

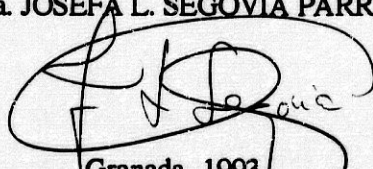
UNIVERSIDAD DE GRANADA  
INSTITUTO DE PARASITOLOGIA Y BIOMEDICINA LOPEZ-NEYRA  
C.S.I.C.

**ALTERACION DEL TRANSPORTE Y FENOTIPO DE  
MULTIRRESISTENCIA EN *Leishmania tropica* (LRC-L39)  
RESISTENTE A METOTREXATO.**

Memoria que presenta la Licenciada  
Ma VICTORIA AMADOR TRUJILLO para  
optar al grado de Doctor en Farmacia.

Directores:  
Dr. FRANCISCO GAMARRO CONDE      Dr. SANTIAGO CASTANY S CUELLO

Ponente:  
Dra. JOSEFA L. SEGOVIA PARRA



Granada, 1993.

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
INSTITUTO DE PARASITOLOGIA Y BIOMEDICINA LOPEZ-NEYRA  
C.S.I.C.

TESIS DOCTORAL

**ALTERACION DEL TRANSPORTE Y  
FENOTIPO DE MULTIRRESISTENCIA  
EN *Leishmania tropica* (LRC-L39)  
RESISTENTE A METOTREXATO.**

MARIA VICTORIA AMADOR TRUJILLO

Granada, 1993.

*El presente trabajo ha sido realizado en los laboratorios del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" (C.S.I.C.), bajo la dirección de los Doctores Francisco Gamarro Conde y Santiago Castanys Cuello.*

**Deseo expresar mi más sincero agradecimiento:**

**A los Drs. Francisco Gamarro y Santiago Castanys, por la dirección de la presente Tesis, así como por sus respectivas ayudas, que me han permitido superar las dificultades encontradas a lo largo de su realización.**

**A los Drs. Luis Miguel Ruiz y M<sup>a</sup> Dolores González, por la ayuda y consejo prestado en los estudios de separación cromosómica.**

**A la Dra. Josefa L. Segovia, por la atención que me ha prestado, siempre que he necesitado su colaboración y la del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.**

**Al Dr. Guy Bauw, por su desinteresada orientación en algunos capítulos de esta Tesis, durante mi estancia en el Departamento de Genética de la Universidad Estatal de Gante (Bélgica).**

**A mis amigos M<sup>a</sup> Jesús, Esther, Rosalía y Jose Antonio, así como al resto de compañeros del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra".**

**A mis hermanos y a mi amiga Milagros, por la colaboración prestada en mi trabajo informático.**

**Al Dr. Eduardo Ortega, así como a mis amigas Encarna y Carmen por sus inestimables ayudas en la elaboración de las diapositivas.**

*A Carlos y a nuestros padres.*

***INDICE***

|   | <u>Página</u> |
|---|---------------|
| <b>1.- INTRODUCCION</b>   | <b>1</b>      |
| 1.1.- Generalidades sobre <u>Leishmania</u> .   | 1             |
| 1.2.- Mecanismos de resistencia.  | 7             |
| 1.2.1.- Amplificación génica. Elementos<br>extracromosomales.                                       | 12            |
| 1.2.2.- Alteraciones estructurales y funcionales<br>en la proteína blanco de acción del<br>fármaco. | 18            |
| 1.2.3.- Alteración del transporte de fármacos.  | 20            |
| 1.2.4.- Multirresistencia a fármacos.<br>Generalidades.   | 24            |
| 1.2.4.1.- MDR en <u>Leishmania</u> .  | 31            |
| <b>2.- OBJETIVOS</b>  | <b>36</b>     |
| <b>3.- MATERIAL Y METODOS</b>   | <b>38</b>     |
| 3.1.- Parásitos y mantenimiento de cultivos.  | 38            |
| 3.2.- Fármacos y sustancias químicas empleadas.   | 40            |
| 3.3.- Adaptación y cultivo de los parásitos.  | 42            |
| 3.4.- Inducción de resistencia a Metotrexato.   | 43            |
| 3.5.- Clonaje en placa.   | 45            |
| 3.6.- Estudio de la resistencia cruzada a otros<br>fármacos y sustancias químicas.                  | 46            |
| 3.7.- Estudio de la reversión de resistencia en<br>la línea MTX-R1000.                              | 48            |
| 3.8.- Transporte de Metotrexato. Acúmulo y eflujo.<br>Parámetros cinéticos del transporte.          | 49            |

|   |    |
|---|----|
| 3.8.1.- Estudio de la captación de fármaco<br>por los parásitos.      | 49 |
| 3.8.2.- Estudio de la cinética del influjo de<br>fármaco.             | 50 |
| 3.8.3.- Estudio del eflujo de fármaco.                                | 52 |
| 3.9.- Estudio del patrón de proteínas.                                | 54 |
| 3.9.1.- Electroforesis de proteínas.                                  | 54 |
| 3.9.2.- Marcaje de proteínas con metionina-<br>-[ <sup>35</sup> S].   | 56 |
| 3.9.3.- Obtención de proteínas totales,<br>citosólicas y de membrana. | 56 |
| 3.9.4.- Geles de poliacrilamida-SDS.                                  | 57 |
| 3.9.5.- Electroforesis bidimensional.                                 | 58 |
| 3.9.5.1.- Extracción de proteínas totales.                            | 58 |
| 3.9.5.2.- Primera dimensión:<br>Isoelectroenfoque. (IEF).             | 59 |
| 3.9.5.3.- Segunda dimensión:<br>Electroforesis SDS-PAGE.              | 60 |
| 3.9.5.4.- Electrotransferencia a membrana.                            | 60 |
| 3.9.6.- Western Blot.   | 61 |
| 3.9.7.- Microsecuenciación de la proteína de<br>membrana de 240 kDa.  | 62 |
| 3.10.- Acidos nucleicos.  | 65 |
| 3.10.1.- Estudio de ADN.  | 65 |
| 3.10.1.1.- Aislamiento de ADN.  | 65 |



|   |           |
|---|-----------|
| 3.10.1.2.- Digestión de ADN con endonucleasas de restricción.                                   | 67        |
| 3.10.1.3.- Electroforesis de ADN.   | 67        |
| 3.10.1.4.- Transferencia e inmovilización de ADN a soportes sólidos. "Southern-Blot".           | 68        |
| 3.10.1.5.- Características de las sondas empleadas.   | 69        |
| 3.10.1.6.- Aislamiento de ADN plasmídico.   | 71        |
| 3.10.1.7.- Marcaje radiactivo de las sondas.  | 72        |
| 3.10.1.8.- Hibridación del ADN con sondas.  | 74        |
| 3.10.2.- Estudio de ARN.  | 75        |
| 3.10.2.1.- Aislamiento de ARN.  | 75        |
| 3.10.2.2.- Aislamiento de ARN POLY A+.  | 76        |
| 3.10.2.3.- Electroforesis de ARN.   | 77        |
| 3.10.2.4.- Transferencia de ARN a soporte sólido. "Northern Blot".                              | 78        |
| 3.10.2.5.- Hibridación del ARN con sondas.  | 79        |
| 3.10.3.- Localización cromosomal.   | 79        |
| 3.10.3.1.- Preparación de los bloques de agarosa.   | 79        |
| 3.10.3.2.- Electroforesis en campo pulsante. Chef.  | 81        |
| <b>4.- RESULTADOS</b>   | <b>82</b> |
| 4.1.- Inducción, selección y estabilidad de <u>L. tropica</u> resistente <u>in vitro</u> a MTX. | 82        |

|   |         |
|---|---------|
| 4.2.- Resistencia cruzada a otros fármacos y sustancias químicas.   | 87      |
| 4.3.- Estudio del transporte del MTX.   | 94      |
| 4.4.- Cambios en el patrón de proteínas en <u>L. tropica</u> MTX-R1000.                                     | 101     |
| 4.4.1.- Microsecuenciación de la proteína de membrana de 240 kDa sobreexpresada en los parásitos MTX-R1000. | 111     |
| 4.5.- Sobreexpresión de un gen homólogo al gen ltpgpE en <u>L. tropica</u> .                                | 115     |
| 4.6.- Análisis mediante Southern Blot del gen pgpE.   | 117     |
| 4.7.- Localización cromosomal del gen pgpE.   | 120     |
| <br>5.- DISCUSION   | <br>122 |
| 5.1.- Inducción, selección y estabilidad de <u>L. tropica</u> resistente <u>in vitro</u> a MTX.             | 122     |
| 5.2.- Multirresistencia a fármacos en <u>L. tropica</u> .   | 126     |
| 5.3.- Alteración del transporte de MTX en <u>L. tropica</u> .   | 132     |
| 5.4.- Cambios en el patrón de proteínas en <u>L. tropica</u> MTX-R1000.                                     | 138     |
| 5.5.- Sobreexpresión de un gen homólogo al gen ltpgpE en <u>L. tropica</u> .                                | 143     |
| <br>6.- CONCLUSIONES  | <br>146 |
| <br>7.- BIBLIOGRAFIA  | <br>148 |

# ***1. INTRODUCCION***

1.1.- GENERALIDADES SOBRE LEISHMANIA.

El género Leishmania constituye un grupo de protozoos flagelados pertenecientes a la familia Trypanosomatidae. Son organismos unicelulares caracterizados por poseer un único flagelo y por su típico ADN mitocondrial denominado Kinetoplasto. Estos parásitos, son los causantes de la afección parasitaria denominada Leishmaniasis.

La leishmania puede encontrarse bien como forma flagelada, extracelular, denominada forma promastigota, en el tracto digestivo del vector, o bien como forma carente de flagelo e intracelular denominada forma amastigota, en los macrófagos del hospedador vertebrado. Estos parásitos son transmitidos bajo la forma promastigota por la picadura de un insecto vector que pertenece a diferentes especies del género Phlebotomus en Europa, Asia, y Africa, mientras que en Iberoamérica pertenecen a las especies del género Lutzomia y Psychodopygus. Una vez dentro del huésped, los parásitos son fagocitados por los macrófagos, diferenciándose intracelularmente a formas amastigotas. Estas formas se reproducen por bipartición longitudinal (fisión binaria) y tras la ruptura celular serán de nuevo fagocitadas por células del sistema retículo endotelial. El ciclo se cierra al picar un vector al animal infectado, ya sea el hombre u hospedadores reservorios como cánidos o roedores. Las formas amastigotas pasan al tubo digestivo y se diferencian a formas promastigotas que se multiplican por bipartición.

La leishmaniasis se considera la segunda enfermedad en importancia entre las enfermedades producidas por protozoos

parásitos. Se estima en más de 12 millones las personas afectadas por esta enfermedad y en cientos de millones las que viven en áreas endémicas de la enfermedad. Esta enfermedad puede manifestarse de varias formas: leishmaniasis visceral denominada Kala-azar, considerada como la forma más severa de la enfermedad, leishmaniasis cutánea denominada Botón de oriente y leishmaniasis mucocutánea.

La clínica de la leishmaniasis visceral, se caracteriza por la aparición de fiebre de curso oscilante, malestar general con desnutrición y pérdida de peso, hepato-esplenomegalia, hipergammaglobulinemia y pancitopenia. Si la enfermedad no es tratada conduce a la muerte en un 90% de los casos, como resultado de diarrea y neumonía (Berman, 1988).

En el caso de la leishmaniasis cutánea, se observan placas duras, nódulos, pápulas costrosas y lesiones verrugosas similares a tumores. Esta enfermedad suele comenzar con la aparición de una pápula enrojecida que prolifera a úlcera con márgenes algo elevados.

Las especies que forman parte del género Leishmania están agrupadas en cuatro complejos. La especie Leishmania tropica, en la que hemos centrado nuestros estudios, junto con las especies Leishmania major y Leishmania aethiopica constituyen el complejo denominado L. tropica. Este complejo es causante de lesiones cutáneas (botón de oriente), que se ulceran después de varios meses de la inculación de los parásitos; su localización geográfica abarca la cuenca Mediterránea, Oriente Medio, Asia, partes del Este y Norte Africano.

### Quimioterapia.

Respecto a la quimioterapia de la enfermedad, el tratamiento de elección para todas las formas de leishmaniasis (visceral, cutánea y mucocutánea) es el complejo de antimonio pentavalente (SbV), en la forma de estibogluconato sódico (Pentostam) o de antimoniato de meglumina (Glucantime). Estos fármacos son administrados vía parenteral a una dosis recomendada de 10-20 mg Sb(V)/Kg por día en el caso de Pentostam, o bien 28 mg Sb(V)/Kg por día de Glucantime (Berman, 1985). Sin embargo, en ocasiones este tratamiento fracasa o aparecen recaídas en todas las formas de la enfermedad, además de presentar numerosos efectos tóxicos, entre ellos: afecciones cardíacas, renales, mialgias, artralgias y anorexia (Chulay y col. 1985).

La dosis a administrar de compuestos antimoniales pentavalentes ha sido modificada en ocasiones, para evitar fracaso en la respuesta, bien por incremento de la dosis diaria o bien de la duración del tratamiento. En 1982, la OMS recomendó que la dosis diaria de antimonio pentavalente empleada en el tratamiento de personas con leishmaniasis visceral, se incrementara de 10 a 20 mg/Kg/día, siempre que la dosis máxima diaria no supere 850 mg. Debido a la respuesta negativa al tratamiento en algunos casos, Herwaldt y col. (1992) describen que esta restricción diaria en la dosis no debe tenerse en cuenta. Sugieren que el tratamiento de antimonio pentavalente a una dosis de 20 mg/Kg/día, sin límite diario, es más eficiente y no significativamente más tóxico. Estos autores tratan la leishmaniasis cutánea durante 20 días, y la visceral y mucocutánea durante 28 días basándose en criterios clínicos.

Existen otros agentes terapéuticos empleados en la 2ª línea de fármacos habituales en el tratamiento de la enfermedad, continuándose la búsqueda del compuesto ideal, administrable oralmente, efectivo y no tóxico.

La pentamidina o la anfotericina B, son los fármacos elegidos cuando el tratamiento fracasa con los compuestos de antimonio pentavalente, pero su uso está limitado por ser generalmente más tóxico y por su administración parenteral. (Berman, 1985; Davidson y col. 1993).

De reciente utilización y de administración oral son el allopurinol, que se emplea en el tratamiento de la leishmaniasis visceral, y el ketoconazol empleado en la leishmaniasis cutánea (Berman, 1985). Se han llevado incluso, asociaciones efectivas de estibogluconato sódico con allopurinol (Kager y col. 1981).

Un grado variable en la eficacia del tratamiento de la leishmaniasis se ha manifestado con metronidazol, formicina B, 8-aminoquinoleínas, Nifurtimox, isoniazida, rifampicina y aminosidina (Berman, 1988; Davidson y col. 1993).

El ketoconazol es un derivado del imidazol N-sustituido, que presenta propiedades fungicidas. El interés en las posibles aplicaciones de este compuesto y derivados del imidazol para el tratamiento de leishmaniasis parte de la demostración de que el ketoconazol inhibe la propagación de formas amastigotas de varias especies de leishmania, mediante inhibición de la síntesis de ergosterol, inhibiendo la demetilación del lanosterol y produciendo de esta manera una acumulación de 14 $\alpha$ -metil esteroides. Por lo que la citotoxicidad del ketoconazol se atribuye a las altera-

ciones en la membrana celular como consecuencia de los cambios en la composición de esteroides.

Recientemente, se ha ensayado in vitro e in vivo frente a Leishmania donovani la actividad de un antibiótico antraciclínico, la doxorubicina, fármaco caracterizado como antineoplásico. Su actividad in vitro fué muy alta tanto para las formas promastigotas como amastigotas. In vivo, la inhibición fué del 95% a una concentración de 625 µg/Kg/día en 4 dosis consecutivas, concentración que está lejos de la dosis tóxica (Sett y col. 1992).

Otro grupo terapéutico ensayado in vitro por Petrillo y col. (1987) sobre formas promastigotas de L. major, son las sulfonamidas y sulfonas, presentando estos parásitos distintas susceptibilidades a la acción de las mismas.

La utilización de un sistema efectivo de administración es importante porque de ella dependerá la accesibilidad del fármaco a aquellos tejidos parasitados. Los liposomas son considerados como nuevos sistemas de liberación de fármacos con perspectivas de futuro. Son vesículas de menos de 3 µ de diámetro, constituidas por bicapas lipídicas concéntricas, alternando con compartimentos acuosos. Constituyen una forma farmacéutica especial dotada de citotropismo, con lo cual se obtienen mejores resultados terapéuticos a dosis bajas del medicamento y con ello se reducen los efectos secundarios derivados de su administración. Los liposomas poseen un elevado tropismo por las células del retículo endotelial, favoreciendo el que estos compuestos sean rápidamente eliminados de la circulación por el retículo endotelial del hígado y bazo (Gregoriades y col. 1980).



Se han realizado numerosas formulaciones de liposomas conteniendo compuestos antimoniales y anfotericina B, considerándose su uso en el ensayo humano. Alving y col (1978) administraron con buenos resultados Pentostam y Glucantime encapsulado en liposomas a hamsters infectados con L. donovani durante 17-20 días. La dosis necesaria fué aproximadamente 2,5 mg/Kg, en comparación con 832 mg/Kg de fármaco libre que fué necesario administrar para obtener similar efectividad.

## 1.2.- MECANISMOS DE RESISTENCIA.

Desafortunadamente, como describíamos anteriormente, el tratamiento con compuestos antimoniales fallan en ocasiones en todas las formas de la enfermedad : Kala-azar (Bryceson y col. 1985; Gradoni y col. 1987; Mebrahtu y col. 1989 ), mucocutánea (Franke y col. 1990; Marsden, 1986) y cutánea (Costa y col. 1986). Este fallo en el tratamiento de la leishmaniasis es un problema en muchas zonas endémicas, ocurriendo entre un 5 y un 70% de los pacientes. Esto puede deberse a reinfecciones, o deficiencias inmunológicas, fisiológicas o farmacocinéticas del hospedador. Sin embargo, existe la posibilidad de que en el fallo terapéutico intervengan mecanismos de resistencia desarrollados por el parásito (Berman y col. 1989; Jackson y col. 1990; Grögl y col. 1992).

Para determinar hasta que punto influye la resistencia al fármaco en el fracaso del tratamiento, Grögl y col. (1989) obtuvieron formas promastigotas de Leishmania mexicana amazonensis, Leishmania braziliensis y Leishmania enrietti resistentes a Pentostam in vitro. Los resultados de estos estudios demostraron que el parásito adquiere una resistencia estable al antimonio pentavalente in vitro, y que existen diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad al antimonio pentavalente entre clones de parásitos procedentes de pacientes tratados y no tratados con Sb(V), siendo más sensibles al tratamiento aquellos clones que no habían estado expuestos anteriormente a la acción de fármacos.

Recientemente, se ha estudiado in vitro la sensibilidad a Sb(V) que presentan leishmanias aisladas de pacientes en los que fracasó el tratamiento con Pentostam y Glucantime. Estas determinaciones se realizaron mediante la microtécnica de radiorrespirometría (RAM) desarrollada por Jackson y col. (1990). En ocasiones, los parásitos eran hasta 100 veces más resistentes al Sb(V) que el nivel máximo tolerable en suero en humanos; los pacientes de los cuales procedían dichos parásitos no respondían bien al tratamiento quimioterapéutico.

Con similar fin, Grögl y col. (1992) desarrollaron la técnica de microdilución semiautomática (SAMT), que permite predecir en un 85% de los casos la eficacia del tratamiento. Mediante esta técnica observaron que algunas leishmanias aisladas de pacientes previamente expuestos al tratamiento con Sb(V) son menos susceptibles que otras y que algunas presentaban resistencia natural puesto que no fueron expuestas anteriormente a Sb(V). Además, encontraron incrementada la dosis inhibitoria 50 (DI<sub>50</sub>) de Sb(V) de 10 a 17 veces en L. mexicana y L. braziliensis aisladas de pacientes que habían sido tratados previamente.

De aquí se deduce, que uno de los grandes problemas a los que se enfrenta el tratamiento de la leishmaniasis es la resistencia adquirida a los fármacos habitualmente empleados. Por ello es importante el estudio de los mecanismos de resistencia a fármacos desarrollados por los parásitos, al objeto de buscar nuevas estrategias de tratamiento alternativos, en los casos en los que falla el tratamiento quimioterapéutico.

Los parásitos en general, pueden desarrollar independiente o simultáneamente alguno de los siguientes mecanismos de resistencia: una amplificación de los genes implicados en la síntesis de las proteínas blanco de acción del fármaco (Coderre y col. 1983; Beverley y col. 1984, Washtien y col. 1985; Inselburg y col. 1987), cambios estructurales y/o funcionales en las proteínas blanco de acción (Ferone, 1970; Sirawaraporn y col. 1984; Walter, 1986; Chen y col. 1987), alteración del transporte de fármacos (Dewes y col. 1986; Ellenberger y col. 1987a; Kaur y col. 1988; Ellenberger y col. 1987b), presencia de elementos extracromosomales (Hightower y col. 1988, White y col. 1988; Ellenberger y col. 1989) y recientemente se ha descrito un nuevo mecanismo de resistencia similar al de las células tumorales multirresistentes, y caracterizado por la amplificación de un gen homólogo al gen de la multirresistencia a fármacos (o gen MDR). Este último mecanismo se ha descrito en las células tumorales (Roninson y col. 1986; Pastan y col. 1987), admitiéndose que el gen MDR codifica la síntesis de una glicoproteína de membrana de alto tamaño molecular (150-180 kDa), denominada glicoproteína-P (Gottesman y col. 1988), implicada en el eflujo de fármacos en un proceso dependiente de energía (Endicott y col. 1989, Van der Blik y col. 1989), así como en la resistencia cruzada a otros fármacos estructural y funcionalmente diferentes al fármaco frente al cual se ha obtenido la resistencia de las células.

La posibilidad de mantener in vitro estos parásitos, ha permitido la inducción controlada y obtención en el laboratorio de parásitos resistentes a diferentes fármacos.

Uno de los fármacos más empleados en el estudio de los mecanismos de resistencia a fármacos en Leishmania es el

Metotrexato (MTX). El MTX es un 4-amino análogo del ácido fólico que se emplea en la quimioterapia de diferentes tipos de cáncer como linfomas, sarcomas osteogénicos, carcinoma de mama, cáncer de pulmón y tumores cerebrales, habiéndose empleado también en el tratamiento de desórdenes no neoplásicos como psoriasis, artritis reumatoides y asma esteroide dependiente.

Una de las características esenciales de estos parásitos es la incapacidad de síntesis de novo de purinas, lo que implica que el papel esencial del ácido fólico como cofactor reside en su participación en la síntesis de dTMP, precursor necesario para la síntesis de ADN. El ciclo de síntesis de dTMP depende de 3 reacciones secuenciales catalizadas por los enzimas: Timidilato sintasa (TS), Dihidrofolato reductasa (DHFR) y Serina transhidroximetilasa (STH), encontrándose en Leishmania las dos primeras formando parte de una única proteína bifuncional. El tetrahidrofolato desempeña un importante papel en estas reacciones como portador de grupos metilo, durante un proceso de oxidación-reducción, catalizado por la TS y DHFR, respectivamente. El bloqueo de este ciclo, conlleva a una disminución de dTMP y a la muerte celular, lo que hace que se consideren estos enzimas como blanco interesante para una posible acción de agentes anti-leishmania. El MTX es un potente inhibidor del enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), produciendo una deplección del contenido de tetrahidrofolato intracelular, necesario en la biosíntesis de nucleótidos de purina y timidina, lo que conlleva a una inhibición de la síntesis de ADN.

Los fármacos antifolatos son ampliamente empleados en el tratamiento de infecciones causadas por protozoos (incluyendo Plasmodium, Pneumocystis y Toxoplasma), pero no

se ha probado su efectividad para el tratamiento de la leishmaniasis (Berman, 1988). La bioquímica y regulación del transportador de folato (Ellenberger y col. 1987a) y la síntesis de novo de folato a partir de biopterina (Beck y col. 1991) en las células de mamíferos son lo suficientemente diferentes como para sugerir que estos fármacos puedan tener alta especificidad contra Leishmania.

La selección de diferentes especies de Leishmania resistentes in vitro a MTX ha sido ampliamente descrita por diversos autores: L. major (Ellenberger y col. 1987; Ellenberger y col. 1989; Callahan y col. 1992), Leishmania tarentolae (White y col. 1988; Papadopoulou y col. 1992) y L. donovani (Kaur y col. 1988; Beck y col. 1991).

**1.2.1.-AMPLIFICACION GENICA.  
ELEMENTOS EXTRACROMOSOMALES.**

Una de las características de Leishmania es el pequeño tamaño de su genoma, aproximadamente 50.000 kb (Leon y col. 1978; Beverley, 1991). Todas las especies de Leishmania contienen de 25 a 30 cromosomas pequeños y fácilmente separables mediante electroforesis en campo pulsante (Van der Ploeg y col. 1984).

Mientras que las células animales son altamente resistentes a la amplificación génica, las especies de Leishmania responden con facilidad a la selección por fármacos mediante la amplificación de genes que codifican las proteínas blanco de acción de los fármacos, así como genes cuya funcionalidad en la resistencia a fármacos se desconoce.

En L. major resistente a MTX se han descrito 2 tipos de amplificaciones génicas, mediante aparición de elementos extracromosomales. Uno de estos elementos extracromosomales, procede de la región R del cromosoma 4, es aproximadamente de 30 kb, y contiene el gen que codifica para la proteína bifuncional DHFR-TS. Esto implica la sobreproducción del enzima blanco de acción del fármaco como mecanismo de resistencia. Esta amplificación génica extracromosomal y circular resultó ser inestable en ausencia de la presión del fármaco cuando los parásitos habían crecido durante 3 meses en presencia de 1 mM de MTX, pero resultó estable después de mantener los parásitos durante 11 meses en presencia de 1 mM de MTX (Hightower y col. 1987). Debido a que las líneas resistentes a MTX, siempre presentan otras alteraciones metabólicas, mediante experiencias de trans-

fección empleando el gen DHFR-TS de Leishmania, se comprobó si solo esta amplificación era suficiente para conferir resistencia a MTX. Después de introducir este gen en parásitos salvajes, no sometidos a tratamiento con MTX, se consiguió que estos parásitos fuesen resistentes a MTX (Beverley, 1991), sin producirse amplificación de la región R.

Otro elemento extracromosomal descrito en parásitos salvajes y resistentes a MTX y a otros fármacos no relacionados, de aproximadamente 68 kb en L. major, procede de la región H del cromosoma 6 (Hightower y col. 1988) y contiene una secuencia duplicada con orientación invertida de 30 kb, separada por secuencias únicas de 4-5 kb, existiendo una copia cromosomal de la secuencia de la región H (Beverley y col. 1984; White y col. 1988; Ellenberger y col. 1989a; Katakura y col. 1989).

Se ha tratado de buscar una posible relación entre la resistencia a fármacos y la amplificación de la región H. En L. major resistente a primaquina y terbinafina, fármacos estructural y funcionalmente diferentes, no relacionados con el MTX, se ha observado la amplificación de la región H y además presentaban un índice de resistencia al MTX de 10 a 20 veces mayor al de las formas sensibles, sin producirse amplificación de la región R (Ellenberger y col. 1989a). Se ha descrito también que diversos clones de L. major seleccionados con MTX, amplifican la región H sin que haya existido amplificación de la región R (Beverley, 1991).

En los parásitos salvajes de L. tarentolae se ha observado la presencia de un ADN extracromosómico, equivalente a la amplificación de la región H de L. major por su homología en secuencia y por tener la secuencia duplicada



con orientación invertida. Estos parásitos son del orden de 20 veces más resistentes a MTX y el número de copias aumenta en presencia de fármaco (White y col. 1988). En L. mexicana amazonensis resistente a arsenito sódico, también se ha observado una amplificación de la región H y resistencia cruzada a MTX (Katakura y col. 1989).

Aunque estas observaciones demuestran una correlación entre la resistencia a fármacos y la amplificación de la región H, la posibilidad de que existiera diferentes mecanismos de resistencia en estos parásitos, puso en duda la función de la región H. Así, en L. major resistente a terbinafina, primaquina o MTX se produce amplificación de la región H sin observarse alteraciones en la captación y eflujo de fármacos (Ellenberger y col. 1989a), mientras que en diferentes líneas celulares resistentes a MTX se ha demostrado la existencia de una alteración en la captación de MTX (Ellenberger y col. 1987b; Kaur y col. 1988).

Como se detallará más adelante, en esta región se han identificado diferentes genes, entre ellos un gen homólogo al gen MDR implicado en la multirresistencia a fármacos en las células de mamíferos, el gen *ltpgpA* en L. tarentolae (Ouellette y col. 1990) y el gen *lmpgpA* en L. major (Callahan y col. 1991).

Se ha comprobado mediante estudios de transfección (recientemente desarrollados en Kinetoplástidos), empleando diferentes fragmentos de ADN de la región H, que contenían el gen *ltpgpA* procedente de L. tarentolae o bien el gen *lmpgpA* procedente de L. major, que la expresión de estos genes en la línea salvaje de L. major confiere resistencia a metales pesados como son los antimoniales trivalentes,

arseniato sódico, pero no a antimoniales pentavalentes, zinc y cadmio (Callahan y col. 1991).

Otro determinante génico, localizado en la región H, es denominado ltdh en L. tarentolae (Papadopoulou y col. 1992) y hmtx en L. major (Callahan y col. 1992). Papadopoulou y col. (1992) realizaron estudios de transfección, empleando distintos fragmentos de la región H de L. tarentolae resistente a MTX, demostrando que uno de los fragmentos de 4,3 kb confiere gran resistencia a MTX y una baja resistencia a otros antifolatos como trimetropim y pirimetamina y ninguna resistencia a otros fármacos tales como Arsenito. El análisis de la secuencia revela que este fragmento contiene un gen ltdh, homólogo al gen que codifica para un enzima perteneciente a una familia de deshidrogenasas de cadena corta, enzimas involucradas en diferentes reacciones de oxido-reducción en un amplio número de organismos (Callahan y col. 1992). La amplificación de deshidrogenasas de cadena corta representaría un nuevo mecanismo para la resistencia a folatos. Igualmente, existe otro gen localizado en este fragmento de 4,3 kb, que codifica para el enzima arginina succinato (Ouellette y col., resultados aún no publicados).

Existen otras amplificaciones génicas descritas como consecuencia de la selección a fármacos y a diversos inhibidores metabólicos en Leishmania.

La amplificación génica es el único mecanismo de resistencia a tunicamicina en Leishmania (Detke y col. 1988; Katakura y col. 1991). La tunicamicina es un antibiótico que inhibe al enzima N-acetilglucosamina-I-fosfato transferasa (NAGT), la cual está involucrada en el proceso de glicosilación. La región amplificada, tras la selección

con tunicamicina, contiene el gen *nagt*, que mediante estudios de transfección se ha comprobado confiere la resistencia a tunicamicina (Liu y col. 1992).

Leishmania es incapaz de sintetizar purinas de novo y por ello, estos parásitos son dependientes de nucleótidos exógenos para cumplir sus requerimientos de purinas. La inducción de resistencia en Leishmania al ácido micofenólico, un inhibidor del enzima inosina monofosfato deshidrogenasa (IMPDH), implicada en el metabolismo de purinas, está relacionada con la amplificación del gen *impdh* (Wilson y col. 1991).

DL- $\alpha$ -Difluorometil ornitina (DFMO) es un inhibidor irreversible del enzima ornitina descarboxilasa (ODC) y ha sido empleada en la tripanosomiasis africana. En L. donovani resistente a DFMO se ha observado una amplificación del gen *odc*, con la consecuente sobreproducción del enzima ODC (Hanson y col. 1992).

Igualmente, L. donovani resistente a vinblastina contiene una amplificación de un gen homólogo al que codifica la glicoproteína-P humana, distinto al gen *lmpgpA*. Estos parásitos resistentes a vinblastina mostraban resistencia cruzada a muchos sustratos clásicos de la glicoproteína-P de mamíferos como la puomicina y daunorubicina. Este gen, denominado *ldmdr 1*, se ha demostrado mediante estudios de transfección que confiere un típico fenotipo MDR (Henderson y col. 1992).

Los elementos extracromosomales observados en los parásitos sometidos a la presión de fármacos, son estables con replicación autónoma y se mantienen mientras el fármaco

está presente (Beverley y col. 1984; Hightower y col. 1988). En las células de mamíferos, el paso de amplificación inestable a estable está normalmente asociado con una relocalización de las secuencias extracromosomales en el cromosoma de origen, dando lugar a las denominadas regiones cromosomales homogéneamente teñidas (Stark y col. 1984; Schimke, 1984). En Leishmania parece que durante el proceso de estabilización también existe una reinserción cromosomal del ADN bien en el mismo lugar que el gen residente o bien una localización diferente (Beverley y col. 1984).

### 1.2.2.-ALTERACIONES ESTRUCTURALES Y FUNCIONALES EN LA PROTEINA BLANCO DE ACCION DEL FARMACO.

Se ha descrito en diferentes especies de Plasmodium resistentes a pirimetamina, que no solo puede estar incrementada la cantidad de enzima (DHFR), sino que además se observa una disminución de la afinidad por el fármaco. Esto es indicativo de posibles alteraciones de las propiedades estructurales y funcionales del enzima (Ferone, 1970; Sirawaraporn y col. 1984; Mc. Cutchan y col. 1984; Walter, 1986; Banyal y col. 1986). Estas alteraciones de los enzimas blanco de acción, se originan como consecuencia de mutaciones puntuales, ocasionadas por la presión del fármaco, en los genes que codifican estas proteínas blanco de acción (Zolg y col. 1989; Foote y col. 1990).

Estudios en Plasmodium falciparum resistentes in vivo a pirimetamina, han demostrado la existencia en el enzima DHFR de los parásitos resistentes, de una mutación puntual en el aminoácido 108 (Treonina/Serina muta a Asparragina) (Peterson y col. 1988; Cowman y col. 1988; Snewin y col. 1989). Esta mutación no modifica la sensibilidad a cicloguanil (fármaco que se emplea igualmente en el estudio del mecanismo de resistencia en Plasmodium). Esto indica que esta mutación puntual está involucrada en la inhibición de la unión de la pirimetamina al sitio activo del enzima (Zolg y col. 1989). En cambio, en P. falciparum resistente a cicloguanil, se han encontrado 2 mutaciones, en la Serina 108 que muta a Treonina y en Alanina 16 que muta a Valina; observándose que estas mutaciones no afectan a la pérdida de sensibilidad a pirimetamina. Se han descrito en parásitos resistentes a ambos fármacos, 3 mutaciones comunes en el enzima DHFR: Serina 108 que muta a Asparragina, Isoleu-

cina 164 a Leucina 164 y Cisteína 59 a Arginina 59 (Peterson y col. 1990; Foote y col. 1990; Peterson y col. 1991).

En algunas cepas de L. donovani y L. mexicana amazonensis resistentes al antimonial pentavalente Pentostam, cuyo blanco de acción parece ser los enzimas glucolíticos, especialmente fosfofructoquinasa, se sabe que no existe alteración en la captación y acúmulo del fármaco, sospechándose que exista una alteración de tipo estructural y/o funcional en el blanco de acción de fármaco (Ullman y col. 1989; Berman y col. 1989).

En otros parásitos, como Toxoplasma gondii, resistente a emimicina (análogo del uracilo), sustrato para el enzima uracilfosforibosiltransferasa, se propone que alteraciones funcionales y estructurales en este enzima, produzcan una disminución de la actividad enzimática, lo que impide que este análogo citotóxico se incorpore en el "pool" de nucleótidos (Pfefferkorn y col. 1989).

### 1.2.3.- ALTERACION DEL TRANSPORTE DE FARMACOS.

El descenso en la acumulación de fármaco en el interior celular, es otro de los posibles mecanismos de resistencia que se ha descrito en células tumorales de mamíferos (Sirotnak y col. 1981; Ohnuma y col. 1985) y en bacterias resistentes a fármacos (Mandelbaum-Shavit, 1976).

Se ha realizado el estudio de la alteración del transporte en diferentes parásitos resistentes a fármacos: Plasmodium (Krogstad y col. 1987), Crithidia (Dewes y col. 1986), L. major y L. donovani (Ellenberger y col. 1987a; Kaur y col. 1988), demostrando la existencia de una alteración en el transporte de fármaco, que provoca una disminución en el acúmulo del mismo, pudiéndose considerar éste como otro de los mecanismos de resistencia en Leishmania.

Con el fin de profundizar en el conocimiento de este mecanismo, el transportador más estudiado es el de nucleósidos y folato, así como de su análogo citotóxico, MTX. Se sabe que en células eucariotas existen proteínas de membrana transportadoras de folato. Así, Elwood (1989) caracterizó el transportador de folato/MTX de células tumorales humanas. A partir del estudio de la secuencia de un ADNc procedente de células tumorales de humanos de 1,1 kb, dedujo la secuencia de aminoácidos de este transportador. El polipéptido, constituido por 257 aminoácidos, tiene un tamaño molecular mínimo de 29,8 kDa. Esta proteína contiene 3 sitios posibles para la N-glicosilación (Asn-X-Thr o Asn-X-Ser) y 2 regiones hidrofóbicas, una amino terminal y otra carboxiterminal, que corresponden a un péptido señal y a un dominio transmembrana, respectivamente. Esta

secuencia también contiene un sitio potencial de fosforilación, dependiente de AMP cíclico, además de otros múltiples lugares de fosforilación. En L. donovani se ha descrito que el posible transportador para folato/MTX, es una proteína de, aproximadamente, 46 kDa (Beck y col. 1989).

En lo referente al mecanismo de transporte de folatos en Leishmania, según Ellenberger y col. (1987a) el influjo de folato y MTX exhibe una cinética Michaelis-Menten, siendo la Velocidad máxima ( $V_{max}$ ) similar para ambos sustratos, y la afinidad del transportador mayor para folato que para MTX. El influjo es dependiente de tiempo, así como de energía ya que el transporte está reducido significativamente a 4°C y por inhibidores metabólicos como Iodoacetato y Azida; a su vez el acúmulo se produce contra un gradiente de concentración. Además, el folato y MTX compiten por el mismo transportador, siendo la Constante de afinidad ( $K_t$ ) para el folato de 0,8  $\mu$ M y 1,9  $\mu$ M para MTX.

Se han observado algunas diferencias entre los transportadores de folato/MTX encontrados en Leishmania, bacterias y células de mamíferos (Ellenberger y col. 1987a). Los transportadores de Leishmania y bacterias presentan una respuesta similar frente a determinados inhibidores metabólicos (Azida sódica e Iodoacetato), y la afinidad por la captación de folato es mayor que para MTX. En cambio, el transportador de células tumorales presenta mayor afinidad por MTX que por folato. Otras de las peculiaridades encontradas exclusivamente en el transportador de Leishmania es su inhibición por pABA-glutamato y que la actividad del transportador parece estar regulado por la fase en que se encuentra el crecimiento celular, disminuyendo la captación en la fase estacionaria.



Estudios realizados por Dewes y col. en 1986 en Crithidia fasciculata resistentes a MTX, demostraron que este parásito presentaba alteraciones en el transporte del fármaco. Este parásito mostraba una reducción de la captación del fármaco, debido a su adaptación a MTX, y este fenotipo se mantenía estable en ausencia de la presión de fármaco. Este hecho se comprobó que no estaba relacionado, ni con una amplificación del gen DHFR-TS ni con un aumento de la actividad del enzima DHFR-TS, como ocurría en L. major resistente a MTX, en la que además de desarrollar una amplificación inestable del gen DHFR, presenta una reducción en el acúmulo de fármaco que se mantiene durante 60 generaciones en ausencia de MTX.

Igualmente, Kaur y col. en 1988 obtuvieron diferentes clones de L. donovani resistentes a 1mM de MTX, que presentan deficiencias en el transporte de MTX, pero poseen niveles normales de DHFR-TS y no presentan amplificación génica, al contrario que L. major. La captación de fármaco por parte de estos parásitos resistentes no representó más del 1% del fármaco incorporado por los parásitos sensibles.

Ellenberger y col. (1987b) estudiaron la posible relación entre la amplificación génica de la región R y H, observada en L. major resistente a MTX, y la reducción en la captación de folato y MTX. Estos estudios confirmaron que la reducción de la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) en el influjo de MTX no estaba relacionada con el grado de resistencia a MTX.

En Crithidia se observaba que a bajas concentraciones de fármaco aparecía una alteración en el transporte. Igualmente, en L. major resistente a 1  $\mu$ M de MTX, se producía un rápido descenso en la  $V_{max}$  de influjo para el MTX de un 60%

a las 24 horas de exposición al fármaco; este descenso es muy inestable en ausencia de MTX, ya que tras 24 generaciones en medio carente de fármaco, la  $V_{max}$  aumentó hasta un 83% del valor de  $V_{max}$  de las formas sensibles.

En lo que se refiere a la estabilidad de estos mecanismos de resistencia, se ha observado en L. major resistente a 1 mM de MTX, que el fenotipo responsable de la reducción de la  $V_{max}$  se mantiene durante más de 200 generaciones, es decir, moderadamente estable en ausencia de MTX. Por el contrario, la amplificación de la región R y H es menos estable. Se produce una disminución en el número de copias de la región R y H amplificadas, siendo la pérdida de la amplificación de R-ADN más rápida que la de H-ADN, seguida finalmente por la pérdida en la reducción de la captación de MTX (Ellenberger y col. 1987b).

Formas amastigotas aisladas de ratones que llevaban infectados 6 meses con formas promastigotas de L. major, resistentes a 1 mM de MTX, pierden la amplificación del R-ADN, manteniendo niveles intermedios del número de copias de H-ADN, mientras que la reducción en el acúmulo de fármaco es comparable a la línea original resistente. La estabilidad en la reducción de la acumulación de fármaco en la línea resistente, sugiere que este fenotipo podría deberse a una mutación génica que revierte lentamente en ausencia de la presión de fármaco. Estos datos igualmente demuestran que la amplificación génica y la alteración en el transporte de fármaco, son dos mecanismos de resistencia no relacionados y por ello independientes.

#### 1.2.4.- MULTIRRESISTENCIA A FÁRMACOS. GENERALIDADES.

La adquisición in vitro e in vivo de resistencia a fármacos en células tumorales, permitieron describir el fenómeno conocido como multirresistencia a fármacos, simplificado por las siglas MDR (multidrug resistance). Debido a este fenómeno, las células seleccionadas por su resistencia a fármacos, adquirirían simultáneamente resistencia cruzada a un diverso grupo de fármacos generalmente lipofílicos, estructural y funcionalmente diferentes como son los alcaloides de la Vinca: vincristina o vinblastina; antibióticos: doxorubicina o daunorubicina y ciertos antifolatos como el trimetrexato (Kessel y col. 1968; Biedler y col. 1970; Fojo y col. 1987; Bradley y col. 1988). Las células con este fenotipo se denominaban multirresistentes. Estos fármacos son los principales carcinostáticos de uso clínico, lo que implica la importancia del estudio de este fenotipo, ya que constituye un grave problema en el tratamiento antitumoral.

Este fenotipo de multirresistencia se caracteriza por un significativo eflujo de fármacos, debido a la acción de una glicoproteína de membrana de alto tamaño molecular, denominada glicoproteína-P. Esta glicoproteína está codificada por un gen denominado MDR que se encuentra amplificado y sobreexpresado en las células multirresistentes.

Se ha descrito que este fenotipo MDR puede ser revertido mediante el empleo de diferentes sustancias como bloqueadores de los canales de calcio (verapamil, bepridil y nifedipina), antagonistas del calcio-calmodulina como trifluoperazina (Kessel, 1986), e incluso otros fármacos no

relacionados, como ciclosporina A, quinidina, detergentes no aniónicos, anestésicos locales y esteroides. Sustancias que en general se han denominado quimiosensibilizadores. Esta reversión del fenotipo MDR parece ser consecuencia de la competición que se establece entre los fármacos citotóxicos y los quimiosensibilizadores por un sitio de unión a glicoproteína-P. Esto origina una disminución en el eflujo de fármaco y un mayor acúmulo de fármacos citotóxicos en las células MDR (Kessel, 1986; Fojo y col. 1985) (Fig. 1).

El estudio del fenómeno de multirresistencia a fármacos en células tumorales confería una gran importancia a la molécula efectora conocida como glicoproteína-P (P del término de permeabilidad). Las glicoproteínas-P son proteínas de membrana de alto tamaño molecular, (entre 130-190 kDa), sobreexpresadas en todas las células resistentes con fenotipo MDR (Juliano y col. 1976; Peterson y col. 1978; Kartner y col. 1985; Scotto y col. 1986).

La sobreexpresión de glicoproteínas-P está relacionada con una amplificación génica, y el grado de amplificación se mide por el tamaño o número de cuerpos extracromosómicos, denominados cromosomas doble minuto (DM) o por la presencia de regiones cromosómicas homogéneamente teñidas (HSR) (Riordan y col. 1985).

Mediante una sonda de ADNc, construida a partir del ARNm que traduce para la glicoproteína-P de 170 kDa, presente en las células tumorales multirresistentes, se ha demostrado que el gen que codifica esta glicoproteína-P se encuentra amplificado (Riordan y col. 1985). En lo que se refiere a la transcripción, mediante el empleo de sondas específicas se ha observado la expresión de un ARNm de 4,3 kb sobreexpresado en las células resistentes.

Las células tumorales poseen 2 genes *mdr*, mejor denominados genes de la familia glicoproteína-P: MDR 1 y MDR 2, pero sólo el gen MDR 1 parece estar relacionado con el fenotipo MDR, desconociéndose la función del gen MDR 2. Estudios realizados mediante clonaje y transfección de un ADNc procedente de la expresión de un gen MDR 1, en células hospedadoras sensibles a fármacos, mostraban una adquisición en las células de un fenotipo multirresistente (Gros y col. 1986; Ueda y col 1987). El estudio de la secuencia completa de este ADNc de 4,3 kb y la secuencia deducida de aminoácidos, permitió conocer el tamaño y otras características de la glicoproteína-P. Este polipéptido de 1280 aminoácidos, tiene un tamaño molecular mínimo de 140 kDa. La glicoproteína-P está constituida por 2 partes estructuralmente similares. El grado de homología entre ambas mitades varia a lo largo de la secuencia, siendo más fuerte cerca del extremo carboxilo terminal. En los perfiles de hidrofobicidad, cada parte parecen ser casi idénticas, cada una de estas mitades constan de un dominio hidrofóbico con 6 segmentos transmembrana y una región hidrofílica que contiene una secuencia consenso de un lugar de unión a nucleótidos (Gros y col. 1986; Chen y col. 1986). Además, la glicoproteína-P presenta 8 sitios potenciales para la N-glicosilación, correspondientes a secuencias Asparragina-X-Serina/Treonina (Fig. 2).

Las regiones de unión a nucleótidos de la glicoproteína-P presentan una gran homología con los dominios de unión a nucleótidos de un grupo de proteínas transportadoras pertenecientes a organismos eucariotas y procariotas, entre los que se encuentran las proteínas bacterianas: *hisp P*, *OppD*, *malk*, *pstB* y *hlyB* (Chen y col. 1986; Gros y col. 1986). La presencia de elementos de transmembrana, posibles formadores de canales, y la gran homología con los dominios

de unión a ATP con las proteínas transportadoras de membrana, hace suponer que la glicoproteína-P funcione como bomba de eflujo de fármacos dependiente de energía. De hecho, se ha descrito que el eflujo de fármacos, existente en células multirresistentes, es un proceso dependiente de energía (Bradley y col. 1988) y que la mutagénesis dirigida de uno o ambos dominios de unión a ATP, inhibe la función de la glicoproteína-P como transportador de fármacos (Azzaria y col. 1989). Diversos autores (Sarkadi y col. 1992; Al-Shawi y col. 1993), basándose en estas observaciones, han demostrado que la glicoproteína-P posee una alta actividad ATPasa que es marcadamente estimulada por los fármacos que interaccionan con la glicoproteína-P, tales como verapamil y vinblastina. Recientemente, se ha descrito que la glicoproteína-P es una proteína bifuncional, además de actuar como un transportador de membrana, en una actividad que requiere la hidrólisis de ATP, actúa como canal de cloro para regular el volumen intracelular, necesitando solo la unión a ATP (Gill y col. 1992).

Las células tumorales con fenotipo MDR resistentes a diferentes fármacos presentan más resistencia al fármaco inductor, lo que sugiere que existan varios genes MDR, formando parte de una familia de genes, localizados en un mismo amplicón (Riordan y col. 1985). Roninson y col. en 1986 demostraron que el espectro de resistencia en las células MDR puede estar mediado por mutaciones en los genes MDR, lo que llevaría a que la glicoproteína-P tuviera más afinidad para expulsar al exterior el fármaco utilizado en la inducción de resistencia. Este grupo propuso que las secuencias que determinan esta especificidad por el fármaco, se localizan cerca del dominio transmembrana, preferentemente en los dominios 5, 6, 11 o 12 (Bruggemann y col. 1992).

El aminoácido en posición 185 del dominio citoplasmático podría estar involucrado en la selección del fármaco que se unirá a la glicoproteína-P, ya que se ha observado mutaciones puntuales durante la selección de células resistentes a colchicina. En estas mutaciones, el aminoácido Glicina de las células sensibles muta a Valina en las células resistentes (Choi y col. 1988).

En lo que se refiere a regulación y expresión del gen MDR, estudios realizados sobre los niveles de ARNm en tejidos normales, indican su expresión en células del colon, bazo, hígado, riñón, intestino delgado, lo que sugiere que la glicoproteína-P es un constituyente normal en la célula, que actúa en procesos de detoxificación celular.

El fenotipo MDR, como un importante mecanismo de resistencia a fármacos en células tumorales, ha sido objeto de estudio e investigación en parásitos. Así, se ha demostrado que algunos parásitos desarrollan un mecanismo MDR similar al de las células tumorales; entre ellos: Plasmodium falciparum resistente a cloroquina (Martin y col. 1987; Wilson y col. 1989; Foote y col. 1989), Entamoeba histolytica resistente a emetina (Samuelson y col. 1990, 1992), y L. donovani resistente a vinblastina (Henderson y col. 1992). Siendo en Plasmodium y Leishmania en los que con mayor profundidad se ha realizado el estudio del fenotipo MDR.

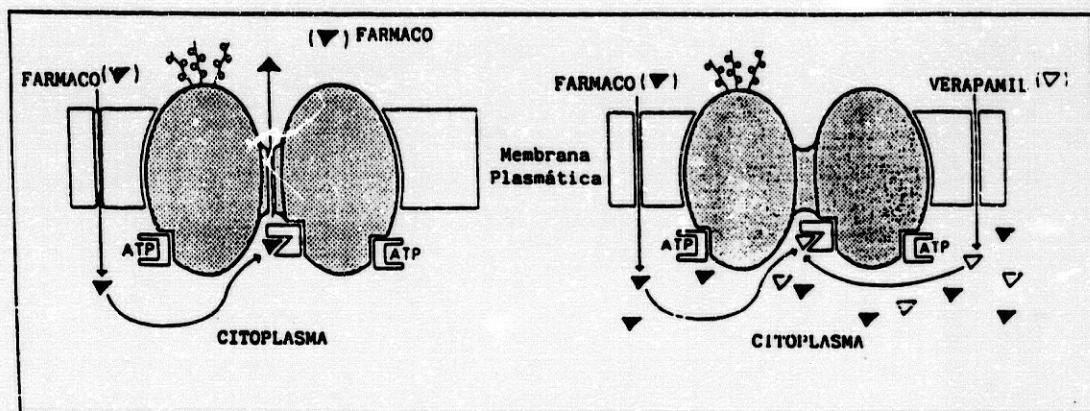


Figura 1.- Esquema ilustrando el eflujo de fármacos mediado por la glicoproteína-P, y como el eflujo puede ser inhibido por quimiosensibilizadores (verapamil). El sitio de unión a ATP está localizado en el dominio citoplasmático de la proteína. Los fármacos entran en la célula por difusión a través de la bicapa lipídica. Las flechas indican la dirección del movimiento a través del canal de membrana. Figura tomada de M.M. Gottesman y I. Pastan (1988).



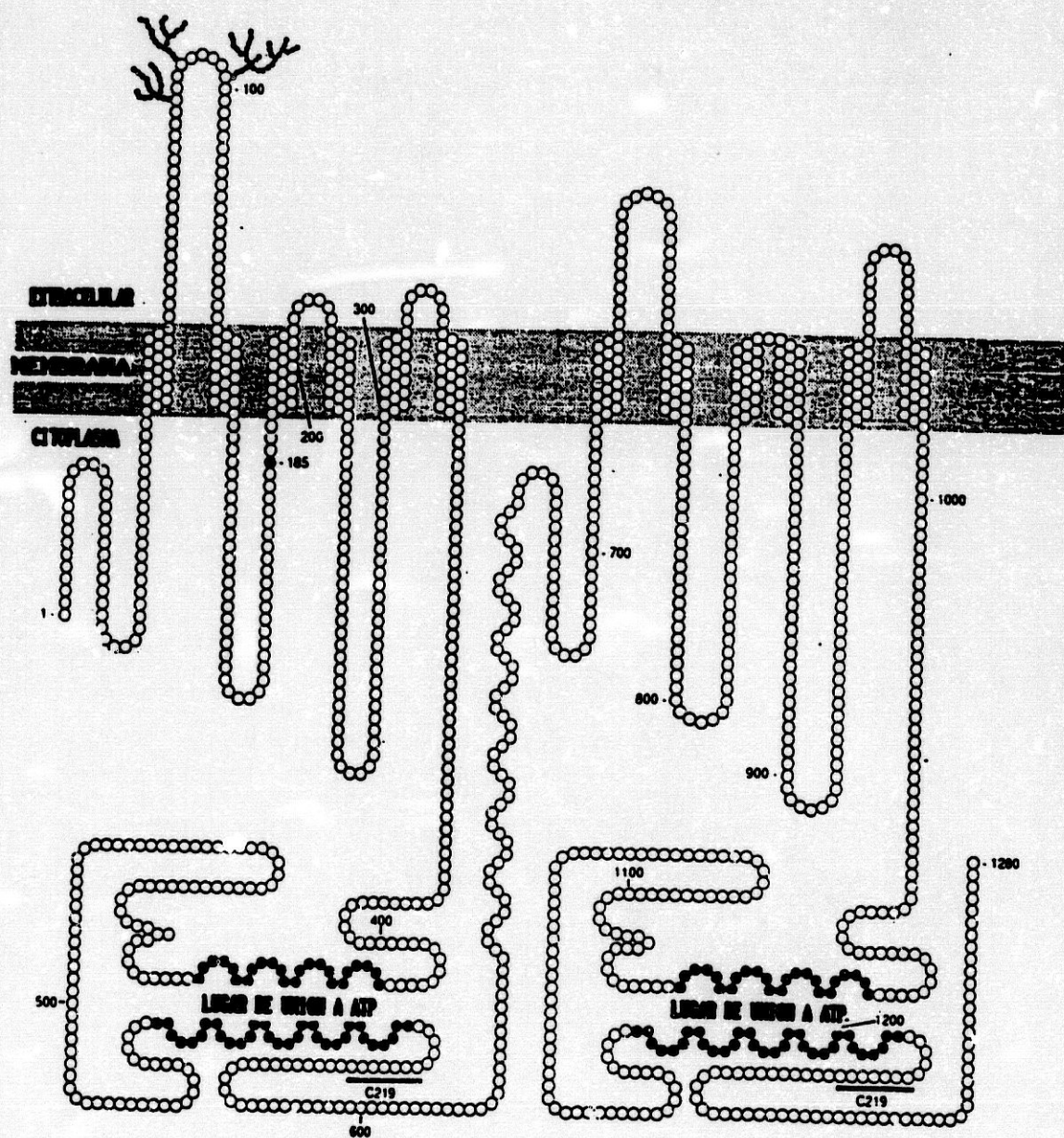


Figura 2.- Modelo de orientación de la glicoproteína-P humana. Cada aminoácido componente de la glicoproteína-P, está representado por un círculo. Los lugares de N-glicosilación están señalados por flechas. El lugar de unión a ATP está marcado por círculos negros. El aminoácido 185 está involucrado en la selección del fármaco. El epítipo para el anticuerpo monoclonal C<sub>219</sub>, que reconoce un dominio citoplasmático de la glicoproteína-P humana, está indicado mediante una línea. Figura tomada de Juranka y col. (1989).

#### 1.2.4.1.- MDR EN LEISHMANIA.

En diferentes especies de Leishmania resistentes a distintos fármacos, se han encontrado muchas de las características del fenotipo MDR. En muchas de estas especies se observaba una amplificación de la región H, relacionada con la resistencia a fármacos. Así, en la región H se ha llegado a identificar tanto en L. tarentolae como en L. major resistentes a MTX, un gen homólogo al gen MDR, denominado ltpgpA (Ouellette y col. 1990) y lmpgpA (Callahan y col. 1991), respectivamente. Recientemente se ha descrito una nueva amplificación de un gen que codifica para una glicoproteína-P, en L. donovani resistente a vinblastina. Este gen es muy diferente del gen ltpgpA/lmpgpA y su amplificación no está relacionada con la amplificación de la región H. Además, se ha demostrado mediante transfección que este gen, denominado ldmdr 1, confiere un típico fenotipo MDR en las células transfectadas, dado que estas células presentan resistencia cruzada a fármacos y sustancias tales como puromicina, daunorubicina y doxorubicina, sustancias relacionadas con el espectro de multirresistencia de las células tumorales (Henderson y col. 1992).

Los genes que codifican la glicoproteína-P estudiados hasta el momento, presentan altamente conservada la secuencia que corresponde al dominio de unión a nucleótidos. Por ello, Ouellette y col. (1990), mediante el empleo de una sonda específica de ADNc, que contiene este dominio de unión a nucleótidos del gen MDR de células tumorales, localizó un gen homólogo, denominado gen ltpgpA o gen A. Este gen contenía 4646 nucleótidos y la fase de lectura abierta origina una proteína de 1548 aminoácidos con un

tamaño molecular de aproximadamente 172 kDa. Esta proteína es más larga que la encontrada en células tumorales de mamíferos, de aproximadamente 1280 aminoácidos (Gros y col. 1986; Chen y col. 1986). Los gráficos de hidrofobicidad muestran que el gen *ltpgpA* consta de 2 mitades similares, cada una contiene 6 dominios de transmembrana y un dominio de unión a nucleótidos (nbs), similar al del gen *mdr 1* humano que codifica para la glicoproteína-P. De los 9 posibles sitios de glicosilación, podría ser únicamente extracelular el localizado entre los fragmentos 1 y 2 del dominio transmembrana, igual a lo que sucede en la glicoproteína-P de células de mamíferos (Van der Blik y col. 1988) y en la glicoproteína-P STE6 de levaduras (Mc Grath y col. 1989).

Los aminoácidos adicionales presentes en el producto del gen *ltpgpA*, en relación con glicoproteínas-P descritas, se localizan en el extremo N-terminal, no presentando homología significativa con ninguna proteína conocida descrita en los bancos de datos. El producto de transcripción del gen *ltpgpA* tiene 5,5 kb, manteniéndose una correlación entre el nivel de expresión de este ARNm y el nivel de amplificación génica.

Todos los genes glicoproteína-P descritos hasta ahora, a excepción del gen STE6 de levaduras, forman parte de una familia de multigenes, con al menos 2 miembros. En Leishmania se ha descrito al menos 6 genes de la familia glicoproteína-P, 5 en L. tarentolae (Ouellette y col. 1991), denominados: *ltpgpA*, *ltpgpB* y *ltpgpC*, localizados en un cromosoma de aproximadamente 800 kb, y los genes *ltpgpD* y *ltpgpE*, localizados en un cromosoma de 1400 kb. El sexto gen de la familia glicoproteína-P descrito en el genoma de

Leishmania, denominado ldmdr1 se ha descrito en L. donovani resistente a vinblastina (Henderson y col. 1992).

Estudios recientes de transfección realizados por Callahan y col. (1991), empleando 4 grandes fragmentos de ADN procedentes de la región H de L. major resistente a MTX, mostraron que sólo los vectores que contenían el gen lmpgpA completo, adquirirían una resistencia significativa al arsenito (unas 10 veces más resistente) y a antimoniales trivalentes, aunque no a pentavalentes, zinc, cadmio ni a otras sustancias típicas del espectro de multirresistencia en células tumorales, como puromicina y vinblastina. Cuando se realizó la transfección empleando un fragmento de 10 kb, conteniendo el gen ltpgpA, se observó que las Leishmania transfectadas, presentaban menor resistencia (de 2 a 4 veces) a los antimoniales trivalentes que cuando se utilizó el gen lmpgpA, aunque resultaron ser algo más resistentes al arseniato (2,8 veces, comparado con 1,9 veces cuando se utilizó el gen lmpgpA).

Basados en que mutaciones puntuales en el gen mdr 1, de células de mamíferos pueden modificar el perfil de resistencia a fármacos (Azzaria y col. 1989), las divergencias existentes en la secuencia de aminoácidos entre los genes ltpgpA y lmpgpA, podrían ser las responsables de las diferencias en el patrón de resistencia a fármacos observado entre las leishmanias transfectadas con estos dos genes (Callahan y col. 1991).

Todos los datos descritos relacionan al gen ltpgpA con la resistencia descrita en Leishmania a metales pesados, similar a lo que sucede en bacterias resistentes a metales pesados, en las que existe un significativo eflujo de fármacos como arsenito, arseniato y antimonio (Mobley y

col. 1982), y en las que se ha visto la existencia de una proteína de membrana con actividad ATPasa, cuya función es similar a la glicoproteína-P (Silver y col. 1989). Sin embargo, el análisis de su secuencia y estructura muestra que la proteína ltpgpA pertenece a la familia de la glicoproteína-P (Ouellette y col. 1990), y no a las proteínas ATPasa bacterianas.

L. donovani resistente a vinblastina, que presenta el gen *ldmdr1* amplificado, que codifica para una glicoproteína-P, desarrolla resistencia cruzada a diversos fármacos y sustancias químicas típicas del fenotipo MDR (Henderson y col. 1992). Sin embargo, su fenotipo de resistencia no revierte en presencia de verapamil, al igual que ocurre en L. tarentolae resistente a MTX y L. major resistente a metales pesados (Callahan y col. 1991).

En estudios realizados en formas promastigotas de L. errietti y L. panamensis resistentes a Pentostam, y que presentan reducción en el acúmulo de fármaco, se ha demostrado la sobreexpresión de diferentes péptidos reconocidos por el monoclonal C<sub>21</sub>, (dirigido contra el dominio de citoplasmático de la glicoproteína-P). Así, en L. errietti se reconocieron 2 péptidos de 96-106 kDa y 23-25 kDa, en L. panamensis se encontraron ciertas diferencias entre 2 clones: en el clon WR-746-CL4 se sobreexpresaban péptidos de 96-104 kDa y 43-45 kDa, en cambio en el clon WR-746-CL6, los péptidos eran de 53 y 23-25 kDa. Del mismo modo, en las formas amastigotas de este parásito se detectó una proteína de 170 kDa, similar al de las células tumorales con fenotipo MDR (Grögl y col. 1991).

Para finalizar este capítulo de introducción, destacar que en general los protozoos pertenecientes al

género Leishmania, además de poder desarrollar un mecanismo de resistencia con características similares al MDR, desarrollan otros mecanismos de resistencia como son la alteración del transporte del fármaco y la amplificación de otros genes cuyas funciones no son aún bien conocidas y aunque no estén asociados al fenotipo MDR, podrían ser caminos alternativos para resistir la acción citotóxica de fármacos.

## **2. OBJETIVOS**

El objeto de la presente tesis doctoral va dirigido a conocer los mecanismos implicados en la adquisición de resistencia a Metotrexato en Leishmania tropica LRC-L39. Uno de los graves problemas a los que se enfrenta el tratamiento de las enfermedades producidas por parásitos, es la cada vez más frecuente resistencia adquirida a los fármacos habitualmente empleados en el tratamiento antiparasitario. En Leishmania no se conoce en profundidad el mecanismo de resistencia a fármacos, por ello se consideró importante el estudio de los mecanismos de resistencia a fármacos desarrollados in vitro por L. tropica resistente a Metotrexato (MTX); siendo el MTX uno de los fármacos cuyo mecanismo de acción es bien conocido, habiéndose utilizado ampliamente en los estudios de los mecanismos moleculares de resistencia a fármacos en Leishmania. En células de mamíferos se han descrito 3 posibles mecanismos de resistencia a fármacos:

- Una amplificación de los genes que codifican para las proteínas blanco de acción del fármaco.
- Cambios estructurales y/o funcionales de estas proteínas.
- Alteraciones en el transporte del fármaco.

Nuestros estudios se han centrado en determinar en L. tropica resistente a MTX, si existe o no una alteración en el transporte de fármaco, realizando estudios de captación y eflujo de MTX, así como estudios cinéticos del transporte de fármaco, al objeto de conocer si la constante de afinidad ( $K_t$ ) y/o la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) para el MTX, se encontraban alterados. Otro de los objetivos de estudio en esta tesis, es determinar si L. tropica resistente a MTX presenta un mecanismo similar al que desarrollan la células



tumorales con fenotipo multirresistente, y que se caracteriza por la amplificación y/o sobreexpresión de un gen MDR que codifica para una glicoproteína de membrana de alto tamaño molecular involucrada en el eflujo de fármacos al exterior celular, así como en la resistencia cruzada a fármacos no relacionados estructural y funcionalmente con el fármaco frente al que inicialmente se obtuvo la resistencia.

### **3. MATERIAL Y METODOS**

### 3.1.- PARASITOS Y MANTENIMIENTO DE CULTIVOS.

La cepa de *Leishmania* utilizada en nuestros estudios fué *Leishmania tropica* LRC-L39, aislada y tipificada por el Dr. L.F. Schnur (Hebrew University, Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel). El mantenimiento de las formas promastigotas de *L. tropica* en el laboratorio, se realizó a 28°C en el medio RPMI 1640 modificado (Gibco, Middlesex, U.K.) como describe (Jackson y col., 1986), y suplementado con un 20% de suero bovino fetal inactivado (SBFI) (Laboratorios Flow, U.K.).

#### Composición del medio RPMI 1640 modificado

|  |         |
|--|---------|
| RPMI 1640 (10X) _____  | 70 ml   |
| Glutamina _____  | 0.210 g |
| Hepes _____  | 0.417 g |
| Bicarbonato sódico _____   | 0.770 g |
| Solución de aminoácidos -<br>ac.orgánicos y azúcares (10X) _____ | 100 ml  |
| Solución de vitaminas (100X) _____                               | 2 ml    |
| Agua bidestilada c.s.p. _____                                    | 800 ml  |

Disueltos todos los componentes, ajustamos a un pH de 7,2 y posteriormente adicionamos 200 ml de SBFI. Se esteriliza por filtración mediante presión negativa, a través de un filtro de membrana de 0,2  $\mu$ m (Millipore, Bedford, USA).

## Solución de vitaminas (100X)

|                                |        |
|--------------------------------|--------|
| Pantotenato cálcico _____      | 10 mg  |
| Cloruro de colina _____        | 10 mg  |
| Acido fólico _____             | 10 mg  |
| I-Inositol _____               | 20 mg  |
| Clorhidrato de piridoxal _____ | 10 mg  |
| Nicotinamida _____             | 10 mg  |
| Riboflavina _____              | 1 mg   |
| Clorhidrato de tiamina _____   | 10 mg  |
| Agua bidestilada c.s.p. _____  | 100 ml |

Solución de aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares  
(10X)

|                               |         |
|-------------------------------|---------|
| Arginina _____                | 4,4 g   |
| Cistina _____                 | 0,8 g   |
| Glutamato _____               | 2,5 g   |
| Glutamina _____               | 16,4 g  |
| Prolina _____                 | 69 g    |
| L-ornitina _____              | 1 g     |
| Glucosa _____                 | 7 g     |
| Fructosa _____                | 4 g     |
| Malato _____                  | 6,7 g   |
| Alfa-ketoglutaratato _____    | 3,7 g   |
| Fumarato _____                | 0,55 g  |
| Succinato _____               | 0,6 g   |
| Agua bidestilada c.s.p. _____ | 1000 ml |

### 3.2.- FARMACOS Y SUSTANCIAS QUÍMICAS EMPLEADAS.

- Metotrexato (MTX) suministrado por Cyanamid Ibérica S.A., División Lederle, España.
- Glucantime suministrado por Rhône-Poulenc Farma, S.A., España.
- Vinblastina suministrado por Lilly S.A., España.
- Doxorubicina y daunorubicina suministrado por Farmitalia Carlo Erba, España.
- Ketoconazol, puromicina, arseniato sódico e hidrocloreuro de verapamil suministrados por Sigma Chemical Co. (San Luis, MO).
- Tricloruro de antimonio suministrados por Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania).
- Metotrexato [3,4 L-glutamil-<sup>3</sup>H]] (MTX-<sup>3</sup>H]) (48,7 Ci/mmol) suministrado por Du Pont de Nemours (Alemania).

#### Preparación de fármacos y sustancias químicas.

Puromicina, doxorubicina, daunorubicina, arseniato sódico e hidrocloreuro de verapamil. Se preparó una solución madre 1mM de cada uno de ellos, mediante disolución en el medio de cultivo.

Ketoconazol. La solución madre 1 mM , se preparó disolviendo el fármaco previamente en 200 µl de etanol absoluto y completando con agua bidestilada hasta un volumen final de 10 ml.

Glucantime. Este fármaco presentaba forma farmacéutica de inyectable a una concentración de 85 mg/ml. Esto per-

mitía adicionar directamente al cultivo las dosis a ensayar.

Tricloruro de antimonio. Se preparó una solución 25 mM en etanol absoluto.

Vinblastina. Se preparó una solución madre 1 mM disolviendo el fármaco en una solución salina de ClNa 155 mM.

MTX. Se prepararon soluciones madre de 10 y 50 mM respectivamente, a partir de una solución comercial de este fármaco, diluyendo con medio de cultivo.

Estas soluciones se prepararon el día de su uso y se esterilizaron mediante filtración, a través de filtros estériles (Sartorius), provistos de membranas con un diámetro de poro de 0,2  $\mu$ m. (Millipore, Bedford, USA).

MTX- $^3$ H. Las soluciones de esta sustancia utilizadas en el estudio del transporte de fármacos, se prepararon a partir de una solución comercial cuya concentración era 24  $\mu$ M, diluyendo en medio deficiente en folato. El medio RPMI deficiente en folato, se preparó adicionando una solución de vitaminas que no tenía ac. fólico entre sus componentes.

### 3.3.- ADAPTACION Y CULTIVO DE LOS PARASITOS.

Una vez estandarizado el cultivo de los parásitos a 28°C en medio RPMI 1640 modificado con un 20% de SBF1, se calculó el tiempo de doblaje de la población parasitaria.

Se cultivaron las formas promastigotas a partir de un inóculo inicial de  $4 \times 10^6$  células/ml de medio de cultivo y se incubaron a 28°C. Tras 24, 48 y 72 horas de cultivo, se realizaba un recuento en una cámara Haemocitométrica de Neubaver, tras un tratamiento de los parásitos con formaldehído al 0,36% en tampón fosfato salino (PBS), cuya composición es: 0,13 M NaCl, 2,6 mM KCl, 8,2 mM  $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ , 1,8 mM  $\text{KPO}_4\text{H}_2$ , ph 7,2.

Para el cálculo del tiempo de doblaje (td) de la población parasitaria, se empleó la fórmula siguiente:

$$td = \frac{t_2 - t_1}{N}$$

Siendo N, el número de generaciones en el intervalo de tiempo ( $t_2 - t_1$ ). Se calculó N por la fórmula:

$$N = \frac{\log y_2 / y_1}{\log 2}$$

Siendo  $y_1$ , el número de parásitos/ml en el tiempo  $t_1$  e  $y_2$ , el número de parásitos/ml en el tiempo  $t_2$ .

### 3.4.- INDUCCION DE RESISTENCIA A METOTREXATO.

Calculado el tiempo de doblaje de la población parasitaria, se inició la inducción de resistencia *in vitro* a MTX, mediante exposición continuada a concentraciones crecientes de fármaco como describe Coderre y col. (1983). Se seleccionó como pautas de concentración de MTX: 5, 10, 20, 50, 100, 500 y 1000  $\mu\text{M}$ . Los parásitos en un volumen de 5 ml, y a una concentración de  $4 \times 10^6/\text{ml}$  se mantenían en cultivo en presencia de MTX a la concentración de interés. El pase de una concentración a otra superior se llevaba a cabo, cuando el tiempo de duplicación fuese aproximadamente igual al de los parásitos salvajes. Esto coincidía habitualmente tras 15 generaciones de parásitos y que corresponde a su vez a 5 pases de los parásitos a medio de cultivo. Los parásitos adaptados a las concentraciones de fármacos anteriormente descritas, se criopreservan a  $-80^\circ\text{C}$  y en nitrógeno líquido.

Las líneas resistentes se denominaron MTX-R5, MTX-R10, ...MTX-R1000, en alusión a la concentración de fármaco a la que eran resistentes.

Una vez obtenida la línea resistente MTX-R1000, se determinó la Dosis Inhibitoria 50 ( $\text{DI}_{50}$ ) para el MTX, tanto en la línea salvaje como en la línea MTX-R1000.

La  $\text{DI}_{50}$  se define como la concentración de fármaco que inhibe en un 50% el crecimiento de los parásitos.

El porcentaje de inhibición del crecimiento (%I) se calculó en función de la siguiente fórmula, descrita por Osuna y col. (1983):



$$\%I = 100 \times (Nc - Np) / Nc.$$

Siendo Nc el número de organismos/ml en la línea salvaje y Np el número de organismos/ml en presencia de distintas dosis de MTX.

A partir del valor de  $DI_{50}$ , se determinaba el Índice de Resistencia (IR). El valor IR se obtiene del cociente entre la  $DI_{50}$  de los parásitos MTX-R1000 respecto a la  $DI_{50}$  de los parásitos control.

$$IR = \frac{DI_{50} \text{ MTX-R1000}}{DI_{50} \text{ control}}$$

Se obtuvieron también líneas resistentes que se denominaron MTX-R1000d, por adaptación directa de parásitos MTX-R10 a  $1000\mu\text{M}$  de MTX, como describen Dewes y col. (1986).

#### **ESTABILIDAD DE LA RESISTENCIA A MTX EN AUSENCIA DE FARMACO.**

Una vez obtenidos los parásitos resistentes MTX-R1000, quisimos conocer la estabilidad de esta resistencia en ausencia de fármaco. Para ello, se mantuvieron cultivos de parásitos MTX-R1000 en medio libre de MTX, durante 3 y 6 meses, denominando a estas líneas  $Rv_3$  y  $Rv_6$ , respectivamente. El valor de  $DI_{50}$  para el MTX a los 3 y 6 meses de cultivo, se determinó como se ha descrito anteriormente.

### 3.5.- CLONAJE EN PLACA.

El clonaje de los parásitos se realizaba en placas Petri conteniendo agarosa al 1% más medio RPMI 1640 modificado y suplementado con un 20% de SBFI.

La preparación de las placas se realizó mediante modificación del protocolo descrito por Iovannisci y col., (1983). Se prepara una solución de agarosa al 2%, se autoclava y posteriormente se mezcla a partes iguales con RPMI 2X suplementado con un 20% de SBFI (con la dosis de MTX para tener una concentración por placa de 1mM, en el caso del clonaje de la línea MTX-R1000). A continuación realizamos una serie de diluciones de los parásitos en medio de cultivo, hasta obtener una concentración de 1 organismo/ $\mu$ l de medio, sembrando por placa 200 organismos. Tras incubar estas placas a 28°C durante dos semanas, se obtuvieron varios clones tanto de la línea salvaje como de la línea MTX-R1000; estos clones posteriormente se picaron y se cultivaron en medio RPMI 1640 modificado y suplementado con un 20% de SBFI. Estos clones se criopreservan a -80°C y en nitrógeno líquido.

### **3.6.- ESTUDIO DE LA RESISTENCIA CRUZADA A OTROS FÁRMACOS Y SUSTANCIAS QUÍMICAS.**

Se estudió la resistencia cruzada de la línea MTX-R1000 a otros fármacos, no relacionados estructuralmente ni funcionalmente con el MTX. Los fármacos y sustancias químicas escogidos con este fin fueron:

- Doxorubicina, daunorubina, vinblastina y puromicina. Estos fármacos y sustancias químicas mencionadas se han descrito como inductores de fenotipo de multirresistencia (MDR) en células tumorales de mamíferos (Ling y col., 1983).

- Glucantime (Grögl y col 1992) y ketoconazol (Viallet y col., 1986). Estos, sobre todo el Glucantime, son fármacos de elección en el tratamiento de la leishmaniasis.

- Arseniato sódico (Detke y col., 1989) y tricloruro de antimonio (Callahan y col., 1991). Estas sustancias químicas no son inductoras de fenotipo MDR, pero están relacionadas con un gen de la familia MDR que confiere resistencia a metales pesados en Leishmania (Callahan y col. 1991).

El crecimiento de las líneas salvaje y MTX-R1000, se determinó después de 48 horas de incubación a 28°C en 1,5 ml de medio de cultivo conteniendo diferentes concentraciones de fármaco. El inóculo inicial fué  $4 \times 10^6$  parásitos/ml. Se calcularon los valores de  $DI_{50}$ , usando como control el crecimiento de un cultivo de parásitos en las mismas condiciones de ensayo pero en ausencia de los fármacos estudiados. Con estos valores calculamos el índice de

resistencia de la línea MTX-R1000 a los diferentes fármacos.

Se realizaron de igual modo, estudios de resistencia cruzada en la línea MTX-R1000d. Las sustancias ensayadas fueron puromicina y ketoconazol.

Igualmente, se han realizado estudios de resistencia cruzada a fármacos en las líneas Rv<sub>1</sub> y Rv<sub>2</sub>. Los fármacos y sustancias químicas empleados para este ensayo fueron : puromicina, ketoconazol, vinblastina y doxorubicina. Determinándose la  $DI_{50}$  y el IR para cada sustancia.

### 3.7.- ESTUDIO DE LA REVERSION DE RESISTENCIA EN LA LINEA MTX-R1000.

El fármaco elegido para el estudio de la reversión de la resistencia al MTX en la línea MTX-R1000, fué el hidrocioruro de verapamil, dado que se ha descrito que revierte el fenotipo MDR en células de mamíferos (Fojo y col. 1985). Previo al estudio de la reversión de la resistencia, se calculó la  $DI_{50}$  para el verapamil en las líneas salvaje y MTX-R1000. De estos datos, pudimos deducir la concentración de fármaco que nos interesaba utilizar en este estudio. La concentración de fármaco escogida fué  $15 \mu\text{M}$ , la cual afecta en no más de un 20 %, al crecimiento de los parásitos MTX-R1000. Esta dosis de fármaco, será suficiente para afectar el crecimiento celular, y nos permitirá estudiar el crecimiento de la línea MTX-R1000 expuesta a una concentración de  $9,5 \text{ mM}$  de MTX (dosis que inhibe en un 35% el crecimiento de los parásitos), en presencia de  $15 \mu\text{M}$  de verapamil. De éste modo, si existiera reversión de la resistencia, se observaría un incremento significativo de la toxicidad por el MTX, o por el contrario un efecto de inhibición del crecimiento aditivo debido a la presencia de ambos fármacos. Para este estudio se prepararon varios cultivos de parásitos MTX-R1000, partiendo de un inóculo de  $4 \times 10^6$  parásitos/ml en cada uno. Con objeto de comparar resultados, estos cultivos contenían las siguientes concentraciones de fármacos:

- $1 \text{ mM}$  de MTX.
- $9,5 \text{ mM}$  de MTX.
- $15 \mu\text{M}$  de verapamil.
- $9,5 \text{ mM}$  de MTX en presencia de  $15 \mu\text{M}$  de verapamil.

Estos cultivos se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  y a las 48 h se determinó el %I del crecimiento en cada caso.

**3.8.- TRANSPORTE DE METOTREXATO. ACUMULO Y EFLUJO.  
PARAMETROS CINETICOS DEL TRANSPORTE.**

**3.8.1.- ESTUDIO DE LA CAPTACION DE FARMACO  
POR LOS PARASITOS.**

Se ha descrito tanto en células tumorales como en parásitos, que uno de los posibles mecanismos de resistencia a fármacos es la alteración del transporte, observándose una disminución del acúmulo de fármaco en el interior celular (Fojo y col. 1985; Kaur y col. 1988).

Se estudió la incorporación de MTX-<sup>[3H]</sup> en las líneas salvaje, MTX-R1000 y Rv<sub>3</sub>, siguiendo el método descrito por Kaur y col. (1988). Para ello se incubaron los parásitos durante 24 horas a 28°C en medio RPMI modificado y deficiente en folato. Posteriormente, ajustamos igual número de parásitos para las 3 líneas, centrifugamos a 2.000 g durante 10 min y lavamos los parásitos mediante centrifugación 3 veces con PBS. El precipitado obtenido se resuspende en medio deficiente en folato hasta obtener una densidad de 10<sup>7</sup> parásitos en 100 µl de medio.

Iniciamos el estudio de la incorporación de fármaco, colocando en un tubo eppendorf y sobre 200 µl de dibutil ftalato (Sigma), 100 µl de medio de cultivo conteniendo 10<sup>7</sup> parásitos y 100 µl de una solución 200 nM MTX-<sup>[3H]</sup>. El estudio de la captación de fármaco se realizó a diferentes intervalos de tiempo: 15, 30, 60 y 120 min a la temperatura de 28°C y 0°C (como control del fármaco no incorporado al interior celular). Tras cada intervalo de tiempo se realizaba una centrifugación a 12.000 g durante 5 min, que permite a los parásitos quedar concentrados en la base del

tubo eppendorf y libre de fármaco extracelular, que quedaba localizado en la fase acuosa (sobre el dibutil ftalato). Una vez eliminada esta capa de MTX- $^3\text{H}$ , lavamos la superficie del dibutil ftalato con PBS para quitar los restos de medio radiactivo y posteriormente eliminamos el dibutil ftalato. El precipitado de parásitos se lisa con 100  $\mu\text{l}$  de Triton X-100 (Sigma) al 1% en agua bidestilada y se adiciona sobre un tubo que contiene 4 ml de líquido de centelleo (Optiphase Hifase II, LKB Wallac), midiendo en un contador de partículas  $\beta$  (1209 Rackbeta Liquid Scintillation counter, LKB Wallac) las c.p.m. (cuentas por minuto), que corresponderán al fármaco incorporado.

Se determinaron las d.p.m. (desintegración por minuto) a partir de los datos de c.p.m. obtenidos, ya que  $d.p.m. = c.p.m. \times 1/E_f$ , siendo  $E_f = c.p.m./d.p.m. = 0,5794$  (eficiencia de contaje). Los resultados obtenidos se expresan en pmoles de MTX incorporado/ $10^9$  células, para ello se hizo previamente una recta de calibrado del fármaco (d.p.m. frente a distintas concentraciones de MTX- $^3\text{H}$  expresadas en pmoles).

### 3.8.2.- ESTUDIO DE LA CINÉTICA DEL INFLUJO DE FÁRMACO

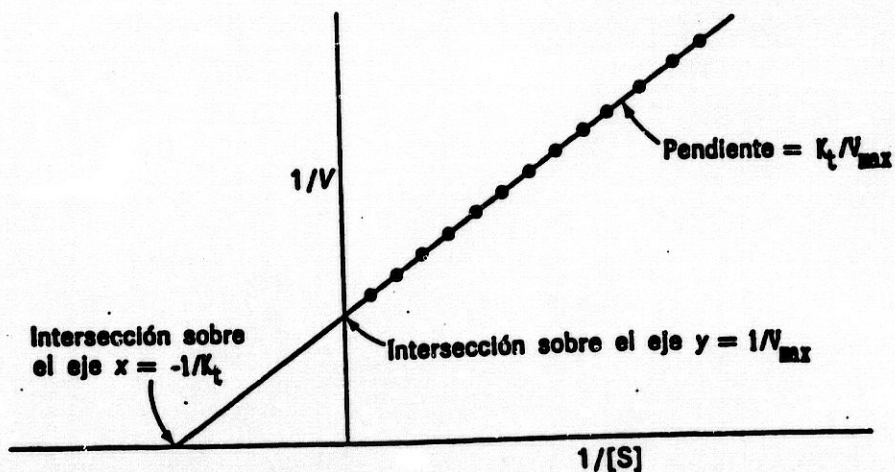
Los parámetros cinéticos de transporte se determinaron, basándonos en el análisis de Lineweaver-Burk como describe Kaur y col. (1988).

Para esta experiencia tanto los parásitos salvajes como MTX-R1000, se cultivaron 24 horas antes del estudio en medio deficiente en folato. Posteriormente, se centrifugaron a 2.000 g durante 10 min y se lavaron las células 3 veces con PBS mediante centrifugación. El precipitado se resuspende en medio deficiente en folato a una densidad de  $1 \times 10^7$  parásitos en 100  $\mu\text{l}$ .

El estudio se inició mezclando en cada tubo eppendorf 100  $\mu\text{l}$  de medio con  $1 \times 10^7$  células junto a 100  $\mu\text{l}$  de una solución de MTX- $^3\text{H}$ , colocando esta mezcla sobre 200  $\mu\text{l}$  de dibutil ftalato. Las concentraciones de MTX ensayadas fueron 0,125, 0,25, 0,5 y 1  $\mu\text{M}$ , siendo el tiempo de exposición al fármaco de 2 y 4 min. La incorporación de fármaco se finalizaba mediante centrifugación a 12.000 g durante 1 min, posteriormente recogemos los sobrenadantes, lavamos con PBS para eliminar los restos de radiactividad y una vez eliminada la capa de dibutil ftalato, lisamos el precipitado con 100  $\mu\text{l}$  de Triton X-100 al 1%. Medimos el fármaco incorporado por técnicas de centelleo líquido.

La constante de afinidad aparente ( $K_t$ ) y la velocidad máxima ( $V_{\text{max}}$ ), pueden calcularse a partir de las velocidades de incorporación del fármaco a diferentes concentraciones. Para ello representamos en el eje de ordenadas  $1/\text{pmol}/10^9$  células/minuto frente a  $1/[\text{MTX-}^3\text{H}]$  en el de abscisas, obteniendo una recta de regresión, con una ordenada en el origen igual a  $1/V_{\text{max}}$  y una pendiente  $K_t/V_{\text{max}}$ , siguiendo la ecuación siguiente:

$$1/V = 1/V_{\text{max}} + K_t/V_{\text{max}} \cdot 1/[S]$$





### 3.8.3.- ESTUDIO DEL EFLUJO DEL FÁRMACO.

La determinación del eflujo de fármaco, se realizó mediante una modificación del método descrito por Deffie y col. (1988) y consistente en :

Los parásitos correspondientes a las líneas salvaje, MTX-R1000, Rv, y Rv, se incubaron en medio RPMI modificado deficiente en folato durante 24 horas. Posteriormente, ajustamos igual número de parásitos para las 4 líneas ( $n \times 10^8$  parásitos, siendo n el número de experiencias que realizaremos), centrifugamos a 2.000 g durante 10 min, lavamos el precipitado 3 veces con PBS y se resuspende el precipitado celular en 250  $\mu$ l de medio RPMI modificado deficiente en folato, conteniendo una solución 0,25  $\mu$ M de MTX- $^3$ H]. Esta mezcla la incubamos a 28°C durante 1 hora con agitación.

La incorporación de fármaco se interrumpió por enfriamiento rápido en hielo, adicionando a continuación 1 ml de medio deficiente en folato a 4°C. Esta mezcla se trasvasa a un tubo eppendorf conteniendo 200  $\mu$ l de dibutil ftalato. Se centrifuga a 12.000 g durante 1 min y el precipitado obtenido se resuspende en medio deficiente en folato (precalentado a 28°C), para obtener una densidad de  $10^6$  células en 100  $\mu$ l de medio. A continuación se distribuyen alicuotas de 100  $\mu$ l en tubos eppendorf. El tiempo 0 del estudio del eflujo de fármaco se determinó mediante centrifugación de una alicuota de suspensión parasitaria sobre el tubo eppendorf conteniendo dibutil ftalato. Tras la centrifugación, recogemos la parte acuosa localizada sobre el dibutil ftalato, midiendo los c.p.m. que corresponden al fármaco expulsado por los parásitos en el tiempo 0.

En los demás tubos añadimos 1,2 ml de medio sobre 200  $\mu$ l de dibutil ftalato e incubamos a 28°C durante 5, 10, 30 y 60 min. Tras cada intervalo de tiempo, se introducen los tubos en hielo, se centrifugan a 12.000 g durante 1 min, quedándonos con los sobrenadantes (para calcular los c.p.m. expulsados) y lavamos 3 veces con PBS la superficie superior del dibutil ftalato. El precipitado que queda, tras eliminar el dibutil ftalato, se lisa con 100  $\mu$ l de Triton X-100 al 1%.

Medimos el fármaco expulsado al medio y el que permanece incorporado en los parásitos mediante técnicas de centelleo líquido. Los resultados se expresan en % de fármaco expulsado y % de fármaco retenido en el parásito, ya que conocemos la cantidad total de fármaco incorporado (determinación del eflujo en el tiempo 0).

### 3.9.- ESTUDIO DEL PATRON DE PROTEINAS.

Con estos estudios queremos conocer si la adquisición de resistencia a MTX en *L. tropica*, conlleva cambios en el patrón de proteínas (sobreexpresión y /o desaparición), que facilitan la adaptación del parásito al medio de cultivo en presencia de fármaco.

#### 3.9.1.- ELECTROFORESIS DE PROTEINAS.

El análisis de proteínas de los parásitos se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), según el método de Laemmli (1970).

#### Composición del gel separador.-

La concentración de acrilamida de los geles que hemos empleado en las experiencias que se describen posteriormente, fueron al 6, 8 y 10 %, según el rango de tamaño molecular de las proteínas que nos interesaba visualizar.

Composición para un volumen de 10 ml de gel:

| <u>Soluciones madre</u>           | <u>Volumen (ml)</u> |           |            |
|-----------------------------------|---------------------|-----------|------------|
|                                   | <u>6%</u>           | <u>8%</u> | <u>10%</u> |
| 30% Acrilamida 0,8% Bisacrilamida | 2                   | 2,7       | 3,3        |
| 1,5 M Tris HCl (pH 8,8), 0,4% SDS | 2,5                 | 2,5       | 2,5        |
| 10% Persulfato amónico            | 0,04                | 0,04      | 0,04       |
| Temed                             | 0,005               | 0,005     | 0,005      |
| Agua bidestilada                  | 5,5                 | 4,8       | 4,2        |

## Composición del gel almacenador.-

|                                   | Volumen (ml) |
|-----------------------------------|--------------|
| <u>Soluciones madre</u>           | <u>4,5%</u>  |
| 30% Acrilamida 0,8% Bisacrilamida | 1,5          |
| 0,5 M Tris HCl (pH 6,8), 0,4% SDS | 2,5          |
| 10% Persulfato amónico            | 0,03         |
| Temed                             | 0,01         |
| Agua bidestilada                  | 6            |

Las muestras de proteínas se trataron con igual volumen de tampón de muestra 2x (1% SDS, 10% glicerol, 0,1% azul de bromofenol, 50mM DTT, 12mM Tris HCl pH 6,8) y se desnaturalizaron hirviéndolas durante 5 min.

El tampón de electroforesis 10X utilizado contenía 0,25 M Tris, 1,92 M Glicina, 1% SDS, siendo el pH final 8,3.

Nuestras experiencias se realizaron en un equipo de electroforesis Protean II Slab Cell de Bio-Rad.

Las proteínas marcadoras de tamaño molecular utilizadas para el estudio de las proteínas separadas tras la electroforesis, fueron suministradas por Bio-Rad. Sus tamaños moleculares en kDa correspondían a las proteínas: miosina, 200;  $\beta$ -galactosidasa, 116; fosforilasa b, 97; albúmina de suero bovino, 66; ovoalbúmina, 45; anhidrasa carbónica, 31 e inhibidor de tripsina, 21.

### 3.9.2.- MARCAJE DE PROTEINAS CON METIONINA-[<sup>35</sup>S].

El marcaje metabólico de los parásitos con Metionina-[<sup>35</sup>S], se realizó incubando  $1 \times 10^8$  células /ml en solución salina de Hanks (Gibco, BRL) con  $10 \mu\text{Ci/ml}$  de Metionina-[<sup>35</sup>S] (ICN Biomedicals, actividad específica  $1143 \text{ Ci mmol}^{-1}$ ), a  $28^\circ\text{C}$  durante 2 horas en agitación. Posteriormente, lavamos los parásitos 5 veces con PBS mediante centrifugación en microfuga durante 1 min; determinándose tras el último lavado los c.p.m.

### 3.9.3.- OBTENCION DE PROTEINAS TOTALES, CITOSOLICAS Y DE MEMBRANA.

La obtención de proteínas se realizó por modificación de la técnica descrita por Meek y col. (1985).

Una vez lavadas las células (marcadas o no con <sup>35</sup>S) con PBS, se resuspenden a una concentración de  $10^8$  células/ml en tampón de lisis hipotónico (10mM Tris-ClH pH 7,4, 1mM EDTA, 5mM DTT, 1mM PMFS,  $100 \mu\text{g/ml}$  aprotinín,  $100 \mu\text{g/ml}$  leupeptín). Agitamos hasta homogeneizar y las sometemos a 3 ciclos de congelación (5 min a  $-80^\circ\text{C}$ ) - descongelación en hielo. Centrifugamos 5 segundos a 12.000 g y desechamos el precipitado (nucleos y parásitos no lisados). Del sobrenadante obtenido, separamos una alícuota significativa que constituirán las proteínas totales. El resto del sobrenadante se vuelve a centrifugar a 12.000 g durante 30 min, guardando el nuevo sobrenadante que contendrá la fracción de proteínas citosólicas. El precipitado obtenido se lava con tampón de lisis, centrifugamos a 12.000 g durante 15 min y este precipitado obtenido constituirá la fracción de

proteínas de membrana, que se resuspende en tampón de lisis con un 10% de glicerol. Las fracciones de proteínas totales, citosólicas y de membranas, se mantienen a -80°C hasta su uso.

La determinación de la concentración de proteínas en cada fracción, se llevó a cabo por el método de Lowry y col. (1951).

#### 3.9.4.- GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.

Una vez obtenidas las proteínas totales procedentes de las líneas salvajes y resistentes, se separaron 40 µg de proteínas totales de cada línea mediante electroforesis en geles SDS-PAGE al 6% de acrilamida (apartado 3.9.1). La electroforesis se desarrolló a 80 voltios, a temperatura ambiente. Tras finalizar la electroforesis, el gel obtenido se tiñó con una solución de Azul Comassie (0,2% Azul Comassie, 40% Metanol, 10% Acido acético) y posteriormente se trató con solución destefidora (10% Acido acético, 25% Metanol), hasta visualizar las proteínas teñidas por el colorante.

Igualmente, se realizaron electroforesis en geles SDS-PAGE al 8% de acrilamida de los parásitos marcados con Metionina-[<sup>35</sup>S]. Se utilizaron 200.000 c.p.m. de proteínas totales, citosólicas y de membrana, tanto de la línea salvaje como de MTX-R1000 por pocillo. La electroforesis se desarrolló a 9 mA durante toda la noche a temperatura ambiente. El gel obtenido se tiñó con una solución de Azul Comassie, para visualizar las proteínas marcadoras. Una vez teñido, se procedió a la fluorografía, para lo cual tratamos el gel 30 min con el Kit comercial Amplify

(Amhersham), secándose el gel sobre papel Whatman a 80°C durante 2 horas bajo condiciones de vacío en un secador de geles (Bio-Rad). El gel seco se sometió a exposición empleando una película Kodak X-Omat.

### 3.9.5.- ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL.

#### 3.9.5.1.- EXTRACCION DE PROTEINAS TOTALES.

La extracción de proteínas destinadas a ser analizadas por electroforesis SDS-PAGE Bidimensional, se realizó mediante extracción con fenol como describen Bauw y col.(1987). El precipitado de parásitos (aproximadamente  $3 \cdot 10^9$  organismos), se resuspende en 500  $\mu$ l de tampón de extracción (0,7 M sacarosa, 0,5 M Tris, 30 mM HCl, 0,1 M KCl, 2% 2-mercaptoetanol). A esta solución, añadimos 500  $\mu$ l de fenol e incubamos 30 min a 4°C. Esta mezcla la centrifugamos 10 min a 12.000 g, transfiriendo a un nuevo tubo las proteínas extraídas con fenol.

Posteriormente, las proteínas se dejan precipitando toda la noche a -20°C en 1 ml de tampón de precipitación (0,1 M acetato amónico en metanol). A continuación, centrifugamos a 12.000 g durante 10 min y el precipitado final se disuelve en tampón de muestra (9,5 M urea, 2% Nonidet P-40, 2% anfolitos pH 3,5-10 de Bio-Rad, 0,1 M DTT). Ajustamos la concentración final de proteína a 1  $\mu$ g/ $\mu$ l. Realizándose la determinación de la concentración de proteínas mediante el método Bradford, (1976).

Igualmente, y en el caso de parásitos marcados metabólicamente con Metionina- [ $^{35}$ S], ajustamos a una concentración final de  $1 \times 10^4$  c.p.m./ $\mu$ l. Las muestras así obtenidas se mantienen alicuoteadas a -20°C hasta su uso.

### 3.9.5.2.- PRIMERA DIMENSION: ISOELECTROFORESIS (IEF).

La separación de proteínas totales de las líneas salvaje y MTX-R1000 mediante IEF, se realizó en geles cilíndricos (18 cm de longitud y 2 mm de diámetro); cuya composición era:

|                               |            |
|-------------------------------|------------|
| Urea                          | 5,5 g      |
| 30% acrilamida                | 1,3 ml     |
| 2% bisacrilamida              | 0,52 ml    |
| 10% Nonidet P-40              | 2 ml       |
| Agua bidestilada              | 1,5 ml     |
| Anfolitos pH 3,5-10 (Bio-Rad) | 0,1 ml     |
| Anfolitos pH 5-7 (Bio-Rad)    | 0,4 ml     |
| 10% Persulfato amónico        | 10 $\mu$ l |
| Temed                         | 5 $\mu$ l  |

La cámara inferior contenía como solución de electroforesis (anolito) 0,01 M  $H_2PO_4$  y en la superior (catolito) 0,1 M NaOH. Cargamos en el gel 20  $\mu$ l de tampón de muestra y 20  $\mu$ l de tampón aislante (6M urea, 1% anfolito pH 3,5-10, 100 mM DTT, 5% Nonidet P-40) y realizamos un precorrido de los geles, comenzando a 100 voltios con incrementos de voltage cada 20 min (100 voltios cada vez) hasta alcanzar los 400 voltios, que mantenemos durante un tiempo mínimo de una hora.

Finalizado este tiempo, cargamos las muestras,  $1 \times 10^6$  c.p.m. o 100  $\mu$ g de proteínas por gel y 20  $\mu$ l de tampón aislante. A continuación se realiza el corrido del gel en las mismas condiciones del precorrido, hasta alcanzar 400 voltios que mantendremos durante 18 horas.



### 3.9.5.3.- SEGUNDA DIMENSION: ELECTROFORESIS SDS-PAGE.

Preparamos los geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida (apartado 3.9.1). Finalizada la primera dimensión extraemos los geles de los tubos cilíndricos y los sumergimos en tampón de equilibrio (60mM Tris-HCl pH 6,8, 1% SDS, 20% glicerol, 50 mM DTT), dejándolo en incubación durante 1 hora en agitación, renovando el tampón a los 30 min. A continuación situamos cada uno sobre un gel almacenador al 4,5% de acrilamida, cubriéndolo con tampón de electroforesis.

La electroforesis se realizó a 9mA durante toda la noche. Finalizada la electroforesis, teñimos con Azul Comassie para visualizar las proteínas marcadoras, realizándose una fluorografía de los geles, mediante tratamiento con la solución comercial Amplify (Amhersham) durante 30 min, posterior secado de los geles a 80°C bajo condiciones de vacío y exposición con la película a -80°.

### 3.9.5.4.- ELECTROTRANSFERENCIA A MEMBRANA.

En el caso de la segunda dimensión realizada con proteínas totales no marcadas con Metionina- $^{35}\text{S}$ , se hizo una electrotransferencia a membrana de poliviniliden difluoride (PVDF) (Millipore Bedford, USA), siguiendo la técnica descrita por Bauw y col. (1989).

Las membranas PVDF antes de su uso se cortaron al tamaño de los geles, humedeciéndose 5 min en metanol y posteriormente se lavaron durante 30 min en agua. Antes de

la transferencia, los geles de acrilamida se equilibraban durante 1 hora con 200 ml de tampón constituido por: 0,1% SDS en 50mM de ácido bórico, ajustando el pH con NaOH hasta 8. La transferencia se realizó en un aparato Trans Blot Cell (Bio-Rad) a 35v durante 8 horas, en un tampón que contenía 50 mM de ácido bórico y 50 mM de Tris. Finalizada la transferencia, lavamos la membrana 5 min con agua destilada y teñimos con Amido Black o Naphtol Blue Black al 0,1%. Desteñimos posteriormente con agua, hasta visualizar las proteínas.

### 3.9.6.- WESTERN BLOT.

Las proteínas de membrana (40  $\mu$ g) y las proteínas totales (40 $\mu$ g) procedentes de las líneas salvaje, MTX-R1000, Rv<sub>1</sub> y Rv<sub>2</sub>, se separaron en un gel SDS-PAGE al 6% de acrilamida (apartado 3.9.1). Realizándose a continuación la electrotransferencia a papel de nylon, siguiendo la técnica de Towbin y col. (1979). Las condiciones de transferencia empleadas fueron: 25 voltios durante 2 horas en un aparato Semiphor TE 70 (Hoefer scientific instruments, S. Francisco). El tampón de transferencia empleado fue: 0,025M Tris, 0,15 M Glicina, 20% Metanol, 0,1 % SDS, pH 8,3. Tras la transferencia, la membrana de nylon (Hybon-N, Amersham Corp.) se lavaba durante 5 min con el tampón de transferencia y posteriormente se incubaba a temperatura ambiente durante 12 horas con leche desnatada (5% en PBS más 0,02% de azida sódica), al objeto de bloquear la membrana. Posteriormente, se lavó varias veces con una solución de lavado constituida por 0,1% albúmina de suero bovino (BSA) y 0,1% tween 20 en PBS. A continuación, se realizaba la incubación durante 3 horas con el anticuerpo monoclonal C<sub>215</sub>, a la concentración de 2  $\mu$ g/ml en solución de lavado

(Juranka y col., 1989). Este anticuerpo monoclonal reconoce un dominio citoplasmático de la glicoproteína-P humana, siendo suministrada por el Dr. Victor Ling (Ontario Cancer Institute, Universidad de Toronto, Canadá). Para finalizar, se elimina el anticuerpo procediéndose a un lavado de la membrana con la solución de lavado antes descrita. La reacción antígeno-anticuerpo se detectó, siguiendo la técnica descrita por Bollag y col. (1991), consistente en la incubación a temperatura ambiente de la membrana durante 1 hora con peroxidasa de rábano conjugada con IgG de conejo anti-ratón (Nordic Immunol. Lab. California), siendo la dilución empleada 1:1000. Seguidamente, se lava la membrana 3 veces durante 5 min con solución de lavado y posteriormente revelamos con una solución de 1-Cl-4-naftol (20 mg disueltos en 6,7 ml de metanol, 20  $\mu$ l de agua oxigenada 30 volúmenes en 100 ml de PBS).

### **3.9.7.- MICROSECUENCIACION DE LA PROTEINA DE MEMBRANA DE 240 kDa.**

Al objeto de conocer si la proteína de alto tamaño molecular, reconocida por el anticuerpo monoclonal C<sub>219</sub>, presentaba relación en su secuencia con la glicoproteína-P humana, se realizó una microsecuenciación mediante el método descrito por Bauw y col., (1990).

#### **1.- Preparación de las muestras. Geles SDS-PAGE.**

El precipitado de parásitos MTX-R1000, previamente lavado 3 veces con solución PBS, se disolvió en tampón de muestra 1x (apartado 3.9.1), para obtener una concentración final de 40  $\mu$ g de proteínas en 10  $\mu$ l de tampón.

Se realizaron varias electroforesis en geles de SDS-PAGE, a una concentración del 6% de acrilamida (apartado 3.9.1), al objeto de separar las proteínas de alto tamaño molecular. La concentración de proteína total empleada fué de 400  $\mu\text{g}$ .

Las condiciones de la electroforesis, fueron de voltaje constante (40 v) durante toda la noche, a temperatura ambiente.

### 2.- Electrotransferencia a membrana.

El proceso de electrotransferencia a membrana se realizó al igual que se describe en el ap.9.5.4. Una vez transferidas las proteínas a la membrana y visualizadas, tras su tinción con amido black o naphtol blue black, cortamos el trozo de membrana que contiene la proteína de interés, almacenándola en un tubo eppendorf, a 4°C hasta el posterior proceso de digestión.

### 3.- Digestión.

Las piezas de membrana cortadas, se cubrían con 200  $\mu\text{l}$  de una solución bloqueante (1% de polivinilpirrolidona en metanol), dejándola en incubación durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, la mezcla bloqueante fué diluida con igual volumen de agua bidestilada, realizándose una incubación durante 10 min. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron las membranas 4 veces con agua (500  $\mu\text{l}$ ) y una sola vez con 500  $\mu\text{l}$  de tampón constituido por 0,1 M Tris HCl pH 8,5. En este tampón se mantienen en incubación durante 10 min. Eliminamos este tampón y se adiciona tampón nuevo con un volumen suficiente para cubrir

las membranas (generalmente entre 100 y 150  $\mu$ l). Sobre esto, añadimos 1 ml de solución de tripsina recién preparada (a una concentración de 1 mg/ml de agua bidestilada). La digestión se realizó a 37°C durante 6 horas. Igualmente, se realizó con otros trozos de membrana una digestión con una solución de pepsina en 0,1 M de ácido fórmico, durante 10 horas a 37°C. La mezcla de digestión fué transferida a un segundo eppendorf y las membranas (que quedaron en el primer tubo eppendorf) se lavaron con 500  $\mu$ l de ac. trifluoroacético al 12% y con agua. Todas las soluciones de lavado la recogimos también en este segundo eppendorf. Esta mezcla se mantuvo a -20°C hasta el posterior aislamiento de péptidos mediante técnicas de HPLC.

#### 4.- Separación de péptidos por fase reversa HPLC.

La mezcla de péptidos se inyectó en una columna de fase reversa (0,46x25 cm, Vydac Separation Group, USA), usando un Hewlett Packard Ti 1050 series HPLC. Los péptidos se separaron por un incremento lineal de gradiente de acetonitrilo en 0,1% de ac. trifluoroacético, hasta alcanzar un 70% de acetonitrilo a los 70 min (flujo 1ml/min, 1%/min). Los péptidos eluidos fueron detectados por U.V. a 214 nm y recogidos en tubos eppendorf. Se mantuvieron a -20°C previamente a su secuenciación.

#### 5.- Secuenciación de péptidos.

Los péptidos fueron seleccionados para el análisis de su secuenciación en función de la altura de los picos identificados en la gráfica obtenida tras la separación de péptidos por HPLC. La secuenciación de péptidos se realizó en un aparato 473A Protein Sequencer (Applied Biosystems).

### 3.10.- ACIDOS NUCLEICOS.

#### 3.10.1.- ESTUDIO DE ADN.

##### 3.10.1.1.- AISLAMIENTO DE ADN.

El ADN total de los parásitos se aisló siguiendo el método que describen Coderre y col. (1983). Para ello, partimos de un cultivo con un volumen total de  $10^9$  parásitos, en fase logarítmica de crecimiento. Tras centrifugación a 2.000 g durante 15 min, el precipitado celular se lisa mediante adición de 4 ml de tampón A (0,2 M Tris-HCl pH 8, 0,1 M EDTA), a los que se añadió 100  $\mu$ g de proteinasa K por cada ml de tampón (Sigma) y 0,2 ml de SDS al 10%, dejando esta mezcla a temperatura ambiente durante toda la noche.

#### **Extracción.-**

La extracción del ADN se realizó adicionando, a la solución antes descrita, 0,8 ml de 5 M de NaCl y 5 ml de solución 1:1 cloroformo-isoamílico (24:1)/ fenol saturado con tampón A. Agitamos por inversión durante 15 min, centrifugando a 2.000 g durante 5 min. La fase superior se transfiere a un nuevo tubo, repitiendo el proceso una vez más. A continuación, se realiza una extracción adicionando, a la fase acuosa recogida, un volumen igual de cloroformo-isoamílico (24:1) y posterior centrifugación a 2.000 g durante 5 min, al objeto de poder retirar los posibles restos de fenol. La fase acuosa obtenida se recoge y transfiere a un nuevo tubo para continuar el proceso de aislamiento de ADN.

### **Precipitación.-**

La precipitación se realizó añadiendo 2 volúmenes de etanol absoluto (almacenado a -20°C), dejándose bien toda la noche a -20°C o bien 30 min a -80°C. Centrifugamos 10 min a 18.000 g a 4°C y retiramos el sobrenadante.

El precipitado se resuspende en 4 ml de tampón TE (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA), adicionándole 4 µl de RNasa A de pancreas bovino (10 mg/ml) (Boehringer Mannheim). Dejándolo en incubación durante toda la noche a temperatura ambiente. Repetimos el proceso de extracción y precipitación con etanol. El precipitado final se resuspende en agua bidestilada estéril y se mantiene alicuoteado a -20 °C hasta su uso.

La determinación de la concentración de ADN se realizó espectrofotométricamente. Ajustamos la Densidad óptica (DO) a la longitud de onda de 260 y 280 nm. Sabiendo que para una concentración de ADN de 1 mg/ml la DO a 260 nm es 20, podemos saber la concentración de ADN de la muestra problema.

$$\text{mg/ml} = \text{DO } 260 \text{ nm} \times 1 \text{ mg/ml} \times (\text{factor de dilución})/20.$$

La determinación de la DO a la longitud de onda de 280 nm y la subsiguiente relación DO 260/DO 280 es indicativa del grado de pureza del ADN, debiendo de estar comprendida entre los valores 1,8 y 2, para que el ADN pueda considerarse con un grado de pureza óptimo.

### 3.10.1.2.- DIGESTION DEL ADN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN.

El ADN aislado de las líneas salvaje y MTX-R1000, fué digerido con las endonucleasas de restricción EcoRI y BamHI (Boehringer Mannheim) .

En un tubo eppendorf estéril se añadió en este orden, agua bidestilada estéril, suficiente para una mezcla de reacción final de 30  $\mu$ l, ADN a digerir (aproximadamente 6  $\mu$ g por digestión), 3  $\mu$ l del tampón 10X, específico para el enzima de restricción y 1  $\mu$ l de enzima de restricción (8-12 U/ml) . Esta mezcla se incubó durante 2 horas a 37°C. Para parar el proceso de digestión, se adicionó 5  $\mu$ l de solución de muestra 6X (0,25% Xylene cianol, 0,25% azul de bromofenol, 30% glicerol) .

### 3.10.1.3.- ELECTROFORESIS DE ADN.

Una vez digerido el ADN de las líneas salvaje y MTX-R1000 con las endonucleasas de restricción, se realiza una electroforesis en geles de agarosa al 1% en TBE (8,9 mM Tris, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA, pH 8,4), siendo el tampón de electroforesis empleado el TBE y las condiciones de desarrollo de 35 voltios durante toda la noche, a temperatura ambiente.

Los marcadores de tamaño molecular utilizados (0,2  $\mu$ g/pocillo) fueron:

- ADN del fago Lambda digerido con la endonucleasa de restricción Hind III (Boehringer Mannheim) y cuyos fragmen-



tos presentaban un tamaño molecular de 23.130, 9.416, 6.557, 4.361, 2.322, 564, y 125 pares de bases (pb).

- ADN de la forma replicativa del Fago  $\Phi$ X174 digerido con la endonucleasa de restricción Hae III, cuyos fragmentos presentaban un tamaño molecular de 1.353, 1.078, 872, 603, 310, 271, 234, 194, 118, 72 pb.

Finalizada la electroforesis, se tiñó el gel durante 30 min con Bromuro de Etidio a una concentración final de 0,5  $\mu$ g/ml, lavándose posteriormente durante 15 min con agua bidestilada y visualizándose con luz ultravioleta el estado del ADN.

#### **3.10.1.4.- TRANSFERENCIA E INMOVILIZACION DE ADN A SOPORTES SOLIDOS. "SOUTHERN-BLOT".**

La transferencia del ADN, separado mediante electroforesis en geles de agarosa, a una matriz inmovilizante, se realizó según la técnica descrita por Southern (1975).

EL ADN debe degradarse parcialmente para aumentar la eficiencia de la transferencia. La irradiación de luz ultravioleta, procedimiento habitualmente empleado para ver el estado del ADN en el gel, contribuye a fragmentar el ADN, previamente al tratamiento del gel antes de la transferencia.

A continuación tratamos el gel con un ácido diluido (0,25 M HCl), durante 15 min para depurinizar el ADN. El enlace fosfodiéster de sitios donde se ha perdido la base es muy sensible al álcali, por lo que el ADN se degrada al desnaturalizarlo. Con este fin, tras lavar el gel con agua

destilada, añadimos una solución desnaturalizante (0,25 M NaOH, 1,5 M NaCl) e incubamos durante 30 min. Posteriormente lavamos de nuevo con agua destilada e incubamos 30 min con un tampón neutralizante (1M Tris-HCl pH 7,2, 1,5 M NaCl). La transferencia del ADN, desde los geles de agarosa a membranas de nylon Hybon-N (Amersham Corp), se realizó durante toda la noche por capilaridad en tampón citrato salino (20xSSC), cuya composición es: 3M NaCl, 0,3 M Citrato sódico, pH 7. Una vez terminada la transferencia lavamos la membrana de nylon 5 min con 2XSSC, lo dejamos secar 1 hora a temperatura ambiente y fijamos el ADN durante 5 min con luz ultravioleta a una longitud de onda de 360 nm.

#### 3.10.1.5.-CARACTERISTICAS DE LAS SONDAS EMPLEADAS.

Las sondas empleadas en el estudio del reconocimiento de genes de la familia glicoproteína-P, fueron suministradas por el Dr. Marc. Ouellette (Laboratorio y Servicio de infectiología, Centro hospitalario de la Universidad de Laval, Quebec, Canadá) y han sido descritas por Ouellette y col. (1990-1991). El mantenimiento de los plásmidos conteniendo las diferentes sondas que se han empleado, se realiza en las células hospedadora Escherichia coli HB101.

##### nbsA.

Esta sonda ha sido aislada, por el Dr. M. Ouellette, a partir del gen ltpppA, localizado en un locus cromosómico de L. tarentolae, denominado H. Es una sonda que reconoce el primer dominio de unión a nucleótidos de la familia glicoproteína-P, siendo por consiguiente una sonda inespe-

cífica que reconoce a todos los genes de esta familia. La sonda corresponde a un inserto de 850 pb PstI del primer dominio de unión a nucleótidos, clonado en el vector pGEM 3ZF.

**pA.**

Es una sonda específica para el gen ltppgA de L. tarentolae; ha sido aislada de la región H del genoma de Leishmania. El plásmido, denominado pA, comprende un inserto de 400 pb BamHI-PstI del gen ltppgA, clonado en el vector pGEM 3ZF.

**pE.**

Es una sonda específica para el gen ltppgE de L. tarentolae. El plásmido, denominado pE, comprende un inserto de 1,25 kb PstI- BamHI del gen ltppgE, clonado en el vector pGEM 3ZF. Para obtener la sonda específica, digerimos con las endonucleasas de restricción PstI - Ava I, aislándose un fragmento de 300 pb.

**pD.**

Es una sonda específica para el gen ltppgD de L. tarentolae. El plásmido, denominado pD, comprende un inserto de 4,7 kb SacI que contiene el gen ltppgD, clonado en el vector pGEM 3ZF. Para obtener la sonda específica digerimos con la endonucleasa de restricción AvaI y aislamos un fragmento de 800 pb.

**4pB+C.**

Es una sonda específica de los genes ltppgB y ltppgC de L. tarentolae. El plásmido, denominado 4pBC, comprende

un inserto de 150 pb HindIII-EcoRV del gen ltppp B, clonado en HindIII-SmaI del vector pGEM 3ZF. Para obtener el inserto, digerimos con las endonucleasas de restricción HindIII y EcoRI.

#### pTCS-tubulina.

Es una sonda específica del gen  $\beta$ -tubulina de Trypanosoma cruzi, cepa Y. El plásmido pUC 13 comprende el inserto de 400 pb EcoRI-HindIII del gen  $\beta$ -tubulina. Esta sonda fué suministrada por el Dr. Antonio Gonzalez (Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", C.S.I.C.) y ha sido descrita por Gonzalez y col. (1984).

#### pKTDLEM.

Es una sonda específica para el gen que codifica el enzima Dihidrofolato reductasa-Timidilato sintasa (DHFR-TS) de L. tropica, conteniendo toda la secuencia codificante para este gen. El plásmido pKK223.3, comprende el inserto de 1560 pb EcoRI-HindIII (pKTDLEM). La célula hospedadora empleada para su mantenimiento es E. coli  $\chi$  2913. Esta sonda fué suministrada por el Dr. Luis M. Ruiz (Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", C.S.I.C.).

#### 3.10.1.6.- AISLAMIENTO DE ADN PLASMIDICO.

El crecimiento de la cepa bacteriana hospedadora en la que mantenemos los plásmidos que contienen las distintas sondas (descritas en el apartado anterior 3.10.1.5.), se realizó en 15 ml de medio LB con una concentración de ampicilina de 100  $\mu$ g/ml, a 37°C durante toda la noche en agitación.

La composición del medio LB es la siguiente:

|                         |       |         |
|-------------------------|-------|---------|
| Bactotripton            | _____ | 10 g    |
| Extracto de levadura    | _____ | 5 g     |
| NaCl                    | _____ | 5 g     |
| Agua bidestilada c.s.p. | _____ | 1000 ml |

Disuelto todos los componentes se esteriliza en el autoclave y se conserva a 4°C.

El aislamiento del ADN plasmídico se realizó siguiendo el método de lisis alcalina descrito por Maniatis y col. (1982).

Una vez aislado el ADN plasmídico, se realiza una digestión del ADN con los enzimas de restricción descritos en el apartado anterior, adecuado para cada sonda, y posteriormente se separan los fragmentos resultantes de la digestión mediante electroforesis en geles de agarosa (al porcentaje de concentración apropiado según el tamaño del fragmento que se desee aislar). Seguidamente, teñimos el gel con una solución de Bromuro de etidio 0,5 µg/ml durante 30 minutos, con el fin de visualizar el fragmento que contiene la sonda que nos interesa.

A continuación purificamos el fragmento de ADN que contiene la sonda que nos interese, mediante el empleo del kit Gene clean (Biotecnología, AMS).

#### 3.10.1.7.- MARCAJE RADIOACTIVO DE LAS SONDAS.

Las sondas de ADN se marcaron con [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP (3000 Ci/mmol, ICN Biomedicals), por el método "Random Primer" (Feinberg y col., 1983).

Esta técnica está basada en la hibridación de una mezcla de todos los posibles hexanucleótidos con el ADN que queremos marcar. La cadena complementaria se sintetiza a partir del 3'-OH terminal del random hexanucleótido primer mediante la acción del enzima Klenow. Este enzima Klenow es un fragmento de una ADN polimerasa de *E. coli*, que carece de actividad exonucleasa 5'—> 3'.

Para el marcaje hemos utilizado el Kit Random Primer de Boehringer Mannheim.

El ADN a marcar (100 ng) se desnaturaliza por calor a 95°C, durante 10 min y posteriormente se enfria en hielo. A continuación, para iniciar el marcaje del ADN adicionales:

|                               |       |        |
|-------------------------------|-------|--------|
| dATP (0,5 mmol/l)             | _____ | 1 µl   |
| dGTP (0,5 mmol/l)             | _____ | 1 µl   |
| dTTP (0,5 mmol/l)             | _____ | 1 µl   |
| Mezcla de hexanucleótidos 10X | _____ | 2 µl   |
| dCTP ( <sup>32</sup> P)       | _____ | 50 µCi |
| Enzima Klenow (2 U/µl)        | _____ | 1 µl   |
| Agua bidest.estéril c.s.p.    | _____ | 20 µl  |

La mezcla radiactiva se incubó a 37°C durante 1 hora. Para obtener el ADN marcado, tratamos con 50 µl de fenol (saturado con Tris-HCl 0,1 M pH 8). Se adiciona a la fase acuosa recogida, 2 µl de tRNA [10 mg/ml], 7,2 µl LiCl 10 M y 150 µl de etanol absoluto (-20°C) y se deja precipitando a -80°C durante un tiempo mínimo de 1 hora. Centrifugamos a 12.000 g durante 10 min a temperatura ambiente y el ADN marcado precipitado se lava con etanol al 70%. Tras la evaporación del etanol, se resuspende el ADN en 100 µl de TE 1X.

La eficiencia del marcaje se determina midiendo los c.p.m. en 1  $\mu$ l del ADN marcado, mediante técnicas de centelleo líquido.

### 3.10.1.8.- HIBRIDACION DEL ADN CON SONDAS.

Los filtros de nylon se incuban durante 2 horas a 42°C con una solución de hibridación, constituida por 50% formamida, 5x solución Denhart (1% ficoll tipo 400, 1% polivinilpirrolidona, 1% albúmina bovina fracción V), 5x SSC y 100  $\mu$ g/ml de ADN de espermatozoos de salmón, previamente desnaturalizado a 95°C durante 10 min. El volumen de solución utilizado fué el correspondiente a 0,2 ml por cm<sup>2</sup> de filtro, relación descrita por Maniatis y col. (1982).

A continuación, los filtros fueron hibridados con la sonda radiactiva, previamente desnaturalizada por calentamiento a 95°C durante 5 minutos (a la concentración de 10<sup>6</sup> c.p.m./ml de solución de hibridación), siendo el volumen de solución utilizado 0,05 ml por cada cm<sup>2</sup> de filtro. El tiempo mínimo de hibridación fué de 18 horas a 42°C. La sonda radiactiva utilizada fué la descrita en el apartado 3.10.1.5. para el gen ltpgpE. Tras el proceso de hibridación, los filtros se lavan con 2x SSC y 0,1% SDS, 2 veces durante 20 minutos a 42°C. Tras el lavado, se seca el filtro y se expone a una película autorradiográfica a -80°C durante 2 días.

Posteriormente, los filtros se deshibridaron mediante tratamiento a 45°C durante 30 min con 0,4 M de NaOH, y posteriormente durante 15 min con 0,1x SSC, 0,1% SDS y 0,2 M Tris HCl pH 7,5. Estos filtros deshibridados, y tras comprobar la ausencia de la sonda radiactiva anterior (median-

te exposición con una película autorradiográfica), se volvieron a hibridar con dos sondas también descritas en el apartado 3.10.1.5: pKTDLEM y pTCS-tubulina.

La sonda para el gen DHFR-TS de L. tropica se empleó para estudiar tanto en los parásitos salvajes como resistentes el número de copias del gen DHFR-TS, blanco de acción de fármaco. Mientras que, la sonda para el gen  $\beta$ -tubulina se empleó para normalizar en los Southern, la cantidad de ADN de los parásitos salvajes y MTX-R1000.

### 3.10.2.- ESTUDIO DE ARN.

#### 3.10.2.1.- AI SLAM IENTO DE ARN.

En el proceso de aislamiento de ARN se requiere que todo el material a emplear haya sido tratado previamente con una solución acuosa conteniendo dietil pirocarbamato (DEPC) al 0,2%, con objeto de inactivar al enzima ribonucleasa (RNasa). Igualmente, las diferentes soluciones y tampones deben contener en solución DEPC al 0,2%, dado que mínimas cantidades de RNasa son suficientes para degradar el ARN. Posteriormente tanto el material como las soluciones y tampones se autoclavan, con el fin de eliminar los restos de DEPC.

El aislamiento del ARN total se realizó a partir de un cultivo de parásitos en fase logarítmica de crecimiento con una densidad de  $10^9$  células. Tras centrifugación a 2.000 g durante 10 min, el precipitado celular se homogeneizó con 4 ml de un tampón de desnaturalización (4M de tiocianato de guanidina, 25 mM citrato sódico pH 7, 0,1 M 2-mercaptoetanol, 0,5% N-lauril sarcosín), siguiendo el método descrito por Chomczynski y col. (1987).



El homogeneizado se mezcló con 0,4 ml de 0,2 M de acetato sódico, pH 4, 4 ml de fenol, y 0,8 ml de cloroformo/alcohol isoamílico (49:1). La solución obtenida se centrifugó a 10.000 g durante 20 minutos a 4°C. En este proceso, la fase acuosa obtenida contiene el ARN total, quedando separado de las proteínas y del ADN, localizadas en la interfase y en la fase orgánica.

Precipitamos el ARN con 1 volumen de isopropanol 100% a -20°C. El precipitado obtenido tras centrifugar durante 10 minutos, se redisuelve en el tampón de desnaturalización, previamente descrito. La solución se vuelve a precipitar con isopropanol, lavándose finalmente con etanol al 70% (mantenido a -20°C). El precipitado final lo resuspendemos en agua bidestilada estéril tratada con DEPC. Las muestras alicuoteadas se mantienen a -80°C hasta su empleo.

#### 3.10.2.2.- AISLAMIENTO DE ARN POLY A\*

El ARN poly A\* se aisló a partir de ARN total mediante cromatografía por columna de oligo(dT) celulosa, siguiendo el método descrito por Aviv y col. (1972).

Preparamos la columna de oligo(dT) celulosa sobre una jeringa de 2 ml de capacidad, lavada previamente con 5 M de NaOH y seguidamente con agua bidestilada estéril (tratada con DEPC). A continuación, añadimos 0,2 g de oligo(dT) celulosa (Boehringer Mannheim), resuspendida en 1 ml de 0,1 M de NaOH. Lavamos la columna con agua bidestilada estéril, dejando que sedimente el oligo(dT) celulosa. Posteriormente, equilibramos con tampón de llenado (0,5 M LiCl, 10mM Tris-HCl pH 7,5, 1mM EDTA, 0,1% SDS). El ARN se calienta a

70°C durante 10 minutos y le añadimos LiCl hasta una concentración de 0,5 M. Hacemos pasar la solución con el ARN a través de la columna y lavamos con una solución constituida por 0,15 M LiCl, 10 mM Tris HCl pH 7,5, 1mM EDTA, 0,1% SDS. El eluido recogido se pasa dos veces más por la columna, para asegurarnos que todo el ARN poly A<sup>+</sup> quedó unido a oligo(dT) celulosa. Posteriormente, se lava la columna de nuevo con solución de lavado. Seguidamente, recogemos el eluido originado al hacer pasar por la columna 2 mM EDTA, 1% SDS. Este eluido contiene el ARN poly A<sup>+</sup>. Volvemos a equilibrar la columna con tampón de llenado y repetimos la selección de ARN poly A<sup>+</sup>, para eliminar posibles contaminantes de ARN poly A<sup>+</sup>. Una vez obtenido el ARN poly A<sup>+</sup>, ajustamos la concentración de sal a 0,3 M de acetato sódico y lo precipitamos con etanol absoluto (-20°C), durante toda la noche a -20°C. A continuación, recogemos el precipitado por centrifugación a 18.000 g durante 30 minutos a 4°C y lo resuspendemos en tampón TE 1x (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1mM EDTA). La concentración de ARN poly A<sup>+</sup> se determinó midiendo su absorbancia a 260 nm, conociendo que una densidad óptica de 25 corresponde a una concentración de 1 mg/ml de ARN.

### 3.10.2.3.- ELECTROFORESIS DE ARN.

La electroforesis de ARN poly A<sup>+</sup> procedente de las líneas salvaje y MTX-R1000, se realizó en geles de agarosa al 1% conteniendo 2,2 M de formaldehído y MNE 1x. La composición del tampón MNE 10x descrita por Maniatis y col. (1982) es: 0.2 M de Ac. Morfilinopropano sulfónico, 50 mM de Acetato sódico, 10 mM de EDTA, en agua bidestilada tratada con 0,2% de DEPC, pH 7,4.

Las muestras de ARN poly A<sup>+</sup> (7 µg) se trataron con 20 µl de tampón de muestra, cuya composición es: 0,5 ml de formamida desionizada, 0,2 ml de formaldehído, 0,2 ml de MNE 10x y 0,1 ml de agua tratada con DEPC, pH 7,4. Esta mezcla se calienta durante 15 minutos a 55°C, adicionándole 1 µl de bromuro de etidio al 1% y 3 µl de solución de la muestra 6x descrito en el apartado 3.10.1.2. La electroforesis se realizó en el tampón MNE 1x, a 70 voltios durante 3 horas.

Los marcadores de ARN empleados fueron suministrados por la casa comercial Promega, siendo los tamaños moleculares de 9.488, 6.225, 3.911, 2.800, 1898, 872, 562 y 363 nucleótidos (nt).

#### **3.10.2.4. - TRANSFERENCIA DE ARN A SOPORTE SOLIDO. "NORTHERN BLOT".**

La transferencia de ARN a soporte sólido se realizó según describe Maniatis y col. (1982) y según la descripción realizada en el apartado 3.10.1.4; modificando solo las soluciones empleadas en el tratamiento del gel previo al montaje de la transferencia. El ARN es muy sensible a la presencia de ácido, por ello el gel no se tratará con HCl, como sucedía en el caso del Southern blot. En este caso, el tratamiento se realizó con 50 mM de NaOH como solución desnaturizante y 0,1 M de Tris-HCl pH 7,5 como tampón neutralizante.

### 3.10.2.5.- HIBRIDACION DEL ARN CON SONDAS.

La membrana de nylon una vez seca, se hibridó con todas las sondas específicas para los genes: ltpgpA, ltpgpB y C, ltpgpE y ltpgpD, descritas en el apartado 3.10.1.5., siguiendo el mismo método descrito para el Southern blot (Apartado 3.10.1.7).

Posteriormente, este filtro se deshibridó mediante lavado durante 1-2 h a 65°C con el tampón: 0,005 M Tris-HCl pH 8, 0,002 M Edta Na, y 0,1x de solución Denhardt's. A continuación, lo volvimos a hibridar con la sonda para el gen  $\beta$ -tubulina de Trypanosoma cruzi, cepa Y (descrita en el apartado 3.10.1.5.), al objeto de normalizar la cantidad de ARN poly A<sup>+</sup> de los parásitos salvajes y MTX-R1000.

### 3.10.3.- LOCALIZACION CROMOSOMAL.

#### 3.10.3.1.- PREPARACION DE LOS BLOQUES DE AGAROSA.

La preparación de los bloques de agarosa de la línea salvaje y resistente, se realizó siguiendo el método de Garvey y col. (1986).

Cada bloque debe contener aproximadamente 24  $\mu$ g de ADN ( $8 \times 10^7$  células por bloque). Para su obtención, se partió de un cultivo en fase exponencial de crecimiento. Se centrifugaron a 2.000 g a 4°C durante 10 minutos y se lavaron 3 veces con PBS. Se ajusta el volumen final teniendo en cuenta que cada molde puede contener 0,6 ml, de los cuales 0,3 ml corresponden a PBS y 0,3 ml a agarosa de bajo punto de fusión (L10-Rad) al 1,2% en PBS. Los bloques, una vez

enfriados a 4°C, se cogen con una espátula y se depositan en el tampón de digestión (0,5 M EDTA pH 9, 1% n-lauril sarcosina sódica, 1 mg/ml Proteinasa K). Los bloques se incubaron en este tampón durante 2 días a 50°C, posteriormente se lavan 3 veces con 0,2 M EDTA pH 8, con un tiempo entre lavado de 2 a 3 horas. Los bloques en este tampón se mantienen a 4°C hasta su uso.

Como marcadores cromosómicos, se emplearon los cromosomas de levadura Sacharomyces cerevisiae S-13. Para preparar los bloques se siguió el método descrito por Carle y col. (1985). Crecemos células a 28°C en 10 ml de medio YPD (1% de extracto de levadura, 2% peptona, 2% dextrosa), hasta alcanzar la fase estacionaria. Se lavaron 2 veces una densidad de células de  $4 \times 10^{10}$  células con 0,05M EDTA pH 7,5, y se resuspenden en 1 ml de esta solución. Por cada 300  $\mu$ l de suspensión de células, añadimos 100  $\mu$ l de una solución que contiene el enzima zymolasa (2 mg/ml en 0,01 M fosfato disódico, conteniendo 50% glicerol). Ponemos la mezcla a incubar a 37°C durante 15-20 minutos y posteriormente se adiciona un volumen igual al de la mezcla, de agarosa de bajo punto de fusión al 1%. Con esta mezcla llenamos los moldes y se dejan enfriar a 4°C. Sacamos los bloques con la ayuda de una espátula y lo colocamos en tampón LET (0,5M EDTA, 0.01M Tris pH 7,5 y 7,5% 2-mercaptoetanol), a 37°C durante toda la noche. A continuación, los bloques de agarosa se incuban durante toda la noche a 50°C en tampón NDS (0,01 M Tris, 0,5 M EDTA, 1% lauril sarcosina pH 9,5) más 1 mg/ml de proteinasa K. Los bloques se mantienen en este tampón a 4°C hasta su empleo.

### 3.10.3.2.- ELECTROFORESIS EN CAMPO PULSANTE . CHEF .

Esta técnica permite la separación de los cromosomas del parásito mediante la aplicación de pulsos de campos eléctricos de dirección variable (Chu y col., 1986).

Las muestras de ADN cromosómico se separaron en geles de agarosa al 1,5% (P/V) en TBE 0,5x. Para cargar las muestras en el gel, se introdujeron los bloques en los pocillos, sellándose posteriormente con agarosa al 1%. A continuación, el gel se sumerge en el tampón de electroforesis (TBE 0,5x). Tras varios ensayos experimentales, se seleccionaron las condiciones de desarrollo, que permitía separar los cromosomas de gran tamaño. La electroforesis se desarrolló a 150 voltios, y la inversión del campo eléctrico se realizó cada 100 segundos durante 12 horas, 200 segundos durante 24 horas y 300 segundos cada 12 horas. El aparato utilizado fué un Pulsaphor Plus <sup>TM</sup>System (Pharmacia, LKB, Modelo 2015). Finalizada la electroforesis, y al objeto de observar los cromosomas, el gel se tiñó con Bromuro de Etidio a una concentración de 0,5 µg/ml durante 30 min. Los tamaños moleculares de los cromosomas de Sacharomyces cerevisiae que se emplearon como marcadores fueron : 198, 225, 311, 495, 635, 709, 763, 835, 864, 948, 948, 991, 1.047, 1.146, 1.285, 1.570, 2.194 kb.

La transferencia del ADN cromosómico a membranas de nylon, se realizó según la metodología descrita para el Southern (apartado 3.10.1.4.). Posteriormente, se hibridó la membrana con la sonda específica para el gen ltpgp E siguiendo la metodología escrita en el apartado 3.10.1.7., con objeto de llevar a cabo la localización cromosomal del gen ltpgp E.

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1.- INDUCCION, SELECCION Y ESTABILIDAD DE *L. tropica* RESISTENTE IN VITRO A MTX.

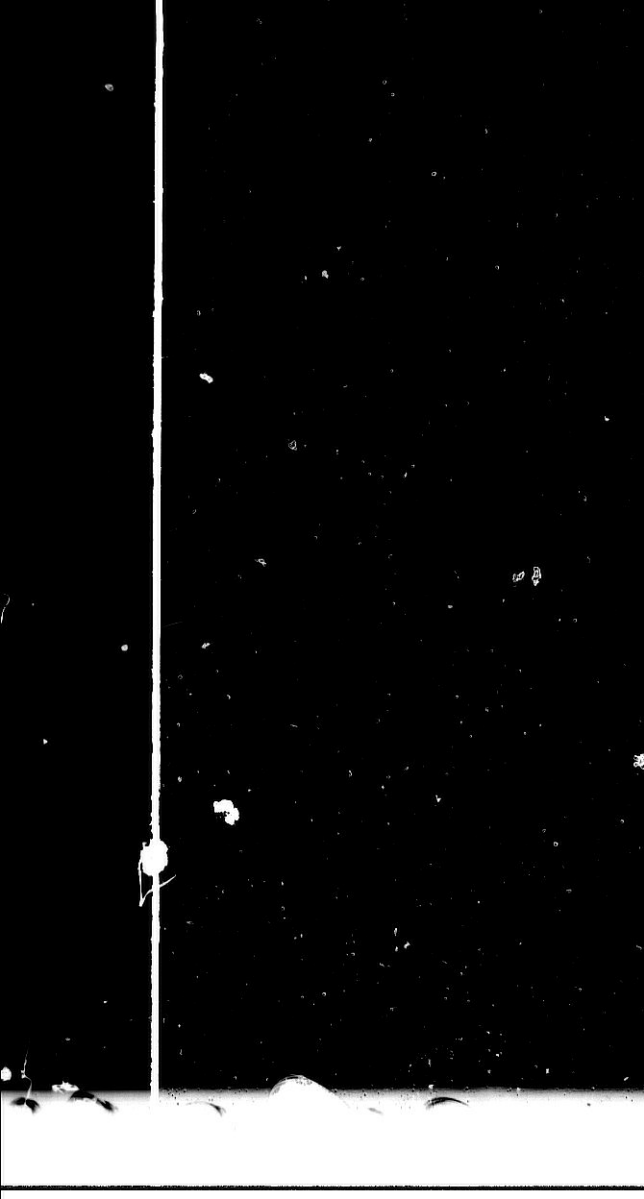
La obtención de *L. tropica* resistente in vitro a MTX, se realizó de 2 formas: A) mediante exposición continuada a concentraciones crecientes de fármaco, comenzando con una concentración de 5  $\mu\text{M}$ , y B) mediante exposición directa de los parásitos (resistentes a 10  $\mu\text{M}$  de MTX) a 1000  $\mu\text{M}$  de MTX.

Con respecto a la obtención de parásitos resistentes siguiendo la modalidad A, observamos que los parásitos mostraban a esta concentración, un crecimiento inicial lento, pero el crecimiento celular se normalizaba después de 5 pases (3 generaciones cada pase) en medio fresco, conteniendo la misma concentración de fármaco. Lo mismo ocurrió cuando los parásitos se exponían a concentraciones crecientes de fármaco, hasta obtener los parásitos adaptados al crecimiento en presencia de 1000  $\mu\text{M}$  de MTX y que denominamos MTX-R1000.

Los parásitos resistentes MTX-R1000, presentaban un tiempo de doblaje similar al observado en la línea salvaje que no había sido expuesta al fármaco (22 y 23 horas en las líneas salvaje y MTX-R1000, respectivamente), (Fig. 3). El tiempo requerido para inducir la resistencia a la máxima concentración de MTX (1000  $\mu\text{M}$ ) fué 188 días (Fig. 4).

Los valores de la  $\text{DI}_{50}$  para el MTX tanto de las líneas salvaje como MTX-R1000 fueron de 20  $\mu\text{M}$  y 15,9 mM, respectivamente. Este valor nos permitió hacer un estudio comparativo de las susceptibilidades de ambas líneas y deter-







4.5

5.0

5.6

6.3

7.1

8.0

9.0

10

11.2

12.5

14

16

18

20

22.4

25

28

31.5

36

40

45

50

56

63

71

80

90

100

2.8

3.2

3.6

4.0

4.5

5.0

5.6

6.3

7.1

8.0

9.0

10

11.2

12.5

14

16

18

20

22.4

25

2.5

2.2

2.0

1.8

1.6

MICROCOPY RESOLUTION TEST CHART  
NATIONAL BUREAU OF STANDARDS  
STANDARD REFERENCE MATERIAL 1010a  
(ANSI and ISO TEST CHART No. 2)

#### 4.1.- INDUCCION, SELECCION Y ESTABILIDAD DE *L.tropica* RESISTENTE IN VITRO A MTX.

La obtención de *L. tropica* resistente in vitro a MTX, se realizó de 2 formas: A) mediante exposición continuada a concentraciones crecientes de fármaco, comenzando con una concentración de 5  $\mu\text{M}$ , y B) mediante exposición directa de los parásitos (resistentes a 10  $\mu\text{M}$  de MTX) a 1000  $\mu\text{M}$  de MTX.

Con respecto a la obtención de parásitos resistentes siguiendo la modalidad A, observamos que los parásitos mostraban a esta concentración, un crecimiento inicial lento, pero el crecimiento celular se normalizaba después de 5 pases (3 generaciones cada pase) en medio fresco, conteniendo la misma concentración de fármaco. Lo mismo ocurrió cuando los parásitos se exponían a concentraciones crecientes de fármaco, hasta obtener los parásitos adaptados al crecimiento en presencia de 1000  $\mu\text{M}$  de MTX y que denominamos MTX-R1000.

Los parásitos resistentes MTX-R1000, presentaban un tiempo de doblaje similar al observado en la línea salvaje, que no había sido expuesta al fármaco (22 y 23 horas en las líneas salvaje y MTX-R1000, respectivamente), (Fig. 3). El tiempo requerido para inducir la resistencia a la máxima concentración de MTX (1000  $\mu\text{M}$ ) fué 188 días (Fig. 4).

Los valores de la  $\text{DI}_{50}$  para el MTX tanto de las líneas salvaje como MTX-R1000 fueron de 20  $\mu\text{M}$  y 15,9 mM, respectivamente. Este valor nos permitió hacer un estudio comparativo de las susceptibilidades de ambas líneas y deter-

minar el índice de resistencia de los parásitos MTX-R1000, que fué 794 (Tabla I), es decir los parásitos MTX-R1000 son 794 veces más resistentes al MTX que los parásitos salvajes.

Los resultados obtenidos en parásitos resistentes siguiendo la modalidad B, mostraban que el tiempo requerido para la adaptación a esta concentración de fármaco fué 157 días (Fig. 4). Estos parásitos que denominamos MTX-R1000d presentaban un tiempo de doblaje de 23 horas (Fig. 3), tiempo similar al que presentaban la línea resistente MTX-R1000. La  $DI_{50}$  para el MTX de la línea MTX-R1000d fué similar a la de la línea MTX-R1000, esto es 15,9 mM, aproximadamente.

Para determinar la estabilidad de la resistencia en ausencia de MTX, se cultivaron parásitos MTX-R1000 en medio sin fármaco durante 3 y 6 meses ( $Rv_3$  y  $Rv_6$ , respectivamente). El valor de la  $DI_{50}$  para el MTX se mantuvo inalterable (15,9 mM) para los parásitos  $Rv_3$ , pero a los 4, 5 y 6 meses los valores de  $DI_{50}$  fueron : 6,3 mM, 0,4 mM y 0,2 mM, respectivamente (Fig. 5). Este último valor, 0,2 mM se aproxima más al valor que presentaba la línea salvaje (21  $\mu$ M) que al de la línea MTX-R1000 (15,9 mM). Con lo que se deduce que la estabilidad de la resistencia a MTX en L. tropica se mantiene durante 3 meses de crecimiento en ausencia de fármaco.

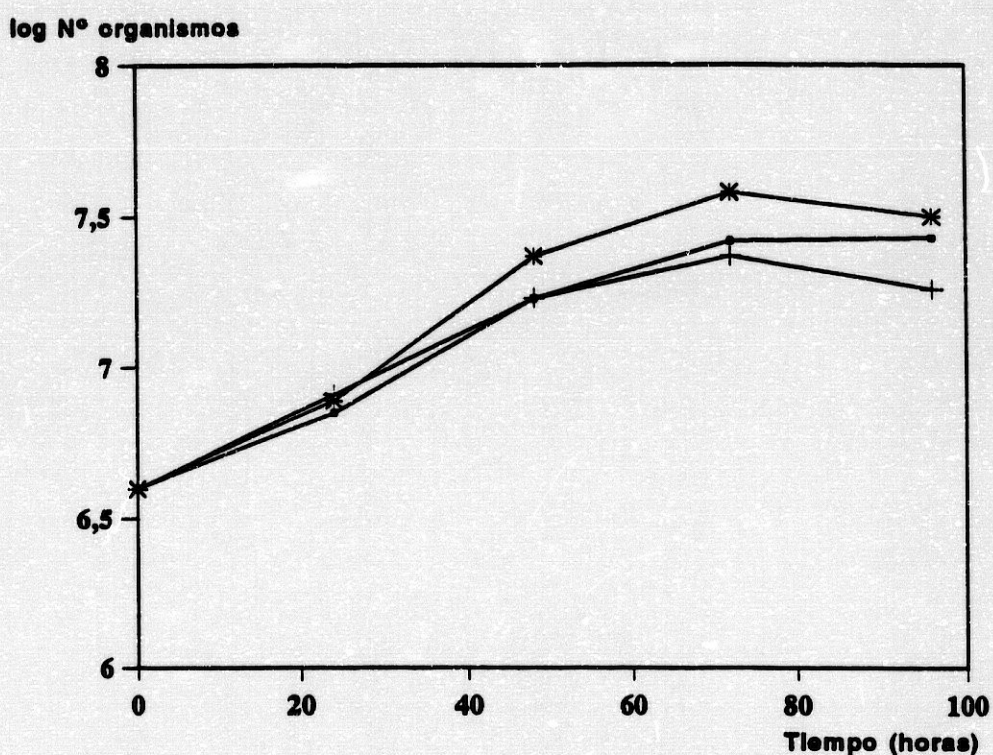


Figura 3.- Determinación del tiempo de duplicación (td) en diferentes líneas de *L. tropica*. Formas promastigotas de las líneas salvaje (\*), MTX-R1000 (•) y MTX-R1000d (+), se incubaron a 28°C a partir de un inóculo inicial de  $4 \times 10^6$ /ml en medio RPMI 1640 modificado (20% SBF1). La determinación del n° de parásitos/ml se realizó tras 24, 48, 72, y 96 horas. Los tiempos de duplicación obtenidos fueron 22, 23 y 23 horas para las líneas salvaje, MTX-R1000 y MTX-R1000d respectivamente. Cada valor de la gráfica representa la media de 3 experimentos independientes.

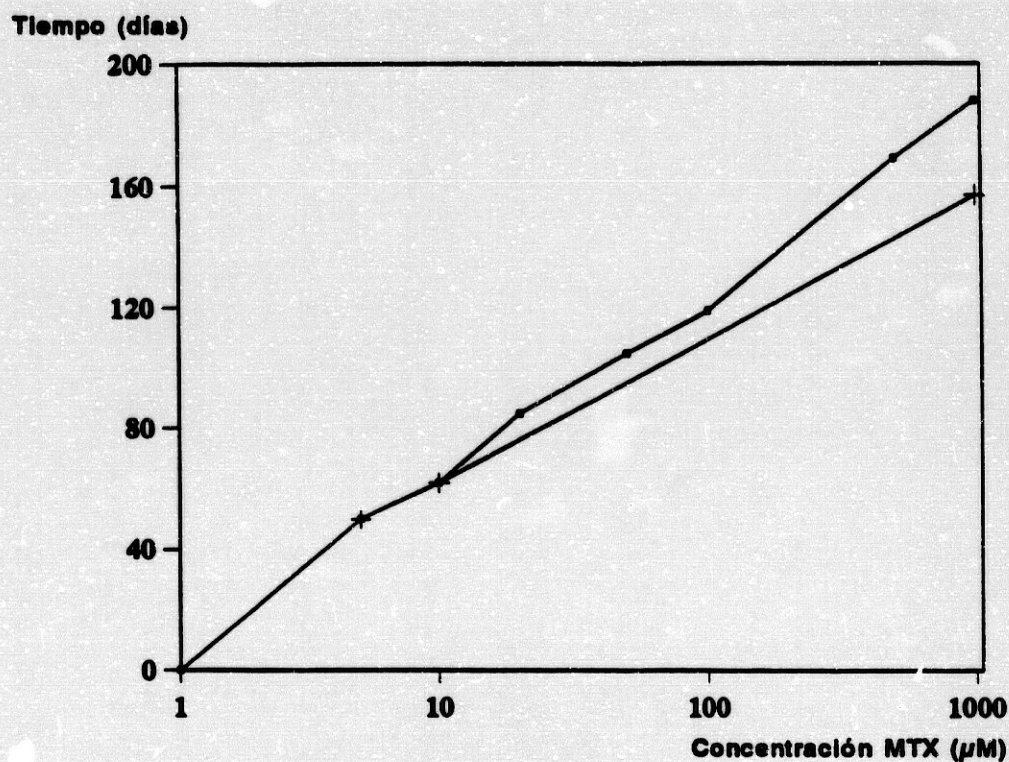


Figura 4.- Tiempo de inducción de resistencia a 1000  $\mu\text{M}$  de MTX en *L. tropica*. La inducción de resistencia a MTX, se realizó por exposición continuada a concentraciones crecientes de MTX (\*) o bien por exposición directa de los parásitos MTX-R10 a 1000  $\mu\text{M}$  de MTX (+), obteniéndose así las líneas MTX-R1000 y MTX-R1000d, respectivamente. En el eje de abscisas (representación logarítmica) se indica las concentraciones de MTX ( $\mu\text{M}$ ) a las cuales se obtuvieron los parásitos resistentes y en el de ordenadas, el número de días necesarios para adaptarse a las diferentes concentraciones de MTX.

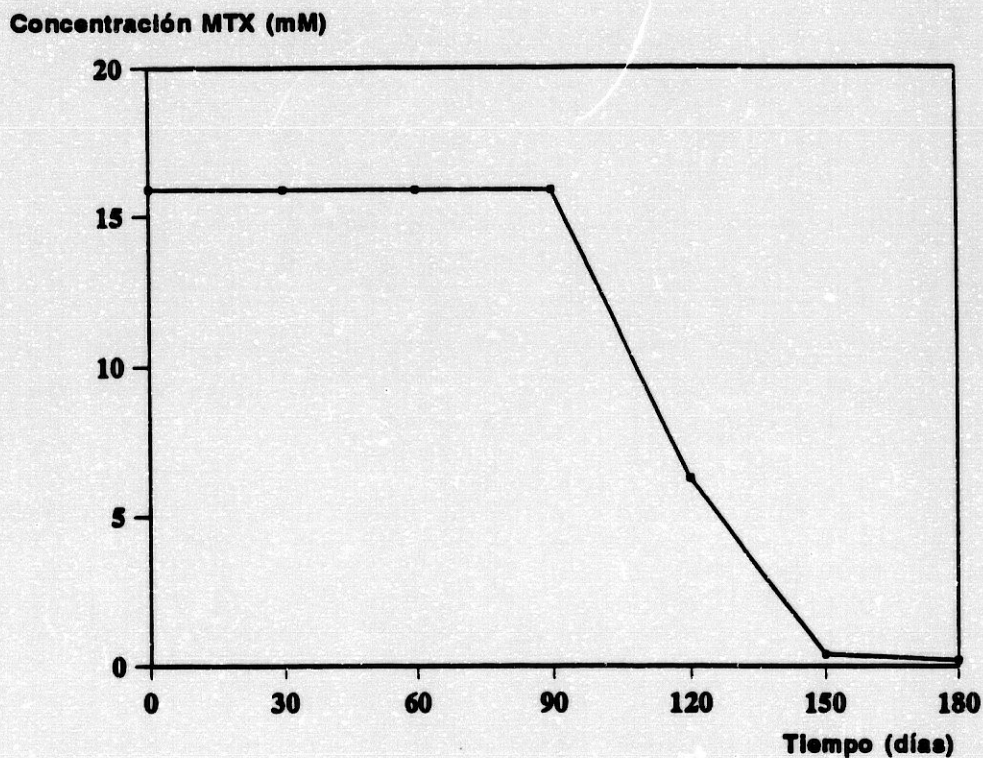


Figura 5.- Estabilidad de la resistencia a MTX en la línea *L. tropica* MTX-R1000. Parásitos MTX-R1000 se mantuvieron en cultivo en medio libre de MTX durante 6 meses, determinándose cada mes la  $DI_{50}$  para el MTX. En el eje de ordenadas se representan las concentraciones de MTX correspondiente a la  $DI_{50}$  de cada mes, mientras que en el eje de abscisas se representa el tiempo de cultivo de los parásitos en ausencia de MTX.

#### 4.2.- RESISTENCIA CRUZADA A OTROS FÁRMACOS Y SUSTANCIAS QUÍMICAS.

Estudios en células tumorales, seleccionadas por su resistencia a un fármaco, mostraban que podían adquirir simultáneamente resistencia cruzada a otros fármacos no relacionados estructural ni funcionalmente con el fármaco utilizado para la inducción de la resistencia, es decir desarrollaban un mecanismo de multirresistencia a fármacos denominado MDR (Ling y col. 1983).

Este fenotipo MDR se ha venido considerando como una de las características más destacadas a tener presente en los parásitos y células resistentes tanto in vitro como in vivo. Nosotros quisimos conocer si nuestros parásitos resistentes a MTX presentaban resistencia cruzada a otros fármacos y sustancias químicas no relacionados con el MTX.

Los fármacos y sustancias químicas empleadas fueron : puromicina, ketoconazol, Glucantime, vinblastina, doxorubicina, daunorubicina, tricloruro de antimonio y arseniato sódico. Los valores de resistencia cruzada están reflejados en la Tabla I.

Estos resultados demuestran que la línea MTX-R1000 presenta una resistencia significativa a puromicina, vinblastina, doxorubicina y arseniato sódico. Las 3 primeras sustancias mencionadas se han empleado en los estudios de multirresistencia a fármacos y sustancias químicas en células tumorales resistentes (Ling y col., 1983). Aunque el arseniato sódico no forma parte del espectro de multirresistencia a fármacos en células tumorales, sin embargo se ha descrito la existencia de un gen de



la familia glicoproteína-P, localizado en la región H de Leishmania, que confiere resistencia a metales pesados, entre ellos a arseniato sódico (Callahan y col. 1991).

Se realizaron también estudios de resistencia cruzada en la línea MTX-R1000d. Inicialmente, las sustancias ensayadas fueron puromicina y ketoconazol. Los valores de las  $DI_{50}$  obtenidos fueron:  $25 \pm 0.4 \mu M$  ( $p < 0,001$ ) y  $37 \pm 0,48 \mu M$  para puromicina y ketoconazol, respectivamente; siendo los valores de I.R. 6,6 para puromocina y 1,97 para ketoconazol. Estos resultados de I.R. fueron similares a los encontrados en la tabla I para estas sustancias en el caso de la línea MTX-R1000 (4,2 para puromicina y 1,6 para el ketoconazol), lo que indica que la línea MTX-R1000d posee características en este sentido similares a la línea MTX-R1000.

Igualmente, se realizaron estos ensayos de resistencia cruzada en las líneas  $Rv_3$  y  $Rv_6$ . Los fármacos y sustancias químicas empleadas fueron : puromicina, ketoconazol, vinblastina y doxorubicina. Los resultados de estos experimentos se recogen en la Tabla II. El índice de resistencia observado en  $Rv_3$  fué similar al observado en la línea MTX-R1000, sin embargo el índice de resistencia en el caso de  $Rv_6$  revierte hacia los de la línea salvaje. Esto vuelve a confirmar que hasta los 3 meses de crecimiento en ausencia de MTX, el fenotipo de resistencia es estable; transcurrido este tiempo, el fenotipo revierte hasta que a los 6 meses de crecimiento en ausencia de MTX, los valores de resistencia cruzada se asemejan más a los obtenidos con los parásitos salvajes.

En células de mamíferos, el fenotipo MDR revierte en presencia de fármacos o sustancias antagonistas de los canales de calcio, tales como verapamil (Fojo y col. 1985).

Quisimos comprobar si el verapamil era capaz o no de revertir el fenotipo de multirresistencia en los parásitos resistentes a MTX. Con el objeto de buscar la concentración de verapamil que nos interesaba utilizar en el estudio de reversión de la resistencia a MTX, se determinó la  $DI_{50}$  para el verapamil tanto en la línea salvaje como en la línea MTX-R1000. Los valores de la  $DI_{50}$  fueron 16,4 y 32,3  $\mu\text{M}$  para las líneas salvaje y MTX-R1000, respectivamente, como se deduce de la figura 6. A partir de estos valores se calculó el índice de resistencia que fué 1,97, lo que indica una baja resistencia a verapamil en la línea MTX-R1000.

De los datos de la  $DI_{50}$  para la línea MTX-R1000, pudimos deducir la concentración de fármaco que no afectaba, en más de un 20%, al crecimiento de los parásitos. La concentración de verapamil escogida para el estudio de la reversión de la resistencia fué 15  $\mu\text{M}$ , la cual inhibía en un 14% el crecimiento de los parásitos. También comparamos el %I de varios cultivos, expuestos a los fármacos y concentraciones que se detallan: 9,5 mM de MTX, 15  $\mu\text{M}$  de verapamil y 9,5 mM de MTX más 15  $\mu\text{M}$  de verapamil. En la figura 7, se muestra como el %I en el cultivo expuesto a 9,5 mM de MTX fué 35, mientras que el expuesto a 9,5 mM de MTX más 15  $\mu\text{M}$  de Verapamil presentaba un 46%. Los resultados obtenidos, indican que los parásitos MTX-R1000, no revierten tras exponerlos en cultivo en presencia de 15  $\mu\text{M}$  de verapamil, dado que no se ha observado un incremento significativo de la toxicidad de MTX, sino un efecto aditivo de inhibición del crecimiento, debido a la presencia de ambos fármacos.

TABLA I

Resistencia cruzada en las líneas salvaje y MTX-R1000 de *L. tropica*.

| Fármacos <sup>b</sup><br>y<br>Sust. quím. | Dosis Inhibitoria 50 ( $\mu$ M) <sup>a</sup> |                 | Indice de Resistencia <sup>c</sup> |
|---|--|-----------------|------------------------------------|
|   | Salvaje                                      | MTX-R1000       |                                    |
| MTX                                       | 20,0 $\pm$ 6,7                               | 15900 $\pm$ 550 | 794 $\pm$ 269 ***                  |
| PUR                                       | 3,8 $\pm$ 0,7                                | 16,2 $\pm$ 1,5  | 4,2 $\pm$ 0,8 **                   |
| KET                                       | 18,8 $\pm$ 1,3                               | 29,8 $\pm$ 2,4  | 1,6 $\pm$ 0,1                      |
| GLU                                       | 212 $\pm$ 12                                 | 221 $\pm$ 14    | 1,0 $\pm$ 0,1                      |
| VIN                                       | 14,8 $\pm$ 0,7                               | 36,7 $\pm$ 1,0  | 2,5 $\pm$ 0,1 *                    |
| DOX                                       | 36,1 $\pm$ 7,8                               | 94,1 $\pm$ 3,6  | 2,6 $\pm$ 0,6 *                    |
| DAU                                       | 34,2 $\pm$ 2,4                               | 32,6 $\pm$ 5,8  | 0,9 $\pm$ 0,2                      |
| SbCl <sub>3</sub>                         | 48,1 $\pm$ 0,1                               | 60,6 $\pm$ 1,7  | 1,3 $\pm$ 3,4                      |
| Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub>         | 17,3 $\pm$ 3,5                               | 73,1 $\pm$ 1,4  | 4,2 $\pm$ 0,9 **                   |

a La dosis inhibitoria 50 es la concentración de fármaco que disminuye en un 50% el crecimiento de los parásitos. Los datos mostrados corresponden a los valores medios obtenidos de 3 datos experimentales independientes con sus respectivas  $\pm$  desviaciones standard.

b Las abreviaturas de los fármacos y de las sustancias químicas usadas son: MTX, metotrexato; PUR, puromicina; KET, ketoconazol; GLU, glucantime; VIN, vinblastina; DOX, doxorubicina; DAU, daunorubicina; SbCl<sub>3</sub>, tricloruro de antimonio; Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>, arseniato sódico.

c El índice de resistencia se obtiene a partir del cociente entre la DI<sub>50</sub> de los parásitos MTX-R1000 y la DI<sub>50</sub> de los parásitos salvajes. Los valores estadísticamente significativos con respecto a los de la línea salvaje, se obtuvieron mediante el test estadístico "t" de Student y se designan por asteriscos. (\* p<0,005; \*\* p<0,002; \*\*\* p<0,0001)

TABLA II

Resistencia cruzada en las líneas Rv<sub>3</sub> y Rv<sub>6</sub> de *L. tropica*.

| Fármacos <sup>b</sup><br>y<br>Sust. quím | Dosis inhibitoria<br>50 (μM) <sup>a</sup> |                 | Índice de resistencia <sup>c</sup> |                 |
|--|---|-----------------|------------------------------------|-----------------|
|  | Rv <sub>3</sub>                           | Rv <sub>6</sub> | Rv <sub>3</sub>                    | Rv <sub>6</sub> |
| PUR                                      | 19,69±2,16                                | 4,15±1,96       | 5,07±1,09**                        | 1,07±0,54       |
| KET                                      | 34,16±5,80                                | 29,85±0,09      | 1,82±0,33                          | 1,50±0,11       |
| VIN                                      | 34,27±3,24                                | 13,26±3,87      | 2,30±0,25*                         | 0,99±0,26       |
| DOX                                      | 82,43±4,40                                | 45,19±1,69      | 2,28±0,51*                         | 1,25±0,27       |

a La dosis inhibitoria 50 es la concentración de fármaco que disminuye en un 50% el crecimiento de los parásitos. Los datos mostrados corresponden a los valores medios obtenidos de 3 datos experimentales independientes con sus respectivas  $\pm$  desviaciones standard.

b Las abreviaciones de los fármacos y sustancias químicas usadas son: PUR, puromicina; KET, ketoconazol; VIN, vinblastina; DOX, doxorubicina.

c El índice de resistencia se obtiene a partir del cociente entre la DI<sub>50</sub> de los parásitos MTX-R1000 en ausencia de MTX durante 3 (Rv<sub>3</sub>) o 6 meses (Rv<sub>6</sub>) y la DI<sub>50</sub> de los parásitos salvajes. Los valores estadísticamente significativos con respecto a los de la línea salvaje, se obtuvieron mediante el test estadístico "t" de Student y se designan por asteriscos. (\* p<0,01; \*\* p<0,001)

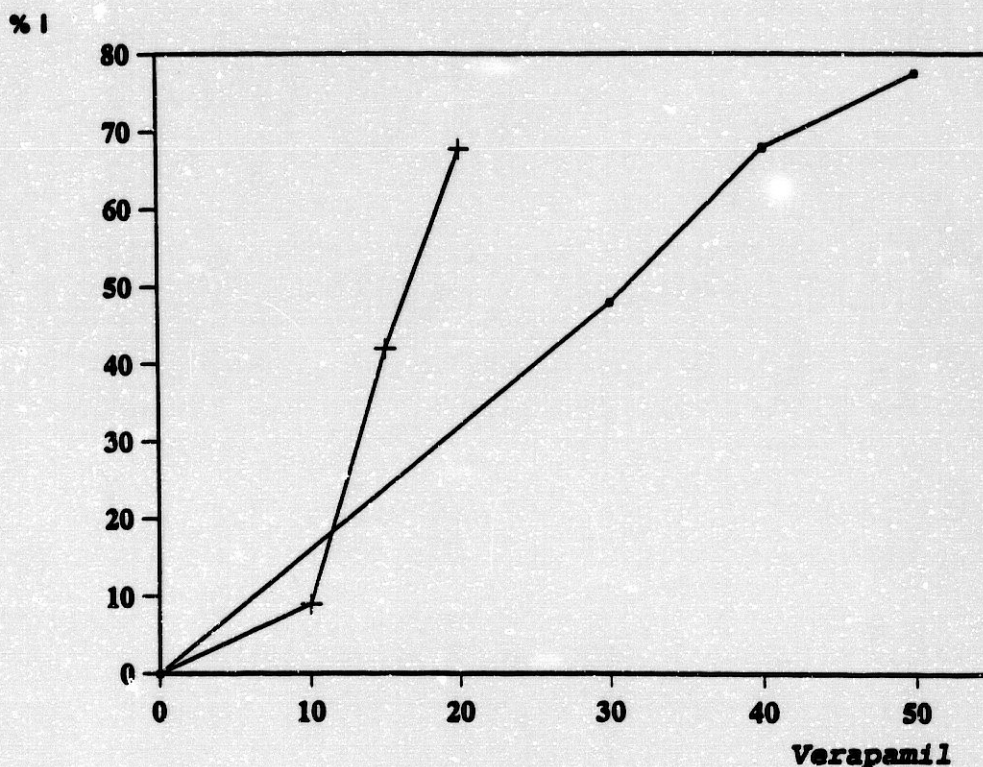


Figura 6.- Determinación en *L. tropica* de la  $DI_{50}$  para el verapamil. Cultivos de parásitos de las líneas salvaje y MTX-R1000 se incubaron a  $28^{\circ}\text{C}$  en presencia de distintas concentraciones de verapamil : 10, 15 y 20  $\mu\text{M}$  en el caso de la línea salvaje (+) y 30, 40 y 50  $\mu\text{M}$  en el caso de la línea MTX-R1000 (\*). El inóculo inicial del cultivo fue  $4 \times 10^6$  parásitos/ml en medio RPMI 1640 modificado (20% SBFI). Tras 48 horas de incubación se procedió al estudio del % de inhibición del crecimiento (%I), mediante el conteo del n° de parásitos/ml. Las  $DI_{50}$  fueron  $16,4 \pm 3,9$  y  $32,3 \pm 3,8$  para las líneas salvaje y MTX-R1000, respectivamente. El índice de resistencia fue  $1,97 \pm 0,52$ . Cada valor de la gráfica representa la media de 3 experimentos independientes.

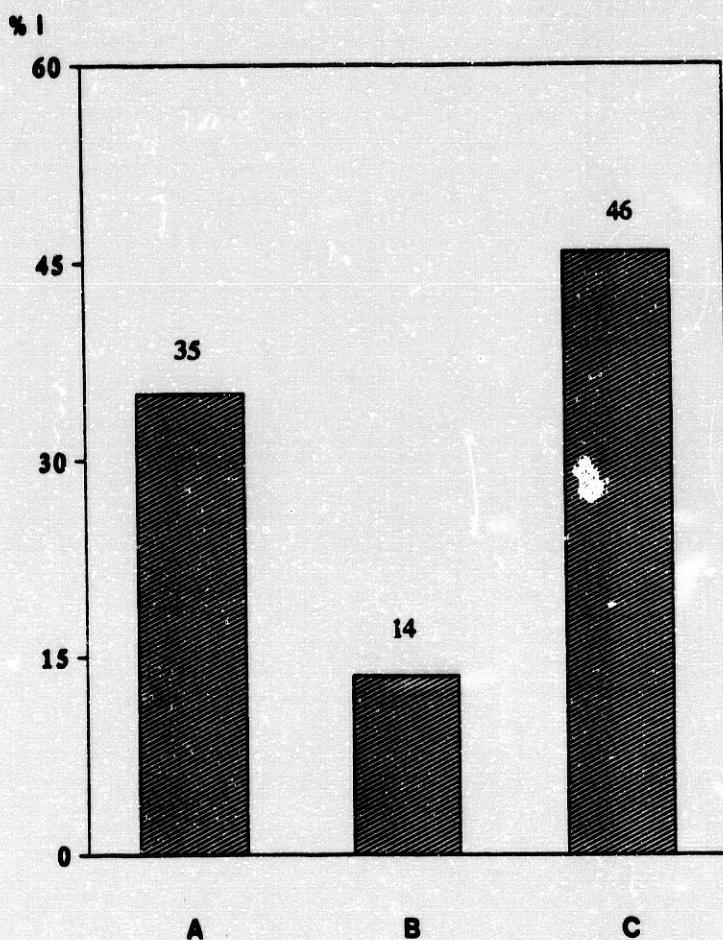


Figura 7.- Estudio de la reversión de la resistencia a MTX en *L. tropica* MTX-R1000 en presencia de verapamil. Se determinó la inhibición del crecimiento (%I) de los parásitos resistentes a MTX en presencia de verapamil, comparando el crecimiento de varios cultivos obtenidos a partir de un inóculo inicial de  $4 \times 10^6$  parásitos/ml y mantenidos en presencia de diferentes concentraciones de fármacos: (A) 9,5 mM de MTX, dosis que inhibe en un 35 % el crecimiento de los parásitos. (B) 15  $\mu$ M de verapamil, dosis que inhibe no más de un 20 % el crecimiento de los parásitos. (C) 9,5 mM de MTX más 15  $\mu$ M de verapamil.

Estos cultivos se incubaron a 28°C y tras 48 horas de crecimiento se determinó el % I en cada caso. El % I representado corresponde a la media de 3 experimentos independientes.

#### 4.3.- ESTUDIO DEL TRANSPORTE DE MTX.

Uno de los mecanismos de resistencia descritos tanto en protozoos parásitos como en células tumorales es la alteración en el transporte del fármaco (Fojo y col. 1985; Willingham y col. 1986; Ellenberger y col. 1987a; Kaur y col. 1988). En los estudios realizados sobre la alteración del transporte, se ha demostrado la existencia de una disminución en el acúmulo de fármaco, pudiéndose considerar éste como otro de los mecanismos de resistencia que los parásitos en general y específicamente los protozoos del género Leishmania pueden desarrollar.

La cinética de la captación de MTX en las líneas salvaje y MTX-R1000 de L. tropica se determinó mediante el análisis de Lineweaver-Burk (Fig. 8). Los datos obtenidos (Tabla III) muestran que la afinidad aparente para el MTX ( $K_t$ ) fué 0,46 y 0,40  $\mu\text{M}$  para la línea salvaje y MTX-R1000 respectivamente, mientras que la velocidad máxima de influjo ( $V_{\text{max}}$ ) fué 3,52 y 1,21  $\text{pmol min}^{-1} [10^9 \text{ parásitos}]^{-1}$ . Lo que indica que aunque ambas poblaciones tienen una afinidad semejante por el fármaco, sin embargo el valor de  $V_{\text{max}}$ , es significativamente mayor en la línea salvaje que en la resistente.

Los valores de  $K_t$  para el MTX fueron similares a aquellos obtenidos por Kaur y col. (1988) en L. donovani y ligeramente más bajos a aquellos obtenidos por Ellenberger y col. (1987b) en L. major. Los valores de  $V_{\text{max}}$  para la línea salvaje fueron significativamente más bajos que los descritos para L. donovani y L. major.

Los estudios realizados sobre la incorporación de MTX-<sup>[3H]</sup> en las líneas salvaje, MTX-R1000 y Rv<sub>3</sub>, y cuyos resultados se muestran en la Figura 9, indican que tanto la línea MTX-R1000 como la Rv<sub>3</sub> muestran una baja acumulación de fármaco, menos de un 3%, respecto a la línea salvaje que llega a acumular a los 120 min de exposición a MTX-<sup>[3H]</sup>, unos 3,4 pmol/10<sup>9</sup> parásitos.

La línea MTX-R1000 no solo presenta reducida la captación de MTX, sino que los estudios realizados sobre el eflujo de MTX-<sup>[3H]</sup> revelan, como podemos apreciar en la Figura 10, que a los 60 min permanece retenido el 60% de fármaco en la línea salvaje; por el contrario la velocidad de eflujo es significativamente mayor en la línea resistente, permaneciendo a los 60 min solo el 6% del fármaco inicialmente acumulado.

Similares resultados se obtuvieron con la línea Rv<sub>3</sub>, requiriendo 6 meses (aproximadamente 200 generaciones de parásitos), de cultivo en ausencia de fármaco, para que se restablezcan los niveles de acumulación similares a los de la línea salvaje. En la Figura 11 observamos que, a los 60 min, la línea Rv<sub>3</sub> retiene aún el 67% de fármaco y la línea Rv<sub>3</sub> solo el 17%.

Tras realizar estudios de eflujo de MTX-<sup>[3H]</sup> con clones procedentes de la línea salvaje y MTX-R1000, se obtuvieron resultados similares a los anteriormente descritos, observándose que los clones de la línea salvaje retenían mayor concentración de fármaco que los clones de la línea MTX-R1000.



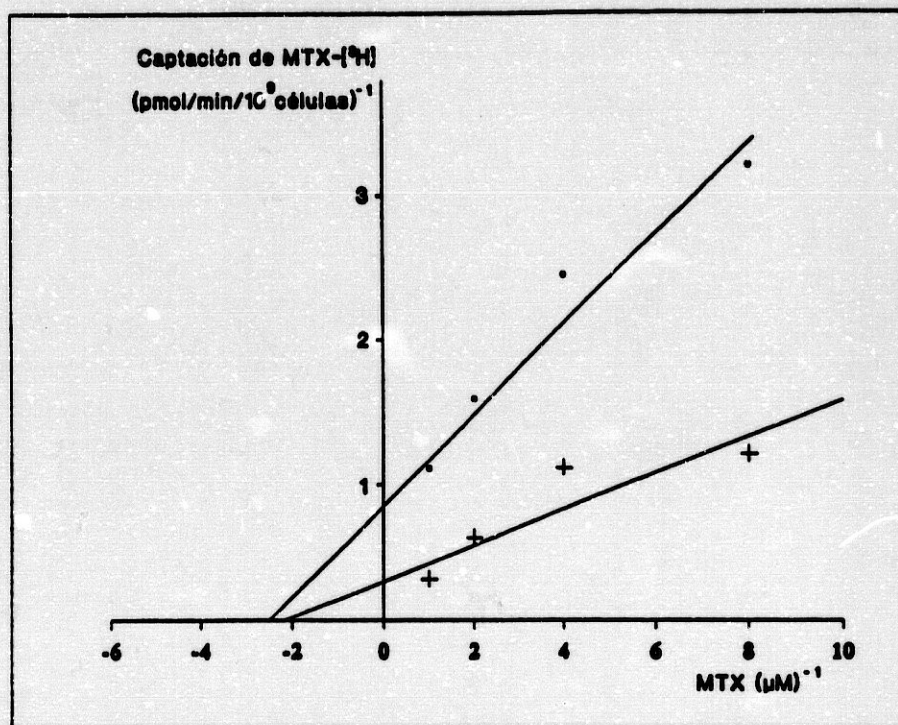


Figura 8.- Estudio cinético de la captación de MTX-<sup>3</sup>H en *L. tropica* mediante análisis de Lineweaver-Burk. Se realizó un estudio comparativo de la cinética de captación de MTX-<sup>3</sup>H a distintas concentraciones, en las líneas salvaje (+) y MTX-R1000 (•). Cada punto representa la media de 3 valores experimentales para una misma concentración de fármaco, siendo el tiempo de exposición al fármaco de 2 y 4 minutos. Los valores para la constante de afinidad (kt) y velocidad máxima (Vmax) obtenidos se muestran en la tabla III.

**TABLA III**

Parámetros cinéticos de transporte de MTX en  
L. tropica

| Línea     | Influjo de MTX  |                   | Total <sup>c</sup><br>acumulado |
|-----------|-----------------|-------------------|---------------------------------|
|           | Kt <sup>a</sup> | Vmax <sup>b</sup> |                                 |
| Salvaje   | 0,46            | 3,52              | 3,40                            |
| MTX-R1000 | 0,40            | 1,21              | 0,09                            |

a Afinidad aparente para el MTX expresada en  $\mu\text{M}$ .

b Velocidad máxima de influjo de MTX expresada en  $\text{pmol} \times \text{min}^{-1} [10^9 \text{células}]^{-1}$ .

c pmol de MTX acumulado por  $10^9$  parásitos, en presencia de  $0,1 \mu\text{M}$  de MTX- $^3\text{H}$  durante 120 min.

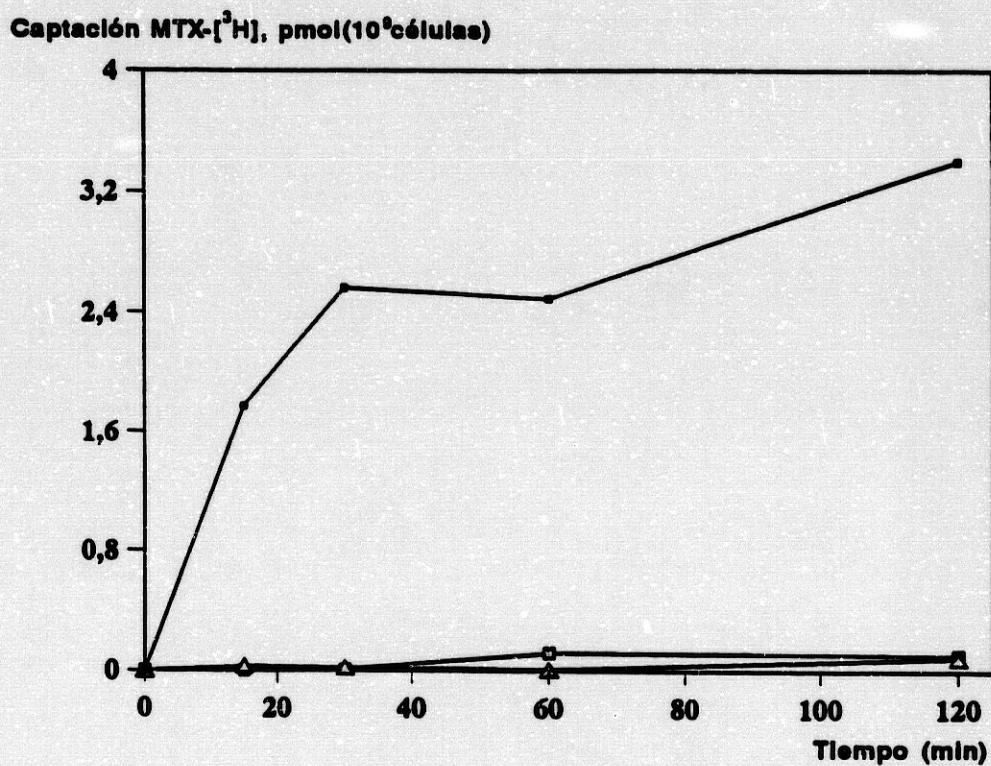


Figura 9.- Captación de MTX- $^3\text{H}$  en *L. tropica*. Se realizó un estudio comparativo de la captación de fármaco en las líneas salvaje (.), MTX-R1000 (□) y Rv, (Δ). Los resultados representan la diferencia observada en la captación del fármaco a 28°C y 0°C, tras un tiempo de exposición de los parásitos al fármaco de 15, 30, 60 y 120 minutos. Cada valor representado corresponde a la media de 3 experimentos independientes.

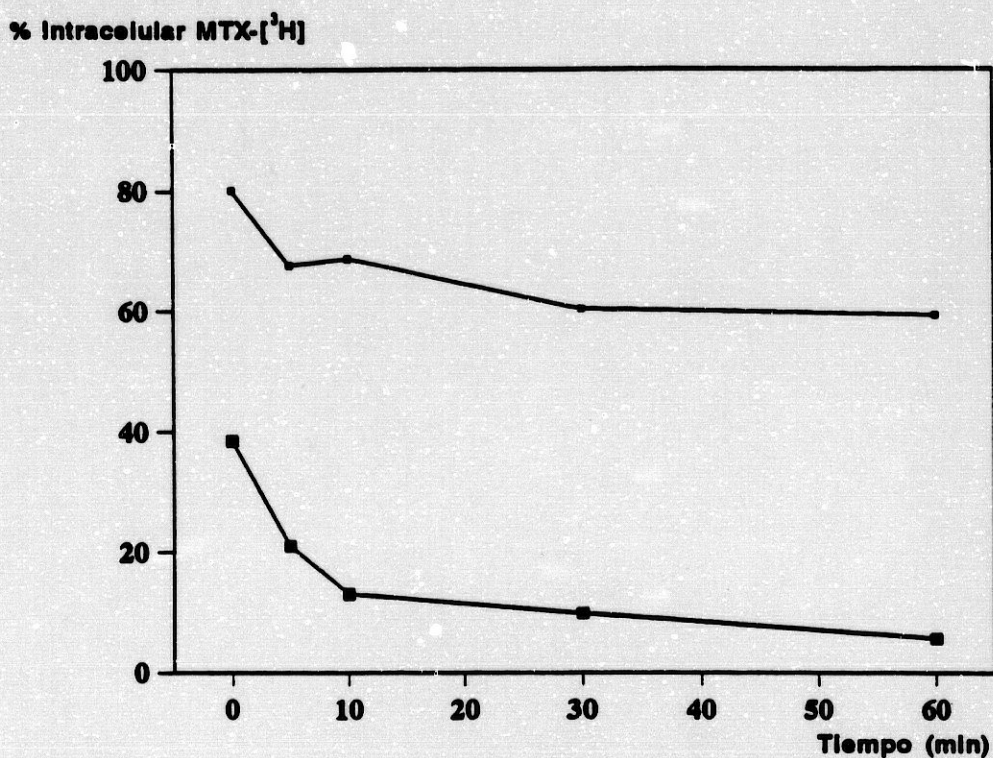


Figura 10.- Determinación del eflujo de MTX-<sup>3</sup>H en la línea salvaje y MTX-R1000 de *L. tropica*. El eflujo de MTX-<sup>3</sup>H en las líneas salvaje (•) y MTX-R1000 (■), se determinó tras mantener estos parásitos durante 1 hora en presencia de 0,25  $\mu$ M de MTX-<sup>3</sup>H. Los valores de eflujo se midieron a los 5, 10, 30 y 60 minutos en medio de cultivo libre de fármaco. La concentración intracelular inicial se determinó previamente al estudio del eflujo. Los datos que representamos son el porcentaje de la concentración intracelular de fármaco. Al tiempo 0, el % intracelular no es 100% debido al tiempo mínimo requerido para resuspender los parásitos en medio de cultivo ausente de fármaco y posterior lavado (aproximadamente 1 min). Cada valor representado corresponde a la media de 3 experimentos independientes.

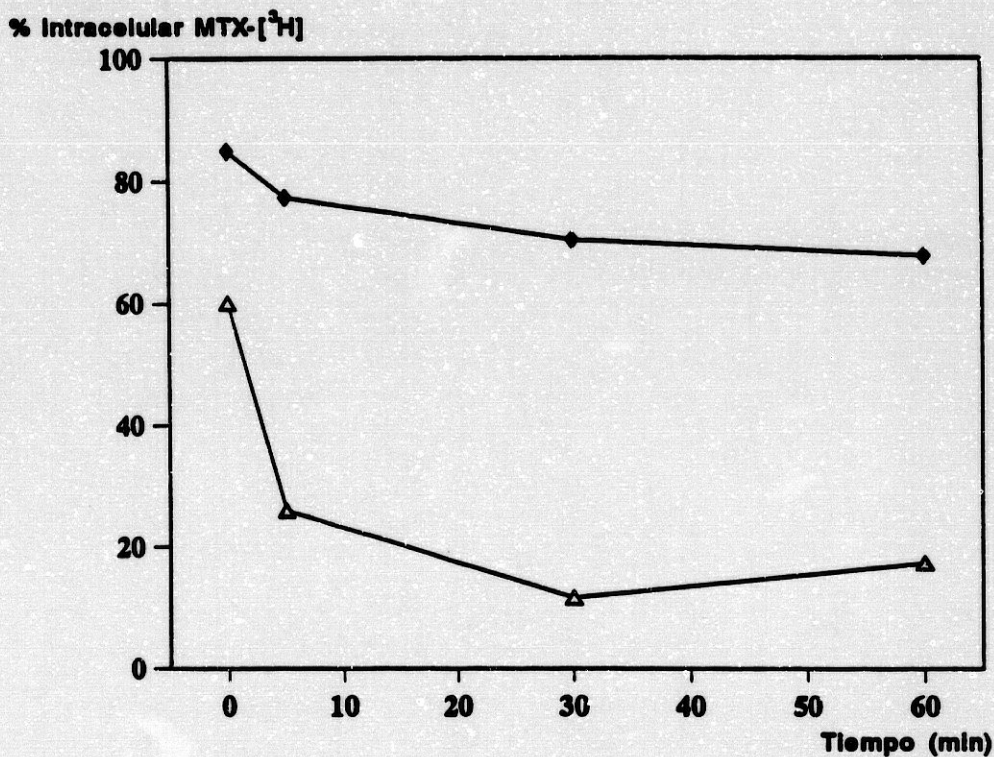


Figura 11.- Determinación del eflujo de MTX-<sup>3</sup>H en las líneas Rv<sub>3</sub> y Rv<sub>6</sub> de *L. tropica*. El eflujo de MTX-<sup>3</sup>H en las líneas Rv<sub>3</sub> (Δ) y Rv<sub>6</sub> (◆), se determinó tras mantener estos parásitos durante 1 hora en presencia de 0,25 μM de MTX-<sup>3</sup>H. Los valores de eflujo se midieron tras 5, 30 y 60 minutos de mantenimiento de los parásitos en medio de cultivo libre de fármaco. La concentración intracelular inicial se determinó previamente al estudio del eflujo. Los datos que representamos son el porcentaje de la concentración intracelular de fármaco. Al tiempo 0, el % intracelular no es 100% debido al tiempo mínimo requerido para resuspender los parásitos en medio de cultivo ausente de fármaco y posterior lavado (aproximadamente 1 min). Cada valor representado corresponde a la media de 3 experimentos independientes.

#### 4.4.- CAMBIOS EN EL PATRON DE PROTEINAS EN *L. tropica* MTX-R1000.

Diversos autores han descrito en células tumorales, que la adquisición de resistencia a fármacos, así como la aparición del fenotipo MDR, va acompañado de cambios en el patrón de proteínas (sobreexpresión y/o desaparición), independientemente de la sobreexpresión de la proteína de membrana de alto tamaño molecular denominada glicoproteína-P, cuya presencia en células resistentes es indicativo del fenotipo MDR. (Beck y col. 1979; Kartner y col. 1983; Richert y col. 1985; Van der Bliek y col. 1986).

Basados en este hecho, hemos realizado el estudio de posibles cambios en el patrón de proteínas de *L. tropica* MTX-R1000 respecto a las formas salvajes, así como la existencia o ausencia en los parásitos resistentes de sobreexpresión de una proteína posiblemente relacionada con la glicoproteína-P humana.

Los análisis de geles SDS-PAGE de proteínas totales, procedentes de parásitos salvajes y MTX-R1000, teñidas con Azul Comassie (Fig. 12), revelan diversos cambios en el patrón de proteínas, entre ellos la sobreexpresión en la línea MTX-R1000 de una proteína de alto tamaño molecular, aproximadamente 240 kDa, y la presencia en la línea salvaje de dos proteínas (236 y 261 kDa), ausentes en la línea resistente. El análisis videodensitométrico de esta proteína de 240 kDa en geles teñidos con Azul Comassie, mostraba que ésta representa un 1% del total de proteínas de la línea MTX-R1000.

Los cambios en el patrón de proteínas se recomprobaron más exhaustivamente mediante geles SDS-PAGE de proteínas totales, citosólicas y de membrana, tanto de los parásitos salvajes y como resistentes, marcados metabólicamente con metionina- $^{35}\text{S}$ . Así, en la Fig. 13 se aprecian los mismos cambios en el patrón de proteínas a los observados en la Fig. 12.

La sobreexpresión de una proteína de membrana, posiblemente perteneciente a la familia glicoproteína-P, se confirmó mediante Western blot de un gel SDS-PAGE conteniendo proteínas totales y de membrana de las líneas salvaje, MTX-R1000, Rv<sub>3</sub> y Rv<sub>6</sub>, y su posterior inmunodetección con un anticuerpo monoclonal C<sub>21s</sub>, que reconoce un dominio citoplasmático de la glicoproteína-P humana.

Los resultados demuestran la aparición de una proteína de membrana reconocida por el anticuerpo monoclonal, de aproximadamente 240 kDa, presente en las membranas de los parásitos MTX-R1000 y en los parásitos mantenidos en ausencia de fármaco durante 3 meses (Rv<sub>3</sub>). Esta proteína, por el contrario, no aparece en los parásitos salvajes, ni en los revertidos 6 meses (Rv<sub>6</sub>), como se observa en la Figura 14.

Posteriormente, tratando de completar el estudio de la expresión de proteínas y ver otras diferencias posibles de los parásitos resistentes respecto a los salvajes, se realizaron electroforesis en doble dimensión de proteínas totales, obtenidas de parásitos marcados metabólicamente con metionina- $^{35}\text{S}$ . Las diferencias encontradas entre ambas líneas se muestran en las Figura 15A y 15B, y los pesos moleculares de cada proteína se describen en las tablas IV y V.

Así, hemos confirmado los cambios en el patrón de proteínas ya observados en geles SDS-PAGE de una sola dimensión, como la mencionada proteína de membrana de 240 kDa, relacionada con la glicoproteína-P, que aparece en la línea MTX-R1000. Igualmente, en la línea salvaje, aparecen dos proteínas de aproximadamente 236 y 261 kDa, ausentes en la línea resistente.

La presencia de estas proteínas de alto tamaño molecular se confirmó también mediante electroforesis de doble dimensión, electrotransferencia a membrana de polyviniliden difluoride (PVDF), y visualización de las proteínas mediante tinción con Amido black (Fig. 16A y 16B).

Estas proteínas de alto tamaño molecular se visualizan en las autoradiografías (Fig. 15A y 15B) o en las membranas PVDF (Fig. 16A y 16B), como varios puntos, pues presentan diferencias en sus puntos isoeléctricos. Probablemente pueda explicarse por la existencia de distintos niveles de glicosilación y fosforilación de la proteína. También se observa en las Figuras 15 y 16, que se tratan de proteínas ligeramente ácidas.

Tanto la línea salvaje como la línea resistente, difieren en algunas proteínas de similar tamaño molecular, que presentan distinta movilidad según su punto isoeléctrico. Este grupo de proteínas se encuentran en un rango de tamaño molecular entre 25 y 45 kDa (Fig. 15 y 16; Tabla IV y V).



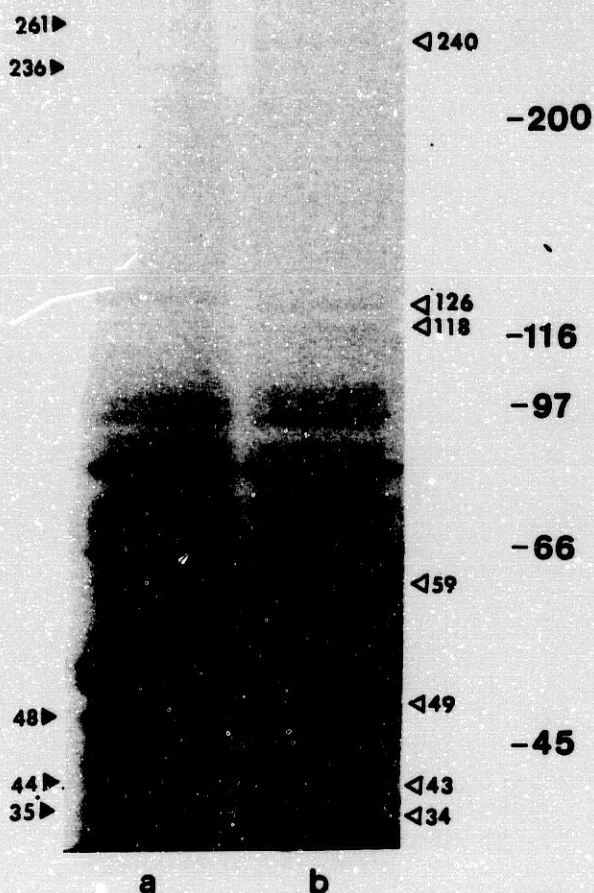


Figura 12.- Estudio mediante SDS-PAGE del patrón de proteínas en las líneas salvaje y resistente de *L. tropica*. Proteínas totales (40  $\mu$ g) de las líneas salvajes (a) y MTX-R1000 (b), se separaron en geles SDS-PAGE al 6% de acrilamida y se tificaron con Azul Comassie. Las diferencias encontradas en el patrón de proteínas entre ambas líneas se indican mediante flechas negras (para indicar proteínas presentes en la línea salvaje y ausentes en la línea resistente) y blancas (para indicar proteínas presentes en la línea resistente y ausentes en la línea salvaje). Los tamaños moleculares de cada proteína, señalada mediante flechas negras y blancas, se encuentran en las tablas IV y V, respectivamente.

Los marcadores de tamaño molecular (kDa), indicados en el margen derecho, son : miosina, 200;  $\beta$ -galactosidasa, 116; fosforilasa b, 97; albúmina de suero bovino, 66; ovoalbúmina, 45; anhidrasa carbónica, 31; inhibidor de tripsina, 21.

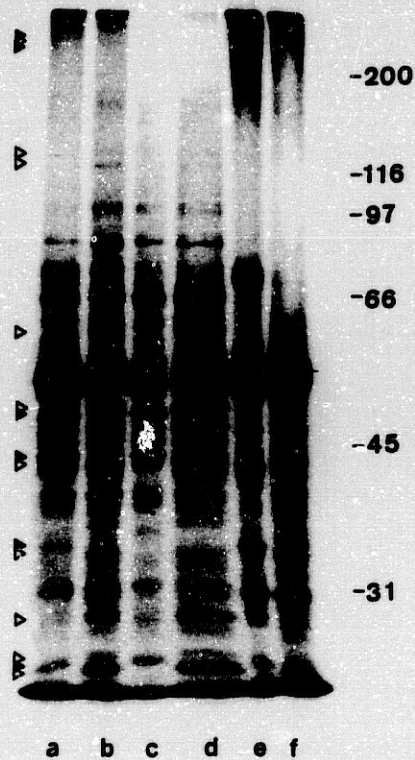


Figura 13.- Estudio mediante SDS-PAGE del patrón de proteínas en las líneas salvaje y resistente de *L. tropica* marcadas con metionina- $[^{35}\text{S}]$ . Parásitos de las líneas salvaje y MTX-R1000 marcados con metionina- $[^{35}\text{S}]$  ( $2 \times 10^5$  c.p.m. de cada una) se separaron en geles SDS-PAGE al 8% de acrilamida. a y b: Proteínas totales de las líneas salvaje y MTX-R1000, respectivamente. c y d: Proteínas citosólicas de las líneas salvaje y MTX-R1000, respectivamente. e y f: Proteínas de membrana de las líneas salvaje y MTX-R1000. Las diferencias encontradas en el patrón de proteínas entre ambas líneas se indican mediante flechas negras (para indicar proteínas presentes en la línea salvaje y ausentes en la línea resistente) y flechas blancas (para indicar proteínas presentes en la línea resistente y ausentes en la línea salvaje). Los tamaños moleculares de cada proteína, señalada mediante flechas negras y blancas, se encuentran en las tablas IV y V, respectivamente.

Los marcadores de tamaño molecular (kDa), indicados en el margen, son los mismos a los descritos en la Fig. 12.

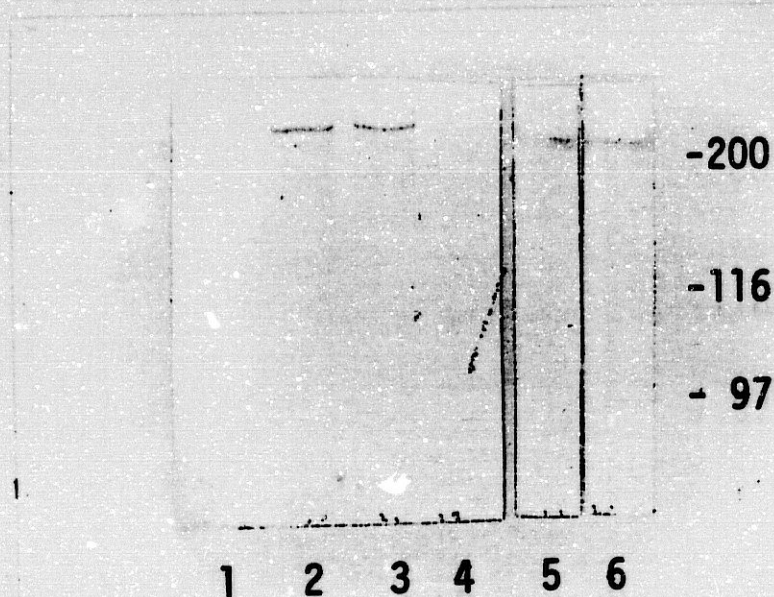


Figura 14.- Análisis mediante Western blot de la presencia de proteínas relacionadas con la glicoproteína-P en diferentes líneas de *L. tropica*. Las proteínas, en una concentración de 40  $\mu\text{g}$ /pocillo, se separaron en un gel SDS-PAGE al 6% de acrilamida y tras ser transferido, a una membrana de nylon, se incubó con el anticuerpo monoclonal C<sub>219</sub>.

(1-4) Proteínas totales de las líneas: (1) salvaje, (2) MTX-R1000, (3) Rv<sub>3</sub>, (4) Rv<sub>6</sub>.

(5-6) Proteínas de membrana de las líneas: (5) MTX-R1000, (6) Rv<sub>3</sub>.

Los marcadores de tamaño molecular (kDa), indicados en el margen, son los mismos a los descritos descritos en la Fig. 10.

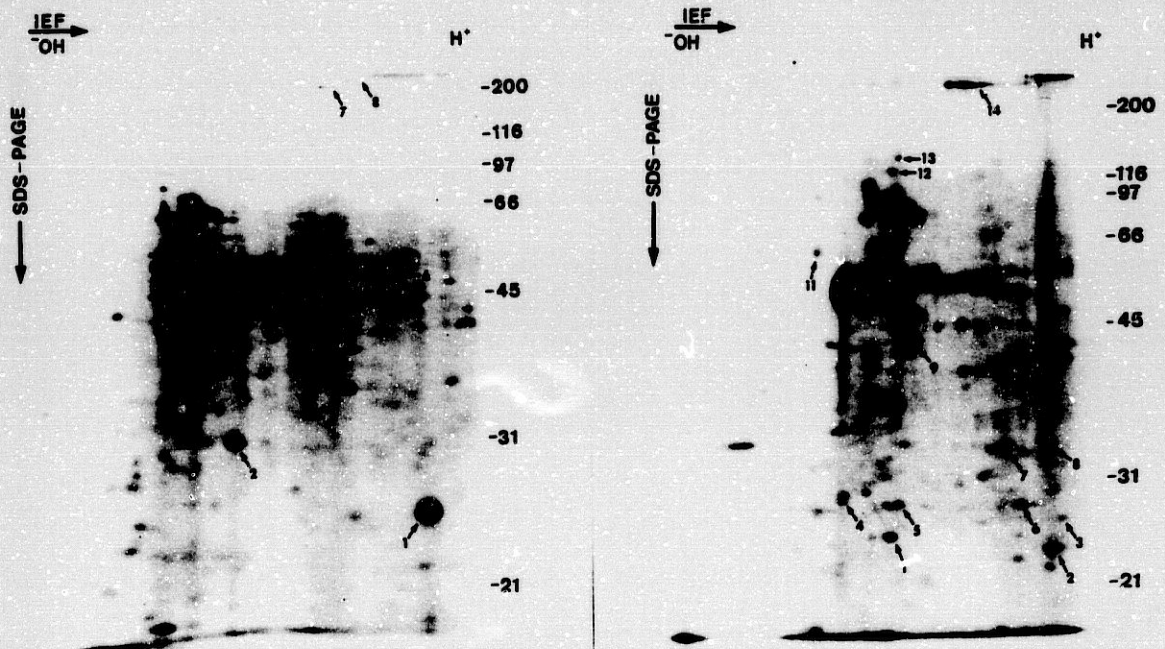


Figura 15.- Estudio en *L. tropica* del patrón de proteínas mediante geles de electroforesis en doble dimensión (2SDS-PAGE). Se realizó un isoelectroenfoco de proteínas totales ( $1 \times 10^6$  c.p.m. de cada muestra) procedentes de parásitos marcados con metionina- $[^{35}\text{S}]$ , para su posterior separación en geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida. Las diferencias observadas en el patrón de proteínas entre las líneas salvaje (A) y MTX-R1000 (B) se indican mediante flechas. En las tablas IV y V encontramos los tamaños moleculares de cada proteína, señalada con su correspondiente número.

Las proteínas marcadoras de tamaño molecular, indicadas en el margen, son las mismas a las descritas en la Fig. 12.

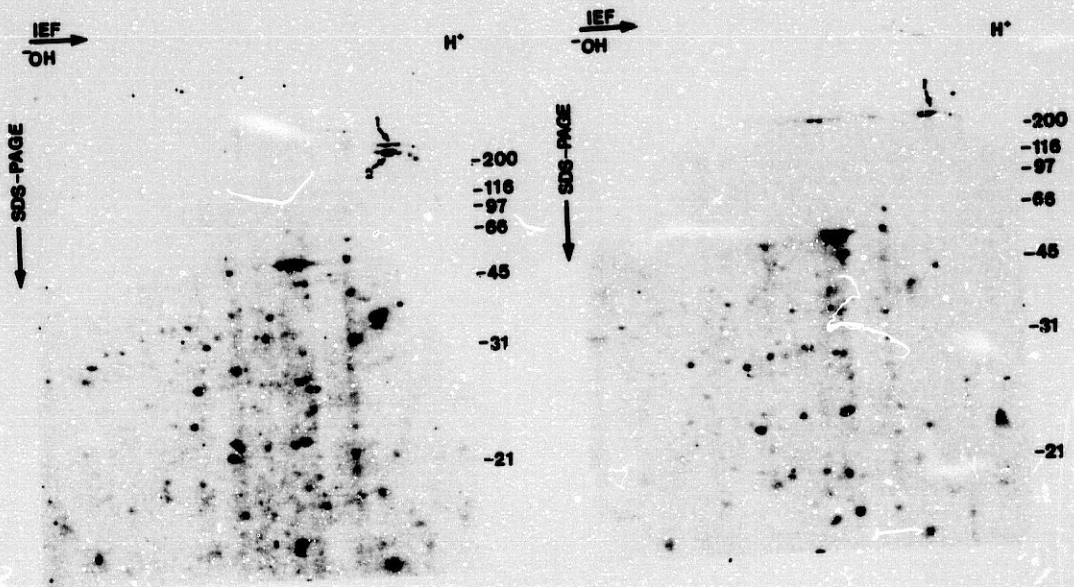


Figura 16.- Estudio del patrón de proteínas de *L. tropica* mediante geles 2SDS-PAGE transferidos a membrana PVDF. Se realizó un isoelectroenfoque de las proteínas totales de las líneas salvaje y MTX-R1000 (100  $\mu$ g de cada muestra), para su posterior separación en geles SDS-PAGE al 10% de acrilamida y transferencia a membrana PVDF. Mediante flechas indicamos las diferencias observadas exclusivamente en las proteínas de alto tamaño molecular entre las líneas salvaje (A) y MTX-R1000 (B). Los tamaños moleculares (kDa) de estas proteínas fueron aproximadamente: (A) 1) 261, 2) 236; (B) 1) 240.

Las proteínas marcadoras de tamaño molecular, indicadas en el margen, son las mismas a las descritas en la Fig. 10.

**TABLA IV**

Proteínas presentes sólo en la línea salvaje  
de L. tropica

| <u>Proteína n<sup>o</sup>b</u> | <u>Proteínas<sup>a</sup> (kDa)</u> |                        |                 |
|--------------------------------|------------------------------------|------------------------|-----------------|
|                                | <u>totales</u>                     | <u>citoplasmáticas</u> | <u>membrana</u> |
| 1                              | 26                                 | 26                     | 26              |
| 2                              | 35                                 | ---                    | 35              |
| 3                              | 44                                 | 44                     | ---             |
| 4                              | 44                                 | ---                    | 44              |
| 5                              | 48                                 | 48                     | ---             |
| 6                              | 48                                 | 48                     | ---             |
| 7                              | 236                                | ---                    | 236             |
| 8                              | 261                                | ---                    | 261             |

a Tamaño molecular, expresado en kDa, de las diferentes proteínas observadas en las Figuras 13 y 15A.

b Los números corresponden a las proteínas señaladas con flechas en la Fig. 15A.

**TABLA V**

**Proteínas sobreexpresadas en la línea MTX-R1000  
de L. tropica**

| <u>Proteína n<sup>o</sup>b</u> | <u>Proteínas<sup>a</sup>(kDa)</u> |                    |                 |
|--------------------------------|-----------------------------------|--------------------|-----------------|
|                                | <u>totales</u>                    | <u>citósolicos</u> | <u>membrana</u> |
| 1                              | 25                                | 25                 | ---             |
| 2                              | 25                                | 25                 | ---             |
| 3                              | 27                                | 27                 | ---             |
| 4                              | 29                                | 29                 | ---             |
| 5                              | 29                                | 29                 | ---             |
| 6                              | 29                                | 29                 | ---             |
| 7                              | 34                                | ---                | 34              |
| 8                              | 34                                | ---                | 34              |
| 9                              | 43                                | 43                 | ---             |
| 10                             | 49                                | 49                 | ---             |
| 11                             | 59                                | 59                 | ---             |
| 12                             | 118                               | 118                | ---             |
| 13                             | 126                               | 126                | ---             |
| 14                             | 248                               | ---                | 248             |

**a** Tamaño molecular, expresado en kDa, de las diferentes proteínas observadas en las Figuras 13 y 15B.

**b** Los números corresponden a las proteínas señaladas por flechas en la Fig. 15B.

**4.4.1.- MICROSECUENCIACION DE LA PROTEINA DE MEMBRANA  
DE 240 kDa SOBREEXPRESADA EN LOS PARASITOS  
MTX-R1000.**

Una vez confirmada la sobreexpresión de una proteína de membrana de 240 kDa en los parásitos resistentes, posiblemente relacionada con la glicoproteína-P humana, procedimos al aislamiento, purificación y secuenciación de dicha proteína. Para ello, hicimos diversos geles SDS-PAGE al 6% de acrilamida y una posterior electrotransferencia a membranas PVDF, donde visualizamos la proteína, teñida con Amido black. Algunas de las piezas cortadas se sometían a una digestión con una solución de tripsina y otras con una solución de pepsina.

Los péptidos fueron seleccionados, para el análisis de su secuencia, en función de la altura de los picos identificados en las gráficas obtenidas tras la separación por HPLC (Fig. 17A y 17B).

Los picos elegidos en el caso de la digestión con tripsina fueron los números: 3, 4, 5, 6, 11, 15, 22, 23 y 24 de la Fig. 17A.

Se obtuvo de este modo, la microsecuenciación de 3 péptidos, correspondientes a los picos cuyos números eran 4, 5 y 6, sin obtener éxito en los demás.

La secuencia de aminoácidos obtenida en cada caso, fué:



| <u>Peptido n°4</u> |        | <u>Peptido n°5</u> | <u>Peptido n°6</u> |
|--------------------|--------|--------------------|--------------------|
| 1.-                | Glu    | Ala                | Ala                |
| 2.-                | Leu    | Pro                | Pro                |
| 3.-                | Pro    | Val                | Val                |
| 4.-                | Ala    | Asp                | Asp                |
| 5.-                | (Ala)? | Pro                | Pro                |
| 6.-                | N.D.   | Ala                | Ala                |
| 7.-                | Asp    | Met                | Met                |
| 8.-                | N.D.   | Tyr                | Tyr                |
| 9.-                | Gly    | Asn                | Asn                |
| 10.-               | Glu    | Thr                | Thr                |
| 11.-               | Tyr    |                    |                    |

Observamos como la secuencia de los péptidos 5 y 6 es idéntica; posiblemente, la digestión de estos péptidos fué incompleta y estas secuencias forman parte de péptidos de mayor tamaño. Respecto a la secuencia del péptido 4, la secuenciación no resultó buena, habiendo aminoácidos sin determinar.

Igualmente, en el caso de la digestión con pepsina, se seleccionaron los picos: 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de la Fig. 17B. Se obtuvo solo con éxito la microsecuenciación del péptido n° 4, cuya secuencia de aminoácidos es:

|         |          |
|---------|----------|
| 1.- Tyr | 7.- Asp  |
| 2.- Thr | 8.- Pro  |
| 3.- Lys | 9.- Ala  |
| 4.- Ala | 10.- Met |
| 5.- Pro | 11.- Tyr |
| 6.- Val |          |

Este péptido contiene parte de los péptidos mencionados anteriormente como 5 y 6, lo que sugiere que las secuencias de estos péptidos forma parte de un péptido de mayor tamaño.

La microsecuencia obtenida de esta proteína de membrana, posiblemente relacionada con la glicoproteína-P humana, es insuficiente para buscar homologías con proteínas de similares características, pues no se ha encontrado homologías significativas al introducir la microsecuencia en el banco de datos Gene Bank EMBL.

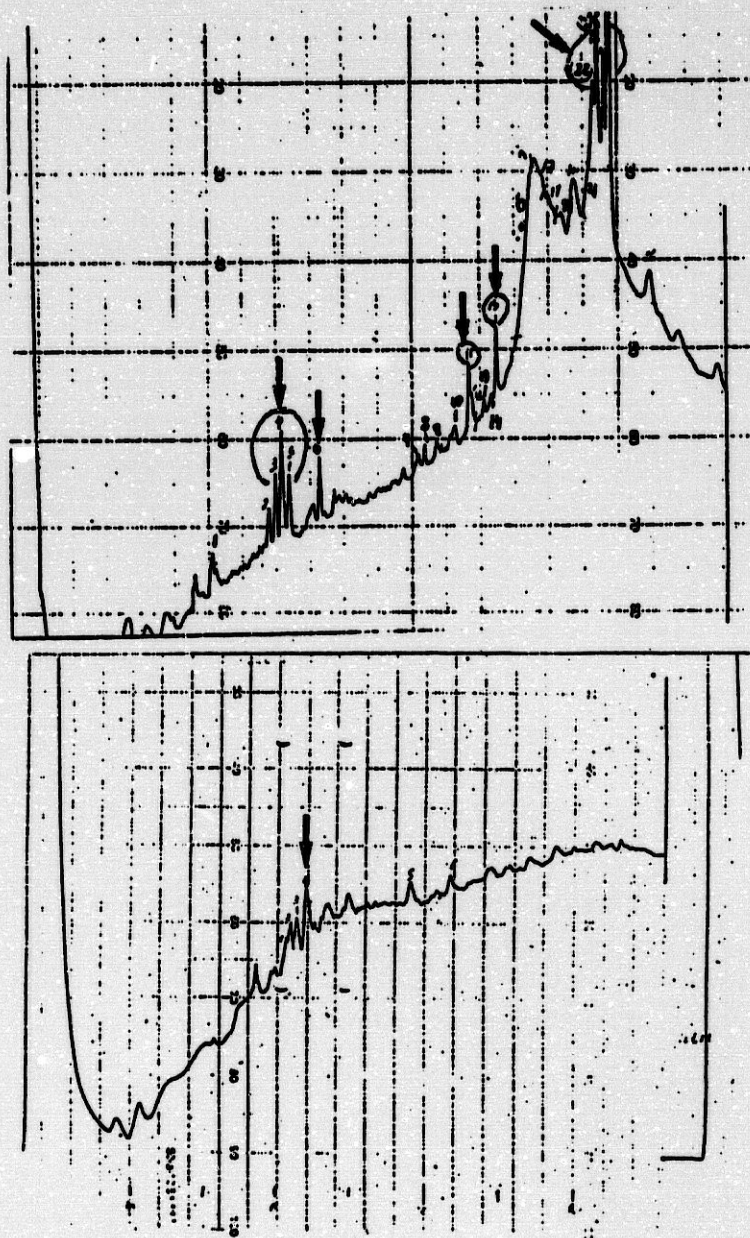


Figura 17.- Gráficas correspondientes a la separación de péptidos mediante HPLC.

(A) Tras digestión realizada con una solución de tripsina

(B) Tras digestión realizada con una solución de pepsina

#### 4.5.- SOBREEXPRESION DE UN GEN HOMOLOGO AL GEN ltpgpE EN *L. tropica*.

Para determinar que genes de la familia glicoproteína-P están involucrados en la sobreexpresión en *L. tropica* de esta proteína de membrana, posiblemente relacionada con la glicoproteína-P, estudiamos los niveles de transcripción de estos genes, mediante Northern blot, a partir de ARN poly A<sup>+</sup> procedente de parásitos salvajes y MTX-R1000. Tras hibridar con diversas sondas específicas para los diferentes genes que se han descrito en *L. tarentolae*: sonda para los genes ltpgpA, ltpgpB y C, ltpgpD y ltpgpE (suministradas por el Dr. M. Ouellette); observamos que únicamente la sonda para el gen ltpgpE reconoce exclusivamente en los parásitos resistentes un transcrito de aproximadamente, 6kb (Fig. 18A).

Para normalizar la cantidad de ARN poly A<sup>+</sup> de los parásitos salvajes y MTX-R1000, el northern se rehibridó con una sonda específica para el gen  $\beta$ -tubulina de *T. cruzi* (Fig. 18B).

El tamaño del ARNm, que posiblemente codifique para glicoproteína-P E (pgpE), es similar al descrito para los genes glicoproteínas-P de células de mamíferos (Chen y col. 1986), *E. histolytica* resistente a emetina (Samuelson y col. 1990), *L. tarentolae* resistente a MTX (Ouellette y col. 1990), y de menor tamaño que los ARNm descritos en *P. falciparum* cuyo tamaño es 7-8 kb (Wilson y col. 1989) y en *L. donovani* resistente a vinblastina, con un tamaño de 12,5 kb (Henderson y col. 1992).

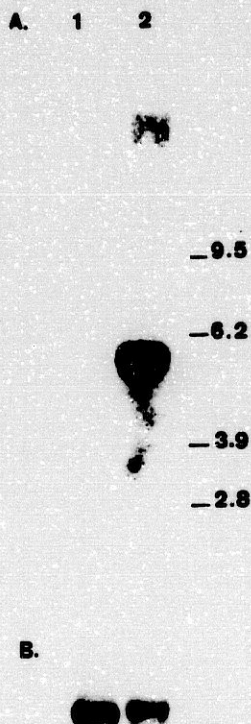


Figura 18.- Expresión del gen *ppgE* en las líneas salvaje y MTX-R1000 de *L. tropica*. (A) La electroforesis de 7  $\mu$ g de ARN poly A<sup>+</sup> procedente de las líneas salvaje (1) y MTX-R1000 (2), se realizó en un gel de agarosa al 1 $\frac{1}{2}$ ,2 M de formaldehído. Se transfirió a membrana de nylon y se hibridó con la sonda para el gen *ltpgpE*. (B) Posteriormente, la membrana se deshibridó y se volvió a hibridar con la sonda específica para el gen  $\beta$ -tubulina, al objeto de normalizar la cantidad de ARN poly A<sup>+</sup> de los parásitos salvajes y MTX-R1000.

En el margen se indican los tamaños moleculares, expresados en kilobases (kb), de los marcadores de ARN suministrados por Promega.

#### 4.6.- ANÁLISIS MEDIANTE SOUTHERN BLOT DEL GEN pgpE.

Se ha descrito tanto en células tumorales (Riordan y col. 1985) como en Leishmania (Ouellette y col. 1990; Callahan y col. 1991), resistentes a fármacos, que el aumento en los niveles de transcripción va asociado a la amplificación de al menos uno de los genes glicoproteína-P.

Los análisis de Northern blot y de proteínas, en los que se observa en la línea MTX-R1000, un transcrito de aproximadamente 6 kb que hibrida exclusivamente con la sonda para el gen ltpgpE, y la sobreexpresión de una proteína de membrana relacionada con la glicoproteína-P humana, podrían sugerir que la línea MTX-R1000 de L. tropica podría tener amplificado el gen pgpE, homólogo al gen ltpgpE de L. tarentolae.

Hemos estudiado mediante Southern blot e hibridación con la sonda específica para el gen ltpgpE si este incremento en la transcripción se correspondía con un incremento en el número de copias génicas para el gen pgpE.

Tras digerir el ADN genómico de parásitos salvajes y MTX-R1000, con los enzimas EcoRI y BamHI, y posterior hibridación del Southern con la sonda específica para el gen ltpgpE de L. tarentolae, pero no se observa un incremento en el número de copias génicas en la línea MTX-R1000.

Sin embargo, en el análisis del Southern blot (Fig. 19A), se observa que existe una significativa diferencia en el patrón de restricción de los parásitos resistentes respecto al de los salvajes, debido posiblemente a reordenamientos génicos.

Para normalizar la cantidad de ADN en las muestras de los parásitos salvajes y MTX-R1000 y comprobar que realmente no existía amplificación del gen *pgpE*, se empleó una sonda para el gen  $\beta$ -tubulina procedente de Trypanosoma cruzi (Fig. 19 C); el análisis videodensitométrico de la hibridación con esta sonda mostraba que existía una mayor cantidad de ADN de los parásitos resistentes con respecto a la de los parásitos salvajes.

Uno de los mecanismos de resistencia que pueden desarrollar los organismos eucariotas es la amplificación del gen que codifica a la proteína blanco de acción del fármaco. Con el propósito de estudiar si el número de copias del gen que codifica para la proteína DHFR-TS, blanco de acción del MTX, presentaba o no diferencias entre los parásitos salvajes y MTX-R1000, este mismo Southern se hibridó con una sonda para el gen DHFR-TS de L. tropica (Fig. 19B). El análisis videodensitométrico de los resultados de esta hibridación y los obtenidos al normalizar la cantidad de ADN en las muestras con la sonda para el gen  $\beta$ -tubulina (Fig. 19C) demostraron que no existe alteración en el número de copias del gen DHFR-TS en los parásitos que han adquirido resistencia a 1000  $\mu$ M de MTX, respecto a las formas salvajes.

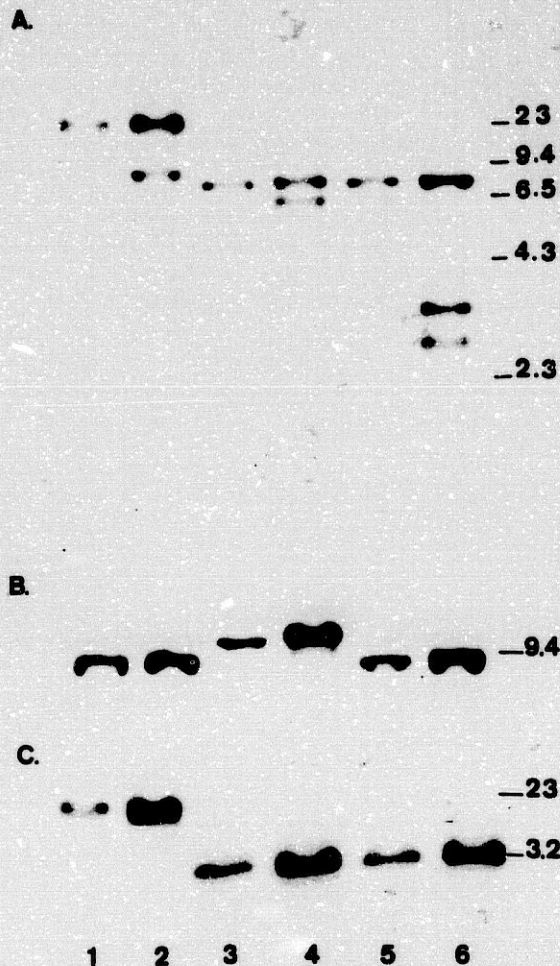


Figura 19.- Análisis del Southern blot de *L. tropica* mediante hibridación con diferentes sondas. (A) 2  $\mu$ g de ADN de las líneas salvaje y MTX-R1000 se digirieron con los enzimas EcoRI y BamHI. La electroforesis se realizó en gel de agarosa al 1%, transfiriéndose a membrana de nylon y posteriormente se realizó la hibridación con la sonda específica para el gen ltpgpE. 1 y 2: ADN de las líneas salvaje y MTX-R1000 respectivamente, digeridas con EcoRI. 3 y 4: ADN de las líneas salvaje y MTX-R1000 respectivamente, digeridas con BamHI. 5 y 6: ADN de las líneas salvaje y MTX-R1000 respectivamente, digeridas con EcoRI y BamHI. (B) Posteriormente, la membrana se deshibridó y se volvió a hibridar con la sonda específica para el gen DHFR-TS procedente de *L. tropica*, al objeto de determinar el número de copias del gen DHFR-TS en los parásitos salvajes y MTX-R1000. (C) La membrana se volvió a rehibridar con la sonda para el gen  $\beta$ -tubulina, con objeto de normalizar la cantidad de ADN de los parásitos salvajes y resistentes. Los marcadores de tamaño molecular, expresados en kb, proceden del ADN del fago Lambda digerido con HindIII.



#### 4.7.- LOCALIZACION CROMOSOMAL DEL GEN *pgpE*.

Al objeto de estudiar por una parte la localización cromosómica del gen *pgpE* y por otra comprobar si en los parásitos resistentes tienen lugar reordenamientos cromosomales, se separaron los cromosomas de las líneas salvaje y MTX-R1000 mediante electroforesis en campo pulsante (CHEF). Estos geles se transfirieron a membrana y se hibridaron con la sonda específica para el gen *ltpgpE* (Fig. 20). Se localizó el gen *pgpE* en un cromosoma de aproximadamente 1500 kb, tanto en la línea salvaje como en la línea MTX-R1000. En la hibridación de la sonda para el gen *ltpgpE* con el cromosoma, no se observó amplificación del gen *pgpE*, aunque si existe una sensible variación en el tamaño del cromosoma entre las líneas salvaje y MTX-R1000, ya que se observa que el cromosoma de la línea resistente es ligeramente de menor tamaño que el correspondiente de la línea salvaje. Esta diferencia observada puede estar relacionada con el cambio en el patrón de digestión de la línea MTX-R1000 (Fig. 19A), y quizás esta modificación podría estar relacionada con el incremento en la transcripción observada para el gen *pgpE* (Fig. 18). Igualmente, en el gel teñido con Bromuro de Etidio, se observa que existe un gran cambio en el patrón cromosómico entre los parásitos salvajes y resistentes. Posiblemente, la variación del tamaño del cromosoma podría deberse a cambios intracromosomales, como sugieren los análisis de Southern blot (Fig. 19A).

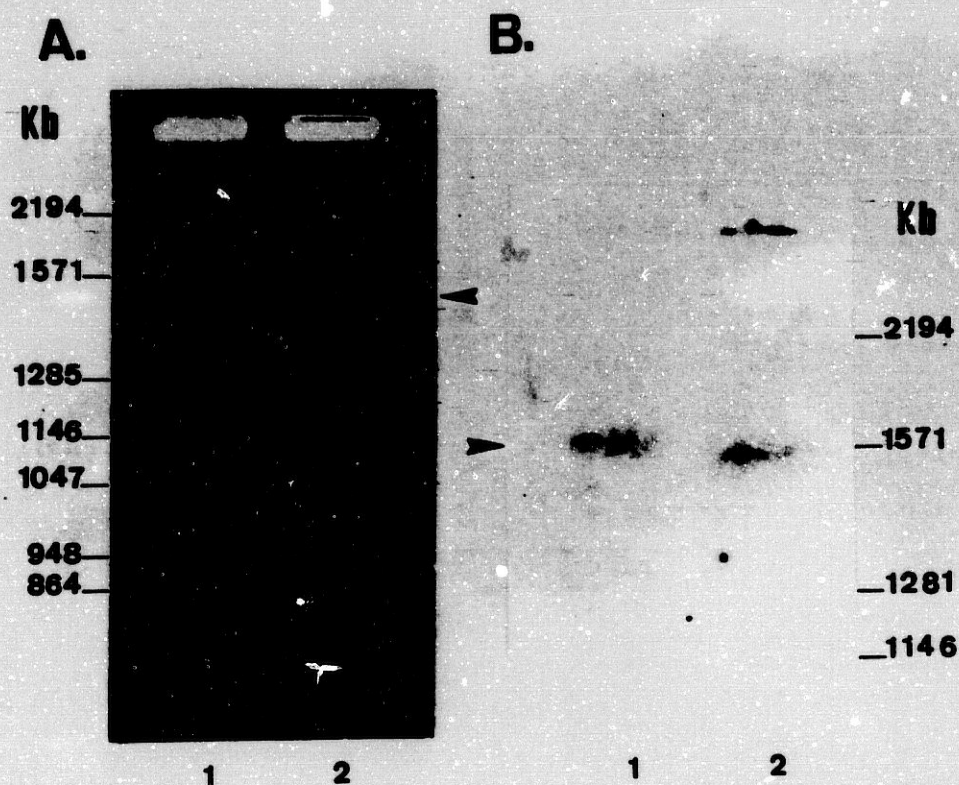


Figura 20.- Localización cromosomal del gen *pgpE* de *L. tropica* mediante Southern cromosómico. (A) Cada pocillo contenía 4  $\mu$ g de ADN cromosomal, procedente de las líneas (1) salvaje (2) MTX-R1000, y contenido en bloques de agarosa. Los cromosomas de las líneas indicadas fueron separados mediante CHEF. Las condiciones de la electroforesis fueron adecuadas para separar ADN cromosomal de gran tamaño. (B) El Southern blot del gel se hibridó con la sonda homologa para el gen *ltpppE*.

Como marcadores de tamaño molecular (expresados en kb), se emplearon los tamaños moleculares de los cromosomas de *S. cerevisiae*.

## **5. *DISCUSSION***

### 5.1.- INDUCCION, SELECCION Y ESTABILIDAD DE *L.tropica* RESISTENTE IN VITRO A MTX.

La inducción de resistencia a fármacos in vitro en células de mamíferos, ha sido muy empleada para el estudio de los mecanismos de resistencia a fármacos. Nosotros estamos interesados específicamente en el estudio del mecanismo molecular de resistencia a fármacos en protozoos parásitos del género Leishmania. Para lo cual, en L. tropica LRC-L39 hemos inducido la resistencia in vitro a metotrexato (MTX).

El MTX se puede considerar como prototipo de fármaco empleado para el estudio de los mecanismos de resistencia en Leishmania, debido a que su mecanismo de acción es bien conocido. Este fármaco, ampliamente utilizado en la quimioterapia de diferentes tipos de cáncer, es un inhibidor del enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), produciendo una disminución en el contenido intracelular de tetrahidrofolato, necesario para la biosíntesis de nucleótidos de purina y timidina, lo que origina una inhibición de la síntesis de ADN.

Los parásitos resistentes a MTX, pueden desarrollar diversos mecanismos, que bien independientes o combinados pueden conferir resistencia a antifolatos. Estos mecanismos consisten en: amplificación del gen que codifica para la proteína dihidrofolato reductasa-timidilato sintasa (DHFR-TS), blanco de acción del MTX (Beverley, 1991), alteración del transporte de MTX (Ellenberger y col. 1987; Kaur y col. 1988), y aparición de elementos extracromosomales (región H) (Hightower y col. 1988; White y col. 1988).

Los métodos utilizados en células eucariotas para la inducción de resistencia a fármacos in vitro son:

- 1.- Mutagénesis mediante la cual se obtienen clones de células resistentes al fármaco objeto de estudio; este método se ha utilizado en la obtención de Entamoeba histolítica resistente a emetina (Samuelson y col. 1990) y en L. donovani resistente a MTX (Kaur y col. 1988), utilizando como agente mutagénico Etilmetanosulfonato y N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, respectivamente.
- 2.- Mediante exposición de las células a concentraciones crecientes de fármaco, disuelto en el medio de cultivo (Coderre y col. 1983). De estos dos métodos, el más utilizado es la exposición de las células a concentraciones crecientes de fármaco.

La inducción de resistencia in vitro a 1000  $\mu\text{M}$  de MTX en L. tropica LRC-L39, se realizó mediante exposición continuada a concentraciones crecientes de fármaco, como describen Coderre y col. (1983), y por exposición directa de los parásitos resistentes a 10  $\mu\text{M}$  de MTX (MTX-R10) a 1000  $\mu\text{M}$  de MTX (MTX-R1000d), como describen Dewes y col. (1986).

La concentración escogida para comenzar el proceso de inducción de resistencia a MTX fué 5 $\mu\text{M}$ , ya que parecía la dosis más adecuada al ser significativamente menor que la  $\text{DI}_{50}$  para el MTX encontrada en la línea salvaje de L. tropica LRC-L39 (20  $\mu\text{M}$ ).

El tiempo requerido para obtener la resistencia a la máxima concentración de MTX, por ambos métodos, fué similar, 188 y 157 días, respectivamente (Fig. 4). Las líneas MTX-R1000d, mostraron las mismas propiedades (tiempo de doblaje, valores de  $\text{DI}_{50}$  a MTX, valores de resistencia cruzada a otros fármacos), que las obtenidas mediante expo-

sición a concentraciones crecientes de MTX. De esto podemos deducir que la obtención de la línea MTX-R1000d por adaptación directa a 1000  $\mu$ M de MTX, a partir de parásitos resistentes a bajas concentraciones de MTX, no presenta ventajas en lo que se refiere al tiempo requerido para obtener resistencia a la máxima concentración, respecto a la selección por exposición continuada a concentraciones crecientes de fármaco. Otra importante desventaja a considerar en el uso de la adquisición de resistencia por adaptación directa de parásitos resistentes a bajas concentraciones, es la alta concentración de fármaco que se requiere durante todo el proceso, hecho que encarece este método. También, en favor de la selección de resistencia por exposición continuada a concentraciones crecientes de fármaco, observamos un mejor proceso de adaptación del parásito a la presencia del fármaco, dado que el crecimiento celular en los cultivos se observaba menos afectado (en lo que se refiere a una mayor movilidad, a un crecimiento más rápido y a una menor formación de agrupaciones en rosetas) que en los cultivos de parásitos obtenidos por adaptación directa.

Todo lo cual, ha llevado a considerar el método de obtención de resistencia in vitro mediante la adaptación a concentraciones crecientes de fármaco como el método usual de adquisición de resistencia in vitro en nuestro laboratorio.

Los parásitos MTX-R1000 de L. tropica LRC-L39, presentaron un valor de I.R. (índice de resistencia) igual a 794; es decir esta línea es 794 veces más resistente a MTX que la línea salvaje. Este valor resultó ser más alto que el obtenido en L. tarentolae resistente a 1mM de MTX, cuyo valor de I.R. era 40 (Ouellette y col. 1990) y más bajo que el obtenido en L. major resistente a 1 mM de MTX,

que presentaba un valor de I.R. de 4.600 (Ellenberger y col. 1989a). Las diferencias encontradas en los valores de I.R. podría deberse entre otros factores a las distintas susceptibilidades que pueden presentar los parásitos salvajes al MTX. Así por ejemplo, la línea salvaje de L. major era más sensible a MTX que la de L. tropica LRC-L39, siendo la  $DI_{50}$  para el MTX de 0,5 y 20  $\mu$ M respectivamente; es decir la línea salvaje de L. tropica es aproximadamente 40 veces menos sensible al MTX que L. major, y esto influye en que el valor de I.R. sea más bajo en L. tropica. Otros factores que podrían influir en estas diferencias de los valores de I.R. son: tratarse de distintas especies, desarrollar mecanismos de resistencia diferentes y crecer en medios de cultivos diferentes.

En lo que se refiere a la estabilidad de la resistencia a MTX, los resultados de nuestros estudios, muestran que después de mantener los parásitos 6 meses ( $Rv_6$ ) en cultivo en ausencia de fármaco, el fenotipo de resistencia es estable durante 3 meses de crecimiento en ausencia de fármaco ( $Rv_3$ ), revirtiendo lentamente hasta alcanzar a los 6 meses unos valores de  $DI_{50}$  próximos a los de parásitos salvajes (Fig. 5). Esta estabilidad de resistencia, encontrada en la línea  $Rv_3$  (aproximadamente 200 generaciones), quedó confirmada con los estudios de resistencia cruzada en las líneas  $Rv_3$  y  $Rv_6$ , cuyos resultados son similares a los de la línea MTX-R1000 y salvaje, respectivamente. Estos resultados de estabilidad de resistencia a MTX son similares a los observados por Dewes y col. (1986) en C. fasciculata y por Kaur y col. (1988) en L. donovani, que mantienen el fenotipo de resistencia después de 200 generaciones de crecimiento en ausencia de fármaco.

## 5.2.- MULTIRRESISTENCIA A FÁRMACOS EN *L. tropica*.

Estudios realizados en células tumorales seleccionadas por su resistencia a un determinado fármaco, mostraban que adquirirían simultáneamente resistencia cruzada a diversos fármacos lipofílicos estructural y funcionalmente diferentes, como son vinblastina, vincristina, doxorubicina, daunorubicina y ciertos antifolatos. Las células que presentaban este fenotipo se denominaron multirresistentes, fenotipo que está simplificado con las siglas MDR (Pastan y col. 1987; Endicott y col. 1989; Gros y col. 1991).

El fenotipo MDR en células tumorales, se caracteriza por la amplificación y sobreexpresión de un gen MDR que codifica para una glicoproteína de membrana de alto tamaño molecular, involucrada en el eflujo de fármacos al exterior celular, así como en la resistencia cruzada a diferentes fármacos no relacionados con el fármaco frente al que se obtuvo la resistencia.

En distintas especies de Leishmania, seleccionadas por su resistencia a fármacos, se han realizado diversos estudios de resistencia cruzada, para comprobar si desarrollaban un mecanismo de resistencia similar al de las células tumorales con fenotipo MDR.

Así, en *L. tarentolae* resistente a MTX (Ouellette y col. 1990), se comprobó que no presentaba resistencia cruzada a trimetoxato (análogo del MTX), arsenito, puromicina y doxorubicina. Ellenberger y col. (1989a) describieron en *L. major* resistente a MTX, resistencia cruzada a primaquina y terbinafina. Resultados que junto a los obte-



nidos por Katakura y col. (1989) en estudios con L. mexicana amazonensis resistentes a arsenito, y que presentaban resistencia cruzada a MTX, sugirieron la relación de la resistencia a fármacos con la presencia en estos parásitos de la amplificación de la región H.

Dentro de la región H, se ha descrito la presencia de los genes *ltpgpA* en L. tarentolae (Ouellette y col. 1990) y el gen *lmpgpA* en L. major (Callahan y col. 1991), que se encuentran amplificados en los parásitos resistentes a MTX. Estos genes presentan una gran homología en sus secuencias y perfiles de hidrofobicidad con los genes MDR (mejor denominados genes de la familia glicoproteína-P), descritos en células de mamíferos (Ouellette y col. 1991).

Recientes estudios de transfección realizados por Callahan y col. (1991), empleando 4 grandes fragmentos de ADN procedentes de la región H de L. major resistente a MTX, mostraron que sólo los vectores que contenían el gen *lmpgpA* completo, adquirirían una resistencia significativa al arsenito (unas 10 veces más resistente) y a los antimoniales trivalentes, aunque no a los antimoniales pentavalentes, zinc, cadmio ni a otras sustancias descritas en el espectro de multirresistencia en células tumorales y Plasmodium, como puromicina y vinblastina. Cuando se realizó la transfección empleando un fragmento de 10 kb, conteniendo el gen *ltpgpA*, se observó que las Leishmanias transfectadas, presentaban menor resistencia (de 2 a 4 veces) a los antimoniales trivalentes que cuando se utilizó el gen *lmpgpA*, excepto al arseniato que resultó ser algo más resistente (2,8 veces, comparado con 1,9 veces en el caso del gen *lmpgpA*).

Los estudios de transfección en Leishmania pueden ser útiles para conocer la funcionalidad que desempeñan los genes glicoproteína-P en la resistencia a los fármacos utilizados en el tratamiento clínico de la enfermedad. Así, los datos experimentales anteriormente descritos sugieren que el gen *ltpgpA*, puede desempeñar un importante papel en la susceptibilidad de Leishmania a los antimoniales clínicamente empleados. Aunque el fármaco de elección, utilizado en el tratamiento de leishmaniasis es el antimonio pentavalente y no antimonio trivalente, y dado que el gen *lmpgpA* no confiere resistencia in vitro a Pentostam (Sb V), se sospecha que los compuestos pentavalentes pueden metabolizarse in vivo, pasando a antimoniales trivalentes (Croft y col. 1981).

En bacterias se ha descrito una resistencia a metales pesados similar a lo que sucede en Leishmania. Estas bacterias presentaban un significativo eflujo de fármacos como arsenito, arseniato y antimonio (III) (Mobley y col. 1982), y la existencia de una proteína de membrana con actividad ATPasa, cuya función es similar a la glicoproteína-P (Silver y col. 1989). Sin embargo, el análisis de la secuencia y estructura del gen *ltpgpA* muestra que la proteína que codifica este gen pertenece a la familia de la glicoproteína-P (Ouellette y col. 1990), y no a las proteínas ATPasa bacterianas.

Henderson y col. (1992) observaron en L. donovani resistente a vinblastina la amplificación de un gen que codifica para una glicoproteína-P. Este gen, denominado *ldmdr1*, confiere un típico fenotipo MDR, dado que estos parásitos resistentes a vinblastina presentaban resistencia cruzada a fármacos pertenecientes al espectro de resistencia cruzada descrito en células de mamíferos como puromicina, doxorubicina y daunorubicina. Este gen es muy diferente

del gen *ltpgpA*, dado que la homología del gen *ldmdr1* con el gen *mdr* humano es mayor que en el gen *ltpgpA*, y esta amplificación no está relacionada con la amplificación de la región H.

Igualmente, *L. tropica* LRC-L39 resistente *in vitro* a MTX presenta una significativa resistencia cruzada a fármacos y sustancias químicas no relacionados estructuralmente y funcionalmente con el MTX (Tabla I), y que forman parte del espectro de resistencia de las células tumorales con fenotipo MDR tales como puromicina, vinblastina y doxorubicina. También presentó resistencia a arseniato sódico, que no forma parte del espectro de resistencia de las células tumorales, ni es inductora del fenotipo MDR, pero sin embargo, como se ha comentado anteriormente, se ha descrito en *L. major* y en *L. tarentolae* que presentaban amplificación en la región H de un gen perteneciente a la familia de glicoproteínas-P, que podría ser el responsable de la resistencia cruzada a los metales pesados, entre ellos antimonio (III) y arsenico (III y V) (Callahan y col. 1991).

En células de mamíferos (Fojo y col. 1985) y en *Plasmodium* resistente a cloroquina (Martin y col. 1987), el fenotipo de multirresistencia a fármacos, revierte mediante el empleo de diferentes sustancias que actúan como bloqueadores de los canales de calcio, como el verapamil. Esta reversión podría ser consecuencia de la competencia que se establece entre los fármacos citotóxicos y los bloqueadores de los canales de calcio por un sitio de unión en la glicoproteína-P, responsable del eflujo celular.

En L. tropica LRC-L39 la resistencia a MTX no revierte por el tratamiento con verapamil (Fig. 7), incluso a una concentración que inhibía casi en un 20% el crecimiento de los parásitos. Además, se observó una baja resistencia (1,9 veces) a éste fármaco (Fig. 6). Estudios realizados en diferentes especies de Leishmania resistentes a MTX, como es el caso de L. tarentolae (Ouellette y col. 1990) y L. major (Ellenberger y col. 1989), han demostrado que el tratamiento con verapamil, no revertía la resistencia a MTX.

En otras especies de Leishmania resistentes a fármacos diferentes al MTX, como en L. donovani resistente a vinblastina (Henderson y col. 1992), y en L. major resistente a MTX, tampoco se observó que tras el tratamiento con verapamil, revirtiera su resistencia a los fármacos mencionados.

Este hecho podría deberse a que las secuencias de las glicoproteínas-P de células tumorales son distintas a las de Leishmania. Posiblemente no exista un sitio de unión o exista baja afinidad en la glicoproteína-P de estos parásitos para el verapamil y por lo tanto no puede competir con otros fármacos citotóxicos como ocurre en las células tumorales.

No obstante, si los genes *ltppgA* o *lmpgpA* fueran los responsables de la resistencia a antimoniales en el tratamiento clínico de leishmaniasis, como comentamos anteriormente, resultaría interesante buscar agentes efectivos que actuaran, como el verapamil lo hace en células tumorales multirresistentes, compitiendo por el sitio de unión de la glicoproteína-P y revirtiendo de este modo la resistencia a los antimoniales.

Los datos descritos, junto con los resultados obtenidos en L. tropica LRC-L39, sugerirían la existencia en estos parásitos de amplificación de genes homólogos a los genes de la familia glicoproteína-P. De hecho, en L. tropica resistente a MTX hemos encontrado, sobreexpresada en la membrana celular, una proteína de 240 kDa. Esta proteína relacionada con la glicoproteína-P humana podría estar involucrada en el eflujo de fármacos y explicaría que estos parásitos presenten una significativa resistencia cruzada a fármacos no relacionados estructural ni funcionalmente con el MTX, y relacionados con el espectro de multirresistencia en células de mamíferos.

### 5.3.- ALTERACION DEL TRANSPORTE DE MTX EN *L. tropica*.

Como mencionábamos anteriormente, uno de los posibles mecanismos de resistencia a antifolatos en *Leishmania*, es la alteración del transporte.

Estudios realizados sobre la alteración del transporte de fármacos en células tumorales de mamíferos y diferentes parásitos resistentes a fármacos, han demostrado la existencia de una disminución en el acúmulo del mismo en el interior celular, por una menor captación de fármaco (disminución en el influjo) o bien por una salida más rápida de éste (aumento de eflujo).

Para conocer mejor este mecanismo de resistencia, diversos autores han estudiado el transportador de nucleósidos y folato, así como de su análogo citotóxico, MTX. Se sabe que en las células animales existen proteínas de membrana transportadoras de folato y análogos. Así, Elwood (1989) caracterizó el transportador de folato/MTX de células tumorales humanas y dedujo que esta proteína, podría tener un tamaño molecular de 29,8 kDa. En *L. donovani* se ha descrito que la proteína posiblemente transportadora para folato/MTX, tiene un tamaño molecular de aproximadamente 46 kDa (Beck y col. 1989). Sin embargo, existen diferencias en el mecanismo de transporte de folato/MTX entre *Leishmania*, bacterias y células de mamíferos. La regulación del transporte de folato/MTX en *Leishmania* es diferente al de bacterias, ya que no es tan dependiente de las concentraciones extracelulares de folato, pues no hay cambios en el transporte a concentraciones de 4 mM. También es diferente a células de mamíferos, pues la captación en estos protozoos es inhibida por

azida sódica mientras que en células de mamíferos la azida sódica produce un descenso de AMPc y una elevación de las concentraciones intracelulares de MTX. Del mismo modo, el pABA-glutamato inhibe el transporte en Leishmania mientras que no afecta al transporte en bacterias y en células de mamíferos. El transporte de folato en Leishmania está regulado por la fase de crecimiento celular, la Velocidad máxima ( $V_{max}$ ) del influjo se reduce más de 10 veces en la fase estacionaria. Por el contrario, en bacterias y células de mamíferos, el transporte es máximo al final de la fase logarítmica del crecimiento y en la fase estacionaria. Otra de las diferencias que presenta el transporte de folato/MTX en Leishmania, respecto a células de mamíferos, es que las células de mamíferos presentan mayor afinidad por el MTX que por el folato, mientras que en Leishmania la afinidad es mayor para folato.

Las diferencias mencionadas en este sistema de transporte en Leishmania, respecto a las células de mamíferos, podrían ser de gran utilidad para el desarrollo de inhibidores específicos del transporte de folato, en una quimioterapia selectiva, sabiendo que Leishmania es incapaz de sintetizar de novo folato y debe adquirirlo del medio extracelular.

El mecanismo de transporte de folatos en Leishmania, estudiado por Ellenberger y col. (1987a), propone que el influjo de folato y MTX exhibe una cinética Michaelis-Menten, siendo la Velocidad máxima ( $V_{max}$ ) similar para ambos sustratos y la afinidad del transportador mayor para folato que para MTX. El influjo es dependiente de tiempo, de energía (ya que el transporte se reduce a 4°C), está inhibido por iodoacetato y azida, y el acúmulo se produce contra gradiente de concentración.

En células tumorales y en parásitos resistentes a MTX el primer mecanismo de resistencia que se observa es la alteración de transporte, pudiendo aparecer posteriormente otros mecanismos de resistencia como es la amplificación génica. Así, L. major resistente a  $1\mu\text{M}$  de MTX desarrolla un rápido descenso en la  $V_{\text{max}}$  de flujo para el MTX de un 60% a las 24 horas de exposición al fármaco, aunque este descenso inicial es inestable en ausencia de fármaco, ya que tras 24 generaciones en medio carente de fármaco, la  $V_{\text{max}}$  aumenta hasta un 83% de la  $V_{\text{max}}$  de los parásitos salvajes (Ellenberger y col. 1987b).

En lo que se refiere a la estabilidad de este mecanismo, en L. major resistente a  $1\text{mM}$  de MTX se ha observado una significativa reducción en el acúmulo de MTX. Esta reducción se mantiene por más de 200 generaciones en ausencia de MTX, y de forma paralela se produce una disminución en el número de copias de las regiones R y H amplificadas, siendo la pérdida de amplificación de R-ADN más rápida que la de H-ADN, seguida finalmente por la pérdida en la reducción en la captación de MTX (Ellenberger y col. 1987b). Todos estos datos sugieren que la amplificación génica no está relacionada con la reducción del transporte de fármaco, incluso se ve reducido en mayor grado en clones que no presentan amplificación, y la diferencia en la estabilidad de la amplificación y el descenso del transporte en la línea resistente a  $1\text{mM}$  de MTX en ausencia de fármaco, apoyan aún más esta hipótesis.

En L. donovani resistente a MTX (Kaur y col. 1988), también se ha observado que presentaba deficiencias en el transporte de MTX. Estos parásitos resistentes no incorporaban más del 1% del fármaco incorporado por los parásitos sensibles, similar a lo que ocurre en L. major resistente a MTX (Dewes y col. 1986).



Igualmente, en L. tropica se observa que tanto la línea MTX-R1000, como la línea RV<sub>1</sub>, muestran una disminución significativa de MTX (aprox. un 97%), cuando lo comparamos con las líneas salvaje o RV<sub>0</sub>, (Fig.9). Como observamos, este fenotipo resistente que conlleva a una disminución de la capacidad de acumulación de fármaco, se mantiene hasta 3 meses después de un crecimiento en ausencia de la presión de MTX (aproximadamente 200 generaciones).

En lo que se refiere a los parámetros cinéticos de transporte, la afinidad aparente para el MTX ( $K_t$ ), no está alterada en la línea MTX-R1000 de L. tropica respecto a la línea salvaje, mientras que la velocidad de influjo ( $V_{max}$ ) es significativamente mayor en la línea salvaje (tabla III).

Los valores de  $K_t$  encontrados en otras especies de Leishmania fueron muy similares a aquellos obtenidos en L. donovani (Kaur y col. 1988) y algo más bajos a los de L. major (Ellenberger y col. 1987b). Los valores de  $V_{max}$  para la línea salvaje de L. tropica fueron significativamente más bajos que los descritos para L. donovani y L. major. Posiblemente, estas diferencias se deban a la distinta composición de los medios de cultivo utilizados en estas experiencias y a los valores de los índices de crecimiento de los parásitos, por poseer un diferente tiempo de doblaje.

Puesto que la afinidad del receptor por el fármaco (valor de  $K_t$ ) es la misma en las líneas salvaje y MTX-R1000, esta disminución en la captación de MTX, podría atribuirse a una mutación en el gen que codifica para el transportador, o bien a una variación en la expresión de receptores de membrana en la línea MTX-R1000 (Ellenberger

y col. 1987b; Kaur y col. 1988). No está claro si esta mutación tiene lugar en el gen estructural que codifica para el transportador de folatos, en un gen regulador o en un gen responsable de la modificación de la composición de la membrana, pudiendo disminuir el número de receptores para MTX/folato en la línea MTX-R1000.

En células tumorales multirresistentes se ha descrito un aumento de eflujo de diversos fármacos en un proceso dependiente de energía, actuando como transportador la glicoproteína-P. Sin embargo, se conoce muy poco acerca del eflujo de MTX en lo que se refiere a su regulación; si existe o no proteínas específicamente exportadoras de MTX o si es la misma proteína transportadora de folato/MTX, anteriormente descrita, la encargada también del eflujo de MTX.

En L. major se ha descrito que el MTX se hidroliza en el interior celular pasando a MAPA (N-10-metil-4-deoxy-4-aminopteroato), dado que después de 24 horas de incubación en presencia de 1  $\mu$ M de MTX, un 30% era MAPA, siendo éste 190 veces menos potente en la inhibición del crecimiento, dado que presenta menos afinidad que el MTX por el enzima DHFR-TS, esto sugeriría que pudiera ser éste uno de los motivos de resistencia a MTX. En lo que se refiere al eflujo, se observó que después de 24 horas de incubación de los parásitos en presencia de 1  $\mu$ M de MTX, la concentración de MAPA excedía a la de MTX en el medio de cultivo. Además, se observó que la presencia de MAPA en el medio de cultivo no inhibía el influjo de folato, lo que sugería la existencia de un transportador para MAPA, distinto del transportador de folato/MTX (Ellenberger y col. 1989b).

Estos datos sugieren la posibilidad de que existan metabolitos del MTX, que se originen intracelularmente, que

tengan más facilidad para salir de la célula que el propio MTX, o incluso que existan transportadores específicos para estos metabolitos.

L. tropica LRC-L39 no sólo presenta reducida la captación de MTX, sino que el eflujo de fármaco o sus metabolitos es significativamente mayor en la línea resistente. Se requiere, aproximadamente, 200 generaciones en cultivo en ausencia de fármaco, para que se restablezcan los niveles de acumulación similares a los de la línea salvaje (Fig. 10 y 11).

En la actualidad no existe ninguna técnica óptima para medir el eflujo real, sino la tendencia a una estabilidad entre la cantidad de fármaco que entra y que sale. Es decir, no es posible estudiar en un tiempo muy corto una cinética muy rápida. En la técnica de eflujo utilizada en nuestros estudios, se mide el fármaco expulsado de la célula, pero se desconoce el fármaco que puede quedar asociado al receptor en la membrana o que una vez alcanzado el equilibrio, el fármaco pueda volver a salir de la célula por difusión, pudiendo así, ser transportado de nuevo al interior celular.

En conclusión, en L. tropica resistente a MTX se ha observado que existe una alteración en el transporte de fármaco que conlleva a una disminución en el acúmulo del mismo en el interior celular, debido a una menor incorporación y a una salida más rápida de fármaco respecto a la línea salvaje. Estos resultados sugieren que uno de los mecanismos de resistencia en L. tropica resistente a MTX podría estar relacionado con la actividad del transportador folato/MTX.

#### 5.4.- CAMBIOS EN EL PATRON DE PROTEINAS EN *L.tropica* MTX-R1000.

En células tumorales, la adquisición del fenotipo MDR, va acompañada de cambios en el patrón de proteínas (sobrexpresión y/o desaparición), además de la sobreexpresión de una proteína de membrana de alto tamaño molecular denominada glicoproteína-P (Beck y col. 1979; Van der Blik y col. 1986; Richert y col. 1985; Kartner y col. 1983). Estos cambios en el patrón de proteínas surgen como respuesta a la situación estresante que supone para la célula la adaptación al medio de cultivo en presencia de fármaco.

Así, se ha descrito en células tumorales la sobreexpresión de una proteína citosólica de aproximadamente 22 kDa (Van der Blik y col. 1986) o bien desaparición o disminución de dos glicoproteínas de 72 y 75 kDa (Richert y col. 1985).

En células tumorales multirresistentes se ha observado una reducción en el acúmulo de diferentes fármacos, debido a un aumento en el eflujo de fármaco en un proceso, y posiblemente relacionado con la sobreexpresión de la glicoproteína-P, cuyo tamaño molecular está comprendido entre 130 y 190 kDa (Juliano y col. 1976; Kartner y col. 1985).

En lo que se refiere a la sobreexpresión de glicoproteína-P en parásitos; en *P. falciparum* resistente a cloroquina se ha deducido, a partir de la secuencia de aminoácidos del gen *pfmdr1*, que el producto de este gen es un polipéptido de 160 kDa (Cowman y col. 1991). Otros 2

péptidos de 82 y 20 kDa se reconocieron en P. berghei por el anticuerpo monoclonal C<sub>21</sub>, (Grögl y col. 1991).

Este anticuerpo monoclonal C<sub>21</sub>, reconoce un epítipo localizado en el dominio citoplasmático de la glicoproteína-P humana, próximo al sitio de unión a ATP. Ha sido muy utilizado para estudiar la sobreexpresión de glicoproteína-P en diferentes tipos de células (Kartner y col. 1985). La secuencia de aminoácidos del epítipo que reconoce este anticuerpo monoclonal es Val-Val-Gln-Val-Ala-Leu-Asp (Georges y col. 1990).

En L. tropica resistente in vitro a MTX, hemos observado una moderada resistencia cruzada a fármacos englobados en el espectro de resistencia encontrado en células tumorales con fenotipo MDR. Para comprobar si existe sobreexpresión de algunas proteínas pertenecientes a la familia de la glicoproteína-P en estas células resistentes, hemos empleado el anticuerpo monoclonal C<sub>21</sub>. Este anticuerpo monoclonal C<sub>21</sub>, reconoció mediante Western Blots una proteína de 240 kDa (Fig. 14), cuyo tamaño molecular es significativamente más grande que las glicoproteínas-P descritas en otros parásitos. En L. tarentolae el tamaño mínimo de la glicoproteína-P, deducida de la secuencia de aminoácidos del gen ltpgpA, fué de 172 kDa (Oullette y col. 1990). En L. enrietti y L. panamensis se ha demostrado la sobreexpresión de péptidos, reconocidos por el anticuerpo monoclonal C<sub>21</sub>, con tamaños que oscilan entre 23-25 kDa y 43-45 kDa, respectivamente.

La gran variabilidad encontrada en el tamaño de las glicoproteínas-P entre células tumorales, Leishmania y otros parásitos, puede deberse a la gran divergencia existente entre los tipos de genes que codifican para esta glicoproteína, formando parte de una familia de multigenes.

A parte de que el tamaño de la glicoproteína-P se deba a las diferencias encontradas entre las secuencias de los genes de esta familia, también el tamaño de esta proteína dependerá del grado de glicosilación en que se encuentre.

Basados en esto, podríamos decir que modificaciones posteriores de la proteína de membrana encontrada en la línea resistente de *L. tropica*, como son la N-glicosilación y la fosforilación, sería la causa de que esta proteína sea más grande del tamaño normal de las glicoproteínas-P, descritas hasta el momento o que el gen que la codifica tiene un tamaño superior al de los descritos. La cantidad de esta proteína estimada mediante el análisis videodensitométrico de geles SDS-PAGE teñidos con Azul Comassie, respecto al total de proteínas presentes en el patrón de *L. tropica* es aproximadamente del 1%. Resultados similares, se obtuvieron en los geles SDS-PAGE realizados con parásitos marcados radiactivamente con metionina- $[^{35}\text{S}]$ . Los resultados obtenidos tanto en el Western Blot (Fig.14) como en los geles SDS-PAGE (Fig. 15), con parásitos marcados radiactivamente, muestran que esta proteína se encuentra enriquecida en la fracción de membrana y está ausente en el citosol. Este fenotipo es estable cuando mantenemos en cultivo los parásitos MTX-R1000 durante 3 meses en ausencia de la presión de fármaco ( $\text{Rv}_3$ ), puesto que aún sobreexpresaban esta proteína de 240 kDa reconocida mediante el anticuerpo monoclonal  $\text{C}_{219}$ , mientras que en los parásitos que se mantuvieron durante 6 meses en ausencia de fármaco, no se detectaba esta proteína (Fig. 14).

Probablemente, la presencia de esta proteína de membrana en la línea MTX-R1000 y  $\text{Rv}_3$ , podría estar relacionado con que el fenotipo de resistencia cruzada a otros fármacos se mantuviera también estable en esta línea, y esto explicaría que en la línea  $\text{Rv}_3$ , que no sobreexpresan

esta proteína de membrana, los valores de resistencia cruzada a fármacos fuesen similares al de los parásitos salvajes. Lo que sugiere, que esta proteína de membrana esté involucrada en el eflujo de fármacos al exterior celular, y por lo tanto sea responsable de la resistencia cruzada encontrada en L. tropica LRC-L39.

La línea salvaje de L. tropica también presenta 2 proteínas de alto tamaño molecular (236 y 261 kDa) y con un punto isoeléctrico ácido, ausentes en el patrón de proteínas de la línea MTX-R1000. Los geles SDS-PAGE bidimensionales realizados con proteínas totales de L. tropica, nos permitieron observar que tanto las proteínas de alto tamaño molecular presentes, en la línea salvaje, como la proteína de membrana que aparece en la línea resistente, se visualizan como varios puntos, posiblemente debido a diferencias en sus puntos isoeléctricos, que podrían ser consecuencia de la existencia de glicosilaciones y fosforilaciones de las proteínas.

La adquisición de resistencia en L. tropica a MTX, conlleva también otros cambios en el patrón de proteínas, tanto citosólicas como de membrana, que se observan en las figuras 13, 14, 15 y 16. Hemos observado en geles SDS-PAGE bidimensionales, que la línea salvaje y resistente difieren en algunas proteínas de similar tamaño molecular, dentro de un rango de 25-45 kDa, que muestran distinta movilidad debido a que presentan diferentes valores de punto isoeléctrico.

El aislamiento y la digestión de la proteína de membrana de 240 kDa, encontrada en la línea MTX-R1000 de L. tropica, nos permitió obtener éxito en la microsecuenciación de 3 péptidos que resultaron ser prácticamente idénticos. Esta microsecuenciación de la proteína resultó

ser insuficiente para buscar homologías con otras secuencias de glicoproteína-P. Esto puede deberse a que esta microsecuenciación corresponde a una región no muy conservada en la familia de glicoproteínas-P descritas hasta el momento, lo que indica que posiblemente pertenezca a una zona localizada fuera del dominio de unión a nucleótidos.



### 5.5.- SOBREEXPRESION DE UN GEN HOMOLOGO AL GEN ltpgpE EN L.tropica.

La sobreexpresión de genes glicoproteína-P tanto en células tumorales (Riordan y col. 1985), como en Leishmania, descritos hasta el momento, ha estado asociado a una amplificación génica (Ouellette y col. 1991; Callahan y col. 1991).

En las células de mamíferos, existen diversos genes que codifican para glicoproteína-P ( 3 en roedores y 2 en humanos) (Roninson y col. 1991); en P. falciparum se han descrito 2 genes diferentes, relacionados con el gen MDR de células de mamíferos (Wilson y col. 1989). En L. tarentolae resistente a MTX (Ouellette y col. 1991) se ha descrito una familia de multigenes con al menos 5 miembros denominados: ltpgpA localizado en un cromosoma de aproximadamente 800 kb en la región H; ltpgpB y ltpgpC, localizados en el mismo cromosoma anterior en el extremo 5' de la región H, y los genes ltpgpD y ltpgpE localizados en un cromosoma de 1.400 kb. Recientemente, se ha descrito en L. donovani resistente a Vinblastina (Henderson y col. 1991) un nuevo gen que codifica para una glicoproteína-P, y que confiere un fenotipo MDR.

En L. tropica LRC-L39 se ha observado que únicamente la sonda para el gen ltpgpE reconoce un transcrito de aproximadamente 6 kb en los parásitos resistentes, sin embargo no presentaba amplificación del gen que denominamos pgpE, homólogo al gen ltpgpE de L. tarentolae (Fig. 18).

El tamaño del ARNm reconocido por la sonda para el gen ltpgpE es similar al ARNm de 4,5 kb descritos en los genes

MDR de células de mamíferos (Chen y col., 1986), en E. hystolítica resistente a emetina (Samuelson y col., 1990), y en L. tarentolae resistente a MTX (Ouellette y col., 1990), y menores que los ARNm descritos en P. falciparum (7-8 kb) (Wilson y col., 1989), y en L. donovani resistente a vinblastina (12,5 kb) (Henderson y col., 1991).

Esta desproporcionada cantidad de ARN respecto al número de copias del gen, podría explicarse bien por un aumento en la transcripción, o bien por un incremento en la estabilidad del ARN o bien debido a modificaciones post-transcripcionales que influyen en la etapa de maduración o en la liberación del ARN al citoplasma (Darnell y col., 1986; Borst y col., 1987).

Los reordenamientos génicos pueden estar implicados en la activación de la expresión de genes (Borst y col. 1987). Así, en Trypanosoma brucei se ha descrito que tiene lugar un reordenamiento génico para expresar el antígeno de superficie (VSG), es decir existe una movilidad del gen dentro del cromosoma, hacia un sitio de expresión activo situado en el telómero del cromosoma (Pays y col. 1988).

Algo similar podría ocurrir en Leishmania, dado que hemos observado un aumento de los niveles de transcripción sin amplificación génica.

El gen pgpE, se localizó mediante electroforesis en campo pulsante, en un cromosoma de aproximadamente 1.500 kb tanto en la línea salvaje como en la MTX-R1000, aunque es ligeramente de menor tamaño el cromosoma correspondiente a la línea resistente. Esto puede deberse a cambios intracromosomales, como es la delección de la secuencia de ADN. Estos resultados están en concordancia con la alta plasticidad cromosómica descrita en Leishmania, que justifica el

polimorfismo encontrado en el tamaño de los cromosomas en que cada especie tiene un cariotipo diferente (Lightall y col. 1992). Esta plasticidad cromosómica puede que ya existiera en la población o que estuviera influenciada por la presión que ejerce el fármaco sobre los parásitos en crecimiento.

Uno de los posibles mecanismos de resistencia a MTX en Leishmania es la amplificación del gen que codifica para el enzima DHFR-TS, blanco de acción de fármaco. Sin embargo, en nuestra línea MTX-R1000 no se observó incremento en el número de copias del enzima DHFR-TS respecto a la línea salvaje (Fig.18B).

Estos resultados sugieren que posiblemente el gen responsable del fenotipo de resistencia a fármacos tales como puromicina, ketoconazol, vinblastina y arseniato sódico, observado en L. tropica MTX-R1000 sea el gen pgpE. Posteriores estudios de transfección que actualmente se están desarrollando en el laboratorio confirmarán la implicación del gen pgpE en la resistencia a fármacos en Leishmania.

## **6. CONCLUSIONES**

- 1.- Leishmania tropica LRC-L39 adaptada in vitro a 1mM de Metotrexato genera un nivel de resistencia 794 veces superior al de la línea salvaje; siendo este fenotipo de resistencia estable al menos durante 100 generaciones en ausencia de fármaco.
- 2.- Los parásitos resistentes desarrollan una disminución significativa en la captación de fármaco, acumulando sólo un 3% de fármaco con respecto al incorporado por la línea salvaje. Igualmente, en estos parásitos se observa un eflujo significativo de fármaco.
- 3.- L. tropica LRC-L39 resistente a Metotrexato presenta además una resistencia cruzada significativa a los fármacos y sustancias químicas: puromicina, vinblastina, doxorubicina y arseniato sódico, no relacionados estructural ni funcionalmente con el Metotrexato. Esta resistencia podría estar relacionada con el fenotipo de multirresistencia descrito en células tumorales resistentes a fármacos.
- 4.- Hemos observado en los parásitos resistentes, la sobreexpresión de una proteína de membrana, que es reconocida por el anticuerpo monoclonal C<sub>219</sub>, específico para la glicoproteína-P humana. Además, existen otras modificaciones en el patrón de proteínas, que posiblemente contribuyan a la adaptación al fármaco.
- 5.- L. tropica LRC-L39 resistente a Metotrexato sobreexpresa uno de los genes de la familia glicoproteína-P, homólogo al gen ltpgpE de Leishmania tarentolae, sin embargo no se observa amplificación génica. El mapa de restricción así como el patrón cromosómico sugieren que un reordenamiento génico pueda explicar el incremento en la expresión génica.

### CONCLUSION FINAL

Los estudios realizados sobre Leishmania tropica LRC-L39 resistente in vitro a Metotrexato demuestran que estos parásitos desarrollan al menos 2 mecanismos diferentes de resistencia:

- 1) La alteración de la captación de Metotrexato.
- 2) Un mecanismo de resistencia que presenta algunas características similares al fenotipo descrito en células tumorales multirresistentes.

## **7. BIBLIOGRAFIA**

Al-Shawi, M.C. y Senior, A.E. (1993) Characterization of the Adenosine Triphosphatase activity of Chinese hamster P-glicoprotein. J. Biol. Chem. 268, 4197-4206.

Aviv, H. y Leder, P. (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 1408-1412.

Azzaria, M., Schurr, E. y Gros, P. (1989) Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr-1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. Mol. Cell. Biol. 9, 5289-5297.

Banyal, H.S. e Inselburg, J. (1986) *Plasmodium falciparum*: induction, selection and characterization of pyrimethamine-resistant mutants. Exp. Parasitol. 62, 61-70.

Bauw, G., De Loose, M., Inzé, D., Van Montagu, M. y Vanderkerckhove, J. (1987) Alterations in the phenotype of plant cells studied by NH<sub>2</sub>-terminal amino acid-sequence analysis of proteins electroblotted from two-dimensional gel-separated total extracts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4806-4810.

Bauw, G., Van Damme, J., Puype, M., Vanderkerckhove, J., Gesser, B. y Ratz, G.P. (1989) Protein-electroblotting and microsequencing strategies in generating protein data bases from two-dimensional gels. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 86, 7701-7705.



Bauw, G., Holm Rasmussen H., Van Den Bulcke, M., Van Damme, J., Puype, M., Gesser, B., Celis, J.E. y Vandekerckhove, J. (1990) Two dimensional gel electrophoresis, protein electroblotting and microsequencing : A direct link between proteins and genes. *Electrophoresis* 11, 528-536.

Beck, W.T., Mueller, T.J. y Tanzer, L.R. (1979) Altered surface membrane glicoproteins in Vinca alkaloid resistant human leukemic lymphoblasts. *Cancer Res.* 39, 2070-2076.

Beck, J.T. y Ullman, B. (1989) Affinity labeling of the folate-methotrexate transporter from Leishmania donovani. *Biochemistry* 28, 6931-6937.

Beck, J.T. y Ullman, B. (1991) Biopterin conversion to reduced folates by Leishmania donovani promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 49, 21-28.

Berman, J.D. (1985) Experimental chemotherapy of leishmaniasis, a critical review. Chang, K-P, Bray, R.S. eds. *Human parasitic diseases*. Amsterdam Elsevier, 1, 111-138.

Berman, J.D. (1988) Chemoterapy for leishmaniasis. Clinical Efficacy and Future Strategies. *Rev. Infect. Dis.* 10, 560-586.

Berman, J.D., Edwards, N., King, M. y Grögl, M. (1989) Biochemistry of (Pentostam) resistant Leishmania. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 40, 159-164.

Beverley, S.M., Coderre, J.A., Santi, D.V. y Schimke, R.T. (1984) Unstable DNA amplifications in methotrexate-resistant Leishmania consist of extrachromosomal circles which relocalize during stabilization. *Cell.* 38, 431-439.

Beverley, S.M. (1991) Gene amplification in Leishmania. Annu. Rev. Microbiol. 45, 417-444.

Biedler, J.L. y Riehm, H. (1970) Cellular resistance to daunomycin D in Chinese hamster cells "in vitro"; cross-resistance, radio autographic and cytogenetic studies. Cancer Res. 30, 1174-1184.

Bollag, D.M. y Edelman, S.J. (1991) Immunoblotting. In: Protein Methods, pp. 181-211, A John Wiley & Sons, Inc., New York.

Borst, P. y Greaves, D.R. (1987) Programmed gene rearrangements alternating gene expression. Science, 235, 658-667.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.

Bradley, G., Juranka, P.F. y Ling, V. (1988) Mechanism of multidrug resistance. Biochim. Biophys. Acta. 948, 87-128.

Bruggemann, E.P., Currier, S.J., Gottesman, M.M. y Pastan, I. (1992) Characterization of the azidopine and vinblastine binding site of P-glycoprotein. J. Biol. Chem. 267, 21020-21026.

Bryceson, A.D.M., Chulay, J.D., Mugambi, M., Were, J.B., Gachichi, G., Chungu, C.N., Muigai, R., Bhatt, S.M., Ho, M., Spencer, H.C., Meme, J. y Anabwani, G. (1985). Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. II. Response to high-dosage sodium stibogluconate or prolonged treatment with pentamidine. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 79, 705-714.

Callahan, H.L. y Beverley, S.M. (1991) Heavy metal resistance: a new role for P-glicoproteins in Leishmania. J. Biol. Chem. 266, 18427-18430.

Callahan, H.L. y Beverley, S.M. (1992) A member of the Aldoketo reductase family confers methotrexate resistance in Leishmania. J. Biol. Chem. 267, 24165-24168.

Carle, G.F. y Olson, M.V. (1985) An electrophoretic karyotype for yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82, 3756-3760.

Coderre, J.A., Beverley, S.M., Schimke, R.T. y Santi, D.V. (1983) Overproduction of a bifunctional thymidilate synthase-dihydro folate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant Leishmania. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80, 2132-36.

Costa, J.M.L., Marsden, P.D., Llanos-Cuentas, E.A., Netto, E.M., Carvalho, E.M., Barral, A., Rosa A.C., Cuba, C.C., Magalhaes, A.V. y Baretto, A.C. (1986) Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: A report eight cases. J. Trop. Med. Hyg. 84, 319-323.

Cowman, A.F., Morry, M.J., Briggs, B.A., Cross, G.A.M. y Foote, S.J. (1988) Aminoacid changes linked to pyrimethamine resistance in the dihydrofolate reductase-thymidilate synthase gene of Plasmodium falciparum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9109-9113.

Cowman, A. F., Karcz, S., Galatis, D. y Culvenor, J. G. (1991) A P-glycoprotein homologue of Plasmodium falciparum is localized on the digestive vacuole. J. Cell. Biology 113, 1033-1045.

Croft, S.L., Neame, K.D. y Homewood, C.A. (1981) Citado por Callahan y col. 1991.

Chen, C-J, Chin, J.E., Ueda, K., Clark, D.P., Pastan, I., Gottesman, M.M. y Roninson, I. (1986) Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr 1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47, 381-389.

Chen, C-J., Mueller, C., Wendlinger, M. y Zolg, J.W. (1987) Kinetic and molecular properties of the dihydrofolate reductase from pyrimethamine-sensitive and pyrimethamine-resistant clones of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. *Mol. Pharmacol.* 31, 430-437.

Choi, K., Chen, C-J, Kriegler, M. y Roninson, I. (1988) An altered pattern of cross-resistance in multidrug resistance cells results from spontaneous mutations in the *mdr 1* (P-glycoprotein) gene. *Cell* 53, 519-529.

Chomczynski, P., y Sacchi, N. (1987) Single step method of RNA isolation by acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156-159.

Chu, G., Vollrath, D. y Davis, R.W. (1986) Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric field. *Science* 234, 1582-1585.

Chulay, J.D., Spencer, H.C. y Mugambi, M. (1985) Electrocardiographic changes during treatment of leishmaniasis with pentavalent antimony (sodium stibogluconate). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34, 702-709.

Darnell, J. E. (1986) Variety in the level of gene control in eukariotic cells. *Nature.* 297, 365-371.

Davidson, R.N. y Croft, S.L. (1993) Recent advances in the treatment of visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. and Hyg.* 87, 130-131.

Deffie, A.M., Alam, T., Seneviratne, C., Beenken, S.W., Batra, J.K., Shea, T.C., Henner, W.D. y Goldenberg, G.J. (1988) Multifactorial resistance to adriamycin: relationship of DNA repair, glutathione transferase activity, drug efflux, and P-glycoprotein in cloned cell lines of Adriamycin-sensitive and resistant P 388 Leukemia. *Cancer Res.* 48, 3595-3602.

Detke, S., Chaudhuri, G., Kink, J.A. y Chang, K.P. (1988) DNA amplification in tunicamycin resistant Leishmania mexicana. Multiple copies of a single 63 Kilobase supercoiled molecule and their expression. *J. Biol. Chem.* 263, 3418-3424.

Detke, S., Katakura, K. y Chang, K.P. (1989) DNA amplification in arsenite-resistant Leishmania. *Exp. Cell Res.* 180, 161-170.

Dewes, H., Ostergaard, H.L. y Simpson, L. (1986) Impaired drug uptake in methotrexate-resistant Crithidia fasciculata without changes in dihydrofolate reductase activity or gene amplification. *Mol. Biochem. Parasitol.* 19, 149-161.

Ellenberger, T.E. y Beverley, S.M. (1987a) Biochemistry and regulation of folate and methotrexate transport in Leishmania major. *J. Biol. Chem.* 262, 10053-10058.

Ellenberger, T.E. y Beverley, S.M. (1987b) Reductions in methotrexate and folate influx in methotrexate-resistant lines of Leishmania major are independent of R or H region amplification. *J. Biol. Chem.* 262, 13501-13506.

Ellenberger, T.E. y Beverley, S.M. (1989a) Multiple drug resistance and conservative amplification on the H region in Leishmania major. J. Biol.Chem. 264, 15094-15103.

Ellenberger, T.E. Wrigth, J.E., Rosowsky, A. y Beverley, S.M. (1989b) Wild type and drug resistant Leishmania major hydrolyze methotrexate to N-10-methyl-4-deoxy-4-aminopteroate without accumulation of methotrexate poly-glutamates. J. Biol. Chem. 264, 15960-15966.

Elwood, P.C. (1989) Molecular cloning and characterization of the human folate-binding protein cDNA from placenta and malignant tissue culture (KB) cells. J. Biol. Chem. 254, 14893-14901.

Endicott, J.A. y Ling, V. (1989) The biochemistry of P-glycoprotein mediated multidrug resistance. Annu. Rev. Biochem. 58, 137-171.

Feinberg, A.P. y Vogelstein B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 137, 266-267.

Ferone, R. (1970) Dihydrofolate reductase from pyrimethamine-resistant Plasmodium berghei. J. Biol. Chem. 245, 850-54.

Fojo, A. Akiyama, S.I., Gottesman, M.M. y Pastan, I. (1985) Reduced drug accumulation in multiply drug-resistant human KB carcinoma cell lines. Cancer Res. 45, 3002-3007.

Fojo, A.T., Ueda, K., Slamon, O.J., Poplack, D.G., Gottesman, M.M. y Pastan, I. (1987) Expresión of a multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 265-269.

Foote, S.J., Thompson, J.K., Cowman, A.F. y Kemp, D.J. (1989) Amplification of the multidrug resistance gene in some chloroquine-resistant isolates of *P.falciparum*. Cell. 57, 921-930.

Foote, S.J., Galatis, D. y Cowman, A.F. (1990) Aminoacids in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene of *Plasmodium falciparum* involved in cycloguanil resistance differ from those involved in pyrimethamine resistance. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3014-3017.

Franke, E.D., Wignall, F.S., Cruz, M.E., Rosales, E., Tovar, A.A., Lucas, C.M., Llanos-Cuentas, E.A. y Berman, J.D. (1990) Efficacy and toxicity of sodium stibogluconate for mucosal leishmaniasis. Ann. Intern. Med. 113, 934-940.

Garvey, E.P. y Santi, D.V. (1986) Stable amplified DNA in drug-resistant *Leishmania* exists as extrachromosomal circles. J. Biol. Chem. 233, 535-540.

Georges, E., Bradley, G., Gariepy, J. y Ling, V. (1990) Detection of a P-glycoprotein isoforms by gene specific monoclonal antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 152-156.

Gill, D.R., Hyde, S.C., Higgins, C.F., Valverde, M.A., Mintenig, G.M. y Sepúlveda, F.V. (1992) Separation of drug transport and chloride channel functions of the human multidrug resistance P-glycoprotein. Cell 71, 23-32.

Gonzalez, A., Prediger, E., Hucacas, M.E., Nogueira, N. y Lizardi, P.M. (1984) Michromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: Its use in a high-sensitivity parasite detection assay. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 3356-3360.

Gottesman, M.M. y Pastan, I. (1988) The multidrug transport, a double-edged sword. *J. Biol. Chem.* 263, 12163-12166.

Gradoni, L., Gramiccia, M., Pettoelle, H., Di Martino, L. y Nocerino, A. (1987) A new Leishmania infantum enzymatic variant, agent of an urban visceral case unresponsive to drugs. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81, 927-928.

Gregoriadis, G. (1980) In liposomes in biological systems (Gregoriadis, G. and Allison, A.C. eds.) 25-86. Wiley and sons, New York.

Grögl, M., Oduola A.M.J., Cordero, L.D.C, Kyle, D.E. (1989) Leishmania ssp: development of pentostam-resistant clones in vitro by discontinuous drug exposure. *Exp. Parasitol.* 69, 78-90.

Grögl, M., Martin, R.K., Oduola, A.M.J., Milhous, W.K. y Kyle, D.E. (1991) Characteristics of multidrug resistance in Plasmodium and Leishmania: detection of P-glycoprotein like components. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 45, 98-111.

Grögl, M., Thomason, T.N. y Franke, E.D. (1992) Drug resistance in leishmaniasis: its implications in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous diseases. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 47, 117-126.

Gros, P., Croop, J. y Housman, D.E. (1986) Mammalian multidrug resistance gene complete cDNA sequence indicates strong homology to bacterial transport proteins. *Cell* 47, 371-380.



Gros, P., Dhir, R., Croop, J. y Talbot, F. (1991) A single amino acid substitution strongly inoculates the activity and substrate specificity of mouse mdr 1 and mdr 3 drug efflux pumps. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 88, 7289-7293.

Hanson, S., Adelman, J. y Ullman, B. (1992) Unstable amplification of two extrachromosomal elements in  $\alpha$ -Difluoromethylornithine-resistant Leishmania donovani. J. Biol. Chem. 267, 2350-2359.

Henderson, D. M., Sifri, C.D., Rodgers, M., Wirth, D.F., Hendrison, N. y Ullman, B. (1992) Multidrug resistance in Leishmania donovani is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian mdr 1 gene. Mol. Cell. Biol. 12, 1013-1019.

Herwaldt, B.L. y Berman, J.D. (1992) Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of patient clinical studies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 46, 296-306.

Hightower, R.C., Wong, M.L., Ruiz-Perez, L.M. y Santi, D.V. (1987). Electron microscopy of amplified DNA forms in antifolate-resistant Leishmania. J. Biol. Chem. 262, 14618-14624.

Hightower, R.C., Ruiz-Pérez, L.M., Wong, M.L. y Santi, D.V. (1988) Extrachromosomal elements in the lower eukaryote Leishmania. J. Biol. Chem. 263, 16970-16976.

Inselburg, J., Bzik, D.J., y Honi, T. (1987). Pyrimethamine resistant Plasmodium falciparum: overproduction of dihydrofolate reductase by a gene duplication. Mol. Biochem. Parasitol. 26, 121-134.

Iovannisci, D.M. y Ullman, B. (1983) High efficiency plating method for Leishmania promastigotes in semidefined or completely-defined medium. J. Parasitol. 69, 633-636.

Jackson, P.R., Lawrie, L.M., Stiteler, J.M., Hawkins, D.W., Wohlhieter, J.A. y Rowtin, E.D. (1986) Detection and characterization of Leishmania species and strains from mammals and vectors by hibridization and restriction endonuclease digestion of kinetoplast DNA. Veter. Parasitol. 20, 195-215.

Jackson, J.E., Tally, J.D., Ellis, W.Y., Hebralitu, Y.B., Lawyer, P.G., Were, J.B., Reed, S.G., Panisko, D.M. y Limmer, B.L. (1990) Quantitative in vitro drug potency and drug suceptibility evaluation of Leishmania ssp. from patients unresponsive to pentavalent antimony therapy. Am. J. Trop. Med. Hyg. 43, 464-480.

Juliano, R.L. y Ling, V. (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in chinese hamster ovary cell mutants. Biochim. Biophys. Acta 455, 152-162.

Juranka, P.F., Zastawny R.L. y Ling V. (1989) P-glycoprotein: multidrug-resistance and a superfamily of membrane associated transport proteins. The FASEB Journal 3, 2583-2592.

Kager, P.A., Rees, P.H., Wellda, B.T., Hockmeyer, W.T. y Lyverly, W.H. (1981) Allopurinol in the treatement of visceral leishmaniasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 75, 556-559.

Kartner, N., Riordan, J.R. y Ling, V. (1983) Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. Science, 221, 1285-1288.

Kartner, N., Evernden-Posella, D., Bradley, G. y Ling, V. (1985) Detection of P-glycoprotein in multidrug-resistant cell lines by monoclonal antibodies. *Nature (London)* 316, 820-823.

Katakura, K. y Chang, K.P. (1989) H DNA amplification in Leishmania resistant to both arsenite and methotrexate. *Mol. Biochem. Parasitol.* 34, 189-192.

Katakura, K., Peng, Y., Pithawalla, R., Detke, S., y Chang, K.P. (1991) Tunicamycin-resistant variants from five species of Leishmania contain amplified DNA in extrachromosomal circles of different sizes with a transcriptionally active homologous regions. *Mol. Biochem. Parasitol.* 44, 233-244.

Kaur, K., Coons, T., Emmett, K. y Ullman, B. (1988) Methotrexate-resistant Leishmania donovani genetically deficient in the folate-methotrexate transporter. *J. Biol. Chem.* 263, 7020-7028.

Kessel, D., Botterill, V. y Wodinsky, I. (1968) Uptake and retention of daunomycin by mouse leukemic cells as factor in drug response. *Cancer Res.* 28, 938-941.

Kessel, D. (1986) Circumvention of resistance to anthracyclines by calcium antagonist and other membrane-perturbing agents. *Cancer Surv.* 5, 109-127.

Krogstad, D.J., Gluzman, I.Y., Kyle, D.E., Oduola, A.M., Martin, S.K., Milhous, W.K. y Schlesinger, P. (1987) Efflux of Chloroquine from Plasmodium falciparum: Mechanism of Chloroquine Resistance. *Science* 238, 1283-1285.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Leon, W., Fonts, D.L., Hanning, J. (1978) Sequence arrangement of the 16S and 26S rRNA genes in the pathogenic haemoflagellate Leishmania donovani. *Nucleic Acids Res.* 5, 491-503.

Lightall, G.K. y Giannini, S. H. (1992) The chromosomes of Leishmania. *Parasitology today* 8, 192-199.

Ling, V. y Thompson, L.H. (1974) Reduced permeability in CHO cells as a mechanism of resistance to colchicine. *J. Cell. Physiol.* 83, 103-116.

Ling, V., Kartner, N., Sudo, T., Siminovitch, L. y Riordan J.R. (1983) Multidrug-resistant phenotype in chinese hamster ovary cells. *Cancer treatment Reports.* 67, 869-874.

Liu, X. y Chang, K-P. (1992) 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.* 12, 4112-4122.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Mandelbaum-Shavit, F. (1976) Citado por Ellenberger y col. 1987b.

**Maniatis, T., Fritsch, E.F. y Sambrook, J. (1982)** Molecular cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

**Marsden, P.D. (1986)** Mucosal leishmaniasis ("espundia": Escomel, 1911). Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 80, 859-876.

**Martin, S.K., Odoula, A.M. y Milhous, W.K. (1987)** Reversal of chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum* by verapamil. Science 235, 899-901.

**Mc Cutchan, T.F., Welsh, J.A., Dame, J.B., Quakyi, I.A., Graves, P.M., Drake, J.C. y Allegra, C.J. (1984)** Mechanism of pyrimethamine resistance in recent isolates of Plasmodium. Antimicrob. Agents Chemother. 26, 656-59.

**Mc Grath, J.P. y Varshavsky, A. (1989)** The yeast STE6 gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. Nature (London) 340, 400-404.

**Mebrahtu, Y., Lawyer, P.G., Githure, J., Were, J.B., Muigay, R., Hendricks, L., Leeuwenburg, J., Koech, D. y Robert, S.C. (1989)** Visceral leishmaniasis unresponsive to pentostam caused by Leishmania tropica in Kenya. Am. J. Trop. Med. Hyg. 41, 289-294.

**Meek, T.D., Garvey E.P. y Santi D.V. (1985)** Purification and characterization of the bifunctional thymidilate synthetase-dihydrofolate reductase from Methotrexate-resistant Leishmania trópica. Biochemistry 24, 678-686.

**Mobley, M.L.T. y Rosen, B.P. (1982)** Energetics of plasmid mediated arsenate resistance in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6119-6122.

Ohnuma, T., Lo, R.J., Scanlon, K.J., Kamen, B.A., Ohnoshi, T., Wolman, S.R. y Holland J.F. (1985) Evolution of Methotrexate resistance of human acute lymphoblastic leukemia cells in vitro. *Cancer Res.* 45, 1815-1822.

Osuna, A., Castanys, S., Masadós, C., Adroher, F.J. Brafia, M.F. y Roldán C.M. (1983) In vitro action of three Benzo (de) Isoquinoline 1,3-Dione Derivatives against Trypanosoma cruzi. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* 25, 254-258.

Ouellette, M., Fase-Fowler, F. y Borst, P. (1990) The amplified H circle of methotrexate-resistant Leishmania tarentolae contains a novel P-glycoprotein. *EMBO J.* 9, 1027-1033.

Ouellette, M., Hetterma, E., Wüst, D., Fase-Fowler, F. y Borst, P. (1991) Direct and inverted DNA repeats associated with P-glycoprotein gene amplification in drug resistant Leishmania. *EMBO J.* 10, 1009-1016.

Papadopoulou, B., Roy, G. y Ouellette, M. (1992) A novel antifolate resistance gene on the amplified H circle of Leishmania. *EMBO J.* 11, 3601-3608.

Pastan, I. y Gottesman, M.M. (1987) Multiple drug resistance in human cancer. *New Engl. J. Med.* 316, 1388-1393.

Pays, E. y Steinert, M. (1988) Control of antigens gene expression in African Trypanosomes. *Annu. Rev. Genet.* 22, 107-126.

Peterson, R.H.F. y Biedler, J.L. (1978) Plasma membrana proteins and glycoproteins from Chinese hamster cells sensitive and resistant to actinomycin D. *J. Supramol. Struct.* 9, 289-298.

Peterson, D.S., Walliker, D.W. y Wellams, T.E. (1988) Evidence that a point mutation in dihydrofolate reductase-thymidylate synthase confers resistance to pyrimethamine in *falciparum* malaria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 9114-9118.

Peterson, D.S., Milhons, W.K. y Wellems, T.E. (1990) Molecular basis of differential resistance to cycloguanil and pyrimethamine in Plasmodium falciparum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 3018-3022.

Peterson, D.S., Di Santi, S.M., Pova, M., Calvosa, V.S., Do Rosario, V.E. y Wellems, T.E. (1991) Prevalance of the dihydrofolate reductase Asn-108 mutations as the basis for pyrimethamine-resistant *falciparum* malaria in the Brazilians amazon. Am. J. Trop. Med. Hyg. 45, 492-497.

Petrillo Peixoto, M. y Beverley, S.M. (1987) In vitro activity of sulfonamides and sulfones against Leishmania major promastigotes. Antimicrob. Agents and Chemother. 31, 1575-1578.

Pfefferkorn, E.R., Eckel, M.E. y Mc Adams, E. (1989) Toxoplasma gondii: The biochemical basis of resistance to Emimycin. Exp. Parasitol. 69, 129-164.

Richert, N., Akiyama, S., Shen, D.W., Gottesman, M.M. y Pastan, I. (1985) Multiply drug-resistant human KB carcinoma cells have decreased amounts of a 75 KDa and a 72 KDa glycoproteins. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 2330-2333.

Riordan, J.R., Deuchars, K., Kartner, N., Alon, N., Trent, J. y Ling, V. (1985) Amplification of P-glycoprotein genes in multidrug-resistant mammalian cell lines. Nature (London) 316, 817-819.

Roninson, I.B., Chin, J.E., Choi, K., Gros, P., Housman, D.E., Fojo, A., Shen, D.W., Gottesman, M.M. y Pastan, I. (1986) Isolation of human mdr DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 83, 4538-4542.

Roninson, I.B. (1991) P-glycoprotein mediated drug resistance: puzzle and perspectives. In I.B. Roninson (ed.), Molecular and cellular biology of multidrug resistance in tumors cells. Plenum. New York.

Samuelson, J., Ayala, P., Orozco, E. y Wirth, D. (1990) Emetine-resistant mutants of Entamoeba histolytica overexpress mRNAs for multidrug resistance. Mol. Biochem. Parasitol. 38, 281-290.

Samuelson, J., Burke, A. y Courval, J. (1992) Susceptibility of an emetine-resistant mutant of Entamoeba histolytica to multiple drugs and to channel blockers. Antimicrob. Agents and Chemother. 36, 2392-2397.

Sharkadi, B., Price, E.M., Bouchert, R.C., Germann, U.A. y Scarborough, G.A. (1992) Expression of the Human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. J. Biol. Chem. 267, 4854-4858.

Scotto, K.W., Biedler, J.L. y Melera, P.W. (1986) Amplification and expression of genes associated with multidrug resistance in mammalian cells. Science 232, 751-755.

Schimke, R.T. (1984) Gene amplification in cultured animal cells. Cell 37, 705-13.



**Sirotnak, F.M., Muccio D.M., Kelleher, L.E. y Goutas, L.J. (1981)** Relative frequency and kinetic properties of transport-defective phenotypes among Methotrexate-resistant L1210 clonal cell lines derived in vivo. *Cancer Res.* 41, 4447-4452.

**Sett, R., Basu, N., Ghosh, A.K. y Das, P.K. (1992)** Potential of doxorubicin as an antileishmanial agent. *J. Parasitol.* 78, 350-354.

**Silver, S., Nucifora, G., Chu, L. y Misra, T.K. (1989)** Bacterial resistance ATPases: primary pumps for exporting toxic cations and anions. *Trends. Biochem. Sci.* 14, 76-80.

**Sirawaraporn, W. y Yuthavong, Y. (1984)** Kinetic and molecular properties of dihydrofolate reductase from pyrimethamine-sensitive and pyrimethamine-resistant Plasmodium chabaudi. *Mol. Biochem. Parasitol.* 10, 355-367.

**Snewin, V.A., England, S.M., Sims, P.F.G. y Hyde, E. (1989)** Characterization of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from human malaria parasites highly resistant to pyrimethamine. *Gene* 76, 41-52.

**Southern, E.M. (1975)** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electroforesis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517.

**Stark, G.R. y Wahl, G.M. (1984)** Gene amplification. *Annu. Rev. Biochem.* 53, 447-91.

**Towbin, H., Staehelin, T. y Gordon, J. (1979)** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.

Ueda, K., Cardarelli, C., Gottesman, M.M. y Pastan, I. (1987) Expression of a full-length cDNA for the human tumors and tissues. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 3004-3008.

Ullman, B., Carrero-Valenzuela, E. y Coons, T. (1989) Leishmania donovani: Isolation and characterization of sodium stibogluconate Pentostam resistant cell lines. Exp. Parasitol. 69, 157-163.

Van der Blik, A.M., Meyers, J.L., Biedler, J.L., Hes, E. y Borst, P. (1986) A 22 Kd protein (sorcin/U 19) encoded by an amplified gene in multidrug-resistant cells, is homologous to the calcium-binding light chain of calpain. EMBO J. 5, 3201-3208.

Van der Blik, A.M., Kooiman, P.M., Schneider, C. y Borst, P. (1988) Sequence of mdr 3 encoding a human P-glycoprotein. Gene 71, 401-411.

Van der Blik, A.M. y Borst, P. (1989) Multidrug resistance. Adv. Cancer Res. 52, 165-203.

Van der Ploeg, L.H.T., Cornelissen, A.W.C.A., Bany, I.D. y Borst, P. (1984) Chromosomas of Kinetoplastida. EMBO J. 3, 3109-3115.

Viallet, J., Maclean, J.D. y Robson, H. (1986) Response to Ketoconazole in two cases of longstanding cutaneous leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 35, 491-495.

Walter, R.D. (1986) Altered dihydrofolate reductase in pyrimethamine-resistant Plasmodium falciparum. Mol. Biochem. Parasitol. 19, 61-66.

Whastien, W.L., Grumont, R. y Santi, D.V. (1985) DNA amplification in antifolate-resistant Leishmania. J. Biol. Chem. 260, 7809-7812.

White, T.C., Fase-Fowler, F., Van Luenen, H., Calafat, J. y Borst, P. (1988) The H circles of Leishmania tarentolae are a unique amplifiable system of oligomeric DNAs associated with drug resistance. J. Biol. Chem. 263, 16977-16983.

Wilson, C.M., Serrano, A.E., Wasley, A., Bogenschutz, M.P., Shankar, A.H. y Wirth D.F. (1989) Amplification of a gene related to mammalian mdr genes in drug resistant Plasmodium falciparum. Science 244, 1184-1186.

Wilson, K., Collar, F.R., Huberman, E., Stringer, J.R. y Ullman, B. (1991) Amplification and molecular cloning of the IMP dehydrogenase gene of Leishmania donovani. J. Bol. Chem: 266, 1665-1671.

Willingham, M.C., Cornwell, M.M., Cardarelli, C.O., Gottesman, M.M. y Pastan, I. (1986) Single cell analysis of daunomycin uptake and efflux in multidrug-resistant and sensitive KB cells: effects of verapamil and other drugs. Cancer Res. 46, 5941-5946.

Zolg, J.W., Plitt, J.R., Chen, G-X y Palmer, S. (1989) Point mutations in the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene as the molecular basis for pyrimethamine resistance in Plasmodium falciparum. Mol. Biochem. Parasitol. 36, 253-262.