de algunos canales iónicos como potenciales blancos de droga y en el estudio de los posibles mecanismos genéticos y bioquímicos involucrados en el fenómeno de resistencia a drogas, hemos llevado a cabo un estudio del efecto de inhibidores clásicos de canales iónicos sobre el crecimiento y viabilidad de *Leishmania sp.* (11,12). Estudios previos han puesto en evidencia la susceptibilidad de *Leishmania sp.* a glibenclamida, un bloqueador de canales de

K^+ dependientes de ATP (K^+_{ATP}) y de glicoproteína P (Pgp), un miembro del grupo de transportadores del tipo ABC relacionado con el fenotipo MDR (11,12,13). En el caso particular de *L. (L.) major*, la droga afectó la entrada y establecimiento de la infección en el macrófago por parte de promastigotes, al igual que la sobrevivencia del amastigote una vez establecida la infección (12); la droga no mostró ningún efecto sobre la viabilidad y funcionamiento del macrófago. Este efecto parece estar asociado con un incremento de interferón gamma y la estimulación de mecanismos relacionados con una respuesta inmunológica del tipo Th1. Por otro lado, ratones BALB/c infectados por *L. (L.) mexicana* y sometidos a tratamiento con glibenclamida (80 mg/kg/día) mostraron una reducción significativa de las lesiones (14). En este estudio desarrollamos cultivos de amastigotes axénicos del aislado venezolano *L. (L.) mexicana* M9012 y evaluamos el efecto de la glibenclamida sobre el crecimiento y el proceso de transformación *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos: los reactivos utilizados en el estudio son de grado biología molecular o una calidad similar y provienen en su mayoría de la casa comercial SIGMA. La glibenclamida (Gb) se obtuvo de Research Biochemical International (Natick Mass., USA) y se preparó de acuerdo a lo descrito previamente (12).

Parásitos: el aislado venezolano *L. (L.) mexicana* (MHOM/VE/90/LCP9012), obtenido a partir de una lesión cutánea de un paciente en el Estado Táchira (14) fue utilizado en todo el estudio. Los promastigotes de la cepa M9012 fueron cultivados a temperatura ambiente en medio Schneider's *Drosophila* ajustado a pH 7,2; suplementado con suero fetal de bovino al 10 % (GIBCO) y kanamicina a una concentración de 50 µg/ml (SIGMA). El crecimiento de los parásitos fue cuantificado diariamente mediante conteo directo en cámara de Neubauer.

Cultivo de amastigotes axénicos: los promastigotes fueron sometidos a transformación mediante choque térmico y cambios de pH. En una primera etapa, un inóculo inicial de 1×10^6 promastigotes/mL cultivado en medio Schneider's *Drosophila* a pH 7,2 se colocó en frascos de cultivo de 25 mL, que contenían 3 mL de medio a pH 6,0 suplementado con 20% de suero fetal bovino, a temperatura ambiente durante 48 h. En una segunda etapa, un inóculo de 1×10^5 promastigotes/mL de este último cultivo se colocó en un frasco de cultivo de 150 mL que contenía 5 mL de medio fresco a pH 6,0 y 20% de suero fetal bovino y se incubó a una temperatura de 33 °C; luego de 24 h fue posible observar formas redondeadas y a partir del tercer día la población mostró pérdida total del flagelo, reducción de tamaño y una morfología redondeada, características propias de la forma amastigote. Estos parásitos son considerados como la forma axénica de amastigotes y como tal se utilizaron en este trabajo. Al quinto día de incubación se realizó el primer pasaje del cultivo de amastigotes axénicos, utilizando una dilución 1:2 en medio fresco previamente preincubado a 33°C. A partir de este cultivo se obtuvieron los amastigotes axénicos para posteriores experimentos, partiendo de un inóculo inicial de $2,5 \times 10^6$ amastigotes axénicos/mL para un volumen de 5 mL.

Susceptibilidad a glibenclamida: promastigotes de *L. (L.) mexicana* Gb^s se cultivaron en presencia y ausencia de Gb, utilizando un inóculo inicial de 1×10^6 promastigotes/mL, y su

crecimiento fue seguido de acuerdo a lo descrito previamente. El efecto de la droga sobre el crecimiento se expresó como el porcentaje de la densidad de parásitos obtenidos en cada concentración de droga utilizada, respecto a la densidad de parásitos en el cultivo control en ausencia de la droga luego de 72 h de crecimiento. Estos valores se utilizaron para la construcción de una curva dosis-respuesta y a partir de ella estimar la concentración efectiva de la droga inhibitoria del 50 % del crecimiento de los parásitos (IC_{50}) mediante interpolación lineal (15).

Selección de promastigotes resistentes a glibenclamida: los promastigotes (1×10^6 cel/mL) fueron incubados en un rango de concentraciones de glibenclamida de 10, 25, 50 y 100 µM durante 5 días, al cabo de los cuales fueron pasados a medio fresco, manteniendo siempre la misma concentración de droga. El crecimiento de los parásitos fue cuantificado diariamente, mediante el conteo directo en cámara de Neubauer, realizando tres réplicas independientes para cada condición. Los parásitos fueron considerados resistentes (Gb^r) al alcanzar en presencia de la droga, el mismo crecimiento de aquellos Gb^s en ausencia de la droga.

Evaluación de la resistencia a glibenclamida durante el proceso de transformación: promastigotes resistentes a concentraciones de Gb de 50 µM (Gb^{r50}) y 100 µM (Gb^{r100}) fueron transformados a amastigotes axénicos, de acuerdo al protocolo descrito previamente. En ambos casos, los promastigotes fueron colocados en ausencia de la droga (0 µM) y a la misma concentración de droga a la cual fueron seleccionados (50 y 100 µM) en medio de cultivo previamente ajustado a pH 6,0 y 33°C. El crecimiento fue seguido diariamente mediante el conteo directo de los parásitos en cámara de Neubauer, y se realizaron tres réplicas independientes para cada condición.

Viabilidad: la determinación de viabilidad se llevó a cabo empleando naranja de acridina (1,44 mg/mL). Para ello, un volumen de 5 µL de un cultivo de parásitos en fase logarítmica de crecimiento fue colocado sobre un portaobjeto y se añadieron 2µL de la solución de naranja de acridina; seguidamente, estos parásitos se observaron en un microscopio de fluorescencia ECLIPSE E400 (Nikon YFL), empleando un filtro de longitud de onda integrado (Dapi, FITC y rojo texas: D.F.T)

RESULTADOS

Susceptibilidad de promastigotes de *L. (L.) mexicana* a glibenclamida. Promastigotes Gb^s provenientes de la transformación de amastigotes obtenidos de lesiones de ratón y colocados en medio de cultivo Schneider's *Drosophila*, se utilizaron para evaluar su crecimiento en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de glibenclamida. Los resultados mostraron que promastigotes de *L. (L.) mexicana* fueron extremadamente susceptible a la droga y el efecto resultó ser dosis dependiente (Fig. 1A), con un IC_{50} de $54,1 \pm 1,0$ µM (Fig. 1B). Posteriormente, se seleccionaron líneas de promastigotes resistentes a glibenclamida (Gb^r), mediante crecimiento de promastigotes Gb^s a una concentración fija de droga; utilizando una línea seleccionada a 50 µM Gb (Gb^{r50}) se evaluó la infectividad y estabilidad genética de dicha resistencia. Los resultados mostraron que la línea Gb^{r50} fue capaz de producir lesiones típicas en ratones BALB/c en ausencia de la droga y los promastigotes Gb^{r50} aislados a partir de las lesiones fueron capaces de alcanzar, en presencia de 50 µM glibenclamida, un crecimiento similar

Figura 1.

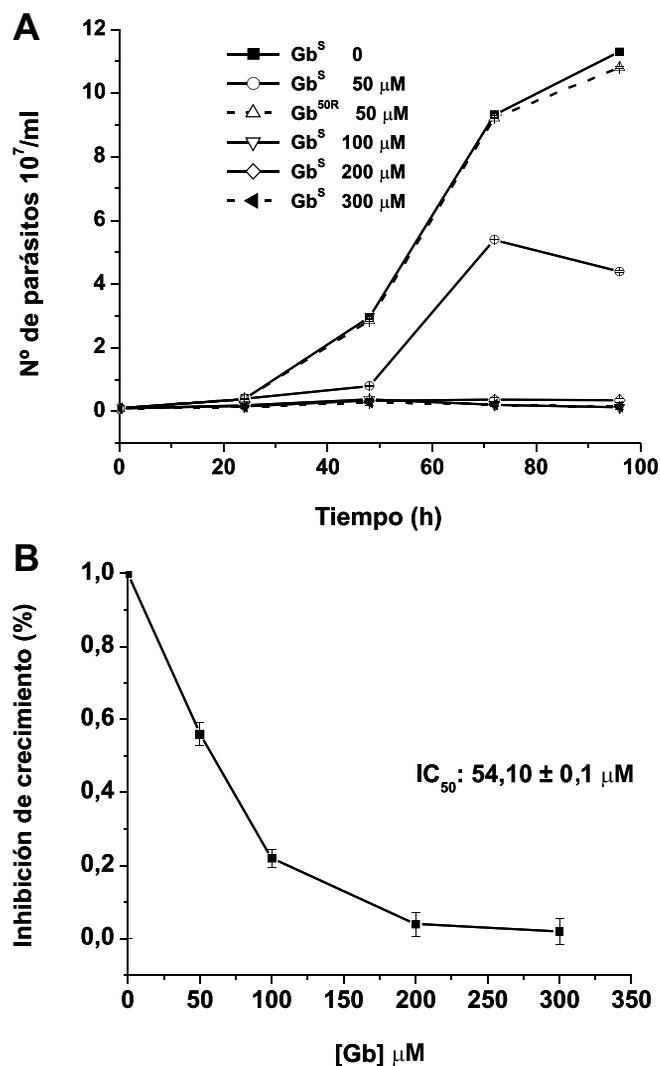


Figura 1: Susceptibilidad de promastigotes de *L. (L.) mexicana* a glibenclamida. Un inóculo de 1×10^6 promastigotes de *L. (L.) mexicana* M9012 sensible a glibenclamida, Gb^s, e igual inóculo de una línea resistente seleccionada a 50 μM glibenclamida, Gb⁵⁰, fueron inoculados en ratones BALB/c. Una vez establecida la lesión, los amastigotes fueron aislados y transformados a promastigotes en medio Schneider's *Drosophila* como se describe en Materiales y Métodos. (A) Curvas representativas del crecimiento de promastigotes Gb^s y Gb⁵⁰ en presencia de diferentes concentraciones de glibenclamida (■: 0; ●: 50; ▼: 100; ◆: 200; y ▲: 300 μM) y Gb⁵⁰ (△: 50 μM). (B) Efecto de la glibenclamida sobre la viabilidad de Gb^s. Los datos se presentan como la media ± error estándar de la media (barras) de 6 replicas. El valor IC₅₀ = 54,3 ± 1,0 μM se obtuvo por el método de interpolación lineal de Huber y Koella (15).

al de promastigotes Gb^s en ausencia de la droga, sugiriendo una gran estabilidad del fenotipo de resistencia (Fig. 1A).

Transformación de *L. (L.) mexicana* y resistencia a glibenclamida. El proceso de transformación fue analizado en términos del crecimiento y viabilidad de los parásitos (Fig. 2). Los resultados muestran un crecimiento similar en aquellos parásitos Gb^s mantenidos a temperatura ambiente y un pH del medio de cultivo de 7,2 ó 6,0 (Fig. 2A) y una evaluación de la morfología de los parásitos mostró que la misma no sufrió efecto alguno, encontrándose en ambas condiciones la forma típica de promastigotes; sin embargo, es notoria la forma redondeada de los promastigotes mantenidos a pH 6,0 (Fig. 2B). Cuando los parásitos se cultivaron a pH 6,0 y 33°C se produjo una reducción significativa del crecimiento (Fig. 2A) y un cambio en su morfología a una forma

redondeada carente de flagelo (Fig. 2B), típica de los amastigotes axénicos.

Figura 2.

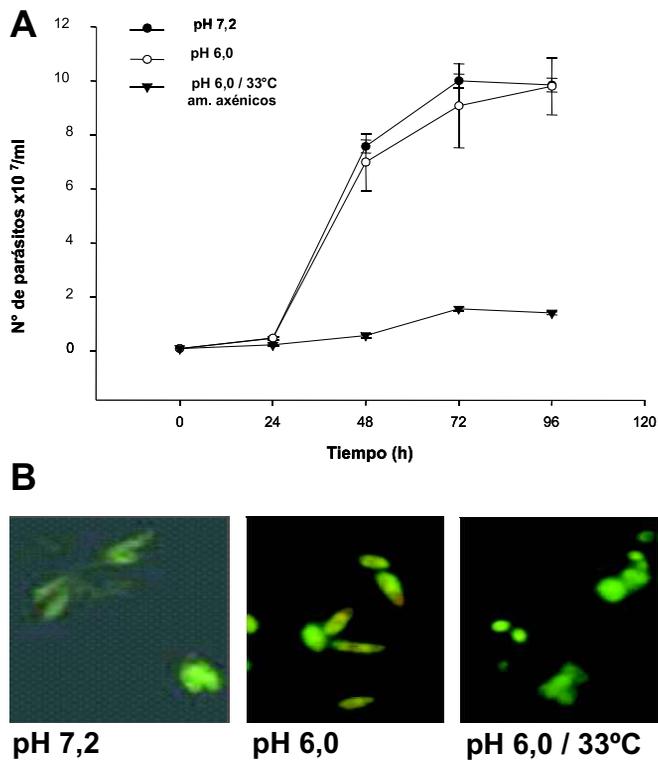


Figura 2: Transformación *in vitro* de *L. (L.) mexicana*. Un inóculo de 1×10^6 promastigotes de *L. (L.) mexicana* M9012 sensible a glibenclamida, Gb^s, fue colocado en medio Schneider's *Drosophila* e incubados en condiciones de transformación como se describe en Materiales y Métodos. (A) Crecimiento de promastigotes Gb^s bajo las condiciones de pH 7,2 (●) y pH 6,0 (○) a temperatura ambiente, y amastigotes axénicos (pH 6,0 a 33°C) (▼). (B) Morfología y viabilidad de promastigotes Gb^s a pH 7,2 y 6,0 a temperatura ambiente, y amastigotes axénicos (pH 6,0 / 33°C).

Una vez establecido el sistema, los promastigotes Gb^s y aquellos seleccionados como resistentes a una concentración de glibenclamida de 50 μM (Gb⁵⁰) y 100 μM (Gb¹⁰⁰) respectivamente (Fig. 3A), se utilizaron para comparar su crecimiento y transformación en presencia y ausencia de la droga. En comparación con Gb^s, el crecimiento de los promastigotes Gb⁵⁰ y Gb¹⁰⁰ cultivados a pH 6,0 en presencia de la misma concentración de glibenclamida a la cual fueron seleccionados, mostró una reducción de un 30 al 40% entre las 48 y 96 h (Fig. 3B); sin embargo, bajo las mismas condiciones pero en ausencia de la droga estos cultivos (Gb⁵⁰ y Gb¹⁰⁰) mostraron un crecimiento similar al obtenido a pH 7,2 y al de aquellos Gb^s cultivados a pH 6,0 (Fig. 3B). Sorpresivo resultado lo observado bajo condiciones de pH 6,0 y una temperatura de 33°C, donde hay un crecimiento limitado para Gb^s, Gb⁵⁰ y Gb¹⁰⁰ en ausencia de la droga, al igual que un crecimiento no significativo para Gb⁵⁰ y Gb¹⁰⁰ (no mostrado) a 25 μM glibenclamida (Fig. 3C), la cual es una concentración muy por debajo de la utilizada en su selección (50 μM).

Los parásitos tanto en ausencia como a 25 μM glibenclamida, mantienen la capacidad de transformarse a amastigotes axénicos (Fig. 3D). Estos resultados sugieren un incremento de la susceptibilidad a la droga por parte de los amastigotes axénicos. La viabilidad de los parásitos, tanto resistentes como sensibles, bajo estas condiciones se encontró

extremadamente comprometida a concentración de glibenclamida superiores a las utilizadas (resultados no mostrados).

Figura 3.

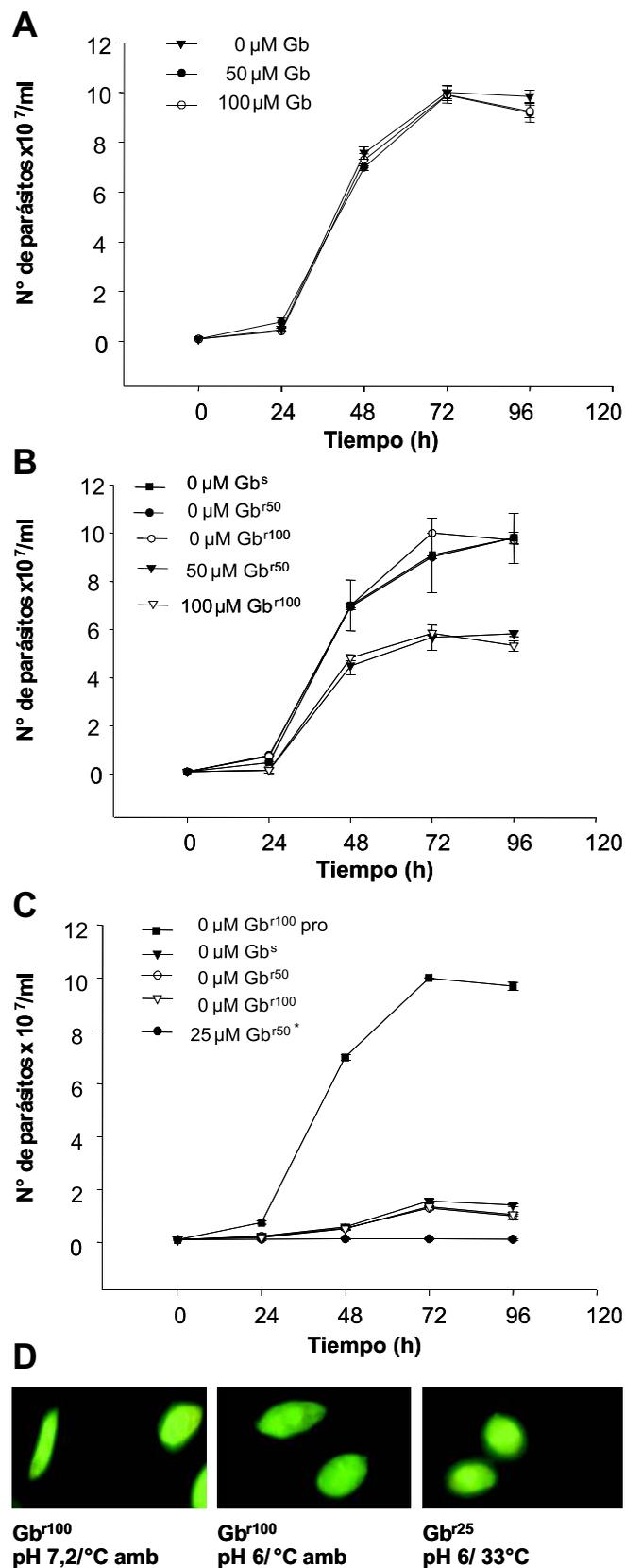


Figura 3: Transformación de *L. (L.) mexicana* y resistencia a glibenclamida. Un inóculo de 1×10^5 promastigotes de *L. (L.) mexicana* M9012 sensibles (Gb^s) y resistentes (Gb^{50} y Gb^{100}) a glibenclamida, fueron inoculados en medio Schneider's *Drosophila*, en ausencia y presencia de glibenclamida, y se llevó a cabo un seguimiento de su crecimiento y transformación a amastigotes axénicos como se describe en Materiales y Métodos. Curvas representativas del crecimiento en medio Schneider's *Drosophila* a pH y temperatura seleccionada, fueron obtenidas por conteo directo en cámara de Neubauer. (A) pH 7,2 / 25 °C, promastigotes Gb^s (∇ : 0 μM Gb), Gb^{50} (\bullet : 50 μM Gb) y Gb^{100} (\circ : 100 μM Gb). (B) pH 6,0 / 25 °C, promastigotes Gb^s (\blacksquare : 0 μM Gb), Gb^{50} (\bullet : 0 μM Gb y ∇ : 50 μM Gb) y Gb^{100} (\circ : 0 μM Gb y ∇ : 100 μM Gb). (C) pH 6,0 / 33 °C, promastigotes Gb^s (∇ : 0 μM Gb), Gb^{50} (\circ : 0 μM Gb; \bullet : 25 μM Gb) y Gb^{100} (∇ : 0 μM Gb). Como referencia para la construcción de la gráfica se utilizaron los valores obtenidos para promastigotes Gb^{100} crecidos a pH 7,2 / 25 °C (\blacksquare : 0 μM Gb). (D) Morfología y viabilidad de promastigotes Gb^{100} a pH 7,2 y 6,0 y temperatura ambiente y de amastigotes axénicos Gb^{50} (Gb 25 μM).

DISCUSIÓN

La toxicidad de los compuestos antimoniales, así como el desarrollo y expansión de resistencia a estos compuestos, ha generado una necesidad urgente de desarrollo y evaluación de nuevas drogas, y la identificación de nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de la leishmaniasis. La variabilidad genética tanto del parásito *Leishmania sp.* como de la población humana en riesgo influyen de la diversidad en la respuesta inmunológica, así como en la farmacocinética y farmacodinámica de las drogas y, en general, en la quimioterapéutica anti-leishmania. Tomando en cuenta el rol de la membrana celular en la homeostasis de estos parásitos e interesados en el estudio de los mecanismos genéticos y bioquímicos involucrados en el fenotipo de resistencia a drogas en *Leishmania sp.*, evaluamos el efecto de glibenclamida sobre el crecimiento y transformación de promastigotes a amastigotes axénicos. Los resultados de los ensayos presentados en este estudio, muestran un efecto diferencial de la glibenclamida sobre el crecimiento de promastigotes y amastigotes axénicos de *L. (L.) mexicana* M9012, encontrándose que estos últimos parecen ser más susceptibles a la droga ($IC_{50} < 10,0 \mu\text{M}$, resultados no mostrados). Resultados similares se han obtenido utilizando otras drogas, tales como glucantime que parece ser específico para el estadio amastigote. Sin embargo, se han obtenido resultados controversiales relacionados con diferencias en la sensibilidad de distintas especies de *Leishmania sp.* a glucantime (4,16,17). Podría especularse que tal diferencia en susceptibilidad a la droga entre promastigotes y amastigotes se deba a modificaciones bioquímicas y fisicoquímicas que ocurren en la superficie del parásito durante el proceso de transformación, debido a la variación de pH y el choque térmico, con una mayor o mejor exposición de los blancos de acción de la droga en la forma amastigote en comparación con la forma promastigote. No necesariamente los blancos tienen que ser los canales de K^+_{ATP} en *Leishmania sp.* la evidencia de la existencia de estos canales es indirecta (18). Estudios previos muestran la existencia de modificaciones diferenciales importantes de la superficie del parásito en ambos estadios, ejemplos de ello lo constituyen la aglutinación diferencial con algunas lectinas (19) y los cambios que ocurren en la composición de esteroides de amastigotes resistentes a la anfotericina B (20).

La selección de resistentes a glibenclamida, permitió evaluar el efecto de la droga sobre su crecimiento y transformación de estos parásitos. Las líneas resistentes fueron capaces de crecer en la respectiva concentración de glibenclamida a la cual fueron seleccionadas (50 ó 100 M) y en condiciones de cultivo a pH 7,2. Sorprendente fue la necesidad de disminuir la concentración de la glibenclamida por debajo de la concentración utilizada en la selección inicial, para generar los amastigotes axénicos a partir de las líneas resistentes Gb^{50} y Gb^{100} ; tales concentraciones disminuyeron en un 50 % el

crecimiento de estas líneas resistentes a pH 6,0/25 °C sin afectar su viabilidad y causan la muerte de estos parásito a pH 6,0/33 °C. La transformación a axénicos de las líneas resistentes sólo fue posible en ausencia de la droga o a 25 µM glibenclamida, donde no se afectó la viabilidad de los parásitos; sin embargo, después de 120 h no se evidenció multiplicación de los amastigotes axénicos generados. Esto podría sugerir inestabilidad en la retención del fenotipo inicial de resistencia después de completar el ciclo de vida (promastigote a axénico) o una adaptación de la resistencia inicial. No obstante, el hecho de pasar los promastigotes Gb^{rs0} por animales experimentales y demostrar que se pueden obtener y mantener de nuevo las líneas resistentes a partir de lesiones de estos animales sugiere que el fenotipo de resistencia es genéticamente estable. Por otro lado, en experimentos preliminares, hemos detectado que cuando los amastigotes axénicos se colocan en condiciones de transformación a promastigotes, el fenotipo de resistencia revierte a su condición original, es decir, los parásitos resultantes recuperan su crecimiento a 50 y 100 µM glibenclamida, según haya sido la concentración utilizada para la selección (resultados no mostrados). La remodelación de componentes de la membrana del parásito podría explicar tanto la pérdida como la recuperación del fenotipo de resistencia. Diferencias en la estabilidad de la resistencia inducida a diferentes concentraciones de pentamidina en amastigotes axénicos, luego de su transformación a promastigotes, han sido descritas en *L. (L.) mexicana* M379; tales diferencias se han asociado a una modulación de la resistencia durante el ciclo de vida del parásito (21). Tomando en cuenta el desconocimiento del mecanismo de acción de la glibenclamida en *Leishmania sp.*, se adelantan experimentos para obtener el perfil proteómico tanto de promastigotes como de amastigotes axénicos sensibles y resistentes, a fin de establecer diferencias en dichos perfiles e identificar potenciales blancos de la droga. En resumen, en este trabajo se establecieron condiciones para la transformación de promastigotes del aislado venezolano *L. (L.) mexicana* M9012 a amastigotes axénicos; la susceptibilidad de los axénicos a la glibenclamida fue mayor que la de los promastigotes. La transformación de líneas resistentes a la droga, genéticamente estable, no parece ser afectada por la droga, aunque en condiciones de transformación la droga claramente afecta la tasa de crecimiento de los parásitos.

AGRADECIMIENTOS. A la Dra. A. Herrera y Dra. E. Valdívieso por la lectura, corrección y sugerencias al trabajo. A la Dra. C. Hernández por su ayuda en las pruebas de viabilidad.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. In: www.who.int/tdr/diseases/leish/diseaseinfo.htm
2. Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. Trends in Parasitol 2006; 22:552-557.
3. Mendoza-León A, Shaw JJ, Tapia FJ. A guide for the cutaneous leishmaniasis connoisseur. In: Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Sánchez MA, editores. Molecular and Immune Mechanisms in the Pathogenesis of Cutaneous Leishmaniasis. RG Landes Biosciences Publishers. Austin, Texas. 1996; p.1-23.
4. Croft SL, Sundar Sh, Fairlamb A. Drug resistance in Leishmaniasis. Clin Microbiol. Rev 2006; 19:111-126.
5. Croft SL, Barrett MP, Urbina JU. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. Trends in Parasitol 2005; 21:508-512.
6. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search fo novel drugs. Trends in Parasitol 2003; 19:502-508.
7. Croft SL. Antiprotozoal activity of phospholipids analoges. Mol Biochem Parasitol 2003; 126:165-172.
8. Alvar J, Croft S, Olliaro P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. A Parasitol 2006; 61:227-279.
9. Davis AJ, Murray HW, Handman E. Drug against leishmaniasis: a synergy of technology and partnerships. Trends in Parasitol 2004; 20:73-76.
10. Antoine JC, Prina E, Lang T, Courret N. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. Trends in Microbiol 1998; 7:392-401.
11. Ponte-Sucre A, Mendoza-León A, Moll H. Experimental leishmaniasis: synergistic effect of ion channel blockers and interferon-γ on the clearance of *Leishmania major* by macrophages. Parasitol Res 2001; 87:27-31.
12. Ponte-Sucre A, Campos Y, Fernandez M, Moll H, Mendoza-León A. *Leishmania sp.*: Growth and survival are impaired by ion channel blockers. Exp Parasitol 1998; 88:11-19.
13. Golstein PE, Boom A, van Geffel J, Jacobs P, Masereel B, Beauwens R. P-glycoprotein inhibition by glibenclamide and related compounds. Pflügers Arch-Eur J Physiol 1999; 437:652-660.
14. Serrano-Martín X, Payares G, Mendoza-León A. Glibenclamide, a blocker of K⁺ATP channels, shows antileishmanial activity in experimental murine cutaneous leishmaniasis. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50:4214-4216.
15. Huber W, Koella J. A comparison of three methods of estimating EC50 in studies of drug resistance in malaria parasites. Acta Tropica 1993; 55:257-261.
16. Callahan HL, Portal AC, Devereaux R, Grogl M. An axenic system for drug screening. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:818-822.
17. Berman D, Edwards N, King M, Grogl M. Biochemistry of Pentostam resistant Leishmania. Am. Trop. Med- Hyg. 1989; 40:159-164.
18. DiFranco M, Villarroel A, Ponte-Sucre A, Quiñonez M, Drujan D, Dagger F. Incorporation of ion channels from the plasma membrane of *L. mexicana* into planar bilayers. Acta Científica Venezolana 1995; 46:206-207.
19. DaSilva R, Sack DL. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigotes virulence and attenuation. Inf and Immunol 1987; 55:2802-2806.
20. 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.
21. Sereno D, Lemesre JL. In vitro life cycle of pentamidine-resistant amastigotes: stability of the chemoresistant phenotypes is dependent on the level of resistant induced. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:1898-1903.