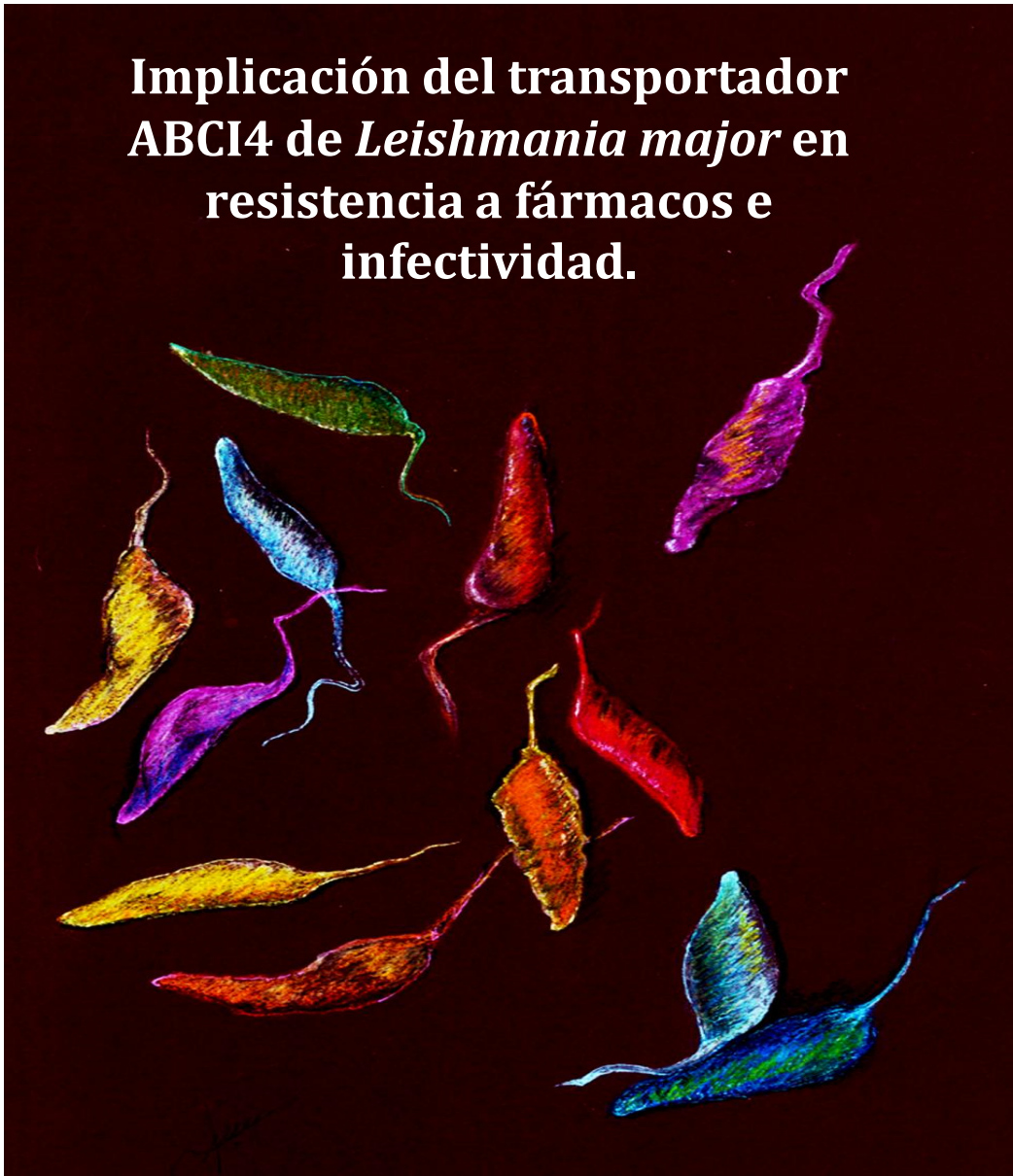


**Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”  
Universidad de Granada**

**Implicación del transportador  
ABCI4 de *Leishmania major* en  
resistencia a fármacos e  
infectividad.**



**José Ignacio Manzano González**

**Tesis Doctoral**

**Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular**

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: José Ignacio Manzano González  
D.L.: GR 1873-2014  
ISBN: 978-84-9083-057-4





Instituto de Parasitología y Biomedicina  
"López-Neyra"



Universidad de Granada

**“Implicación del transportador ABCI4 de  
*Leishmania major* en resistencia a fármacos e  
infectividad”**

Directores de Tesis:

Dr. Francisco Gamarro Conde

Dr. Santiago Castanys Cuello

Memoria presentada por el Licenciado **José Ignacio Manzano  
González** para optar al grado de Doctor por la Universidad de  
Granada en el Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología  
Molecular.





D. Francisco Gamarro Conde y D. Santiago Castanys Cuello,

Investigadores Científicos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “**Implicación del transportador ABCI4 de *Leishmania major* en resistencia a fármacos e infectividad**” ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC) de Granada por **D. José Ignacio Manzano González**, Licenciado en Biología por la Universidad de Alcalá de Henares, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada. Garantizando, que hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

**Fdo. Dr. Francisco Gamarro Conde**

Investigador Científico del CSIC

**Fdo. Dr. Santiago Castanys Cuello**

Investigador Científico del CSIC



Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y ha sido financiada por los proyectos:

- Proyecto SAF2009-07440, titulado “*Caracterización de nuevos transportadores ABC en Leishmania: su implicación en infectividad y resistencia a fármacos*”, financiado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (2010-2012).
- Proyecto SAF2012-34267, titulado “*Implicación de los transportadores ABCG y otros transportadores ABC específicos de tripanosomátidos en la infectividad y resistencia a fármacos en Leishmania*”, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (2013-2015).

Parte de los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en:

**Manzano, J. I.**, R. García-Hernández, S. Castanys, and F. Gamarro. **2013**. A new ABC half-transporter in *Leishmania major* is involved in resistance to antimony. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**:3719-30.

**Manzano, J. I.**, F. Lecerf-Schmidt, M. A. Lespinasse, A. Di Pietro, S. Castanys, A. Boumendjel, and F. Gamarro. **2013**. Identification of specific reversal agents for *Leishmania* ABCI4-mediated antimony resistance by flavonoid and trolox derivative screening. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. Oct 14 *In press*

Otras publicaciones obtenidas como resultado de las colaboraciones realizadas con otros miembros del laboratorio y con investigadores de otros centros durante mi periodo de formación predoctoral, que indudablemente han contribuido a mi formación científica, han sido:

García-Hernández, R., **J. I. Manzano**, S. Castanys, and F. Gamarro. **2012**. *Leishmania donovani* develops resistance to drug combinations. PLoS Negl Trop Dis **6**:e1974.

Caballero, E., **J. I. Manzano**, P. Puebla, S. Castanys, F. Gamarro, and A. San Feliciano. **2012**. Oxazolo[3,2-a]pyridine. A new structural scaffold for the reversal of multi-drug resistance in *Leishmania*. Bioorg Med Chem Lett **22**:6272-5.

**Manzano, J. I.**, L. Carvalho, R. Garcia-Hernandez, J. A. Poveda, J. A. Ferragut, S. Castanys, and F. Gamarro. **2011**. Uptake of the antileishmania drug tafenoquine follows a sterol-dependent diffusion process in *Leishmania*. J Antimicrob Chemother **66**:2562-5.

**Manzano, J. I.**, L. Carvalho, J. M. Pérez-Victoria, S. Castanys, and F. Gamarro. **2011**. Increased glycolytic ATP synthesis is associated with tafenoquine resistance in *Leishmania major*. Antimicrob Agents Chemother **55**:1045-52.

Carvalho, L., J. R. Luque-Ortega, **J. I. Manzano**, S. Castanys, L. Rivas, and F. Gamarro. **2010**. Tafenoquine, an antiplasmodial 8-aminoquinoline, targets *Leishmania* respiratory complex III and induces apoptosis. Antimicrob Agents Chemother **54**:5344-51.

# ÍNDICE



<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	4
Leishmaniasis: Generalidades .....	4
<i>Leishmania</i> : Agente etiológico. ....	11
<i>Leishmania</i> : Ciclo de vida .....	13
<i>Leishmania</i> : transmisión.....	15
Establecimiento de la infección .....	16
Respuesta inmune del hospedador en la infección por <i>Leishmania</i> ....	20
Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis .....	22
Diagnóstico de la leishmaniasis .....	24
Control del vector y reservorios de la leishmaniasis .....	26
Desarrollo de vacunas frente a la leishmaniasis .....	27
Tratamiento de la leishmaniasis .....	30
Biología y bioquímica del parásito.....	36
Mecanismos de resistencia a fármacos en <i>Leishmania</i> .....	53
<b>TRANSPORTADORES ABC</b> .....	61
Organización estructural de los transportadores ABC.....	62
Mecanismo de acción de los transportadores ABC.....	65
Clasificación de la familia de transportadores ABC.....	67
Transportadores ABC en <i>Leishmania</i> .....	68
Revertidores de la resistencia a fármacos mediada por transportadores ABC en <i>Leishmania</i> .....	73
<b>OBJETIVOS</b> .....	77



<b>MATERIAL</b> .....	79
Líneas celulares.....	79
Medios y reactivos empleados en el cultivo de <i>Leishmania</i> . ....	79
Medios para el cultivo de bacterias.....	81
Medio para el cultivo de células THP-1. ....	81
<b>TAMPONES Y SOLUCIONES</b> .....	82
Soluciones generales. ....	82
Soluciones y reactivos para electroforesis de proteínas.....	82
Soluciones para Western blot e inmunodetección. ....	83
<b>VECTORES PLASMÍDICOS</b> .....	83
Vectores de clonaje. ....	83
Vectores de expresión. ....	84
<b>OLIGONUCLEÓTIDOS</b> .....	85
Clonaje del gen ABCI4. ....	85
Secuenciación del gen ABCI4. ....	85
Mutagénesis del gen ABCI4 (K/M en la posición 742).....	85
Adición de tres copias del epítipo FLAG a ABCI4. ....	86
Oligonucleótidos para la obtención de parásitos mutantes nulos (KO) para ABCI4. ....	86
<b>REACTIVOS</b> .....	87
Reactivos de Biología Molecular.....	87
Compuestos y reactivos para el estudio funcional de la proteína ABCI4. .....	88
Reactivos para inmunodetección.....	89

Compuestos con potencial actividad revertidora del transportador ABCI4.....	90
<b>MÉTODOS</b> .....	91
Cultivo in vitro de <i>Leishmania</i> . ....	91
Criopreservación y congelación de los parásitos. ....	91
Cultivo de bacterias.....	91
Preparación de células competentes por choque térmico y transformación .....	92
Aislamiento de DNA genómico de parásitos. ....	92
Aislamiento del gen ABCI4.....	93
Secuenciación del DNA.....	93
Aislamiento de DNA plasmídico. ....	93
Mutagénesis dirigida. ....	94
Diseño de construcciones para sobreexpresar ABCI4, ABCI4 <sup>K/M</sup> , 3xFLAG-ABCI4 y las quimeras de GFP con ABCI4. ....	94
Obtención de una línea mutante nulo para el gen ABCI4 de <i>Leishmania</i> .....	98
Medida de la expresión del transportador ABCI4 mediante RT-PCR. ....	100
Transfección de DNA plasmídico por electroporación en <i>Leishmania</i> . ....	101
Preparación de extractos totales de <i>L. major</i> para electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE. ....	101
Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE y transferencia a membrana.....	102

Detección con anticuerpos de proteínas transferidas a membranas.	102
Biotinilación de las proteínas de la superficie de la membrana plasmática de <i>Leishmania</i> .	103
Determinación de la formación de homodímeros de ABCI4 mediante ensayos de co-inmunoprecipitación.	104
Infección de macrófagos peritoneales por líneas de <i>Leishmania</i> .	104
Infección de células THP-1 por líneas de <i>Leishmania</i> .	105
Determinación de la concentración inhibitoria 50 del crecimiento en formas promastigotas y amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i> .	106
Microscopia de fluorescencia en líneas de <i>Leishmania</i> .	107
Determinación de la acumulación y eflujo de antimonio en líneas de <i>Leishmania</i> mediante ICP-MS (Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo).	108
Acumulación y eflujo de cadmio en líneas de <i>Leishmania</i> .	109
Acumulación y eflujo de zinc-mesoporfirina en líneas de <i>Leishmania</i> .	110
Acumulación y eflujo de feoforbida A en líneas de <i>Leishmania</i> .	110
Determinación de tioles no proteicos en líneas de <i>Leishmania</i> .	111
Medida del potencial de membrana mitocondrial en líneas de <i>Leishmania</i> .	112
Medida de ATP en líneas de <i>Leishmania</i> .	113
Medida de la producción de ROS en líneas de <i>Leishmania</i> .	113
Determinación de la localización mitocondrial en parásitos permeabilizados con digitonina.	114

---

<b>RESULTADOS</b> .....	115
Secuencia y análisis predictivo de la estructura del transportador ABCI4 de <i>Leishmania</i> .....	115
<b>Resultados I: Caracterización funcional y localización del transportador ABCI4 de <i>Leishmania</i></b> .....	119
Localización del transportador ABCI4 en <i>Leishmania</i> .....	119
Homodimerización del transportador ABCI4 de <i>Leishmania</i> .....	124
La sobreexpresión de ABCI4 confiere resistencia a antimoniales, otros metales y porfirinas tóxicas en <i>Leishmania</i> .....	125
Acumulación y eflujo de Sb <sup>III</sup> , Cd <sup>II</sup> y porfirinas en líneas de <i>L. major</i> ..	129
Implicación de los tioles en la resistencia a Sb <sup>III</sup> mediada por ABCI4 en <i>Leishmania</i> .....	136
Determinación de ATP y $\Delta\Psi_m$ en líneas de <i>Leishmania</i> .....	140
Producción de ROS inducida por Sb <sup>III</sup> en líneas de <i>Leishmania</i> .....	142
Infectividad y supervivencia de líneas de <i>Leishmania</i> en macrófagos peritoneales de ratón.....	144
<b>Resultados II. Identificación de nuevos revertidores específicos de la resistencia a antimonio mediada por el transportador ABCI4 en <i>Leishmania</i></b> .....	146
Reversión de la resistencia a Sb <sup>III</sup> mediada por ABCI4 en <i>Leishmania</i> . .....	147
Inhibición de la replicación de las formas amastigotas intracelulares de <i>Leishmania</i> .....	154

Reversión de la resistencia a porfirinas tóxicas mediada por ABCI4 en <i>Leishmania</i> .....	156
Reversión de la acumulación y eflujo de Sb <sup>III</sup> y tioles en líneas de <i>Leishmania</i> .....	157
Reversión de la acumulación y eflujo de ZnMP en líneas de <i>Leishmania</i> .....	159
<b>DISCUSIÓN</b> .....	161
Situación actual de la leishmaniasis .....	161
Transportadores ABC .....	163
Localización del transportador ABCI4 .....	165
Homodimerización del transportador ABCI4 .....	166
Resistencia a antimonio y otros metales pesados .....	168
Resistencia a la porfirina tóxica zinc-protoporfirina .....	171
Potencial de membrana mitocondrial, ATP y generación de ROS ....	173
Infectividad y replicación de <i>Leishmania</i> en el interior de macrófagos peritoneales .....	175
Identificación de agentes revertidores específicos de la resistencia a antimonio mediada por ABCI4 .....	177
Perspectivas .....	179
<b>CONCLUSIONES</b> .....	181
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	183
<b>ANEXOS</b> .....	202
ANEXO 1 .....	202
ANEXO 2 .....	204

ANEXO 3 .....	206
ANEXO 4 .....	208
ANEXO 5 .....	209
ANEXO 6 .....	210
ANEXO 7 .....	212



## **ABREVIATURAS**

ABC	ATP Binding Cassette
AQP-1	Aquogliceroporina-1
BSA	Albumina de suero bovino
BSO	L-butionina-S,R-sulfoximina
CEIP	Inmunoэлектроforesis
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane regulator
CR	Receptor del complemento de macrófagos
CRP	Proteína Reactiva C
CTE	Cadena de transporte de electrones
DAT	Test de aglutinación directa
DDT	Dicloro difenil tricloroetano
DDM	Dodecilmaltosido
DMFO	Difluorometilornitina
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Método de inmunoabsorción ligado a enzimas
FBS	Suero bovino fetal
G418	Geneticina
GFP	Proteína verde fluorescente
GGCS	$\gamma$ -glutamilcisteina sintetasa
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GPIL	GPI libres
GSH	Glutación
HAART	High Active Anti-Retroviral Therapy
IC50	Concentración inhibitoria del 50% del crecimiento
IFAT	Test de Inmunofluorescencia
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
iNOS	Oxido nítrico sintasa inducible
LC	Leishmaniasis cutánea



## Abreviaturas

---

LMC	Leishmaniasis mucocutanea
LOHA	N-hidroxi-L-arginina
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniasis visceral
MCM	Técnica de microcultivo
MDR	Multidrug resistance
MIP-1 $\alpha$	Proteína inflamatoria de macrófago 1 $\alpha$
MRP	Multi-Drug resistance protein
MTT	Bromuro de 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
MVT	Multivesicular tubule
NBD	Nucleotide binding domain
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
ODC	Ornitina descarboxilasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
P-gp	Glicoproteína-P
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PPG	Proteofosfoglicano
RE	Retículo endoplasmático
RENAVE	Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica
ROI	Especies reactivas de oxígeno intermedias
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Spd	Espermidina
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
TGN	Red de vesículas <i>trans</i> -Golgi
TMD	Dominio transmembrana
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
T(SH) <sub>2</sub>	Tripanotión
UTR	Región no codificante
VIH	Virus de la inmunodeficiencia adquirida

# RESUMEN



## **RESUMEN**

La leishmaniasis es la segunda enfermedad parasitaria en importancia por detrás de la malaria, tanto desde el punto de vista de la prevalencia anual de casos como de la letalidad de alguna de sus variantes, en el caso de no ser tratada. Según los datos de la OMS, hay 350 millones de personas en el mundo en riesgo de padecer la enfermedad, dándose de forma estimada de 0,2 a 0,4 millones de casos de leishmaniasis visceral y de 0,7 a 1,2 millones de casos de leishmaniasis cutánea cada año. Ante la ausencia de una vacuna eficaz, solo queda llevar a cabo programas de control de las poblaciones del insecto vector y tratamientos quimioterapéuticos de los afectados. Actualmente existe un muy reducido arsenal de fármacos para el tratamiento de la leishmaniasis, empleándose aún como primera línea, los antimoniales pentavalentes, cada vez más criticados desde el punto de vista del fallo terapéutico por aparición de resistencias en zonas endémicas. Se trata de un hecho preocupante y cada vez más frecuente, siendo necesario el desarrollo de nuevos fármacos eficaces o el empleo de compuestos que reviertan las resistencias generadas a los fármacos ya existentes.

Los transportadores ABC representan una de la familia de proteínas más amplia presente tanto en procariontas como en eucariotas, llevando a cabo funciones muy diversas, y muchas de ellas de gran relevancia clínica. El genoma de *Leishmania* contiene 42 genes codificantes para transportadores ABC (Leprohon et al. 2006), clasificados a su vez en varias subfamilias desde la A hasta la H, excepto 4 genes con muy baja homología con el resto de los transportadores ABC incluidos en un grupo denominado como “otros”, al cual nuestro grupo ha denominado como ABCI, y que engloba a los genes *ABCI1* (LmjF12.1190), *ABCI2* (LmjF32.2060), *ABCI3* (LmjF33.3040) y *ABCI4* (LmjF33.3260), todos ellos codificantes para ABC “half-transporters”, con una disposición del NBD en el extremo carboxilo pero con el requerimiento común de formar homo-/heterodímeros para ser funcionalmente activos.

A lo largo del presente trabajo de tesis doctoral, se ha estudiado la implicación del transportador ABCI4 del parásito *Leishmania* en la resistencia a fármacos e infectividad. El porcentaje de homología tan bajo con otros transportadores ABC de *Leishmania*, y con eucariotas en general, lo convierte en un transportador interesante de estudio, ya que podría emplearse como diana terapéutica en el tratamiento de la leishmaniasis.

El transportador ABCI4 pertenece a la familia ABC (ATP-binding cassette), y presenta un grado de homología muy bajo con otros transportadores ABC de *Leishmania*, aunque mayor con transportadores mitocondriales de la familia ABCB, que poseen una disposición TMD-NBD. Se demuestra en este trabajo de tesis la implicación de ABCI4 en el eflujo de metales pesados, confiriendo así resistencia a Pentostam<sup>®</sup>, Sb<sup>III</sup>, As<sup>III</sup> y Cd<sup>II</sup>. La resistencia observada se explica gracias a la menor acumulación de estos compuestos debido a un eflujo significativamente mayor. Se ha demostrado mediante ensayos de co-inmunoprecipitación que el transportador ABCI4 forma homodímeros para realizar su función de transporte. A su vez, se empleó una combinación de estudios de localización subcelular empleando microscopía confocal y ensayos de biotinylation sirviendonos de parásitos que expresan ABCI4 fusionado a GFP- y a FLAG-, observando que el transportador tenía una localización dual en mitocondria y membrana plasmática. Además, los parásitos que sobreexpresaban ABCI4 presentaron un incremento en la replicación en el interior de macrófagos peritoneales de ratón. En este trabajo de tesis determinamos también que algunas porfirinas son sustrato del transportador ABCI4. Consecuentemente, la sobreexpresión de ABCI4 confería resistencia a algunas porfirinas tóxicas, tales como zinc-protoporfirina, debido a la menor acumulación resultante de un eflujo significativamente mayor. Además, observamos que ABCI4 tiene una significativa capacidad de exportar tioles tras la incubación con Sb<sup>III</sup>, pudiendo considerar al transportador ABCI4 como una potencial bomba tiol-X que es capaz de reconocer metales conjugados con tioles.

Por otro lado, se investigaron una serie de 15 compuestos, potenciales inhibidores de la actividad de ABCI4, derivados o analogos de flavonoides y trolox, evaluando su actividad revertidora de la resistencia a antimonio en los parásitos que sobreexpresaban ABCI4. Entre los compuestos evaluados, *N*-etiltroloxcarboxamida (compuesto **D2**), produjo la mayor actividad. Con el fin de optimizar la actividad del compuesto **D2**, sintetizamos una serie de 10 derivados (compuestos **D3** a **D12**) mediante la condensación de varias aminas con trolox. El análisis de la actividad revertidora de la resistencia a antimonio mostró que *N*-propiltroloxcarboxamida (compuesto **D4**) era el inhibidor más potente de ABCI4. La actividad revertidora se mantuvo en amastigotes intracelulares obtenidos tras la infección de células THP-1. Además, los derivados de trolox revertían significativamente la resistencia a la porfirina toxica zinc-protoporfirina. El mecanismo de acción de estos derivados activos se demostró ligada a la reversión significativa de la acumulación de Sb<sup>III</sup> y zinc-protoporfirina, debido al descenso en el eflujo del fármaco. Dado que el transportador ABCI4 puede ser considerado como una bomba tiol-X, determinamos la capacidad de los derivados de trolox de revertir el eflujo de tioles no proteicos en las líneas de *L. major* en presencia de Sb<sup>III</sup>. La relación estructura-actividad estudiada en la presente tesis remarca la importancia del tamaño y longitud del sustituyente alquilo de trolox.

En resumen, hemos demostrado que ABCI4, un nuevo transportador ABC de *Leishmania*, se encuentra implicado en la resistencia a antimonio, otros metales y porfirinas mediante un incrementode su eflujo al exterior celular y que los compuestos derivados de trolox D2 y D4 podrían ser considerados como agentes revertidores específicos de la actividad de ABCI4.



# INTRODUCCIÓN





## **INTRODUCCIÓN**

### **Leishmaniasis: Generalidades**

La leishmaniasis engloba un amplio espectro de enfermedades causadas por parásitos protozoarios del género *Leishmania*, con una amplia diversidad clínica y epidemiológica.

Según la última actualización de los datos de la Organización Mundial de la Salud (Alvar et al. 2012), la leishmaniasis es una enfermedad distribuida a lo largo de 98 países, repartidos entre el Nuevo Mundo (continente americano) y el Viejo Mundo (Europa, Asia y África), encontrándose la mayoría de estos en vías de desarrollo. En la actualidad hay más de 350 millones de personas que viven en zonas en riesgo de contraer la enfermedad. Los datos oficiales de recuento muestran un total de más de 58.000 casos de leishmaniasis visceral (LV) y 220.000 casos de leishmaniasis cutánea (LC) al año. Sin embargo, solo las dos terceras partes de los países registran datos de incidencia de la enfermedad, de tal manera que se estima que se dan al año aproximadamente entre 0,2 y 0,4 millones de casos de LV y entre 0,7 y 1,2 millones de casos de LC. Actualmente, se estima que existe una incidencia total de aproximadamente 12 millones de casos de leishmaniasis en todo el mundo.

Más del 90% de los casos de LV se dan en 6 países (Bangladesh, Brasil, India, Sudan del Norte, Sudan del Sur y Etiopia), de los cuales el 10% acaban en la defunción del individuo, en la mayoría de los casos por fallo en el diagnóstico o en el tratamiento de los pacientes. La LC está distribuida de manera más amplia, sin embargo una tercera parte de los casos se dan en una de estas tres regiones: América, región Mediterránea y desde el Este del Oriente Medio hasta el centro de Asia. Los diez países con mayor incidencia de LC y que acumulan el 70-75%

## Introducción

---

de los casos registrados en el mundo son: Afganistán, Argelia, Colombia, Brasil, Irán, Siria, Etiopía, Norte de Sudán, Costa Rica y Perú (Fig. I-1).

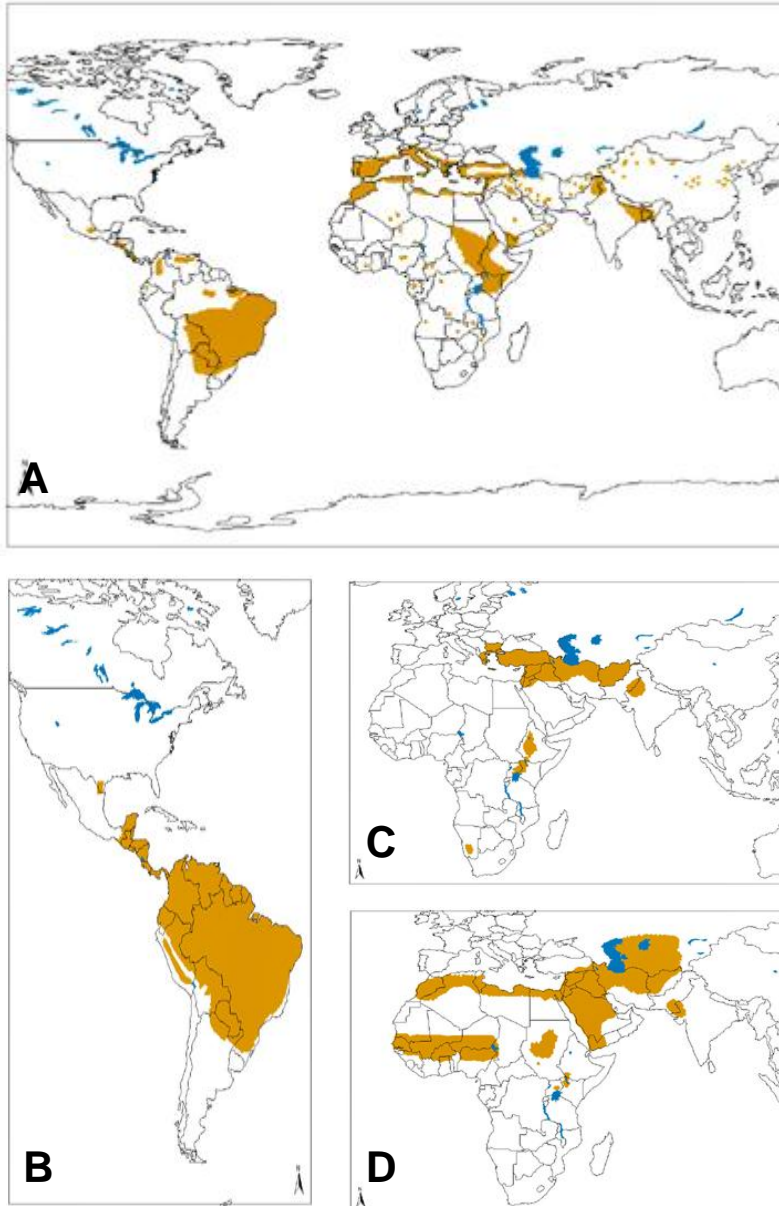


Figura I-1. Distribución mundial de leishmaniasis. (A) Leishmaniasis visceral, (B) Leishmaniasis cutánea y mucocutánea en el Nuevo Mundo, (C) Leishmaniasis cutánea causada por *Leishmania tropica* y *Leishmania aethiopica* en el Viejo Mundo y (D) Leishmaniasis cutánea causada por *Leishmania major* en el Viejo Mundo. Las zonas en marrón representan las zonas endémicas para leishmaniasis. ([www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis\\_maps/en/index.html](http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html)).

La leishmaniasis es una enfermedad ligada principalmente a la pobreza, dándose en países en vías de desarrollo donde los medios económicos para

combatir la enfermedad tanto a nivel de diagnóstico como de tratamiento son muy escasos (<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>).

Desde 1993, las regiones endémicas a *Leishmania* se han expandido considerablemente debido a factores derivados del desarrollo económico de los países afectados y a cambios medioambientales, entre otros: nuevos asentamientos, urbanización negligente, deforestación, industria minera y maderera, construcción de presas, expansión de áreas de cultivo y guerras.

Es importante destacar la asociación existente entre los casos de VIH y la coinfección con *Leishmania*. En estos individuos, cuyo sistema inmune se encuentra disminuido, la probabilidad de desarrollar LV aumenta entre 100 y 200 veces siendo además muy difícil aplicar un tratamiento efectivo, dándose a lo largo del tiempo recaídas que en muchos casos terminan siendo fatales (Alvar et al. 2008). En el Sur de Europa, el 25-70% de los casos de VL en adultos están relacionados con VIH (WHO, 1997). El tratamiento con HAART (High Active Anti-Retroviral Therapy) ha reducido a la mitad la incidencia de coinfección de *Leishmania* con VIH (Alvar, 2008). Sin embargo, los beneficios de esta terapia solo están disponibles para el 5% de los pacientes infectados con VIH en el mundo.

A su vez, se pueden dar coinfecciones de *Leishmania* junto con *Mycobacterium tuberculosis* (Delobel et al. 2003), *Trypanosoma cruzi* (Bastrenta et al. 2003), *Salmonella* y *Schistosoma* (Djidingar et al. 1997).

Por otra parte, la leishmaniasis canina es muy importante en veterinaria por tratarse de una zoonosis grave pudiendo llegar a ser mortal para el animal. De esta manera, el perro se considera el principal reservorio de estos parásitos para el humano, por lo cual, una alta prevalencia de infección canina se asocia a un alto riesgo de la enfermedad en humanos. La leishmaniasis canina tiene una amplia prevalencia y distribución en Europa, Asia, África y América (Alvar et al. 2004). En el suroeste europeo se estima que hay unos 2,5 millones de perros infectados (Baneth et al. 2008). Los gatos domésticos también podrían ser

## Introducción

---

hospedadores reservorios secundarios en el sur de Europa, y las infecciones pueden estar asociadas con retrovirus felinos (Ready, 2010).

La prevalencia de leishmaniasis canina en España es muy elevada, concretamente en Andalucía el porcentaje de perros seropositivos oscila entre el 5 y el 34%, en Cataluña entre el 9 y el 18%, mientras que en la Comunidad de Madrid entre el 8 y el 11% (Fig. I-2) ([www.virbac.es](http://www.virbac.es)).

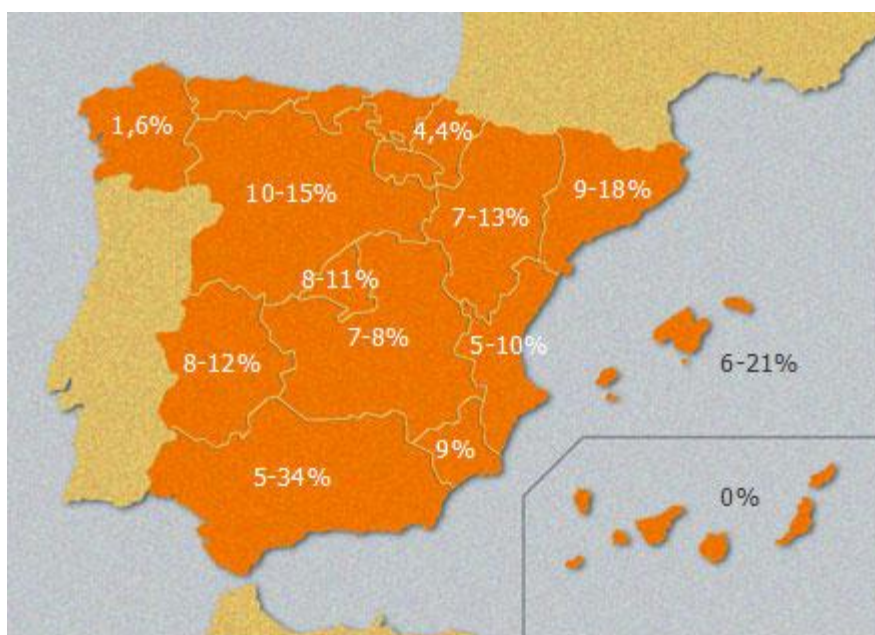


Figura I-2. Prevalencia de la leishmaniasis canina en España por Comunidades Autónomas en el año 2011 ([www.virbac.es](http://www.virbac.es)).

## Situación actual de la leishmaniasis en España y en el resto de Europa

En España la leishmaniasis es una zoonosis endémica presente en la mayor parte del territorio peninsular e Islas Baleares. El parásito que se detecta es *L. infantum* y el principal reservorio es el perro. Los vectores competentes para transmitir el parásito son los flebotomos, de dos especies diferentes (*Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi*) (Suárez Rodríguez et al. 2012).

España forma parte de uno de los grandes focos donde se concentra gran parte de la carga de la enfermedad, la cuenca Mediterránea. En estos focos se han observado grandes fluctuaciones en la incidencia de la enfermedad atribuibles a cambios medioambientales, desplazamientos de población o aspectos climáticos (Suárez Rodríguez et al. 2012).

En nuestro país la enfermedad sigue tres patrones de presentación: endémico, en el que los casos de enfermedad se presentan de forma esporádica y el perro actúa como principal reservorio; los casos asociados a la coinfección con el VIH o a situaciones de inmunodepresión y los brotes epidémicos. El grupo de edad de menos de cinco años presenta la mayor incidencia junto con la población inmunodeprimida (Suárez Rodríguez et al. 2012).

Desde 1996 a 2011 la RENAVE (Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica) detectó 1.755 casos, con una incidencia media anual de 0,45 casos/100.000 hab. Las mayores cifras de incidencia se registraron en Baleares, Valencia, Madrid, Andalucía y Cataluña (Fig. I-3). Sin embargo, no todas las comunidades autónomas notifican los datos acerca de la enfermedad, ya que no todas las comunidades la consideran endémica. Desde 2009 está teniendo lugar un brote en el suroeste de la Comunidad de Madrid, destacando el elevado número de casos, cerca de 400 y la detección de un nuevo reservorio, la liebre (Jiménez et al. 2013; Molina et al. 2012). Dicho brote permanece activo actualmente, con formas viscerales y cutáneas, afectando a todos los grupos de edad. Este brote ha incrementado significativamente la frecuencia de la leishmaniasis en los años 2010-2011, aumentando la tasa de incidencia a 21,54/100.000 hab. El 36,6 % de los casos asociados a este brote presentaron LV y el 63,4 % restante LC (Suárez Rodríguez et al. 2012).

La vulnerabilidad de la población se ha visto afectada por cambios demográficos, como son el nuevo modelo de desarrollo urbanístico que ha tenido lugar en España con la construcción de un gran número de viviendas unifamiliares en los alrededores de las grandes ciudades, dándose las

## Introducción

---

condiciones propicias para la transmisión de la enfermedad. En otro sentido, el cambio climático, en la medida en que predice un aumento en la temperatura global, puede favorecer la presencia de vectores en todo el territorio peninsular (Suárez Rodríguez et al. 2012).

En España, tras el éxito logrado en el control de enfermedades con una incidencia importante en algunas zonas del país, como el paludismo, no se han implementado estas estrategias en el marco de un programa de control integrado dirigido a otras enfermedades vectoriales como la leishmaniasis (Suárez Rodríguez et al. 2012).



**Figura I-3. Incidencia de hospitalizaciones relacionadas con leishmaniasis en España (1997-2008) (Gil-Prieto et al. 2011)**

Los riesgos de emergencia o re-emergencia de la leishmaniasis en Europa se encuentran asociados a tres escenarios principales:

1. La introducción de cepas de *Leishmania* en Europa procedentes del Nuevo Mundo debido al aumento de viajeros a/desde estas zonas, además de perros domésticos.
2. La distribución natural de LV y LC causada por *L. infantum* y *L. tropica* desde las regiones mediterráneas, donde estas especies son endémicas, a áreas vecinas donde existen vectores no portadores de la enfermedad.

3. La re-emergencia de la enfermedad en la región Mediterránea causada por un incremento en el número de personas inmunodeprimidas.

Únicamente existen dos ciclos de transmisión de leishmaniasis en la Unión Europea, y ambos se encuentran ampliamente extendidos en las proximidades del Medio Este y Norte de África: la LV y LC causada por *L. infantum* a lo largo de la región Mediterránea, y la LC antroponótica causada por *L. tropica*, que ocurre esporádicamente en Grecia y países vecinos y que genera un riesgo importante de distribución por toda la Unión Europea debido al movimiento de emigrantes y viajeros (Fig. I-4). En segundo lugar, la leishmaniasis ha comenzado a ser más aparente en latitudes más al norte, donde los insectos vectores están ausentes o presentes en muy baja densidad. La mayoría de las infecciones implican a la leishmaniasis canina, y este hecho se explica debido a la importación de perros, o que viajan, desde las zonas endémicas, seguidos de transmisión vertical (perra/cachorros). La transmisión vertical en humanos es muy poco frecuente (Ready, 2010).

Existen regiones de la Unión Europea donde se encuentra el vector aunque sin enfermedad. Este es un factor de riesgo de emergencia de la enfermedad que habría que tener en cuenta (Ready, 2010).

La globalización ha incrementado exponencialmente los casos de leishmaniasis que requieren tratamiento en países como Francia, Alemania, Italia y Reino Unido. La importación intercontinental no es un factor significativo por varios motivos: la fisonomía del vector no es lo suficiente robusta para ser dispersado por el viento, además las especies de *Leishmania* transmitidas en el Nuevo Mundo son transmitidas muy poco por los insectos del Viejo Mundo. El cambio climático y los cambios medioambientales podrían modificar el mapa de distribución de los insectos vectores y con ellos aumentar el riesgo de emergencia de leishmaniasis en toda Europa (Ready, 2010).



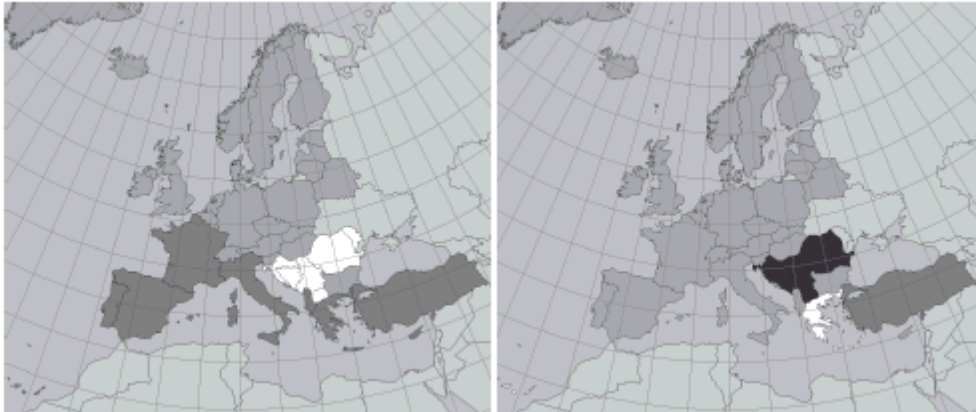


Figura I-4. Distribución de las diferentes especies de *Leishmania* en el continente europeo. Panel izquierdo: *L. infantum*; Panel derecho: *L. tropica*. Gris: Ausencia; Gris oscuro: Presencia; Blanco: Presencia esporádica; Negro: infecciones no tipificadas. (Ready, 2010).

### **Leishmania: Agente etiológico.**

*Leishmania* es un protozoo parásito intracelular monoflagelado. Fue descubierto simultáneamente por Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg y Vianna. Pertenece a la familia *Trypanosomatidae*, orden *Kinetoplastida*, clase *Zoomastigophorea*, filum *Sarcomastogophora*.

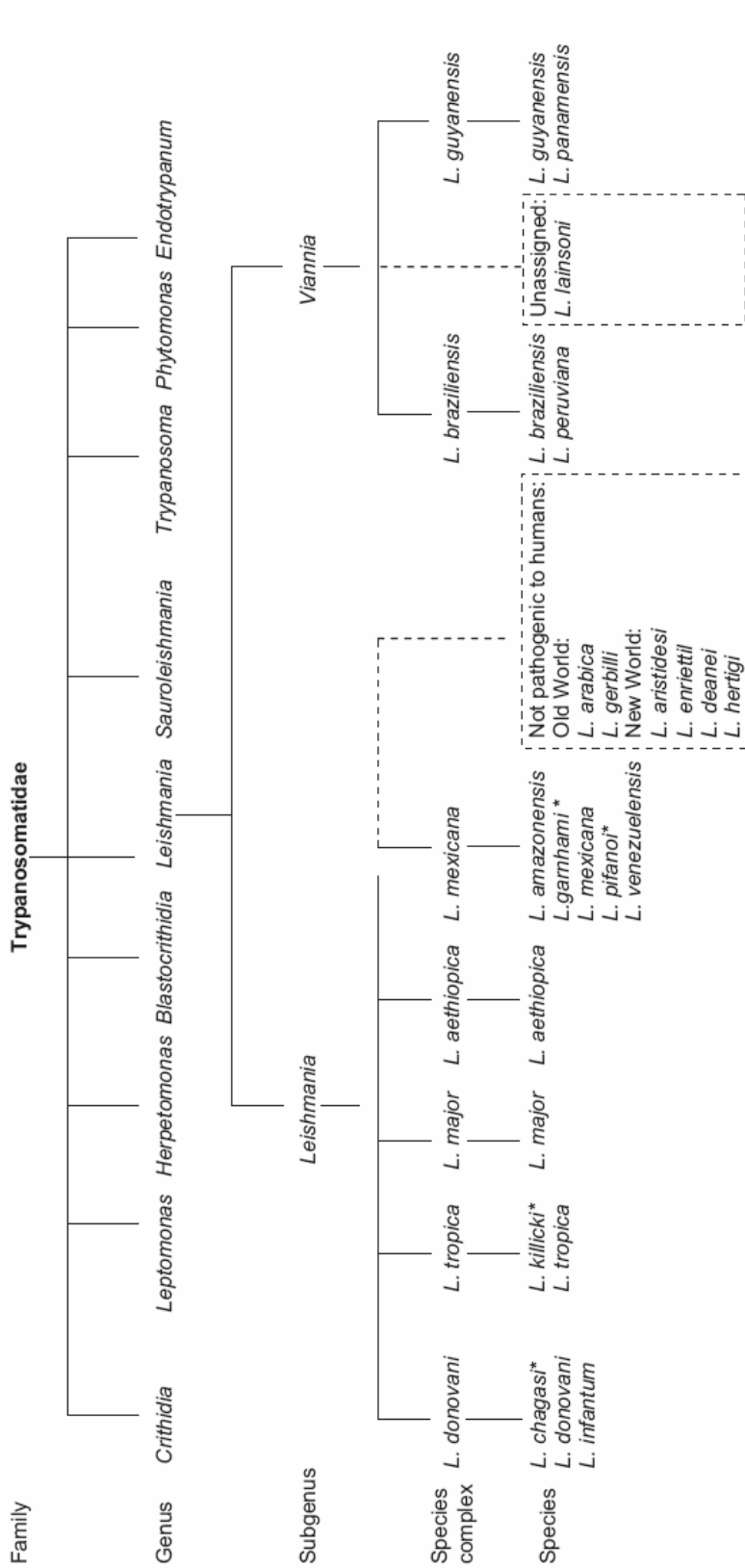


Figura I-5. Taxonomía de *Leishmania* (Bañuls et al. 2007).

## Introducción

---

Su clasificación taxonómica aceptada actualmente en base a la unificación de hallazgos clínicos, serológicos, inmunopatológicos, epidemiológicos y geográficos, incluye el complejo *L. mexicana* que comprende tres especies (*L. mexicana*, *L. enriettii* y *L. amazonensis*), un complejo *Leishmania donovani* con tres especies (*Leishmania donovani*, *L. infantum*, *Leishmania chagasi*), las especies *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, y un grupo del subgénero *Viannia* con otras cuatro especies (*Leishmania (V) braziliensis*, *Leishmania (V) guayanensis*, *Leishmania (V) panamensis* y *Leishmania (V) peruviana*) (Fig. I-5). Las diferentes especies son muy similares morfológicamente, aunque se diferencian por su composición en isoenzimas, antígenos, patología y sensibilidad a fármacos (Mimori et al. 1989; Walton, 1989).

### **Leishmania: Ciclo de vida**

*Leishmania* tiene un **ciclo de vida digenético**, incluyendo dos formas claramente diferenciadas: una forma **promastigote** flagelada, extracelular y proliferativa que reside en el tracto digestivo del hospedador invertebrado en un ambiente hidrolítico, con pH neutro y una media de temperatura de 26° C, y una forma **amastigote** no flagelada intracelular que se replica en el interior de los macrófagos del hospedador vertebrado donde hay un ambiente hidrolítico, con pH ácido (pH 4,5-5,5) y una temperatura 10° C superior a la que se encontraba en el insecto vector (Fig. I-6) (Chang et al. 1985; Chang y Dwyer 1976).

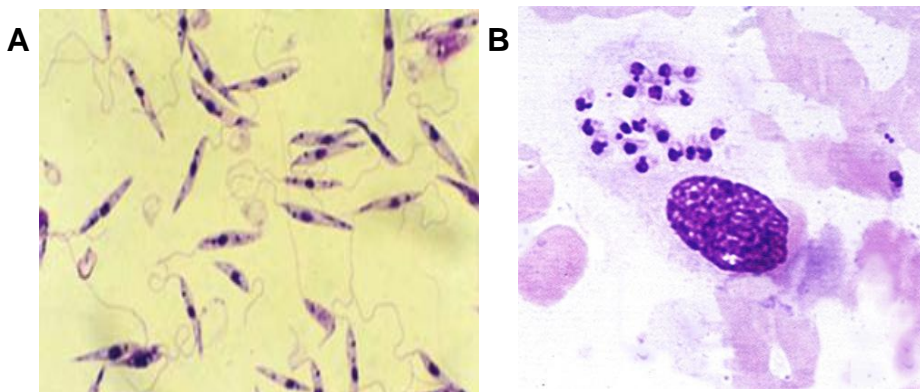


Figura I-6. (A) Formas promastigotas y (B) formas amastigotas intracelulares de *Leishmania*.

La forma promastigota procíclica no infectiva y que reside en el tracto digestivo del insecto vector experimenta un proceso denominado **metaciclologénesis** en el que pierde su capacidad proliferativa adquiriendo capacidad infectiva. Los promastigotes metacíclicos migran desde su localización intestinal hacia la probóscide del insecto. Tras la inoculación al hospedador vertebrado, durante la alimentación del insecto vector hembra, los promastigotes son fagocitados por células dendríticas y macrófagos donde se diferencian a formas amastigotas en el interior de los fagolisosomas o vacuolas parasitóforas. Las formas amastigotas se multiplican por fisión binaria en el interior de los macrófagos hasta dar lugar a la rotura celular, diseminando los parásitos al torrente sanguíneo, a través del cual invaden otros tejidos donde serán fagocitados nuevamente por macrófagos. El ciclo se completa cuando el hospedador invertebrado se alimenta de sangre de un hospedador infectado. De esta manera, los amastigotes se convierten en promastigotes que podrán ser inoculados a un nuevo hospedador (Fig. I-7) (Muskus et al., 2002).

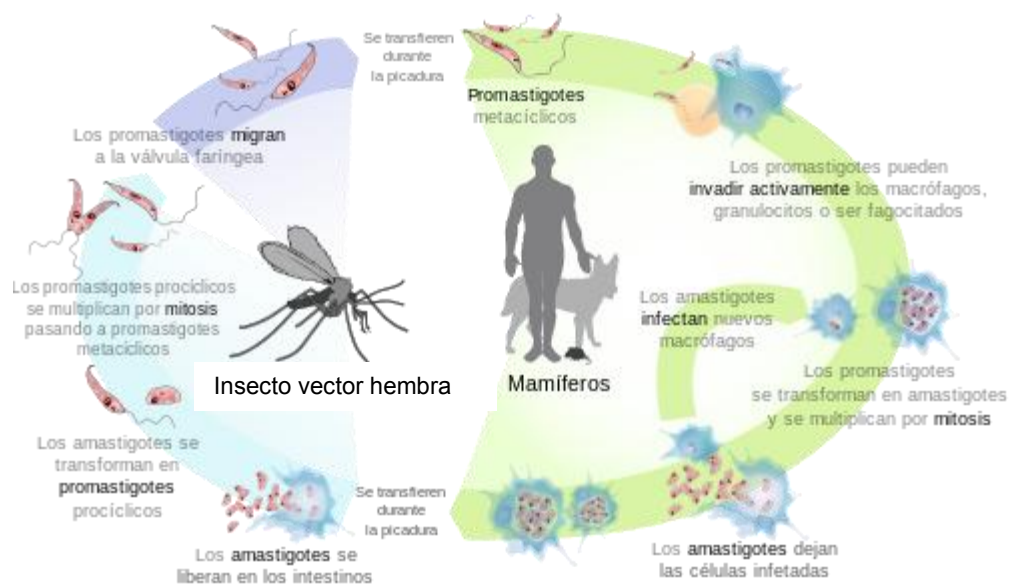


Figura I-7. Ciclo de vida de *Leishmania* con el ser humano como hospedador mamífero. (<http://es.wikipedia.org/wiki/Leishmaniasis>)

### **Leishmania: transmisión**

Los insectos vectores implicados en la transmisión de la leishmaniasis pertenecen a la familia *Psychodidae*; al menos 70 especies conocidas son capaces de transmitir la enfermedad. Representantes del género *Phlebotomus* transmiten la enfermedad en el Viejo Mundo mientras que en el Nuevo Mundo son transmitidos por representantes del género *Lutzomya*. Estos insectos denominados comúnmente “moscas de la arena” se caracterizan por tener el tórax arqueado, alas lanceoladas, pilosidad a lo largo del cuerpo, patas largas y un abdomen tubular largo y delicado; miden entre 1,5 y 3 mm y son de color amarillento con ocelos oscuros (Fig. I-8) (Feliciangeli and Rabinovich 1998). El hábitat de distribución comprende desde bosques lluviosos a regiones extremadamente secas, y se encuentran distribuidos desde el nivel del mar hasta 1.500 metros por encima de dicho nivel. Viven en ambientes oscuros, a temperaturas alrededor de los 18° C y tienen actividad crepuscular (Davies et al. 2000). Las **hembras** son hematófagas y necesitan sangre para la maduración de los huevos.

Existen otras formas de transmisión menos frecuentes como son la transmisión congénita, transmisión parenteral vía transfusión de sangre o por jeringuillas compartidas entre toxicómanos, o la más infrecuente que sería mediante un accidente en laboratorio de investigación. (Magill, 1995; Herwaldt, 2001).



Figura I-8. Insecto vector hembra perteneciente al genero *Phlebotomus*.

Normalmente, la enfermedad es transmitida al hombre a través de animales (zoonosis), siendo el perro el reservorio principal, estando presente en la cuenca mediterránea, China, Medio Oriente y Sudamérica. Existen otros reservorios menos frecuentes como son otros animales de la familia del perro como lobo y zorro, además de pequeños roedores como ratas o puerco-espín. Sin embargo, también se puede dar la transmisión entre los propios humanos (antroponosis), en zonas de gran incidencia y endemismo, como en el subcontinente Indio y este de África (India).

La leishmaniasis canina es muy importante en veterinaria por tratarse de una zoonosis grave que puede llegar a ser mortal para el perro. Como se ha descrito anteriormente (Generalidades), el perro se considera el principal reservorio de estos parásitos para el humano, por lo cual, una alta prevalencia de infección canina se asocia a un alto riesgo de la enfermedad en humanos (Alvar et al. 2004).

### **Establecimiento de la infección**

El éxito en el establecimiento de la infección de los parásitos de *Leishmania* depende principalmente de la supervivencia de éstos a la actividad antimicrobiana generada por los macrófagos y a la capacidad de evadir los mecanismos de activación de una respuesta inmune efectiva, para lo cual *Leishmania* ha desarrollado numerosas estrategias para manipular varias funciones de los macrófagos, incluyendo la presentación de antígenos, la generación de óxido nítrico y radicales de oxígeno además de la producción de citoquinas. Estas acciones son resultado de las interacciones entre las moléculas de la superficie de *Leishmania*, particularmente lipofosfoglicano (LPG) y la glicoproteína de superficie gp63.

Dichas moléculas de superficie protegen de la acción de las enzimas hidrolíticas en el tracto digestivo del insecto vector. A su vez, los promastigotes

## Introducción

---

procíclicos permanecen adheridos al epitelio intestinal mediante la unión del **LPG** con lectinas (una galectina repetida en tándem) del intestino evitando su expulsión (Kamhawi et al. 2004). Durante el proceso de metaciclogénesis, las moléculas de LPG sufren una serie de modificaciones entre las que se encuentran una elongación en su estructura y cambios de composición, reduciendo su afinidad por las lectinas. El promastigote metacíclico, de esta manera, se separa del epitelio intestinal migrando hacia la faringe, a partir de donde será eyectado tras la picadura del insecto vector (Cunningham et al. 2002).

Los **neutrófilos** son las primeras células en ser movilizadas durante la primera hora tras la infección (Belkaid et al. 1998) en el lugar donde el insecto vector ha inoculado los parásitos de *Leishmania*, debido a moléculas no bien caracterizadas presentes en la saliva del insecto vector. La mayoría de los parásitos ingeridos por los neutrófilos son destruidos con facilidad (Nathan, 2006). Sin embargo, algunos pueden sobrevivir de forma transitoria dentro de los neutrófilos: (1) evitando la generación de especies reactivas de oxígeno, (2) evadiéndose de los compartimentos líticos del neutrófilo, (3) aumentando la vida media del neutrófilo, e (4) interfiriendo en la vía de señalización mediada por interferón- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ). La presencia de parásitos apoptóticos en el inóculo evita la activación de los mecanismos antimicrobianos, induciendo por un lado la liberación de citoquinas antiinflamatorias como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) y la interleuquina 10 (IL-10), y por otro lado la disminución en la expresión de la citoquina proinflamatoria: factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), apoyando de esta manera la supervivencia de la población infectiva (van Zandbergen et al. 2006). Existe una vía denominada silenciosa o “Caballo de Troya” consistente en que los neutrófilos apoptóticos con parásitos viables, son fagocitados por macrófagos. De esta manera, los parásitos son transferidos al macrófago donde podrán replicarse libremente (Laskay et al. 2008); sin embargo, aún se desconoce cómo es la transferencia de parásitos entre neutrófilos y macrófagos (Charmoy et al. 2010) (Fig. I-10). Una forma que tiene el parásito de persistir en el hospedador vertebrado por un periodo de tiempo largo es infectar células denominadas blancos seguros (que tienen una

reducida actividad antimicrobiana) como son los fibroblastos y hepatocitos (Bogdan, 2008).

Una vez dentro del hospedador mamífero, los promastigotes de *Leishmania* deben evadir en primer lugar la **lisis mediada por el complemento**. Los promastigotes procíclicos se ha demostrado que no son capaces de resistir la acción del complemento mientras que las formas metacíclicas especializadas en la transmisión al hospedador pueden evitar esta lisis mediada por complemento (Puentes et al. 1989). Esta diferencia en la resistencia al complemento se ha demostrado que depende de las moléculas de LPG en la superficie del parásito. LPG es más largo en la superficie de los promastigotes metacíclicos y parece prevenir la asociación de las subunidades C5b-C9 del complejo del complemento, los cuales son efectores de la lisis celular.

La opsonización *in vivo* de los promastigotes metacíclicos de *Leishmania* que se produce mediante C3b y C3bi permite la interacción con los receptores del complemento del macrófago (CR) 1 y 3, respectivamente. Debido a la rápida conversión de C3b a C3bi mediada por **gp63**, una metaloproteasa, la interacción con CR3 es de mayor importancia que la realizada con CR1 que parece ser transitoria (Kane and Mosser, 2000). La vía de interacción con CR3 es más ventajosa para el parásito a la hora de evitar la acción oxidativa del macrófago durante la fagocitosis (Fig. I-9) (Mosser and Edelson, 1987).

Los promastigotes también pueden unirse al macrófago mediante el receptor de manosa-fucosa que se une a los residuos de manosa del LPG (Blackwell et al. 1985). Las moléculas de LPG también pueden interaccionar con CRP (proteína Reactiva C, un producto inflamatorio temprano) y así producirse la fagocitosis mediada por el receptor de CRP, sin dar lugar a la activación del macrófago (Culley et al. 1996). De otra manera, gp63 y LPG pueden interaccionar con el receptor de fibronectina y con CR4, respectivamente (Talamas-Rohana et al 1990; Brittingham et al. 1999).



## Introducción

---

Tras la interacción con el macrófago, los promastigotes de *Leishmania* son internalizados en el fagolisosoma, siendo vulnerables a la actividad hidrolítica. Por el contrario, la forma amastigote del parásito no es vulnerable al ambiente ácido encontrado en el fagolisosoma. De esta manera, para que el proceso de maduración y conversión de las formas promastigotas en amastigotas pueda llevarse a cabo correctamente, se produce una repulsión de las membranas del fagosoma y el endosoma (Miao et al. 1995), proceso en el que está implicado LPG, retardando la fusión del fagosoma y del endosoma. Dos moléculas, denominadas peroxirredoxinas LcPxn1 y 2, y una superóxido dismutasa se ha descrito que depletan los derivados de nitrato y las especies reactivas de oxígeno intermedias (ROI), consideradas como las moléculas microbicidas más importantes (Barr and Gedamu, 2003). Por otra parte, LPG puede mejorar la supervivencia celular neutralizando los ROI vacuolares (Chan et al. 1989) y proteger contra la acción de enzimas lisosomales por su fuerte carga negativa y sus unidades repetidas de galactosa y manosa (Eilam et al. 1985). La actividad proteolítica de gp63 es óptima al pH ácido al que se encuentra el fagolisosoma, actuando también contra enzimas lisosomales (Seay et al. 1996).

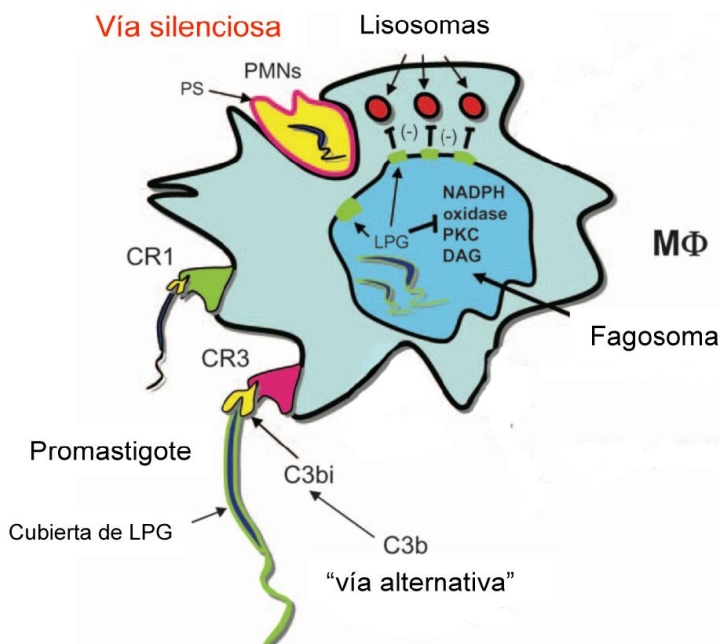


Figura I-9. Representación esquemática de la entrada de *Leishmania* en el interior del macrófago. Abreviaturas: M $\phi$ , macrófago, PMNs, leucocitos polimorfonucleares; PS, fosfatidilserina; LPG, lipofosfoglicano; PKC, proteína quinasa C; DAG, diacilglicerol (Peters and Sacks, 2006).

El parásito usa la maquinaria de la célula huésped para poder sobrevivir y replicarse. Una forma de supervivencia es la distorsión de las vías de señalización del macrófago para reprimir o estimular la expresión de varias citoquinas, moléculas microbidas y la presentación de antígenos (Bhardwaj et al. 2010). Los amastigotes obtienen del fagolisosoma del macrófago la mayoría de los nutrientes y fuentes de carbono que requieren para su metabolismo, en cambio el fagolisosoma de los neutrófilos se cree que contiene bajos niveles de aminoácidos esenciales, pudiendo ser esta la causa que imposibilitaría que el parásito pueda diferenciarse y crecer en ellos (Naderer and McConville, 2008).

### **Respuesta inmune del hospedador en la infección por *Leishmania***

Durante la inoculación de los parásitos de *Leishmania* en el hospedador vertebrado, algunos de los componentes de la saliva (como apirasa, maxadilán y prostaglandina E2) del insecto vector, impide la coagulación y favorece la vasodilatación, disminuyendo la sensibilización e inflamación (de Almeida et al. 2003).

Los granulocitos polimorfonucleares (neutrófilos) son el primer tipo celular que se moviliza al lugar de inoculación de los parásitos, secretando quimioquinas para atraer la mayor cantidad de este tipo celular. Los parásitos son internalizados y fagocitados posteriormente por macrófagos (Peters et al. 2008). La consecuencia de la actividad de neutrófilos y macrófagos es el reclutamiento de las células dendríticas mediado por la producción de mediadores celulares, IgG y citoquinas/quimioquinas, siendo un importante punto de unión entre la respuesta inmune innata y la adaptativa (Reiner and Locksley, 1995).

La principal función de las células dendríticas es el reconocimiento y procesamiento de antígenos y su presentación a las células T (Banchereau and

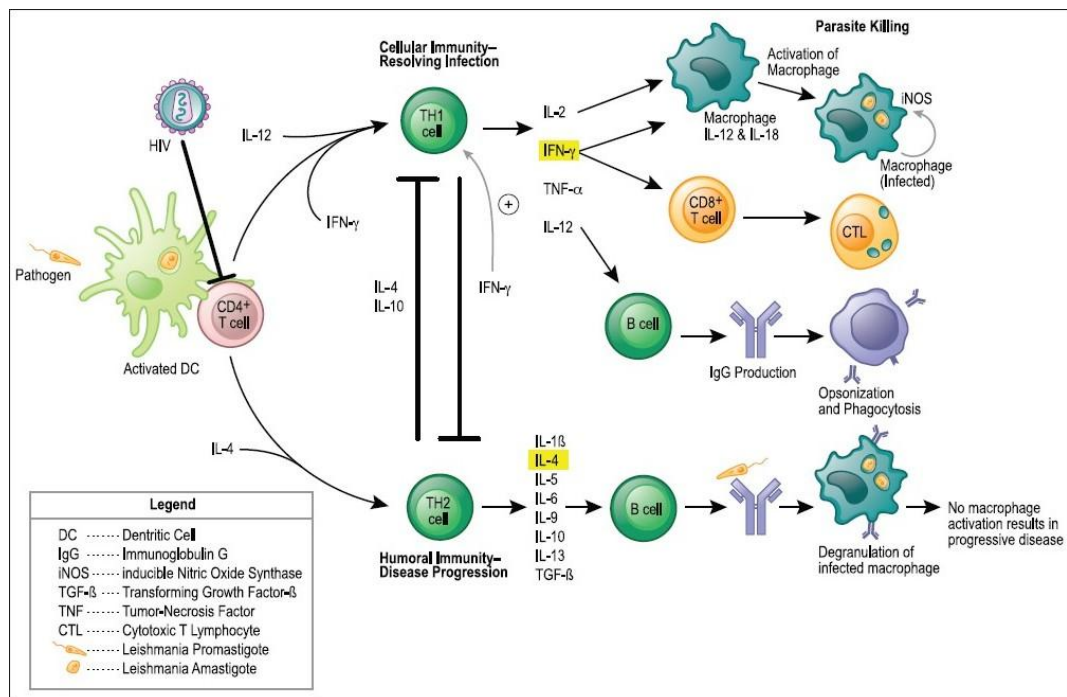
## Introducción

---

Steinman, 1998). Las células de Langerhans son las células dendríticas más efectivas en la presentación del antígeno, bien directamente o bien a través del contacto con neutrófilos infectados. Las células dendríticas activadas migran a través de los nodos linfoides activando las células NK (Natural Killer) y estimulando la producción de IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-12 (Bajenoff et al. 2006). Las principales funciones biológicas de IL-12 son la producción de IFN- $\gamma$  y dirigir la diferenciación de células T CD4<sup>+</sup> en Th1 (Trinchieri, 2003), además de regular la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y por tanto la producción de óxido nítrico (Fig. I-10).

La entrada de los parásitos desencadena la respuesta inmune humoral en el hospedador, siendo ineficaz contra este tipo de infecciones intracelulares en los que el amastigote se encuentra en el interior del fagolisosoma. Así pues, el control de la infección de *Leishmania* está mediado por una respuesta inmune celular dependiente de la especie y las manifestaciones clínicas que desarrolle.

Los macrófagos son reclutados en última instancia, siendo el tipo celular más importante en la infección de *Leishmania*, ya que utiliza su función fagocítica como estrategia para ser internalizada y replicada en el interior del fagolisosoma. En humanos, las quimioquinas CCL2 y la proteína inflamatoria de macrófago 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ ) parecen ser las responsables de la activación de los macrófagos en las lesiones de la piel (Teixeira et al. 2006). La internalización promueve la producción de especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico y N-hidroxi-L-arginina (NOHA) como mediadores para eliminar al parásito (Iniesta et al. 2001). Los macrófagos dirigen la producción de citoquinas pro-inflamatorias como IL-12, además de actuar como células presentadoras de antígenos a las células Th1.



**Figura I-10. Respuesta inmunitaria frente a *Leishmania*, progreso de las respuestas Th1 y Th2 (Ezra et al. 2010).**

Se ha descrito en un modelo murino C57BL/6 que la infección subcutánea con *L. major* desencadena una respuesta llevada a cabo por células del tipo T-helper-1 (Th1), con producción de altos niveles de la citoquina IFN- $\gamma$ , IL-2 y factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) dando lugar a la curación y a la resistencia a la reinfección. Mientras que el desarrollo de una respuesta de tipo Th2 caracterizada por la producción de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 y IL-13, activando la respuesta inmune humoral, no es efectiva limitando la actuación de la respuesta de tipo Th1, dando lugar a una infección descontrolada (Awasthi et al. 2004).

## **Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis**

Las diferentes manifestaciones clínicas dependen principalmente de la especie de *Leishmania* implicada en la infección, pero también del estado inmunológico y de determinadas características genéticas del hospedador (Alexander et al. 1999).

## Introducción

---

Existen tres manifestaciones clínicas principales de la leishmaniasis: visceral, cutánea y mucocutánea (Herwaldt, 1999).

**-Leishmaniasis visceral (LV).** También conocida como kala-azar (término hindú para “fiebre negra”) (Fig. I-11A). Producida predominantemente por la especie *L. donovani* en la India, este de Asia y África, y por *L. infantum* y *L. chagasi* en la cuenca mediterránea, Asia Central y América del Sur. Es la forma más grave de la enfermedad, pudiendo ser fatal tras pocos meses sin el tratamiento adecuado. En esta enfermedad, el sistema retículo-endotelial está infectado afectando órganos vitales como bazo, hígado y médula ósea. La enfermedad se caracteriza por fiebre, espasmos irregulares, anorexia, anemia, esplenomegalia, hepatomegalia, y un aumento de los nódulos linfáticos y amígdalas. Después de una curación aparente de la enfermedad pueden aparecer lesiones cutáneas conocidas como “post kala-azar”, que pueden desaparecer fácilmente con el tratamiento. La mayoría de las infecciones viscerales son asintomáticas en individuos inmunocompetentes con desarrollo de una respuesta inmune protectora (Badaro et al. 1986).

**-Leishmaniasis cutánea (LC).** También denominada “botón de oriente” (Fig. I-11C). Es la forma más común de la enfermedad. Producida por *L. tropica* en regiones pobladas de Etiopía, Kenya, norte de África, Oriente Medio e India; por *L. major* en regiones del norte de África, Oriente Medio, India y Sudán; y por las especies *L. mexicana*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, o *L. panamensis* en Sudamérica. La principal manifestación que encontramos en esta forma de la enfermedad consiste en la aparición de úlceras de tamaño variable en la piel, con una costra con un borde de color morado y aspecto escamoso. El periodo de incubación suele ser de dos o tres meses tras la picadura del insecto vector. Las úlceras se localizan en el lugar de la inoculación (leishmaniasis cutánea localizada) y suele sanar espontáneamente en un plazo de entre 2 meses y un año. Una variedad de esta forma de la enfermedad se denomina leishmaniasis cutánea difusa, en la que aparecen lesiones nodulares diseminadas por todo el cuerpo y que tienden a confluir favoreciendo su extensión. Suele ser bastante

complicado tratar este tipo específico de leishmaniasis, quedando cicatrices, lo que provoca a su vez un estado de exclusión social en aquellos individuos que la padecen.

**-Leishmaniasis mucocutánea (LMC).** También llamada “espundia” en los lugares hiperendémicos (Fig. I-11B). Producida por *L. (V) braziliensis*, *L. (V) amazonensis*, *L. (V) panamensis*, y *Leishmania (V) guyanensis* en América Central y del Sur. La lesión inicial aparece en el sitio de la picadura, al igual que en la forma cutánea, dando la sensación de curación. Sin embargo, pasados unos meses, el 20-50% de los casos evolucionan afectando las mucosas de la nariz, la cavidad bucal y la región rinofaríngea produciendo lesiones granulomatosas hemorrágicas que provocan la degeneración de los tejidos cartilaginosos. Se ha descrito que *L. mexicana* también puede afectar a regiones mucocutáneas, especialmente el oído, provocando la pérdida del pabellón auditivo.



Figura I-11. Manifestaciones clínicas de la LV (A), LMC (B) y LC, (C).

## Diagnóstico de la leishmaniasis

El correcto diagnóstico de la leishmaniasis ha sido siempre un problema para los profesionales sanitarios, especialmente debido a la localización remota de los pacientes y a su deficiente acceso a los servicios médicos, tratando en muchos

## Introducción

---

casos a los pacientes en base a la observación empírica de los síntomas clínicos. Un buen diagnóstico no solo ayuda al tratamiento temprano de la enfermedad sino que acorta los plazos del mismo.

El diagnóstico de esta enfermedad ha evolucionado relativamente poco en los últimos años. Una de las primeras vías para diagnosticar la leishmaniasis es mediante la identificación de amastigotes de *Leishmania* en el tejido cutáneo (en el caso de LC), mucoso (LMC) o hígado, nódulos linfoides, medula ósea o bazo en el caso de la LV. La observación microscópica de amastigotes en el interior del macrófago, se realiza normalmente mediante la tinción de Giemsa. El establecimiento de cultivos a partir de biopsias pueden ser utilizados para confirmar el diagnóstico e identificar la especie y realizar estudios de resistencia *in vitro* en pacientes que no responden al tratamiento. Existe un método de microcultivo (MCM) utilizado para el diagnóstico de la LC en el que se utilizan microcapilares para el cultivo de los parásitos, tardando un tiempo menor que los cultivos tradicionales (Allahverdiyev et al. 2004). La LMC no se suele diagnosticar mediante estos métodos debido al bajo número de parásitos, lo que dificulta un diagnóstico sensible y eficaz (Jebbari et al. 1998).

Los métodos serológicos comienzan a ser de menor complejidad y coste, utilizándose en regiones endémicas asociadas a la pobreza. Se basan en la detección de anticuerpos presentes en la sangre del paciente contra proteínas de *Leishmania*. Existen dos métodos de detección en los que el propio promastigote se utiliza como antígeno en la reacción; (1) test de aglutinación directa (DAT) basados en la incubación de la muestra con un anticuerpo polivalente formando un precipitado visible. El problema radica en la necesidad de una cantidad elevada de antígeno en la muestras, además de la imposibilidad de distinguir entre infecciones pasadas o presentes dando falsos positivos (Hailu, 1990); (2) Test de inmunofluorescencia (IFAT), donde la incubación de antígeno y anticuerpo se da en un porta, visualizándose la reacción microscópicamente gracias a la unión de un anticuerpo secundario fluorescente. Este método es muy poco práctico en campo.



El método de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) se está empleando bastante en leishmaniasis canina siendo más sensible, específico y requiriendo, a su vez, menos antígeno, aunque sigue siendo muy poco accesible en la mayoría de las zonas endémicas. Existen otros muchos métodos serológicos como la inmunoelectroforesis (CIEP), basado en la fijación del complemento.

La prueba inmunocromatográfica frente a antígenos recombinantes de *Leishmania* como rK26 o rK39 se utiliza en campo, siendo barato y eficaz (96-100% de eficacia). El antígeno se inmoviliza en la tira y el suero se mueve a través de la tira por capilaridad. La aparición de una banda visible indica una reacción positiva (Myler and Fasel, 2006).

Recientemente, se ha elevado la sensibilidad de la detección mediante el uso de PCR en el diagnóstico de la enfermedad. La mayoría de los métodos basados en PCR se centran en amplificar zonas de los minicírculos de DNA presentes en el kinetoplasto (DNA mitocondrial del parásito), que presentan miles de copias por célula (Aviles et al. 1999; Singh et al. 2005). Una de las grandes ventajas del uso de este método es la identificación de la especie implicada en la infección, basándose en el diseño de oligonucleótidos frente a las secuencias conservadas.

## **Control del vector y reservorios de la leishmaniasis**

En las zonas endémicas de leishmaniasis se han llevado a cabo estrategias de control de las poblaciones del insecto vector. Aunque el empleo en estas zonas de DDT o deltametrina en zonas como Argelia, India o Brasil ha ayudado a reducir el número de estos insectos, también ha contribuido al desarrollo de resistencias a estos compuestos (Bora, 1999).

En algunos países como Palestina, China o las repúblicas centroasiáticas de la Unión Soviética, el sacrificio de los animales infectados es el método de



## Introducción

---

elección en el control de la leishmaniasis canina, y por tanto de la humana. Específicamente en China, estas iniciativas se llevan a cabo con enorme convicción junto con el tratamiento en masa de los pacientes, así como con el control vectorial empleando DDT (diclorodifeniltricloroetano). Sin embargo, en el resto de países donde la leishmaniasis es una enfermedad endémica, surgen problemas éticos ante el sacrificio masivo de perros infectados. En algunos de estos países se realiza el sacrificio de animales sin criterios bien definidos. Para controlar la infección en perros se suele optar por el empleo de collares impregnados con deltametrina, demostrando ser efectivos frente a una amplia variedad de especies del insecto vector en diferentes lugares de Europa, Asia y Sudamérica (Killick-Kendrick, 1999).

## **Desarrollo de vacunas frente a la leishmaniasis**

La recuperación bien de forma espontánea o bien mediante tratamiento farmacológico de la enfermedad se acompaña con una respuesta inmune frente a la reinfección, otorgando una base racional al desarrollo de vacunas frente a la leishmaniasis.

El primer acercamiento para la obtención de un tipo activo de inmunización frente a la leishmaniasis se dio en los años 70 y consistía en la inoculación en una zona, no demasiado expuesta del cuerpo, de parásitos vivos o extractos de tejidos extraídos de lesiones cutáneas, dando origen al término de "leishmanización". Anteriormente a este hecho, ya se había descrito la utilización de parásitos vivos para la obtención de inmunización frente a la enfermedad. Así, las madres de zonas endémicas como Israel o Líbano exponían a sus niños a la picadura del insecto vector (Gavron and Saul, 1997). Sin embargo, la aparición de individuos en los que aparecían lesiones durante un largo periodo, o que necesitaban tratamiento, o incluso que se cronificaban no respondiendo al tratamiento, lo hace inviable para su uso en humanos por el alto riesgo que conlleva.

Los objetivos para obtener vacunas contra la leishmaniasis son: (1) Inducir una inmunización duradera en toda la población y (2) Seguridad, estandarización, estabilidad y facilidad de producción en masa (Färber y Moll, 2013).

Existen actualmente tres generaciones de vacunas desarrolladas frente a la leishmaniasis:

- Primera generación: Estas vacunas se componen de parásitos muertos o fracciones de parásitos. Desde los años 70, se han desarrollado dos tipos de vacunas con parásitos muertos, una vacuna compuesta por 5 componentes procedentes de cuatro especies diferentes denominada Leishvacin (Mayrink et al. 1979) y otra vacuna monovalente realizada a partir de *L. amazonensis*. Estudios clínicos demostraron la inmunogenicidad y seguridad de estas vacunas, pero confirieron una escasa protección (Armijos et al. 2004, Velez et al. 2000). Se utilizan como aditivo a la terapia antimonial en Brasil pero nunca de forma profiláctica (Mayrink et al. 1985).

Otra aproximación, es el uso de parásitos de diferentes especies, con o sin el uso de adyuvantes dependiendo de la zona geográfica, dando como resultado una protección muy baja debido sobre todo a la destrucción de la inmensa mayoría de las proteínas durante el proceso de autoclavado (Ferreira 2003).

- Segunda generación: Basadas en la utilización de subfracciones derivadas de promastigotes o de antígenos recombinantes de *Leishmania*. De esta manera, subfracciones como FML (enriquecida en glicoproteínas) confieren excelentes resultados inmunoprotectores frente a leishmaniasis visceral en modelo murino (Santos et al. 2003).

Por otro lado, se han descrito una serie de antígenos recombinantes que confieren protección frente a la LC en modelo murino como son LACK, gp63, 4H6 y antígeno de bolsillo flagelar (FPA), mientras que no se han realizado muchos estudios frente a la forma visceral. Dichos antígenos

pueden ser fusionados como en el caso de Leish-111f (tres antígenos fusionados en tándem).

Sin embargo, las vacunas de segunda generación no son viables en términos de estandarización, purificación y producción en masa.

Actualmente, se está estudiando la forma de administración a través microorganismos y virus.

- Tercera generación: Son vacunas basadas en DNA. Previamente se ha demostrado que se observa expresión proteica tras la inyección de un plásmido en músculo esquelético de ratón (Roberts, 2005). Al basarse en DNA, se pueden combinar múltiples genes en una simple construcción confiriendo mayor inmunogenicidad, e incluso modificar el vector introduciendo genes de citoquinas o adyuvantes (Ivory and Chadee, 2004). Las primeras vacunas experimentales de esta generación utilizaron como antígeno gp63 y LACK. Actualmente hay multitud de antígenos candidatos de formar parte de futuras vacunas frente a leishmaniasis. Este tipo de vacunas pueden producirse de manera sencilla y a gran escala, siendo mucho más estables que las pertenecientes a la primera o segunda generación. (Palatnik-de-Sousa, 2008).

Recientemente, se ha demostrado que la vacunación de hamsters con una vacuna basada en el DNA del receptor de hemoglobina de *Leishmania* protege frente a la LV (Guha et al. 2013).

Una nueva aproximación a la inmunización frente a la leishmaniasis emplearía componentes de la saliva del insecto vector, que induciría una respuesta local inflamatoria protectora (Morris et al. 2001).

Se ha estimulado la investigación y el desarrollo de vacunas contra la leishmaniasis canina debido a la importancia económica de los perros y su papel como reservorio de leishmaniasis humana causada por *L. infantum*. Leishmune<sup>®</sup> (Fort Dodge Animal Health) es la primera vacuna autorizada contra leishmaniasis canina. Contiene el antígeno del ligando de mucosa-manosa (FML) de *L. donovani* y se ha descrito una eficacia del 76-80%, y una protección del 92%. La

formulación FML-saponina superó los ensayos clínicos en Brasil. Otra vacuna que ha sido aprobada recientemente para su uso en Europa se compone del antígeno ES purificado del sobrenadante del cultivo de promastigotes de *L. infantum* junto con *Quilaja saponaria* (QA21) como adyuvante (CaniLeish<sup>®</sup>, Virbac Animal Health). Esta vacuna tiene una eficacia bajo condiciones de campo (en Francia) del 92%, protegiendo a los animales ante la aparición de síntomas clínicos. Sin embargo, se requieren estudios a mayor escala para comprobar si esta vacuna contribuye a controlar la leishmaniasis canina en Europa. La eficacia de otras vacunas como aquella que emplea el antígeno recombinante A2 de amastigotes de *Leishmania* con saponina como adyuvante (Leish-Tec, Hertape Calier) requiere ser evaluada bajo condiciones de campo (Otranto y Dantas-Torres, 2013).

## **Tratamiento de la leishmaniasis**

Ante la falta de vacunas eficaces y de métodos efectivos de control de las poblaciones del insecto vector, la única herramienta de lucha frente a la leishmaniasis es mediante **quimioterapia**. El éxito o fracaso del tratamiento depende del estado inmunológico del paciente (co-infección con VIH), la localización geográfica y la especie de *Leishmania* que produce la infección y las consiguientes manifestaciones clínicas derivadas de la misma.

Así, desde 1940 se usan fármacos tales como antimoniales pentavalentes (Glucantime<sup>®</sup> y Pentostam<sup>®</sup>) y diamidinas (Pentamidina) para combatir la enfermedad. Posteriormente, antifúngicos como anfotericina B (tanto en forma deoxicolato como en forma liposomal) y ketoconazol, antibacterianos como paromomicina y dapsona y más recientemente el antitumoral miltefosina, el primer fármaco oral aprobado frente a la leishmaniasis, se unieron al arsenal farmacológico existente frente al tratamiento de la enfermedad (Croft, 2006). La alta toxicidad hepática y renal observada para la mayoría de estos compuestos, y el coste del tratamiento de muchos de ellos ha potenciado la búsqueda de

## Introducción

---

fármacos alternativos que deberían reunir las siguientes condiciones: administración oral, menores efectos secundarios y menor precio (Palumbo, 2009).

La primera línea de tratamiento frente a la LV y LC la constituyen los fármacos **antimoniales pentavalentes**: estibogluconato de sodio (Pentostam<sup>®</sup>) y antimoniato de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>) (Fig. I-12), excepto en la zona endémica del estado de Bihar (India) donde el fallo terapéutico alcanza ya al 60% de los pacientes tratados. Estos fármacos promueven el eflujo de tiones e inhiben la tripanotión reductasa y la glutatión sintetasa, produciendo una acumulación de las formas oxidadas tanto de tripanotión como de glutatión (Wyllie et al. 2004). Su acción conduce a una depleción en los niveles de ATP, despolarización de la membrana mitocondrial, producción de ROS y fragmentación del DNA, dando lugar a una muerte celular similar a la apoptosis (Ouellette et al. 2004).

Actualmente se emplea Pentostam<sup>®</sup> mediante inyecciones parenterales de 20 mg/ml durante 30 días acompañado o no con IFN- $\gamma$  (Sundar et al. 2006). Los tratamientos duraderos con antimoniales producen severos efectos secundarios como dolor en el lugar de la inyección, arritmias cardiacas o pancreatitis aguda. Frecuentemente, debido a los graves efectos secundarios, se abandona parcial o totalmente el tratamiento favoreciendo la aparición de resistencias (Croft et al. 2006).

El tratamiento más empleado para combatir la leishmaniasis canina es el basado en meglumina de antimoniato (en formulación en polvo o liposomal), sola o acompañada con alopurinol (Otranto y Dantas-Torres, 2013).

La **anfotericina B** es un antibiótico poliénico (Fig. I-12) usado predominantemente como antifúngico, pero que posee una excelente actividad leishmanicida (Sundar y Rai, 2002). La anfotericina B se une a los esteroides, predominantemente ergosterol, de la membrana plasmática con una alta afinidad generando poros acuosos, aumentando la permeabilidad a iones y provocando la

muerte del parásito (Leandro and Campino, 2003). La anfotericina B se ha utilizado con excelentes resultados en regiones de la India donde el fallo terapéutico del tratamiento de la LV con antimoniales pentavalentes es muy alto (Thakur et al. 1999). La anfotericina B en su forma deoxicolato tiene excelentes porcentajes de curación muy cercanos al 100%, empleando una dosis (via intravenosa) de 0,75-1 mg/kg durante 15-20 días (Sundar y Rai, 2002). Sin embargo, la mayoría de los pacientes experimentan reacciones adversas (fiebre, tromboflebitis, nefrotoxicidad, miocarditis e incluso la muerte). La necesidad de hospitalización del paciente, el alto coste del fármaco, la necesidad de una estricta monitorización y la alta incidencia de efectos secundarios constituyen un problema para su empleo.

La **anfotericina B liposomal** (Ambisome<sup>®</sup>) es igual de efectiva frente a la LV que la convencional y tiene un significativo descenso de las reacciones adversas y el tiempo de tratamiento. La dosis empleada, bajo los criterios de efectividad y coste, es variable en las diferentes regiones geográficas; de este modo, mientras que los pacientes de la India requieren una dosis menor (10 mg/kg), en zonas Mediterráneas o Brasil la dosis empleada para obtener la curación de la enfermedad es mayor (18-21 mg/kg) (Sundar et al. 2002, 2006, 2013). Hasta hace poco, su precio resultaba prohibitivo para países en desarrollo, sin embargo se acordó con la OMS en 2007 un precio preferencial (18\$ un vial de 50 mg) para su uso en regiones endémicas a LV (Olliaro and Sundar, 2009). En relación a la posibilidad de aparición de resistencias, los estudios realizados demuestran que la resistencia clínica a anfotericina B es poco frecuente (Chappuis et al. 2007; Ouellette et al. 2013).

La **miltefosina** es un alquilfosfolípido (hexadecilfosfocolina) desarrollado inicialmente como anticancerígeno (Fig. I-12). Se ha descrito que inhibe la citocromo c oxidasa, pudiendo actuar también sobre otras enzimas (Luque-Ortega y Rivas, 2007). Es el primer fármaco oral aprobado para el tratamiento de la leishmaniasis. Los porcentajes de curación para la LV es del 94% a las dosis diarias durante 4 semanas de 100 mg para pacientes con un peso superior a 25

## Introducción

---

kg y 50 mg para aquellos que pesen menos de 25 kg (Sundar et al. 2002). Las limitaciones de este fármaco son su alto coste, los efectos secundarios adversos del tracto digestivo, y ocasionalmente la hepatotoxicidad y nefrotoxicidad. Se trata de un fármaco teratogénico, así que está prohibido su uso en pacientes embarazadas, y se deben tomar medidas anticonceptivas en pacientes en edad fértil durante el tratamiento y 3 meses después de este. La rápida recuperación que experimentan los pacientes unido al alto coste, motiva a los pacientes a dejar rápidamente el tratamiento o no cumplir correctamente las pautas de dosificación. Esto junto al hecho de que la miltefosina tiene una larga vida media en el organismo de entre 150 y 200 horas, podría favorecer la aparición de resistencia. (Sundar y Murray, 2005).

La **paromomicina** es un antibiótico aminoglicósido que se usa por vía parenteral para el tratamiento de la LV y de forma tópica y parenteral para la LC (Fig. I-12). La actividad leishmanicida vendría provocada por su unión en el sitio A del ribosoma inhibiendo el proceso de traducción proteica e introduciendo errores de lectura (Fernández et al. 2011). Se han observado porcentajes de curación similares a los observados con anfotericina B o antimonioales (David y Craft, 2009). Es un fármaco muy barato, del que no se ha descrito la aparición de resistencia clínica (Chappuis et al. 2007). Las desventajas del uso de este fármaco son: la necesidad de inyectarlo intramuscularmente durante los 21 días que dura el tratamiento (16-20 mg/kg/día), la monitorización de los niveles de transaminasas en el suero, y la existencia de datos inadecuados para aprobar su uso en mujeres embarazadas.

La **pentamidina** (Fig. I-12) es una diamidina, y fue el primer fármaco empleado en pacientes con LV y fallo terapéutico con antimonioales pentavalentes, dando altos porcentajes de curación (Jha, 1983). El compuesto se acumula en la mitocondria del parásito inhibiendo la topoisomerasa II mitocondrial, la biosíntesis de poliaminas y el potencial de membrana mitocondrial (Basselin et al., 2002; Croft, 2006). La eficacia de este fármaco ha disminuido mucho desde que comenzó a emplearse y sumado a sus severos

efectos adversos (puede provocar diabetes dependiente de insulina e incluso la muerte), conlleva a que se esté abandonando su uso, siendo utilizado únicamente como tratamiento compasivo.

Los **azoles** como el ketoconazol, el fluconazol (Fig. I-12) o el itraconazol son antifúngicos que actúan inhibiendo la vía de la biosíntesis de esteroides. Bloquean específicamente la síntesis de ergosterol, mediante la inhibición de la enzima C14  $\alpha$ -desmetilasa. Estudios *in vitro* han demostrado una actividad leishmanicida, aunque hay controversia con respecto a su eficacia clínica frente a distintas especies de *Leishmania* (Croft et al. 2006).

La **sitamaquina** es una 8-aminoquinolina eficaz por vía oral para tratar la LV. Ensayos clínicos de fase I y II han mostrado resultados con distintos niveles de éxito dependiendo de las especies de *Leishmania* y de la localización geográfica. La sitamaquina inhibe el complejo II de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, produciendo muerte asociada a apoptosis (Carvalho et al. 2011). En un ensayo clínico fase IIb realizado en la India, la sitamaquina mostró ser igual de eficaz que el desoxicolato de anfotericina B y mejor tolerada. Se han detectado efectos secundarios adversos como nefrotoxicidad y metahemoglobinemia (Sundar y Chatterjee, 2006). Actualmente, el objetivo de la empresa es reducir los efectos secundarios del fármaco.

El **alopurinol** es un análogo tóxico de hipoxantina, y actúa interfiriendo en la síntesis del RNA del parásito. Su empleo como monoterapia no ha dado buenos resultados, utilizándose en combinación con antimoniales pentavalentes. Su uso está más extendido en veterinaria para el tratamiento de la leishmaniasis canina, observándose una diferencia en los niveles de concentración que alcanza en el perro respecto a los alcanzados en humanos (Croft et al. 2006).

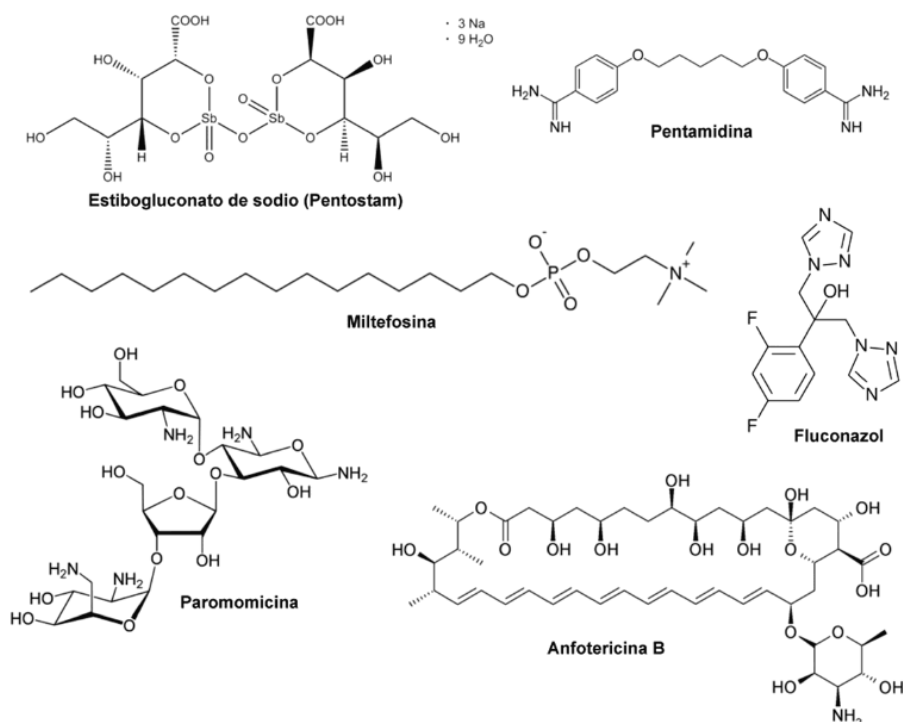
El **imiquimod** es un antiviral que se emplea en combinación con antimoniales pentavalentes en el tratamiento de pacientes con lesiones cutáneas que son refractarias al tratamiento previo con antimoniales. El imiquimod es un inmunomodulador de uso tópico que estimula la respuesta inmune local en el sitio



## Introducción

---

de aplicación induciendo la producción de citoquinas y óxido nítrico en macrófagos (Croft et al., 2006).



**Figura I-12. Fármacos leishmanicidas.**

Ante el reducido arsenal terapéutico disponible para tratar la enfermedad, las empresas farmacéuticas realizan una búsqueda de nuevos compuestos que puedan tener potencial acción leishmanicida y que tengan menores efectos secundarios. Entre los compuestos candidatos seleccionados hay chalconas, flavonoides, alquilfosfocolinas, bifosfonatos, sesquiterpenos, quinolinas, formulaciones orales de anfotericina B, buparvaquona, y otros compuestos que interfieren con el metabolismo del ergosterol (Polonio y Efferth 2008; Richard y Werbovetz, 2010).

Recientemente, la OMS ha recomendado el uso de terapias combinadas de fármacos leishmanicidas para reducir la duración y la toxicidad del tratamiento, prolongar la vida terapéutica de los fármacos ya existentes y retrasar al máximo la aparición de resistencias.

Algunas combinaciones que ya se han empleado con éxito en ensayos clínicos son: (1) dosis bajas de pentamidina con alopurinol frente a LV (Singh y Sivakumar, 2004); (2) paromomicina más cloruro de metilbencetonio en forma de ungüento, siendo más efectiva frente a LC que muchas monoterapias (Singh y Sivakumar, 2004); (3) estibogluconato de sodio y paromomicina para tratar la LV, es segura y efectiva en ensayos llevados a cabo en India y en el este de África (Chappuis et al. 2007); (4) anfotericina B liposomal y miltefosina o paromomicina, o miltefosina y paromomicina, ensayadas en India y Bangladesh para tratar la LV siendo estas combinaciones más eficaces y menos tóxicos, reduciendo el tiempo de tratamiento, el tiempo de hospitalización, el coste y los efectos secundarios adversos (Sundar et al. 2011).

Aunque los ensayos clínicos realizados han demostrado la eficacia de este tipo de terapias combinadas, es necesario investigar otros factores como la identificación de un tratamiento corto que sea bien tolerado por los pacientes, aspectos logísticos, a la vez que evaluar el riesgo de aparición de resistencias en el campo (García-Hernández et al. 2012).

## **Biología y bioquímica del parásito**

Los parásitos del género *Leishmania* son organismos diploides con características únicas que los diferencian del resto de organismos eucariotas: componentes específicos de membranas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), orgánulos como acidocalcisomas, glicosomas o kinetoplasto, edición del RNA mitocondrial, transcripción policistronica y *trans-splicing* (Toledo et al. 2010). En la etapa en la que infecta al hospedador invertebrado se ha demostrado que se produce intercambio de material genético mediante reproducción sexual; sin embargo, se considera que los parásitos de *Leishmania* se dividen principalmente por fisión binaria.

## Introducción

---

Una característica de estos microorganismos es su capacidad de alterar el número de copias de genes individuales, grupos de genes, o cromosomas. Esta **plasticidad génica** les confiere una clara ventaja adaptativa (Toledo et al. 2010).

- **Genoma de *Leishmania***: En los últimos años se han secuenciado los genomas de 5 especies de *Leishmania* (*L. major*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. braziliensis* y *L. mexicana*), revelando la existencia de más de 8.300 genes que codifican para proteínas y 900 genes para RNA. Alrededor de 6.200 genes se encuentran conservados en todos los tripanosomatidos (*Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*), mientras que alrededor de 1.000 genes son específicos del género *Leishmania*, y 200 de estos son diferentes entre las distintas especies secuenciadas, indicando una evolución marcada por diferentes presiones selectivas. Los datos de las secuencias del genoma se pueden visitar en la página web de GeneDB (<http://www.genedb.org/Homepage>) o TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). Las diferentes especies de *Leishmania* tienen un genoma constituido por un número de cromosomas variable entre 34 y 36 pares, numerados en orden ascendente de tamaño, con tamaños comprendidos entre 250 kb y 4 Mb. De esta manera, *L. major* y *L. donovani* tienen 36 pares de cromosomas, *L. mexicana* y *L. amazonensis* tienen 34 y el grupo de *L. braziliensis* tienen 35. La mayoría de los genomas son **diploides** de forma general, aunque se pueden dar ciertos grados de aneuploidias, así en *L. major* el cromosoma 1 es triploide (Sunkin et al. 2000), mientras que el 20 y el 31 parecen ser tetraploides. El 49,7% del genoma codifica para proteínas. El contenido en G + C de las regiones codificantes y no codificantes es de un 62,5 % y un 57,3 %, respectivamente.

La **regulación** de la expresión génica en *Leishmania* es predominantemente **post-transcripcional**. La RNA polimerasa II transcribe largas cadenas policistrónicas en ausencia de promotores conocidos (Martinez-Calvillo et al. 2003). La síntesis de mRNA se lleva a cabo mediante **trans-splicing** por adición en el extremo 5' de una secuencia de 39 nucleótidos (mini-exón) y posterior poliadenilación en el extremo 3' (Myler and Fasel, 2006) (Fig. I-13). Sólo se

conocen 2 genes que contengan intrones en *Leishmania*, codificando para la poli(A) polimerasa y para una RNA helicasa; y otros dos genes que requerirían también modificaciones del tipo cis-splicing (Ivens et al. 2005).

La regulación de los niveles de mRNA se determina mediante secuencias localizadas en regiones no traducibles en 3' (3'UTR) que controlan la estabilidad y la traducción. La **regulación post-traducciona** está asociada con la expresión diferencial de genes entre las diferentes formas de vida del parásito (Myler and Fasel, 2006).

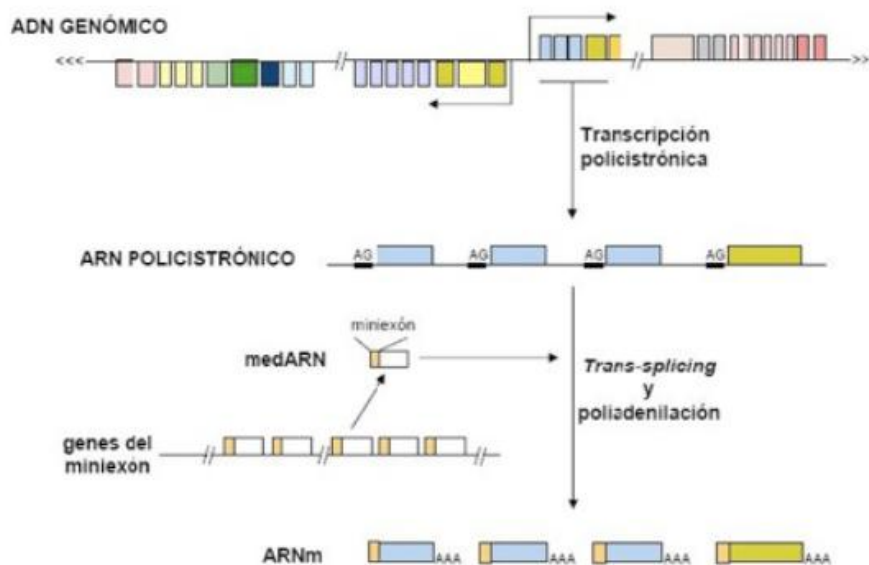


Figura I-13. Proceso transcripcional en *Leishmania* (esquema de J.M. Requena; <http://www.ricet.es/es/5/grp-grupo-de-biologia-molecular-de-parasitos-tropicales.htm>)

- **Kinetoplasto:** El DNA mitocondrial de los tripanosomátidos se encuentra ubicado en una estructura denominada kinetoplasto. Se localiza cercano al bolsillo flagelar y perpendicular al eje del mismo (Fig. I-14). Dos tipos de anillos de DNA, minicírculos y maxicírculos, están presentes en el kinetoplasto. Mientras hay miles de minicírculos con un tamaño que oscila entre 0,5 y 2,5 kb, solo hay unas pocas docenas de maxicírculos con un tamaño entre 20 y 40 kb. Los maxicírculos son estructural y funcionalmente análogos al DNA mitocondrial de

## Introducción

---

eucariotas superiores, codificando rRNAs y subunidades de los complejos de la cadena respiratoria. Los minicírculos codifican para RNAs guías que modifican los transcritos de los maxicírculos mediante la inserción o deleción de uridilato en los mismos, a lo largo de un proceso de edición del RNA (de Souza et al. 2009).

- **Acidocalcisosomas:** *Leishmania* tiene unos orgánulos de pH ácido y electrodensos denominados acidocalcisosomas (Fig. I-14). Acumulan una alta concentración de fósforo como pirofosfato o polifosfato, además de calcio y otros cationes, y aminoácidos básicos. Son orgánulos redondeados cuyo número y tamaño varía de acuerdo a la especie, al estadio del parásito, y al medio de cultivo (Docampo et al. 2005). Los acidocalcisosomas están asociados con la participación en varias funciones como almacenamiento de cationes y fósforo, metabolismo del polifosfato, homeostasis de calcio, mantenimiento del pH intracelular, y osmoregulación del parásito.

- **Metabolismo en *Leishmania*:** Se han identificado en *L. major* más de 400 genes implicados en las principales rutas metabólicas, existiendo diferencias notables con otros tripanosomátidos a nivel de enzimas ausentes en determinados ciclos con respecto a estos. La adaptación a los diferentes ambientes en que se encuentran las distintas fases del parásito juega un papel fundamental en el metabolismo, siendo de especial relevancia el pH del medio y la disponibilidad de oxígeno y dióxido de carbono.

Las principales fuentes de energía utilizadas por *Leishmania* son la glucosa y los aminoácidos (prolina en mayor medida), implicando sistemas de generación de energía como la glicólisis y el metabolismo mitocondrial, con una cadena de transporte de electrones muy activa.

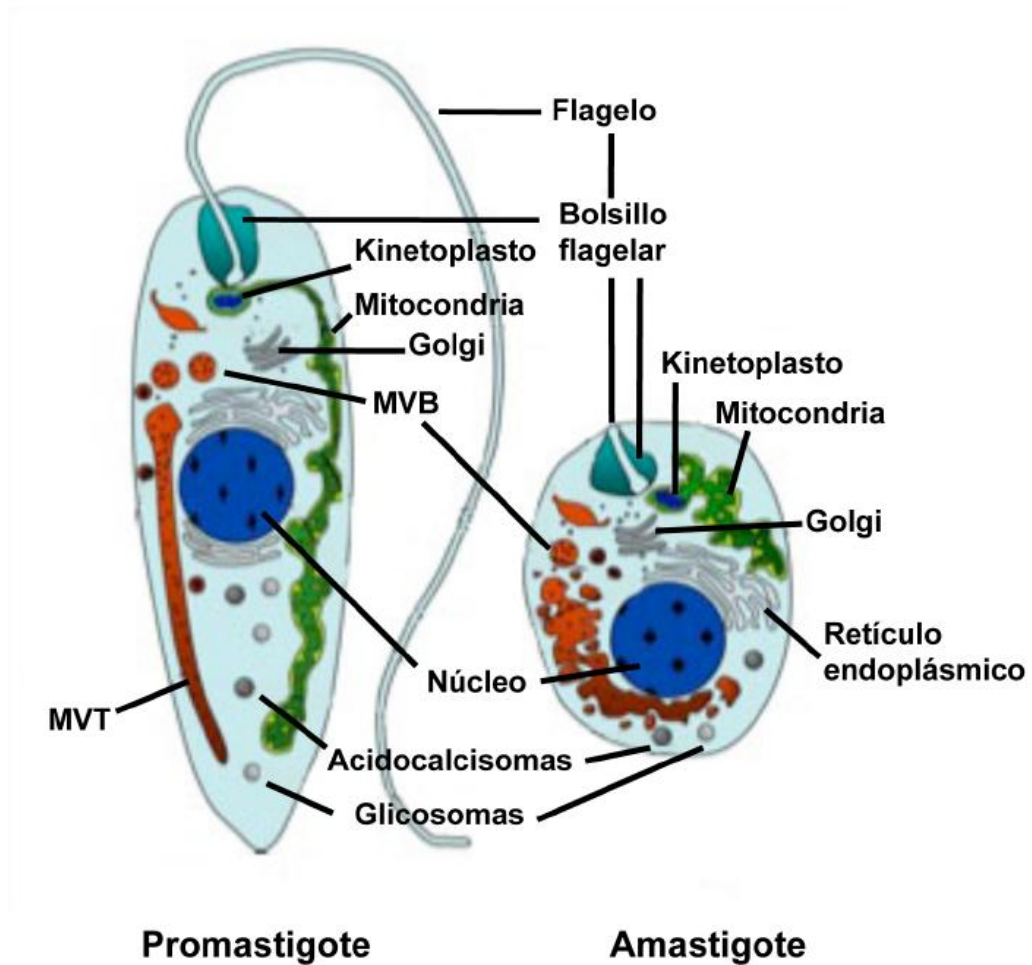


Figura I-14. Esquema gráfico de los orgánulos constitutivos presentes en las formas promastigotas y amastigotas de *Leishmania* (Besteiro et al. 2007).

La **glicólisis** es una vía metabólica de producción de ATP presente en todos los eucariotas. Sin embargo, mientras en casi todos los organismos la glicólisis es un proceso únicamente citosólico, en *Leishmania* la mayor parte de la ruta (únicamente tres enzimas se encuentran en citosol) se localiza en orgánulos de origen peroxisomal denominados **glicosomas** (Fig. I-14). Estos orgánulos tienen una única bicapa fosfolipídica como membrana, una matriz proteínica electrodenso y no contiene DNA. La producción neta de ATP y el poder reductor se da en el citosol debido a esta compartimentalización, ya que el balance energético obtenido en el interior del glicosoma es nulo. Además de la glicólisis, otros sistemas metabólicos tienen lugar en los glicosomas, al menos en parte, como son la ruta de las pentosas fosfato, la ruta gluconeogénica, biosíntesis de

## Introducción

---

purinas y pirimidinas,  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, biosíntesis de esteres lipídicos, biosíntesis de isoprenoides y mecanismos de defensa frente a agentes oxidativos. La localización de enzimas gluconeogénicas y glucolíticas en el mismo compartimento permite al parásito adaptarse rápidamente a diferentes fuentes de carbono. Durante la fase intracelular, algunas enzimas de la ruta glicolítica pueden cambiar su localización glicosoma/citosol (Michels et al. 2006). A su vez, se ha observado que los glicosomas contienen amilasa y sucrasa para la degradación del almidón y los disacáridos tomados del insecto vector al alimentarse de néctar. En su interior encontramos quinasa como ribuloquinasa y xiluloquinasa, demostrando la utilización de otros azúcares aparte de la glucosa como sustrato energético (Opperdoes et al. 2007).

Igualmente, se ha descrito que *Leishmania* sintetiza manano (polímero de manosa), como reserva energética (Fig. 10) (Opperdoes et al. 2007).

Un hecho característico del orden Kinetoplastida es la presencia de una única **mitocondria** ramificada (Fig. I-14) a lo largo del parásito. En este orgánulo tienen lugar numerosas rutas del metabolismo energético, además de una **cadena de transporte de electrones (CTE)** muy activa (Fig. I-15), principal fuente de energía del parásito. Es interesante el estado de parada metabólica reversible en el que pueden entrar los promastigotes de *Leishmania* al inhibir la CTE, hecho que no sucede, por ejemplo en *Trypanosoma* que muere rápidamente al inhibir dicha actividad. Se piensa que es debido a una adaptación a la ausencia de oxígeno en el interior del insecto vector (Opperdoes et al. 2007). También se ha demostrado la menor dependencia de la cadena respiratoria en la forma amastigota de *Leishmania* respecto a otros grupos de la familia (Fidalgo et al. 2011). La CTE se sitúa en la membrana interna mitocondrial, y consta de cuatro complejos: Complejo I (NADH deshidrogenasa), Complejo II (succinato deshidrogenasa), Complejo III (Coenzima Q-citocromo c reductasa) y Complejo IV (citocromo c oxidasa), con la ubiquinona (Coenzima Q) y el citocromo c actuando como transportadores de electrones móviles entre los distintos complejos. El gradiente de protones producido dirige la síntesis de ATP mediante

una  $F_1/F_0$  ATPasa (Complejo V) en un proceso denominado fosforilación oxidativa. En *Leishmania* la CTE tiene algunas particularidades, una de ellas es un complejo I alternativo NADH deshidrogenasa que es insensible a la rotenona como inhibidor, debido a la baja actividad o a la ausencia de una enzima similar a la de mamíferos. Estudios bioquímicos básicos han demostrado la existencia de un complejo II clásico. Los parásitos tienen muy limitado el transporte de electrones entre el complejo I y el III, de esta manera el succinato se convertiría en el donador principal de electrones para la producción de energía. El succinato puede ser reciclado en parásitos a partir del fumarato mediante la fumarato reductasa (ausente en mamíferos, posible diana terapéutica). El complejo IV se encuentra constituido por más de 14 subunidades codificadas por genes nucleares y mitocondriales (procedentes de los maxicírculos), jugando un papel fundamental en los estadios infectivos del parásito (Fidalgo et al. 2011).



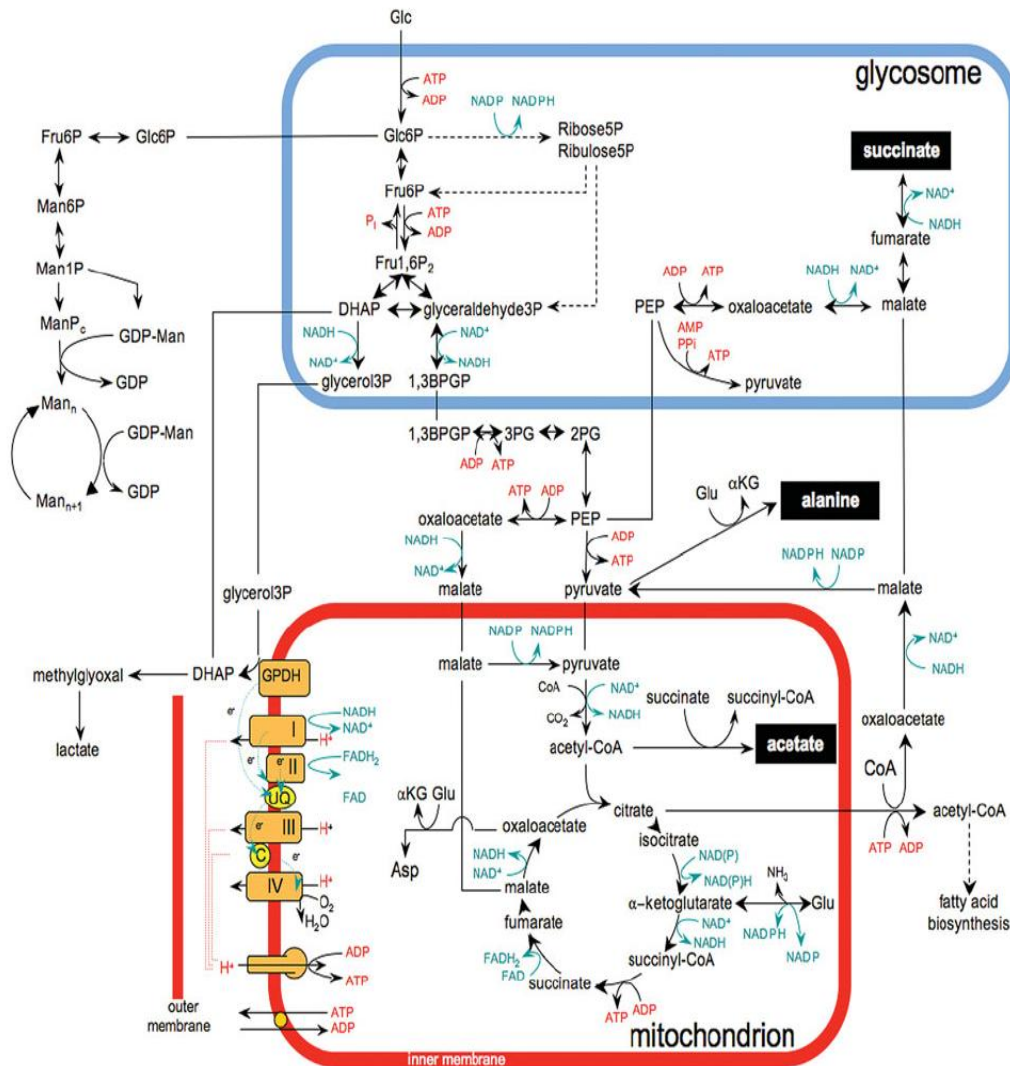


Figura I-15. Representación esquemática del metabolismo del carbono en *Leishmania*. Abreviaturas: I-IV complejos de la CTE; αKG, α-ketoglutarato; 1,3BPGP, 1,3-bisfosfoglicerato; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; Fru1,6P<sub>2</sub>, fructosa-1,6-bisfosfatasa; Glu, glutamato; GPDH, glicerol 3-fosfato deshidrogenasa dependiente de FAD; Glc6P, glucosa-6-fosfato; Man6P, manosa-6-fosfato; ManP<sub>c</sub>, Man1,4-ciclo-fosfato; Man<sub>n</sub>, oligomeros de manogeno (Manβ1-2Man)<sub>n</sub>; PEP, fosfoenilpiruvato; 2PG, 2-fosfoglicerato; 3PG, 3-fosfoglicerato.

El metabolismo de las **purinas** en *Leishmania* difiere con respecto al de eucariotas superiores, siendo ésta incapaz de sintetizar el anillo de purina a partir de precursores metabólicos, obteniendo estos compuestos a partir del hospedador. Sin embargo, *Leishmania* si tiene la capacidad de generar **pirimidinas de novo**, aunque en su ruta hay una enzima que realizaría una acción doble timidilato sintasa y dihidrofolato reductasa (DHFR-TS), mientras que en el hospedador estas acciones las realizan dos enzimas; la proteína PTR1

también se encuentra implicada en la reducción de folatos, siendo una diana terapéutica a tener en cuenta para el diseño de nuevos fármacos frente a la enfermedad. Por otro lado, *Leishmania* no puede tampoco sintetizar **folatos** y debe importar estos desde el medio extracelular mediante un transportador en la membrana plasmática (Opperdoes et al. 2007).

A su vez, algunas **vitaminas y cofactores** tienen que ser captados del medio para que *Leishmania* pueda llevar a cabo con normalidad su metabolismo (McConville et al. 2008 en After the genome).

El adecuado balance redox intracelular es vital para la supervivencia y proliferación de todos los organismos vivos, y depende de reacciones basadas en grupos tioles. La mayoría de los organismos eucariotas y procariotas utilizan glutatión (GSH) o tioredoxina complementados con las pertinentes reductasas para mantener la capacidad reductora. Sin embargo, el **metabolismo redox** de los tripanosomátidos está basado en la molécula N<sup>1</sup>,N<sup>8</sup>-bis(glutationil)espermidina o **tripanotión** T(SH)<sub>2</sub>. Así, esta molécula estaría implicada en funciones tan diversas como la replicación de DNA, la defensa frente a agentes oxidantes, ensamblaje de los clusters hierro-azufre y la detoxificación de cetoaldehidos, xenobióticos y metales pesados.

La biosíntesis de T(SH)<sub>2</sub> requiere la adición de dos moléculas de GSH a una molécula de espermidina (Spd) en una reacción catalizada por la enzima tripanotión sintetasa. El primer paso de la síntesis de GSH, es limitante y es catalizado por la enzima  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa (GGCS), produciéndose la unión de una molécula de L-glutamato con una de L-cisteína. La reacción de síntesis termina con la adición de una molécula de L-glicina a  $\gamma$ -glutamilcisteína. Se ha demostrado en *Leishmania* que la reducción de la actividad GGCS bien mediante el inhibidor químico irreversible L-butionina-S,R-sulfoximina (BSO) o bien mediante la manipulación del genoma conlleva a una mayor susceptibilidad al estrés oxidativo y al provocado por xenobióticos, además de un descenso en la supervivencia en el interior de macrófagos activados; mientras que en *T. brucei*

## Introducción

---

provoca incluso la muerte del parásito. La Spd puede generarse de novo en el interior del parásito o bien tomarse del medio en el caso de *Leishmania*. La ruta biosintética de Spd parte de una arginina e implica su descarboxilación convirtiéndola en ornitina que formará la molécula de Spd mediante la actividad de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC). También existe un inhibidor de ésta enzima denominado DMFO (difluorometilornitina) que induce fallos importantes en el metabolismo redox de tripanosomátidos. Todas las enzimas implicadas en esta vía llevan a cabo su actividad consumiendo ATP (Fig. I-16).

El T(SH)<sub>2</sub> se ha demostrado que es más eficiente que el GSH: (1) reduciendo pequeñas moléculas tales como dehidroascorbato, peróxido de hidrógeno y peroxinitrito, (2) reduciendo proteínas disulfuro como redoxinas, (3) captando radicales inducidos por radiación, (4) actuando como cofactor en varios sistemas de tripanosomátidos y (5) reaccionando con xenobióticos electrofílicos.

De esta manera, el T(SH)<sub>2</sub> sería la primera defensa frente a la actividad de las células del sistema inmune del hospedador, formando un complejo estable dinitrosil-hierro, impidiendo la nitrosilación de las proteínas y la actividad del peroxinitrito procedente del óxido nítrico producido por dichas células. En otro sentido, la T(SH)<sub>2</sub> juega un papel de detoxificación de compuestos arsénicos trivalentes (melarsoprol), antimoniales trivalentes (triofostam), y los compuestos nitroheterocíclicos (nifurtimox, megazol y benznidazol). Los antimoniales serían conjugados directamente con T(SH)<sub>2</sub> mediante la actividad de la enzima tripanotión-S-transferasa.

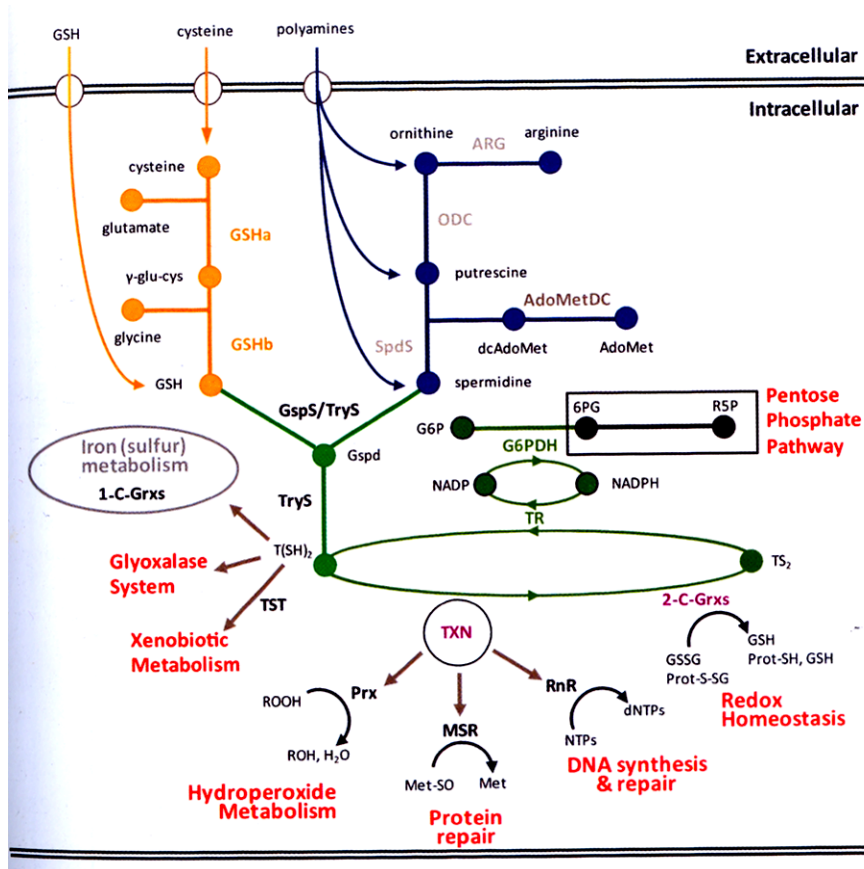


Figura I-16. Metabolismo del tripanotión. Abreviaturas: GSH, glutatión; GSHa,  $\gamma$ -glutamilcistein sintetasa; GSHb, glutatión sintetasa; ARG, arginasa; ODC, ornitina descarboxilasa; AdoMetDC, S-adenosinil metionina descarboxilasa; Spds, espermidina sintetasa; GspS, mono(glutationil)espermidina sintetasa; TryS, tripanotión sintetasa; TR, tripanotión reductasa;  $TS_2$ , tripanotión disulfuro; G6PDH, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa; G6P, glucosa-6-fosfato; 6PG, 6-fosfogluconato; R5P, ribosa-5-fosfato; 1-C-Grxs, monotiol glutaredoxinas; TST, tripanotión S-transferasa; TXN, triparredoxina; Prx, peroxidasa; ROOH, hidropéroxidos; ROH, alcoholes; metionina sulfoxida reductasa (MSR); Met, metionina; Met-SO, sulfoxido metionina; RnR, ribonucleótido reductasa, dNTPs, desoxinucleótidos; NTPs, nucleótidos; 2-C-Grxs, ditiol glutaredoxinas; GSSG, glutatión disulfuro; Prot-S-SG, mezcla proteína/GSH disulfuro.

- **Componentes de la superficie celular:** La membrana plasmática de *Leishmania* tiene dominios con distinta composición y funciones, son por tanto células polarizadas. Presenta tres características específicas que la diferencian de la de los eucariotas superiores: (1) está recubierta a lo largo de toda su cara citoplasmática por una red de microtúbulos, (2) la solidez que proporciona la red de microtúbulos restringe los procesos de endocitosis y exocitosis, que sólo se llevarán a cabo en una zona determinada de la membrana plasmática del parásito desprovista de éstos y situada en el extremo flagelado del parásito, denominada **bolsillo flagelar** (Overath et al. 1997), y (3) la mayor parte de los

## Introducción

---

componentes de la superficie celular de *Leishmania* se encuentran anclados a glicosilfosfatidilinositol (GPI). De esta manera, las macromoléculas que componen esta envoltura externa son mayoritariamente glicoproteínas, proteofosfoglicanos (PPG) altamente glicosilados y lipofosfoglicanos (LPG) complejos (Fig. I-17) (Ilgoutz and McConville, 2001).

Una de las primeras proteínas ancladas a GPI estudiadas en detalle fue una metaloproteasa denominada **gp63** o leishmanolisina. Se ha demostrado que gp63 es un potente factor de virulencia en promastigotes en virtud a su unión con el receptor CR1 y CR3 del macrófago, después de la opsonización producida con los componentes del complemento C3b y C3bi, favoreciendo la protección a la acción del complemento. Gp63 se expresa en la superficie de los promastigotes de *Leishmania*; sin embargo, se ha demostrado que puede ser secretada al exterior hidrolizando proteínas en el tracto digestivo del insecto vector o en el hospedador mamífero. También se expresaría en la forma amastigota, evitando la degradación en el fagolisosoma del macrófago (Yao et al. 2003).

Los **LPGs** son las macromoléculas más abundantes de la superficie de los promastigotes. Al igual que los PPG presentan cadenas de fosfoglicanos, variando la longitud y composición dependiendo del estadio del parásito, siendo mayor la longitud en el estado promastigote metacíclico, y menor en las formas procíclica. El nivel de expresión de LPG también varía dependiendo del estadio de desarrollo del parásito, siendo bajo en las formas amastigotas (McConville and Homans, 1992). Los LPGs llevan acabo diferentes funciones durante el establecimiento de la infección: inhibición de la lisis mediada por complemento, protección frente a la respuesta humoral del hospedador, participación en la unión al macrófago, bloqueo del proceso de maduración del fagosoma e inhibición de la respuesta oxidativa (Lodge y Descoteaux, 2005).

Los **PPGs** están formados por un esqueleto polipeptídico modificado por cadenas complejas de fosfoglicano. Pertenecen a una familia heterogénea y altamente glicosilada y pueden encontrarse anclados a GPI en la membrana

plasmática o en forma secretada al exterior (Ivens et al. 2005). La forma secretada por promastigotes consistiría en largos filamentos que los encapsularía en el tracto digestivo del insecto vector. Los PPGs jugarían un papel fundamental en: i) el establecimiento de la infección mediante la unión, no sólo a través de los fosfoglicanos, sino también a través de unas estructuras con repeticiones de leucinas en el extremo N-terminal (Handman y Bullen, 2002), y ii) en la supervivencia del parásito en el interior del hospedador mamífero por mecanismos aún desconocidos que afectarían a los macrófagos (Rogers et al. 2004)



Figura I-17. Composición de la membrana plasmática de las formas promastigotas y amastigotas en *Leishmania*. Abreviaturas: LPG, lipofosfoglicano; GPI, glicosilfosfatidilinositol; PPG, proteofosfoglicano (Ilgoutz y McConvile, 2001).

Los GPI libres (**GPILs**) son el componente mayoritario de la superficie celular en *Leishmania* tanto en las formas promastigotas como amastigotas, sin cambiar el nivel de expresión dependiendo del estadio de desarrollo del parásito, al contrario de lo que sucede con el resto de componentes. Se ha demostrado su implicación en la evasión de la respuesta inmune del macrófago mediante la adquisición de glicoesfingolípidos por parte del parásito en el interior del macrófago.

Además de los componentes mencionados, a lo largo de la superficie celular podemos encontrar transportadores integrales de membrana como el de

## Introducción

---

hexosas, los de bipterina y folato, el de nucleósidos, el de transferrina y numerosos transportadores de la familia ABC, entre otros.

En cuanto a los lípidos que componen la superficie de *Leishmania*, la principal diferencia es que el esteroles principal es el **ergosterol** (ergosta-5,7, 24-trien-3 $\beta$ -ol) y no el colesterol como ocurre en las células de mamíferos. Debido a la importancia que tiene el ergosterol para los tripanosomátidos, la inhibición de la ruta de síntesis se ha convertido en una estrategia de búsqueda de nuevos fármacos antiprotozoarios (Urbina, 1997).

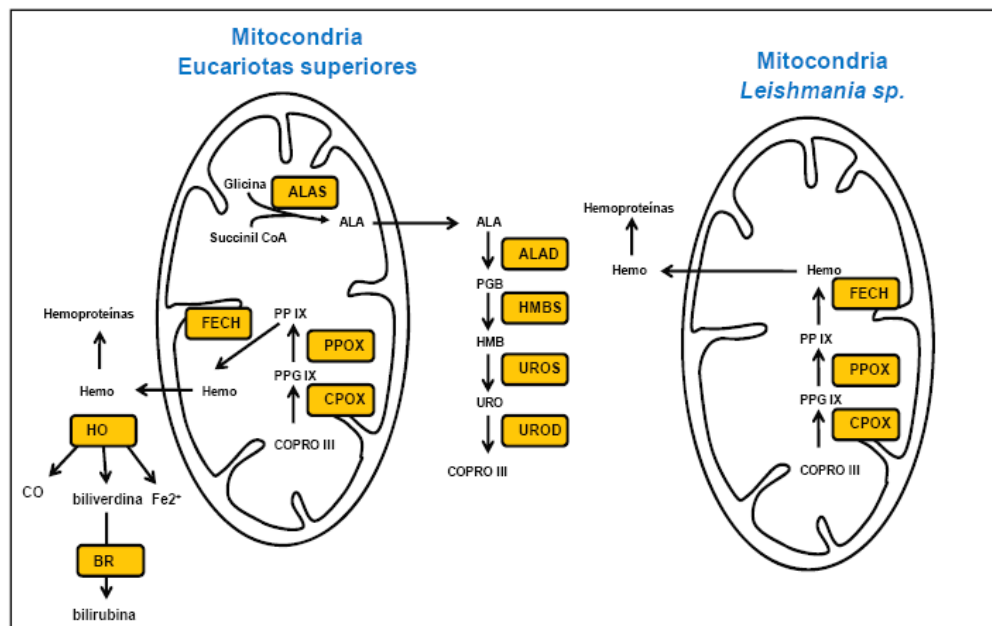
- **Tráfico vesicular:** Los procesos de endocitosis y exocitosis de *Leishmania* se dan en el **bolsillo flagelar**. Mediante esta vía de tráfico vesicular se produce la entrada de nutrientes, la secreción de proteínas al medio extracelular, o la integración de proteínas de membrana en la superficie (Overath et al. 1997). Intervienen distintos orgánulos: (1) El retículo endoplásmico de gran tamaño, (2) el aparato de Golgi, (3) un gran conjunto de vesículas ubicadas entre el retículo endoplásmico y la cara *cis* del aparato de Golgi, y (4) un conjunto de vesículas y elementos tubulovesiculares dispuestos entre la cara *trans* del aparato de Golgi y el bolsillo flagelar que forman la red de vesículas *trans*-Golgi (TGN) (Landfear, 2001). A su vez, existe una estructura tubulovesicular implicada en el tráfico vesicular en *Leishmania* denominada MVT (*multivesicular tubule*), tratándose de un compartimento lisosomal terminal que se extiende desde el TGN, hasta el extremo posterior de la célula (Ilgoutz et al., 1999; Mullin et al., 2001; Weise et al., 2000).

- **Tráfico de hemo:** El hemo es una metaloporfirina que actúa como grupo prostético de proteínas que llevan a cabo funciones esenciales dentro del metabolismo celular.

Los organismos pertenecientes a la familia de los tripanosomatidos (entre ellos *Leishmania*) son auxótrofos para la molécula de hemo, siendo necesaria la captación desde el exterior celular, bien de la molécula de hemo o bien de su



precursor inmediato (protoporfirina IX), para la correcta funcionalidad de hemoproteínas, entre ellas los citocromos (Srivastava et al. 1997; Pal y Joshi-Purandare, 2001; Rao et al. 2005). Se ha demostrado en *Leishmania*, la ausencia de tres de las enzimas necesarias para la síntesis de hemo, en comparación con el resto de eucariotas superiores (Fig. I-18) (Dutta et al. 2008; Sah et al. 2002).



**Figura I-18. Biosíntesis de hemo en eucariotas superiores y *Leishmania sp.*** Ala: ácido 5-aminolevulínico; PBG: porfobilinogeno; HMB: hidroximetilbilano; UROIII: uroporfirinógeno III; COPRO III: Coproporfirinógeno III; PPG IX: protoporfirinógeno III; PP IX: Protoporfirina IX; CO: monóxido de carbono; ALAS: 5-aminovulinato sintetasa; ALAD: 5-amilovulinato deshidratasa; HMBS: hidroximetilbilano sintetasa; UROS: Uroporfirinógeno III sintetasa; UROD: Uroporfirinógeno descarboxilasa; CPOX: Coproporfirinógeno oxidasa; FECH: ferroquelatasa; HO: hemoxigenasa; BR: biliverdina reductasa (Dutta et al., 2008).

La existencia de un transportador específico o receptor para hemo en la membrana plasmática de *Leishmania* se llevaba especulando desde hace tiempo, basándonos en artículos que demostraban la alta afinidad con la que se unía la molécula de hemo a la superficie celular. El hemo posee cadenas aniónicas de carboxilato que limitarían su capacidad para difundir a través de la membrana plasmática, por lo tanto sería necesario un mecanismo de transporte dependiente de energía que translocara el hemo al interior celular (Krishnamurthy et al., 2007). Recientemente se ha descrito en *Leishmania* la proteína LHR1, localizada en la membrana plasmática y en vesículas ácidas, homologa al transportador de hemo



## Introducción

HRG-4 de *Caenorhabditis elegans* que promueve la entrada de Zn-mesoporfirina (análogo fluorescente de hemo) e incrementa el contenido intracelular de hemo (Huynh et al. 2012).

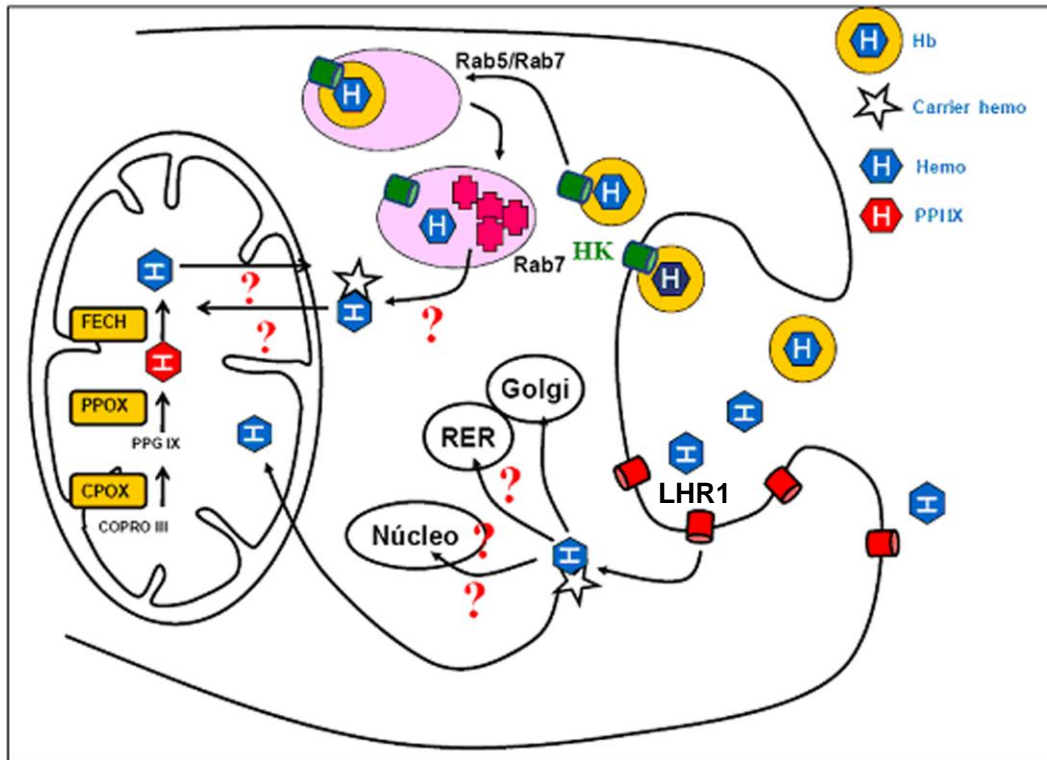


Fig. I-19. Obtención de hemo en formas promastigotas de *Leishmania*. La captación de hemo se realiza a través de dos vías: (1) A partir de la endocitosis de hemoglobina mediada por receptor y su posterior degradación vía Rab5/Rab7, y (2) Entrada de hemo libre a través del receptor LHR1 y distribución a los diferentes orgánulos. Las interrogaciones muestran las vías aun desconocidas en el tráfico de hemo (Galbraith and McElrath, 1988; Patel et al. 2008; Sengupta et al. 1999; Singh et al. 2003).

La captación de hemo puede realizarse también a partir de la molécula de hemoglobina (Hb) presente en el suero (Chang and Chang, 1985), y *Leishmania* la realiza a través de endocitosis mediada por receptor. La molécula de Hb se une a una hexoquinasa de 46 kDa ubicada en el bolsillo flagelar (Krishnamurthy et al., 2005; Sengupta et al., 1999). Posteriormente, la molécula de Hb es endocitada en un proceso mediado por Rab5 (endosomas tempranos) y por Rab7 (endosomas tardíos), (Singh et al., 2003). La ruta endocítica finaliza alcanzando el lisosoma donde será degradada (Patel et al., 2008).

Aún se desconoce cual es la fuente fisiológica de hemo en amastigotes intracelulares de *Leishmania*, bien la Hb, o bien el hemo liberado tras la digestión de Hb y de otras hemoproteínas del hospedador en la vacuola parasitófora del macrófago (Akilov et al. 2007; Kelly et al. 2003).

Una vez en el citoplasma, este metabolito (que probablemente se una a proteínas citosólicas para evitar su toxicidad) se distribuye por distintos orgánulos. En la mitocondria el grupo hemo se incorpora como grupo prostético de los citocromos de la cadena respiratoria. La entrada y salida de hemo de la mitocondria sería a través de transportadores dependientes de energía. Se han descrito en células humanas una serie de transportadores de la familia ABC implicadas en el transporte mitocondrial de hemo. Así, el transportador ABCB6, localizado a nivel de membrana plasmática y membrana mitocondrial realizaría el transporte de porfirinas precursoras de hemo hacia el interior mitocondrial (Krishnamurthy and Schuetz, 2006; Szakacs et al. 2007). ABCB10 está localizado en la membrana mitocondrial interna, y podría estar involucrado en la salida de hemo al espacio intramembranal (Dunn et al., 2007). ABCG2 exporta porfirinas a través de la membrana plasmática y de la membrana interna mitocondrial de algunas células tumorales (Kobuchi et al. 2012). Por otra parte, no se conoce el papel que juegan ABCB7 y ABCB8, localizados en la membrana interna mitocondrial, en el tráfico de porfirinas (Krishnamurthy et al. 2007). Otra proteína involucrada en transporte de hemo en la mitocondria es OGC (2-oxoglutarato carrier), localizada en la membrana mitocondrial interna siendo responsable de la entrada de porfirinas precursoras del hemo desde el espacio intermembranal hacia la matriz mitocondrial (Kabe et al. 2006). En *Leishmania*, nuestro grupo describió que el transportador LABCG5, era necesario para el rescate del hemo proveniente de la Hb.

### **Mecanismos de resistencia a fármacos en *Leishmania***

El fallo terapéutico en la leishmaniasis es frecuente en zonas endémicas. Este hecho depende de múltiples factores tanto por parte del hospedador como del parásito. Por la parte del hospedador mamífero, el fallo terapéutico podría ser atribuido a un tratamiento inadecuado, una alteración en la farmacocinética del fármaco, reinfección o alteración de la respuesta inmunológica (Sundar et al. 2001). Recientemente, se ha descrito una línea resistente a antimonio de *L. donovani* que sobreexpone en su superficie conjugados de N-galactosamina, inductores de un incremento de los niveles de IL-10 aumentando la infectividad de los parásitos y afectando a nivel de la célula hospedadora con la sobreexpresión del transportador MDR1 (ABCB1) que se especula que podría estar implicado en la eliminación de antimonio al exterior celular (Mukherjee et al. 2013). En este sentido, se ha descrito que la infección de *L. panamensis* y el posterior tratamiento con antimoniales regula los niveles de 16 genes implicados en la respuesta a fármacos en la célula hospedadora, entre ellos los más destacados son los que codifican para ABCB6 y metalotioneína-2A. ABCB6 es un transportador de antimonio localizado en la membrana plasmática del macrófago y en la membrana del fagolisosoma (Gómez et al. 2013).

La resistencia a fármacos se define como la disminución de la eficacia de los compuestos sobre poblaciones celulares (parásitos de *Leishmania*) a los que previamente eran susceptibles.

Existen al menos tres mecanismos asociados directamente con la resistencia a fármacos en *Leishmania*:

- Amplificación génica de las enzimas que son dianas sobre las que ejerce su actividad el fármaco, o de las que constituyen una vía alternativa a la inhibida (Papadopoulou et al. 1992).
- Mutaciones que alteran la función en las enzimas sobre las que actúa el compuesto (Arrebola et al. 1994).

- Disminución del nivel intracelular del fármaco a través del eflujo al medio extracelular mediante transportadores (Ponte-Sucre, 2003; Kedzierski, 2009).

Sin embargo, la resistencia farmacológica se considera un fenómeno multifactorial. Se asocia, generalmente, con el incremento de la expresión de proteínas transportadoras similares a MDR1/ABCB1 (multidrug resistance) y a MRP1 (ABCC1 (multidrug resistance-associated protein)) (Ponte-Sucre, 2003), entre otras proteínas. Ambos tipos de transportadores modulan la concentración intracelular del agente quimioterapéutico (Fig. I-20).

En *Leishmania* la resistencia puede ser natural, como la resistencia observada en *L. braziliensis* a ketoconazol o miltefosina, o adquirida, que es la que desarrollan los parásitos expuestos a dosis subóptimas de los fármacos (Croft et al. 2006, 2008, Sánchez-Cañete et al. 2009).

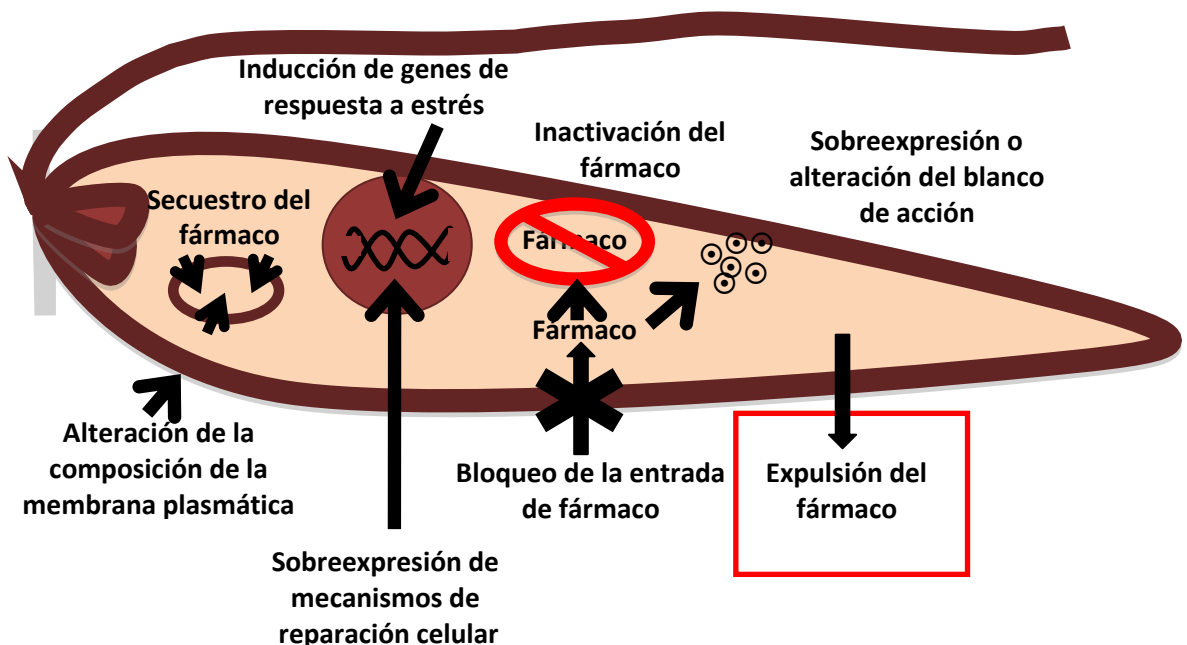


Figura I-20. Representación esquemática de los principales mecanismos de resistencia a fármacos en *Leishmania*.

## Introducción

---

Existen diferentes mecanismos descritos para los diversos fármacos empleados en el tratamiento de la leishmaniasis. Uno de los mecanismos principales de resistencia a los **antimoniales pentavalentes** es la disminución de la concentración activa de fármaco en el interior del parásito. El parásito puede reducir el nivel del fármaco a través de múltiples vías: descenso en la entrada, incremento del eflujo, inhibición de la activación del fármaco, inactivación d del fármaco mediante secuestro (Fig. I-21).

La ruta de **entrada** de los antimoniales (V) no se conoce todavía pero se piensa que entran en la célula por una proteína transportadora de gluconato, ya que se ha observado una inhibición competitiva entre ambos sustratos (Brochu et al. 2003). Existen diferencias en la acumulación entre los antimoniales (V) y (III) en las dos formas del ciclo de vida de *Leishmania* (formas promastigotas y formas amastigotas intracelulares), sugiriendo que la entrada del fármaco se llevaría a cabo por vías diferentes. Se ha identificado en *Leishmania* una aquogliceroporina (AQP1) que media la entrada de antimonio trivalente al parásito (Gourbal et al. 2004). La sobreexpresión de AQP1 produce la hipersensibilidad a antimonio incluso en líneas resistentes clínicas, indicando un papel en la resistencia natural a antimoniales. En aislados clínicos de Nepal resistentes se ha observado una disminución en la expresión del transportador AQP1 (Decuypere et al. 2005).

La forma trivalente del antimonio es muy activa frente a ambas formas del ciclo de vida del parásito, mientras que el antimonio pentavalente es activo únicamente frente a la forma intracelular. De esta manera, se acepta de forma general la necesidad de que la forma pentavalente del fármaco sea **reducida**, y por tanto activada a la forma trivalente. El lugar exacto (macrófago o amastigote) donde se produce la reacción de reducción no está claro todavía, de hecho existen estudios que aseguran que determinados amastigotes axénicos son capaces de realizar la reducción de Sb (V) mientras que los promastigotes serían incapaces (Shaked-Mishan et al. 2001); sin embargo, otros estudios indican que este proceso de reducción tiene lugar en el interior del macrófago (Sereno et al.

1998). Existen dos vías aceptadas por las que se produce la reducción del fármaco: una vía no enzimática llevada a cabo gracias a la acción del glutatión (GSG) y tripanotión reducido ( $T(SH)_2$ ) y una vía enzimática en la que estaría implicada una enzima específica del parásito denominada TDR1 (Thiol-dependent reductase I) (Ashutosh et al. 2007). La pérdida de esta actividad resultaría crucial en la aparición de resistencias.

Otro mecanismo de resistencia al antimonio implicaría el **eflujo del fármaco** o su derivado activo fuera del interior celular. Hay dos tipos de transportadores pertenecientes a la familia ABC (ATP binding cassette) conocidos e involucrados en fenómenos de resistencia en cáncer: el transportador tipo MDR1/glicoproteína-P (P-gp) y el transportador tipo MRP (Multi-Drug Resistance Protein). La sobreexpresión de la P-gp en *Leishmania* confiere resistencia a daunorubicina y vinblastina, pero no se ha observado ninguna relación con el antimonio (Ouellette et al. 2001); de todas maneras se ha descrito su sobreexpresión en la membrana del macrófago pudiendo estar implicado a este nivel (Mookerjee et al. 2008). Sin embargo, una proteína del grupo MRP, denominada MRPA (o PGPA) estaría involucrada en la resistencia a antimoniales mediante el secuestro de conjugados metal-tiol en el interior de vesículas próximas al bolsillo flagelar (Legare et al. 2001) y no mediante su eflujo directo a través de la membrana plasmática del parásito. Se ha observado la sobreexpresión de este transportador tanto en líneas resistentes generadas en laboratorio como en aislados clínicos de pacientes con resistencia a los antimoniales. Un segundo transportador (PRP1) de la familia ABC se ha visto implicado en la resistencia a antimonio (Coelho et al. 2003). Finalmente, se ha propuesto la existencia de un transportador, aún desconocido, que exportaría complejos metal-tiol a través de la membrana plasmática.

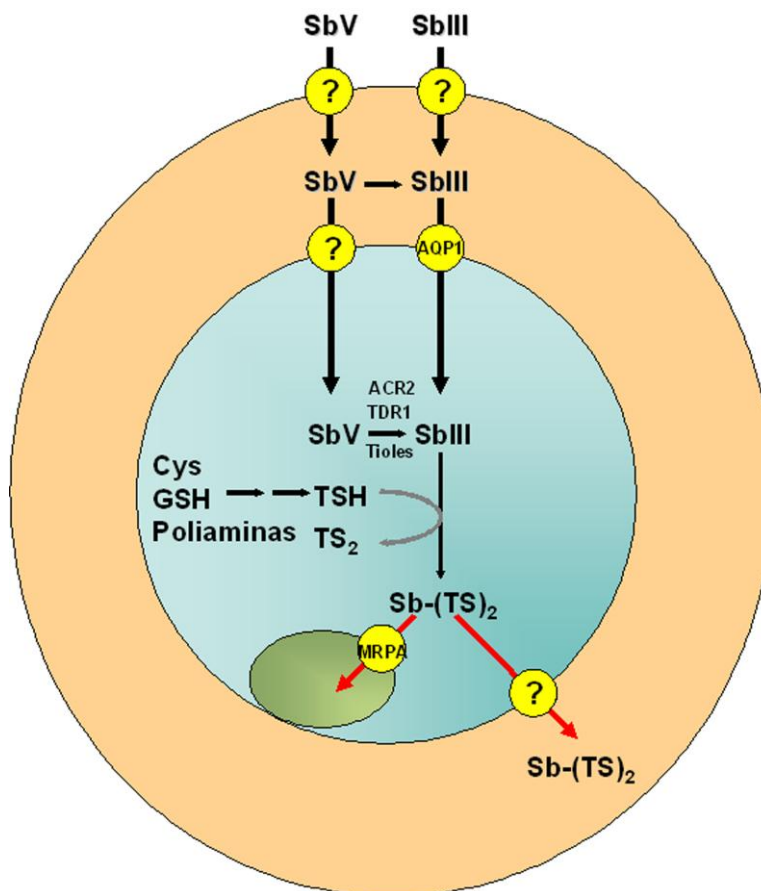
El **metabolismo de los tioles** juega un papel central en la defensa contra el daño causado por el estrés oxidativo producido por xenobióticos y metales pesados. Líneas de *Leishmania* mutantes obtenidas en el laboratorio resistentes a arsenito y antimoniales muestran incrementos muy significativos de los niveles

## Introducción

---

de tioles intracelulares: cisteína, GSH, espermidina y  $T(SH)_2$ . Se ha observado que están amplificadas en líneas resistentes los genes que codifican para las enzimas implicadas en la formación de los precursores del tripanotión, GGCS ( $\gamma$ -glutamylcystein sintetasa) y ODC (ornitina descarboxilasa), (Ashutosh et al. 2007). además, inhibidores específicos como BSO (L-buionina-(SR)-sulfoximina) y DMFO (DL- $\alpha$ -difluorometilornitina) son capaces de revertir dicha resistencia. El uso de estos revertidores produce reversión de la resistencia en aislados clínicos de *Leishmania* en la India (Carter et al. 2003). Igualmente, modificaciones en el citoesqueleto y la sobreexpresión de algunas proteínas de choque térmico han sido otros de los efectos observados en aislados clínicos de *Leishmania* resistentes a los antimoniales.

A







## Introducción

La mayor expresión de la enzima C-24- $\Delta$ -esterol metiltransferasa y la reducción de ergosterol y sustitución por colest-5,7,24-trien-3 $\beta$ -ol en la membrana provocan una disminución en la afinidad de la anfotericina B disminuyendo su acumulación. Adicionalmente, se observó que esta línea resistente presentaba un aumento en la expresión de P-gp, el cual exportaría anfotericina B al exterior celular, una sobreexpresión de las enzimas de la cascada de las triparredoxinas y un mayor nivel de tioles intracelulares (Purkait et al. 2012). A nivel clínico, se han observado algunas recaídas en algunos pacientes tratados con la versión liposomal del fármaco, especialmente en pacientes infectados con VIH (Ouellette et al. 2013). Previamente, ya se ha descrito que la posibilidad de obtener líneas mutantes resistentes *in vitro* a anfotericina B, observándose un cambio en la composición lipídica de la membrana plasmática (Mbongo et al. 1998) (Fig. I-22).

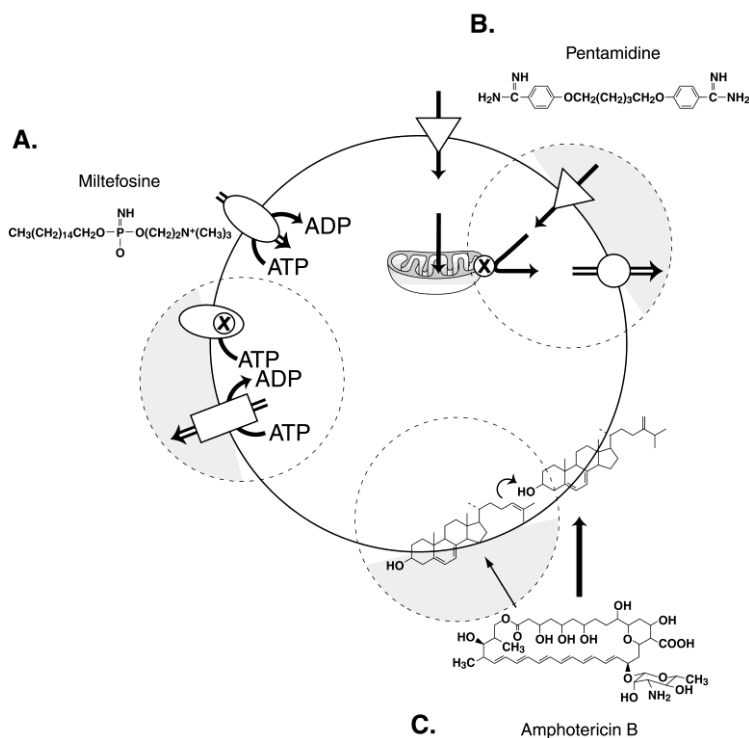


Figura I-22. Esquema de los mecanismos de resistencia a miltefosina, pentamidina y anfotericina B en *Leishmania*. (A) Miltefosina; (B) Pentamidina; (C) Anfotericina B.

En la resistencia a **miltefosina**, los mecanismos observados en parásitos mutantes resistentes obtenidos *in vitro* incluyen una reducción en la entrada del fármaco, cambios en la permeabilidad de la membrana, un metabolismo del

fármaco más rápido y un mayor eflujo del mismo (Fig. I-22) (Perez-Victoria et al. 2003; Seifert et al. 2003). La menor acumulación del fármaco se debe fundamentalmente a la presencia de mutaciones puntuales inactivantes en la proteína LdMT (una aminofosfolípido translocasa [P4-ATPasa] que forma parte del complejo del transportador de miltefosina) impidiendo la correcta translocación del fármaco desde la cara externa a la cara interna de la membrana plasmática. A su vez, la reducción en la expresión de LdRos3 (la subunidad no catalítica de LdMT, perteneciente a la familia CDC50), también produce resistencia al fármaco (Pérez-Victoria et al. 2003; Pérez-Victoria et al. 2006; Sánchez-Cañete et al. 2009). La sobreexpresión de la P-gp de *Leishmania* confiere resistencia cruzada a miltefosina en líneas resistentes a daunomicina (Perez-Victoria et al. 2001), siendo bloqueada la resistencia mediante el empleo de revertidores específicos del transportador, revelando que existe una correlación entre la resistencia y menor acumulación del fármaco debido a un mayor eflujo. Finalmente, se ha demostrado que existe una relación entre el eflujo de miltefosina y otras proteínas de la familia de los transportadores ABC (ABCG4 y ABCG6) en *L. infantum* (Castanys-Muñoz et al. 2007; 2008).

En relación a la **paramomicina**, los estudios experimentales en promastigotes y amastigotes axénicos de *L. donovani* resistentes a paramomicina han mostrado que uno de los posibles mecanismos de resistencia está asociado con una significativa reducción en la acumulación del fármaco, aunque de momento se desconoce el mecanismo molecular (Maarouf et al. 1998; Jhingran et al. 2009; Chawla et al. 2011).

En parásitos resistentes a **pentamidina**, el fármaco no se acumula en la mitocondria, y la fracción que se encuentra en el citosol es rápidamente transportada al exterior celular (Basselin et al. 2002). No se han observado fenómenos de amplificación génica en aislados clínicos resistentes, pero se piensa que el transportador PRP1 (ABCC7) localizado en vesículas, estaría

implicado en la expulsión de la pentamidina fuera del parásito (Fig. I-22) (Coelho et al. 2003).

Recientemente, se ha demostrado *in vitro* la posibilidad de generar líneas resistentes de *L. donovani* a las diferentes **combinaciones de fármacos**: anfotericina B más antimoniales, o miltefosina, o paromomicina; miltefosina más paromomicina; y antimoniales más paromomicina (García-Hernández et al. 2012).

Los mecanismos generales observados en todas las líneas resistentes consistieron: en un aumento en los niveles totales de tioles intracelulares, y en el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial y de los niveles de ATP. Los niveles de resistencia obtenidos fueron menores en las combinaciones que tenían anfotericina B (García-Hernández et al. 2012).

## **TRANSPORTADORES ABC**

Los transportadores ABC (ATP-binding cassette) constituyen una de las mayores familias de proteínas a lo largo de toda la escala biológica, y desempeñan una gran diversidad de funciones. Fueron descubiertos y estudiados por primera vez en bacterias, pero pronto se encontró que este sistema de transporte se hallaba a lo largo de todas las especies, desde procariontes hasta humanos, siendo proteínas muy ubicuas. Muchas proteínas ABC son de relevancia médica debido a su relación con enfermedades de origen genético, bien por mutaciones puntuales o bien por la modificación en la expresión de éstas. Los transportadores ABC juegan un papel fundamental en la detoxificación celular, y se ha descrito que están asociados con el fenotipo MDR (multidrug resistance) descrito en células cancerígenas y en numerosos microorganismos patógenos (Higgins, 1992, Choi y Yu, 2013).

Las proteínas de la familia ABC están involucradas en numerosas actividades fisiológicas aunque normalmente están implicadas en el transporte de moléculas (sustratos) a través de las membranas biológicas en contra de altos gradientes de

concentración mediante la hidrólisis de ATP. Los sustratos conocidos que transportan son estructuralmente diversos, encontrando entre ellos lípidos, esteroides, péptidos, iones, metales pesados, toxinas, nucleótidos, carbohidratos, fármacos, etc. No todas las proteínas ABC actúan como transportadores, algunas pueden intervenir como reguladores de procesos celulares (Zolnerciks et al. 2011).

Según las diferentes arquitecturas estructurales y el sentido del transporte de los sustratos, encontramos tres tipos de transportadores ABC: Importadores ABC de tipo I, Importadores ABC de tipo II y Exportadores ABC. Los **importadores** son fundamentalmente procarióticos y su principal función es la de proporcionar nutrientes esenciales para la bacteria. Los **exportadores** se encuentran tanto en procariotas como en eucariotas, y participan en el eflujo de diferentes compuestos. Igualmente, la localización de estas proteínas en la célula es muy amplia, encontrándose en membrana plasmática, peroxisomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, mitocondrias y vesículas intracelulares, lo que explica su participación en una gran variedad de actividades biológicas.

### **Organización estructural de los transportadores ABC**

La estructura típica de un transportador ABC la constituyen cuatro dominios que juntos forman la unidad mínima funcional necesaria para que pueda producirse el transporte; específicamente, contienen dos **dominios** hidrofóbicos de **transmembrana (TMD)** que forman la vía de translocación a través de la membrana, y dos **dominios de unión a nucleotidos (NBD)** que utilizan la energía liberada por la unión e hidrólisis del ATP para realizar el transporte del sustrato en contra de un gradiente. Estos cuatro dominios pueden expresarse como péptidos independientes, como pares de dominios o como una sola proteína. Los transportadores ABC pueden estar codificados en eucariotas como *full-transporters* (configuración TMD-NBD-TMD-NBD o NBD-TMD-NBD-TMD) o como *half-transporters* (configuración TMD-NBD o NBD-TMD) que deberán

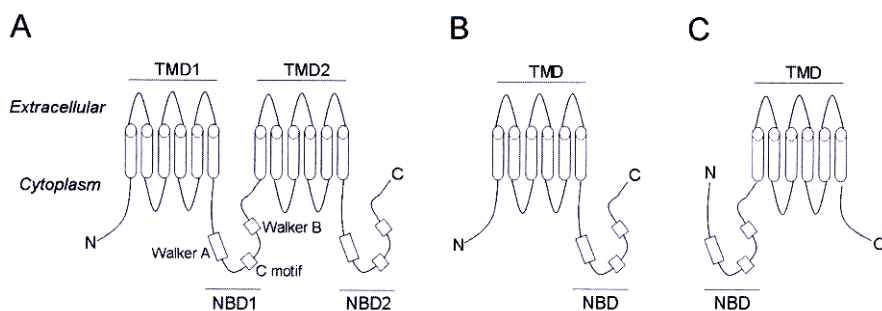
homo- o heterodimerizar para crear una unidad funcional (Fig. I-23). Algunas proteínas ABC eucariotas no poseen dominios TMD en su estructura, estando relacionadas con funciones reguladoras no asociadas al transporte. En otros transportadores ABC, el núcleo formado por los cuatro dominios típicos se ve aumentado con dominios adicionales que añaden funcionalidad al transportador. Por ejemplo, los importadores ABC de procariontes requieren un dominio específico SBP (solute-binding protein), presente en el periplasma de bacterias Gram negativa para unir el sustrato con alta afinidad y transportarlos hasta el complejo de transporte. La proteína humana CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (ABCC7) implicada en la enfermedad de la fibrosis quística tiene también un dominio extra (R) que sirve para regular la actividad de canal de cloro de la CFTR (Zolnerciks et al. 2011; Higgins, 1992).

Los **dominios NBD** de los diferentes transportadores ABC comparten un alto grado de identidad en sus secuencias aminoacídicas, hallándose siete motivos conservados: **Walker A** (GXXGXGKS/TS/T, donde X es cualquier aminoácido), **Walker B** (h<sub>4</sub>DE/D, donde h corresponde a un residuo hidrofóbico) ambos esenciales para la correcta hidrólisis del ATP; el tercer dominio conocido como el **motivo sello o C** de la familia de transportadores ABC que lleva la secuencia consenso LSGGQ, es característico y exclusivo de las proteínas ABC. Otros motivos conservados son los *loops* A- (supuestamente implicado en la interacción con el anillo de adenina del ATP), Q-, D- y H-. La integridad de estos dominios es esencial para la función de los transportadores ya que se han descrito mutaciones en los NBDs de varios transportadores que inhiben su actividad. Sin embargo, el ATP no es el único sustrato de estos transportadores, puesto que se ha visto que pueden utilizar otros nucleótidos (Zolnerciks et al. 2011). Por ejemplo, CFTR utiliza GTP (Randak et al., 1996), y el NBD1 de ABCR/ABCA4 funciona como una nucleotidasa general (Biswas, 2001).

Los **dominios transmembrana** (TMD) están constituidos por varios segmentos de tipo  $\alpha$ -helice (MSH) que atraviesan la membrana. El número y longitud de estos MSH varía dependiendo de cada transportador, aunque la

estructura típica la constituyen 6 segmentos. Los TMD frecuentemente son muy diferentes entre los distintos transportadores ABC, y están implicados en la especificidad del sustrato. De esta manera, hay muchos transportadores ABC altamente especializados, reconociendo y transportando un número muy limitado de sustratos, mientras que otros son altamente promiscuos en su reconocimiento y transporte de sustratos, como por ejemplo la proteína ABCB1. Los determinantes de esta especificidad todavía no están claros, pero se ha observado que mutaciones en los TMDs pueden cambiar la selectividad del transportador por el sustrato (Zhou et al., 1999; Maeno et al. 2009).

El tamaño y la hidrofobicidad de las proteínas ABC ha condicionado significativamente el avance en la resolución de sus **estructuras tridimensionales**. El primer transportador ABC completo que se pudo estudiar mediante cristalización fue el importador de vitamina B12 en *E. coli* (BtuCD), en 2002. En 2006, se obtuvo la estructura completa de un exportador ABC, Sav1866 de *Staphylococcus aureus* (Dawson et al. 2006). Desde entonces, se han podido estudiar una variedad muy completa de transportadores ABC. Sav1866 es una proteína homóloga a ABCB1 humana, de la que todavía no se ha obtenido su estructura cristalina (si se ha conseguido para ABCB1a en *Mus musculus*) (Zolnerciks et al. 2011; Rosenberg et al., 2005). Sav1866 cristalizó con sus dominios NBD en forma de dímero cerrado con ADP en ambos bolsillos NBD, y con una cavidad formada por los dominios transmembrana que se abría al exterior celular, describiendo una forma de “V” regular. Las dos subunidades presentan un giro considerable una sobre otra, con lo que tanto los TMDs como los NBDs se encuentran interaccionando muy cercanos en el espacio. Los **cambios conformacionales** generados por la unión e hidrólisis del ATP se transmiten desde los NBDs a los TMDs a través de interacciones no covalentes en la superficie de contacto entre los lazos intracelulares y los NBDs. De hecho, la mayoría de los residuos que conforman esa región se encuentran muy conservados entre las proteínas ABC. Por otro lado, el cristal obtenido de ABCB1a describe una “V” invertida con los dominios NBD totalmente separados (siendo esta estructura muy controvertida) (Zolnerciks et al. 2011).



**Figura I-23. Organización estructural de los transportadores ABC.** Las  $\alpha$ -helices transmembrana se muestran como cilindros. Los dominios Walker A, Walker B y el motivo C se muestran como cajas. (A) Los transportadores de las subfamilias ABCA, ABCC y parte de la ABCB contienen dos TMDs fusionados a dos NBDs (TMD1-NBD1-TMD2-NBD2), topología típica de un *full transporter*. (B) Transportador ABC *half-transporter* con el dominio NBD en el extremo carboxilo terminal. (C) Transportador ABC *half-transporter* con el dominio NBD en el extremo amino terminal (Zolnerciks et al. 2011).

## Mecanismo de acción de los transportadores ABC

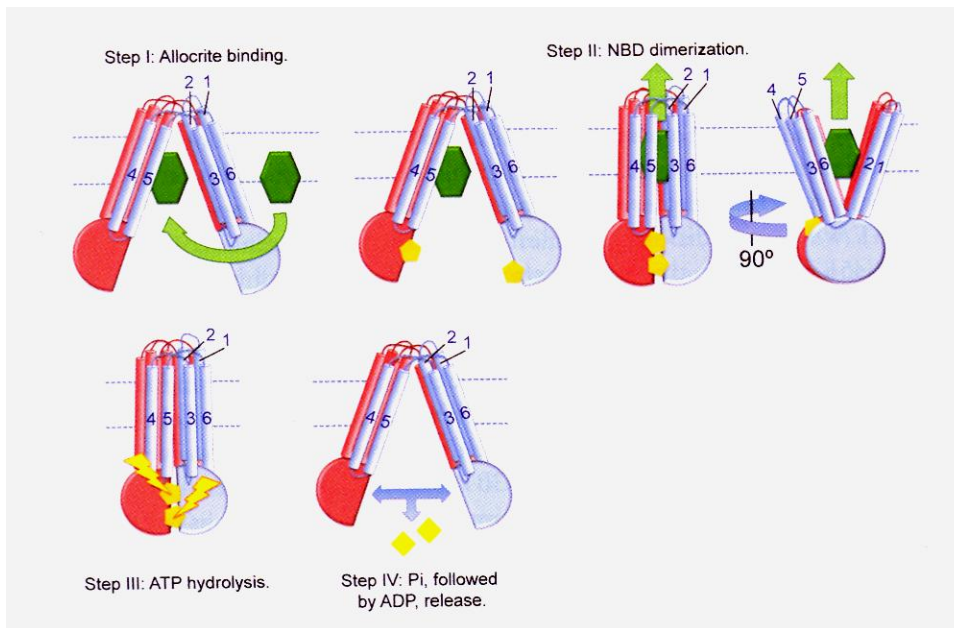
Si asumimos la veracidad de los modelos estructurales de ABCB1a y Sav1866, el modelo de transporte se puede resumir en cuatro pasos (Zolnerciks et al. 2011) (Fig. I-24):

- Paso I: El ciclo de transporte se inicia con la unión del sustrato con alta afinidad a un bolsillo de la cara interior de la membrana interna. En ausencia del sustrato, los NBDs no están dimerizados.
- Paso II: Una vez unido el sustrato, los NBDs dimerizan en presencia de dos moléculas de ATP y se genera un bolsillo de baja afinidad al sustrato. Se ha demostrado que la unión de un análogo de ATP no hidrolizable a ABCB1 desciende su afinidad por vinblastina aunque su capacidad de transporte sigue siendo la misma, sugiriendo que la unión de los nucleótidos y no la hidrólisis de los mismos es suficiente para realizar el transporte del sustrato (por ejemplo un fármaco). Estudios adicionales

realizados en el exportador bacteriano LmrA, corroboran el modelo del bolsillo interior de alta afinidad por el sustrato y el bolsillo de baja afinidad dirigido al espacio extracelular. Los detalles mecánicos de la formación del “cierre” de los dos dominios NBD todavía se desconoce, siendo particularmente difícil de entender con la estructura propuesta para ABCB1a, debido a la cantidad de cambios conformacionales que tendría que dar lugar para llegar a la situación de su homóloga Sav1866.

- Paso III: La hidrólisis del ATP inicia la disociación del dímero NBD-NBD. Se ha hipotetizado que la liberación del sustrato provocaría un cambio conformacional en las TMDs, que sería transmitido a los NBDs, dirigiendo la hidrólisis de ATP. ABCB1 requiere ambos NBDs para catalizar la hidrólisis de ATP, sin embargo la hidrólisis no parece ser simultánea en ambos NBD pero se ha sugerido que dos moléculas de ATP son hidrolizadas por cada ciclo de transporte. Algunos transportadores ABC como ABCB2/3 (TAP1/2) y CFTR probablemente solo hidrolizan una molécula de ATP por cada transporte. La hipótesis más simple para la necesidad de una o dos moléculas de ATP es la de la necesidad de energía necesaria para provocar el cambio conformacional y romper el dímero NBD-NBD.
- Paso IV: Liberación de ADP y Pi, restaurando el estado inicial del transportador. Después de la hidrólisis del ATP, se libera en primer lugar el Pi como se demuestra de la habilidad del vanadato de captar ADP del bolsillo del transportador en un estado post-hidrolítico. Seguidamente, se libera el ADP. En una proteína ABC no transportadora MutS (implicada en reparación del DNA), se retiene al menos una molécula de ADP hasta que la unión con el DNA provoque un cambio conformacional, reemplazándose el ADP por ATP.





**Figura I-24. Modelo propuesto para el ciclo de transporte de un transportador ABC. Los TMDs se muestran como cilindros atravesando la membrana (línea azul punteada), mientras que los NBDs se muestran como semicírculos (Zolnerciks et al. 2011).**

La actividad de las proteínas ABC puede estar regulada por el nivel de **fosforilación** de la proteína. Fosforilaciones en la región de unión entre ambas mitades de la Pgp pueden modular la interacción con ciertos sustratos (Szabo et al. 1997). La proteína CFTR (cystic fibrosis transmembrane regulador) está regulada por proteínas kinasas y fosfatasa. La actividad del canal CFTR aumenta unas 100 veces tras la fosforilación. El dominio regulador posee numerosos sitios susceptibles de ser fosforilados por PKA (Gadsby et al., 2006).

## **Clasificación de la familia de transportadores ABC**

En base a la homología en las secuencias de los NBDs de los transportadores ABC en organismos eucariotas, las proteínas ABC han sido clasificadas en 8 subfamilias (ABCA-ABCH), existiendo una subfamilia extra tanto en plantas (Kang et al. 2011) como en el parásito *Leishmania* (Leprohon et al. 2006; Manzano et al. 2013) denominada ABCI .

Actualmente se conocen 49 genes que codifican para proteínas ABC en el genoma humano. Estos transportadores se han dividido en 7 subfamilias (ABCA-ABCG) mediante análisis filogenético. Se ha asociado la modificación (mutación o expresión) en 18 transportadores ABC con el desarrollo de enfermedades genéticas recesivas (Dean, 2006). Enfermedades genéticas severas como son la fibrosis quística, la adrenoleucodistrofia, la colestasis hepática, la distrofia macular de Stargardt o la enfermedad de Tangier, están producidas por mutaciones en genes ABC.

### **Transportadores ABC en *Leishmania***

El uso combinado de búsquedas sistemáticas en BLAST contra el genoma de *L. major* ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)), empleando la secuencia del motivo sello de la familia de proteínas ABC como clave, permitió hallar 42 ORFs que podrían ser asignados a la superfamilia ABC, representando el 0,5 % del número total de genes (aproximadamente 8.300) en *L. major*. Otros dos tripanosomátidos relacionados con *Leishmania*, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*, tienen un número menor de proteínas ABC (28 y 22, respectivamente), indicando que la familia de genes ABC en *Leishmania* está expandida (Sauvage et al. 2009). De estos 42 genes, 32 codifican para proteínas intrínsecas de membrana y 10 para proteínas ABC sin segmentos TMD. Dependiendo de la homología en las secuencias de los dominios TMD y NBD, los transportadores ABC en *Leishmania* se agrupan en 8 subfamilias (ABCA-ABCH), existiendo una subfamilia extra denominada como “otros” (Leprohon et al. 2006). Hasta la fecha se han estudiado transportadores ABC de las subfamilias ABCA, ABCB, ABCC y ABCG (Fig.I-25).

### **Subfamilia ABCA**

Esta subfamilia se compone de 10 miembros en *L. major*, con la organización estructural típica TMD-NBD-TMD-NBD. Dos miembros de esta subfamilia han

## Introducción

sido caracterizados por nuestro grupo. ABCA4 (LtrABCA2) se encuentra localizado en el bolsillo flagelar y en vesículas internas, mientras que ABCA8 (LtrABC1.1) se encuentra localizado en bolsillo flagelar y membrana plasmática (Araujo-Santos et al. 2005; Parodi-Talice et al. 2003). Ambos están implicados en el tráfico de fosfolípidos y su sobreexpresión reduce la infectividad de los parásitos. Sin embargo, la sobreexpresión de estos transportadores no confiere resistencia a fármacos.

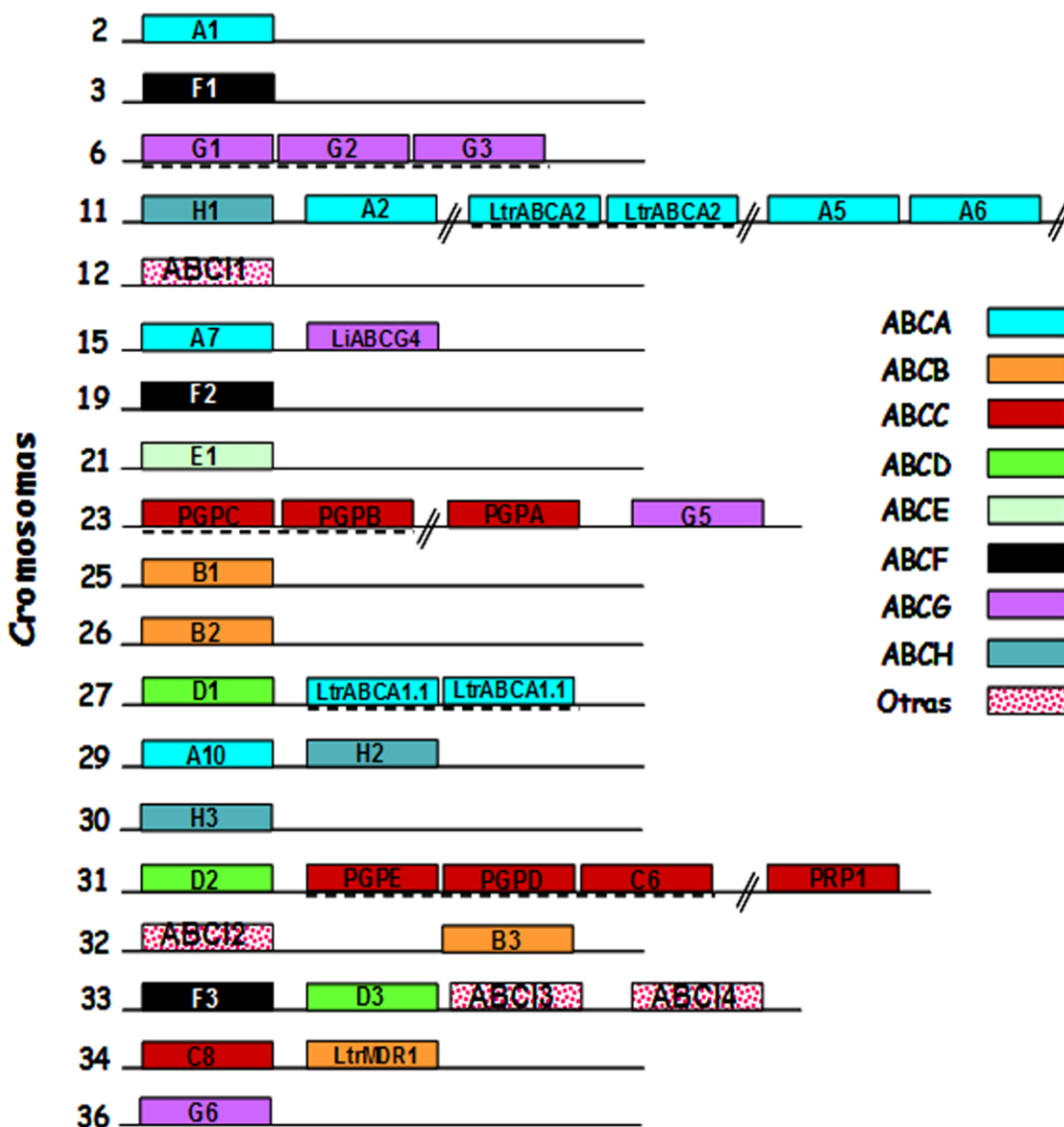


Figura I-25. Localización cromosómica de los genes que codifican proteínas ABC en *Leishmania*. Los cromosomas aparecen representados por líneas horizontales, y los genes ABC, como rectángulos coloreados. Una línea discontinua debajo de los genes, representa genes agrupados en tándem. Las líneas inclinadas en los cromosomas separan miembros de una misma familia que no están en el mismo locus. Adaptado de (Lephrohon et al. 2006).

### Subfamilia ABCB

Esta subfamilia la constituyen 4 miembros, dos de ellos son *full-transporters* (ABCB4 y ABCB2) y otros dos son *half-transporters* (ABCB1 y ABCB3), desconociéndose aún su función. El transportador ABCB4 de *Leishmania* es una proteína homóloga a la Pgp/MDR1 humana y se ha encontrado sobreexpresada en al menos 5 líneas resistentes a vinblastina y daunorubicina, con resistencia cruzada a su vez con fármacos hidrofóbicos como puromicina, adriamicina y doxorubicina. El interés clínico de esta proteína surgió cuando se demostró que ABCB4 de *Leishmania tropica* (LtMDR1) confería resistencia a fármacos leishmanicidas como miltefosina y edelfosina (Perez Victoria et al. 2001). A su vez, se observó en *L. enrietti* que el número de copias de ABCB4 se encontraba directamente relacionado con la acumulación de pentamidina. Se propuso que, ABCB4 sería el responsable de importar pentamidina al interior de la mitocondria, y la resistencia a la misma sería debido a una menor actividad del transportador, siendo el mecanismo de resistencia observado diferente de los típicos mediados por Pgp en mamíferos.

ABCB2 es el segundo transportador caracterizado con una estructura tipo Pgp, confiere resistencia a 5-fluorouracil disminuyendo la acumulación de este, sugiriendo su implicación en la extrusión de xenobióticos (Katakura et al. 2004).

### Subfamilia ABCC

Compuesta por 8 miembros. El primer gen caracterizado de esta subfamilia fue ABCC3 (PGPA o MRPA), y se localizó originalmente en un elemento de DNA extracromosómico, amplificado en una línea de *L. tarentolae* resistente a metotrexato (Ouellette et al. 1990). ABCC3 se encuentra amplificado frecuentemente en líneas de *L. major* resistentes a antimoniales y a arsenito. El nivel de resistencia conferido mediante la sobreexpresión de ABCC3 es diferente dependiendo de la especie de *Leishmania*, lo que sugiere que ABCC3 requiere de otros factores para conferir altos niveles de resistencia como niveles elevados

## Introducción

---

de tripanotión. ABCC3 se localiza en la membrana de vesículas intracelulares próximas al bolsillo flagelar, sugiriendo que la resistencia a metales proviene del secuestro de conjugados metal-tiol.

Recientemente, se ha demostrado que los transportadores ABCC4, ABCC5 y ABCC7 se encuentran asociados con fenotipo de resistencia a antimoniales en líneas con alto contenido en T(SH)<sub>2</sub>, sugiriendo su implicación en el transporte de conjugados antimonio-tiol (Leprohon et al. 2009). La sobreexpresión de ABCC7 (PRP1) también confiere resistencia a pentamidina, secuestrando la pentamidina en vesículas que posteriormente serán exocitadas a través del bolsillo flagelar (Coelho et al. 2006). También se ha descrito que la sobreexpresión de ABCC2, ABCC6 y ABCC8 no confieren resistencia a antimoniales (Leprohon et al. 2009). Finalmente, el transportador ABCC9 puede que no sea funcional porque no mantiene los motivos de unión a ATP (Légaré et al. 2009).

## Subfamilia ABCG

Constituida por 6 miembros, esta subfamilia ha sido ampliamente estudiada y caracterizada por nuestro grupo. ABCG2, se localiza en vesículas intracelulares próximas al bolsillo flagelar, y se ha observado mediante la técnica de dominante negativo la implicación de este transportador en la translocación de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática, afectando a su vez a la virulencia de los parásitos (Campos-Salinas et al. 2013). ABCG4, se encuentra localizado en la membrana plasmática, y está implicado en la translocación de análogos de fosfatidilcolina, confiriendo también resistencia a alquilfosfolípidos (miltefosina, edelfosina) (Castanys-Muñoz et al. 2007). ABCG5, se localiza en vesículas cercanas al núcleo y al bolsillo flagelar estando implicado en el transporte intracelular de hemo (Campos-Salinas et al. 2011). ABCG6 se encuentra localizado en la membrana plasmática, y se cree que está implicado en el tráfico de fosfolípidos ya que su sobreexpresión reduce los niveles de

fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, confiriendo resistencia a sitamaquina, miltefosina y camptotecina (Castanys-Muñoz et al. 2008).

En *Leishmania*, existe un grupo de genes que codifican para proteínas ABC que se encuentran sin clasificar entre las subfamilias ya establecidas (ABCA-H). Este grupo denominado como “others” que incluye cuatro transportadores con un porcentaje de homología muy bajo con respecto a otras proteínas ABC eucariotas, pero que poseen a su vez genes ortólogos en *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi* (Leprohon et al. 2006).

ABC (Alias)	Leishmania sp.	Fármacos	Localización celular
ABCB2 (MDR2)	L. amazonensis	5-fluorouracilo	Bolsillo flagelar y túbulos multivesiculares asociados a lisosoma
ABCB4 (MDR1)	L. amazonensis, L. enrieti, L. donovani, L. tropica	Vinblastina, puromicina, daunomicina, miltefosina, edelfosina	Aparato de Golgi, Retículo endoplásmico, túbulos multivesiculares asociados a lisosoma y mitocondria
ABCC3 (PGPA/MRPA)	L. major, L. tarentolae, L. infantum	Antimonio trivalente, pentavalente, arsenito	Vesículas entre el núcleo y el bolsillo flagelar
ABCC4	L. infantum	Antimonio trivalente	Compartimento tubular orientado a lo largo del eje longitudinal del parásito
ABCC5	L. infantum	Antimonio trivalente	Compartimento tubular orientado a lo largo del eje longitudinal del parásito
ABCC7 (PRP1)	L. major	Pentamidina, antimonio trivalente	Vesículas intracelulares
ABCG4	L. infantum	Miltefosina, edelfosina, sitamaquina	Membrana plasmática y bolsillo flagelar
ABCG6	L. donovani, L. infantum	Camptotecina, miltefosina, cloroquina, sitamaquina	Membrana plasmática y bolsillo flagelar

**Tabla I-1. Proteínas ABC de *Leishmania* implicadas en la resistencia a fármacos. Adaptado del capítulo del libro Drug Resistance in *Leishmania* parasites (Coelho y Cotrim, 2013).**

### **Revertidores de la resistencia a fármacos mediada por transportadores ABC en *Leishmania***

La continua aparición de resistencias a los fármacos de primera línea empleados en los tratamientos frente a leishmaniasis, hace necesario el desarrollo de fármacos nuevos leishmanicidas o de compuestos que restauren la eficacia de los fármacos empleados revirtiendo los mecanismos de resistencia a los mismos. Entre los diferentes mecanismos de resistencia identificados, el tráfico de los fármacos a través de las membranas juega un papel fundamental disminuyendo la concentración intracelular en las localizaciones diana de los mismos. Los transportadores ABC proveen la base de resistencia a múltiples fármacos en células cancerígenas de mamíferos, además de en levaduras patógenas, hongos, parásitos y bacterias. La inhibición de la actividad de proteínas ABC representa una estrategia de gran interés en el control de la resistencia a fármacos (Pradines, 2013).

Se han descrito numerosos compuestos que revierten *in vitro* la resistencia a múltiples fármacos en células cancerígenas y en *Leishmania*:

- **Verapamil:** Es un bloqueante de canales dependientes de voltaje tipo L, y revierte eficazmente el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos en células de mamífero, bacterias y parásitos. Es un inhibidor de la Pgp humana (ABCB1) (Matsson et al. 2009). Se ha demostrado que incrementa la actividad del antimonio *in vitro* en *L. donovani* (Neal et al. 1989), y es eficaz revirtiendo la resistencia a antimonio y a arsenito mediada por la sobreexpresión de algunas proteínas tipo Pgp y MRP en *L. tarentolae* y *L. donovani* (BoseDasGupta et al. 2008). También se ha descrito la reversión de la resistencia a estibogluconato de sodio en aislados clínicos resistentes (Valiathan et al. 2006). A su vez, el verapamil mejora la entrada de la pentamidina mediada por ABCC7 (PRP1) en algunas especies de *Leishmania*.

- **Derivados de fenotiazina:** Las fenotiazinas y reserpinas son inhibidores de calmodulina, pudiendo revertir la resistencia a fármacos en células de mamífero, bacterias y parásitos; entre ellas, la clorpromazina es un inhibidor de la Pgp humana. Se ha observado un efecto sinérgico entre la clorpromazina y la meglumina de antimonio en parásitos resistentes de *L. donovani* y *L. major*. A su vez, estos derivados inhiben la actividad de la tripanotión reductasa, que desempeña un papel fundamental en la función de transporte tipo MRP, disminuyendo los niveles de tripanotión reducido (Essodaigui et al. 1999). Al igual que el verapamil, mejora la entrada de pentamidina en las líneas resistentes (Basselin et al. 2002). Sin embargo, la toxicidad de estos derivados ha detenido la investigación sobre su potencialidad como agentes revertidores.
- **Flavonoides:** Este grupo lo constituyen flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavanonas y chalconas (Perez-Victoria et al. 2002). Se han identificado más de 6.500 flavonoides diferentes a partir de muestras de plantas, y son un grupo muy prometedor en la resistencia a fenotipos de resistencia a múltiples fármacos en *Leishmania*. Estos se unen a los dos dominios NBDs de los transportadores ABC, causando la inhibición del eflujo y revirtiendo la resistencia a daunomicina en *L. tropica* (Perez-Victoria et al. 1999a).

La quercetina (una flavona), modula el transportador a múltiples fármacos disminuyendo la síntesis de la Pgp humana por inhibición de la activación transcripcional del gen *mdr1* implicado en la susceptibilidad a daunomicina (Perez-Victoria et al. 2001). Inhibe la Pgp humana (ABCB1), MRP2/ABCC2) y BCRP (ABCG2). A su vez, revierte la resistencia a camptotecina y arsenito mediada por ABCG6 de *L. donovani* (BoseDasGupta et al. 2008).

Algunos dímeros flavonoides sintéticos exhiben una significativa actividad revertidora de la resistencia a pentamidina y estibogluconato de sodio en *L. enriettii* y *L. donovani* (Wong et al. 2007).
- **Sesquiterpenos:** Los agarofuranos sesquiterpenos obtenidos de *Maytenus cuzcoina*, *M. chubutensis*, *M. macroparta*, *M. magellanica*, *M.*



*apurimacensis* y *Crossopetalum tonduzii* son nuevos agentes revertidores, de la resistencia que confiere la Pgp de *Leishmania* a múltiples fármacos como antraciclinas (daunomicina) y alquilfosfolípidos (miltefosina y edelfosina) incrementando la acumulación de dichos fármacos (Perez-Victoria et al. 2001). También son activos frente a la Pgp humana.

- **Estatinas:** Son inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMGCoA) reductasa y de la Pgp en células cancerígenas. Se ha demostrado que interfieren en el crecimiento de parásitos protozoarios de la familia Trypanosomatidae, entre ellos alguna especie de *Leishmania*. Recientemente, se ha demostrado que la lovastatina permite la acumulación de gluconato de antimonio en líneas de *L. donovani* resistentes y que revierte dicha resistencia (Mookerjee Basu et al. 2008)
- **Sulfonilurea (Glibenclamida):** Inhibe a la Pgp (ABCB1) y MRP1 (ABCC1) en células cancerígenas. Se ha demostrado que la administración simultánea *in vitro* de glibenclamida incrementa la eficacia de Glucantime y disminuye el ratio de macrófagos infectados por *L. major* (Padrón-Nieves et al. 2009). La administración de glibenclamida en experimentos *in vivo* incrementa la potencia de Glucantime cuando es administrado simultáneamente, reduciendo el tamaño de las lesiones en ratones infectados con líneas sensibles y resistentes de *Leishmania* (Serrano-Martín et al. 2006). La combinación de Glucantime-glibenclamida podría representar una estrategia novedosa para luchar contra la infección de *Leishmania*.
- **Elacridar y Zosuquidar (Derivados de Acridonecarboxamida):** Son moduladores de Pgp humana, revirtiendo la resistencia mediada por Pgp a miltefosina en *Leishmania* (Perez-Victoria et al. 2006).
- **Ditiocarbamato (Disulfiram):** Empleado en el tratamiento para el alcoholismo crónico. Inhibe Pgps modificando covalentemente una o dos cisteínas endógenas en el segmento NBD. Podría ser efectiva en combinación con Glucantime (Namazi et al. 2008).

- **Benzoquinonas:** Las bis-piranobenzoquinonas inhiben la actividad de Pgp en células de mamífero, pero no a MRP1. En líneas resistentes de *L. tropica* incrementa la actividad de daunorubicina (Pradines, 2013).

Compuesto	Revertidor de la resistencia a:
Verapamil	Antimoniales, Pentamidina, Arsenito, Pirarubicina y Vinblastina
Clorpronacina	Antimoniales
Trifluoperacina, Proclorperacina	Pentamidina, Pirarubicina
Tioridacina, Trifluoropromacina	Pirarubicina
Silimarina y silibina	Daunomicina
Quercetina	Arsenito
Flavonoides sintéticos	Pentamidina y estibogluconato de sodio
Dihidro- $\beta$ -agarofurano	Miltefosina, Edelfosina, Daunomicina
Lovastatina	Antimoniales
Glibenclamida	Glucantime
Benzoquinonas	Daunomicina
Elacridar, Zosuquidar	Miltefosina

**Tabla I-2. Revertidores de la resistencia a fármacos mediados por transportadores a fármacos en *Leishmania*. Adaptado de (Pradines, 2013).**



# OBJETIVOS



## **OBJETIVOS**

La leishmaniasis es una enfermedad distribuida en 98 países repartidos a lo largo de 3 continentes, constituyendo un grave problema de salud pública a nivel mundial. Considerada como una de las enfermedades olvidadas más relevantes, está causada por el protozoo parásito *Leishmania*. Actualmente, la única herramienta de lucha eficaz frente a esta enfermedad se basa en el empleo de la quimioterapia. Sin embargo, el tratamiento frente a la leishmaniasis se enfrenta con varios problemas relacionados con el escaso arsenal de fármacos disponibles, el aumento de resistencias frente a algunos de los fármacos en uso, la frecuente aparición de efectos secundarios de los fármacos y el alto coste del tratamiento en las zonas endémicas.

Uno de los mecanismos de resistencia en *Leishmania* está asociado a una reducción en la acumulación del fármaco bien por una disminución en la entrada o por un incremento en el eflujo del fármaco, estando implicados en este último caso los transportadores ABC (ATP-Binding Cassette). Los transportadores ABC constituyen una de las familias de proteínas más amplias presentes a lo largo de toda la escala biológica. Son proteínas capaces de transportar diferentes sustratos a través de las membranas biológicas en un proceso dependiente de la hidrólisis de ATP, estando implicadas en una gran variedad de funciones fisiológicas con consecuencias importantes a nivel clínico.

El genoma de *Leishmania* contiene 42 genes que codifican para proteínas ABC, con miembros representativos de cada subfamilia (desde ABCA hasta ABCH). Adicionalmente, en *Leishmania* existe un grupo de transportadores ABC sin clasificar con función desconocida, inicialmente denominado como “otros”, y que hemos agrupado como subfamilia ABCI.

## Objetivos

---

En el presente trabajo nos planteamos como objetivo general estudiar la implicación del transportador ABCI4 de *Leishmania major* en la infectividad y susceptibilidad a fármacos. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Análisis de homología de ABCI4 respecto a otros transportadores ABC.
2. Localización de ABCI4 en el parásito.
3. Implicación de ABCI4 en la susceptibilidad a fármacos así como en los procesos biológicos relacionados con la infectividad y su pervivencia intracelular de *Leishmania*.
4. La búsqueda de compuestos inhibidores específicos de la actividad del transportador ABCI4.



**MATERIAL Y  
METODOS**





## MATERIAL

### Líneas celulares.

- **Parásitos:** La línea utilizada ha sido *Leishmania major* (MHOM/JL/80/Friedlin).
- **Bacterias:** Todas las cepas corresponden a la especie *Escherichia coli*.
  - **DH5 $\alpha$ :** *supE44  $\Delta$ lacU169 (  $\phi$ 80lacZ  $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1* (GibcoBRL).
  - **TOP10:** *F<sup>-</sup> mcrA  $\Delta$  (mrr-hsdRMS-mcrBC)  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74 recA1 deoR araD139  $\Delta$  (ara-leu) 7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG* (Invitrogen).
  - **XL10-GOLD<sup>®</sup>:** *Tet<sup>R</sup>  $\Delta$ (mcrA)183  $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA-1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI<sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>R</sup>) Amy Cam<sup>R</sup>]<sup>a</sup>* (Stratagene).
- **Células THP-1:** línea celular mielomonocítica humana THP-1 (ATCC TIB-202).

### Medios y reactivos empleados en el cultivo de *Leishmania*.

**Solución de aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos (SAA 10X):** Esta solución se adiciona al medio de cultivo y se compone de arginina 4,4 mg/ml, cistina 0,8 mg/ml, glutamato 2,5 mg/ml, glutamina 16,4 mg/ml, prolina 69 mg/ml, L-ornitina 1 mg/ml, glucosa 7 mg/ml, fructosa 4 mg/ml, malato 6,7 mg/ml,  $\alpha$ -cetoglutarato 3,7 mg/ml, fumarato 0,55 mg/ml y succinato 0,6 mg/ml.

**Solución de vitaminas 100X:** Esta solución se adiciona al medio de cultivo y se compone de pantotenato cálcico 1 mg/ml, cloruro de colina 1 mg/ml, ácido fólico 1

## Material y métodos

---

mg/ml, clorhidrato de piridoxal 1 mg/ml, clorhidrato de tiamina 1 mg/ml, l-inositol 20 mg/ml, nicotinamida 1 mg/ml y riboflavina 0,1 mg/ml.

**RPMI 1640 modificado suplementado con 20% de hiFBS:** Este medio se compone de 8,32 g de RPMI 1640 (Gibco), 4,75 g de Hepes, 1,6 g de bicarbonato sódico, además de 100 ml de solución de aminoácidos orgánicos y azúcares 10X y 0,2 ml de solución de vitaminas (100X), previamente descritas, en 800 ml de H<sub>2</sub>O. El pH del medio se ajusta a 7,2 y se esteriliza mediante filtración. Finalmente, el medio se suplementa con suero bovino fetal inactivado por calor (hiFBS) (Invitrogen) al 20%. La inactivación del hiFBS se realiza a 56°C durante 45 min.

**Medio M-199:** El medio M-199 se suplementa con 10% de hiFBS

**Higromicina B** (Invitrogen): Antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. Se trata de un aminoglicósido utilizado frente a bacterias, hongos y células eucariotas superiores produciendo la inhibición de la síntesis proteica. Se adicionó al medio en los casos en los que fue necesaria la selección y el mantenimiento de parásitos transfectados con el vector que contiene el gen de resistencia a dicho antibiótico. Se utilizó en un rango de concentraciones comprendidas entre 5 y 500 µg/ml para la selección de parásitos transfectados, mientras que para el mantenimiento de las líneas transfectadas se empleó una concentración de 500 µg/ml.

**Geneticina (G-418)** (Gibco): Antibiótico producido por la bacteria *Micromonospora rhodorangea*. Se trata de un aminoglicósido que bloquea la síntesis proteica inhibiendo el paso en el que se produce la elongación polipeptídica. Se utilizó como antibiótico de selección de los parásitos transfectados con los vectores que contenían el gen de la neomicina fosfotransferasa. Se utilizó en un rango de concentraciones comprendidas entre 5 y 500 µg/ml para la selección de parásitos transfectados, mientras que para el

mantenimiento de las líneas transfectadas se empleó una concentración de 500 µg/ml.

**Medio de congelación:** RPMI modificado suplementado con un 20% de hiFBS y con 10% de dimetilsulfóxido (DMSO).

### **Medios para el cultivo de bacterias.**

- **LB líquido:** Este medio contiene 10 g de bactotripton, 10 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura llevado hasta 1 L con agua bidestilada, pH 7,5, siendo necesario autoclavar el medio.
- **LB-Agar:** Bacto Agar al 1,5% en LB líquido. La esterilización se realiza mediante autoclave.
- **Medio NZY<sup>+</sup> para mutagénesis:** Este medio contiene 10 g de NZ amina (caseína hidrolizada), 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl en un volumen final de 1 L con agua bidestilada, pH 7,5, siendo necesario autoclavar el medio. Previo a su utilización, adicionar 12,5 ml de una solución 1 M MgCl<sub>2</sub>, 12,5 ml de una solución 1 M de MgSO<sub>4</sub> y 20 ml de una solución de glucosa 20%.
- **Medio de congelación:** 15% de glicerol en LB líquido.

### **Medio para el cultivo de células THP-1.**

Esta línea se mantiene a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de hiFBS, 2 mM glutamato, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Las células se diferencian a macrófagos con 20 ng de acetato de forbolmiristato durante 48 h permitiéndoles así adquirir la capacidad de adherencia.

## TAMPONES Y SOLUCIONES

### Soluciones generales.

**TAE 10X:** Tris 0,4 M, EDTA 10 mM, ácido acético glacial 11,42 ml para 1 L. Utilizado en la electroforesis de DNA.

**Solución de carga para DNA 6X:** azul de bromofenol, 0,25%, xileno cianol 0,25% y glicerol 30%.

**Tampón HPMI:** NaCl 132 mM, KCl 3,5 mM, MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, glucosa 5 mM y Hepes 20 mM a pH 7,25. Utilizado en experimentos de acumulación y eflujo de porfirinas tóxicas.

**Tampón HBS:** NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 mM, glucosa 6 mM y Hepes 21 mM a pH 7,4. Utilizado en experimentos de transfección aparte de diversas medidas fluorimétricas para la caracterización de ABCI4.

**Tampón fosfato salino (PBS):** NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM y Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, pH 7,4. Empleado para realizar los lavados de los parásitos durante los diferentes experimentos.

**Tampón de lisis:** Tris-HCl 50 mM y NaCl 150 mM pH 7,5. Utilizado en la preparación de muestras proteicas para Western Blot.

**Tampón salino:** 21 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl y 6 mM glucosa, pH 7. Empleado para los ensayos de acumulación de Cadmio.

### Soluciones y reactivos para electroforesis de proteínas.

**Tampón de lisis:** Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM y DDM 5%.

**Tampón de corrida 10X:** Tris-HCl 0,25 M, glicina 1,92 M, SDS 1%, pH 8,3. Filtrado.

**Acrilamida-bisacrilamida:** Bio-Rad.

**Tampón separador:** Tris-HCl 1,5 M SDS 0,4%, pH 8,8. Filtrado.

**Tampón concentrador:** Tris-HCl 0,5 M SDS 0,4%, pH 6,8. Filtrado.

**Tampón de muestra 2X:** 1,25 ml de tampón concentrador, 0,3 g SDS, 20% glicerol, 10%  $\beta$ -mercaptoetanol, 0,2% azul de bromofenol, completando hasta 5 ml con urea 8 M.

**Persulfato de amonio:** 100 mg/ml en agua destilada. Filtrado.

**Tetrametiletilenediamina (TEMED):** Bio-Rad.

**n-dodecil- $\beta$ -D-maltopiranosido (DDM):** Sigma.

**Acrilamida bis-acrilamida.** Roche.

**$\beta$ -mercaptoetanol.** Merck.

**Bio-Rad Protein Assay:** Para medir la concentración de proteínas. Bio-Rad.

**N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED):** Bio-Rad.

**Persulfato amónico:** Sigma.

**Precision Plus Protein prestained standards (all blue):** Bio-Rad.

**Precision Plus Protein prestained standards (dual colour):** Bio-Rad

**Kaleidoscope prestained standards:** Bio-Rad.

## **Soluciones para Western blot e inmunodetección.**

**Solución de bloqueo:** BSA 1%, Tween-20 0,05% en PBS o leche desnatada en polvo al 5% en PBS.

**Solución de inmunodetección:** BSA 0,1%, Tween-20 0,1% en PBS.

**Tampón de transferencia:** Tris base 25 mM, glicina 192 mM.

**Solución de revelado:** ECL-Plus®. GE Healthcare.

**Rojo de Ponceau:** Rojo de Ponceau-S 0,5%; ácido acético 1%.

## **VECTORES PLASMÍDICOS**

### **Vectores de clonaje.**

- **pGEM-T** (Promega): Vector que posee residuos de desoxitimidina en ambos extremos terminales. Diseñado para el subclonado y secuenciación de fragmentos de DNA amplificados por PCR.

### Vectores de expresión.

- **pXG:** Vector de expresión para *Leishmania* (Ha et al., 1996), construido a partir de secuencias de la región R de *L. major* (DNA circular extracromosómico de 30 Kb). En este vector se ha sustituido el gen de la DHFR-TS por el gen *neo* que codifica para la neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia a geneticina (G418).
- **pXG-Hyg:** Vector de expresión para *Leishmania* (Ha et al., 1996), construido a partir de secuencias de la región R de *L. major* (DNA circular extracromosómico de 30 Kb). En este vector se ha sustituido el gen de la DHFR-TS por el gen *Hyg* que codifica para la higromicina fosfotransferasa que confiere resistencia a higromicina..
- **pXG-'GFP+:** Vector de expresión para *Leishmania* derivado de pXG-GFP+ (Ha et al., 1996), que permite crear proteínas de fusión, marcadas con GFP en el extremo carboxilo terminal de la proteína.
- **pXG-GFP2+':** Este vector es una variante de pXG-GFP+ (Ha et al., 1996), que permite crear proteínas de fusión, marcadas con GFP en el extremo amino terminal de la proteína.

## OLIGONUCLEÓTIDOS

### Clonaje del gen ABCI4.

<b>NOMBRE</b>	<b>SECUENCIA (5'→3')</b>
<b>ABCI4 FW</b>	TGCATTCTCACGCCTTCACAC
<b>ABCI4 RV</b>	ACTAGCATTAGCTGCGAGTTCC
<b>ABCI4-GFP FW</b>	ATAGATCTATGAGACTCACTGATGCTCCGT
<b>ABCI4-GFP RV</b>	ATGATATCGCTCACTGCCTGTGCACG
<b>GFP-ABCI4 FW</b>	ATGCGGCCGCATGAGACTCACTGATGCTCCGT
<b>GFP-ABCI4 RV</b>	ATAGATCTTCAGCTTCACTGCCTGTGC

### Secuenciación del gen ABCI4.

<b>NOMBRE</b>	<b>SECUENCIA (5'→3')</b>
<b>ABCI4 1</b>	ATGAGACTCACTGATGCTCCG
<b>ABCI4 2</b>	ATCGTGACGAGAGCTGTAC
<b>ABCI4 3</b>	TGTCTGATGACGTTGTTTCTCG
<b>ABCI4 4</b>	TGACGAGCATGAAGCGTACAC
<b>ABCI4 5</b>	AGGCCTGCATCGATACAGC

### Mutagénesis del gen ABCI4 (K/M en la posición 742).

<b>NOMBRE</b>	<b>SECUENCIA (5'→3')</b>
<b>ABCI4 MUT FW</b>	GTGGGGCGGGGATGAGTACGCTGCT
<b>ABCI4 MUT RV</b>	AGCAGCGTACTCATCCCCGCCCCAC



### Adición de tres copias del epítipo FLAG a ABCI4.

<b>NOMBRE</b>	<b>SECUENCIA (5'→3')</b>
<b>FLAG-ABCI4 FW</b>	ATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGATGA GACTCACTGATGCTCC
<b>FLAG-ABCI4 RV</b>	TCAGCTCACTGCCTGTGCAC
<b>3FLAG-ABCI4 FW</b>	ATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGGAC TACAAGGACGACGACGAC AAGGACTAC
<b>3FLAG-ABCI4 RV</b>	TCAGCTCACTGCCTGTGCAC

---

### Oligonucleótidos para la obtención de parásitos mutantes nulos (KO) para ABCI4.

<b>NOMBRE</b>	<b>SECUENCIA (5'→3')</b>
<b>KO ABCI4 5UTR FW</b>	GACGGAAGTGAAGGCCGGTAG
<b>KO ABCI4 5UTR RV</b>	CTGAATTACTCGTGCTGCAACA
<b>KO ABCI4 3UTR FW</b>	CGACGAGGCATTGGAAAGC
<b>KO ABCI4 3UTR RV</b>	ACAACTACGTGGAGGACAGG

---

Todos los oligonucleótidos empleados se sintetizaron en el “Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos” del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC), Granada.

## REACTIVOS

### Reactivos de Biología Molecular.

**5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -galactopiranosido (X-Gal):** Roche. Solución 20 mg/ml en dimetilformamida.

**Agarosa:** Pronadisa.

**Ampicilina:** Sigma. Solución 100 mg/ml en agua.

**Bromuro de etidio:** Sigma.

**Desoxinucleótidos:** Roche.

**Dietilpirocarbonato (DEPC):** Sigma

**Enzimas de restricción:** Roche, Fermentas, NewEngland BioLabs.

**Fenol.** Sigma.

**Formaldehído:** Panreac.

**Formamida desionizada:** Roche.

**Fosfatasa alcalina:** Roche.

**Isopropil- $\beta$ -D-tiogalacto-piranosido (IPTG):** Roche. Solución 0.5 M en agua.

**Marcadores de peso molecular: lambda DNA/HindIII, phi174 DNA/HaeIII:** Promega.

**Gel Extraction Kit<sup>®</sup>:** Kit de limpieza de DNA. Omega.

**Plasmid Mini Kit<sup>®</sup>:** Kit de extracción de DNA plasmídico a pequeña escala. Omega

**PureGene<sup>™</sup>:** Kit de aislamiento de DNA genómico. Gentra Systems.

**High Pure RNA Isolation Kit<sup>®</sup>:** Kit de extracción de RNA total. Roche.

**qScript cDNA Synthesis Kit<sup>®</sup>:** Kit para obtener cDNA a partir de RNA (Quanta Biosciences, Inc).

**QuickChange<sup>®</sup> II XL site-directed mutagenesis kit<sup>®</sup>.** Kit para realizar mutagénesis dirigida *in vitro*. Stratagene.

**T4 DNA ligasa:** Invitrogen.

**TripleMaster<sup>®</sup> PCR System.** Kit para amplificar fragmentos de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa. Eppendorf.

## **Compuestos y reactivos para el estudio funcional de la proteína ABCI4.**

**Antimonio trivalente (Sb<sup>III</sup>):** Sigma.

**Pentostam (Sb<sup>V</sup>):** GlaxoSmithKline (Greenford, UK).

**Pentamidina:** Sigma.

**Paromomicina:** Sigma.

**Anfotericina B:** Sigma.

**Ketoconazol:** Sigma.

**Cloroquina:** Sigma.

**Quinina:** Sigma.

**Mefloquina:** Sigma.

**Primaquina:** Sigma.

**Tafenoquina:** GlaxoSmithKline (Greenford, UK).

**Sitamaquina:** GlaxoSmithKline (Greenford, UK).

**Miltefosina (hexadecilfosfocolina):** Zentaris.

**Daunomicina:** Pfizer.

**Bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium] (MTT):** Sigma.

Stock 5 mg/ml en PBS y filtrado. Se almacena a 4 °C.

**Zinc-protoporfirina:** Frontier Scientific (Logan, UT).

**Zinc-mesoporfirina:** Frontier Scientific (Logan, UT).

**BSO (L-Butionina-sulfoximida):** Sigma. Inhibidor de la enzima  $\gamma$ -glutamylcistein sintetasa.

**Cloruro de Cadmio (CdCl<sub>2</sub>):** Sigma.

**Cloruro de Cobalto (CoCl<sub>2</sub>):** Sigma.

**Sulfato de Cobre (CuSO<sub>4</sub>):** Sigma.

**Nitrato de plomo (Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>):** Sigma.

**Arsenito sodico (NaAsO<sub>2</sub>):** Sigma.

**Cloruro de Manganeso (MnCl<sub>2</sub>):** Sigma.

**Cloruro de Zinc (ZnCl<sub>2</sub>):** Sigma.

**Pheophorbide A:** Sigma.

**Glutation (GSH):** Sigma.

**Mitotracker Red:** Invitrogen. Sonda utilizada para el marcaje de la mitocondria.

**MitoSOX Red:** Invitrogen. Sonda utilizada para medir los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) en mitocondria.

**H<sub>2</sub>DCFDA:** Invitrogen. Sonda utilizada para medir los niveles totales de ROS.

**JC-1:** Invitrogen. Sonda empleada para estudiar el potencial de membrana mitocondrial.

**Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF):** Sigma. Se disolvió en isopropanol a una concentración de 100 µg/ml.

**Azida:** Sigma.

**Triton X-100:** Panreac.

**DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dilactate):** Sigma. En su forma Prolong-Gold antifade agente con DAPI para marcaje en muestras fijadas para microscopia.

**ThioStar<sup>®</sup>:** Arbor Assays. Sonda empleada para medir los niveles de tioles no proteicos.

**CellTiter Glo<sup>®</sup>:** Promega. Compuesto utilizado para medir los niveles totales de ATP.

**Measure-iT<sup>™</sup> Lead and Cadmium Assay Kit:** Invitrogen. Kit empleado en la medida de los niveles de Cadmio.

**Acetato de forbolmiristato:** Sigma.

## **Reactivos para inmunodetección.**

**Albúmina de suero bovino (BSA):** Sigma.

**Anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa o con FITC:** Sigma.

**Anticuerpo policlonal anti-GFP de conejo:** Molecular probes (Invitrogen).

**Anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa:** Dako.

**Anticuerpo policlonal anti-FLAG:** Thermo Scientific.

**Anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina:** Thermo Scientific.

## Material y métodos

---

**Anticuerpo anti-LdRos3:** Generado en el laboratorio, específico para la proteína de superficie LRos3 (Sánchez-Cañete et al 2009).

**Anti-GFP-bolas magnéticas:** MBL.

**Membranas de transferencia (PVDF):** Membranas de poli(difluoruro de vinilideno). Immobilon<sup>®</sup>-P, Millipore.

**p-formaldehído:** Sigma.

**Reactivos ECL™ plus Western blotting detection system:** Para la detección en *Western blot*. GE Healthcare.

**Rojo Ponceau-S:** Sigma

**Tween-20:** Merck.

## Compuestos con potencial actividad revertidora del transportador ABCI4.

La síntesis y caracterización de los compuestos A1-A4, B1, B2, C1, C2, E1, F1-F4 ha sido descrita previamente (Doleans-Jordheim et al. 2013; Genoux-Bastide et al. 2011; Valdameri et al. 2012; Haudecoeur et al. 2011; Okombi et al. 2006).

**Síntesis de las carboxamidas derivadas de trolox (serie D):** La síntesis de estos derivados se ha realizado por el grupo de investigación del Prof. Ahcene-Boumendj (Universidad Joseph Fourier, Grenoble, Francia). Una solución de trolox en DMF seco (1 eq.), trietanolamina (4 eq.) y cloruro de bis(2-oxo-3-oxazolidinil)fosfónico (BOP-Cl, 1.5 eq.) se adicionó sucesivamente a un frasco que contenía una solución de amina disuelta en DMF seco. Esta solución se agitó a temperatura ambiente durante 24 h. La mezcla resultante se purificó en una solución de HCl 1 M, extraída con acetato de etilo, y seguida de un lavado con una solución saturada de NaHCO<sub>3</sub> y H<sub>2</sub>O, secada y concentrada para dar el producto crudo. La posterior purificación mediante cromatografía (EtOAc:Hex, 1:1) en silica gel para obtener el compuesto puro deseado se comprobó mediante resonancia magnética nuclear (RMN).

## **MÉTODOS**

### **Cultivo *in vitro* de *Leishmania*.**

Los promastigotes de *Leishmania* se cultivaron *in vitro* a 28 °C en medio RPMI 1640 modificado (Jackson et al., 1986) y suplementado con 20% de hiFBS, o bien en M-199 suplementado con 10% de hiFBS, según el experimento a realizar. El mantenimiento de los parásitos en cultivo se realizó mediante pases continuados consistentes en la resiembra de 4 millones de parásitos en fase logarítmica tardía por ml de medio fresco cada 48-72 h.

### **Criopreservación y congelación de los parásitos.**

Se tomaron 900 µl de parásitos en fase logarítmica de crecimiento y se les adicionó 100 µl de DMSO. Finalmente, se depositaron en viales de congelación que se almacenaron a -80 °C o en nitrógeno líquido.

La descongelación de parásitos se llevó a cabo introduciendo los viales en un baño a 37 °C. Posteriormente, estos parásitos fueron resuspendidos en 5 ml de medio de cultivo para iniciar su crecimiento a 28 °C.

### **Cultivo de bacterias**

Los cultivos líquidos de bacterias se hicieron en medio LB a 37 °C y agitación constante en presencia del antibiótico de selección. Las bacterias también fueron cultivadas en medio semisólido, en placas de petri con LB agar, a 37 °C. Los stocks de bacterias se conservaron a -80 °C en medio LB suplementado con glicerol al 15%.

### **Preparación de células competentes por choque térmico y transformación**

Se crecieron 5 ml de bacterias durante 16 horas en medio líquido con agitación a 37 °C. Se inoculó 1ml del pre-cultivo en 200 ml de LB, continuando su crecimiento hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,375. Se enfriaron en hielo durante 10-15 min y se centrifugaron durante 7 min a 3500 g a 4 °C. Una vez eliminado el sobrenadante, se resuspendieron las células en 1/5 del volumen inicial de  $MgCl_2$  0,1 M estéril frío, incubando la suspensión en hielo 15-20 min. Se volvió a centrifugar (7 min, 3500 g, 4 °C) y se eliminó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en 1/50 del volumen inicial de  $CaCl_2$  0,1 M estéril frío y se incubaron en hielo durante una hora. A esa suspensión se añadió glicerol 100% hasta obtener una concentración final del 15% y se alícuotearon en 200  $\mu$ l en tubos eppendorf enfriados previamente. Las células se pueden guardar a -80 °C hasta su uso.

Para la transformación, se descongeló una alícuota de células competentes, a las que se añadió la mezcla de ligación de DNA. A continuación se realizó un choque térmico, para lo que se incubaron las bacterias durante 30 min en hielo, 45 s a 42 °C y 2 min en hielo. A la mezcla se añadieron 300  $\mu$ l de LB y se incubó una hora a 37 °C con agitación. Una alícuota de la mezcla se plasmó en el correspondiente medio de selección y se incubó a 37 °C durante 14-16 h.

### **Aislamiento de DNA genómico de parásitos.**

Se realizó siguiendo el protocolo descrito en el Kit “Puregene DNA isolation” de Gentra, partiendo de 150 millones de parásitos. El DNA se resuspendió en agua bidestilada y se determinó su concentración mediante espectrofotometría ( $DO_{260}$  DNA doble hebra= 50  $\mu$ g/ml).

## **Aislamiento del gen ABCI4.**

Para aislar el gen ABCI4 se utilizó la base de datos del genoma de *L. major* (GeneDB, código de acceso LmjF\_3\_3260). Utilizando DNA genómico de *L. major* como molde, oligos aguas arriba y abajo del marco abierto de lectura del gen, añadiendo las dianas EcoRV y BglIII, en 5' y 3' de la secuencia, y mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se consiguió amplificar un fragmento de 3.094 pb del cromosoma 33 que se clonó en pGEMT y posteriormente se secuenció.

## **Secuenciación del DNA**

La secuenciación de DNA se realizó por el método de terminación de cadena por dideoxynucleótidos descrito por (Sanger *et al.*, 1977). El método se basa en la interrupción de la síntesis de DNA por una polimerasa mediante la incorporación de un dideoxynucleótido que detiene la elongación de la cadena a partir de un cebador, por no tener un extremo 3'-OH al cual añadir el siguiente nucleótido trifosfato. La secuenciación se realizó con un secuenciador automático 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) utilizando el kit AmpliTaqDyeDeoxy terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer) y utilizando la optimización llevada a cabo en nuestro Instituto por A. Lario (Lario *et al.*, 1997). Los cebadores utilizados fueron los universales (SP6, T7), así como los oligonucleótidos sintéticos descritos anteriormente.

## **Aislamiento de DNA plasmídico.**

Para las extracciones de DNA plasmídico a pequeña escala (1,5-3 ml de cultivo bacteriano) se utilizó el Plasmid Mini Kit® de Omega. Este método permite de forma rápida el aislamiento de pequeñas cantidades de DNA plasmídico en condiciones óptimas para realizar su tratamiento posterior (uso de enzimas de restricción, ligaciones, suclonado, marcaje radiactivo, secuenciación, et c.). El procedimiento se basa en el método de la lisis alcalina y precipitación con una



## Material y métodos

---

solución de acetato potásico. El sobrenadante se pasa por una resina, siendo posteriormente lavado y el DNA eluido con un tampón Tris-HCl 10 mM pH 8,5.

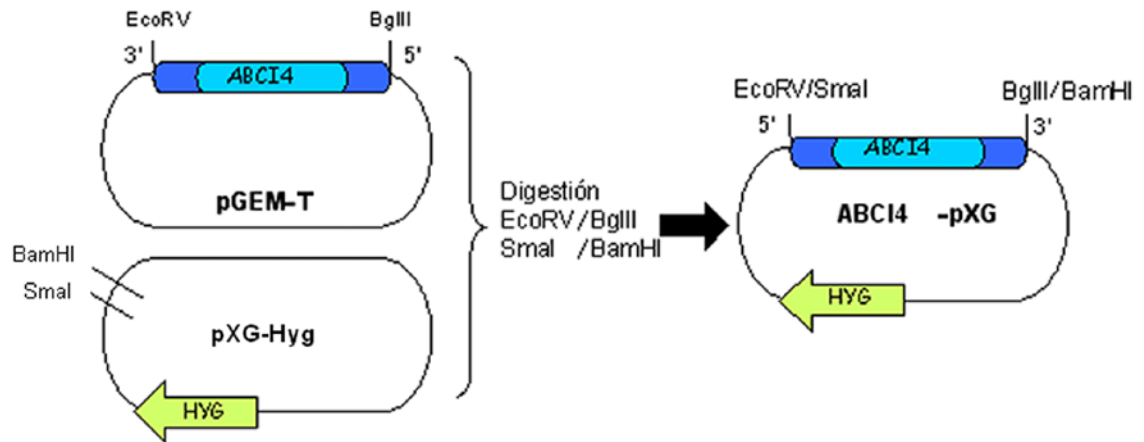
### **Mutagénesis dirigida.**

Para obtener una mutación puntual en un plásmido, se utilizó el protocolo recogido en el kit de mutagénesis *Quick Change® XL-Site-Directed* (Stratagene). Se emplean un par de oligonucleótidos que incluyen la mutación complementaria entre sí, realizándose una reacción de PCR con la enzima *Pfu Ultra High Fidelity DNA Polimerasa* dando como resultado dos hebras completas y complementarias del plásmido amplificado. Después de eliminar el DNA de partida en una reacción de digestión con la enzima *DpnI*, que hidroliza el DNA metilado, se transformaron bacterias con el producto de la amplificación. Finalmente, se chequeó mediante secuenciación la existencia de la mutación en el plásmido obtenido de las bacterias transformadas.

### **Diseño de construcciones para sobreexpresar ABCI4, ABCI4<sup>K/M</sup>, 3xFLAG-ABCI4 y las quimeras de GFP con ABCI4.**

Se realizó la digestión de la construcción obtenida anteriormente con las enzimas EcoRV y BglII y el clonaje del fragmento liberado en el vector pXG-Hyg, previamente digerido con BamHI y SmaI. El plásmido resultante, denominado ABCI4-pXG, contenía el gen ABCI4 completo, flanqueado por 68 nucleótidos de la región 5' no codificante y 176 nucleótidos de la región 3' no codificante (Fig. M-1A).

A



B

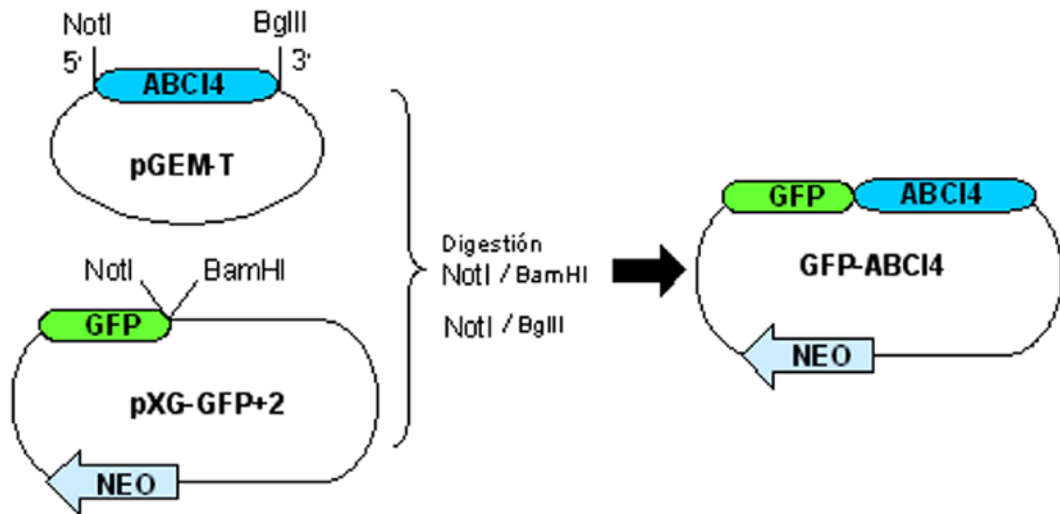


Figura M-1. Clonaje del gen ABCI4 en los vectores de expresión de *Leishmania* pXG-Hyg y de fusión a GFP en el extremo amino terminal pXG-GFP+2'. (A) Clonaje de ABCI4 en pXG-Hyg. (B) Clonaje de ABCI4 fusionándolo en el extremo amino terminal a GFP en pXG-GFP+2'.

Para poder sobreexpresar la proteína fusionada con GFP en el extremo amino, se amplificó ABCI4 mediante PCR empleando los oligos GFP-ABCI4 FW y GFP-ABCI4 RV, añadiendo dianas de restricción para NotI y BglII. El fragmento

## Material y métodos

---

obtenido, previo su clonaje en pGEM-T, se liberó por digestión con NotI y BglII/BamHI, y se clonó en el vector pXG-GFP+2', obteniéndose la construcción GFP-ABC14 (Fig. M-1B).

Para poder sobreexpresar la proteína fusionada con GFP en el extremo carboxilo, se amplificó ABC14 (sin STOP) mediante PCR. Para ello se emplearon los oligos ABC14-GFP FW y ABC14-GFP RV, añadiendo sitios de corte para EcoRV y BglII. El producto de PCR, previo subclonaje en pGEM-T, se clonó en el vector pXG-GFP+, obteniéndose la construcción ABC14-GFP.

En otro sentido, la dimerización es un requisito fundamental para la correcta funcionalidad en los transportadores ABC del tipo "half-transporters" (Fig. M-2), lo cual nos permitió utilizar la técnica de dominante negativo para regular la función de ABC14. Para este fin, a partir de la construcción ABC14-pXG-Hyg se mutó, mediante el kit *Quick Change® XL-Site-Directed* (Stratagene), un residuo de lisina del interior del motivo Walker A de ABC14 (en la posición 742) por una metionina, produciéndose un cambio K742M. Se sabe que esta mutación provoca una pérdida de función en la proteína ABCG2 humana, la proteína ABCCG2 de *Leishmania* (Campos-Salinas et al. 2013) y otras proteínas ABC, por impedir la hidrólisis de la segunda molécula de ATP, si bien no su unión, siendo insuficiente la hidrólisis de una sola molécula de ATP para producir el cambio conformacional necesario para realizar el transporte (Ozvegy et al., 2001).

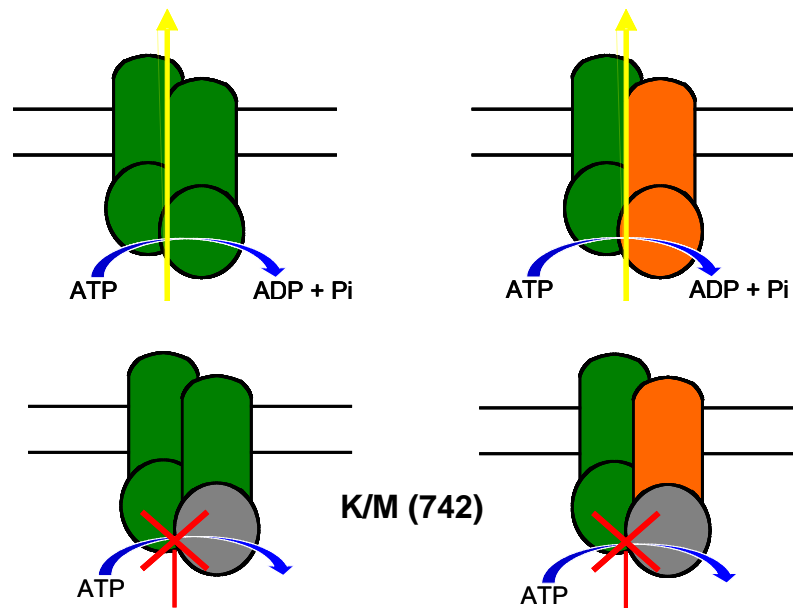


Figura M-2. Esquema de la técnica de dominante negativo en los transportadores ABC de *Leishmania*. Se muestran en color verde o naranja los diferentes monómeros ABC half-transporter que podrían dimerizar (homo/heterodimerizar) para realizar el transporte del sustrato. En gris se muestra el segmento NBD mutado en su segmento Walker A, impidiendo la hidrólisis de ATP y por consiguiente el transporte del alócrilo.

Para localizar mediante técnicas inmunológicas e inmunoprecipitar ABCI4, utilizamos como estrategia la introducción de 3 epítopos FLAG (DYKDDDDK) en tándem en el extremo aminoterminal. Para ello, se realizó una primera PCR sobre el gen ABCI4 insertado en pGEMT en la que se introduce un único epítipo FLAG, y una segunda PCR en la que se introducen otros dos epítopos fusionados al primero y una diáspora de restricción A gel. Posteriormente, se transfirió mediante gestión enzimática XmaI/BamHI y A gel/BglII al vector de expresión de *Leishmania* pXG-Hyg (Fig. M-3)

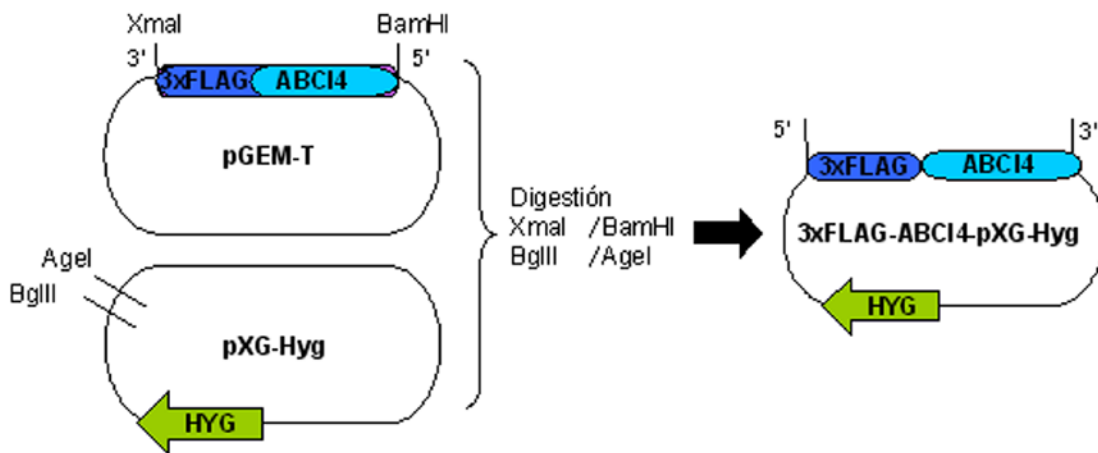


Figura M-3. Clonaje del gen ABCI4 en el vector de expresión de *Leishmania* pXG-Hyg fusionando 3 epítopos FLAG en el extremo amino terminal.

## Obtención de una línea mutante nulo para el gen ABCI4 de *Leishmania*.

Para la obtención de las construcciones destinadas a conseguir líneas de parásitos mutantes nulo para el gen ABCI4, se llevaron a cabo una serie de pasos (Fig. M-4):

- Amplificación mediante PCR de una región de 1,5 Kb de las regiones 5' UTR y 3' UTR de ABCI4 introduciendo sitios de corte para enzimas de restricción.
- Digestión con las enzimas XbaI/BamHI de las construcciones 5'UTR-pGEMT y 3'UTR-pGEMT, y posterior ligación.
- Digestión con las enzimas XbaI/SwaI de las construcciones HYG-pGEMT o NEO-pGEMT (Pérez-Victoria et al. 2006) y 5'UTR-3'UTR-pGEMT y posterior ligación, generando una construcción en el plásmido pGEMT que contiene un gen de resistencia a higromicina o G418 flanqueado por las regiones 5' y 3' UTR del gen ABCI4.
- Esta construcción se lineariza mediante digestión enzimática con BamHI y NotI, para su posterior transfección en el parásito.

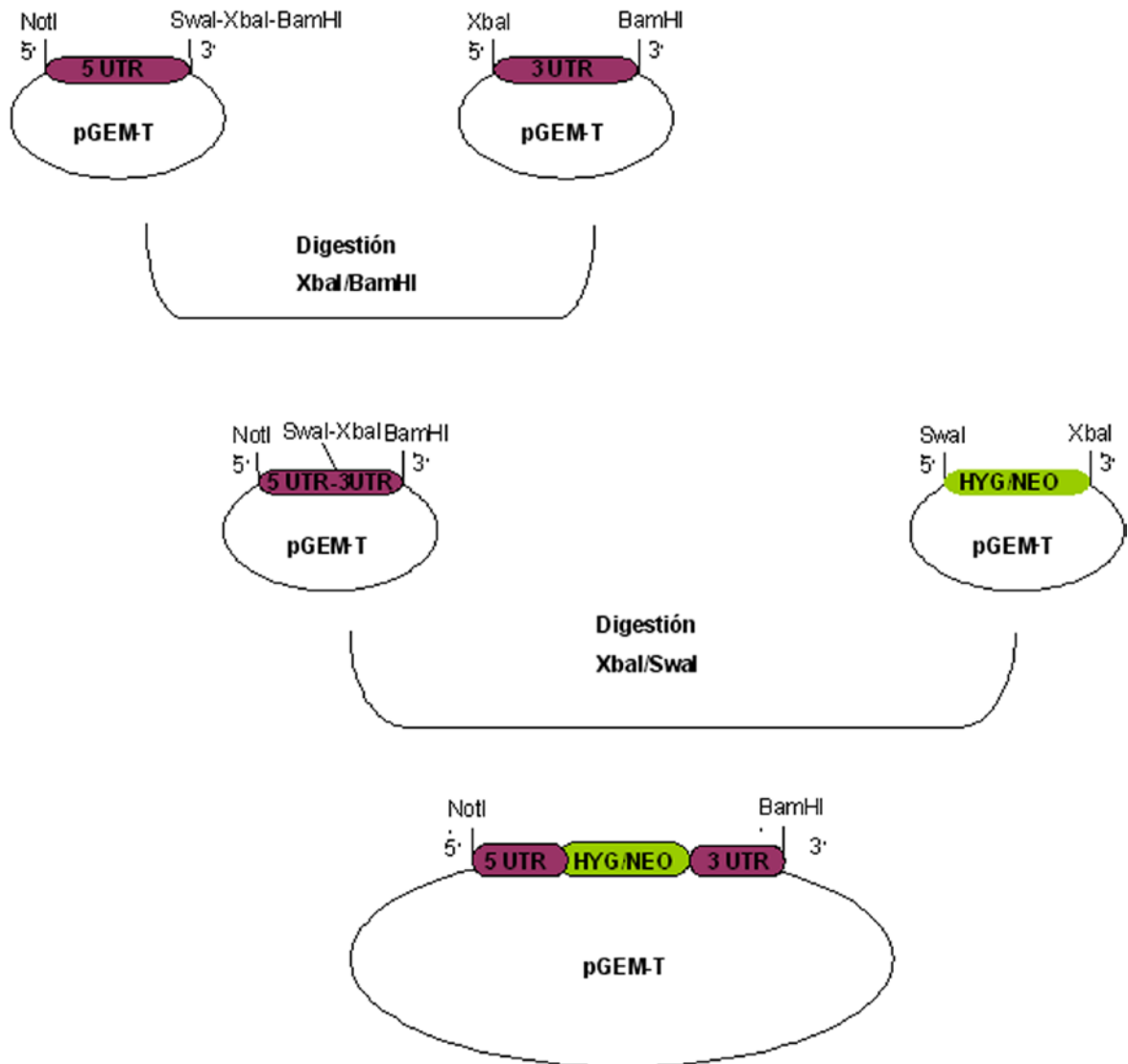


Figura M-4. Estrategia para generar la construcción 5UTR-HYG-3UTR en pGEMT, necesaria para la obtención de parásitos mutantes nulo para ABCI4.

La construcción 5UTR-HYG-3UTR linealizada (al menos 2  $\mu$ g de DNA) se transfecta sobre los parásitos ( $5 \times 10^7$ ) de *L. major*, empleando el kit de transfección Amaxa Nucleofector System (Lonza). Pasadas 24 h, se diluyen los parásitos en microplacas de 96 pocillos hasta una dilución límite, y se exponen a una concentración de 15  $\mu$ g/ml de hidomicina para inducir la doble recombinación, y de esta manera sustituir el gen de interés de uno o de los dos alelos (Fig. M-5). Después de 15 días de cultivo, los parásitos, se traspasan a frascos, con un mayor volumen de cultivo y mayor presión de fármaco. Posteriormente, los parásitos se subclonan en placa de Agar-RPMI con 30  $\mu$ g/ml

## Material y métodos

---

de higromicina, y los clones que crezcan en la placa se crecen de nuevo en medio líquido, analizándose mediante PCR la correcta inserción del gen de resistencia y la sustitución del gen ABCI4. Para obtener parásitos con el otro alelo deleciónado, los parásitos *hyg/+* obtenidos son transfectados con la construcción linearizada compuesta por los segmentos 5' y 3' UTR flanqueando el gen de resistencia a neomicina, llevándose a cabo el mismo proceso de selección descrito anteriormente.

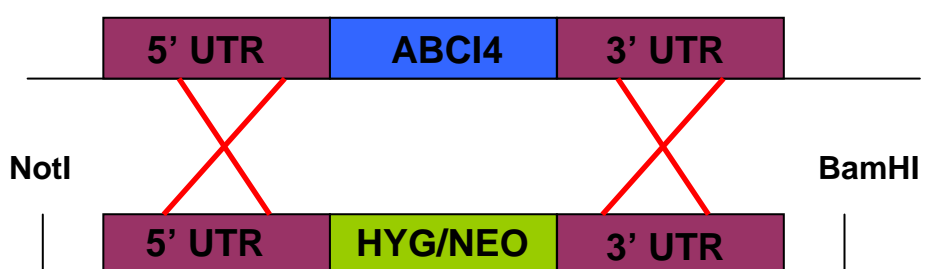


Figura M-5. Modelo predictivo de la doble recombinación que se produce en la sustitución del gen ABCI4 por el gen de resistencia a higromicina en *Leishmania*.

## Medida de la expresión del transportador ABCI4 mediante RT-PCR.

El RNA total se extrajo de las diferentes líneas de *Leishmania* empleando el kit High Pure RNA Isolation (Roche Diagnostics GmbH, Germany) y transcrito en cDNA empleando el kit qScript cDNA Synthesis (Quanta Biosciences, Inc), siguiendo las instrucciones del fabricante. El cDNA obtenido se diluyó (1:10 y 1:50) y se amplificó con los oligos diseñados específicamente para ABCI4 y para GADPH (como control de carga) por 35 ciclos de amplificación a una temperatura de alineamiento de 54° C. Los productos de PCR se visualizaron tras electroforesis en un gel de agarosa al 1%.

## **Transfección de DNA plasmídico por electroporación en *Leishmania*.**

La transfección es una técnica que consiste en la introducción de material genético extraño en células eucariotas. En nuestro caso, el proceso se llevó a cabo mediante electroporación (Kapler et al. 1990) sobre los promastigotes de *L. major* en fase logarítmica tardía de crecimiento. Los parásitos se lavaron 2 veces con PBS estéril y una vez con HBS estéril. Tras el último lavado, los parásitos se resuspenden en HBS a una concentración de  $5 \times 10^7$ /ml; 400  $\mu$ l de esta suspensión se mezclan con 50  $\mu$ L de DNA plasmídico y se incubó durante 10 min en hielo. La transfección se realizó mediante electroporación en el sistema ECM 600® de BTX, utilizando como condiciones 450 voltios, 500  $\mu$ F y 13 ohms. Tras la electroporación, los parásitos se incubaron durante 10 min en hielo y se transfirieron a 4 ml de medio RPMI modificado con 20% hiFBS, incubándose a 28 °C; a las 24 h se les añadió el antibiótico de selección. Tras sucesivos pases en presencia de concentraciones crecientes de antibiótico, los parásitos transfectados se mantienen a una concentración máxima de 500  $\mu$ g/ml.

## **Preparación de extractos totales de *L. major* para electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE.**

De forma general, empleamos parásitos en fase logarítmica tardía de crecimiento ( $2-2,5 \times 10^7$  parásitos/ml). Los parásitos se lavan con PBS y se resuspenden en tampón de lisis durante 30 min a 4 °C, adicionando posteriormente un volumen del tampón de muestra 2X para cargar geles de poliacrilamida a razón de 25  $\mu$ l de la mezcla por pocillo, equivalentes a las proteínas totales de 5 millones de promastigotes.



### **Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE y transferencia a membrana.**

La separación de proteínas en función de su tamaño se realizó mediante la técnica de electroforesis en geles desnaturizantes de poli(acrilamida) y SDS (SDS-PAGE), según el método de Laemmli (1970). La separación electroforética se realizó en geles discontinuos, compuestos por un gel superior (concentrador) preparado al 3-4,5% de acrilamida/bisacrilamida y pH 6,8, y un gel inferior (separador) al 10-14% y pH 8,8. Los porcentajes de acrilamida se eligieron en función del tamaño de las proteínas de interés a separar. La electroforesis se llevó a cabo en minigeles empleando la cubeta del sistema *mini-PROTEAN* de Bio-Rad, a 20-25 mA/gel. Como marcador de peso molecular se utilizaron los standards preteñidos de Bio-Rad.

### **Detección con anticuerpos de proteínas transferidas a membranas.**

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a membranas de PVDF *Immobilion-P* de Millipore; para ello se sumergieron las membranas, geles y papeles en tampón de transferencia. La transferencia se realizó en un aparato Trans Blot SD Semidry Cell (BioRad) a 23 voltios durante 45 min. Finalizada la transferencia, las membranas se tiñeron con una solución 0,5% Rojo Ponceau, 1% ácido acético en agua para visualizar las proteínas y determinar la eficiencia de la transferencia, destiñéndose con agua bi destilada. Seguidamente, la membrana se bloqueó en una solución de leche desnatada 5% en PBS durante 14 h a 4 °C, como paso previo a la inmunodetección de las proteínas transferidas.

Posteriormente, las membranas se incubaron a temperatura ambiente, durante una hora, con el anticuerpo primario correspondiente a la dilución requerida en tampón de bloqueo (1% BSA en PBS) con un 0,05% de Tween-20. Tras 3 lavados de 5 min con tampón de bloqueo, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o ratón conjugado a peroxidasa (1/5.000) durante

30 min. Después de 2 lavados, la membrana se reveló incubándola bajo las mismas condiciones que el anterior y utilizando para el revelado los sustratos ECL Plus™.

### **Biotinilación de las proteínas de la superficie de la membrana plasmática de *Leishmania*.**

Los promastigotes en fase logarítmica ( $1 \times 10^8$ ) son lavados con PBS e incubados en hielo con 1 mM EZ-Link Sulfo-NHS-SS-biotin (Pierce, Thermo Fisher, Rockford, IL) en 1 ml de PBS durante 2 h a 4°C en las que la biotina se une específicamente a aminos primarios de las proteínas de la superficie celular (Fig. M-6). La reacción de biotinilación se detuvo mediante tres lavados con PBS suplementado con 50 mM Tris-HCl. Después, los parásitos se incubaron en PBS con 3% n-dodecil- $\beta$ -D-maltopiranosido (DDM) durante 30 min para solubilizar las proteínas presentes en la muestra. El lisado resultante se centrifugó a  $13,000 \times g$  durante 20 min a 4°C, y el sobrenadante obtenido se incubó con 100  $\mu$ l de streptavidina-agarosa (Pierce) previamente lavada con tampón de lisis suplementado con 0.05 % DDM. Las esferas de agarosa se lavaron 2 veces y las proteínas se eluyen con 30  $\mu$ l de tampón Laemmli. La inmunodetección se llevó a cabo empleando la dilución 1:5000 del anticuerpo policlonal anti-GFP o 1:3000 del anticuerpo policlonal anti-LRos3, como control de proteína integral de membrana plasmática (Sánchez-Cañete et al. 2009). La integridad de la membrana plasmática se determinó mediante la inmunodetección con el anticuerpo monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin (Sigma-Aldrich), a una dilución 1:5000.

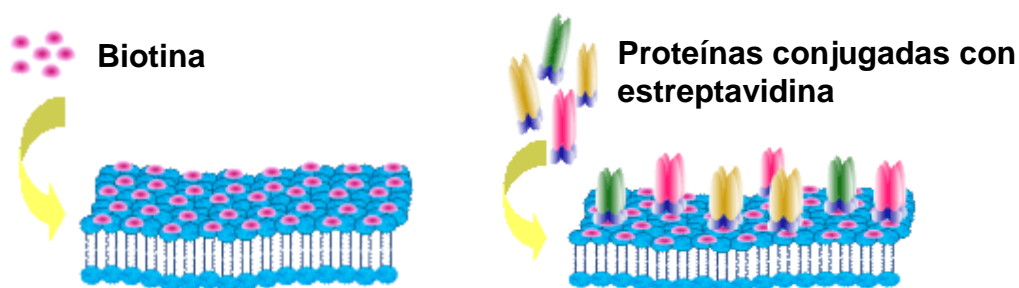


Figura M-6. Modelo de biotinylation de las proteínas de la superficie celular de *Leishmania*.

### **Determinación de la formación de homodímeros de ABCI4 mediante ensayos de co-inmunoprecipitación.**

Los promastigotes ( $8 \times 10^8$ ) que expresaban 3FLAG-ABCI4 y 3FLAG- más GFP-ABCI4 se lavaron con PBS, resuspendidos en 1 ml de tampón de lisis y lisados durante 45 min a 100 bares de presión de  $N_2$  en un cavitador (ASHCROFT®, USA). Los lisados de parásitos se centrifugan a  $1000 \times g$  para eliminar grandes restos celulares y parásitos sin romper, después el sobrenadante se centrifuga a  $100,000 \times g$  a  $4^\circ C$  durante 1 h para obtener fracciones enriquecidas en membranas y orgánulos. Los botones obtenidos se solubilizan con  $550 \mu l$  de tampón de lisis suplementado con 2.5% DDM y la solución resultante se centrifugó a  $100,000 \times g$  a  $4^\circ C$  durante 30 min. Los sobrenadantes se incuban con esferas magnéticas unidas covalentemente a anti-GFP durante 24 h a  $4^\circ C$ . Después de la incubación, las esferas se lavan 3 veces con PBS suplementado con 0.05% DDM y se eluyen con tampón Laemmli. Tras realizar un aelectroforesis y un Western blot, la inmunodetección de la ABCI4 fusionado con GFP y FLAG se realiza empleando una dilución 1:5000 del anticuerpo policlonal anti-GFP o 1:2000 del anticuerpo policlonal anti-FLAG.

## **Infección de macrófagos peritoneales por líneas de *Leishmania*.**

Los macrófagos peritoneales se obtienen de ratones BALB/c (Charles River Ltd.), según el protocolo habitual del laboratorio (Campos-Salinas et al. 2013) consistente en la inoculación en la cavidad peritoneal de los ratones de medio de cultivo RPMI sin suero, seguido de un masaje peritoneal y posterior extracción del medio de cultivo. A continuación, las células obtenidas se lavan con medio RPMI 1640 frío, y se siembran a una densidad de  $3 \times 10^5$  macrófagos/pocillo en medio RPMI-1640 suplementado con 10% hiFBS en placas de 24 pocillos con cristales ( $22 \text{ mm}^2$ ), dejándolos adherirse durante 4 h a  $37^\circ\text{C}$  con 5%  $\text{CO}_2$ . Posteriormente, los macrófagos se infectan a  $35^\circ\text{C}$  con promastigotes en fase estacionaria del crecimiento en una relación parásito/célula de 5:1 en RPMI-1640 con 5% de hiFBS. Después de 6 h de infección, los parásitos que no han sido fagocitados se eliminan mediante lavados con medio libre de suero.

Los macrófagos infectados se incubaron en RPMI 1640 suplementado con 10% hiFBS durante 24 y 72 h a  $37^\circ\text{C}$  en atmósfera con un 5% de  $\text{CO}_2$ . Después de la incubación, las muestras se fijaron con 2.5% de paraformaldehído en PBS durante 20 min a  $4^\circ\text{C}$  y se permeabilizan posteriormente con 0.1% Triton X-100 en PBS durante 10 min. Los parásitos intracelulares se detectan mediante tinción nuclear con Prolong-Gold antifade agent con DAPI (Invitrogen). El porcentaje de infección y el número de amastigotes por macrófagos se determinó en 200 macrófagos por pocillo.

## **Infección de células THP-1 por líneas de *Leishmania*.**

Para inducir la diferenciación de los monocitos THP-1 en macrófagos,  $5 \times 10^5$  células/pocillo en placas de 24 pocillos con cristales estériles en el fondo, son tratadas con 20 ng/ml de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) durante 48 h, seguido de 24 h en medio fresco (El Fadili et al. 2008). Estas células se

## Material y métodos

---

infectaron con formas promastigotas de *Leishmania* en fase logarítmica tardía en una relación 1:10 macrófago/parásito a 35°C y 5% CO<sub>2</sub> durante toda la noche. Los macrófagos infectados se mantuvieron en medio de cultivo a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> durante 24 y 72 h. A continuación, los macrófagos se fijaron con 2.5% paraformaldehído en PBS durante 30 min y se permeabilizaron con 0.1% Triton X-100 en PBS durante otros 30 min. Las formas amastigotas intracelulares se visualizaron tñiendo el núcleo con DAPI (Invitrogen). La actividad de los compuestos se determinó teniendo en cuenta el porcentaje de infección y el número de formas amastigotas intracelulares por célula en relación con las células no tratadas.

### **Determinación de la concentración inhibitoria 50 del crecimiento en formas promastigotas y amastigotas intracelulares de *Leishmania*.**

Para determinar la susceptibilidad a los compuestos en formas promastigotas se utiliza como dato de referencia la EC<sub>50</sub>, que se calcula utilizando un método colorimétrico basado en la reducción de MTT. El método se basa en la capacidad de las enzimas deshidrogenasas de los parásitos de convertir el sustrato MTT, soluble y amarillo, en el producto formazán, insoluble y de color azul. La cantidad de producto formado depende del número de células y de la viabilidad de las mismas.

La EC<sub>50</sub> se define como la concentración de los compuestos requerida para inhibir el crecimiento de los parásitos al 50% en cultivo y se determina tras 72 h de incubación, correspondiente con la fase logarítmica tardía de crecimiento.

Para realizar los ensayos de susceptibilidad a fármacos, se sembraron 300.000 parásitos/pocillo en un volumen final de 100 µl de medio de cultivo en una placa de microtitulación de 96 pocillos, y se incubó durante 72 h a 28°C en

presencia de distintas concentraciones de los diferentes compuestos, por duplicado. A continuación, se añadieron 10  $\mu$ l de MTT (5 mg/ml), y se incubó 4 h a 28°C para permitir la formación de los cristales de formazán. Finalmente, los cristales se disolvieron añadiendo 50  $\mu$ l de SDS 20% e incubando en oscuridad a 37°C durante 4-6 h. La reducción de MTT se determinó leyendo la  $DO_{540}$ .

Para determinar la relación entre los niveles de tioles y la susceptibilidad de las diferentes líneas de *Leishmania*, se adicionó BSO a una concentración final de 3 mM 48 h antes de los ensayos de sensibilidad.

Para determinar la susceptibilidad de las formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* a antimoniales ( $Sb^{III}$  y  $Sb^V$  [Pentostam<sup>®</sup>]), los macrófagos peritoneales extraídos de ratón se infectaron con los parásitos en una relación macrófago/parásito de 1:10. Los cultivos de macrófagos infectados se incubaron con diferentes concentraciones del fármaco durante 72 h. El porcentaje de infección y el número de formas amastigotas por macrófago infectado se determinó a partir del conteo de al menos 200 macrófagos por pocillo.

En el caso en el que se utilizan potenciales inhibidores de la actividad de ABCI4, estos se adicionan al medio de cultivo a una concentración fija (0.5, 5 o 20  $\mu$ M dependiendo de la toxicidad intrínseca del compuesto) y están presentes a lo largo de todo el experimento.

### **Microscopia de fluorescencia en líneas de *Leishmania*.**

Los parásitos que expresaban ABCI4 fusionado a GFP en fase logarítmica se emplearon para los estudios de localización subcelular. La mitocondria se marcó con 50 nM de Mitotracker Red (Invitrogen) durante 30 min a 28°C en medio RPMI sin hiFBS. Posteriormente, los promastigotes se lavaron con PBS y se analizaron con un microscopio confocal Axiovert (TCS SP5 model; Leica) operando con un láser He/Ne a 543 nm para Mitotracker Red y con un láser de Argón a 488 nm

## Material y métodos

---

para GFP; siendo posteriormente escaneada la imagen con un equipo MRC1024 model confocal scanning láser. Para los estudios de localización de ABC14 fusionado con 3 epítomos FLAG, los parásitos se lavaron 4 veces con PBS a 4 °C y se resuspendieron en PBS a una concentración de  $2 \times 10^6$  parásitos/ml. Se utilizaron portaobjetos provistos con 10 círculos de 6 mm de diámetro (BioMérieux). Para su fijación, los portaobjetos con parásitos se incuban durante 30 min con p-formaldehído al 1% y se depositaron 20  $\mu$ l de la suspensión de parásitos por círculo, dejándose secar completamente a temperatura ambiente y almacenándose a -20 °C hasta su utilización. Para la inmunofluorescencia, las preparaciones se incubaron con anti-FLAG diluido en tampón IFI (PBS/0,1% BSA) 1/100 durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Se lavaron 3 veces en tampón IFI y se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado a fluoresceína (Sigma), diluido 1/500 en tampón IFI 1h a 37 °C en cámara húmeda. Los portaobjetos se lavaron 3 veces en tampón IFI y se dejaron secar protegidos de la luz. Se utilizó el microscopio de fluorescencia Olympus (Germany) con un objetivo 100X usando un filtro FITC.

## **Determinación de la acumulación y eflujo de antimonio en líneas de *Leishmania* mediante ICP-MS (Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo).**

Las formas promastigotas ( $1 \times 10^8$ / ml) se incubaron con 100  $\mu$ M de  $Sb^{III}$  en medio de cultivo M-199 durante 5, 10, 30 y 60 min a 28°C, después los parásitos se centrifugaron y el botón resultante se conservó a -80°C hasta la posterior medida de acumulación de antimonio (Brochu et al. 2003). Para determinar el eflujo, las diferentes líneas se incubaron con concentraciones compensadas de antimonio (100  $\mu$ M para las líneas de *Leishmania* pXG-Hyg y ABC14<sup>K/M</sup> y 200  $\mu$ M para la línea ABC14) en medio de cultivo a 28° C durante 1 h para permitir un

marcaje similar entre las diferentes líneas de parásitos. Los parásitos se lavaron con PBS, resuspendidos en medio de cultivo a 28° C y se centrifugaron a diferentes tiempos (0, 30, 60, 120 y 180 min). El botón de parásitos para la determinación de la acumulación o eflujo de antimonio se disolvió en 200 µl de ácido nítrico concentrado durante 24 h a temperatura ambiente. La muestra se diluyó hasta 3 ml con agua destilada y después se inyectó en un ICP-MS (PerkinElmer) para la cuantificación. El antimonio se midió empleándose las relaciones masa/carga (m/z) 121 y 123, y rodio como control interno.

Cuando se emplearon los compuestos D2 y D4, potenciales inhibidores de ABCI4, estos se encontraron presentes a una concentración de 20 µM a lo largo de todo el experimento de acumulación y eflujo. Durante el experimento de eflujo en presencia de los inhibidores D2 y D4, no se compensaron las concentraciones de antimonio porque al inhibir ABCI4 se pueden alcanzar concentraciones intracelulares de antimonio similares a las del control.

### **Acumulación y eflujo de cadmio.**

El ensayo de acumulación de cadmio se realizó utilizando la sonda fluorimétrica Leadmium Green (Invitrogen). Los promastigotes ( $1 \times 10^7$ ) se incubaron con 100 µM de Cd<sup>II</sup> en tampón salino (21 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl y 6 mM glucosa, pH 7) durante 10, 30, 60, 120 y 180 min a 28°C. Los parásitos se centrifugaron y se lavaron dos veces con tampón salino. Después de la incubación, los parásitos se transfirieron a una microplaca de 96 pocillos, la sonda se añadió siguiendo las instrucciones del fabricante, incubándose los parásitos a 37°C durante 30 min. La fluorescencia de las muestras se midió a  $525 \pm 20$  nm tras excitación previa a  $488 \pm 20$  nm empleando un lector de placas Infinite F200 Luminescence System (Tecan Austria GmbH). La concentración de Cd<sup>II</sup> se estimó interpolando contra una curva de referencia. Para determinar el eflujo de Cd<sup>II</sup>, las líneas pXG-Hyg y ABCI4 se incubaron con concentraciones compensadas del metal (100 y 175 µM, respectivamente), de acuerdo a los



## Material y métodos

---

experimentos previos de acumulación. Los parásitos se incubaron durante 1 h, se lavaron con tampón salino y se midió la fluorescencia retenida tras 0, 60, 120, 180 y 240 min.

Para comprobar la actividad del transportador ABCI4 en la mitocondria, se realizaron experimentos de acumulación y eflujo de  $Cd^{II}$  en un tampón con 125 mM sacarosa, 65 mM KCl, 10 mM HEPES, 1 mM  $MgCl_2$ , 2.5 mM fosfato potásico y 2 mM succinato más 20  $\mu M$  de digitonina, y en presencia o ausencia de 5 mM de ATP/ADP y de 1  $\mu M$  de oligomicina (inhibidor de la bomba  $F_1/F_0$  ATPasa mitocondrial).

### **Acumulación y eflujo de zinc-mesoporfirina.**

Las formas promastigotas en fase logarítmica de crecimiento se lavaron y resuspendieron en medio HPMI en una concentración final de  $5 \times 10^7$  promastigotes/ml. Los parásitos se incubaron con 10  $\mu M$  zinc-mesoporfirina (ZnMP) a 28°C durante 10 min y se lavaron con PBS suplementado con 5% BSA. Finalmente, los parásitos se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS y la fluorescencia retenida se midió mediante citometría de flujo (excitación a 405 nm y emisión entre 575 y 585 nm) empleando un FACS Aria Cell Sorter III (Beckton Dickinson, San Jose, CA). Para determinar el eflujo de ZnMP, las líneas de *Leishmania* pXG-Hyg y ABCI4<sup>K/M</sup> se cargaron con 10  $\mu M$  de ZnMP, mientras que la línea que sobreexpresaba ABCI4 se cargó con 20  $\mu M$  para permitir un marcaje similar dependiente de los experimentos previos de acumulación. Los parásitos se lavaron con PBS y se midió la fluorescencia retenida a diferentes intervalos de tiempo (0, 30, 60 y 120 min) mediante citometría de flujo.

En el caso del uso de los compuestos D2 y D4, estos se encuentran presentes a una concentración de 20  $\mu M$  a lo largo de todo el experimento de acumulación y eflujo. En el eflujo de porfirina no se compensan las concentraciones.

## **Acumulación y eflujo de feoforbida A.**

Feoforbida A es un ca tabolito porfirínico fototóxico de la clorofila. Los parásitos ( $1 \times 10^7$ ) se resuspendieron en 1 ml de tampón HPMI y se incubaron con  $10 \mu\text{M}$  de feoforbida A durante 30 min a  $28^\circ\text{C}$  (Robey et al. 2004). Posteriormente, los cultivos se lavaron con PBS y la fluorescencia retenida se midió mediante citometría de flujo empleando un citómetro FACScan (Becton-Dickinson, San Jose, CA) (excitación a 488 nm y emisión entre 515 y 545 nm). Para el eflujo de feoforbida A, después de la incubación con  $10 \mu\text{M}$  de feoforbida A durante 30 min a  $28^\circ\text{C}$ , los parásitos se lavaron con PBS, resuspendiéndose en medio HPMI para posteriormente medir la fluorescencia retenida a los 60 min.

## **Determinación de tioles no proteicos.**

Los niveles de tioles no proteicos se determinó mediante citometría de flujo empleando la sonda fluorescente CellTracker. Los parásitos ( $1 \times 10^7$  promastigotes/ml) se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con  $2 \mu\text{M}$  de CellTracker durante 15 min a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente, se lavaron con PBS y se analizaron mediante citometría de flujo con un citómetro FACScan (Becton-Dickinson, San Jose, CA) (excitación a 488 nm y emisión entre 515 y 545 nm).

El eflujo de tioles al medio se determinó empleando el reactivo fluorescente ThioStar (Luminos, Ann Arbor, MI) que reacciona con tioles no proteicos libres. Los parásitos ( $1 \times 10^8$ ) se incubaron con  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{Sb}^{\text{III}}$  durante 1 h en 1 ml de tampón HBS, seguido por dos lavados con PBS y resuspendidos de nuevo en HBS sin antimonio. Se recogieron parásitos a distintos intervalos de tiempo (30, 60, 120 y 180 min) y tanto el sobrenadante como los botones obtenidos se trataron con ácido tricloroacético al 12% durante 30 min a  $4^\circ\text{C}$  para desproteínizar las muestras, después se centrifugaron a  $13,000 \times g$ . Los sobrenadantes se diluyeron con HBS, para reducir la concentración de ácido tricloroacético hasta el 2%, y después se transfirió a una microplaca de 96 pocillos para su incubación

## **Material y métodos**

---

con 3 µg/ml de ThioStar durante 1 h a temperatura ambiente. La fluorescencia (Exc. 370 nm; Em. 490 nm) se midió empleando un lector de placas Infinite F200 Luminescence System (Tecan Austria GmbH). Diferentes concentraciones de GSH se utilizaron como control de la dependencia de señal de ThioStar y concentración de tioles.

En el caso del uso de los compuestos D2 y D4, estos se encuentran presentes a una concentración de 20 µM a lo largo de todo el experimento.

### **Medida del potencial de membrana mitocondrial.**

La medida del potencial de membrana mitocondrial se realizó utilizando la sonda fluorescente JC-1 (Invitrogen). JC-1 es un compuesto catiónico fluorescente que emite en el rango verde del espectro de luz visible como monómero y en el rango del rojo como agregado en la mitocondria. La relación que se establece entre la proporción como monómero y como agregado es dependiente del potencial de membrana mitocondrial. Los parásitos ( $4 \times 10^6$  promastigotes/ml) en fase logarítmica, se incubaron con 100 µM de  $Sb^{III}$  durante 30, 60, 120, 240 y 360 min en tampón HBS, y posteriormente se lavaron con PBS y se incubaron con 5 µM de JC-1 durante 10 min. La fluorescencia celular se determinó calculando la relación FL2/FL1 usando un citómetro de flujo FACScan (Becton-Dickinson, San Jose, CA). Como control positivo de despolarización total mitocondrial se emplearon los parásitos incubados con 10 µM FCCP durante 10 min.

### **Medida de ATP.**

El ATP total se midió utilizando el kit CellTiter-Glo (Promega) que genera una señal luminiscente proporcional a la cantidad de ATP presente en la muestra (Manzano et al. 2010).

Los parásitos ( $4 \times 10^6$  promastigotes/ml) en fase logarítmica se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  en medio M-199 suplementado con 10% hiFBS conteniendo  $100 \mu\text{M}$   $\text{Sb}^{\text{III}}$  durante 30, 60, 120, 240 y 360 min. La concentración de  $\text{Sb}^{\text{III}}$  a la vez que el tiempo de incubación se seleccionó monitorizando la viabilidad de los parásitos mediante microscopia. Posteriormente, una alícuota de 25  $\mu\text{l}$  de parásitos se pasó a una placa de 96 pocillos y se mezcló con el mismo volumen de CellTiter-Glo, incubándose en oscuridad durante 10 min. La bioluminiscencia resultante se midió con un lector de placas Infinite F200 (Tecan Austria GmbH, Austria).

### **Medida de la producción de ROS.**

La generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) se midió utilizando una sonda permeable no fluorescente llamada  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  (Moreira et al. 2011). Los parásitos ( $4 \times 10^6/\text{ml}$ ) se incubaron con concentraciones crecientes de  $\text{Sb}^{\text{III}}$  durante 48 h a  $28^\circ\text{C}$ . Después de la incubación en presencia de  $\text{Sb}^{\text{III}}$ , los promastigotes se lavaron con PBS, resuspendiéndose en HBST tampón y posteriormente se incubaron con 40 nM de  $\text{H}_2\text{DCFDA}$  durante 30 min a  $28^\circ\text{C}$ . El producto fluorescente (DCF) obtenido tras la acción de corte de las esterasas se midió mediante citometría de flujo (FACScan Becton-Dickinson, San Jose, CA; excitación: 488 nm; emisión: 535 nm).

De forma similar, para medir la producción de ROS mitocondrial usamos una sonda permeable y fluorescente denominada MitoSOX Red (Moreira et al. 2011). Los parásitos ( $4 \times 10^6/\text{ml}$ ) se incubaron con  $5 \mu\text{M}$  MitoSOX durante 2 h a  $28^\circ\text{C}$ , siendo posteriormente lavados con PBS y resuspendidos en medio de cultivo con concentraciones crecientes de  $\text{Sb}^{\text{III}}$  durante 48 h a  $28^\circ\text{C}$ . Transcurrido el periodo de incubación, la fluorescencia de MitoSOX oxidado se midió mediante citometría de flujo (excitación: 488 nm; emisión: 580 nm).

### **Determinación de la localización mitocondrial en parásitos permeabilizados con digitonina.**

Los promastigotes ( $2 \times 10^7$ ) transfectados con el plásmido que contiene GFP-ABC14 se centrifugan y se lavan con tampón PBS, posteriormente se resuspenden en tampón de lisis con las respectivas concentraciones de digitonina (20, 40, 120 y 300  $\mu\text{M}$ ) en hielo durante 30 min. Posteriormente, se adiciona tripsina a una concentración final de 1 mM durante 5 min en hielo, pasado este tiempo se centrifugan y se lavan con PBS. Como control positivo se emplean parásitos permeabilizados con Triton X-100 2%. Los botones obtenidos son disueltos con tampón Laemmli y las muestras se corren en un gel de acrilamida y se transfieren a una membrana. Esta membrana se incuba con anti-GFP y anti-HMGCoA reductasa (control de matriz mitocondrial) a las diluciones requeridas.

# RESULTADOS



## **RESULTADOS**

### **Secuencia y análisis predictivo de la estructura del transportador ABCI4 de *Leishmania*.**

El gen ABCI4 (LmjF33.3260) forma parte del cromosoma 33. En una clasificación reciente de la familia de transportadores ABC en *Leishmania*, ABCI4 se agrupó, por su bajo porcentaje de homología con el resto de transportadores ABC, junto con otros 3 genes no relacionados (ABCI1 (LmjF12.1190), ABCI2 (LmjF32.2060) y ABCI3 (LmjF33.3040)) en una nueva familia que hemos denominado ABCI (Leprohon et al. 2006). Para ello, hemos seguido el procedimiento habitual de nomenclatura en organismos eucariotas de otros transportadores ABC (como el transportador de plantas, Kang et al. 2011), que no se engloban dentro de ninguna subfamilia por su bajo nivel de homología, seguido con la letra siguiente a la última subfamilia reconocida y el número correspondiente a su ordenación en el genoma.

El gen ABCI4 codifica para una proteína de 949 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 103 kDa. ABCI4 presenta todas las características típicas de un “half-transporter” con un único dominio hidrofílico de unión a ATP (NBD) situado en el extremo carboxilo, y un dominio transmembrana (TMD), con seis segmentos transmembrana hidrofóbicos (Fig. R-1).

En el NBD se encuentran las regiones más conservadas de los transportadores ABC: Walker A, Walker B, y el motivo sello de la familia (Fig. R-2).



## Resultados

---

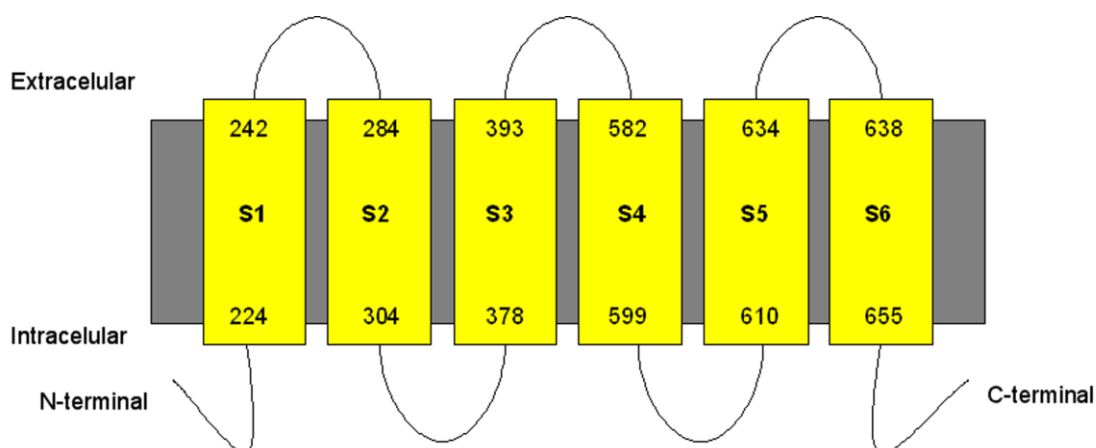


Figura R-1. Predicción de segmentos de transmembrana obtenida a partir de la secuencia aminoacídica del transportador ABCI4 de *Leishmania*. S1, S2, S3, S4, S5 y S6 corresponde a los 6 segmentos transmembrana predichos, mientras que los números incluidos corresponden al número de aminoácido dentro de la secuencia aminoacídica de la proteína. Los programas empleados fueron TMpred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) y MEMSAT-SVM (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

La búsqueda de homologías con otras proteínas se realizó mediante el programa Blastp utilizando los bancos de datos Swiss-Prot y TrEMBL ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/simsearch\\_blast.pl](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/simsearch_blast.pl)) y la base de datos de genomas de trypanosomátidos TritypDB (<http://tritypdb.org/tritypdb/>). El ABCI4 de *L. major* está conservado en las otras especies de *Leishmania* cuyo genoma ha sido secuenciado: *L. donovani*, *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. braziliensis* y *L. tarentolae* con un porcentaje de identidad del 92, 92, 89, 76 y 78% respectivamente. ABCI4 presenta una homología significativa con otras proteínas ABC del género *Trypanosoma*: *T. brucei*, *T. brucei gambiense*, *T. congolense*, *T. congolense*, *T. cruzi*, *T. evansi* y *T. vivax*. La similitud con los genes de trypanosomátidos se localiza principalmente en el NBD con un 43-45% de identidad (tabla R-1). El análisis del alineamiento entre la secuencia completa de ABCI4 y los homólogos de *Trypanosoma sp.* llevado a cabo con el programa CLUSTALW ([http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa\\_automat.pl?page=/NPSA/npsa\\_clustalw.html](http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_clustalw.html)), reveló unos porcentajes de identidad del 17-23% y una similitud del 35-41%. La comparación realizada con otros genomas mostró que ABCI4 solo presenta similitud con proteínas de la familia ABC y concretamente en la zona

correspondiente al NBD. La búsqueda mediante Blastp produjo un alineamiento a nivel de NBD, mientras que los TMD no presentaban ningún emparejamiento significativo. De esta manera, ABCI4 mostró mayor similitud con “half-transporters” con configuración TMD-NBD entre los que se encuentran las proteínas bacterianas exportadoras del lípido A, beta(1-2)glucano y alfa-hemolisina (MsbA, NdvA y HlyB) o miembros de la familia ABCB de eucariotas con localización mitocondrial: ATM1 de hongos, ABCB6, ABCB7/ATM1, ABCB8 y ABCB10 de mamíferos, ABCB23/ATM1 y ABCB24 de plantas y las posibles proteínas mitocondriales ABCB1 y ABCB3 de *L. major* (Tabla R-1).

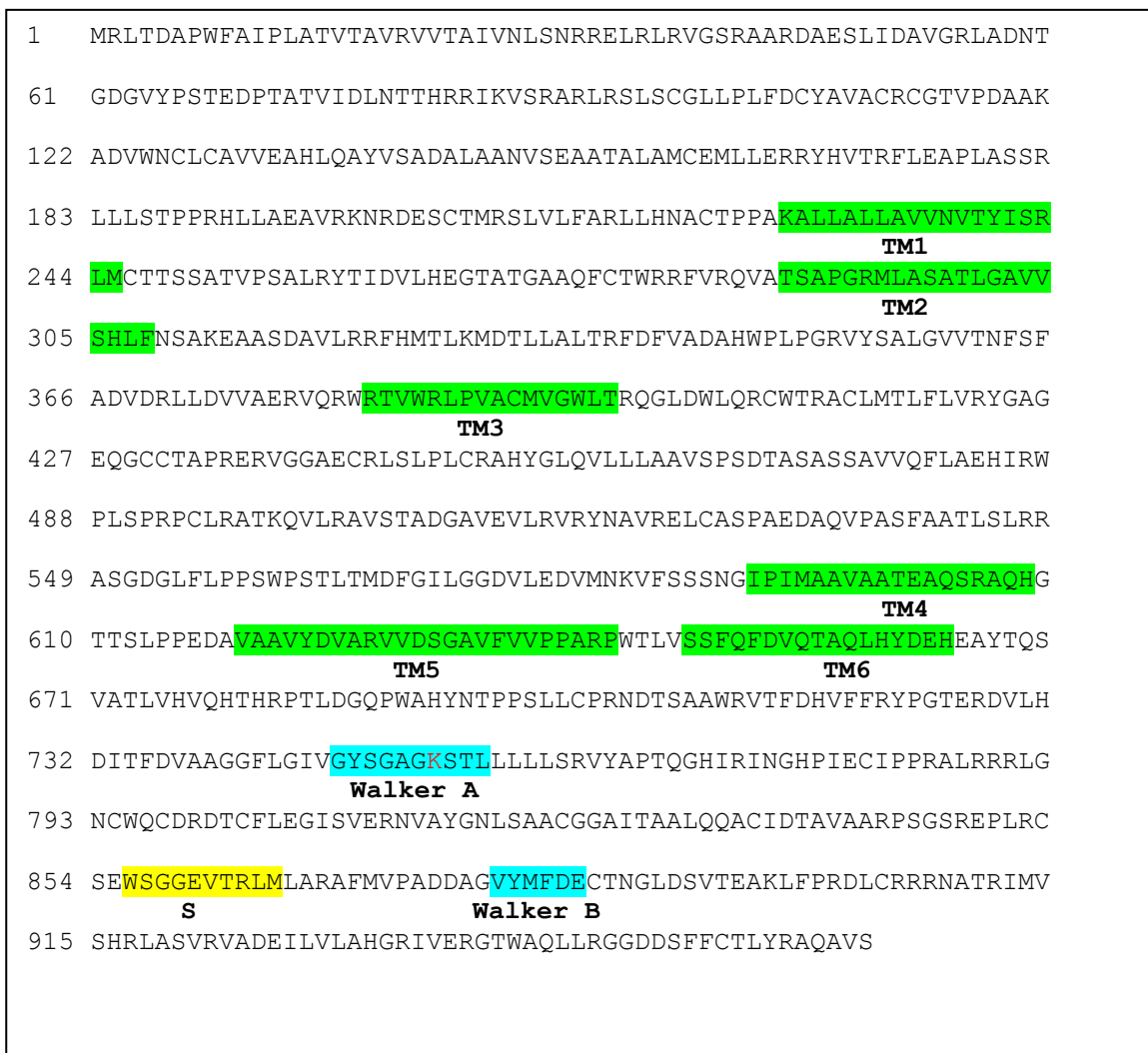


Figura R-2. Secuencia de la proteína ABCI4 de *L. major*. Se indican el sello de la familia (amarillo), los motivos Walker A y B (azul) y los posibles fragmentos transmembrana (verde). Los números en el margen izquierdo indican la posición aminoácida dentro de la proteína.

## Resultados

---

**Tabla R-1. Homología entre el NBD de ABCI4 y el de otros transportadores ABC.**

		%I (%S) <sup>a</sup>
<i>T. brucei</i>	Tb.927.2.6130	43 (61)
<i>T. brucei gambiense</i>	Tbg.972.2.428	43 (60)
<i>T. congolense</i>	TcIL3000_0_4990	43 (59)
<i>T. cruzi</i>	TCSYLVIO_004019	45 (59)
<i>T. evansi</i>	TevSTIB.805.2.3480	43 (60)
<i>T. vivax</i>	TvY486.0003500	44 (60)
<b><u>Bacterias</u></b>		
<i>Rhodofera ferrireducens</i>	MsbA	34 (53)
<i>Agrobacterium vitris</i>	NdvA	37 (55)
<i>Escherichia coli</i>	HlyB	31 (50)
<b><u>Familia ABCB:</u></b>		
<b><u>Leishmania</u></b>		
<i>L. major</i>	ABCB1	30 (49)
<i>L. major</i>	ABCB3	31 (51)
<b><u>Hongos</u></b>		
<i>Candida albicans</i>	ATM1	33 (52)
<b><u>Mamíferos</u></b>		
<i>Homo sapiens</i>	ABCB6	36 (52)
<i>Homo sapiens</i>	ABCB7/ATM1	35 (55)
<i>Homo sapiens</i>	ABCB8	31 (51)
<i>Homo sapiens</i>	ABCB10	31 (50)
<b><u>Plantas</u></b>		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABCB23/ATM1	36 (52)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ABCB24	36 (53)

<sup>a</sup> %I y %S son los porcentajes de identidad y similitud entre secuencias de aminoácidos.

## **Resultados I: Caracterización funcional y localización del transportador ABCI4 de *Leishmania*.**

Las diferentes construcciones obtenidas para el análisis de la localización y función del transportador ABCI4, se emplearon para la transfección de *L. major*. Posteriormente, se analizó la expresión de ABCI4 mediante RT-PCR (Fig. R-3).

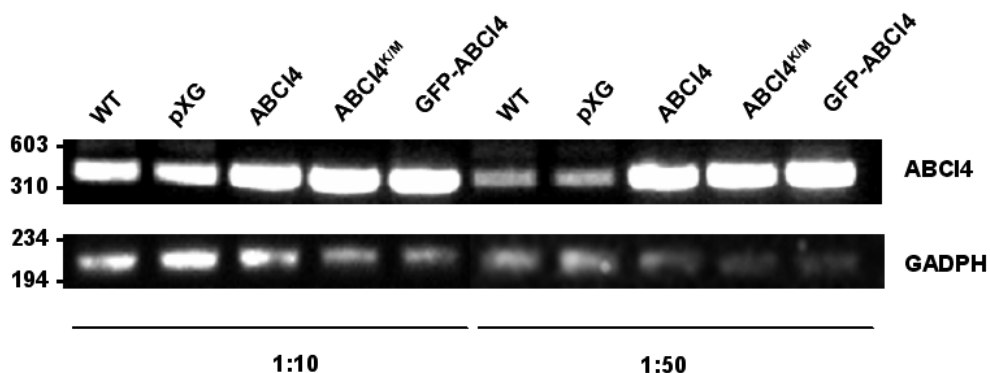


Figura R-3. Análisis de la expresión génica del transportador ABCI4 en *L. major*. Panel superior: Expresión génica de ABCI4 mediante RT-PCR, mostrando la amplificación de un fragmento esperado de 525 pb. Panel inferior: Expresión génica de GADPH como control interno de carga, mostrándose un fragmento amplificado de 226 pb de GADPH. El RNA total se extrajo de parásitos WT (salvaje), pXG-Hyg (control), ABCI4, ABCI4<sup>K/M</sup> y GFP-ABCI4, y después reversotranscrito en cDNA. Los cDNAs se amplificaron mediante PCR a las diluciones 1:10 y 1:50. Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio. Las posiciones de los marcadores de peso molecular (pb) se encuentran indicados a la izquierda.

## **Localización del transportador ABCI4 en *Leishmania*.**

Para llevar a cabo el estudio de la localización subcelular de ABCI4, y tras varios intentos fallidos destinados a la obtención de un anticuerpo policlonal específico que reconociera la proteína mediante inmunofluorescencia indirecta, se crearon quimeras de la proteína fusionada a la proteína verde fluorescente (GFP) en el extremo amino y carboxilo de ABCI4.

## Resultados

---

Se llevaron a cabo experimentos de co-localización mediante microscopía confocal de GFP-ABCI4 con diferentes sondas, siendo significativa la co-localización con el marcador fluorescente mitocondrial MitoTracker. Además de esta localización predominantemente mitocondrial, también se podía observar, aunque con menor intensidad, una segunda localización a nivel de membrana plasmática (Fig. R-4).

El patrón de localización observado se repitió en experimentos realizados con la versión mutada del transportador ABCI4 fusionado a GFP (GFP-ABCI4<sup>KM</sup>). Sin embargo, la línea que expresaba ABCI4 fusionado a GFP en el extremo carboxilo (ABCI4-GFP) nunca pudo emplearse para estos estudios de localización subcelular debido a su bajo nivel de expresión, sugiriendo la importancia de este extremo en el mantenimiento de la estabilidad del transportador. Igualmente, se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta empleando la línea que expresa 3xFLAG-ABCI4, hallándose la misma localización observada anteriormente.

En conclusión, todos estos estudios sugieren una posible localización dual de ABCI4 en *Leishmania*, encontrándose tanto en la **mitocondria** como en la **membrana plasmática** del parásito.

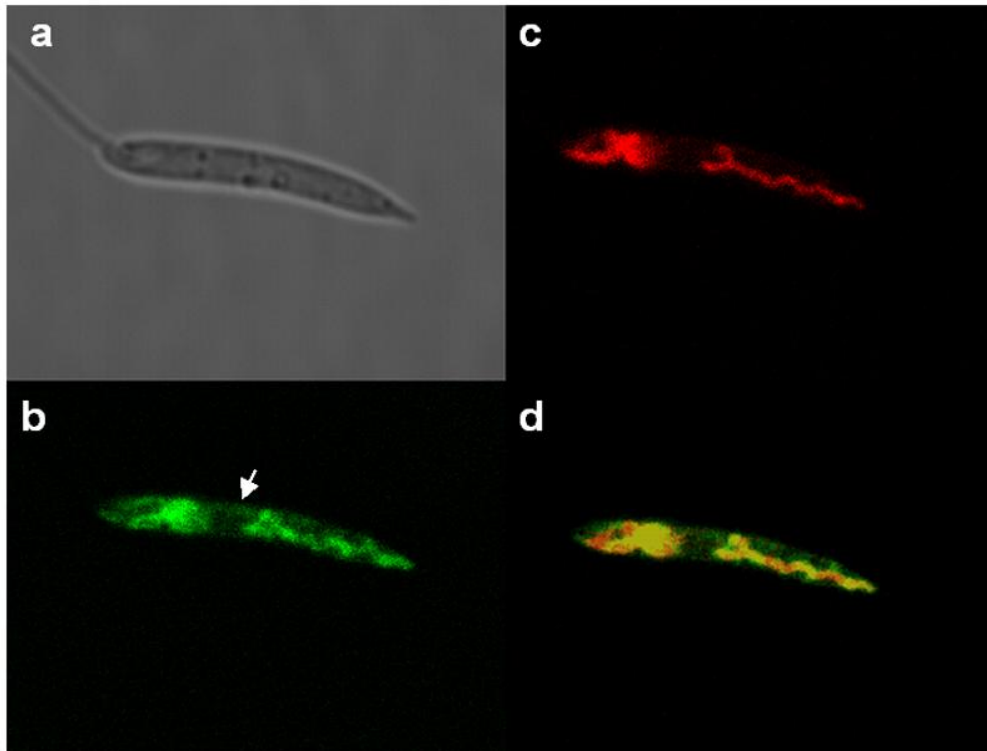


Figura R-4. ABCI4 se localiza en la mitocondria y en la membrana plasmática de *L. major*. Imágenes de formas promastigotas de *L. major* transfectadas con GFP-ABCI4 obtenidas mediante microscopia confocal. (a) con filtro Nomarski. (b) Fluorescencia verde, asociada con la proteína de fusión GFP-ABCI4. (c) Fluorescencia roja, asociada con parásitos incubados a 28 °C con 50 nM de Mitotracker Red durante 30 min. (d) La superposición de imágenes indica co-localización (amarillo) de ABCI4 con la sonda mitocondrial. La figura ilustra un parásito representativo del total de la población. La flecha indica la localización de ABCI4 en la membrana plasmática del parásito.

Adicionalmente, se realizaron estudios de biotilación de la superficie de *Leishmania*, demostrando la presencia de GFP-ABCI4 en la membrana plasmática, y corroborando así, la observación realizada mediante microscopia. De esta manera, se detectó GFP-ABCI4 en la fracción eluida a partir de estreptavidina unida a bolitas (unión estreptavidina-biotina) mediante Western Blot con anti-GFP (Fig. R-5). LRos3, una proteína de superficie del parásito, se utilizó como control positivo (Fig. R-5). No se observaron bandas inmunoreactivas contra anti- $\alpha$ -tubulina en la fracción eluida, confirmando que el reactivo de marcaje no se había introducido inespecíficamente durante el proceso (Fig. R-5).

## Resultados

---

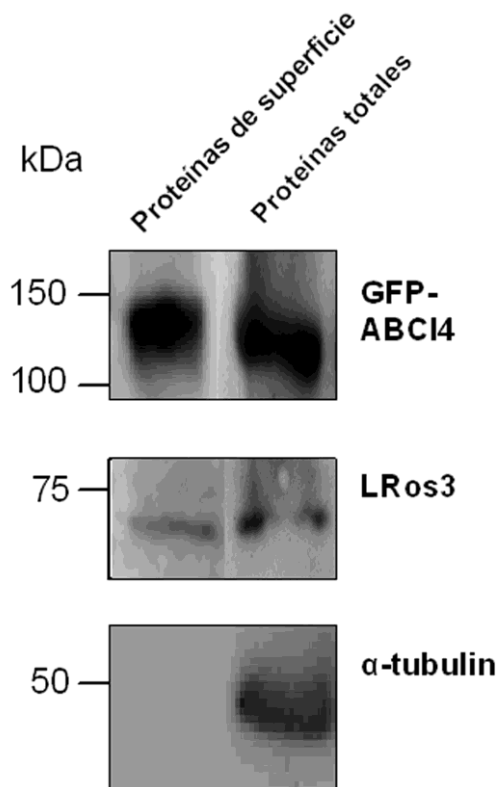


Figura R-5. Niveles de expresión de ABCI4 en la membrana plasmática de líneas de *Leishmania major* que expresa GFP-ABCI4. Se realizó la biotinilación de las proteínas de la superficie de *Leishmania*. Las proteínas biotiniladas se analizaron mediante inmunoblot con anticuerpos anti-GFP, anti-LRos3 y anti- $\alpha$ -tubulin, como se describe en Material y Métodos. El ensayo de Western blot es representativo de al menos tres experimentos independientes.

Para conocer cual era la localización de ABCI4 en la mitocondria, bien en la membrana externa o en la membrana interna mitocondrial, se utilizó como estrategia la digestión controlada con tripsina de parásitos de la línea que expresa GFP-ABCI4, permeabilizados con diferentes concentraciones de digitonina. Para ello, empleamos como control, la proteína de la matriz mitocondrial HMGCoA (3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A) (Carrero-Lérida et al. 2009). Se observó que la banda correspondiente a GFP-ABCI4 desaparecía tras la digestión con tripsina a una concentración alta de digitonina (300  $\mu$ M), en la que tanto la membrana plasmática como la membrana externa e interna mitocondrial se encuentran permeabilizadas (Carrero-Lérida et al. 2009). A su vez, la banda correspondiente a la proteína control de la matriz mitocondrial desaparecía también a dicha concentración de digitonina. Como control de permeabilización de la membrana plasmática, se empleó una línea celular que

expresa GFP, observándose la desaparición de su banda con la primera concentración de digitonina (20  $\mu$ M); de esta manera, la porción de GFP-ABCI4 localizado en la membrana plasmática no interfiere en este estudio. Como control total de permeabilización se empleó Triton X-100 (Fig. R-6).

De este estudio se concluye que la proteína GFP-ABCI4 de *Leishmania* se encuentra localizada tanto en la **membrana interna mitocondrial**, como en la **membrana plasmática**.

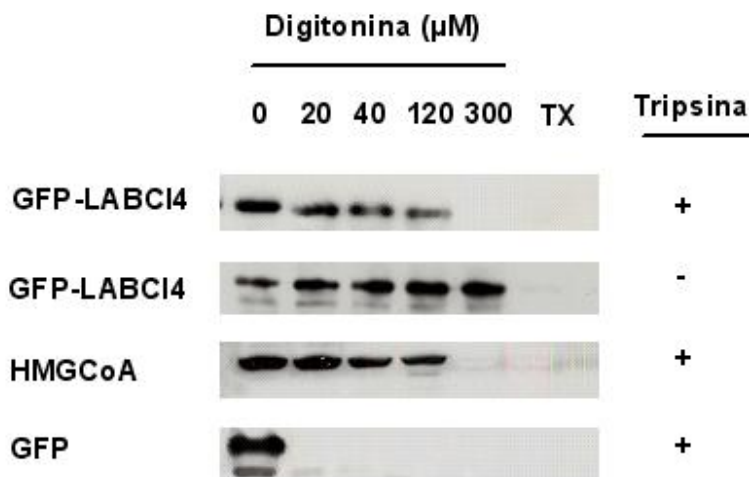


Figura R-6. Localización mitocondrial del transportador ABCI4 de *Leishmania major*. Los parásitos que expresan GFP-ABCI4 se permeabilizaron con las diferentes concentraciones de digitonina y posteriormente son sometidos o no a un tratamiento con tripsina como se describe en Material y Métodos. Posteriormente, los parásitos son lavados y las muestras son analizadas mediante Western blot empleando anticuerpos anti-GFP y anti-HMGCoA. El ensayo de Western blot es representativo de al menos tres experimentos independientes. TX (Triton X-100).

## Homodimerización del transportador ABCI4 de *Leishmania*.

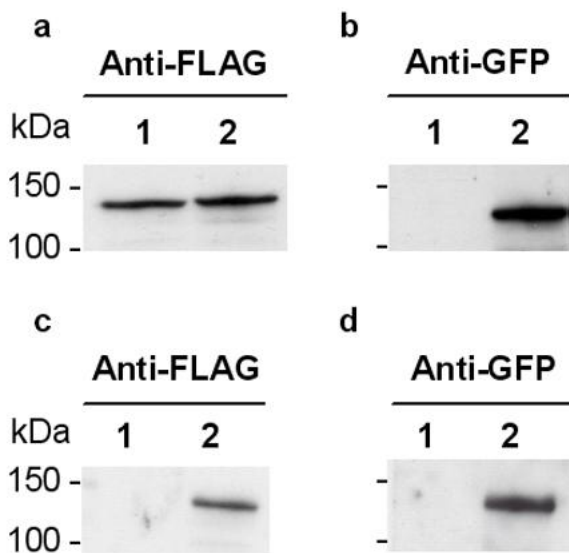
Como se ha mencionado anteriormente, la dimerización es un requisito fundamental para que los ABC “half-transporters” sean funcionalmente activos.



## Resultados

---

Con el objetivo de determinar si ABCI4 forma homodímeros, se realizó un experimento de co-inmunoprecipitación empleando parásitos que co-expresaban GFP- y 3xFLAG-ABCI4. Las proteínas unidas a anti-GFP fijada a bolitas magnéticas se visualizaron mediante inmunoblot con anticuerpos policlonales anti-GFP y anti-FLAG. El análisis del Western blot realizado con extractos totales previos a la incubación con las bolitas magnéticas mostró que los anticuerpos anti-FLAG y anti-GFP detectaban una banda específica del tamaño esperado para ABCI4 tanto fusionado a GFP como a 3xFLAG en parásitos que expresaban 3xFLAG-ABCI4, GFP-ABCI4, y en los que co-expresaban 3xFLAG-ABCI4 y GFP-ABCI4 (Fig. R-7a,b). Los ensayos de co-inmunoprecipitación realizados revelaron que el anticuerpo anti-FLAG únicamente detectaba una banda específica en la fracción eluida de los parásitos que co-expresaban 3xFLAG-ABCI4 y GFP-ABCI4 después de la incubación de los extractos solubilizados y enriquecidos en membranas con bolitas magnéticas unidas covalentemente a anti-GFP (Fig. R-7c), sugiriendo que ABCI4 forma **homodímeros**.



**Figura R-7.** El transportador ABCI4 de *Leishmania major* forma homodímeros para realizar su función de transporte. La fracción enriquecida en membranas de los parásitos de *Leishmania* (a y b) expresando 3xFLAG-ABCI4 (1) y 3xFLAG-ABCI4 y GFP-ABCI4 (2) se incubaron con bolitas magnéticas unidas covalentemente a anti-GFP. Después de la incubación, las bolitas magnéticas se lavaron, se eluyeron y analizaron mediante inmunoblot (c y d). Las posiciones correspondientes al marcador de peso molecular (kDa) se encuentran indicadas a la izquierda.

**La sobreexpresión de ABCI4 confiere resistencia antimoniales, otros metales y porfirinas tóxicas en *Leishmania*.**

Para estudiar la funcionalidad del transportador ABCI4, se emplearon principalmente líneas de *L. major* transfectadas con las construcciones que permiten sobreexpresar ABCI4 y su versión mutada ABCI4<sup>KM</sup> inactiva

La implicación de algunos transportadores de la familia ABC en la resistencia a determinados compuestos se ha demostrado y estudiado previamente (Coelho et al. 2003; Castanys-Muñoz et al. 2008; Ouellette et al. 2004; Pérez-Victoria et al. 2001). De esta manera, quisimos comprobar si la sobreexpresión de ABCI4 confería resistencia a los compuestos leishmanicidas conocidos como Sb<sup>III</sup>, anfotericina B, miltefosina, paromomicina, además de a otros relacionados con una actividad anti-protozoaria tales como aminoquinolinas (sitamaquina, tafenoquina, cloroquina, mefloquina y primaquina), quinina, azoles (ketoconazol), daunomicina y As<sup>III</sup> y a las protoporfirinas tóxicas Zinc-protoporfirina (ZPP) y feoforbida A.

## Resultados

**Tabla R-2. Resistencia a fármacos en las diferentes líneas de *L. major*<sup>a</sup>.**

Compuesto	Promastigote EC <sub>50</sub> (μM) [RI] <sup>b</sup>		
	pXG-Hyg	ABC14	ABC14 <sup>K/M</sup>
Sb (III)	20.87 ± 1.80	53.74 ± 3.35 [2.6]*	21.16 ± 3.60 [1.0]
As (III)	2.62 ± 0.69	5.14 ± 0.50 [2.0]*	1.97 ± 0.36 [0.8]
Anfotericina B	0.14 ± 0.01	0.11 ± 0.01 [0.8]	0.09 ± 0.01 [0.6]
Miltefosina	20.08 ± 1.30	16.39 ± 1.12 [0.8]	20.79 ± 0.60 [1.0]
Paromomicina	25.36 ± 2.36	27.54 ± 3.21 [1.1]	26.31 ± 0.97 [1.0]
Tafenoquina	4.98 ± 0.20	4.90 ± 0.16 [1.0]	3.47 ± 0.28 [0.7]
Sitamaquina	11.52 ± 1.23	11.72 ± 1.52 [1.1]	11.09 ± 0.98 [1.0]
Primaquina	3.69 ± 0.37	4.14 ± 0.65 [1.1]	2.27 ± 0.24 [0.6]
Cloroquina	2.82 ± 0.23	2.32 ± 0.14 [0.8]	1.88 ± 0.21 [0.7]
Ketoconazol	47.30 ± 3.56	45.07 ± 4.89 [1.0]	39.72 ± 2.23 [0.8]
Daunomicina	9.09 ± 0.36	9.54 ± 0.23 [1.1]	9.71 ± 0.36 [1.1]
Mefloquina	0.65 ± 0.03	0.66 ± 0.05 [1.0]	0.62 ± 0.08 [1.0]
Quinina	25.11 ± 1.45	33.23 ± 3.60 [1.3]	22.46 ± 2.14 [0.9]
ZPP <sup>c</sup>	4.35 ± 0.67	10.12 ± 0.23 [2.1]*	4.85 ± 0.16 [1.1]
Feoformida A <sup>c</sup>	10.01 ± 0.15	8.61 ± 0.53 [0.9]	8.90 ± 0.66 [0.9]
	Amastigote EC <sub>50</sub> (μM) [RI] <sup>b</sup>		
	pXG-Hyg	ABC14	ABC14 <sup>K/M</sup>
Sb <sup>III</sup>	5.73 ± 0.41	14.97 ± 1.23 [2.6]*	6.45 ± 0.12 [1.1]
Pentostam <sup>®</sup> (Sb <sup>V</sup> )	28.06 ± 1.98	53.09 ± 2.34 [1.9]*	28.16 ± 2.30 [1.0]

<sup>a</sup> Los promastigotes se cultivaron como se indica en Material y Métodos durante 72 h a 28°C en presencia de concentraciones crecientes de los diferentes compuestos. La viabilidad celular se determinó empleando la técnica colorimétrica basa en la reducción del MTT. Por otro lado, se obtuvieron amastigotes intracelulares de las diferentes líneas de *L. major* tras la infección de macrófagos peritoneales de ratón empleando un ratio macrófago/parásito de 1:10. Después de 72 h, la actividad del compuesto se determinó comparando el porcentaje de macrófagos infectados y el número medio de amastigotes por macrófago infectado entre cultivos tratados con el compuesto y los que crecieron en ausencia del mismo. La infección se determinó mediante el análisis de dichos factores en 200 macrófagos/pocillo tras la tinción con DAPI.

<sup>b</sup> El índice de resistencia [RI] se calculó dividiendo la EC<sub>50</sub> para las líneas de *Leishmania* sobreexpresando ABC14 o ABC14<sup>K/M</sup> entre la obtenida para la línea control (pXG-Hyg). Los datos proceden de medias ± desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes.

<sup>c</sup> La densidad celular se midió empleando un contador de partículas electrónico y mediante contaje directo con un hemocitómetro.

Las diferencias significativas se determinaron mediante el *t*-test de Student (\*: *p*<0.01).

Los resultados mostraron que los parásitos que sobreexpresaban el transportador ABCI4 eran dos veces más resistentes al antimonio trivalente ( $\text{Sb}^{\text{III}}$ ) y al arsenito ( $\text{As}^{\text{III}}$ ) que la línea control (parásitos transfectados con el vector pXG-Hyg vacío). Estos resultados nos sugerían que los iones metálicos podrían ser sustratos de ABCI4 (Tabla R-2). Posteriormente, se analizó la susceptibilidad de las diferentes líneas de *Leishmania* a otros iones metálicos, mostrando que la sobreexpresión de ABCI4 confería resistencia a los iones metálicos  $\text{Cd}^{\text{II}}$  y  $\text{Pb}^{\text{II}}$ , pero no afectaba a la susceptibilidad a otros como  $\text{Cu}^{\text{II}}$ ,  $\text{Zn}^{\text{II}}$ ,  $\text{Co}^{\text{II}}$  y  $\text{Mn}^{\text{II}}$  (Tabla R-3). Así, algunos metales pesados, principalmente  $\text{Sb}^{\text{III}}$ , podrían ser considerados posibles sustratos de ABCI4. Estos resultados se validaron realizando el ensayo de susceptibilidad con una línea transfectada a modo de segundo evento de transfección con ABCI4, para descartar que el fenotipo observado fuera debido a características intrínsecas del clon y que no tuviera nada que ver con la sobreexpresión de ABCI4 (Tabla R-3). Otra verificación que se realizó para comprobar que el fenotipo estuviera ligado a la sobreexpresión del transportador, fue “curar” los parásitos del plásmido pXG-Hyg-ABCI4 (línea revertida, ABCI4rev) manteniendo los parásitos en cultivo en ausencia del antibiótico de selección del plásmido durante un mes. La línea ABCI4rev mostró una susceptibilidad a metales pesados similar a la línea control (pXG-Hyg) (Tabla R-3). Los promastigotes que expresaban GFP-ABCI4 mostraron un comportamiento fenotípico similar a los parásitos que sobreexpresaban ABCI4, demostrando que la fusión del marcador en el extremo amino no interfiere con la funcionalidad de ABCI4 (Tabla R-3). Los datos de susceptibilidad de la línea que expresaba ABCI4<sup>K/M</sup> a los diferentes compuestos testados fueron similares a los observados en la línea control (Tabla R-2 y R-3). Adicionalmente, y para comprobar el carácter dominante negativo de la proteína mutada ABCI4<sup>K/M</sup>, se determinó la susceptibilidad a  $\text{Sb}^{\text{III}}$  en parásitos que co-expresaban ABCI4-ABCI4<sup>K/M</sup> (transfectados con pXG-Hyg-ABCI4 y pXG-ABCI4<sup>K/M</sup>) mostrando una susceptibilidad similar a la observada en la línea control (Fig. R-8); indicando que la versión mutada del transportador se une e inhibe la actividad de ABCI4, sugiriendo a su vez una baja expresión basal de este transportador en parásitos control (pXG-Hyg).

## Resultados

---

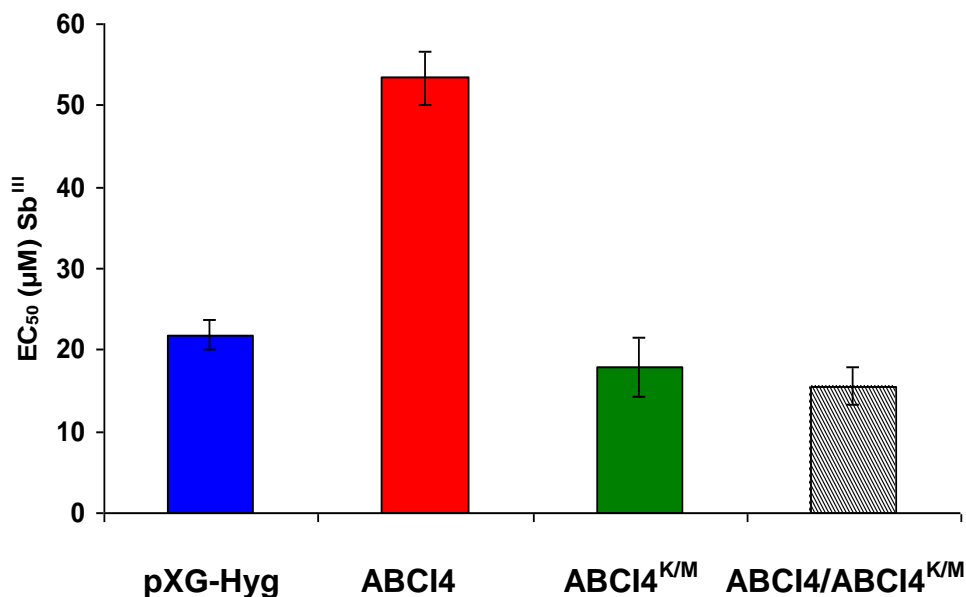


Figura R-8. Susceptibilidad a antimonio en líneas de *L. major*. Se determinó la susceptibilidad a Sb<sup>III</sup> mediante el método basado en la reducción del compuesto MTT de las líneas pXG-Hyg (histograma azul), ABCI4 (histograma rojo), ABCI4<sup>K/M</sup> (histograma verde) y ABCI4 coexpresando ABCI4<sup>K/M</sup> (histograma rallado). Los datos son medias  $\pm$  desviaciones estándar de tres experimentos independientes.

Por otra parte, debido a la localización mitocondrial observada, analizamos la posibilidad de que ABCI4 estuviera implicado en el transporte de hemo, como se ha descrito previamente en otros transportadores ABC (Campos-Salinas et al. 2011; Zutz et al. 2009). Determinamos la susceptibilidad a algunas porfirinas tóxicas como zinc-protoporfirina (ZPP), un análogo de hemo validado, y a feoforbida A, que es un derivado de la clorofila estructuralmente similar a las protoporfirinas. Como se puede ver en la Tabla R-2, la sobreexpresión de ABCI4 confería una resistencia significativa a ZPP (dos veces) pero no a feoforbida A. La línea mutante ABCI4<sup>K/M</sup> mostró unos niveles de susceptibilidad similares a los observados en la línea control.

La resistencia observada a Sb<sup>III</sup> en las formas promastigotas de *Leishmania* se mantuvo en formas amastigotas intracelulares obtenidas tras la infección de macrófagos peritoneales de ratón (Tabla R-2). De esta manera, las formas amastigotas que sobreexpresaban ABCI4 eran resistentes a Pentostam<sup>®</sup>, un fármaco leishmanicida que contiene antimonio pentavalente, el cual es reducido a Sb<sup>III</sup> en las formas amastigotas.

En los estudios de susceptibilidad llevados a cabo con la línea mutante nulo para uno de los alelos de ABCI4 no se observaron diferencias significativas en los niveles de susceptibilidad tanto a iones metálicos como a porfirinas tóxicas, los intentos de obtener un mutante nulo para los dos alelos del gen resultaron infructuosos

### **Acumulación y eflujo de Sb<sup>III</sup>, Cd<sup>II</sup> y porfirinas en líneas de *L. major*.**

Para corroborar que tanto Sb<sup>III</sup> como Cd<sup>II</sup> eran sustratos potenciales de ABCI4, se midió la acumulación intracelular de ambos iones en las diferentes líneas de *L. major* en función del tiempo, empleando para ello el ICP-MS y la sonda fluorescente Leadmium Green, respectivamente. Se observó que la acumulación de Sb<sup>III</sup> y de Cd<sup>II</sup> era dependiente del tiempo transcurrido (Fig. R-9). Los parásitos que sobreexpresaban ABCI4 acumulaban en el punto final de incubación (60 min) un 52% de Sb<sup>III</sup> y un 63% de Cd<sup>II</sup> de lo acumulado por los parásitos control (Fig. R-9). La menor acumulación de Sb<sup>III</sup> podría explicar la resistencia observada a antimoniales en los parásitos que sobreexpresan el transportador ABCI4. Para determinar que la reducción en la acumulación era debida a un eflujo más rápido del compuesto hacia el exterior celular, las diferentes líneas de *L. major* se cargaron en condiciones en las que se acumulara en su interior la misma concentración de los metales pesados a estudio, y posteriormente se midió la cantidad de metal retenido en el interior de estos parásitos a lo largo del tiempo. Determinamos que el eflujo de Sb<sup>III</sup> y de Cd<sup>II</sup> es dependiente del tiempo y más rápido en los parásitos que sobreexpresaban ABCI4 (Fig. R-10), confirmando que las diferencias en la acumulación de Sb<sup>III</sup> y de Cd<sup>II</sup> eran debidas a un incremento en el eflujo mediado por la actividad de ABCI4.

## Resultados

Tabla R-3. Susceptibilidad a metales pesados en promastigotes de *L. major*<sup>a</sup>

Metal	EC <sub>50</sub> (μM) [RI] <sup>b</sup>						
	pXG-Hyg	ABCI4 <sup>c</sup>	2-ABCI4 <sup>d</sup>	ABCI4rev	GFP-ABCI4	3FLAG-ABCI4	ABCI4 <sup>K/M</sup>
Sb (III)	20.87 ± 1.80	53.74 ± 3.35 [2.6]*	40.61 ± 3.46 [2.0]*	21.92 ± 0.36 [1.0]	63.46 ± 2.12 [3.0]*	50.75 ± 1.32 [2.5]*	21.16 ± 3.60 [1.0]
As (III)	2.62 ± 0.69	5.14 ± 0.50 [2.0]*	4.97 ± 0.19 [1.9]*	2.86 ± 0.27 [1.0]	5.76 ± 0.47 [2.2]*	5.06 ± 0.37 [2.0]*	1.97 ± 0.36 [0.8]
Cd (II)	42.36 ± 4.12	82.55 ± 8.84 [2.0]*	-	-	-	-	40.96 ± 2.30 [1.0]
Pb (II)	825.54 ± 25.36	1321.22 ± 52.14 [1.6]*	-	-	-	-	826.15 ± 38.50 [1.0]
Cu (II)	164.31 ± 5.45	221.73 ± 4.73 [1.4]	-	-	-	-	162.63 ± 4.50 [1.0]
Zn (II)	590.04 ± 0.50	728.95 ± 1.43 [1.2]	-	-	-	-	555.43 ± 12.60 [0.9]
Co (II)	35.33 ± 1.23	35.89 ± 1.57 [1.0]	-	-	-	-	38.20 ± 2.01 [1.1]
Mn (II)	30.27 ± 2.96	32.68 ± 1.25 [1.1]	-	-	-	-	32.13 ± 2.63 [1.1]

<sup>a</sup> Los promastigotes se cultivaron como se indica en Material y Métodos durante 72 h a 28°C en presencia de concentraciones crecientes de los diferentes fármacos. La viabilidad celular se determinó empleando la técnica colorimétrica basada en la reducción del MTT. <sup>b</sup> El índice de resistencia [RI] se calculó dividiendo la EC<sub>50</sub> para las líneas de *Leishmania* ABCI4, GFP-LABCI4, 3FLAG-LABCI4 o ABCI4<sup>K/M</sup> y la línea revertida (ABCI4rev) entre la obtenida para la línea control (pXG-Hyg). Los datos proceden de medias ± desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. <sup>c</sup> Primer evento de transfección con pXG-Hyg-ABCI4. <sup>d</sup> Segundo evento de transfección con pXG-Hyg-ABCI4.

Las diferencias significativas se determinaron mediante el *t*-test de Student (\*: *p*<0.01).

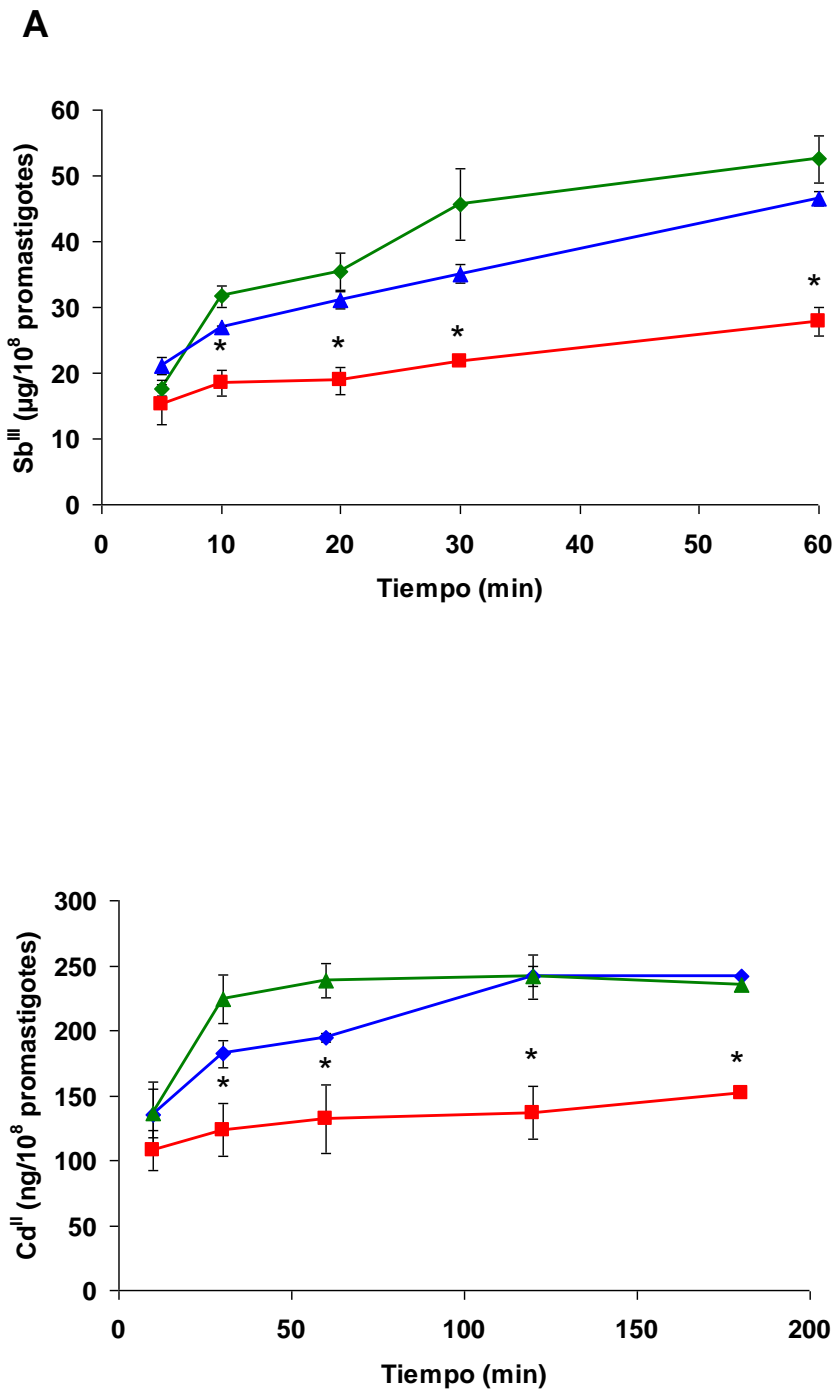
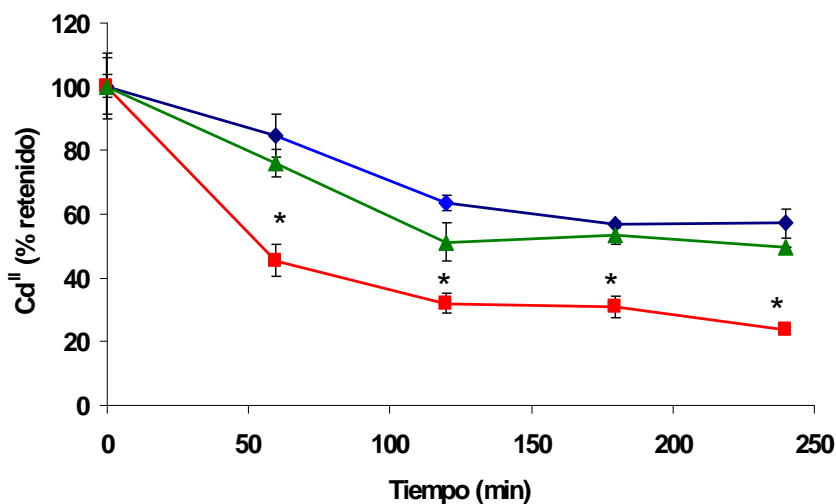


Figura R-9. Acumulación de Sb<sup>III</sup> y Cd<sup>II</sup> en líneas de *L. major*. Las líneas pXG-Hyg (control; línea azul), ABCI4 (línea roja) y ABCI4<sup>K/M</sup> (línea verde) se incubaron con 100 µM Sb<sup>III</sup> (A) o Cd<sup>II</sup> (B), tomando muestras a lo largo del tiempo de incubación como se describe en Material y Métodos. La acumulación de antimonio se midió mediante ICP-MS. Para medir la acumulación de Cd<sup>II</sup>, se empleó la sonda fluorescente Leadmium Green. Los datos proceden de medias  $\pm$  desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron mediante el *t*-test de Student (\*:  $p < 0.01$ ).



## Resultados

A



B

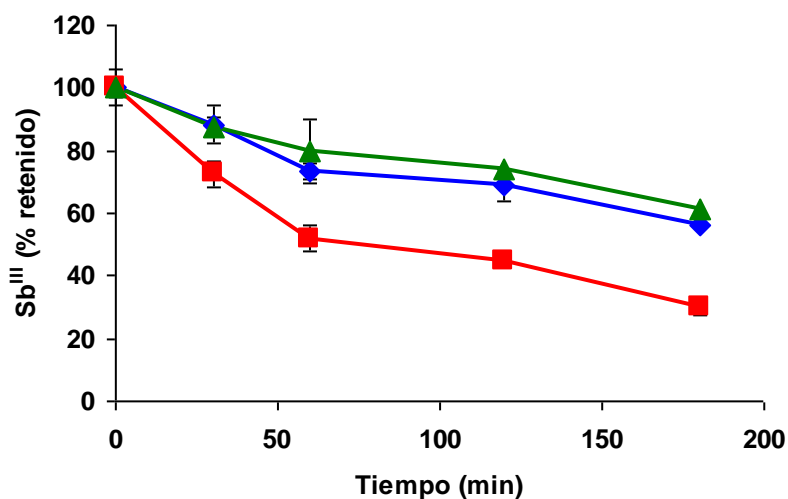
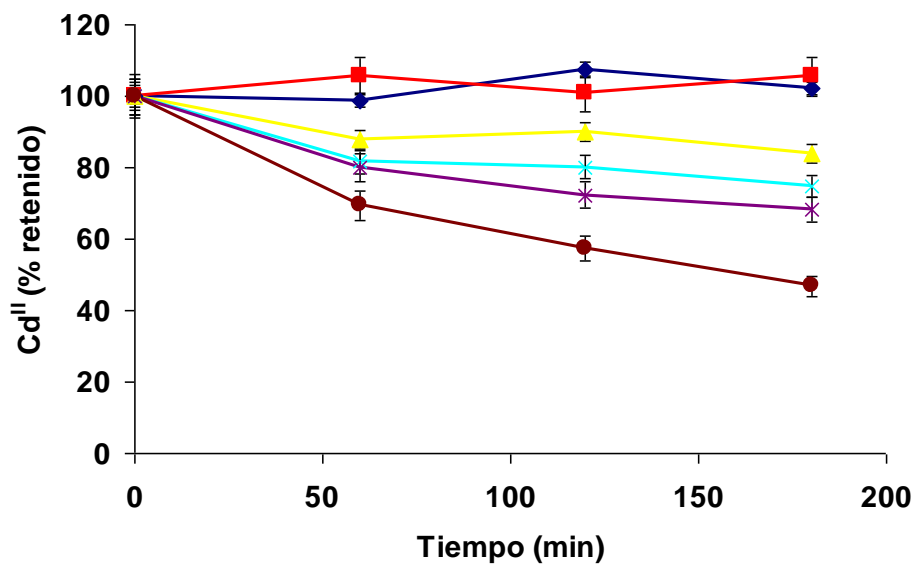


Figura R-10. Eflujo de  $\text{Sb}^{\text{III}}$  y  $\text{Cd}^{\text{II}}$  en líneas de *L. major*. pXG-Hyg (control; línea azul), ABCI4 (línea roja) y ABCI4<sup>K/M</sup> (línea verde). El ensayo de eflujo se llevó a cabo tras la incubación de las líneas de *Leishmania* con concentraciones compensadas de  $\text{Sb}^{\text{III}}$  (A) o  $\text{Cd}^{\text{II}}$  (B) durante 1 h para asegurar un marcaje similar de las diferentes líneas. Los parásitos se lavaron y se resuspendieron en tampón PBS sin  $\text{Sb}^{\text{III}}$  o  $\text{Cd}^{\text{II}}$ . Tras el lavado, se determinaron los niveles intracelulares de los metales a lo largo del tiempo tal como se describe en la leyenda de la figura R-12. Los datos proceden de medias  $\pm$  desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron mediante el *t*-test de Student (\*:  $p < 0.01$ ).

Adicionalmente, para comprobar la actividad de transporte a nivel mitocondrial se realizaron experimentos de eflujo de  $\text{Cd}^{\text{II}}$  en parásitos permeabilizados con 20  $\mu\text{M}$  de digitonina, de tal manera que observamos el

$\text{Cd}^{\text{II}}$  retenido en mitocondria. Igualmente, Los parásitos que sobreexpresaban ABCI4 exportaban más rápido cadmio, quedando una menor cantidad retenido en mitocondria. Además, el eflujo se observó que era mayor cuando el tampón llevaba adicionado ADP en vez de ATP, reforzando la hipótesis de la orientación de los NBD hacia la matriz mitocondrial, empleando el ATP generado por la ATP sintasa. Este hecho se recomprobó empleando oligomicina (inhibidor específico de ATP sintasa) durante el eflujo, observándose una parada en el eflujo (Fig. R-11).

**A**



## Resultados

B

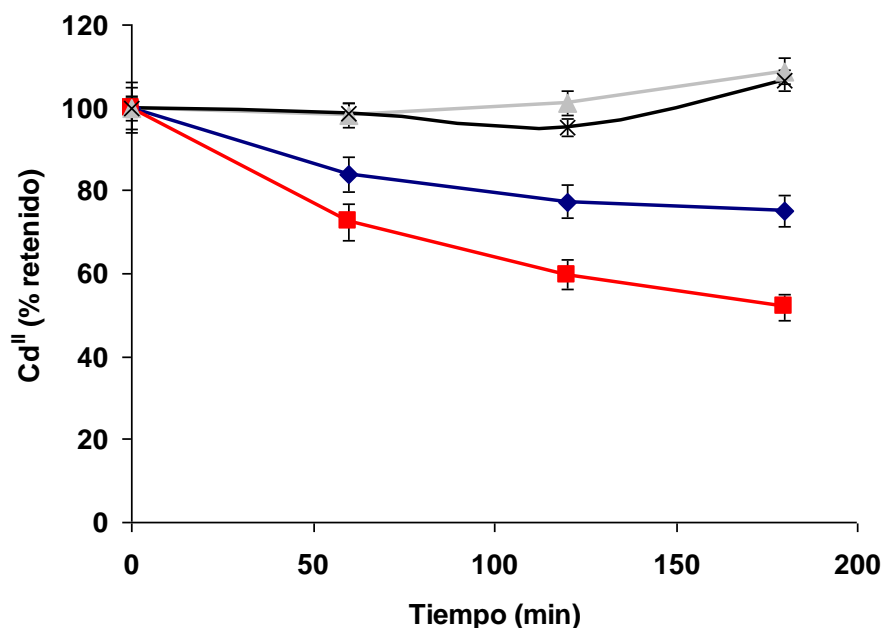


Figura R-11. Eflujo de cadmio en parásitos de *Leishmania* permeabilizados con digitonina. (A) Eflujo de cadmio en ausencia de ATP y ADP (control pXG-Hyg [azul], y ABC14 [rojo]), en presencia de ATP (control [amarillo] y ABC14 [celeste]) o en presencia de ADP (control [morado] y ABC14 [marrón]). (B) Eflujo de cadmio en tampón suplementado con ADP y en ausencia (WT [azul] y ABC14 [rojo]) o presencia de oligomicina (control [negro] y ABC14 [gris]). Los datos proceden de medias  $\pm$  desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron mediante el *t*-test de Student (\*:  $p < 0.01$ ).

A su vez, determinamos, también, la acumulación de la porfirina tóxica fluorescente zinc-mesoporfirina (ZnMP), como análogo de hemo, y se observó una menor acumulación de ZnMP (2,1 veces; con respecto al control) en los parásitos de *Leishmania* que sobreexpresaban ABC14 (Fig. R-12). Los experimentos de eflujo confirmaron que la menor acumulación de ZnMP es debida a un incremento significativo de su eflujo (Fig. R-13). Los parásitos que sobreexpresan ABC14<sup>K/M</sup> presentan una acumulación y eflujo similar al observado en los parásitos control (Fig. R-12 y R-13).

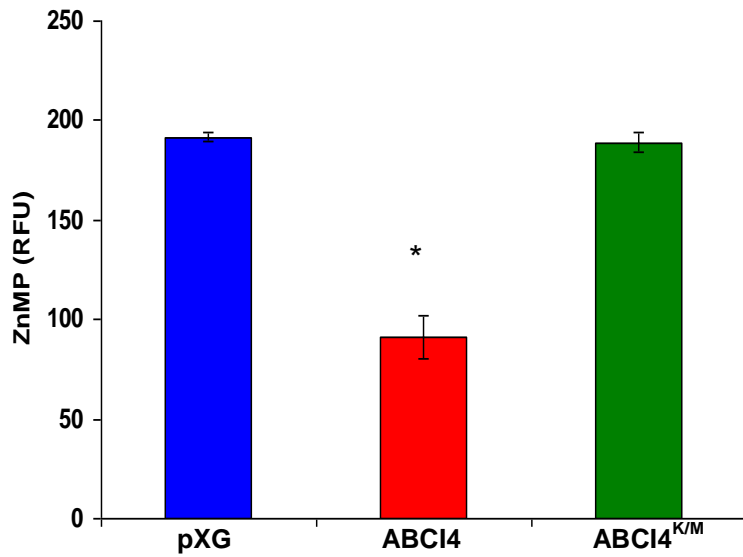


Figura R-12. Acumulación de ZnMP en líneas de *L. major*. Los promastigotes de *L. major* pXG-Hyg (control; histograma azul), ABCI4 (histograma rojo) y ABCI4<sup>K/M</sup> (histograma verde) se incubaron con 10  $\mu$ M de ZnMP durante 10 min a 28 °C. La fluorescencia acumulada se midió mediante citometría de flujo. Unidades relativas de fluorescencia (RFU). Los datos proceden de medias  $\pm$  desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron mediante el *t*-test de Student (\*:  $p < 0.01$ ).

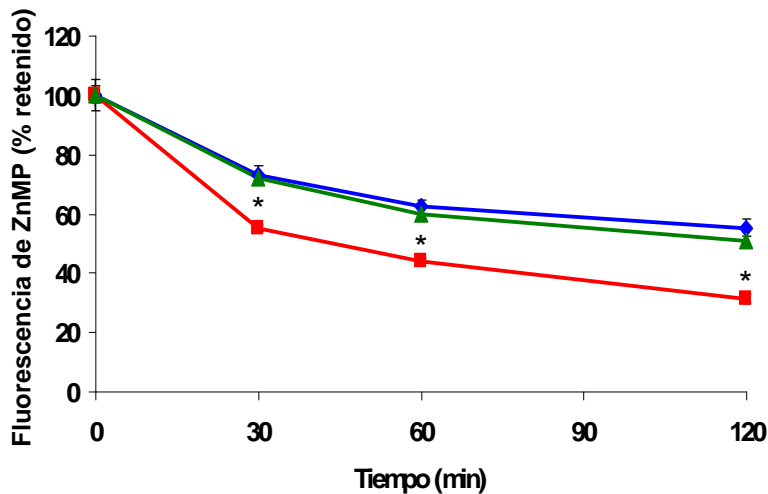


Figura R-13. Eflujo de ZnMP en líneas de *L. major*. pXG-Hyg (control; histograma azul), ABCI4 (histograma rojo) y ABCI4<sup>K/M</sup> (histograma verde). El eflujo se realizó cargando las diferentes líneas de *L. major* con concentraciones compensadas de ZnMP. Los parásitos se lavaron y resuspendieron en buffer PBS sin ZnMP, y se realizaron medidas puntuales a lo largo del tiempo. La fluorescencia acumulada se midió mediante citometría de flujo. Los datos proceden de medias  $\pm$  desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron mediante el *t*-test de Student (\*:  $p < 0.01$ ).

## Resultados

Por el contrario, la acumulación/eflujo de feoforbida A no mostró diferencias entre las diferentes líneas, sugiriendo junto con los datos de susceptibilidad que feoforbida A no interacciona con el transportador ABCI4 (Fig. R-14).

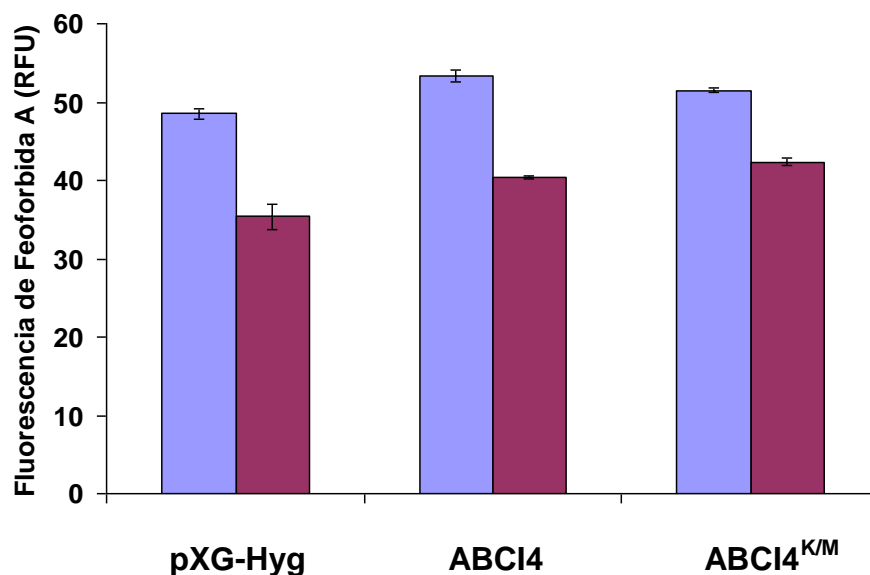


Figura R-14. Acumulación y eflujo de feoforbida A en líneas de *L. major*. La acumulación (histograma azul) se realizó incubando las diferentes líneas con 10  $\mu\text{M}$  de feoforbida A durante 30 minutos a 28°C. El eflujo se realizó en medio libre de feoforbida A durante 60 minutos. Unidades relativas de fluorescencia (RFU). Los datos proceden de medias  $\pm$  desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron mediante el *t*-test de Student (\*:  $p < 0.01$ ).

## Implicación de los tioles en la resistencia a Sb<sup>III</sup> mediada por ABCI4 en *Leishmania*.

Uno de los principales mecanismos de detoxificación observado en líneas de *Leishmania* resistentes a Sb<sup>III</sup> es el incremento de los niveles de tioles (Mukhopadhyay et al. 1996). En este sentido, determinamos la susceptibilidad a Sb<sup>III</sup> y a Cd<sup>II</sup> en líneas que sobreexpresan ABCI4 en presencia de BSO (un inhibidor de la  $\gamma$ -glutamilcisteina sintetasa). La susceptibilidad a los compuestos en las líneas tratadas con el inhibidor mostró a su vez un descenso significativo

## Resultados

en los valores de EC<sub>50</sub> a Sb<sup>III</sup> y a Cd<sup>II</sup>, con valores de descenso más pronunciados en los parásitos que sobreexpresaban ABCI4 con respecto a los que sobreexpresaban ABCI4<sup>K/M</sup> o a los controles (Tabla R-4). Consecuentemente, la resistencia a Sb<sup>III</sup> y Cd<sup>II</sup> de los parásitos que sobreexpresan ABCI4 en *L. major*, esta asociada directamente con los niveles de tioles en el interior celular de los parásitos, probablemente debido a la habilidad del transportador de exportar complejos conjugados con tioles.

**Tabla R-4. Susceptibilidad a metales de las líneas de *L. major* en presencia de BSO.<sup>a</sup>**

Compuesto	EC <sub>50</sub> (μM) [EC <sub>50</sub> descenso] <sup>b</sup>		
	pXG-Hyg	ABCI4	ABCI4 <sup>K/M</sup>
Sb <sup>III</sup>	20.87 ± 1.80	53.74 ± 3.35	21.16 ± 3.60
Sb <sup>III</sup> + BSO <sup>c</sup>	9.28 ± 0.48 [2.2]*	5.30 ± 1.23 [3.6]*	11.48 ± 0.96 [1.9]*
Cd <sup>II</sup>	42.36 ± 4.12	82.55 ± 8.84	40.96 ± 2.30
Cd <sup>II</sup> + BSO	6.30 ± 0.23 [6.7]*	6.85 ± 0.45 [13.7]*	6.36 ± 0.37 [6.4]*

<sup>a</sup> Los promastigotes se cultivaron como se indica en Material y Métodos durante 72 h a 28°C en presencia de concentraciones crecientes de los diferentes metales. La viabilidad celular se determinó empleando la técnica colorimétrica basada en la reducción del MTT.

<sup>b</sup> El descenso de EC<sub>50</sub>, entre corchetes, se calculó dividiendo los valores de EC<sub>50</sub> después del tratamiento con los metales por los valores obtenidos después del tratamiento con los metales más BSO en cada línea de *Leishmania*.

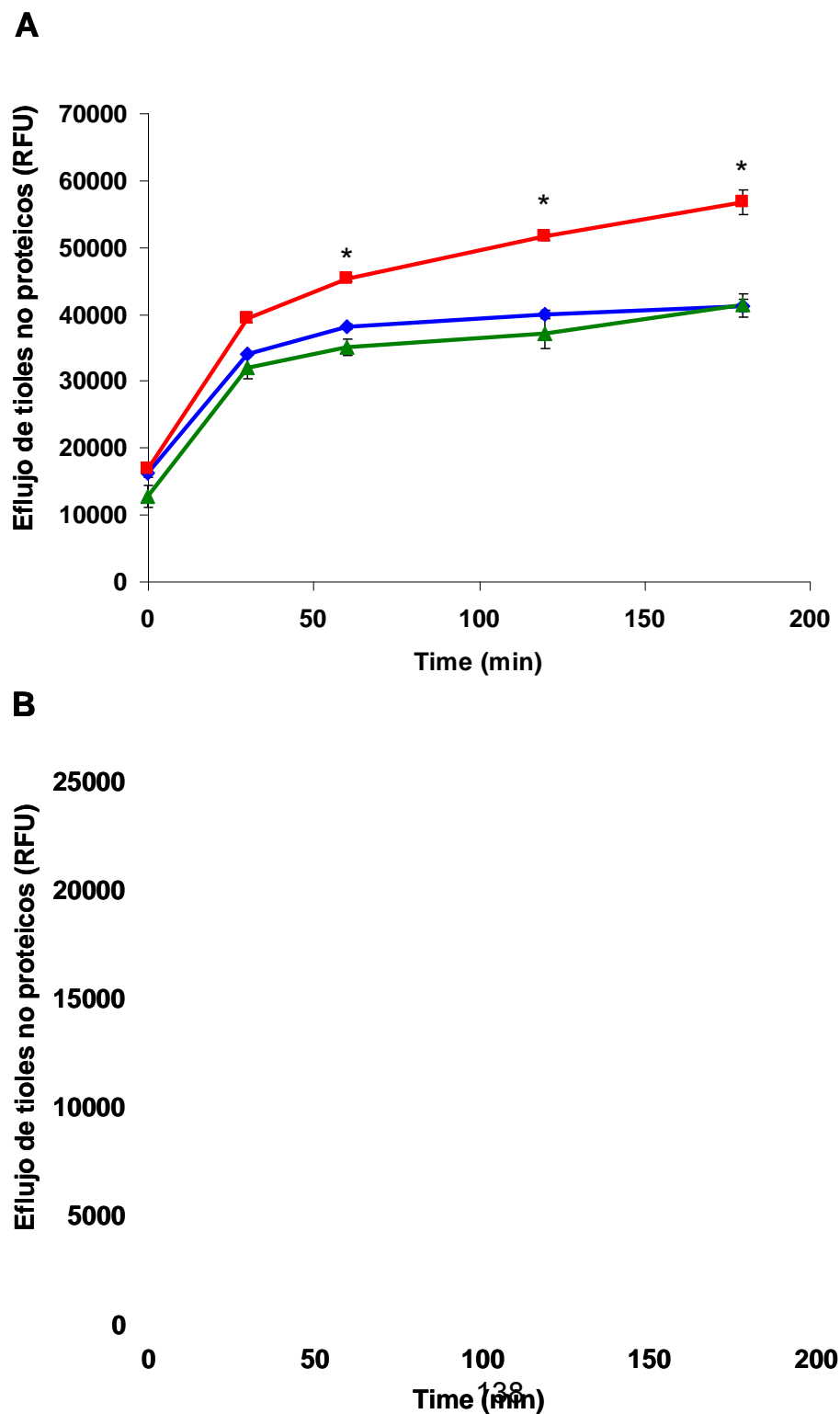
<sup>c</sup> 3 mM BSO (un inhibidor de γ-glutamylcisteina sintetasa) se añadió al medio de cultivo 48 horas antes del ensayo de susceptibilidad.

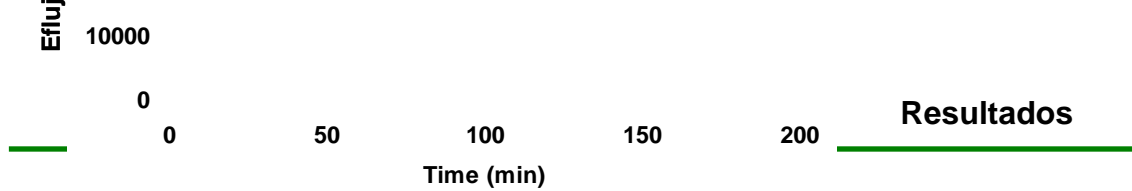
Los datos proceden de medias ± desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron mediante el t-test de Student (\*: p<0.01).

Tanto la conjugación con tioles como el eflujo hacia el exterior celular se ha descrito estar implicado en la resistencia a antimoniales, tanto clínica como inducida en laboratorio (Mukhopadhyay et al. 1996). Por lo tanto, analizamos el eflujo de tioles no proteicos en las diferentes líneas de *L. major* empleando la sonda fluorescente ThioStar. En presencia de Sb<sup>III</sup>, la línea que sobreexpresaba ABCI4 mostró niveles de eflujo de tioles significativamente más altos que los observados en las líneas control y mutante (Fig. R-15A). Como era de esperar,

## Resultados

no hubo diferencias en los niveles de eflujo de tioles en ausencia de  $Sb^{III}$  (Fig. R-15B). Sin embargo, encontramos que en los parásitos que sobreexpresan ABCI4, el eflujo de ZnMP es independiente de tioles (R-16). Como resultado, sugerimos que el transportador ABCI4 confiere resistencia a  $Sb^{III}$  mediante el eflujo de complejos  $Sb^{III}$ -tiol, probablemente  $T(SH)_2$  o GSH, y por tanto podría considerarse a este transportador como una bomba tiol-X como se ha descrito para otras proteínas ABC (Legare et al. 2001).





**B**

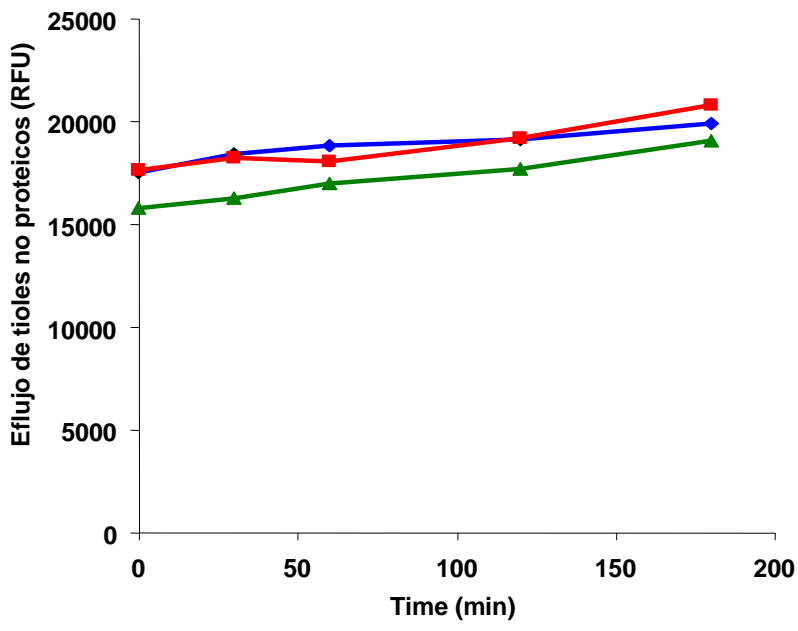
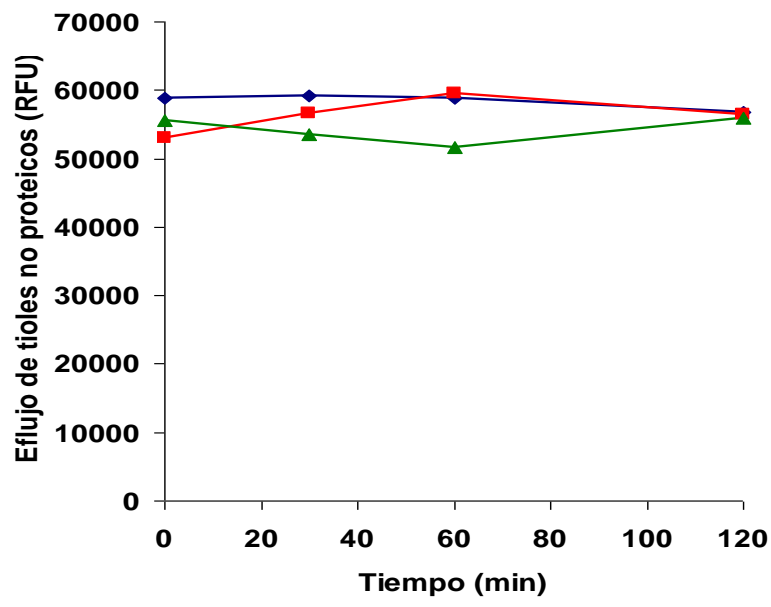


Figura R-15. Eflujo de tioles no proteicos en líneas de *Leishmania* tras la exposición con Sb<sup>III</sup>. Las líneas de *Leishmania* pXG-Hyg (control; línea azul), ABCI4 (línea roja) y ABCI4<sup>K/M</sup> (línea verde) se incubaron con (A) o sin (B) 100 μM de Sb<sup>III</sup> durante 1 h. Los promastigotes se lavaron después con PBS y el sobrenadante procesado a lo largo de diferentes intervalos de tiempo. La fluorescencia de las muestras se determinó en un fluorímetro de placas y se expresó como unidades relativas de fluorescencia (RFU). Los datos proceden de medias ± desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron mediante el t-test de Student (\*: p<0.01).

**A**





## Resultados

---

B

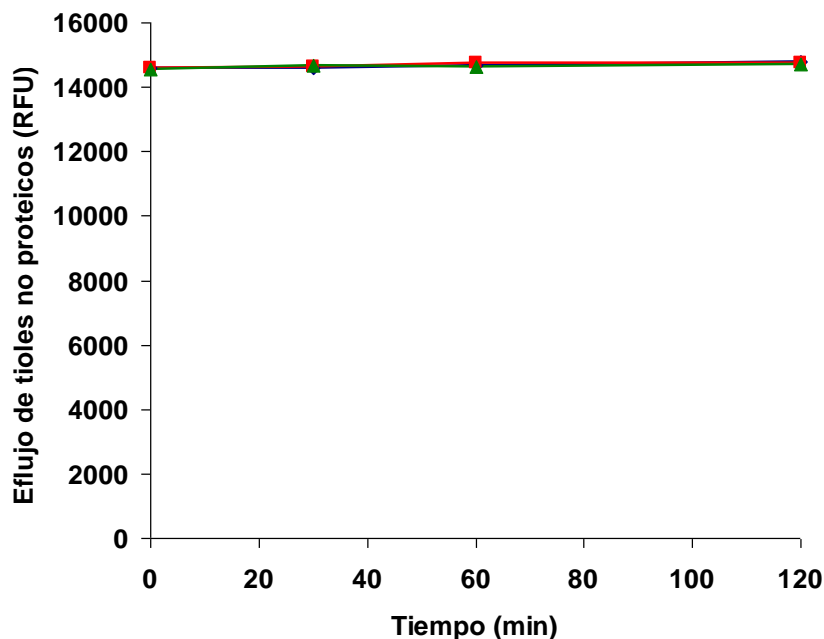


Figura R-16. Eflujo de tioles no proteicos en líneas de *Leishmania* tras la exposición con ZPP. Las líneas de *Leishmania* pXG-Hyg (control; línea azul), ABCI4 (línea roja) y ABCI4<sup>K/M</sup> (línea verde) se incubaron con (A) o sin (B) 10  $\mu$ M de ZPP durante 10 min. Los promastigotes se lavaron después con PBS y el sobrenadante procesado a lo largo de diferentes intervalos de tiempo. La fluorescencia de las muestras se determinó en un fluorímetro de placas y se expresó como unidades relativas de fluorescencia (RFU). Los datos proceden de medias  $\pm$  desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron mediante el *t*-test de Student (\*:  $p < 0.01$ ).

### Determinación de ATP y $\Delta\Psi_m$ en líneas de *Leishmania*.

Previamente, se ha descrito que el tratamiento con antimonio induce un malfuncionamiento mitocondrial en *Leishmania*, provocando un descenso en el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) y pérdida de ATP (Mehta et al. 2006). En base a estos antecedentes, determinamos si la sobreexpresión de ABCI4 confería algún efecto protector contra el daño mitocondrial producido tras el tratamiento con antimoniales. Se observó un descenso en el  $\Delta\Psi_m$  durante los primeros 360 min tras la exposición con Sb<sup>III</sup> tanto en la línea control como en la línea ABCI4<sup>K/M</sup> (Fig. R-17) sin embargo, en los parásitos que sobreexpresaban ABCI4, el  $\Delta\Psi_m$  presentó una menor modificación tras la exposición con Sb<sup>III</sup> (Fig. R-17).

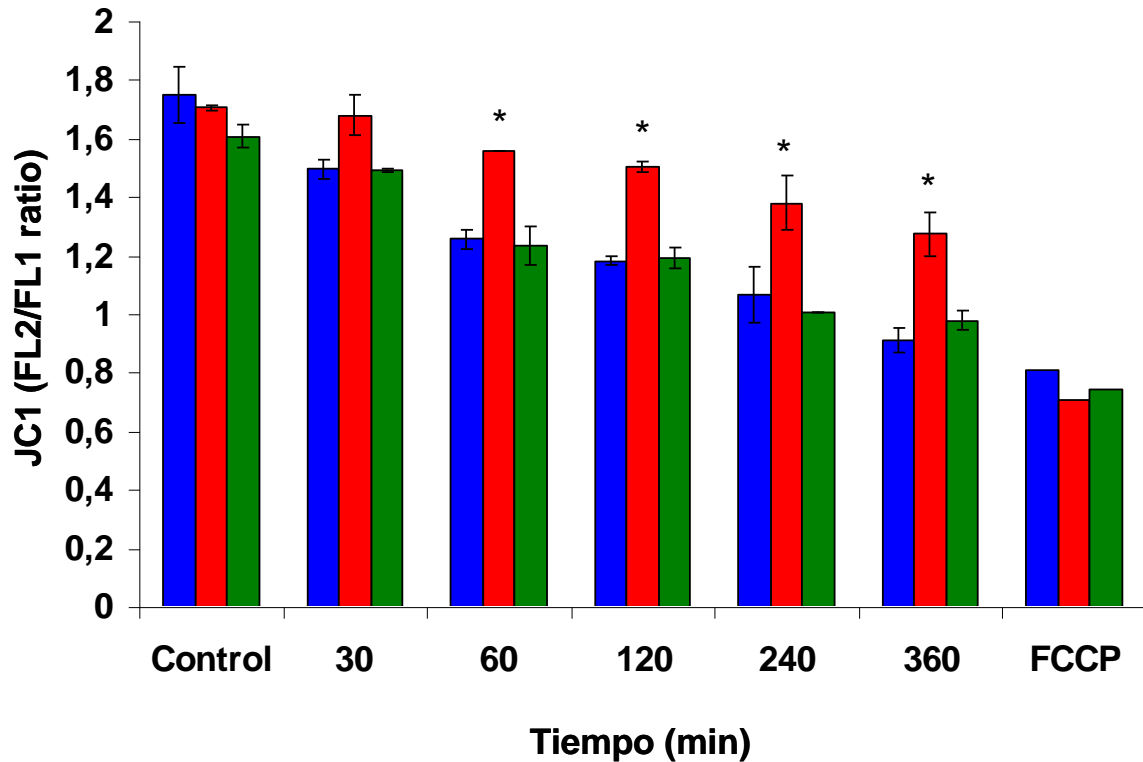


Figura R-17. Cambios en el  $\Delta\Psi_m$  tras la exposición a  $Sb^{III}$  en líneas de *L. major*. Las líneas pXG-Hyg (control; histogramas azules), ABCI4 (histogramas rojos) y ABCI4<sup>K/M</sup> (histogramas verdes) se preincubaron con 100  $\mu M$  de  $Sb^{III}$  a diferentes intervalos de tiempo (30, 60, 120, 240 y 360 min) y después se incubaron con 5  $\mu M$  de JC1 durante 10 min para la determinación del  $\Delta\Psi_m$ . El ratio de fluorescencia FL2/FL1 se midió mediante citometría de flujo. Se emplearon parásitos pretratados con 10  $\mu M$  de FCCP como control de despolarización. Los datos proceden de medias  $\pm$  desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron mediante el *t*-test de Student (\*:  $p < 0.01$ ).

El  $\Delta\Psi_m$  es esencial para la síntesis de ATP, así pues, medimos los niveles de ATP en las diferentes líneas de *Leishmania* tras la exposición con  $Sb^{III}$ . Aunque se observa un descenso progresivo de los niveles de ATP a lo largo del tiempo de tratamiento con  $Sb^{III}$  (Fig. R-18), los parásitos que sobreexpresaban ABCI4 mantuvieron valores significativamente altos con relación a los observados en las líneas control y ABCI4<sup>K/M</sup> (Fig. R-18). Estos datos evidencian la habilidad de ABCI4 de proteger frente a la toxicidad mitocondrial del antimonio manteniendo los niveles de  $\Delta\Psi_m$  y ATP, mediante la reducción en la acumulación de antimonio.

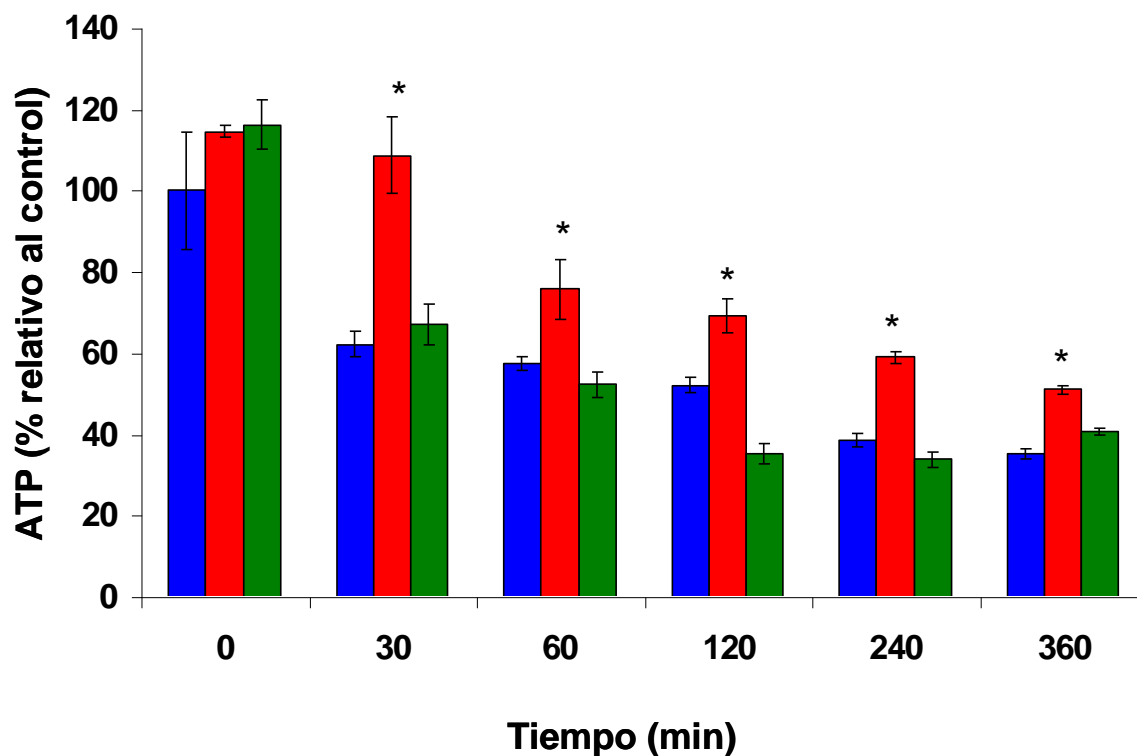


Figura R-18. Medida de los niveles intracelulares de ATP tras la exposición a  $Sb^{III}$  en líneas de *L. major*. Las líneas pXG-Hyg (control; histogramas azules), ABCI4 (histogramas rojos) y ABCI4<sup>KM</sup> (histogramas verdes) se preincubaron con 100  $\mu M$  de  $Sb^{III}$  a diferentes intervalos de tiempo (30, 60, 120, 240 y 360 min) y después se mezclaron con el mismo volumen de CellTiter-Glo para la medida de ATP. Los datos proceden de medias  $\pm$  desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron mediante el *t*-test de Student (\*:  $p < 0.01$ ).

## Producción de ROS inducida por $Sb^{III}$ en líneas de *Leishmania*.

La disminución de  $\Delta\Psi_m$  inducida en *Leishmania* por una amplia variedad de tratamientos farmacológicos, se asocia también con el incremento de la producción de ROS, causando daños a los componentes de la cadena de transporte de electrones, anulando la función mitocondrial, disminuyendo los niveles celulares de ATP, y produciendo la muerte celular. Así, estudiamos la habilidad de ABCI4 de proteger a los parásitos frente a la producción de ROS tras el tratamiento con  $Sb^{III}$ . Los niveles de ROS se midieron empleando dos sondas fluorimétricas permeables: H<sub>2</sub>DCFDA y MitoSOX Red (marca

selectivamente ROS producido en la mitocondria). Después del tratamiento con  $Sb^{III}$  durante 48 h, se observó que los niveles de ROS aumentaban significativamente según se aumentaba la concentración de  $Sb^{III}$ , tanto a nivel citosólico como mitocondrial (Fig. R-19). Los resultados mostraron que la línea que sobreexpresaba ABCI4 generaba niveles de ROS menores que las líneas control y mutante ABCI4<sup>K/M</sup> (Fig. R-19), probablemente debido a un descenso en la acumulación intracelular de  $Sb^{III}$ .

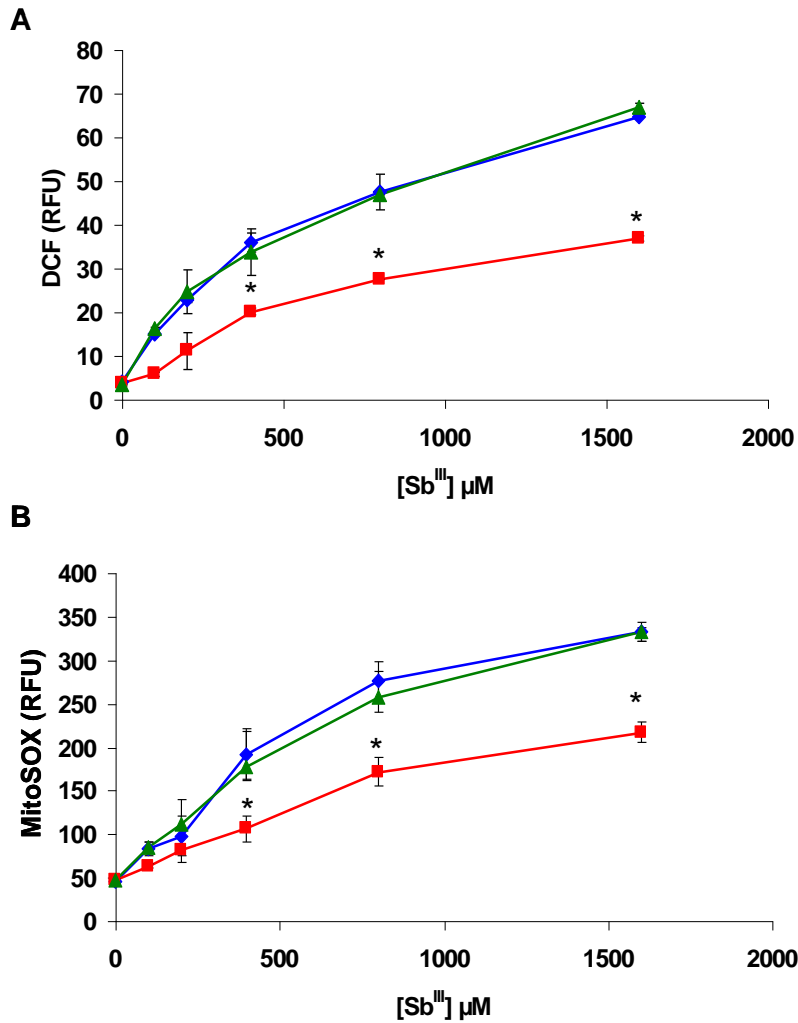


Figura R-19. Producción de ROS en líneas de *L. major* tras la exposición a  $Sb^{III}$ . Los niveles de ROS intracelulares se midieron empleando dos sondas  $H_2DCFDA$  (A) y MitoSOX Red (B). Las líneas pXG-Hyg (control; línea azul), ABCI4 (línea roja) y ABCI4<sup>K/M</sup> (línea verde) se incubaron con diferentes concentraciones de  $Sb^{III}$ , como se describe en Material y Métodos. (A) Después del tratamiento con  $Sb^{III}$ , los parásitos se incubaron con 40 nM de  $H_2DCFDA$  durante 30 min a 28°C. (B) Antes de la adición de  $Sb^{III}$ , los parásitos se incubaron con 5  $\mu M$  de MitoSOX durante 2 h a 28°C. La intensidad de la fluorescencia se determinó mediante citometría de flujo y se expresó como unidades relativas de fluorescencia. Los datos proceden de medias  $\pm$  desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron mediante el *t*-test de Student (\*:  $p < 0.01$ ).

### **Infectividad y supervivencia de líneas de *Leishmania* en macrófagos peritoneales de ratón.**

También analizamos si la sobreexpresión de ABCI4 confería alguna ventaja en términos de infección y supervivencia de los amastigotes intracelulares de *Leishmania*, como una medida de la habilidad para resistir a las situaciones de estrés en el interior de las células hospedadoras de mamífero. De esta manera, se infectaron macrófagos peritoneales de ratón y se evaluó a las 24 y 72 horas post-infección el porcentaje de infección y el número medio de amastigotes por macrófago infectado. Las diferentes líneas no mostraron diferencias significativas en cuanto al porcentaje de infección. Sin embargo, la línea que sobreexpresaba ABCI4 mostró incrementada la capacidad de replicación de los amastigotes en el interior de los macrófagos tras 72 horas post-infección en relación con las líneas control y ABCI4<sup>K/M</sup> (Fig. R-20).

Consecuentemente con los resultados obtenidos, las líneas de *Leishmania* que sobreexpresan ABCI4 tienen una mayor capacidad de supervivencia/división en el interior de la célula hospedadora que el resto de líneas de *Leishmania*, aunque esta función debe ser estudiada con mayor profundidad.

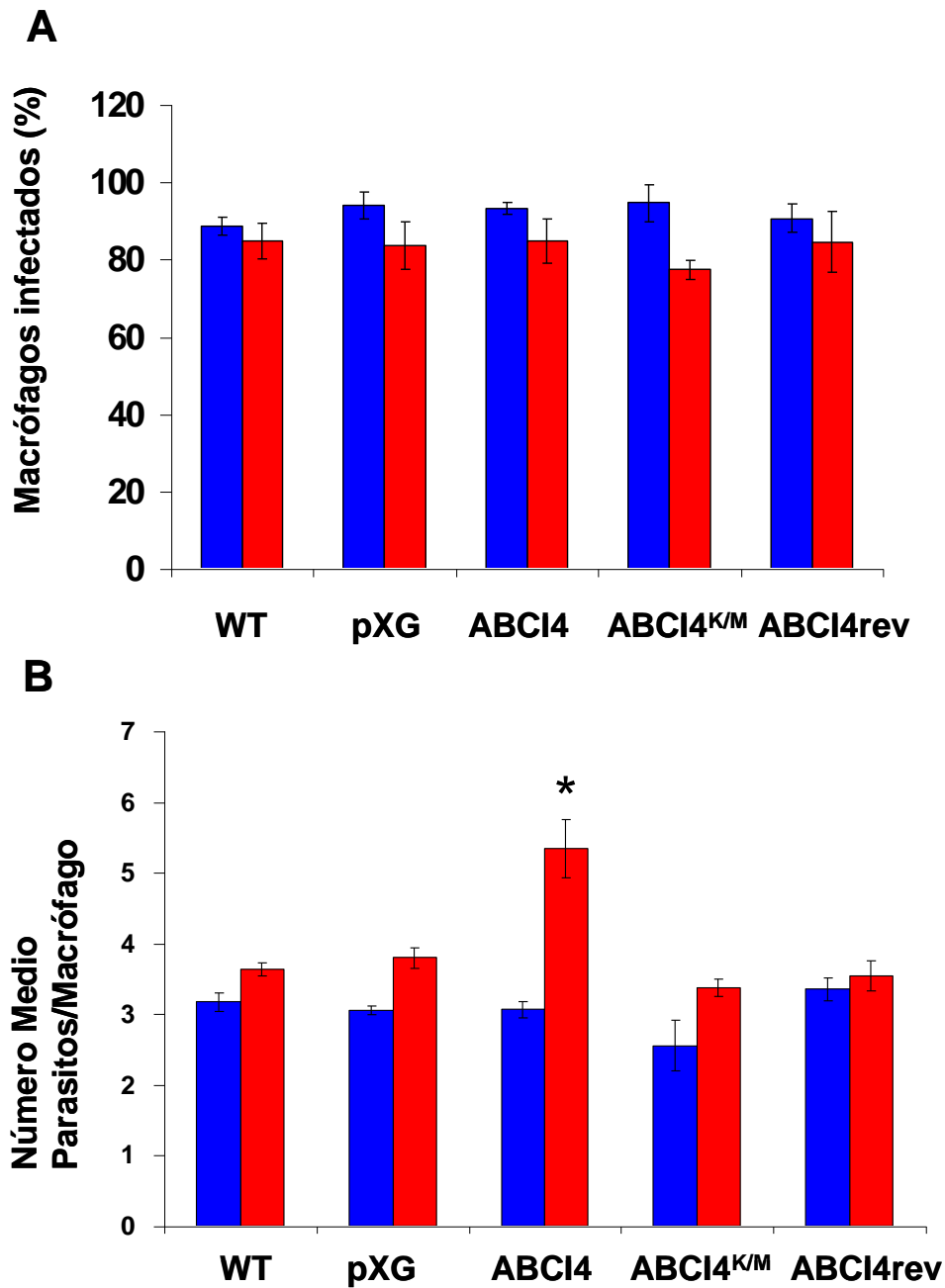


Figura R-20. Infectividad y supervivencia de *L. major* en macrófagos peritoneales de ratón. La infección de macrófagos peritoneales de ratón se realizó con parásitos en fase estacionaria de las diferentes líneas: salvaje (WT), pXG-Hyg (ABCI4, ABCI4<sup>K/M</sup> y revertida (ABCI4rev) empleando una relación macrófago/parásito de 1:5. El porcentaje de macrófagos infectados (A) y el número medio de parásitos por macrófago infectado (B) se determinó a las 24 h (histogramas azules) y a las 72 h (histogramas rojos) post-infección. Los datos proceden de medias  $\pm$  desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron mediante el *t*-test de Student (\*:  $p < 0.01$ ).

### **Resultados II. Identificación de nuevos revertidores específicos de la resistencia a antimonio mediada por el transportador ABCI4 en *Leishmania*.**

Algunos moduladores, como los bloqueadores de canales de calcio (verapamil) (BoseDasgupta et al. 2008), antagonistas de la calmodulina (derivados de la fenotiazina) (Essodaigui et al. 1999), estatinas (lovastatina) (Mookerjee Basu et al. 2008), análogos de piridina (PAK-104P) (Essodaigui et al. 1999), derivados de sulfonilurea (glibenclamida) (Padrón-Nieves et al. 2009) y derivados de acridona carboxamida (elacridar y zosuquidar) (Pérez-Victoria et al. 2006), han demostrado experimentalmente que revierten la resistencia mediada por transportadores ABC en *Leishmania*. Además, compuestos naturales como los dihidro- $\beta$ -agarofurano sesquiterpenos se consideran revertidores prometedores para el fenotipo de resistencia a múltiples fármacos mediado por la sobreexpresión de un transportador glicoproteína-P de la subfamilia ABCB en *Leishmania* (Cortés-Selva et al. 2005; Kennedy et al. 2001). Igualmente, el fármaco de uso oral, sitamaquina, se ha demostrado que es efectivo en la reversión de la resistencia a miltefosina y antimonio mediante la sobreexpresión de la glicoproteína-P y ABCA3, respectivamente (Pérez-Victoria et al. 2011).

Para identificar revertidores eficaces y seguros para el transportador ABCI4 en *Leishmania*, focalizamos nuestros esfuerzos en compuestos que tuvieran baja toxicidad para células de mamífero. Así, centramos principalmente nuestro estudio en 15 compuestos pertenecientes a diferentes subclases de flavonoides, incluyendo auronas, análogos de isoflavonas, flavonas, xantonas y chalconas (Fig. R-21). Para ampliar la diversidad química, incluimos dos compuestos derivados de trolox, que compartían en parte una estructura del tipo flavonoide y que podría actuar como ligando de transportadores ABC.

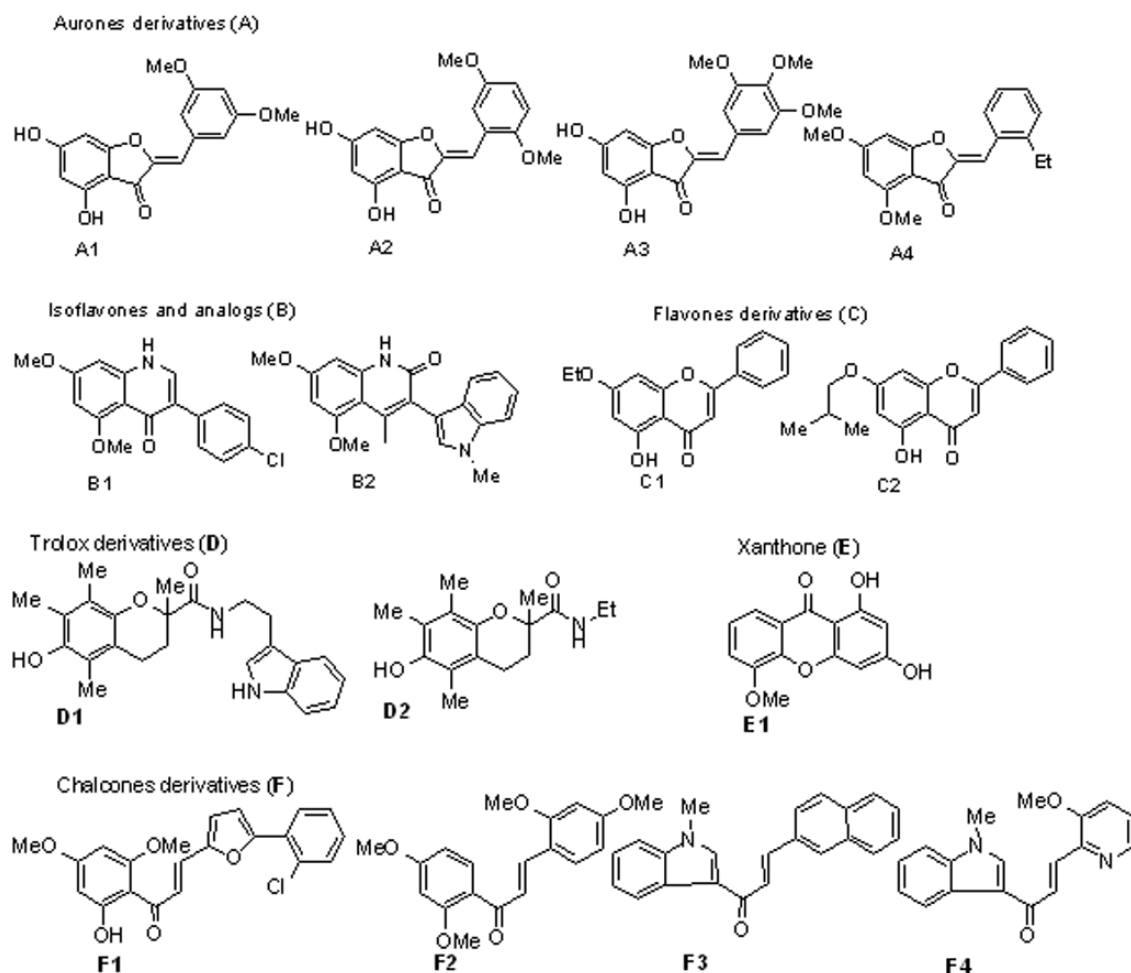


Figura R-21. Estructura de los compuestos flavonoides y análogos ensayados en la actividad revertidora del transportador ABCI4 en *L. major*.

Nuestro objetivo era identificar un compuesto que revirtiera específicamente la resistencia a antimonio mediada por ABCI4, para posteriormente optimizar dicho compuesto para obtener un candidato más activo.

## Reversión de la resistencia a Sb<sup>III</sup> mediada por ABCI4 en *Leishmania*.

El transportador ABCI4 está implicado en la susceptibilidad a antimonio y a otros metales pesados mediante el eflujo de complejos conjugados con tioles. Nuestros resultados muestran que el compuesto D2, análogo de Trolox



## Resultados

---

presenta una toxicidad muy baja tanto para los parásitos control como para las células THP-1 (valores de  $EC_{50} > 500 \mu\text{M}$ , Tabla R-5), revirtiendo a la concentración  $20 \mu\text{M}$  completamente la resistencia a antimonio en la línea de *Leishmania* que sobreexpresa ABCI4 (Fig. R-22), incrementando 3,6 veces la susceptibilidad al antimonio (índice de susceptibilidad de 3,6, Tabla R-6). La reversión total de la resistencia a antimonio se mantiene hasta una concentración de  $0,5 \mu\text{M}$ , sin embargo se empleo  $20 \mu\text{M}$  en el primer screening y en ensayos posteriores como la mayor concentración a la que no se observaba efecto tóxico con el fin de optimizar la observación de resultados.

Como puede observarse en la Figura R-23, el compuesto D2 es una etil carboxamida derivada del trolox, nombre registrado por Hoffman-LaRoche's para el ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico, un derivado de la vitamina E que es conocido como un potente antioxidante (Lucio et al 2009). Las auronas (A1 y A2), isoflavona B1 y chalconas F2 y F4 también revertían completamente la resistencia a antimonio a la concentración de  $20 \mu\text{M}$  en parásitos que sobreexpresaban ABCI4 (Fig. R-22A), aunque su efecto no era específico ya que la susceptibilidad al antimonio aumentaba también en la línea control (Tabla R-6), Este hecho se observó a su vez con el inhibidor de referencia empleado ciclosporina A. Los otros inhibidores de referencia utilizados fueron ineficaces e inespecíficos bloqueando ABCI4 (LY, GF y Cuzco 5).

Tabla R-5. Toxicidad intrínseca de los diferentes compuestos en *L. major* y en células THP-1.<sup>a</sup>

	EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	
	<i>L. major</i> promastigotes	Células THP-1
<b>CsA</b>	12.56 $\pm$ 2.13	41.27 $\pm$ 3.24
<b>GF</b>	14.71 $\pm$ 3.21	95.13 $\pm$ 2.65
<b>LY</b>	47.89 $\pm$ 2.79	361.24 $\pm$ 12.47
<b>Cuzco5</b>	51.23 $\pm$ 3.54	251.36 $\pm$ 19.78
<b>A1</b>	276.47 $\pm$ 14.03	246.46 $\pm$ 13.59
<b>A2</b>	190.17 $\pm$ 9.64	354.34 $\pm$ 14.03
<b>A3</b>	>500	>500
<b>A4</b>	>500	>500
<b>B1</b>	53.52 $\pm$ 3.27	>500
<b>B2</b>	97.08 $\pm$ 13.47	>500
<b>C1</b>	62.17 $\pm$ 5.47	>500
<b>C2</b>	91.86 $\pm$ 7.21	>500
<b>D1</b>	140.75 $\pm$ 16.97	395.20 $\pm$ 17.89
<b>D2</b>	>500	>500
<b>E1</b>	>500	>500
<b>F1</b>	>500	>500
<b>F2</b>	93.53 $\pm$ 4.93	393.64 $\pm$ 28.13
<b>F3</b>	>500	>500
<b>F4</b>	62.97 $\pm$ 1.45	438.73 $\pm$ 24.17

<sup>a</sup> Los parásitos y las células THP-1 se cultivaron como se describe en Material y Métodos durante 72 h a 28°C y 37°C respectivamente, en presencia de concentraciones crecientes de los compuestos. La viabilidad celular se determinó empleando el método colorimétrico basado en la reducción del compuesto MTT. Se emplearon algunos inhibidores de referencia de proteínas ABC: ciclosporina A (CsA), GF120918 (GF, elacridar), LY335979 (LY, zosuquidar) y Cuzco 5. Los datos proceden de medias  $\pm$  desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes.

## Resultados

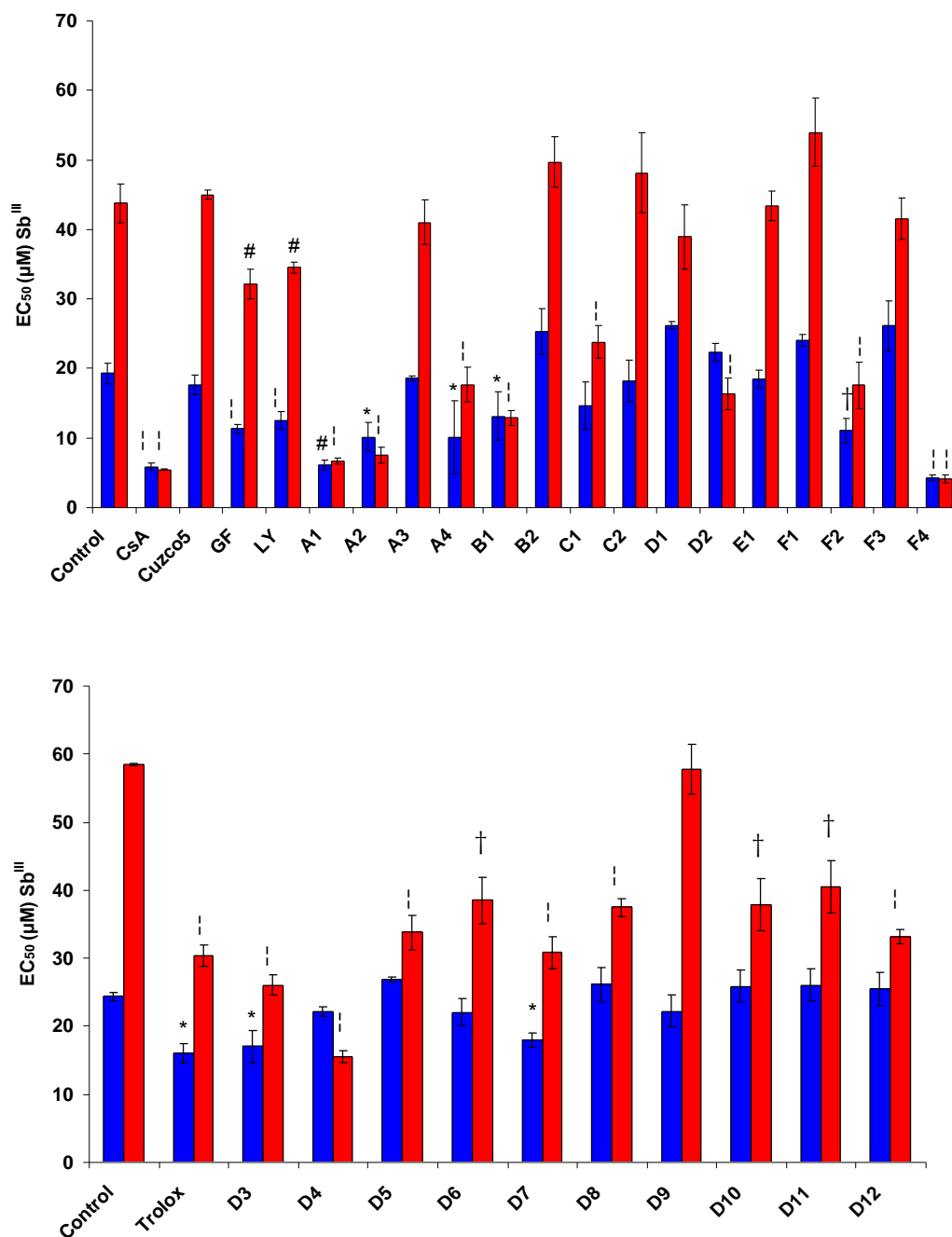


Figura R-22. Susceptibilidad de las líneas de *Leishmania major* tratadas con varios compuestos representativos con potencial actividad revertidora (A) y derivados del trolox (B) al Sb<sup>III</sup>. Se analizó la susceptibilidad al Sb<sup>III</sup> en las líneas de *L. major*: pXG-Hyg (histograma azul) y ABCI4 (histograma rojo) después de 72 h en presencia de 20 µM de los diferentes derivados de flavonoides (A) y en presencia de 20 µM de los derivados del trolox (B). Los histogramas control se refieren a parásitos sin tratar con inhibidores. Se emplearon como agentes revertidores de referencia: 0.5 µM ciclosporina A (CsA), 5 µM Cuzco 5, 0.5 µM GF120918 (GF, elacridar) y 5 µM LY335979 (LY, zosuquidar). La viabilidad celular se determinó empleando el método colorimétrico basado en la reducción del compuesto MTT. Los datos proceden de medias ± desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas se determinaron mediante el *t*-test de Student (\*:  $p < 0.05$ , #:  $p < 0.01$ , †:  $p < 0.005$ , ‡:  $p < 0.005$ , §:  $p < 0.001$ ).

Tabla R-6. Efecto de los diferentes compuestos en el índice de susceptibilidad a Sb<sup>III</sup> en líneas de *L. major*<sup>a</sup>.

	Índice de Susceptibilidad <sup>b</sup>	
	pXG-Hyg	ABCI4
CsA <sup>c</sup>	3.28 ± 0.56	8.04 ± 0.64*
GF <sup>c</sup>	1.69 ± 0.23	1.35 ± 0.17
LY <sup>d</sup>	1.54 ± 0.27	1.26 ± 0.11
Cuzco5 <sup>d</sup>	1.09 ± 0.17	0.97 ± 0.07
A1	3.12 ± 0.60	6.59 ± 0.84*
A2	1.90 ± 0.53	5.82 ± 1.27*
A3	1.03 ± 0.10	1.06 ± 0.15
A4	1.90 ± 1.14	2.47 ± 0.50
B1	1.46 ± 0.50	3.38 ± 0.50*
B2	0.76 ± 0.15	0.88 ± 0.12
C1	1.31 ± 0.41	1.84 ± 0.29
C2	1.06 ± 0.26	0.90 ± 0.16
D1	0.73 ± 0.07	1.12 ± 0.20
D2	0.74 ± 0.09	3.60 ± 0.60*
E1	1.04 ± 0.15	1.00 ± 0.11
F1	0.80 ± 0.09	0.81 ± 0.12
F2	1.74 ± 0.41	2.48 ± 0.63
F3	0.73 ± 0.16	1.05 ± 0.14
F4	4.51 ± 0.76	10.62 ± 2.19*

<sup>a</sup> Los promastigotes se cultivaron como se indica en Material y Métodos durante 72 h a 28°C en presencia de concentraciones crecientes de Sb<sup>III</sup>. La viabilidad celular se determinó empleando la técnica colorimétrica basa en la reducción del MTT.

<sup>b</sup> El índice de susceptibilidad se calculó dividiendo la EC<sub>50</sub> a Sb<sup>III</sup> en ausencia de compuesto entre la EC<sub>50</sub> en presencia de 20 µM de compuesto. Como inhibidores de referencia del transportador ABC se emplearon: ciclosporina A (CsA), GF120918 (GF, elacridar), LY335979 (LY, zosuquidar) y Cuzco 5.

<sup>c</sup> Debido a la toxicidad intrínseca del compuesto se empleó una concentración de 0.5 µM.

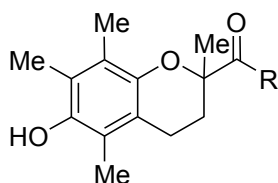
<sup>d</sup> Debido a la toxicidad intrínseca del compuesto se empleó una concentración de 5 µM. Los datos proceden de medias ± desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas de los valores de índice de sensibilidad entre las líneas pXG-Hyg (control) y ABCI4 se determinaron mediante la *t*-test de Student (\*: *p*<0.05).

## Resultados

---

De acuerdo con la capacidad inhibitoria de la resistencia a antimonio del compuesto D2, se sintetizó una nueva serie de carboxamidas del compuesto D2 basadas en la estructura del trolox (compuestos D3 a D12) (Tabla R-7). Estos compuestos se sintetizaron en un único paso, comenzando la reacción a partir de trolox (disponible comercialmente) y aminas. Los compuestos de esta serie no fueron tóxicos ni para los parásitos ni para las células THP-1 ( $EC_{50} > 500 \mu\text{M}$ ). Un análisis de la actividad revertidora de los compuestos pertenecientes a esta nueva serie (Fig. R-22B) mostró que el compuesto derivado más activo (compuesto D4) disminuía 3,75 veces la  $EC_{50}$  para  $\text{Sb}^{\text{III}}$  en parásitos que sobreexpresaban ABCI4. (Tabla R-7). Una sensibilización menor pero igualmente significativa se observó con el resto de compuestos derivados de trolox, excepto el compuesto D9. Como se muestra en la Tabla R-7, los derivados con un sustituyente *N*-propilo (D4) tienen un comportamiento similar al observado con un sustituyente *N*-etilo (D2) (índice de susceptibilidad de 3,75 frente a 3,6), siendo ambos más activos que el compuesto que tiene un sustituyente *N*-butilo (D5). Por otro lado, ramificaciones del grupo propilo (D10 y D12 *versus* D4) producen un descenso en el índice de susceptibilidad. La adición de un grupo etilo extra al compuesto D2 (compuesto D11, Tabla R-7) produce un importante descenso en la actividad revertidora. Se observó un efecto similar en el compuesto D8, donde el grupo alquilo forma parte de un anillo de piperidina. Considerando que el potencial de los derivados flavonoides es debido en parte a los anillos aromáticos tricíclicos que forman parte de su estructura, decidimos introducir un anillo fenólico a la cadena alquílica de trolox (compuestos D6, D7 y D9). Sin embargo, como se muestra en la Tabla R-7, esta modificación no incrementa la actividad revertidora.

Tabla R-7. Efecto de las carboxamidas derivadas de trolox en el índice de susceptibilidad a  $Sb^{III}$  en líneas de *L. major*<sup>a</sup>.



	R	Índice de susceptibilidad <sup>b</sup>	
		pXG-Hyg	LABC14
Trolox	OH	1.51 ± 0.15	1.92 ± 0.12*
D2	NH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	0.74 ± 0.09	3.60 ± 0.60*
D3	NH <sub>2</sub>	1.42 ± 0.23	2.24 ± 0.13*
D4	NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	0.93 ± 0.05	3.75 ± 0.22*
D5	NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub>	0.90 ± 0.03	1.73 ± 0.13*
D6	NH-CH <sub>2</sub> -Ph	1.10 ± 0.12	1.51 ± 0.14*
D7	NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -Ph	1.35 ± 0.10	1.89 ± 0.15*
D8		0.93 ± 0.11	1.56 ± 0.06*
D9		1.09 ± 0.14	1.01 ± 0.06
D10		0.94 ± 0.11	1.54 ± 0.16*
D11		0.94 ± 0.10	1.44 ± 0.14*
D12		0.96 ± 0.11	1.76 ± 0.05*

<sup>a</sup> Los promastigotes se cultivaron como se indica en Material y Métodos durante 72 h a 28°C en presencia de concentraciones crecientes de  $Sb^{III}$ . La viabilidad celular se determinó empleando la técnica colorimétrica basada en la reducción del MTT.

<sup>b</sup> El índice de susceptibilidad se calculó dividiendo la  $EC_{50}$  a  $Sb^{III}$  en ausencia de compuesto entre la  $EC_{50}$  en presencia de 20  $\mu M$  de compuesto.

Los datos proceden de medias  $\pm$  desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas de los valores de índice de susceptibilidad entre las líneas pXG-hyg (control) y ABC14 se determinaron mediante el *t*-test de Student (\*:  $p < 0.05$ ).

## Resultados

Los compuestos D2 y D4 también revertían la resistencia a antimonio mediada por ABCI4 en las formas amastigotas intracelulares mantenidas en células THP-1 (Tabla R-8).

**Tabla R-8. Susceptibilidad a Pentostam (Sb<sup>V</sup>) en formas amastigotes intracelulares de *L. major*<sup>a</sup>.**

Pentostam (Sb <sup>V</sup> )	EC <sub>50</sub> (μM) [SI] <sup>b</sup>	
	pXG-Hyg	ABCI4
Control	20.29 ± 1.96	40.64 ± 3.17
D2	16.23 ± 0.91 [1.25]	15.79 ± 0.57 [2.57]*
D4	14.90 ± 1.28 [1.36]	15.78 ± 0.84 [2.57]*

<sup>a</sup> Los amastigotes intracelulares de las diferentes líneas de *L. major* se obtuvieron tras la infección de macrófagos derivados de monocitos, como se describe en Material y Métodos. Después de 72 h, la susceptibilidad a Pentostam (Sb<sup>V</sup>) se determinó a partir del porcentaje de células infectadas y el número medio de amastigotes por macrófago infectado en cultivos en presencia o ausencia del fármaco. Empleamos los diferentes inhibidores a una concentración de 20 μM y estuvieron presentes a lo largo de todo el experimento.

<sup>b</sup> El índice de susceptibilidad se calculó dividiendo la EC<sub>50</sub> a Sb<sup>III</sup> en ausencia de compuesto entre la EC<sub>50</sub> en presencia de 20 μM de compuesto. Los datos proceden de medias ± desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas de los valores de índice de susceptibilidad entre las líneas pXG-Hyg (control) y ABCI4 se determinaron mediante el *t*-test de Student (\*: *p*<0.01).

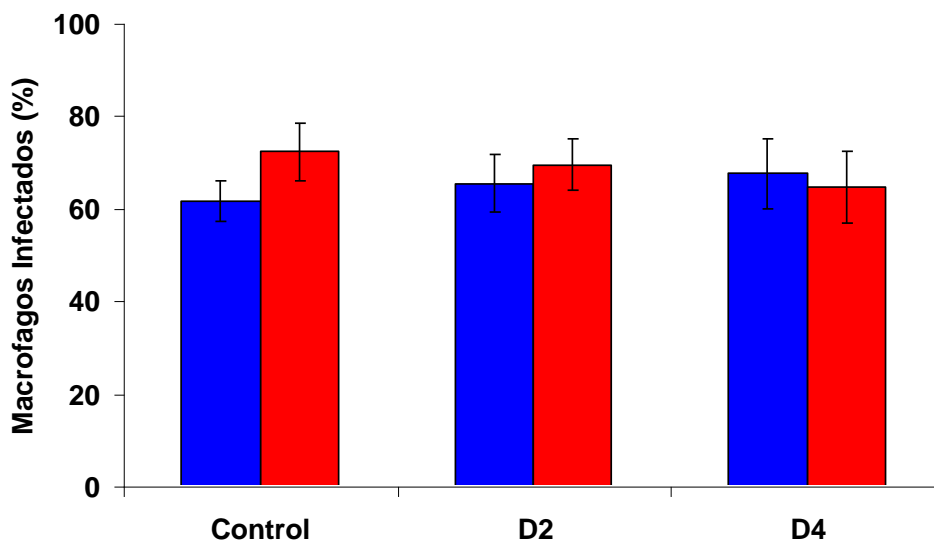
De hecho, en formas amastigotes intracelulares que sobreexpresaban ABCI4 y que eran resistentes a antimonio, los compuestos D2 y D4 revirtieron la resistencia con un índice de susceptibilidad de 2,6 para ambos compuestos, de forma similar a los valores observados en formas promastigotes.

## **Inhibición de la replicación de las formas amastigotas intracelulares de *Leishmania*.**

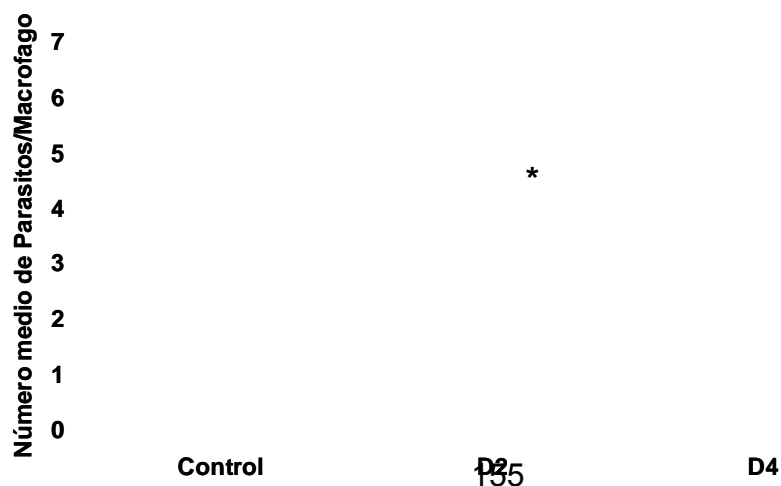
Como se ha descrito previamente, la línea de *Leishmania* que sobreexpresa ABCI4 sobrevive mejor en las condiciones hostiles del interior de

macrófagos peritoneales de ratón, con una tasa de replicación más alta que las líneas control. Así, determinamos si los compuestos D2 y D4 podrían modificar la infectividad y replicación de las líneas de *Leishmania* en el interior de los macrófagos. Como puede observarse, las diferentes líneas de *Leishmania* mostraron un porcentaje de infección similar tanto en presencia como en ausencia de los compuestos testados a 72 h post-infección (Fig. R-23A). Sin embargo, se observó que tras el tratamiento con los compuestos D2 y D4 durante 72 h post-infección, se revertía totalmente la mayor tasa de replicación de los parásitos que sobreexpresaban el transportador ABCI4 (Fig. R-23B). Los compuestos D2 y D4 probablemente bloqueen la funcionalidad de ABCI4 y su habilidad de transportar sustratos aún desconocidos asociados con mecanismos de detoxificación en *Leishmania*, incrementando la habilidad de sobrevivir en el interior de los macrófagos.

### A



### B





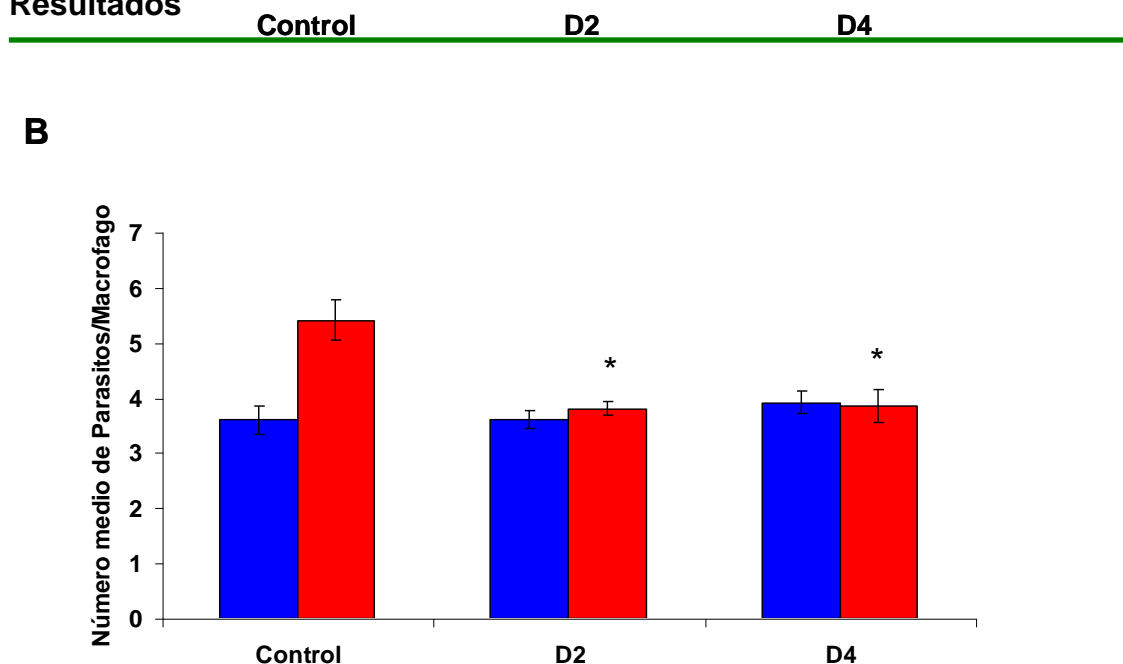


Figura R-23. Infectividad y supervivencia de líneas de *L. major* en macrófagos derivados de monocitos en presencia de los derivados del trolox D2 y D4.

La infección de macrófagos derivados de monocitos obtenidos a partir de células THP-1 con las líneas de *Leishmania* pXG-Hyg (histogramas azules) y ABCI4 (histogramas rojos) se realizó como se describe en Material y Métodos. El porcentaje de macrófagos infectados (A) y el número medio de parásitos por macrófago infectado (B) se determinó a las 72 h post-infección en presencia o ausencia 20  $\mu$ M de D2 o D4. Los datos proceden de medias  $\pm$  desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas frente a la línea en ausencia de compuesto se determinó mediante el *t*-test de Student (\*:  $p < 0.01$ ).

## Reversión de la resistencia a porfirinas tóxicas mediada por ABCI4 en *Leishmania*.

La sobreexpresión del transportador ABCI4 confiere resistencia a algunas porfirinas tóxicas como ZPP, un análogo de hemo que se ha descrito que es transportado por ABCG2 (Desuzinges-Mandon et al. 2010). Como se muestra en la Tabla R-9, los compuestos D2 y D4 revierten de forma eficaz la resistencia a ZPP con un valor de índice de susceptibilidad de 3. Consecuentemente, estos resultados muestran claramente el potencial de los compuestos D2 y D4 como inhibidores efectivos de la actividad de ABCI4, revirtiendo tanto la resistencia a antimoniales como a porfirinas tóxicas en *Leishmania*.

Tabla R-9. Susceptibilidad a ZPP en líneas de *L. major*<sup>a</sup>.

ZPP	EC <sub>50</sub> (μM) [SI] <sup>b</sup>	
	pXG	pXG-ABCI4
Control	4.35 ± 0.67	10.12 ± 0.23
D2	3.03 ± 0.21 [1.43]	3.40 ± 0.36 [2.97]*
D4	3.26 ± 0.16 [1.33]	3.57 ± 0.29 [2.83]*

<sup>a</sup> Los parásitos se cultivaron como se describe en Material y Métodos en presencia de concentraciones crecientes de ZPP. La densidad celular se midió empleando un contador de partículas electrónico y mediante contaje directo con un hemocitómetro. Se emplearon los inhibidores potenciales D2 y D4 a una concentración de 20 μM y estuvieron presentes a lo largo de todo el experimento.

<sup>b</sup> El índice de susceptibilidad (SI) se calculó dividiendo la EC<sub>50</sub> a Sb<sup>III</sup> en ausencia de compuesto entre la EC<sub>50</sub> en presencia de 20 μM de compuesto. Los datos proceden de medias ± desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas frente a la línea en ausencia de compuesto se determinó mediante el t-test de Student (\*:  $p < 0.01$ ).

### **Reversión de la acumulación y eflujo de Sb<sup>III</sup> y tioles en líneas de *Leishmania*.**

Estudiamos la capacidad de los compuestos D2 y D4 de revertir la acumulación de antimonio en la línea de *L. major* que sobreexpresa ABCI4. Como puede observarse en la Figura R-24A, ambos compuestos revierten completamente los niveles de acumulación de Sb<sup>III</sup> (alrededor de 3 veces, respecto a los parásitos sin tratamiento). Para confirmar que el incremento observado en la acumulación de antimonio en los parásitos resistentes era debido a una disminución en la actividad de eflujo, las líneas de *L. major* se cargaron con Sb<sup>III</sup> durante 1 h, y después de ser lavados, se midió la cantidad de antimonio retenida en el interior celular en presencia o ausencia de los compuestos D2 y D4. Los resultados indican que los compuestos D2 y D4 bloquean completamente el eflujo de antimonio mediado por el transportador ABCI4 (Fig. R-24B).

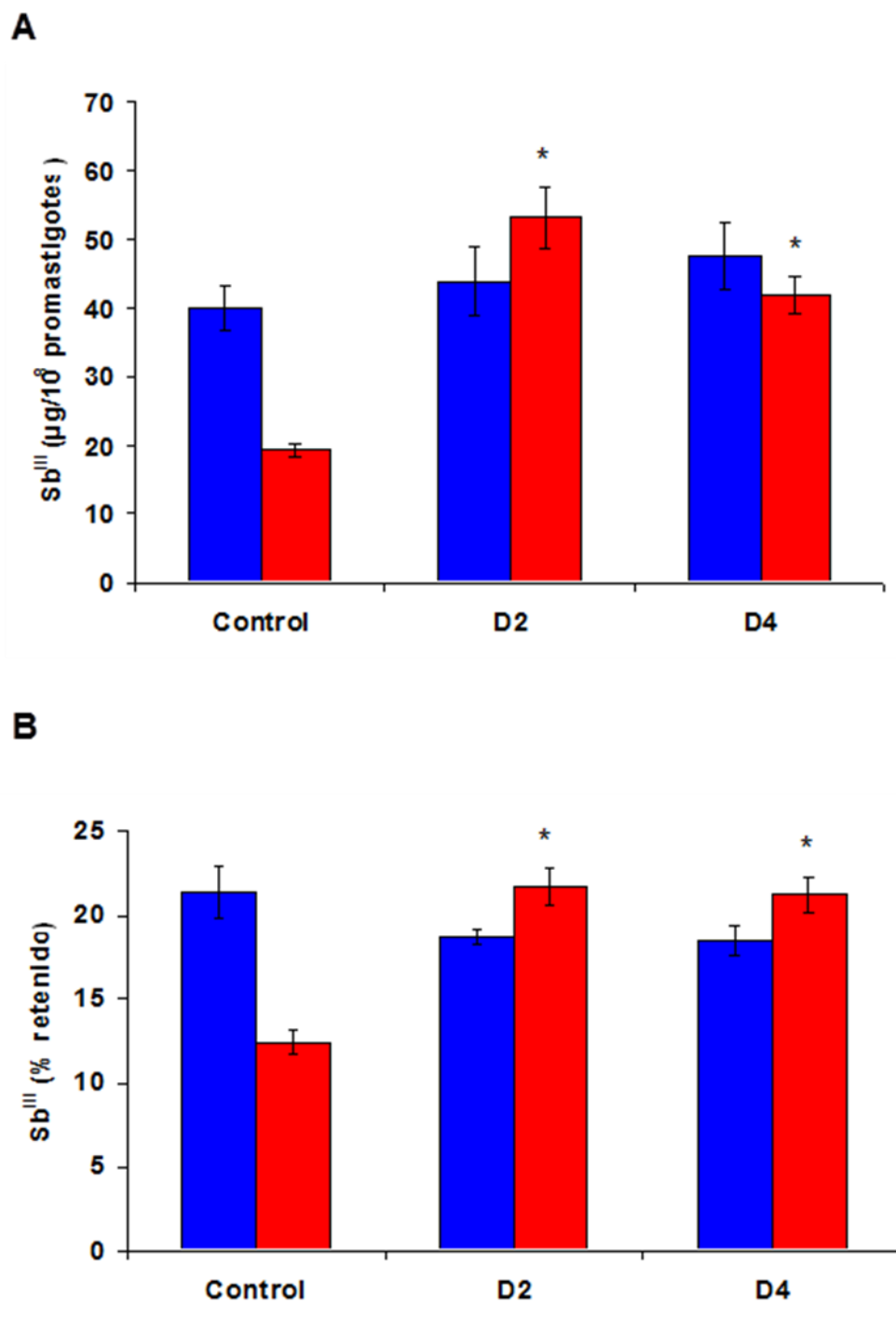


Figura R-24. Acumulación y eflujo de antimonio en líneas de *L. major* en presencia de los derivados de trolox D2 y D4. (A) Las líneas de *Leishmania* pXG-Hyg (histogramas azules) y ABCI4 (histogramas rojos) se incubaron con 100  $\mu\text{M}$  de  $\text{Sb}^{\text{III}}$  durante 60 min en presencia o ausencia de 20  $\mu\text{M}$  de D2 o D4 como se describe en Material y Métodos. (B) Después del ensayo de acumulación, los promastigotes se resuspenden en buffer HBS libre de antimonio en presencia o ausencia de 20  $\mu\text{M}$  de inhibidor durante 180 min a 28°C. El antimonio retenido se midió mediante ICP-MS. Los datos proceden de medias  $\pm$  desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas frente a la línea en ausencia de compuesto se determinó mediante el *t*-test de Student (\*:  $p < 0.01$ ).

Ya que ABCI4 exporta complejos conjugados de metal con grupos tioles, estudiamos la capacidad de D2 y D4 de revertir el eflujo de tioles no proteicos en presencia de  $Sb^{III}$ . Nuestros resultados indican que los compuestos D2 y D4 revierten totalmente el eflujo de tioles no proteicos mediado por ABCI4 (Fig. R-25).

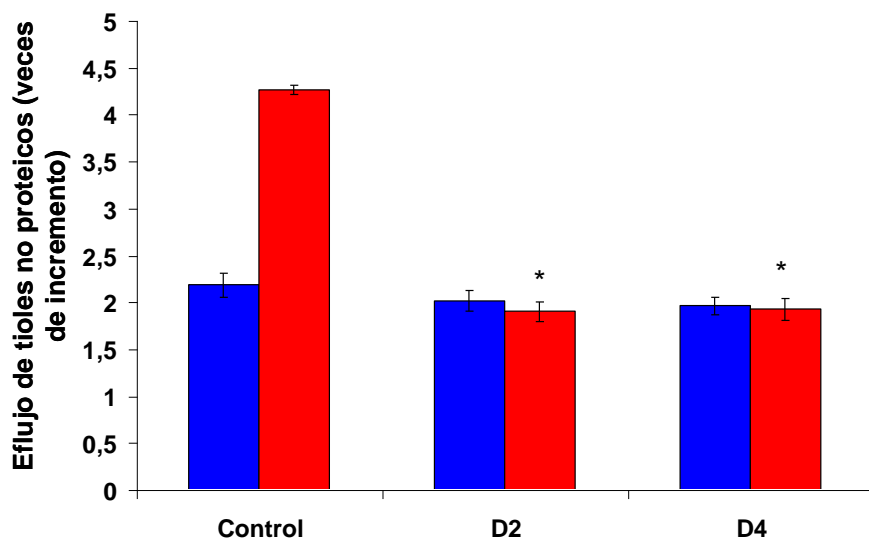


Figura R-25. Eflujo de tioles no proteicos en líneas de *L. major* en presencia de los compuestos D2 y D4. Las líneas de *Leishmania* pXG (histogramas azules) y ABCI4 (histogramas rojos) se incubaron con  $100 \mu M$  de  $Sb^{III}$  durante 1 h, y el eflujo se realizó durante 180 min a  $28^{\circ}C$ . Los compuestos D2 y D4 se añadieron a una concentración de  $20 \mu M$  durante la incubación con  $Sb^{III}$  y permanecieron presentes a lo largo de todo el experimento. Los parásitos se centrifugaron y los sobrenadantes se incubaron con  $3 \mu g/mL$  de ThioStar durante 1 h a temperatura ambiente y se determinó la fluorescencia asociada a las muestras. El incremento del eflujo de tioles no proteicos se refiere al punto inicial de eflujo. Los datos proceden de medias  $\pm$  desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas frente a la línea en ausencia de compuesto se determinó mediante el *t*-test de Student (\*:  $p < 0.01$ ).

## Reversión de la acumulación y eflujo de ZnMP en líneas de *Leishmania*.

Al igual que en el caso del antimonio, determinamos que los compuestos D2 y D4 revierten eficientemente la menor acumulación (Fig. R-26A) y el mayor eflujo de ZnMP en la línea que sobreexpresa ABCI4 (Fig. R-26B).

## Resultados

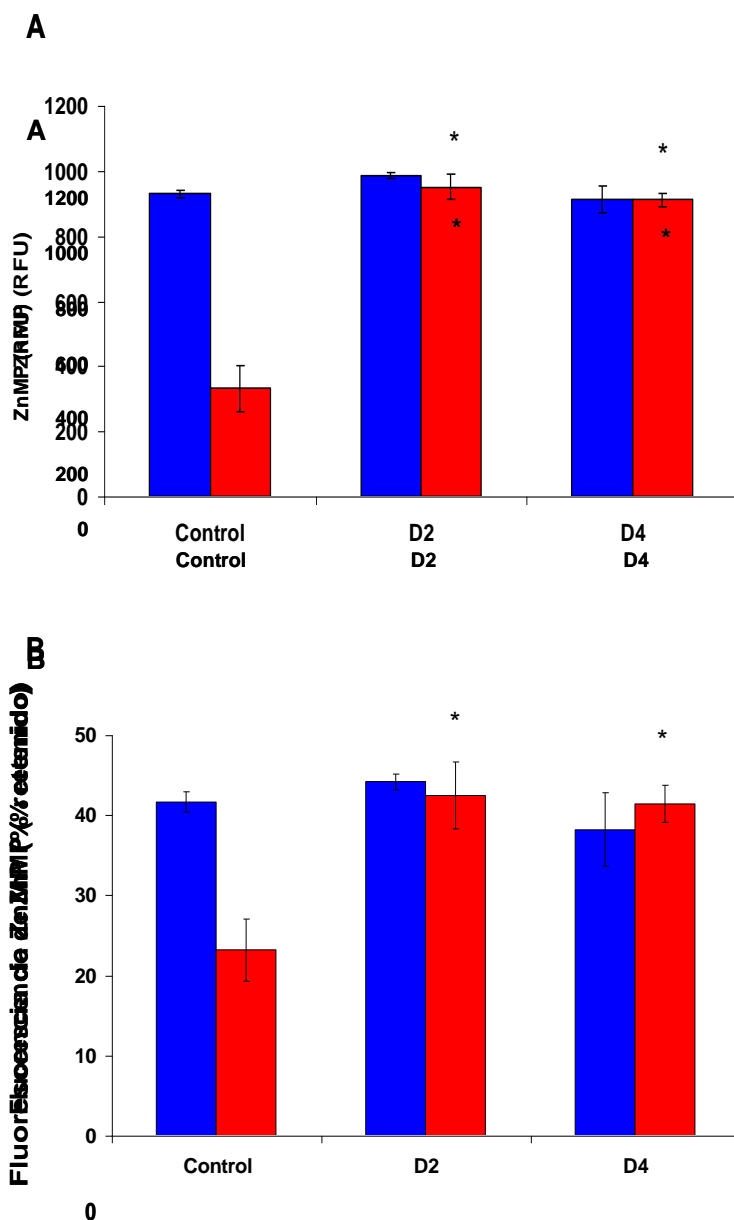


Figura R-26. Acumulación y eflujo de ZnMP en líneas de *L. major* en presencia de los compuestos D2 y D4. (A) Las líneas de *Leishmania* pXG-Hyg (histogramas azules) y ABC14 (histogramas rojos) se incubaron con 10  $\mu$ M de ZnMP en presencia o ausencia de los compuestos D2 y D4. RFU: Unidades relativas de fluorescencia. (B) El ensayo de eflujo se realizó cargando las diferentes líneas de *L. major* con 10  $\mu$ M de ZnMP y resuspendiendo después en buffer HPMI libre de ZnMP. La fluorescencia retenida tanto en acumulación como en eflujo se midió mediante citometría de flujo. Los datos proceden de medias  $\pm$  desviaciones estándar obtenidas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas frente a la línea en ausencia de compuesto se determinó mediante el *t*-test de Student (\*:  $p < 0.01$ ).

Consecuentemente, los compuestos D2 y D4 pueden ser considerados como agentes revertidores específicos que inhiben la actividad del transportador ABC14 de *Leishmania*.

# DISCUSIÓN



## DISCUSION

### Situación actual de la leishmaniasis.

La leishmaniasis es la segunda enfermedad parasitaria en importancia por detrás de la malaria, tanto desde el punto de vista de la prevalencia anual de casos como de la letalidad de alguna de sus variantes, en el caso de no ser tratada. Según los datos de la OMS, hay 350 millones de personas en el mundo en riesgo de padecer la enfermedad, dándose de forma estimada de 0,2 a 0,4 millones de casos de LV y de 0,7 a 1,2 millones de casos de LC cada año. Los datos de incidencia son estimados, dado que solo 33 de los 98 países donde la enfermedad es endémica dan información oficial acerca de la infección. En Europa, la leishmaniasis es una enfermedad emergente dependiente del cambio climático, de los nuevos modelos de desarrollo de los países y del tráfico de viajeros y de perros infectados. La LV y LC son enfermedades endémicas en la región Mediterránea y están causadas por *L. infantum*, apareciendo también esporádicamente en Grecia y países adyacentes brotes de LC debida a *L. tropica*. En este sentido, en España la enfermedad es endémica en todo el territorio nacional, excepto en Canarias. Desde 2009, se ha descrito un brote de leishmaniasis en el sur de la Comunidad de Madrid en el que la liebre cumple el papel de hospedador reservorio. De esta manera, los datos estimados de incidencia de la enfermedad en España han aumentado hasta los 21,54 casos/100.000 hab.

La leishmaniasis es una enfermedad directamente relacionada con la pobreza, asociándose con estados de malnutrición, migraciones, hacinamiento, debilidad del sistema inmune y falta de recursos. A su vez, se encuentra también ligada a cambios en el medio ambiente, tales como deforestación, construcción de presas, nuevos sistemas de riego y urbanización descontrolada, junto con la migración de personas susceptibles (no inmunes) a áreas endémicas, factores



## Discusión

---

que se dan en países en vías de desarrollo ( Cattand, 2 006). En los últimos tiempos, esta enfermedad se está convirtiendo en un problema muy serio en zonas próximas al Amazonas, en las regiones tropicales de los países andinos y en Marruecos y Arabia Saudí, donde se han detenido numerosos programas destinados al desarrollo socioeconómico debido al aumento del número de casos de esta enfermedad. A su vez, es importante destacar la más reciente asociación de coinfección con *Leishmania* en pacientes enfermos de VIH (Alvar et al. 2008), encontrándose frecuentemente dicha asociación en países desarrollados del sur de Europa.

La falta de recursos de los países donde la enfermedad es endémica provoca un acceso insuficiente a métodos de diagnóstico efectivos y a tratamientos adecuados. Ante la ausencia de una vacuna eficaz, solo queda llevar a cabo programas de control de las poblaciones del insecto vector y tratamientos quimioterapéuticos de los afectados. Actualmente existe un reducido arsenal de fármacos para el tratamiento de la leishmaniasis. Se siguen empleando como fármacos de primera línea contra la LV los antimoniales pentavalentes, cada vez más criticados desde el punto de vista del fallo terapéutico por la aparición de resistencias a los mismos en algunas regiones endémicas como India. Otros tratamientos incluyen el empleo de anfotericina B más efectiva y con un reducido número de efectos secundarios en su forma liposomal, la miltefosina, el primer fármaco de administración oral contra la LV y la paromomicina. Sin embargo, la baja renta diaria de la población de algunos de estos países (2 \$ diarios en la India), impide el acceso de los pacientes al tratamiento efectivo, denotando la necesidad de una revisión de los acuerdos establecidos entre la OMS, los gobiernos centrales de los países implicados y las empresas farmacéuticas para reducir los precios y favorecer el acceso de todos los pacientes a los fármacos y diagnósticos necesarios (Alvar et al. 2006).

La aparición de resistencias a los fármacos empleados como primera línea en el tratamiento de la enfermedad, se dan fundamentalmente debido a mecanismos de resistencia a nivel molecular bien en el hospedador o bien en el parásito

(Gómez et al. 2013). De esta manera, se hace necesario el desarrollo de nuevos fármacos eficaces contra la leishmaniasis y la búsqueda de compuestos revertidores de estos mecanismos de resistencia, que reviertan la eficacia inicial de estos fármacos. Desde la OMS, se está fomentando el uso de terapias combinadas, empleando los fármacos de primera línea, precisamente para evitar la rápida aparición de resistencias, las cuales ya se ha descrito que pueden surgir de forma experimental empleando diferentes combinaciones de fármacos (García-Hernández et al. 2012).

### Transportadores ABC

Los transportadores ABC representan la familia de proteínas más amplia presente tanto en procariotas como en eucariotas, llevando a cabo funciones muy diversas, y muchas de ellas de gran relevancia clínica (Higgins et al. 1992).

Según la clasificación más reciente publicada (Leprohon et al. 2006), en *Leishmania* hay 42 genes codificantes para transportadores ABC, agrupados a su vez en varias subfamilias desde la A hasta la H, excepto 4 genes con muy baja homología con el resto de los transportadores ABC. Los transportadores ABC descritos hasta el momento en *Leishmania* forman parte de las subfamilias ABCA, ABCB, ABCC y ABCG. Dos miembros de la **subfamilia ABCA**, LtrABCA1.1 y LtrABCA2, se encuentran implicados en el tráfico de fosfolípidos y en la infectividad del parásito (Parodi-Talice et al. 2003); Araujo-Santos et al., 2005). Uno de los miembros de la **subfamilia ABCB** estudiado (ABCB4/MDR1) posee una alta homología con la glicoproteína-P (Pgp) de mamíferos, expulsando una gran variedad de fármacos al exterior celular y confiere resistencia incluso al fármaco leishmanicida miltefosina, debido a un incremento en el flujo de los fármacos (Pérez-Victoria et al. 2006). Miembros de la **subfamilia ABCC**, también están implicados en la resistencia a fármacos. El más estudiado es el que codifica para la PGPA (MRPA), confiriendo resistencia a arsenito y antimoniales mediante el sequestro en vesículas intracelulares de estos compuestos

## Discusión

---

conjugados con tripanotión (Ouellette et al. 1998). Los miembros de la **subfamilia ABCG** son “half-transporters” y entre ellos encontramos el transportador ABCG2 que se localiza en vesículas intracelulares próximas al bolsillo flagelar. El transportador ABCG2 está implicado en la translocación de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática y por tanto en la infectividad de *Leishmania* (Campos-Salinas et al. 2013). El transportador ABCG4, se encuentra localizado en la membrana plasmática y está implicado en la translocación de fosfatidilcolina, confiriendo también resistencia a alquilfosfolípidos (miltefosina, edelfosina) (Castanys-Muñoz et al. 2007). El transportador ABCG5 se localiza en vesículas cercanas al núcleo y al bolsillo flagelar, estando implicado en el transporte intracelular de hemo (Campos-Salinas et al. 2011). Finalmente, el transportador ABCG6 se encuentra localizado en la membrana plasmática y está implicado en el tráfico de fosfolípidos confiriendo resistencia a si-tamaquina, miltefosina y camptotecina (Castanys-Muñoz et al. 2008)

En *Leishmania*, como se ha comentado con anterioridad, existe un grupo de genes que codifican para proteínas ABC que se encuentran sin clasificar entre las subfamilias ya establecidas (ABCA-H). Este grupo denominado inicialmente como “otros”, incluye cuatro transportadores con muy baja homología con respecto a otras proteínas ABC eucariotas, pero poseen cierta similitud con otras proteínas ABC de especies del género *Trypanosoma* (Leprohon et al. 2006; <http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). Nuestro grupo está interesado en la caracterización de este grupo divergente de genes sin clasificar, específico de tripanosomátidos y ausente en el resto de organismos eucariotas. El grupo “otros”, al cual nombramos como ABCI, incluye 4 genes diferentes denominados como *ABC11* (LmjF12.1190), *ABC12* (LmjF32.2060), *ABC13* (LmjF33.3040) y *ABC14* (LmjF33.3260), todos ellos codificantes para ABC “half-transporters”, con una disposición del NBD en el extremo carboxilo pero con un requerimiento común, la necesidad de formar homo-/heterodímeros para ser funcionalmente activos. En este sentido, cabe resaltar que el transportador ABC14 presenta una mayor homología a nivel del NBD con otros transportadores mitocondriales de la familia ABCB que poseen una disposición TMD-NBD.

## **Localización del transportador ABCI4**

Para estudiar la localización de la proteína ABCI4, se crearon quimeras que nos permitieran tener la proteína fusionada a GFP, tanto en el extremo amino como en el carboxilo. La adición de un péptido o epítipo podrían alterar la localización y funcionalidad de la proteína (Gelissen et al. 2006), y por ello generamos quimeras con GFP en ambos extremos. Sin embargo, la línea que sobreexpresaba ABCI4 en carboxilo terminal no se pudo emplear para el análisis de la localización subcelular debido a los bajos niveles de expresión que obtuvimos, denotando la importancia de este extremo en la correcta funcionalidad de la proteína. Se determinó, mediante microscopía confocal de fluorescencia, que la proteína tenía una localización dual, hallándose mayoritariamente en mitocondria y también en membrana plasmática (Fig. D-1). Dicho patrón de localización se observó, de igual manera, mediante inmunofluorescencia indirecta empleando una línea transfectada con ABCI4 fusionada a 3 repeticiones del epítipo FLAG en amino terminal, corroborando la observación realizada anteriormente. Asimismo, no se observó cambio en la localización de ABCI4 mutado en su Walker A (cambio de una lisina por una metionina), a diferencia con lo descrito anteriormente para otras proteínas ABC (Henriksen et al. 2005).

La localización observada en mitocondria y en membrana plasmática ha sido descrita para el half-transporter ABCB6 humano que estaría implicado en funciones de tráfico de hemo, contribuyendo al descenso de la acumulación de feoforbida A y hemeina (Paterson et al. 2007). De forma similar, la proteína ABCG2 humana se ha descrito que se distribuye en membrana plasmática y orgánulos intracelulares, incluyendo la mitocondria, donde regula los niveles de protoporfirina IX mediada por ALA, exportándola desde la mitocondria al citosol (Kobuchi et al. 2012).

Estudios posteriores, realizados mediante el análisis de la digestión trípica controlada de GFP-ABCI4 en parásitos permeabilizados con digitonina, nos permitieron confirmar la localización mitocondrial, pudiendo afirmar que el

## Discusión

---

transportador ABCI4 se encuentra localizado en la membrana interna mitocondrial. Estos resultados junto con los obtenidos en el análisis de la actividad translocadora llevada a cabo con parásitos permeabilizados con digitonina, nos sugieren que el NBD de ABCI4 se encuentra orientado hacia la matriz mitocondrial.

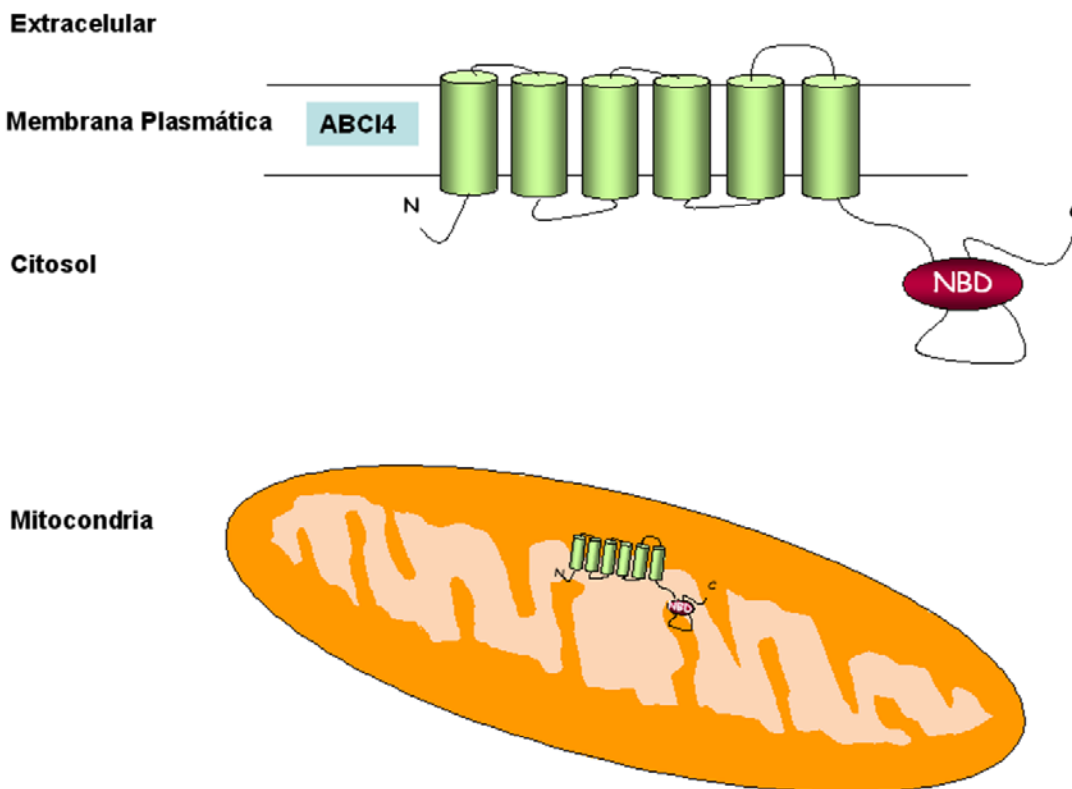


Figura D-1. Esquema de la localización dual del transportador ABCI4 en *Leishmania*.

## Homodimerización del transportador ABCI4

ABCI4 es considerado un “half-transporter”, siendo necesario que homodimerice para ser funcionalmente activo. Los experimentos de co-inmunoprecipitación realizados sugieren que el transportador ABCI4 homodimeriza para llevar a cabo su función de transporte, si n embargo no se

puede descartar que forme heterodímeros con otros transportadores ABC, cambiando su afinidad por sustratos y realizando por tanto el transporte de otras sustancias.

Los transportadores ABC peroxisomales (subfamilia ABCD) de células humanas, ALDP (ABCD1; Proteína de Adrenoleucodistrofia), ALDRP y PMP70 (ABCD3) homodimerizan y/o heterodimerizan entre ellos para llevar a cabo su función de importe de sustratos al interior del peroxisoma (Liu et al. 1999; Hillebrand et al. 2007). De igual manera, se ha descrito que los transportadores ABCG1 y ABCG4 homodimerizan para llevar a cabo su función reguladora en el tráfico de lípidos y esteroides; sin embargo, también heterodimerizarían como se demuestra mediante experimentos de inactivación de cada uno de ellos a través de la sobrexpresión de las proteínas opuestas mutadas en el Walker A (Cserepes et al. 2004). Asimismo, también se ha descrito la necesidad de heterodimerización de los transportadores ABCG5 y ABCG8 para el transporte de dicho complejo hacia la zona apical de la superficie celular donde llevará a cabo sus funciones; se ha demostrado que defectos en este complejo dan lugar a sitosterolemia provocando arterioesclerosis temprana (Graf et al. 2004). Además, el transportador asociado con el procesamiento del antígeno (TAP) un heterodímero formado por la asociación de dos half-transporters de la superfamilia ABCB, TAP1 (ABCB2) y TAP2 (ABCB3), juega un papel esencial en la ruta de presentación de antígeno mediante la translocación de péptidos citosólicos al interior del lumen del retículo endoplasmático (Corradi et al. 2012).

Recientemente, se ha descrito que los transportadores ABCB mitocondriales ABCB6, ABCB7 y ABCB10, con los que el transportador ABCI4 posee mayor grado de identidad, homodimerizan para llevar a cabo sus funciones (Zutz et al. 2009; Chavan et al. 2013).

### **Resistencia a antimonio y otros metales pesados.**

Actualmente, la mayor parte de las funciones descritas para los transportadores ABC de *Leishmania* están restringidas al tráfico de fosfolípidos y a resistencia a fármacos.

En base a estos antecedentes, decidimos investigar la implicación de ABCI4 en la resistencia a fármacos. Encontramos que los parásitos que sobreexpresaban ABCI4 eran resistentes a antimonio, tanto en formas promastigotas como amastigotas intracelulares, así como a  $As^{III}$ ,  $Cd^{II}$  y  $Pb^{II}$ , sugiriendo que los metales pesados podrían ser sustratos potenciales de este transportador. La resistencia observada a los antimoniales ( $Sb^{III}$ ) resultó ser debida a una menor acumulación como consecuencia de un incremento de la actividad de eflujo mediada por ABCI4; observándose este mismo resultado para  $Cd^{II}$ . Adicionalmente, se mostró que el  $Sb^{III}$  era transportado, mediante ABCI4, hacia el exterior celular posiblemente acompañado con grupos tiol, sugiriendo que ABCI4 confiere resistencia al  $Sb^{III}$  mediante el eflujo de complejos  $Sb^{III}$ -tiol. Consecuentemente, el transportador ABCI4 podría ser considerado como una bomba tiol-X capaz de reconocer conjugados metal-tiol.

La primera línea de fármacos empleados para combatir tanto la LV como la LC la constituyen los antimoniales pentavalentes: estibogluconato de sodio (Pentostam<sup>®</sup>) y antimonio de meglumina (Glucantime<sup>®</sup>). El  $Sb^V$  es poco tóxico y es reducido en el interior de la célula huésped o la forma amastigota del parásito para dar lugar al producto leishmanicida  $Sb^{III}$ . Anteriormente, se habían descrito transportadores ABC, pertenecientes a la subfamilia ABCC, implicados en la resistencia a  $Sb^{III}$ . La subfamilia ABCC se define como un grupo de proteínas implicadas en el transporte de conjugados con tioles. El primer transportador descrito en *Leishmania* e implicado en la resistencia a fármacos (antimoniales y arsenito) fue ABCC3, también conocido como PGPA o MRPA. ABCC3 está localizado en la membrana de vesículas intracelulares cercanas al bolsillo flagelar (Legaré et al. 2001). Inicialmente se detectó en amplicones de DNA (círculo H) de

formas promastigotas resistentes a metotrexato, pero la resistencia a este fármaco era debida a la sobreexpresión de pteridina reductasa cuyo gen se localizaba en el mismo amplicón (Callahan et al. 1991; Legaré et al. 2001). La sobreexpresión de ABCC3 confiere un nivel de resistencia a antimonio similar a la observada tras la sobreexpresión de ABCI4 (alrededor de 2-3 veces). Igualmente, se ha demostrado que la sobreexpresión de ABCC4, ABCC5 y ABCC7 (PRP1) confiere resistencia a antimonio (Coelho et al. 2003; Leprohon et al. 2009), aunque no se ha demostrado su amplificación ni sobreexpresión en líneas mutantes resistentes a antimonio (Leprohon et al. 2006, 2009), observando dicha resistencia únicamente en formas promastigotas (Coelho et al. 2003, 2007). Sin embargo, se ha descrito que la sobreexpresión de ABCC3 junto con la de enzimas clave en la síntesis del tiol  $T(SH)_2$  como GGCS o ODC incrementan el valor de  $EC_{50}$  (hasta 15 veces) (Legaré et al. 2001) actuando de forma sinérgica, denotando el importante carácter multifactorial de la resistencia a antimonio, y la dependencia de  $T(SH)_2$  en la detoxificación de metales pesados. De esta manera, ABCC3 confiere resistencia a antimonio mediante el secuestro de complejos tiol- $Sb^{III}$  en vesículas intracelulares y su posterior exocitosis a través del bolsillo flagelar. Además, los complejos tiol- $Sb^{III}$  producidos en el interior del parásito podrían ser también eliminados al exterior celular mediante un transportador tiol-metal localizado en la membrana plasmática no caracterizado hasta el momento (Legaré et al. 2001). La influencia de estos tioles en la resistencia mediada por ABCI4 se demostró mediante la depleción de estos grupos empleando un inhibidor de GGCS (BSO), observando un marcado descenso en la resistencia a  $Sb^{III}$ . A su vez, hemos observado un incremento del eflujo de tioles no proteicos dependiente de la presencia de antimonio en los parásitos que sobreexpresan ABCI4.

Se ha descrito en otros organismos la implicación de los transportadores ABC en la detoxificación de metales, así por ejemplo el transportador de levaduras HTM1 confiere tolerancia a cadmio mediante el secuestro de complejos de cadmio con fitoquelatina (derivado del glutatión) en la vacuola de fisión (Ortiz et al. 1995). De forma similar, el transportador YCF1 confiere resistencia a cadmio y



## Discusión

---

arsenito mediante la acumulación vacuolar de complejos metal-glutación (Li et al. 1996), mecanismo similar al encontrado en células de mamífero y mediado por MRP1/ABCC1 (Leslie, 2011).

Las plantas se encuentran expuestas a múltiples compuestos tóxicos, como los derivados del metabolismo interno, ciertos minerales, toxinas producidas por patógenos, herbicidas y material industrial. De esta manera, las plantas han desarrollado estrategias versátiles para detoxificar estos compuestos potencialmente tóxicos. Frecuentemente, se produce mediante la eliminación o transporte de los compuestos tóxicos conjugados con glutación a través de una bomba tior-X hacia el interior de la vacuola central. Por homología con la proteína humana HsABCC1 que cataliza el transporte de tior-X, se han identificado los transportadores AtABCC1, AtABCC2 y AtABCC3 implicados en el transporte de cadmio y arsenito conjugados con glutación hacia el interior de la vacuola de la planta (*Arabidopsis thaliana*). Se ha demostrado que la sobreexpresión de estos transportadores confiere resistencia a dichos metales (Kang et al. 2011).

Como se describe previamente, la resistencia a antimonio es un proceso multifactorial (Leprohon et al. 2009), que implica diferencias en los niveles de expresión de las diferentes proteínas implicadas, dependiendo de la línea resistente estudiada. Todo esto confirma la heterogeneidad de los mecanismos de resistencia en parásitos resistentes a fármacos (Decuypere et al. 2012). Así, las diferentes técnicas “ómicas” se han usado a nivel de genoma, transcriptoma y metaboloma para detectar adaptaciones moleculares en la resistencia a antimonio en *Leishmania*. Sin embargo, de los pocos estudios que hasta el momento se han realizado sobre la identificación de marcadores de resistencia a antimonio en aislados clínicos, se desprende que el problema es muy complejo ya que no se ha encontrado un patrón consensado (Decuypere et al. 2012). De momento no se ha detectado la implicación del transportador ABCI4 en la resistencia a antimonio en aislados clínicos. Por otra parte, no se ha desarrollado aún un método adecuado para obtener un panel a nivel de expresión proteica de marcadores de la resistencia a antimonio en aislados de *Leishmania*.

## **Resistencia a la porfirina tóxica zinc-protoporfirina**

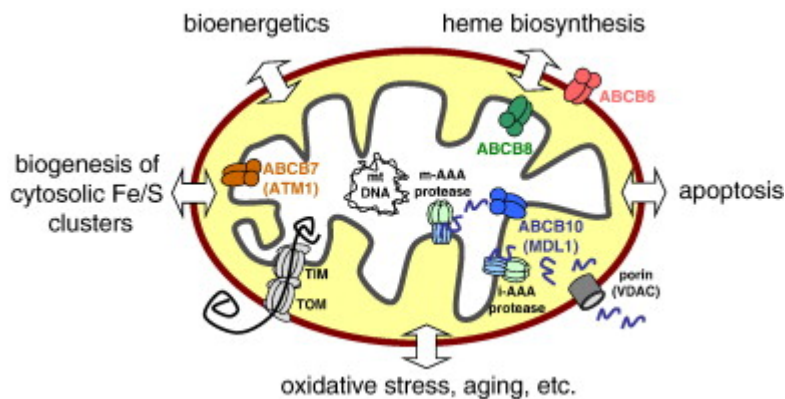
Los organismos pertenecientes a la familia de los tripanosomátidos (entre ellos *Leishmania*) son auxótrofos para la molécula de hemo, siendo necesaria la captación desde el exterior celular, bien de la molécula de hemo o bien de su precursor inmediato (protoporfirina IX), para la correcta síntesis de hemoproteínas, entre ellas los citocromos (Pal y Joshi-Purandare, 2001; Srivastava et al., 1997; Rao et al., 2005).

Hemos demostrado que la sobreexpresión de ABC14 en *Leishmania* confería resistencia a porfirinas tóxicas tales como zinc-protoporfirina (ZPP), un análogo de hemo fluorescente y que se ha descrito que es transportado por ABCG2 humano (Desuzinges-Mandon et al. 2010).

El principal destino del hemo y de la protoporfirina (precursor de hemo) es la mitocondria, donde el grupo hemo se incorpora como grupo prostético de los citocromos de la cadena respiratoria. En células humanas se han descrito una serie de transportadores ABC mitocondriales que estarían directamente relacionados con el tráfico de hemo. Así, el transportador ABCB6, localizado a nivel de membrana plasmática y membrana mitocondrial externa realizaría el transporte de porfirinas precursoras de hemo hacia el interior mitocondrial donde se hallan las enzimas implicadas en los últimos pasos de la biosíntesis del hemo (Krishnamurthy y Schuetz, 2006; Parterson et al. 2007; Hamza et al. 2012). ABCB7 se encuentra localizado en la membrana mitocondrial interna y es esencial para la biogénesis de clusters hierro/azufre y para la homeostasis del hemo; de hecho mutaciones en este transportador inhiben la maduración de los clusters mencionados, relacionándola con la enfermedad denominada anemia sideroblástica ligada al cromosoma X asociada con ataxia cerebelosa (XLSA/A). Estudios recientes demuestran que ABCB7 interaccionaría con la ferroquelatasa (última enzima en la ruta de biosíntesis de hemo), sugiendo un papel en la homeostasis del hemo en las células eritroides (Zutz et al. 2009). Por su parte, ABCB10 que se encuentra también localizado en la membrana mitocondrial

## Discusión

interna, podría estar involucrado en la salida de hemo al espacio intramembranal (Dunn et al. 2007) (Fig. D-2). En otro sentido, se especula la existencia de un exportador de hemo y porfirinas por varias razones: (1) el eflujo debe ser uno de los principales mecanismos implicados en la detoxificación de hemo, ya que su acumulación es extremadamente tóxica para las células; (2) el eflujo podría facilitar el reciclaje del hierro contenido en la molécula de hemo; y (3) el mantenimiento de la homeostasis del hemo y su ministro a proteínas dependientes del mismo. Uno de los transportadores propuestos que llevarían a cabo esta función es FLVCR. La supresión de este gen mediante el virus FLV-C en fibroblastos embrionarios felinos resulta en un incremento del contenido del hemo celular (Hamza et al. 2012). A su vez, ABCG2 (BCRP) que se encuentra localizado en la membrana interna mitocondrial en ciertas células tumorales además de la membrana plasmática, estaría implicado en el tráfico de porfirinas, aunque no existen pruebas directas que confirmen su implicación en el eflujo de las mismas (Krishnamurthy et al. 2007; Hamza et al. 2012).



**Figura D-2. Esquema de los transportadores ABC presentes en la mitocondria de células humanas (Zutz et al. 2009).**

En *Leishmania*, nuestro grupo ha descrito la implicación del transportador LABCG5, localizado en vesículas entre el núcleo y el bolsillo flagelar, en el tráfico de hemo procedente de la endocitosis de hemoglobina (Campos-Salinas et al.

2011). Así, la inactivación del transportador mediante la sobreexpresión de la dominante negativa LABCG5<sup>K/M</sup>, que contiene una mutación en el dominio Walker A, da lugar a un dramático descenso en el crecimiento, siendo posible el rescate de este fenotipo únicamente mediante la adición de hemo y no de hemoglobina (Campos-Salinas et al. 2011).

### **Potencial de membrana mitocondrial, ATP y generación de ROS**

El mecanismo de acción por el que actúan los fármacos antimoniales no se conoce con exactitud en *Leishmania*. Se ha determinado que los antimoniales afectan a la glicólisis y a la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, produciendo una depleción en los niveles de ATP; igualmente dan lugar a una despolarización de la membrana mitocondrial, con producción de ROS y fragmentación del DNA. A su vez, se ha descrito que los antimoniales inhiben en *Leishmania* la tripanotión reductasa, y en células de mamífero disminuyen los niveles de glutatión en el interior mitocondrial, incrementan la peroxidación lipídica y los niveles de la enzima glutatión S-transferasa (secuestro de tioles) generando, así, estrés oxidativo. Todos los eventos acaecidos sugieren una muerte posiblemente asociada a un fenómeno de apoptosis (Fig. D-3) (Raza et al. 2002; Ouellette et al. 2004;). En este sentido, se ha descrito que el trióxido de arsénico ( $As_2O_3$ ) y el trióxido de antimonio ( $Sb_2O_3$ ) inducen apoptosis en células mielogénicas y linfáticas humanas, mediante el reclutamiento de caspasas, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y producción de ROS. Además dichos efectos se ven amplificados en presencia del inhibidor del metabolismo de glutatión BSO, remarcando la importancia del sistema redox basado en glutatión. El  $As_2O_3$  se encuentra en fase de ensayos clínicos para el tratamiento de la leucemia promielocítica aguda (Lösler et al. 2009).

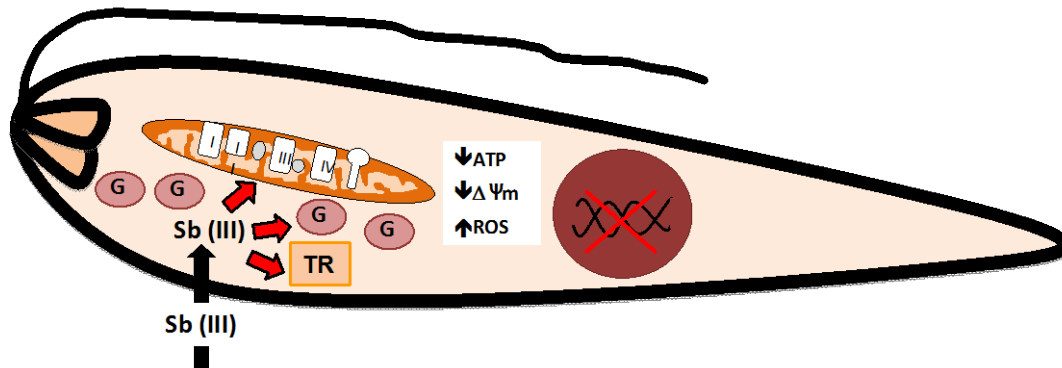


Figura D-3. Esquema de los mecanismos afectados en el tratamiento de *Leishmania* con antimoniales. G: Glicosomas; TR: Tripanotión Reductasa.

El mayor eflujo de los complejos  $Sb^{III}$ -tioI observado en la línea de *Leishmania* que sobreexpresa ABCI4, debería traducirse en un a menor despolarización de l  $\Delta\Psi_m$  y en u n m antenimiento de l os niveles de A TP y R OS ( citosólico y mitocondrial). N uestros resultados corroboran es ta teoría, observándose u n mantenimiento de estos parámetros debido a la menor acumulación de antimonio en el i nterior de esta l ínea, siendo fundamental para el fenotipo obse rvado de resistencia a metales pesados. Anteriormente, ya se había descrito en una línea de p arásitos r esistentes a antimonio e n l a que ex iste un a so breexpresión d el transportador MRPA sin observarse diferencia en cuanto a l os niveles de tioles intracelulares, al i gual que e n n uestra l ínea que so breexpresa ABCI4, que l os niveles de R OS y l a desp olarización de l a m embrana mitocondrial so n significativamente i nferiores tras el t ratamiento co n est os fármacos en comparación co n l as líneas su sceptibles ( Moreira et al. 2011; El F adili e t al. 2005).

## **Infectividad y replicación de *Leishmania* en el interior de macrófagos peritoneales**

Las formas infectivas promastigotas y las formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* son capaces de sobrevivir en el ambiente hostil del interior de los macrófagos, donde existe una alta producción y liberación de ROS. *Leishmania* sobrevive y se replica inhibiendo el daño oxidativo o incrementando la protección antioxidante (Van Assche et al. 2011).

Hemos observado que la línea de *Leishmania* que sobreexpresa ABCI4 sobrevive mejor en el interior de los macrófagos peritoneales de ratón con respecto al resto de las líneas estudiadas, como se determina por el significativo aumento en la replicación de los parásitos a las 72 h post-infección. Aunque el mecanismo por el que se incrementa esta capacidad de supervivencia lo desconocemos, sugerimos que ABCI4 podría ser capaz de transportar sustratos desconocidos y no identificados asociados con mecanismos de detoxificación. En este sentido, se ha descrito que el transportador MRP1, implicado en resistencia a fármacos, es capaz de transportar GSH, además de complejos GSH-metal y GSH-Fe-NO (Maeno et al. 2009; Suryo Rahmanto et al. 2012). Las moléculas de óxido nítrico (NO), junto con radicales de superóxido, peróxido de hidrógeno y peroxinitrito, son generadas por los macrófagos como mecanismo de defensa oxidativo frente a *Leishmania* (Van Assche et al. 2011). De esta manera, el transportador ABCI4 al ser considerado como una bomba tiol-X podría transportar complejos con NO, favoreciendo de esta manera la supervivencia de los parásitos en el interior del macrófago.

Hasta la fecha, no se ha descrito ningún transportador ABC implicado en la replicación de las formas amastigotas de *Leishmania* en el interior de los macrófagos, y por tanto en la mayor infectividad de los parásitos. Sin embargo, si se ha descrito la participación de LA BCG2 en la virulencia de *Leishmania*, transportando fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana plasmática

## Discusión

---

del parásito. De esta manera, los parásitos dominantes negativos para dicho gen infectan con una tasa significativamente menor que la línea salvaje (Campos-Salinas et al. 2012).

A modo de resumen, la sobreexpresión del transportador ABCI4 en la membrana plasmática podría proteger a los parásitos contra los efectos tóxicos del antimonio y otros compuestos mediante el eflujo como complejos conjugados con tioles. Adicionalmente, la sobreexpresión de ABCI4 en mitocondria disminuye la toxicidad y acumulación de antimonio y porfirinas, mediante el eflujo al citosol (Fig. D-4).

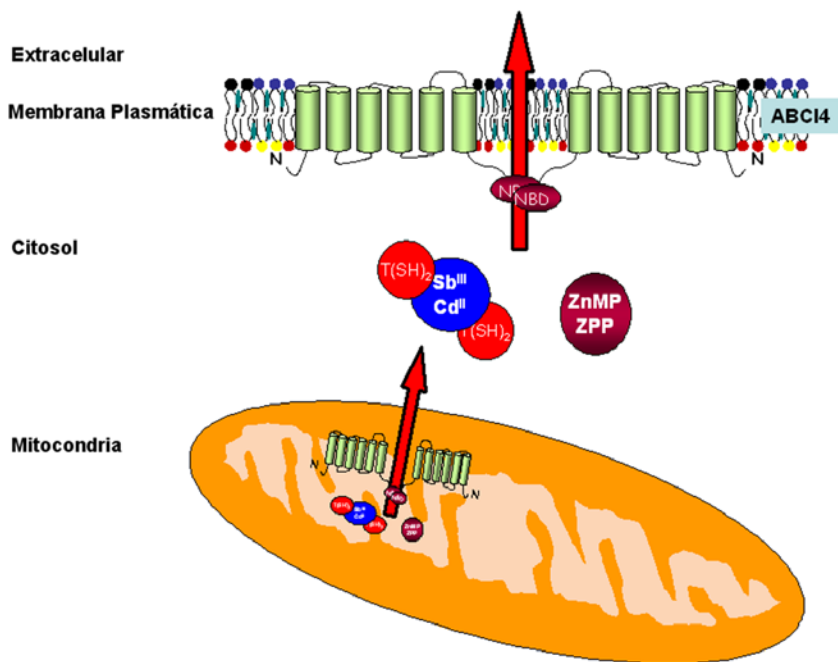


Figura D-4. Esquema de las funciones que llevaría a cabo el transportador ABCI4 en *Leishmania*.

## **Identificación de agentes revertidores específicos de la resistencia a antimonio mediada por ABCI4**

Los compuestos basados en antimonio pentavalente continúan siendo empleados como tratamiento de elección para todas las formas de leishmaniasis, desde lesiones cutáneas a fatales infecciones viscerales, con excepción de la India donde la cada vez mayor resistencia a los antimoniales desaconseja su uso. El incremento en los casos de resistencia a antimoniales hace necesario la identificación y desarrollo de nuevos compuestos con actividad leishmanicida. Igualmente, hace falta incentivar la investigación para dilucidar los mecanismos que generan la resistencia a fármacos en estos parásitos, con la esperanza de poder restaurar la eficacia de los fármacos existentes y facilitar el desarrollo de nuevos fármacos que puedan eludir los mecanismos de resistencia desarrollados por *Leishmania*.

Entre los diferentes mecanismos de resistencia identificados destaca el transporte de los fármacos a través de las membranas, jugando un papel fundamental en el descenso de la concentración intracelular en las localizaciones diana de los mismos. Los transportadores ABC juegan un papel importante en la resistencia a múltiples fármacos en células cancerígenas, además de su implicación en levaduras patógenas, hongos, parásitos y bacterias. La inhibición de la actividad de las proteínas ABC representa una estrategia interesante para el control de la resistencia a fármacos (Pradines, 2013).

Algunos moduladores, como bloqueantes de canales de calcio (verapamil), antagonistas de la calmodulina (derivados de fenotiazina), estatinas (lovastatina), análogos de piridina (PAK-104P), derivados de sulfonilurea (glibenclamida) y derivados de acridonacarboxamida (elacridar y zosuquidar), reverten la resistencia mediada por transportadores ABC en *Leishmania* (BoseDasgupta et al. 2008; Essodaigui et al. 1999; Mookerjee Basu et al. 2008; Padrón-Nieves et al. 2009; Pérez-Victoria et al. 2006). Adicionalmente, compuestos naturales como los



## Discusión

---

sesquiterpenos dihidro- $\beta$ -agarofuranos se consideran prometedoros agentes revertidores del fenotipo de resistencia a múltiples fármacos en *Leishmania* mediada por la sobreexpresión del transportador P-gp, miembro de la subfamilia ABCB (Cortés-Selva et al. 2005; Kennedy et al. 2001). A su vez, el fármaco oral sitamaquina ha de mostrado ser eficaz en la reversión de la resistencia a miltefosina y a antimonio mediada por la sobreexpresión de P-gp y LA BCA3, respectivamente (Pérez-Victoria et al. 2011).

Inicialmente centramos nuestra búsqueda en derivados de flavonoides, dado que ya se ha descrito su actividad revertidora sobre transportadores ABC que confieren resistencia a fármacos (Pérez-Victoria et al. 1999). En este sentido, se ha descrito que las auronas, una subclase de flavonoides, son capaces de unirse e inhibir al transportador P-gp (Boumendjel et al. 2002). A su vez, se ha descrito que los análogos de isoflavona inhiben al transportador NorA, la bomba bacteriana responsable del eflujo de fluoroquinolonas, mientras que algunas flavonas y chalconas se han descrito como inhibidores efectivos de P-gp y ABCG2 (Doleans-Jordheim et al. 2013). De forma similar, algunas xantonas se han identificado como efectores del transportador humano MRP1/ABCC1 (Boumendjel et al. 2011; Vaclavikova et al. 2008; Boccard et al. 2009).

**CONCLUSIONES**



### CONCLUSIONES

1. El gen *ABC14* de *Leishmania* codifica para una proteína ABC del tipo “half-transporter” conservada exclusivamente en tripanosomátidos.
2. Los análisis realizados mediante microscopía confocal, biotinylation y digestión con tripsina de parásitos permeabilizados con digitonina, sugieren que el transportador *ABC14* de *Leishmania* se encuentra localizado tanto en la membrana mitocondrial interna como en la membrana plasmática del parásito.
3. Los ensayos de co-inmunoprecipitación empleando parásitos que co-expresan *ABC14* fusionado con diferentes epítomos, sugieren que la proteína homodimeriza.
4. Los parásitos que sobreexpresan *ABC14* presentan una resistencia significativa a antimoniales, y a otros metales pesados como arsenito, cadmio y plomo.
5. Los parásitos que sobreexpresan *ABC14* acumulan menos compuestos antimoniales y otros metales pesados debido a un incremento en su eflujo al exterior celular.
6. La sobreexpresión de *ABC14* confiere también resistencia a la porfirina tóxica zinc-protoporfirina, debido a una menor acumulación intracelular por un mayor eflujo a través de las membranas donde se ubica el transportador.
7. El eflujo de metales pesados mediado por *ABC14* lleva aparejado un incremento en la eliminación de tóxicos no protéticos al medio, lo que sugiere que *ABC14* podría ser una bomba H<sup>+</sup>-X.

## Conclusiones

---

8. Los parásitos que sobreexpresan ABC14 muestran un incremento en la tasa de replicación en el interior de macrófagos peritoneales de ratón.
  
9. Los compuestos derivados de trolax D2 (N-etilcarboxamida) y D4 (N-propilcarboxamida), bloquean específicamente la actividad de ABC14, revirtiendo a niveles de la cepa salvaje la sensibilidad a metales pesados, Zn-protoporfirina, así como las tasas de replicación intracelular del parásito.

# BIBLIOGRAFÍA



---

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. **Akilov, O. E., S. Kosaka, K. O'Riordan, and T. Hasan.** 2007. Parasiticidal effect of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells. *Exp Dermatol* **16**:651-60.
2. **Alexander, J., A. R. Satoskar, and D. G. Russell.** 1999. Leishmania species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci* **112 Pt 18**:2993-3002.
3. **Allahverdiyev, A. M., S. Uzun, M. Bagirova, M. Durdu, and H. R. Memisoglu.** 2004. A sensitive new microculture method for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* **70**:294-7.
4. **Alvar, J., P. Aparicio, A. Aseffa, M. Den Boer, C. Canavate, J. P. Dedet, L. Gradoni, R. Ter Horst, R. Lopez-Velez, and J. Moreno.** 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* **21**:334-59, table of contents.
5. **Alvar, J., C. Canavate, R. Molina, J. Moreno, and J. Nieto.** 2004. Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* **57**:1-88.
6. **Alvar, J., I. D. Velez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin, and M. den Boer.** 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* **7**:e35671.
7. **Alvar, J., S. Yactayo, and C. Bern.** 2006. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol* **22**:552-7.
8. **Araujo-Santos, J. M., A. Parodi-Talice, S. Castanys, and F. Gamarro.** 2005. The overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in *Leishmania*. *Biochem Biophys Res Commun* **330**:349-55.
9. **Armijos, R. X., M. M. Weigel, M. Calvopina, A. Hidalgo, W. Cevallos, and J. Correa.** 2004. Safety, immunogenicity, and efficacy of an autoclaved *Leishmania amazonensis* vaccine plus BCG adjuvant against New World cutaneous leishmaniasis. *Vaccine* **22**:1320-6.
10. **Arrebola, R., A. Olmo, P. Reche, E. P. Garvey, D. V. Santi, L. M. Ruiz-Perez, and D. Gonzalez-Pacanowska.** 1994. Isolation and characterization of a mutant dihydrofolate reductase-thymidylate synthase from methotrexate-resistant *Leishmania* cells. *J Biol Chem* **269**:10590-6.
11. **Ashutosh, S. Sundar, and N. Goyal.** 2007. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J Med Microbiol* **56**:143-53.
12. **Aviles, H., A. Belli, R. Armijos, F. P. Monroy, and E. Harris.** 1999. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J Parasitol* **85**:181-7.
13. **Awasthi, A., R. K. Mathur, and B. Saha.** 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res* **119**:238-58.
14. **Badaro, R., T. C. Jones, R. Lorenzo, B. J. Cerf, D. Sampaio, E. M. Carvalho, H. Rocha, R. Teixeira, and W. D. Johnson, Jr.** 1986. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. *J Infect Dis* **154**:639-49.



15. **Bajenoff, M., B. Breart, A. Y. Huang, H. Qi, J. Cazareth, V. M. Braud, R. N. Germain, and N. Glaichenhaus.** 2006. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J Exp Med* **203**:619-31.
16. **Banchereau, J., and R. M. Steinman.** 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**:245-52.
17. **Baneth, G., A. F. Koutinas, L. Solano-Gallego, P. Bourdeau, and L. Ferrer.** 2008. Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* **24**:324-30.
18. **Banuls, A. L., M. Hide, and F. Prugnolle.** 2007. Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol* **64**:1-109.
19. **Barr, S. D., and L. Gedamu.** 2003. Role of peroxidoxins in *Leishmania chagasi* survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress. *J Biol Chem* **278**:10816-23.
20. **Basselin, M., H. Denise, G. H. Coombs, and M. P. Barrett.** 2002. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob Agents Chemother* **46**:3731-8.
21. **Bastrenta, B., N. Mita, R. Buitrago, F. Vargas, M. Flores, M. Machane, N. Yacsik, M. Torrez, F. Le Pont, and F. Breniere.** 2003. Human mixed infections of *Leishmania* spp. and *Leishmania-Trypanosoma cruzi* in a sub Andean Bolivian area: identification by polymerase chain reaction/hybridization and isoenzyme. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **98**:255-64.
22. **Belkaid, Y., B. Butcher, and D. L. Sacks.** 1998. Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in *Leishmania*-infected cells. *Eur J Immunol* **28**:1389-400.
23. **Berg, M., M. Vanaerschot, A. Jankevics, B. Cuypers, I. Maes, S. Mukherjee, B. Khanal, S. Rijal, S. Roy, F. Opperdoes, R. Breitling, and J. C. Dujardin.** 2013. Metabolic adaptations of *Leishmania donovani* in relation to differentiation, drug resistance, and drug pressure. *Mol Microbiol*.
24. **Bhardwaj, S., N. Srivastava, R. Sudan, and B. Saha.** 2010. *Leishmania* interferes with host cell signaling to devise a survival strategy. *J Biomed Biotechnol*:109189.
25. **Biswas, E. E.** 2001. Nucleotide binding domain 1 of the human retinal ABC transporter functions as a general ribonucleotidase. *Biochemistry* **40**:8181-7.
26. **Blackwell, J. M.** 1985. Receptors and recognition mechanisms of *Leishmania* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **79**:606-12.
27. **Boccard, J., F. Bajot, A. Di Pietro, S. Rudaz, A. Boumendjel, E. Nicolle, and P. A. Carrupt.** 2009. A 3D linear solvation energy model to quantify the affinity of flavonoid derivatives toward P-glycoprotein. *Eur J Pharm Sci* **36**:254-64.
28. **Bogdan, C.** 2008. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. *Cell Microbiol* **10**:1221-34.

29. **Bora, D.** 1999. Epidemiology of visceral leishmaniasis in India. *Natl Med J India* **12**:62-8.
30. **BoseDasgupta, S., A. Ganguly, A. Roy, T. Mukherjee, and H. K. Majumder.** 2008. A novel ATP-binding cassette transporter, ABCG6 is involved in chemoresistance of Leishmania. *Mol Biochem Parasitol* **158**:176-88.
31. **Boumendjel, A., C. Beney, N. Deka, A. M. Mariotte, M. A. Lawson, D. Trompier, H. Baubichon-Cortay, and A. Di Pietro.** 2002. 4-Hydroxy-6-methoxyaurones with high-affinity binding to cytosolic domain of P-glycoprotein. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **50**:854-6.
32. **Boumendjel, A., S. Macalou, G. Valdameri, A. Pozza, C. Gauthier, O. Arnaud, E. Nicolle, S. Magnard, P. Falson, R. Terreux, P. A. Carrupt, L. Payen, and A. Di Pietro.** 2011. Targeting the multidrug ABCG2 transporter with flavonoidic inhibitors: in vitro optimization and in vivo validation. *Curr Med Chem* **18**:3387-401.
33. **Brittingham, A., G. Chen, B. S. McGwire, K. P. Chang, and D. M. Mosser.** 1999. Interaction of Leishmania gp63 with cellular receptors for fibronectin. *Infect Immun* **67**:4477-84.
34. **Brittingham, A., C. J. Morrison, W. R. McMaster, B. S. McGwire, K. P. Chang, and D. M. Mosser.** 1995. Role of the Leishmania surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis. *J Immunol* **155**:3102-11.
35. **Brochu, C., J. Wang, G. Roy, N. Messier, X. Y. Wang, N. G. Saravia, and M. Ouellette.** 2003. Antimony uptake systems in the protozoan parasite Leishmania and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3073-9.
36. **Callahan, H. L., and S. M. Beverley.** 1991. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in Leishmania. *J Biol Chem* **266**:18427-30.
37. **Campos-Salinas, J., M. Cabello-Donayre, R. Garcia-Hernandez, I. Perez-Victoria, S. Castanys, F. Gamarro, and J. M. Perez-Victoria.** 2011. A new ATP-binding cassette protein is involved in intracellular haem trafficking in Leishmania. *Mol Microbiol* **79**:1430-44.
38. **Campos-Salinas, J., D. Leon-Guerrero, E. Gonzalez-Rey, M. Delgado, S. Castanys, J. M. Perez-Victoria, and F. Gamarro.** 2012. LABCG2, a new ABC transporter implicated in phosphatidylserine exposure, is involved in the infectivity and pathogenicity of Leishmania. *PLoS Negl Trop Dis* **7**:e2179.
39. **Carrero-Lerida, J., G. Perez-Moreno, V. M. Castillo-Acosta, L. M. Ruiz-Perez, and D. Gonzalez-Pacanowska.** 2009. Intracellular location of the early steps of the isoprenoid biosynthetic pathway in the trypanosomatids Leishmania major and Trypanosoma brucei. *Int J Parasitol* **39**:307-14.
40. **Carter, K. C., S. Sundar, C. Spickett, O. C. Pereira, and A. B. Mullen.** 2003. The in vivo susceptibility of Leishmania donovani to sodium stibogluconate is drug specific and can be reversed by inhibiting glutathione biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:1529-35.
41. **Carvalho, L., J. R. Luque-Ortega, C. Lopez-Martin, S. Castanys, L. Rivas, and F. Gamarro.** 2011. The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in Leishmania donovani promastigotes

- by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:4204-10.
42. **Castanys-Munoz, E., N. Alder-Baerens, T. Pomorski, F. Gamarro, and S. Castanys.** 2007. A novel ATP-binding cassette transporter from *Leishmania* is involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids. *Mol Microbiol* **64**:1141-53.
43. **Castanys-Munoz, E., J. M. Perez-Victoria, F. Gamarro, and S. Castanys.** 2008. Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite *Leishmania* with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:3573-9.
44. **Castanys-Munoz, E., J. M. Perez-Victoria, F. Gamarro, and S. Castanys.** 2008. Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite *Leishmania* with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:3573-9.
45. **Cattand, P., P. Desjeux, M. G. Guzman, J. Jannin, A. Kroeger, A. Medici, P. Musgrove, M. B. Nathan, A. Shaw, and C. J. Schofield.** 2006. Tropical Diseases Lacking Adequate Control Measures: Dengue, Leishmaniasis, and African Trypanosomiasis.
46. **Chan, J., T. Fujiwara, P. Brennan, M. McNeil, S. J. Turco, J. C. Sibille, M. Snapper, P. Aisen, and B. R. Bloom.** 1989. Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:2453-7.
47. **Chang, C. S., and K. P. Chang.** 1985. Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol* **16**:267-76.
48. **Chang, K. P., and D. M. Dwyer.** 1976. Multiplication of a human parasite (*Leishmania donovani*) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. *Science* **193**:678-80.
49. **Chappuis, F., S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R. W. Peeling, J. Alvar, and M. Boelaert.** 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* **5**:873-82.
50. **Charmoy, M., F. Auderset, C. Allenbach, and F. Tacchini-Cottier.** 2010. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *J Biomed Biotechnol*:719361.
51. **Chavan, H., M. M. Khan, G. Tegos, and P. Krishnamurthy.** 2013. Efficient purification and reconstitution of ATP binding cassette transporter B6 (ABCB6) for functional and structural studies. *J Biol Chem* **288**:22658-69.
52. **Chawla, B., A. Jhingran, A. Panigrahi, K. D. Stuart, and R. Madhubala.** 2011. Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin -susceptible -resistant *Leishmania donovani*. *PLoS One* **6**:e26660.
53. **Coelho, A., and P. C. Cotrim.** 2013. The Role of ABC Transporters in Drug-Resistant *Leishmania*. Springer-Verlag Wien.
54. **Coelho, A. C., S. M. Beverley, and P. C. Cotrim.** 2003. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* **130**:83-90.

55. **Coelho, A. C., N. Messier, M. Ouellette, and P. C. Cotrim.** 2007. Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania amastigotes*. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:3030-2.
56. **Coelho, A. C., E. H. Yamashiro-Kanashiro, S. F. Bastos, R. A. Mortara, and P. C. Cotrim.** 2006. Intracellular location of the ABC transporter PRP1 related to pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* **150**:378-83.
57. **Corradi, V., G. Singh, and D. P. Tieleman.** 2012. The human transporter associated with antigen processing: molecular models to describe peptide binding competent states. *J Biol Chem* **287**:28099-111.
58. **Cortes-Selva, F., I. A. Jimenez, F. Munoz-Martinez, M. Campillo, I. L. Bazzocchi, L. Pardo, A. G. Ravelo, S. Castanys, and F. Gamarro.** 2005. Dihydro-beta-agarofuran sesquiterpenes: a new class of reversal agents of the multidrug resistance phenotype mediated by P-glycoprotein in the protozoan parasite *Leishmania*. *Curr Pharm Des* **11**:3125-39.
59. **Croft, S. L.** 2008. Kinetoplastida: new therapeutic strategies. *Parasite* **15**:522-7.
60. **Croft, S. L., S. Sundar, and A. H. Fairlamb.** 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* **19**:111-26.
61. **Cserepes, J., Z. Szentpetery, L. Seres, C. Ozvegy-Laczka, T. Langmann, G. Schmitz, H. Glavinas, I. Klein, L. Homolya, A. Varadi, B. Sarkadi, and N. B. Elkind.** 2004. Functional expression and characterization of the human ABCG1 and ABCG4 proteins: indications for heterodimerization. *Biochem Biophys Res Commun* **320**:860-7.
62. **Culley, F. J., R. A. Harris, P. M. Kaye, K. P. McAdam, and J. G. Raynes.** 1996. C-reactive protein binds to a novel ligand on *Leishmania donovani* and increases uptake into human macrophages. *J Immunol* **156**:4691-6.
63. **Cunningham, A. C.** 2002. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Exp Mol Pathol* **72**:132-41.
64. **David, C. V., and N. Craft.** 2009. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther* **22**:491-502.
65. **Davies, C. R., R. Reithinger, D. Campbell-Lendrum, D. Feliciangeli, R. Borges, and N. Rodriguez.** 2000. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cad Saude Publica* **16**:925-50.
66. **Dawson, R. J., and K. P. Locher.** 2006. Structure of a bacterial multidrug ABC transporter. *Nature* **443**:180-5.
67. **de Almeida, M. C., V. Vilhena, A. Barral, and M. Barral-Netto.** 2003. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **98**:861-70.
68. **de Souza, W., M. Attias, and J. C. Rodrigues.** 2009. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Int J Biochem Cell Biol* **41**:2069-80.
69. **Dean, M.** 2006. Genetics of ATP-binding cassette transporters. *Methods Enzymol* **400**:409-422.
70. **Debrabant, A., and H. Nakhasi.** 2003. Programmed cell death in trypanosomatids: is it an altruistic mechanism for survival of the fittest? *Kinetoplastid Biol Dis* **2**:7.

71. **Decuypere, S., S. Rijal, V. Yardley, S. De Doncker, T. Laurent, B. Khanal, F. Chappuis, and J. C. Dujardin.** 2005. Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb(V) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:4616-21.
72. **Decuypere, S., M. Vanaerschot, K. Brunker, H. Imamura, S. Muller, B. Khanal, S. Rijal, J. C. Dujardin, and G. H. Coombs.** 2012. Molecular mechanisms of drug resistance in natural *Leishmania* populations vary with genetic background. *PLoS Negl Trop Dis* **6**:e1514.
73. **Delobel, P., P. Launois, F. Djossou, D. Sainte-Marie, and R. Pradinaud.** 2003. American cutaneous leishmaniasis, lepromatous leprosy, and pulmonary tuberculosis coinfection with downregulation of the T-helper 1 cell response. *Clin Infect Dis* **37**:628-33.
74. **Deponte, M.** 2008. Programmed cell death in protists. *Biochim Biophys Acta* **1783**:1396-405.
75. **Desjardins, M., and A. Descoteaux.** 1997. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med* **185**:2061-8.
76. **Desuzinges-Mandon, E., O. Arnaud, L. Martinez, F. Huche, A. Di Pietro, and P. Falson.** 2010. ABCG2 transports and transfers heme to albumin through its large extracellular loop. *J Biol Chem* **285**:33123-33.
77. **Di Pietro, A., G. Conseil, J. M. Perez-Victoria, G. Dayan, H. Baubichon-Cortay, D. Trompier, E. Steinfels, J. M. Jault, H. de Wet, M. Maitrejean, G. Comte, A. Boumendjel, A. M. Mariotte, C. Dumontet, D. B. McIntosh, A. Goffeau, S. Castanys, F. Gamarro, and D. Barron.** 2002. Modulation by flavonoids of cell multidrug resistance mediated by P-glycoprotein and related ABC transporters. *Cell Mol Life Sci* **59**:307-22.
78. **Djidingar, D., J. P. Chippaux, G. Gragnic, O. Tchani, D. Meynard, and J. Julvez.** 1997. [Visceral leishmaniasis in Niger: six new parasitologically confirmed cases]. *Bull Soc Pathol Exot* **90**:27-9.
79. **Docampo, R., W. de Souza, K. Miranda, P. Rohloff, and S. N. Moreno.** 2005. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol* **3**:251-61.
80. **Doleans-Jordheim, A., J. B. Veron, O. Fendrich, E. Bergeron, A. Montagut-Romans, Y. S. Wong, B. Furdui, J. Freney, C. Dumontet, and A. Boumendjel.** 2013. 3-Aryl-4-methyl-2-quinolones targeting multiresistant *Staphylococcus aureus* bacteria. *ChemMedChem* **8**:652-7.
81. **Dunn, L. L., Y. Suryo Rahmanto, and D. R. Richardson.** 2007. Iron uptake and metabolism in the new millennium. *Trends Cell Biol* **17**:93-100.
82. **Dutta, S., K. Furuyama, S. Sassa, and K. P. Chang.** 2008. *Leishmania* spp.: delta-aminolevulinic acid-inducible neogenesis of porphyria by genetic complementation of incomplete heme biosynthesis pathway. *Exp Parasitol* **118**:629-36.
83. **Eilam, Y., J. El-On, and D. T. Spira.** 1985. *Leishmania major*: excreted factor, calcium ions, and the survival of amastigotes. *Exp Parasitol* **59**:161-8.
84. **El Fadili, K., N. Messier, P. Leprohon, G. Roy, C. Guimond, N. Trudel, N. G. Saravia, B. Papadopoulou, D. Legare, and M. Ouellette.** 2005. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in

- Leishmania infantum axenic and intracellular amastigotes. Antimicrob Agents Chemother **49**:1988-93.
85. **Essodaigui, M., F. Frezard, E. S. Moreira, F. Dagger, and A. Garnier-Suillerot.** 1999. Energy-dependent efflux from Leishmania promastigotes of substrates of the mammalian multidrug resistance pumps. Mol Biochem Parasitol **100**:73-84.
86. **Ezra, N., M. T. Ochoa, and N. Craft.** 2010. Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. J Glob Infect Dis **2**:248-57.
87. **Färber, K., and H. Moll.** 2013. Drug Resistance in Leishmania parasites. Springer-Verlag Wien.
88. **Feliciangeli, M. D., and J. Rabinovich.** 1998. Abundance of Lutzomyia ovallesi but not Lu. gomezi (Diptera: Psychodidae) correlated with cutaneous leishmaniasis incidence in north-central Venezuela. Med Vet Entomol **12**:121-31.
89. **Fernandez, M. M., E. L. Malchiodi, and I. D. Algranati.** 2011. Differential effects of paromomycin on ribosomes of Leishmania mexicana and mammalian cells. Antimicrob Agents Chemother **55**:86-93.
90. **Ferreira, W. A., W. Mayrink, M. L. dos Mares-Guia, and C. A. Tavares.** 2003. Detection and characterization of leishmania antigens from an American cutaneous leishmaniasis vaccine for diagnosis of visceral leishmaniasis. Diagn Microbiol Infect Dis **45**:35-43.
91. **Fidalgo, L. M., and L. Gille.** 2011. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. Pharm Res **28**:2758-70.
92. **Gabron, D., and A. Saul.** 1997. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. Clin Microbiol Rev **10**:298-319.
93. **Gadsby, D. C., P. Vergani, and L. Csanady.** 2006. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. Nature **440**:477-83.
94. **Galbraith, R. A., and M. J. McElrath.** 1988. Heme binding to Leishmania mexicana amazonensis. Mol Biochem Parasitol **29**:47-53.
95. **Garcia-Hernandez, R., J. I. Manzano, S. Castanys, and F. Gamarro.** 2012. Leishmania donovani develops resistance to drug combinations. PLoS Negl Trop Dis **6**:e1974.
96. **Gelissen, I. C., M. Harris, K. A. Rye, C. Quinn, A. J. Brown, M. Kockx, S. Cartland, M. Packianathan, L. Kritharides, and W. Jessup.** 2006. ABCA1 and ABCG1 synergize to mediate cholesterol export to apoA-I. Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**:534-40.
97. **Genoux-Bastide, E., D. Lorendeau, E. Nicolle, S. Yahiaoui, S. Magnard, A. Di Pietro, H. Baubichon-Cortay, and A. Boumendjel.** 2011. Identification of xanthenes as selective killers of cancer cells overexpressing the ABC transporter MRP1. ChemMedChem **6**:1478-84.
98. **Gil-Prieto, R., S. Walter, J. Alvar, and A. G. de Miguel.** 2011. Epidemiology of leishmaniasis in Spain based on hospitalization records (1997-2008). Am J Trop Med Hyg **85**:820-5.
99. **Gomez, M. A., A. Navas, R. Marquez, L. J. Rojas, D. A. Vargas, V. M. Blanco, R. Koren, D. Zilberstein, and N. G. Saravia.** 2013. Leishmania panamensis infection and antimonial drugs modulate expression of

- macrophage drug transporters and metabolizing enzymes: impact on intracellular parasite survival. *J Antimicrob Chemother.*
100. **Gourbal, B., N. Sonuc, H. Bhattacharjee, D. Legare, S. Sundar, M. Ouellette, B. P. Rosen, and R. Mukhopadhyay.** 2004. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem* **279**:31010-7.
  101. **Graf, G. A., J. C. Cohen, and H. H. Hobbs.** 2004. Missense mutations in ABCG5 and ABCG8 disrupt heterodimerization and trafficking. *J Biol Chem* **279**:24881-8.
  102. **Guha, R., D. Gupta, R. Rastogi, R. Vikram, G. Krishnamurthy, S. Bimal, S. Roy, and A. Mukhopadhyay.** 2013. Vaccination with *leishmania* hemoglobin receptor-encoding DNA protects against visceral leishmaniasis. *Sci Transl Med* **5**:202ra121.
  103. **Ha, D. S., J. K. Schwarz, S. J. Turco, and S. M. Beverley.** 1996. Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **77**:57-64.
  104. **Hailu, A.** 1990. Pre- and post-treatment antibody levels in visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **84**:673-5.
  105. **Hamza, I., and H. A. Dailey.** 2012. One ring to rule them all: trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. *Biochim Biophys Acta* **1823**:1617-32.
  106. **Handman, E., and D. V. Bullen.** 2002. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol* **18**:332-4.
  107. **Haudecoeur, R., A. Ahmed-Belkacem, W. Yi, A. Fortune, R. Brillet, C. Belle, E. Nicolle, C. Pallier, J. M. Pawlotsky, and A. Boumendjel.** 2011. Discovery of naturally occurring aurones that are potent allosteric inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Med Chem* **54**:5395-402.
  108. **Henriksen, U., U. Gether, and T. Litman.** 2005. Effect of Walker A mutation (K86M) on oligomerization and surface targeting of the multidrug resistance transporter ABCG2. *J Cell Sci* **118**:1417-26.
  109. **Hermoso, T., Z. Fishelson, S. I. Becker, K. Hirschberg, and C. L. Jaffe.** 1991. Leishmanial protein kinases phosphorylate components of the complement system. *Embo J* **10**:4061-7.
  110. **Herwaldt, B. L.** 2001. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin Microbiol Rev* **14**:659-88, table of contents.
  111. **Herwaldt, B. L.** 1999. Leishmaniasis. *Lancet* **354**:1191-9.
  112. **Higgins, C. F.** 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**:67-113.
  113. **Hillebrand, M., S. E. Verrier, A. Ohlenbusch, A. Schafer, H. D. Soling, F. S. Wouters, and J. Gartner.** 2007. Live cell FRET microscopy: homo- and heterodimerization of two human peroxisomal ABC transporters, the adrenoleukodystrophy protein (ALDP, ABCD1) and PMP70 (ABCD3). *J Biol Chem* **282**:26997-7005.
  114. **Huynh, C., X. Yuan, D. C. Miguel, R. L. Renberg, O. Protchenko, C. C. Philpott, I. Hamza, and N. W. Andrews.** 2012. Heme uptake by *Leishmania amazonensis* is mediated by the transmembrane protein LHR1. *PLoS Pathog* **8**:e1002795.

115. **Ilgoutz, S. C., and M. J. McConville.** 2001. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int J Parasitol* **31**:899-908.
116. **Ilgoutz, S. C., K. A. Mullin, B. R. Southwell, and M. J. McConville.** 1999. Glycosylphosphatidylinositol biosynthetic enzymes are localized to a stable tubular subcompartment of the endoplasmic reticulum in *Leishmania mexicana*. *Embo J* **18**:3643-54.
117. **Iniesta, V., L. C. Gomez-Nieto, and I. Corraliza.** 2001. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med* **193**:777-84.
118. **Ivens, A. C., C. S. Peacock, E. A. Worthey, L. Murphy, G. Aggarwal, M. Berriman, E. Sisk, M. A. Rajandream, E. Adlem, R. Aert, A. Anupama, Z. Apostolou, P. Attipoe, N. Bason, C. Bauser, A. Beck, S. M. Beverley, G. Bianchetti, K. Borzym, G. Bothe, C. V. Bruschi, M. Collins, E. Cadag, L. Ciarloni, C. Clayton, R. M. Coulson, A. Cronin, A. K. Cruz, R. M. Davies, J. De Gaudenzi, D. E. Dobson, A. Duesterhoeft, G. Fazelina, N. Fosker, A. C. Frasch, A. Fraser, M. Fuchs, C. Gabel, A. Goble, A. Goffeau, D. Harris, C. Hertz-Fowler, H. Hilbert, D. Horn, Y. Huang, S. Klages, A. Knights, M. Kube, N. Larke, L. Litvin, A. Lord, T. Louie, M. Marra, D. Masuy, K. Matthews, S. Michaeli, J. C. Mottram, S. Muller-Auer, H. Munden, S. Nelson, H. Norbertczak, K. Oliver, S. O'Neil, M. Pentony, T. M. Pohl, C. Price, B. Purnelle, M. A. Quail, E. Rabbinowitsch, R. Reinhardt, M. Rieger, J. Rinta, J. Robben, L. Robertson, J. C. Ruiz, S. Rutter, D. Saunders, M. Schafer, J. Schein, D. C. Schwartz, K. Seeger, A. Seyler, S. Sharp, H. Shin, D. Sivam, R. Squares, S. Squares, V. Tosato, C. Vogt, G. Volckaert, R. Wambutt, T. Warren, H. Wedler, J. Woodward, S. Zhou, W. Zimmermann, D. F. Smith, J. M. Blackwell, K. D. Stuart, B. Barrell, et al.** 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**:436-42.
119. **Ivory, C., and K. Chadee.** 2004. DNA vaccines: designing strategies against parasitic infections. *Genet Vaccines Ther* **2**:17.
120. **Jackson, P. R., J. M. Lawrie, J. M. Stiteler, D. W. Hawkins, J. A. Wohlhieter, and E. D. Rowton.** 1986. Detection and characterization of *Leishmania* species and strains from mammals and vectors by hybridization and restriction endonuclease digestion of kinetoplast DNA. *Vet Parasitol* **20**:195-215.
121. **Jebbari, H., and R. Davidson.** 1998. Recent advances in leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* **11**:535-9.
122. **Jha, T. K.** 1983. Evaluation of diamidine compound (pentamidine isethionate) in the treatment resistant cases of kala-azar occurring in North Bihar, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **77**:167-70.
123. **Jhingran, A., B. Chawla, S. Saxena, M. P. Barrett, and R. Madhubala.** 2009. Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* **164**:111-7.
124. **Jimenez, M., E. Gonzalez, A. Iriso, E. Marco, A. Alegret, F. Fuster, and R. Molina.** 2013. Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol Res* **112**:2453-9.



125. **Juliano, R. L., and V. Ling.** 1976. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim Biophys Acta* **455**:152-62.
126. **Kabe, Y., M. Ohmori, K. Shinouchi, Y. Tsuboi, S. Hirao, M. Azuma, H. Watanabe, I. Okura, and H. Handa.** 2006. Porphyrin accumulation in mitochondria is mediated by 2-oxoglutarate carrier. *J Biol Chem* **281**:31729-35.
127. **Kamhawi, S., M. Ramalho-Ortigao, V. M. Pham, S. Kumar, P. G. Lawyer, S. J. Turco, C. Barillas-Mury, D. L. Sacks, and J. G. Valenzuela.** 2004. A role for insect galectins in parasite survival. *Cell* **119**:329-41.
128. **Kane, M. M., and D. M. Mosser.** 2000. Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. *Curr Opin Hematol* **7**:26-31.
129. **Kang, J., J. Park, H. Choi, B. Burla, T. Kretzschmar, Y. Lee, and E. Martinoia.** 2011. Plant ABC Transporters. *Arabidopsis Book* **9**:e0153.
130. **Kapler, G. M., C. M. Coburn, and S. M. Beverley.** 1990. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Mol Cell Biol* **10**:1084-94.
131. **Katakura, K., H. Fujise, K. Takeda, O. Kaneko, M. Torii, M. Suzuki, K. P. Chang, and Y. Hashiguchi.** 2004. Overexpression of LaMDR2, a novel multidrug resistance ATP-binding cassette transporter, causes 5-fluorouracil resistance in *Leishmania amazonensis*. *FEBS Lett* **561**:207-12.
132. **Kedzierski, L., A. Sakhianandeswaren, J. M. Curtis, P. C. Andrews, P. C. Junk, and K. Kedzierska.** 2009. Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. *Curr Med Chem* **16**:599-614.
133. **Kelly, J. X., M. V. Ignatushchenko, H. G. Bower, D. H. Peyton, D. J. Hinrichs, R. W. Winter, and M. Riscoe.** 2003. Antileishmanial drug development: exploitation of parasite heme dependency. *Mol Biochem Parasitol* **126**:43-9.
134. **Kennedy, M. L., F. Cortes-Selva, J. M. Perez-Victoria, I. A. Jimenez, A. G. Gonzalez, O. M. Munoz, F. Gamarro, S. Castanys, and A. G. Ravelo.** 2001. Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *J Med Chem* **44**:4668-76.
135. **Killick-Kendrick, R.** 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol* **17**:279-89.
136. **Kobuchi, H., K. Moriya, T. Ogino, H. Fujita, K. Inoue, T. Shuin, T. Yasuda, K. Utsumi, and T. Utsumi.** 2012. Mitochondrial localization of ABC transporter ABCG2 and its function in 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX accumulation. *PLoS One* **7**:e50082.
137. **Krishnamurthy, P., and J. D. Schuetz.** 2005. The ABC transporter Abcg2/Bcrp: role in hypoxia mediated survival. *Biometals* **18**:349-58.
138. **Krishnamurthy, P., and J. D. Schuetz.** 2006. Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**:381-410.
139. **Krishnamurthy, P., T. Xie, and J. D. Schuetz.** 2007. The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacol Ther* **114**:345-58.

140. **Krishnamurthy, P. C., G. Du, Y. Fukuda, D. Sun, J. Sampath, K. E. Mercer, J. Wang, B. Sosa-Pineda, K. G. Murti, and J. D. Schuetz.** 2006. Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. *Nature* **443**:586-9.
141. **Kusuhara, H., and Y. Sugiyama.** 2007. ATP-binding cassette, subfamily G (ABCG family). *Pflugers Arch* **453**:735-44.
142. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
143. **Landfear, S. M., and M. Ignatushchenko.** 2001. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* **115**:1-17.
144. **Laskay, T., G. van Zandbergen, and W. Solbach.** 2008. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology* **213**:183-91.
145. **Leandro, C., and L. Campino.** 2003. Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. *Int J Antimicrob Agents* **22**:352-7.
146. **Legare, D., D. Richard, R. Mukhopadhyay, Y. D. Stierhof, B. P. Rosen, A. Haimeur, B. Papadopoulou, and M. Ouellette.** 2001. The Leishmania ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem* **276**:26301-7.
147. **Leprohon, P., D. Legare, I. Girard, B. Papadopoulou, and M. Ouellette.** 2006. Modulation of Leishmania ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryot Cell* **5**:1713-25.
148. **Leprohon, P., D. Legare, I. Girard, B. Papadopoulou, and M. Ouellette.** 2006. Modulation of Leishmania ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryot Cell* **5**:1713-25.
149. **Leprohon, P., D. Legare, and M. Ouellette.** 2009. Intracellular localization of the ABCC proteins of Leishmania and their role in resistance to antimonials. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:2646-9.
150. **Leprohon, P., D. Legare, F. Raymond, E. Madore, G. Hardiman, J. Corbeil, and M. Ouellette.** 2009. Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant Leishmania infantum. *Nucleic Acids Res* **37**:1387-99.
151. **Leslie, E. M.** 2011. Arsenic-glutathione conjugate transport by the human multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs). *J Inorg Biochem* **108**:141-9.
152. **Li, Z. S., M. Szczyпка, Y. P. Lu, D. J. Thiele, and P. A. Rea.** 1996. The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J Biol Chem* **271**:6509-17.
153. **Liu, L. X., K. Janvier, V. Berteaux-Lecellier, N. Cartier, R. Benarous, and P. Aubourg.** 1999. Homo- and heterodimerization of peroxisomal ATP-binding cassette half-transporters. *J Biol Chem* **274**:32738-43.
154. **Lodge, R., and A. Descoteaux.** 2005. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of Leishmania. *Clin Immunol* **114**:256-65.
155. **Losler, S., S. Schlieff, C. Kneifel, E. Thiel, H. Schrezenmeier, and M. T. Rojewski.** 2009. Antimony-trioxide- and arsenic-trioxide-induced apoptosis in myelogenic and lymphatic cell lines, recruitment of caspases, and loss of

- mitochondrial membrane potential are enhanced by modulators of the cellular glutathione redox system. *Ann Hematol* **88**:1047-58.
156. **Lucio, M., C. Nunes, and D. Gaspar.** 2009. Antioxidant Activity of Vitamin E and Trolox: Understanding of the Factors that Govern Lipid Peroxidation Studies In Vitro. *Food Biophys* **4**:312-20.
157. **Lúcio, M., C. Nunes, D. Gaspar, H. Ferreira, J. L. F. C. Lima, and S. Reis.** 2009. Antioxidant Activity of Vitamin E and Trolox: Understanding of the Factors that Govern Lipid Peroxidation Studies In Vitro. *Food Biophysics* **4**:312-320.
158. **Luque-Ortega, J. R., and L. Rivas.** 2007. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:1327-32.
159. **Maarouf, M., M. T. Adeline, M. Solignac, D. Vautrin, and M. Robert-Gero.** 1998. Development and characterization of paromomycin-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasite* **5**:167-73.
160. **Maeno, K., A. Nakajima, G. Conseil, A. Rothnie, R. G. Deeley, and S. P. Cole.** 2009. Molecular basis for reduced estrone sulfate transport and altered modulator sensitivity of transmembrane helix (TM) 6 and TM17 mutants of multidrug resistance protein 1 (ABCC1). *Drug Metab Dispos* **37**:1411-20.
161. **Magill, A. J.** 1995. Epidemiology of the leishmaniasis. *Dermatol Clin* **13**:505-23.
162. **Manzano, J. I., L. Carvalho, J. M. Perez-Victoria, S. Castanys, and F. Gamarro.** 2011. Increased glycolytic ATP synthesis is associated with tafenoquine resistance in *Leishmania major*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:1045-52.
163. **Martinez-Calvillo, S., S. Yan, D. Nguyen, M. Fox, K. Stuart, and P. J. Myler.** 2003. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell* **11**:1291-9.
164. **Matsson, P., J. M. Pedersen, U. Norinder, C. A. Bergstrom, and P. Artursson.** 2009. Identification of novel specific and general inhibitors of the three major human ATP-binding cassette transporters P-gp, BCRP and MRP2 among registered drugs. *Pharm Res* **26**:1816-31.
165. **Mayrink, W., C. A. da Costa, P. A. Magalhaes, M. N. Melo, M. Dias, A. O. Lima, M. S. Michalick, and P. Williams.** 1979. A field trial of a vaccine against American dermal leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **73**:385-7.
166. **Mayrink, W., P. Williams, C. A. da Costa, P. A. Magalhaes, M. N. Melo, M. Dias, A. Oliveira Lima, M. S. Michalick, E. Ferreira Carvalho, G. C. Barros, and et al.** 1985. An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espirito Santo, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol* **79**:259-69.
167. **Mbongo, N., P. M. Loiseau, M. A. Billion, and M. Robert-Gero.** 1998. Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:352-7.
168. **McConville, M. J., and S. W. Homans.** 1992. Identification of the defect in lipophosphoglycan biosynthesis in a non-pathogenic strain of *Leishmania major*. *J Biol Chem* **267**:5855-61.

169. **Mehta, A., and C. Shaha.** 2006. Mechanism of metalloid-induced death in *Leishmania* spp.: role of iron, reactive oxygen species, Ca<sup>2+</sup>, and glutathione. *Free Radic Biol Med* **40**:1857-68.
170. **Miao, L., A. Stafford, S. Nir, S. J. Turco, T. D. Flanagan, and R. M. Epand.** 1995. Potent inhibition of viral fusion by the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. *Biochemistry* **34**:4676-83.
171. **Michels, P. A., F. Bringaud, M. Herman, and V. Hannaert.** 2006. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta* **1763**:1463-77.
172. **Mimori, T., G. Grimaldi, Jr., R. D. Kreutzer, E. A. Gomez, D. McMahon-Pratt, R. B. Tesh, and Y. Hashiguchi.** 1989. Identification, using isoenzyme electrophoresis and monoclonal antibodies, of *Leishmania* isolated from humans and wild animals of Ecuador. *Am J Trop Med Hyg* **40**:154-8.
173. **Molina, R., M. I. Jimenez, I. Cruz, A. Iriso, I. Martin-Martin, O. Sevillano, S. Melero, and J. Bernal.** 2012. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol* **190**:268-71.
174. **Mookerjee Basu, J., A. Mookerjee, R. Banerjee, M. Saha, S. Singh, K. Naskar, G. Tripathy, P. K. Sinha, K. Pandey, S. Sundar, S. Bimal, P. K. Das, S. K. Choudhuri, and S. Roy.** 2008. Inhibition of ABC transporters abolishes antimony resistance in *Leishmania* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:1080-93.
175. **Moreira, W., P. Leprohon, and M. Ouellette.** 2011. Tolerance to drug-induced cell death favours the acquisition of multidrug resistance in *Leishmania*. *Cell Death Dis* **2**:e201.
176. **Morris, R. V., C. B. Shoemaker, J. R. David, G. C. Lanzaro, and R. G. Titus.** 2001. Sandfly maxadilan exacerbates infection with *Leishmania major* and vaccinating against it protects against *L. major* infection. *J Immunol* **167**:5226-30.
177. **Mosser, D. M., and P. J. Edelson.** 1987. The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature* **327**:329-31.
178. **Mosser, J., A. M. Douar, C. O. Sarde, P. Kioschis, R. Feil, H. Moser, A. M. Poustka, J. L. Mandel, and P. Aubourg.** 1993. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporters. *Nature* **361**:726-30.
179. **Mukherjee, B., R. Mukhopadhyay, B. Bannerjee, S. Chowdhury, S. Mukherjee, K. Naskar, U. S. Allam, D. Chakravorty, S. Sundar, J. C. Dujardin, and S. Roy.** 2013. Antimony-resistant but not antimony-sensitive *Leishmania donovani* up-regulates host IL-10 to overexpress multidrug-resistant protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:E575-82.
180. **Mukhopadhyay, R., S. Dey, N. Xu, D. Gage, J. Lightbody, M. Ouellette, and B. P. Rosen.** 1996. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:10383-7.
181. **Mullin, K. A., B. J. Foth, S. C. Ilgoutz, J. M. Callaghan, J. L. Zawadzki, G. I. McFadden, and M. J. McConville.** 2001. Regulated degradation of

- an endoplasmic reticulum membrane protein in a tubular lysosome in *Leishmania mexicana*. *Mol Biol Cell* **12**:2364-77.
182. **Muskus, C. E., and M. Marin Villa.** 2002. [Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*]. *Biomedica* **22**:167-77.
183. **Myler, P. J., and N. Fasel.** 2006. *Leishmania: After the genome*. Caister Academic Press.
184. **Naderer, T., and M. J. McConville.** 2008. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiol* **10**:301-8.
185. **Namazi, M. R.** 2008. Potential utility of disulfiram against leishmaniasis. *Indian J Med Res* **127**:193-4.
186. **Nathan, C.** 2006. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* **6**:173-82.
187. **Neal, R. A., J. van Bueren, N. G. McCoy, and M. Iwobi.** 1989. Reversal of drug resistance in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* by verapamil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **83**:197-8.
188. **Okombi, S., D. Rival, S. Bonnet, A. M. Mariotte, E. Perrier, and A. Boumendjel.** 2006. Discovery of benzylidenebenzofuran-3(2H)-one (aurones) as inhibitors of tyrosinase derived from human melanocytes. *J Med Chem* **49**:329-33.
189. **Olliaro, P., and S. Sundar.** 2009. Anthropometrically derived dosing and drug costing calculations for treating visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Trop Med Int Health* **14**:88-92.
190. **Oppendoes, F. R., and G. H. Coombs.** 2007. Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. *Trends Parasitol* **23**:149-58.
191. **Oram, J. F.** 2000. Tangier disease and ABCA1. *Biochim Biophys Acta* **1529**:321-30.
192. **Oram, J. F., and A. M. Vaughan.** 2000. ABCA1-mediated transport of cellular cholesterol and phospholipids to HDL apolipoproteins. *Curr Opin Lipidol* **11**:253-60.
193. **Ortiz, D. F., T. Ruscitti, K. F. McCue, and D. W. Ow.** 1995. Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J Biol Chem* **270**:4721-8.
194. **Otranto, D., and F. Dantas-Torres.** 2013. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. *Trends Parasitol* **29**:339-45.
195. **Ouellette, M., J. Drummelsmith, P. Leprohon, K. El Fadili, A. Foucher, B. Vergnes, and D. Legare.** 2013. *Drug Resistance in Leishmania Parasites*. Springer.
196. **Ouellette, M., J. Drummelsmith, and B. Papadopoulou.** 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* **7**:257-66.
197. **Ouellette, M., A. Haimeur, K. Grondin, D. Legare, and B. Papadopoulou.** 1998. Amplification of ABC transporter gene *pgpA* and of other heavy metal resistance genes in *Leishmania tarentolae* and their study by gene transfection and gene disruption. *Methods Enzymol* **292**:182-93.
198. **Ouellette, M., D. Legare, and B. Papadopoulou.** 2001. Multidrug resistance and ABC transporters in parasitic protozoa. *J Mol Microbiol Biotechnol* **3**:201-6.

199. **Overath, P., Y. D. Stierhof, and M. Wiese.** 1997. Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites - Tumultuous traffic in a pocket. *Trends Cell Biol* **7**:27-33.
200. **Ozvegy, C., T. Litman, G. Szakacs, Z. Nagy, S. Bates, A. Varadi, and B. Sarkadi.** 2001. Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun* **285**:111-7.
201. **Padron-Nieves, M., E. Diaz, C. Machuca, A. Romero, and A. Ponte Sucre.** 2009. Glibenclamide modulates glucantime activity and disposition in *Leishmania major*. *Exp Parasitol* **121**:331-7.
202. **Pal, J. K., and M. Joshi-Purandare.** 2001. Dose-dependent differential effect of hemin on protein synthesis and cell proliferation in *Leishmania donovani* promastigotes cultured in vitro. *J Biosci* **26**:225-31.
203. **Palatnik-de-Sousa, C. B.** 2008. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine* **26**:1709-24.
204. **Palumbo, E.** 2009. Current treatment for cutaneous leishmaniasis: a review. *Am J Ther* **16**:178-82.
205. **Papadopoulou, B., G. Roy, and M. Ouellette.** 1992. A novel antifolate resistance gene on the amplified H circle of *Leishmania*. *Embo J* **11**:3601-8.
206. **Parodi-Talice, A., J. M. Araujo, C. Torres, J. M. Perez-Victoria, F. Gamarro, and S. Castanys.** 2003. The overexpression of a new ABC transporter in *Leishmania* is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity. *Biochim Biophys Acta* **1612**:195-207.
207. **Parodi-Talice, A., J. M. Araujo, C. Torres, J. M. Perez-Victoria, F. Gamarro, and S. Castanys.** 2003. The overexpression of a new ABC transporter in *Leishmania* is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity. *Biochim Biophys Acta* **1612**:195-207.
208. **Patel, N., S. B. Singh, S. K. Basu, and A. Mukhopadhyay.** 2008. *Leishmania* requires Rab7-mediated degradation of endocytosed hemoglobin for their growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:3980-5.
209. **Paterson, J. K., S. Shukla, C. M. Black, T. Tachiwada, S. Garfield, S. Wincovitch, D. N. Ernst, A. Agadir, X. Li, S. V. Ambudkar, G. Szakacs, S. Akiyama, and M. M. Gottesman.** 2007. Human ABCB6 localizes to both the outer mitochondrial membrane and the plasma membrane. *Biochemistry* **46**:9443-52.
210. **Perez-Victoria, F. J., S. Castanys, and F. Gamarro.** 2003. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2397-403.
211. **Perez-Victoria, F. J., F. Gamarro, M. Ouellette, and S. Castanys.** 2003. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J Biol Chem* **278**:49965-71.
212. **Perez-Victoria, F. J., M. P. Sanchez-Canete, S. Castanys, and F. Gamarro.** 2006. Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. *J Biol Chem* **281**:23766-75.

213. **Perez-Victoria, F. J., M. P. Sanchez-Canete, K. Seifert, S. L. Croft, S. Sundar, S. Castanys, and F. Gamarro.** 2006. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resist Updat* **9**:26-39.
214. **Perez-Victoria, J. M., B. I. Bavchvarov, I. R. Torrecillas, M. Martinez-Garcia, C. Lopez-Martin, M. Campillo, S. Castanys, and F. Gamarro.** 2011. Sitamaquine overcomes ABC-mediated resistance to miltefosine and antimony in *Leishmania*. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:3838-44.
215. **Perez-Victoria, J. M., M. J. Chiquero, G. Conseil, G. Dayan, A. Di Pietro, D. Barron, S. Castanys, and F. Gamarro.** 1999. Correlation between the affinity of flavonoids binding to the cytosolic site of *Leishmania tropica* multidrug transporter and their efficiency to revert parasite resistance to daunomycin. *Biochemistry* **38**:1736-43.
216. **Perez-Victoria, J. M., M. J. Chiquero, G. Conseil, G. Dayan, A. Di Pietro, D. Barron, S. Castanys, and F. Gamarro.** 1999. Correlation between the affinity of flavonoids binding to the cytosolic site of *Leishmania tropica* multidrug transporter and their efficiency to revert parasite resistance to daunomycin. *Biochemistry* **38**:1736-43.
217. **Perez-Victoria, J. M., F. Cortes-Selva, A. Parodi-Talice, B. I. Bavchvarov, F. J. Perez-Victoria, F. Munoz-Martinez, M. Maitrejean, M. P. Costi, D. Barron, A. Di Pietro, S. Castanys, and F. Gamarro.** 2006. Combination of suboptimal doses of inhibitors targeting different domains of LtrMDR1 efficiently overcomes resistance of *Leishmania* spp. to Miltefosine by inhibiting drug efflux. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:3102-10.
218. **Perez-Victoria, J. M., A. Di Pietro, D. Barron, A. G. Ravelo, S. Castanys, and F. Gamarro.** 2002. Multidrug resistance phenotype mediated by the P-glycoprotein-like transporter in *Leishmania*: a search for reversal agents. *Curr Drug Targets* **3**:311-33.
219. **Perez-Victoria, J. M., A. Parodi-Talice, C. Torres, F. Gamarro, and S. Castanys.** 2001. ABC transporters in the protozoan parasite *Leishmania*. *Int Microbiol* **4**:159-66.
220. **Perez-Victoria, J. M., F. J. Perez-Victoria, A. Parodi-Talice, I. A. Jimenez, A. G. Ravelo, S. Castanys, and F. Gamarro.** 2001. Alkyllysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2468-74.
221. **Peters, N., and D. Sacks.** 2006. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol Rev* **213**:159-79.
222. **Peters, N. C., J. G. Egen, N. Secundino, A. Debrabant, N. Kimblin, S. Kamhawi, P. Lawyer, M. P. Fay, R. N. Germain, and D. Sacks.** 2008. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* **321**:970-4.
223. **Polonio, T., and T. Efferth.** 2008. Leishmaniasis: drug resistance and natural products (review). *Int J Mol Med* **22**:277-86.
224. **Ponte-Sucre, A.** 2003. Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for chemotherapy. *Kinetoplastid Biol Dis* **2**:14.

225. **Pradines, B.** 2013. P-glycoprotein-like Transporters in Leishmania: A search for Reversal Agents. Springer-Verlag Wien.
226. **Puentes, S. M., D. M. Dwyer, P. A. Bates, and K. A. Joiner.** 1989. Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J Immunol* **143**:3743-9.
227. **Purkait, B., A. Kumar, N. Nandi, A. H. Sardar, S. Das, S. Kumar, K. Pandey, V. Ravidas, M. Kumar, T. De, D. Singh, and P. Das.** 2012. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:1031-41.
228. **Randak, C., P. Neth, E. A. Auerswald, I. Assfalg-Machleidt, A. A. Roscher, H. B. Hadorn, and W. Machleidt.** 1996. A recombinant polypeptide model of the second predicted nucleotide binding fold of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a GTP-binding protein. *FEBS Lett* **398**:97-100.
229. **Rao, A. U., L. K. Carta, E. Lesuisse, and I. Hamza.** 2005. Lack of heme synthesis in a free-living eukaryote. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:4270-5.
230. **Raza, H., M. A. Robin, J. K. Fang, and N. G. Avadhani.** 2002. Multiple isoforms of mitochondrial glutathione S-transferases and their differential induction under oxidative stress. *Biochem J* **366**:45-55.
231. **Ready, P. D.** 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill* **15**:19505.
232. **Reiner, S. L., and R. M. Locksley.** 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol* **13**:151-77.
233. **Richard, J. V., and K. A. Werbovetz.** 2010. New antileishmanial candidates and lead compounds. *Curr Opin Chem Biol* **14**:447-55.
234. **Roberts, M. T., C. B. Stober, A. N. McKenzie, and J. M. Blackwell.** 2005. Interleukin-4 (IL-4) and IL-10 collude in vaccine failure for novel exacerbatory antigens in murine *Leishmania major* infection. *Infect Immun* **73**:7620-8.
235. **Robey, R. W., K. Steadman, O. Polgar, K. Morisaki, M. Blayney, P. Mistry, and S. E. Bates.** 2004. Pheophorbide a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res* **64**:1242-6.
236. **Rogers, K. A., and R. G. Titus.** 2004. Characterization of the early cellular immune response to *Leishmania major* using peripheral blood mononuclear cells from *Leishmania*-naive humans. *Am J Trop Med Hyg* **71**:568-76.
237. **Rosenberg, M. F., R. Callaghan, S. Modok, C. F. Higgins, and R. C. Ford.** 2005. Three-dimensional structure of P-glycoprotein: the transmembrane regions adopt an asymmetric configuration in the nucleotide-bound state. *J Biol Chem* **280**:2857-62.
238. **Sah, J. F., H. Ito, B. K. Kolli, D. A. Peterson, S. Sassa, and K. P. Chang.** 2002. Genetic rescue of *Leishmania* deficiency in porphyrin biosynthesis creates mutants suitable for analysis of cellular events in uroporphyrin and for photodynamic therapy. *J Biol Chem* **277**:14902-9.
239. **Sanchez-Canete, M. P., L. Carvalho, F. J. Perez-Victoria, F. Gamarro, and S. Castanys.** 2009. Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:1305-13.



240. **Santos, W. R., I. A. Aguiar, E. Paraguai de Souza, V. M. de Lima, M. Palatnik, and C. B. Palatnik-de-Sousa.** 2003. Immunotherapy against murine experimental visceral leishmaniasis with the FML-vaccine. *Vaccine* **21**:4668-76.
241. **Sauvage, V., D. Aubert, S. Escotte-Binet, and I. Villena.** 2009. The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. *Mol Biochem Parasitol* **167**:81-94.
242. **Seay, M. B., P. L. Heard, and G. Chaudhuri.** 1996. Surface Zn-proteinase as a molecule for defense of *Leishmania mexicana amazonensis* promastigotes against cytolysis inside macrophage phagolysosomes. *Infect Immun* **64**:5129-37.
243. **Seifert, K., S. Matu, F. Javier Perez-Victoria, S. Castanys, F. Gamarro, and S. L. Croft.** 2003. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int J Antimicrob Agents* **22**:380-7.
244. **Sengupta, S., J. Tripathi, R. Tandon, M. Raje, R. P. Roy, S. K. Basu, and A. Mukhopadhyay.** 1999. Hemoglobin endocytosis in *Leishmania* is mediated through a 46-kDa protein located in the flagellar pocket. *J Biol Chem* **274**:2758-65.
245. **Sereno, D., M. Cavaleyra, K. Zemzoumi, S. Maquaire, A. Ouaiissi, and J. L. Lemesre.** 1998. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:3097-102.
246. **Serrano-Martin, X., G. Payares, and A. Mendoza-Leon.** 2006. Glibenclamide, a blocker of K<sup>+</sup>(ATP) channels, shows antileishmanial activity in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:4214-6.
247. **Shaha, C.** 2006. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *Indian J Med Res* **123**:233-44.
248. **Shaked-Mishan, P., N. Ulrich, M. Ephros, and D. Zilberstein.** 2001. Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* **276**:3971-6.
249. **Shani, N., and D. Valle.** 1998. Peroxisomal ABC transporters. *Methods Enzymol* **292**:753-76.
250. **Singh, S., A. Dey, and R. Sivakumar.** 2005. Applications of molecular methods for *Leishmania* control. *Expert Rev Mol Diagn* **5**:251-65.
251. **Singh, S., and R. Sivakumar.** 2004. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother* **10**:307-15.
252. **Singh, S. B., R. Tandon, G. Krishnamurthy, R. Vikram, N. Sharma, S. K. Basu, and A. Mukhopadhyay.** 2003. Rab5-mediated endosome-endosome fusion regulates hemoglobin endocytosis in *Leishmania donovani*. *Embo J* **22**:5712-22.
253. **Srivastava, P., G. D. Sharma, K. K. Kamboj, A. K. Rastogi, and V. C. Pandey.** 1997. Heme metabolism in promastigotes of *Leishmania donovani*. *Mol Cell Biochem* **171**:65-8.
254. **Stefkova, J., R. Poledne, and J. A. Hubacek.** 2004. ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res* **53**:235-43.

255. **Suarez Rodriguez, B., B. Isidoro Fernandez, S. Santos Sanz, M. Sierra Moros, R. Molina Moreno, J. Astray Mochales, and C. Amela Heras.** 2012. Situacion epidemiologica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. *Rev Esp Salud Publica* **86**:555-564.
256. **Sundar, S.** 2001. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* **6**:849-54.
257. **Sundar, S., and M. Chatterjee.** 2006. Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J Med Res* **123**:345-52.
258. **Sundar, S., and H. W. Murray.** 2005. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. *Bull World Health Organ* **83**:394-5.
259. **Sundar, S., and M. Rai.** 2002. Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* **15**:593-8.
260. **Sundar, S., P. K. Sinha, M. Rai, D. K. Verma, K. Nawin, S. Alam, J. Chakravarty, M. Vaillant, N. Verma, K. Pandey, P. Kumari, C. S. Lal, R. Arora, B. Sharma, S. Ellis, N. Strub-Wourgaft, M. Balasegaram, P. Olliaro, P. Das, and F. Modabber.** 2011. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet* **377**:477-86.
261. **Sunkin, S. M., P. Kiser, P. J. Myler, and K. Stuart.** 2000. The size difference between leishmania major friedlin chromosome one homologues is localized to sub-telomeric repeats at one chromosomal end. *Mol Biochem Parasitol* **109**:1-15.
262. **Suryo Rahmanto, Y., D. S. Kalinowski, D. J. Lane, H. C. Lok, V. Richardson, and D. R. Richardson.** 2012. Nitrogen monoxide (NO) storage and transport by dinitrosyl-dithiol-iron complexes: long-lived NO that is trafficked by interacting proteins. *J Biol Chem* **287**:6960-8.
263. **Szabo, K., E. Bakos, E. Welker, M. Muller, H. R. Goodfellow, C. F. Higgins, A. Varadi, and B. Sarkadi.** 1997. Phosphorylation site mutations in the human multidrug transporter modulate its drug-stimulated ATPase activity. *J Biol Chem* **272**:23165-71.
264. **Tachiwada, T., Z. S. Chen, X. F. Che, M. Matsumoto, M. Haraguchi, T. Gotanda, T. Sumizawa, T. Furukawa, K. Nishiyama, N. Seki, M. Yamamoto, M. Nakagawa, and S. Akiyama.** 2007. Isolation and characterization of arsenite-resistant human epidermoid carcinoma KB cells. *Oncol Rep* **18**:721-7.
265. **Talamas-Rohana, P., S. D. Wright, M. R. Lennartz, and D. G. Russell.** 1990. Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150,95 and LFA-1 family of leukocyte integrins. *J Immunol* **144**:4817-24.
266. **Teixeira, M. J., C. R. Teixeira, B. B. Andrade, M. Barral-Netto, and A. Barral.** 2006. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol* **22**:32-40.
267. **Thakur, C. P., R. K. Singh, S. M. Hassan, R. Kumar, S. Narain, and A. Kumar.** 1999. Amphotericin B deoxycholate treatment of visceral leishmaniasis with newer modes of administration and precautions: a study of 938 cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **93**:319-23.

268. **Toledo, J. S., T. R. Ferreira, T. P. Defina, M. Dossin Fde, K. A. Beattie, D. J. Lamont, S. Cloutier, B. Papadopoulou, S. Schenkman, and A. K. Cruz.** 2010. Cell homeostasis in a *Leishmania* major mutant overexpressing the spliced leader RNA is maintained by an increased proteolytic activity. *Int J Biochem Cell Biol* **42**:1661-71.
269. **Trinchieri, G.** 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **3**:133-46.
270. **Tyzack, J. K., X. Wang, G. J. Belsham, and C. G. Proud.** 2000. ABC50 interacts with eukaryotic initiation factor 2 and associates with the ribosome in an ATP-dependent manner. *J Biol Chem* **275**:34131-9.
271. **Urbina, J. A.** 1997. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology* **114 Suppl**:S91-9.
272. **Vaclavikova, R., E. Kondrova, M. Ehrlichova, A. Boumendjel, J. Kovar, P. Stopka, P. Soucek, and I. Gut.** 2008. The effect of flavonoid derivatives on doxorubicin transport and metabolism. *Bioorg Med Chem* **16**:2034-42.
273. **Valdameri, G., C. Gauthier, R. Terreux, R. Kachadourian, B. J. Day, S. M. Winnischofer, M. E. Rocha, V. Frachet, X. Ronot, A. Di Pietro, and A. Boumendjel.** 2012. Investigation of chalcones as selective inhibitors of the breast cancer resistance protein: critical role of methoxylation in both inhibition potency and cytotoxicity. *J Med Chem* **55**:3193-200.
274. **Valiathan, R., M. L. Dubey, R. C. Mahajan, and N. Malla.** 2006. *Leishmania donovani*: effect of verapamil on in vitro susceptibility of promastigote and amastigote stages of Indian clinical isolates to sodium stibogluconate. *Exp Parasitol* **114**:103-8.
275. **Van Assche, T., M. Deschacht, R. A. da Luz, L. Maes, and P. Cos.** 2011. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med* **51**:337-51.
276. **van Zandbergen, G., A. Bollinger, A. Wenzel, S. Kamhawi, R. Voll, M. Klinger, A. Muller, C. Holscher, M. Herrmann, D. Sacks, W. Solbach, and T. Laskay.** 2006. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:13837-42.
277. **Velez, I. D., S. del Pilar Agudelo, M. P. Arbelaez, K. Gilchrist, S. M. Robledo, J. A. Puerta, F. Zicker, J. Berman, and F. Modabber.** 2000. Safety and immunogenicity of a killed *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* vaccine against cutaneous leishmaniasis in Colombia: a randomized controlled trial. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **94**:698-703.
278. **Walton, B. C.** 1989. Leishmaniasis. A worldwide problem. *Int J Dermatol* **28**:305-7.
279. **Wanderley, J. L., and M. A. Barcinski.** 2012. Apoptosis and apoptotic mimicry: the *Leishmania* connection. *Cell Mol Life Sci* **67**:1653-9.
280. **Weise, F., Y. D. Stierhof, C. Kuhn, M. Wiese, and P. Overath.** 2000. Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells. *J Cell Sci* **113 Pt 24**:4587-603.
281. **Wong, I. L., K. F. Chan, B. A. Burkett, Y. Zhao, Y. Chai, H. Sun, T. H. Chan, and L. M. Chow.** 2007. Flavonoid dimers as bivalent modulators for

- pentamidine and sodium stibogluconate resistance in leishmania. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:930-40.
282. **Wyllie, S., M. L. Cunningham, and A. H. Fairlamb.** 2004. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* **279**:39925-32.
283. **Yao, C., J. E. Donelson, and M. E. Wilson.** 2003. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol* **132**:1-16.
284. **Zhou, D., W. D. Hardt, and J. E. Galan.** 1999. *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infect Immun* **67**:1974-81.
285. **Zolnerciks, J., E. Andress, M. Nicolaou, and K. Linton.** 2011. Essays in Biochemistry ABC Transporters, vol. 50. Portland Press Limited.
286. **Zutz, A., S. Gompf, H. Schagger, and R. Tampe.** 2009. Mitochondrial ABC proteins in health and disease. *Biochim Biophys Acta* **1787**:681-90.



# ANEXOS



## **ANEXO 1**

**A new ABC half-transporter in *Leishmania major* is involved in resistance to antimony.**

**Antimicrobial Agents and Chemotherapy 57:3719-30; 2013.**

José Ignacio Manzano, Raquel García-Hernández, Santiago Castanys y Francisco Gamarro.

A lo largo del artículo se describe la caracterización de ABCI4, un nuevo *half transporter* perteneciente a la familia ABC (ATP-binding cassette). Mostramos la implicación de ABCI4 en la exportación de metales pesados, confiriendo resistencia a Pentostam, Sb (III), As (III) y Cd (II). Así, parásitos que sobreexpresaban ABCI4 mostraron un efecto tóxico producido por antimonio menor a nivel mitocondrial, disminuyendo los niveles de producción de especies reactivas de oxígeno y manteniendo valores altos de potencial de membrana mitocondrial y de los niveles de ATP respecto a la línea control. El *half transporter* ABCI4 forma homodímeros como se determinó mediante un ensayo de coimmunoprecipitación. Una combinación de estudios de localización subcelular empleando microscopía confocal y biotinylación de superficie utilizando parásitos que expresaban la proteína verde fluorescente- y FLAG-epítipo ABCI4 sugieren que el transportador presenta una localización dual en mitocondria y membrana plasmática. Los parásitos que sobreexpresaban ABCI4 presentaron un incremento en la replicación en macrófagos peritoneales de ratón. Hemos demostrado que determinadas porfirinas eran sustrato de ABCI4. Consecuentemente, la sobreexpresión de ABCI4 confería resistencia a algunas porfirinas tóxicas, tales como zinc-protoporfirina, debido a la menor acumulación resultado de un significativo eflujo, como se determinó empleando zinc-mesoporfirina fluorescente, un análogo validado de hemo. Además, ABCI4 tiene la capacidad de exportar tioles tras la incubación con Sb (III), por tanto ABCI4 podría considerarse como una potencial bomba tior-X que es capaz de reconocer



metales conjugados con tioles. En resumen, mostramos que este nuevo transportador ABC está implicado en la sensibilidad a fármacos y a otros compuestos mediante el eflujo de complejos conjugados con tioles.

# A New ABC Half-Transporter in *Leishmania major* Is Involved in Resistance to Antimony

J. I. Manzano, R. García-Hernández, S. Castanys, F. Gamarro

Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra," IPBLN-CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Armilla, Granada, Spain

**The characterization of ABCI4, a new intracellular ATP-binding cassette (ABC) half-transporter in *Leishmania major*, is described. We show that ABCI4 is involved in heavy metal export, thereby conferring resistance to Pentostam, to Sb(III), and to As(III) and Cd(II). Parasites overexpressing ABCI4 showed a lower mitochondrial toxic effect of antimony by decreasing reactive oxygen species production and maintained higher values of both the mitochondrial electrochemical potential and total ATP levels with respect to controls. The ABCI4 half-transporter forms homodimers as determined by a coimmunoprecipitation assay. A combination of subcellular localization studies under a confocal microscope and a surface biotinylation assay using parasites expressing green fluorescent protein- and FLAG-tagged ABCI4 suggests that the transporter presents a dual localization in both mitochondria and the plasma membrane. Parasites overexpressing ABCI4 present an increased replication in mouse peritoneal macrophages. We have determined that porphyrins are substrates for ABCI4. Consequently, the overexpression of ABCI4 confers resistance to some toxic porphyrins, such as zinc-protoporphyrin, due to the lower accumulation resulting from a significant efflux, as determined using the fluorescent zinc-mesoporphyrin, a validated heme analog. In addition, ABCI4 has a significant ability to efflux thiol after Sb(III) incubation, thus meaning that ABCI4 could be considered to be a potential thiol-X-pump that is able to recognize metal-conjugated thiols. In summary, we have shown that this new ABC transporter is involved in drug sensitivity to antimony and other compounds by efflux as conjugated thiol complexes.**

Despite being prevalent in 98 countries spread across three continents, leishmaniasis, which is caused by the protozoan parasite *Leishmania*, is one of the most neglected tropical diseases (1). The estimated incidence of leishmaniasis is over 12 million people worldwide, and it is responsible for a variety of pathologies, ranging from self-healing cutaneous lesions to fatal visceral infection (1). Since there are currently no effective vaccines, treatment largely relies on chemotherapy, although its efficacy is increasingly limited by growing resistance to first-line drugs, especially antimonials, the frequent side effects associated with their use, and the high cost of treatment (1). The recommended first-line therapies for visceral leishmaniasis (VL) include: (i) pentavalent antimonials (meglumine antimoniate and sodium stibogluconate), except in some regions in the Indian subcontinent where there are significant areas of drug resistance (2); (ii) the polyene antibiotic amphotericin B; (iii) the liposomal formulation AmBisome; (iv) the aminoglycoside paromomycin; and (v) the oral drug miltefosine. Although the World Health Organization (WHO) (1, 3) recently recommended the use of either a single dose of AmBisome or combinations of antileishmanial drugs in order to reduce the duration and toxicity of treatment, prolong the therapeutic life span of existing drugs and delay the emergence of resistance, recent experimental findings have demonstrated the ability of *Leishmania* to develop resistance to different drug combinations (4).

One of the main problems of leishmaniasis chemotherapy is the growing antimonial resistance found in Indian VL. Studies concerning experimental resistance to antimony in *Leishmania* indicate that several mechanisms may occur concurrently in the same parasite and that different mechanisms may operate in field isolates compared to lab-generated resistant *Leishmania* lines (5, 6). One mechanism of resistance to antimony in *Leishmania* involves a reduction in its accumulation, either by reduced uptake or increased efflux, with the latter being mediated by the ABC transporter ABCC3 (also known as PGPA or MRPA) (7, 8). ABC

transporters constitute one of the largest families of proteins described and as such play a broad variety of physiological roles with major medical consequences. These proteins are evolutionarily highly conserved, they are present in species ranging from prokaryotes to humans (9), and they use the energy provided by ATP hydrolysis to transport different compounds across biological membranes, including a variety of leishmanicidal agents such as antimonials (10), miltefosine (11), pentamidine (12), and sitamaquine (13).

Functional ABC transporters consist of two homologous halves, each of which is composed of a transmembrane domain (TMD) involved in substrate binding and a cytosolic nucleotide binding domain (NBD), which hydrolyzes ATP (9). Some ABC transporters are half-transporters with an NBD-TMD or TMD-NBD topology that requires homo-/hetero-dimerization to become functional (14). The *Leishmania* genome contains 42 ABC genes, with representative members from every subfamily (from ABCA to ABCH) commonly found in eukaryotes (15). To date, only ABC transporters related to the ABCA, ABCB, ABCC, and ABCG subfamilies have been described in *Leishmania* (10, 16).

At least two transporters from the ABCC family appear to be involved in antimony resistance (17). The *Leishmania* ABCC3,

Received 1 February 2013 Returned for modification 26 February 2013

Accepted 17 May 2013

Published ahead of print 28 May 2013

Address correspondence to F. Gamarro, [gamarro@ipb.csic.es](mailto:gamarro@ipb.csic.es).

S.C. and F.G. contributed equally to this article.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00211-13>.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.00211-13

which is located in the intracellular vesicular membrane close to the flagellar pocket, has been reported to be involved in arsenite and antimonial resistance in the promastigotes and amastigotes of several metal-resistant *Leishmania* species (18, 19). In addition, this transporter presents the ability to transport thiol-conjugated metals (19).

One of the proposed mechanisms of resistance to antimony suggests that conjugation with a thiol and extrusion of the complex by an ATP-coupled pump present in the plasma membrane (PM) is required (20). However, this transport system is not found for the ABCC proteins of *Leishmania* since all proteins of this subfamily have an intracellular location (21). Since there is currently very little understanding of the transporter responsible for this antimony efflux system (22), further studies are required to understand the mechanism of antimony resistance in *Leishmania*.

The involvement of thiols in antimony resistance is supported by an increase in the levels of the enzymes responsible for thiol synthesis ( $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase) in experimental metal-resistant *Leishmania* lines and in clinical isolates resistant to Pentostam (GlaxoSmithKline) (23, 24). Furthermore, this resistant phenotype can be reverted by buthionine sulfoximine (BSO), a biosynthesis-specific glutathione inhibitor (19). Similarly, the capacity of *Leishmania* ABCC3 to efflux toxic metals is known to be accompanied by a decreased generation of reactive oxygen species (ROS), thus contributing to decreased antimonial toxicity (25).

The second ABC transporter involved in antimony resistance is ABCC7-PRP1 (12, 17), a gene that is overexpressed in pentamidine-resistant *Leishmania* lines and confers significant cross-resistance to antimony (26). However, no clear association has been found between the amplification/overexpression of PRP1 and pentamidine resistance (27). As described recently, no other ABCC proteins have been demonstrated to be amplified or overexpressed in antimony-resistant *Leishmania* lines (17).

Here, we report the characterization of a new ABC transporter (ABCI4) in *Leishmania major* that is included in the unclassified group of ABC proteins termed as "others" (15). We have renamed this group ABCI, similar to what has been proposed for plant ABC classification (53). This transporter encodes a half-transporter with a TMD-NBD topology that requires at least homodimerization, with a dual localization at the PM and mitochondria. ABCI4 has antimony and other heavy metals as potential substrates, thereby conferring resistance to antimonials due to the lower accumulation resulting from their active efflux. As such, we postulate that ABCI4 could be considered to be a potential thiol-X-pump that is able to recognize metal-conjugated thiols, thereby conferring antimony resistance in *Leishmania*.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemical compounds.** Carbonylcyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazide (FCCP), trivalent antimony (Sb(III); potassium antimony tartrate), pentamidine, paromomycin, amphotericin B, ketoconazole, chloroquine, quinine, mefloquine, primaquine, 4',6-diamidino-2-phenylindole dilactate (DAPI), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), BSO, CdCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, Pb(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, NaAsO<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, *n*-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DDM), pheophorbide A, and glutathione (GSH) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Miltefosine was purchased from Æterna Zentaris (Frankfurt, Germany) and daunomycin (DNM) was purchased from Pfizer (Madrid, Spain). All chemicals were of the highest quality available. Pentostam, tafenoquine, and sitamaquine dihydrochloride were provided

by GlaxoSmithKline (Greenford, United Kingdom). MitoSOX Red, H<sub>2</sub>DCFDA, and JC-1 were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). Zinc-protoporphyrin and zinc-mesoporphyrin were purchased from Frontier Scientific (Logan, UT).

**Animals.** Six-week-old male BALB/c mice were purchased from Charles River Breeding Laboratories and maintained in the Animal Facility Service of our Institute under pathogen-free conditions. They were fed a regular rodent diet and given drinking water *ad libitum*. These mice were used to collect primary peritoneal macrophages.

**Ethics statement.** All experiments were performed according to National/EU guidelines regarding the care and use of laboratory animals in research. Approval for these studies was obtained from the Ethics Committee of the Spanish National Research Council (CSIC file CEA-213-1-11).

***Leishmania* culture conditions.** The promastigotes of *L. major* (MHOM/JL/80/Friedlin) and derivative lines used in the present study were cultured at 28°C in M-199 medium (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (hiFBS; Invitrogen).

***In vitro* infection of mouse peritoneal macrophages.** Amastigotes were cultured for 24 and 72 h in infected peritoneal macrophages from BALB/c mice (Charles River, Ltd.) as described previously (28).

**DNA constructs and site-directed mutagenesis.** *ABCI4* from *L. major* (GeneDB *L. major*, accession code LmjF.33.3260) was isolated from the genomic DNA of *L. major* by PCR using sense (5'-TGCATTCTCACGCC TTCACAC) and antisense (5'-ACTAGCATTAGCTGCGAGTTCC) primers. *ABCI4* was cloned into the *Leishmania* expression vector pXG-Hyg (29) and sequenced. The *Leishmania* expression vectors pXG-GFP+ and pXG-GFP+2' (29) were used to construct chimeric ABCI4 fusion proteins with a green fluorescent protein (GFP) at the C- and N-terminal positions, respectively. For the C-terminal position of GFP, *ABCI4* was amplified by PCR using sense (5'-ATAGATCTATGAGACTCACTGATG CTCCGT) and antisense (5'-ATGATATCGCTCACTGCCTGTGCACG) primers. For the N-terminal position of GFP, *ABCI4* was amplified using sense (5'-ATGCGGCCGCATGAGACTCACTGATGCTCCGT) and antisense (5'-ATAGATCTTCAGCTCACTGCCTGTGC) primers. To obtain parasites expressing nonfunctional ABCI4, a mutation was introduced in the Walker A motif, replacing lysine 742 for methionine (K742M) using the QuikChange XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA) and the sense (5'-GTGGGGCGGGGATGAGTACG CTGCT) and antisense (5'-AGCAGCGTACTCATCCCCGCCCCAC) primers. To incorporate an N-terminal FLAG epitope tag, *ABCI4* was amplified by using sense (5'-ATGGACTACAAGGACGACGACGACAA GATGAGACTCACTGATGCTCC) and antisense (5'-TCAGCTACTG CCTGTGCAC) primers. Similarly, sense (5'-ATGGACTACAAGGACGA CGACGACAAGGACTACAAGGACGACGACGACGACAAGGACTAC) and antisense (5'-TCAGCTCACTGCCTGTGCAC) primers were used to add two additional FLAG epitope tags to the previous construct. These constructs were cloned into the expression vector pXG-Hyg.

**Gene expression.** Total RNA was extracted from different *Leishmania* lines using the high pure RNA isolation kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany) and transcribed into cDNA using the qScript cDNA synthesis kit (Quanta Biosciences, Inc.) according to the manufacturer's instructions. The cDNA obtained was diluted (1:10 and 1:50) and amplified with sense (5'-TGACGAGCATGAAGCGTACAC) and antisense (5'-GCTGT ATCGATGCGAGGCTT) primers for *ABCI4* and with sense (5'-GAAGTA CACGGTGGAGGCTG) and antisense (5'-CGTGTATCAGCACCTTC TTC) primers for *GADPH* (as internal control) and electrophoresed on 1% agarose gel.

**Cell transfection and sensitivity analysis.** Parasites transfected with the constructs obtained above were selected for hygromycin or G418 depending on the vector used in each construct, as described previously (30). In addition, the *Leishmania* line overexpressing *ABCI4*<sup>K/M</sup> was cotransfected with *ABCI4* to rescue the phenotype induced by the mutant line. The sensitivity of *L. major* promastigote lines to different compounds was determined using the MTT colorimetric assay, as described previously

(31). The 50% effective concentration ( $EC_{50}$ ) is the concentration of drug that decreases the rate of cell growth by 50%. To determine the relationship between thiol levels and the sensitivity of the different *Leishmania* lines, 3 mM BSO (a  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase inhibitor) was added at 28°C for 48 h before the sensitivity experiments. The sensitivity of intracellular *Leishmania* amastigotes to Sb(III) and Sb(V) (Pentostam) was determined after 72 h of incubation as described previously (28).

**Fluorescence microscopy of *Leishmania* promastigotes.** Promastigotes expressing ABC14 GFP-fused proteins were used for localization studies. Parasite mitochondria were labeled with 50 nM MitoTracker Red (Invitrogen) for 30 min at 28°C in RPMI medium without hiFBS. They were then washed with phosphate-buffered saline (PBS) and analyzed under an Axiovert confocal microscope (TCS SP5 model; Leica).

**Cell surface biotinylation.** Parasite surfaces were labeled as described previously (32), using 3% DDM instead of 1% Nonidet P-40 for parasite lysis. Protein samples were fractionated by SDS-PAGE under standard conditions and then electrotransferred onto Immobilon P membranes (Millipore, Bedford, MA). Immunodetection was performed using 1:5,000 polyclonal anti-GFP or 1:3,000 polyclonal anti-LRos3 (LRos3 is a PM protein) (32), respectively, in PBS plus 0.01% Tween 20 and 0.1% bovine serum albumin (BSA). Control of PM integrity was determined by immunodetection with monoclonal anti- $\alpha$ -tubulin antibody (Sigma-Aldrich) at 1:5,000. After washing, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary goat anti-rabbit (1:5,000) immunoglobulin G (Dako, Barcelona, Spain) for GFP and LRos3, and rabbit anti-mouse (1:5,000) immunoglobulin G (Dako) for  $\alpha$ -tubulin. Signals were detected using the enhanced chemiluminescence (ECL) substrate (Pierce).

**Coimmunoprecipitation assays.** *Leishmania* promastigotes ( $8 \times 10^9$ ) expressing 3FLAG-ABC14 and both 3FLAG- and GFP-ABC14 chimeric proteins were washed with PBS, resuspended in 1 ml of lysis buffer, and disrupted for 45 min in a prechilled, high-pressure cavitator (Ashcroft, USA) connected to a compressed nitrogen cylinder at 100 bar pressure. The parasite lysates were centrifuged at  $1,000 \times g$  to eliminate cell debris; the supernatant was then centrifuged at  $100,000 \times g$  and 4°C for 1 h to obtain parasite membrane-enriched fractions. The pellets obtained were solubilized in 550  $\mu$ l of lysis buffer supplemented with 2.5% DDM, and the resulting solution clarified by centrifugation at  $100,000 \times g$  at 4°C for 30 min. Supernatants were incubated with magnetic beads covalently bound to anti-GFP for 24 h at 4°C. After incubation, the magnetic beads were washed three times with lysis buffer supplemented with 0.05% DDM and eluted with Laemmli buffer. Samples were fractionated by SDS-PAGE under standard conditions and then electrotransferred onto Immobilon P membranes (Millipore, Bedford, MA). Immunodetection was performed using 1:5,000 polyclonal anti-GFP or 1:2,000 polyclonal anti-FLAG (Pierce), respectively, in wash solution (PBS plus 0.01% Tween 20 and 0.1% BSA). Membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary goat anti-rabbit (1:5,000) immunoglobulin G (Dako), and signals were detected using the ECL substrate (Pierce).

**Antimony accumulation and efflux by ICP-MS.** Promastigotes ( $10^8$  per ml) were incubated with 100  $\mu$ M Sb(III) in M-199 culture medium for different time points at 28°C and then centrifuged, and the resultant pellet stored at  $-80^\circ\text{C}$  until measurement of antimony accumulation as described previously (7). To determine antimony efflux, the different lines were incubated with compensated Sb(III) concentrations (100  $\mu$ M for pXG and ABC14<sup>K/M</sup> lines and 200  $\mu$ M for ABC14 line) in culture medium at 28°C for 1 h to allow a similar labeling in the *Leishmania* lines. The parasites were then washed with PBS, resuspended in culture medium at 28°C, and pelleted at different time points. The cell pellet was dissolved in 200  $\mu$ l of concentrated nitric acid for 24 h at room temperature. The sample was diluted to 3 ml with distilled water and then injected into an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS; Perkin-Elmer) for quantitation.

**Cadmium accumulation and efflux.** Cadmium (Cd(II)) accumulation assays were performed using the fluorimetric dye Leadmium Green

(Invitrogen), as described previously for mammalian cells (33). Thus, promastigotes ( $10^7$ ) were incubated with 100  $\mu$ M Cd(II) in saline buffer (21 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 6 mM glucose; pH 7) for different time points at 28°C. The parasites were then pelleted and washed twice with saline buffer. Sample fluorescence was measured using an Infinite F200 luminescence system (Tecan Austria GmbH). To determine Cd(II) efflux, pXG and ABC14 lines were incubated with compensated concentrations of the metal (100 and 175  $\mu$ M, respectively), according to the results obtained in the accumulation experiments. After incubation for 1 h, parasites were centrifuged, washed twice with saline buffer, and then resuspended in the same buffer. The fluorescence retained was measured at different time points as described above.

**Zinc-mesoporphyrin accumulation and efflux.** Promastigotes in their logarithmic phase were washed and resuspended in HPMI medium (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 400  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>, 40  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM glucose, 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) at a final concentration of  $5 \times 10^7$  promastigotes/ml. The parasites were then incubated with 10  $\mu$ M zinc-mesoporphyrin (ZnMP) at 28°C for 10 min and washed with PBS buffer plus 5% BSA. Finally, the parasites were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS, and the fluorescence retained was measured by flow cytometry (excitation at 405 nm and emission at between 575 and 585 nm) using a FACSria Cell Sorter III (Becton Dickinson, San Jose, CA). To determine the ZnMP efflux, the *Leishmania* control line (pXG) and ABC14<sup>K/M</sup> were loaded with 10  $\mu$ M ZnMP, whereas the *Leishmania* line overexpressing ABC14 was loaded with 20  $\mu$ M in order to allow for a similar labeling in HPMI medium at 28°C. The parasites were subsequently washed with PBS, and efflux was measured by determination of the fluorescence retained at different time points by flow cytometry as described above.

**Pheophorbide A accumulation and efflux.** Determination of the accumulation and efflux of pheophorbide A, a phototoxic porphyrin catabolite of chlorophyll, was performed as described previously (34), with some modifications. Briefly, parasites ( $10^7$ ) were resuspended in 1 ml of HPMI medium and incubated with 10  $\mu$ M pheophorbide A for 30 min at 28°C. The parasites were then washed with PBS buffer and the fluorescence retained measured by flow cytometry using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). For pheophorbide A efflux, after incubation with 10  $\mu$ M pheophorbide A, the parasites were washed with PBS and resuspended in HPMI medium for 60 min at 28°C. The fluorescence retained was measured as described above.

**Determination of nonprotein thiol.** Intracellular nonprotein thiol levels were measured by flow cytometry using CellTracker, as described previously (35). Thiol efflux to the culture medium was determined using the thiol fluorescent detection reagent ThioStar (Luminos, Ann Arbor, MI) (36). Thus, parasites ( $10^8$ ) were incubated with 100  $\mu$ M Sb(III) for 1 h in 1 ml of HBS buffer (21 mM HEPES, 0.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, and 6 mM glucose, pH 7), washed twice with PBS buffer and then resuspended again in Sb(III)-free HBS buffer. Parasites were collected at different time points, and both the supernatants and the pellets obtained were treated with 12% trichloroacetic acid at 4°C for 30 min to deproteinize and then centrifuged at  $13,000 \times g$ . The supernatants were diluted with HBS buffer to reduce the trichloroacetic acid concentration to 2% and were then transferred to a 96-well microplate and incubated with 3  $\mu$ g of ThioStar/ml for 1 h at room temperature. Sample fluorescence (excitation, 380 nm; emission, 510 nm) was measured using an Infinite F200 luminescence system (Tecan Austria GmbH). Different GSH concentrations were used as a control of the thiol concentration dependence signal of ThioStar.

**Measurement of ATP and mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ).** ATP was measured using a CellTiter-Glo luminescence assay, which generates a luminescent signal proportional to the amount of ATP present, as described previously (28).  $\Delta\Psi_m$  was measured by flow cytometry using the JC-1 fluorescent marker. Depolarization of  $\Delta\Psi_m$  is indicated by a reduced accumulation of the dye and a shift from red to green, with a corresponding decrease in the red/green fluorescence ratio. The



parasites ( $4 \times 10^6$  promastigotes/ml) were incubated with 100  $\mu$ M Sb(III) for different time points at 28°C in HBS buffer and then washed twice, resuspended in PBS, and further incubated at 28°C with 5  $\mu$ M JC-1 for 10 min in HBS buffer. Cellular fluorescence was quantified by calculating the ratio between FL2 and FL1 using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson). Parasites fully depolarized by incubation in 10  $\mu$ M FCCP for 10 min at 28°C were used as controls.

**Measurement of ROS production.** The generation of intracellular ROS was measured in parasites exposed to increasing concentrations of Sb(III) for 48 h using the cell-permeant  $H_2$ DCFDA and MitoSOX Red probes, as described previously (37). The fluorescence retained was measured by flow cytometry using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson).

**Statistical analysis.** Statistical comparisons between groups were performed using Student *t* test. Differences were considered significant at a level of  $P < 0.05$ .

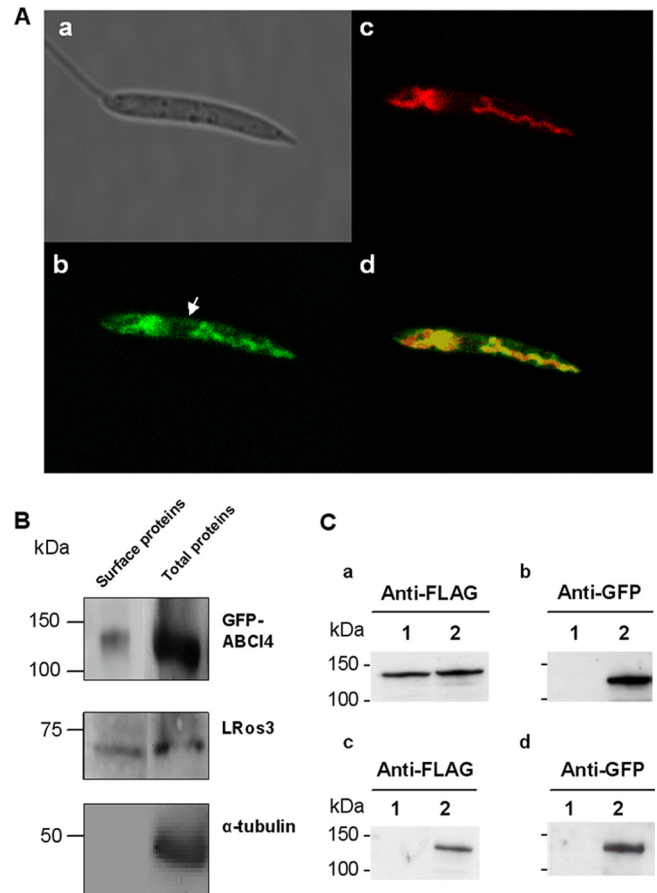
## RESULTS

**Sequence features of ABCI4 and generation of a *Leishmania* line expressing an inactive version of the protein.** The present study focuses on characterization of the ABCI4 gene (GeneDB *L. major*, accession code LmjF.33.3260) from chromosome 33, and grouped as “others” according to the recently proposed classification (15). ABCI4 codes for a 949-amino-acid protein, with a predicted molecular mass of  $\sim 103$  kDa. ABCI4 shares a significant percentage amino acid identity just in the NBD with other *Leishmania* ABC transporters of ca. 30% for the ABCB subfamily. In addition, a similar percent amino acid identity in the NBD domain was observed with other eukaryotic ABC transporters, as for human ABCB6 and ABCB7 transporters.

Hydrophobicity plots of ABCI4 using the programs TMpred ([http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)) and MEMSAT-SVM (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> [data not shown]) showed the expected topology for an ABC half-transporter, with a hydrophilic region, which bears the highly conserved motifs of ABC transporters (NBD) at the COOH terminus, and a hydrophobic region (TMD), containing six putative transmembrane segments at the NH<sub>2</sub> terminus.

The dimerization requirement for ABC half-transporters to become functional led us to test a dominant-negative approach to downregulate ABCI4 function, as recently described for *Leishmania* LABCG5 and LABCG2 (38). To this end, we first mutated the lysine residue inside the Walker A motif in ABCI4 (742 position), which is known to be critical for ATP hydrolysis in ABC transporters (38, 39), to a methionine (K742M). The expression of other ABCG half-transporters with a similar K/M substitution produces a dominant-negative inhibition in the wild-type transporters (38, 40). The resulting construct was transfected into *L. major* and the expression of ABCI4<sup>K742M</sup> (ABCI4<sup>K/M</sup>), as well as other *Leishmania* lines overexpressing ABCI4 was verified by reverse transcription-PCR (RT-PCR) (see Fig. S1 in the supplemental material). In contrast to the phenotype observed after LABCG5<sup>K/M</sup> expression (38), parasites transfected with ABCI4<sup>K/M</sup> grew at normal rates (data not shown).

**Localization of ABCI4 in mitochondria and PM using confocal microscopy and biotinylation assay.** To ascertain the subcellular localization of ABCI4, we fused ABCI4 and ABCI4<sup>K/M</sup> with an N-terminal GFP tag. These constructs were transfected into *L. major* promastigotes and overexpression of the corresponding proteins determined by Western blot analysis of whole parasite



**FIG 1** ABCI4 localizes to the mitochondria and PM of *Leishmania* parasites. (A) Confocal microscopy images of *L. major* stationary promastigotes transfected with GFP-ABCI4. (a) Nomarski image. (b) Green fluorescence associated with the GFP-ABCI4 fusion protein. (c) Red fluorescence associated with parasites incubated at 28°C with 50 nM MitoTracker Red for 30 min. (d) The merged image indicates colocalization (yellow) of ABCI4 with the mitochondrial probe. The figure illustrates a representative parasite from a total population of parasites with a similar fluorescence pattern. The arrow indicates the localization of ABCI4 in the PM. (B) ABCI4 expression levels in the PM membrane by surface biotinylation. Biotinylated proteins from the promastigote surface were analyzed by immunoblotting with anti-GFP, anti-LRos3, and anti- $\alpha$ -tubulin antibodies as described in Materials and Methods. Western blot assays representative of at least three independent experiments are shown. (C) Coimmunoprecipitation experiments demonstrate that ABCI4 forms homodimers. The solubilized membrane-enriched fraction of *Leishmania* parasites (a and b) overexpressing 3 $\times$ FLAG-ABCI4 (lane 1) and 3 $\times$ FLAG-ABCI4 and GFP-ABCI4 (lane 2) was incubated with magnetic beads covalently bound to anti-GFP. After incubation, the magnetic beads were washed, eluted and analyzed by immunoblotting (c and d). The positions of molecular mass markers (in kilodaltons) are indicated on the left.

lysates. As expected, a band corresponding to GFP-ABCI4 was observed at  $\sim 130$  kDa (see Fig. S2 in the supplemental material). Fluorescence microscopy studies showed that GFP-ABCI4 mainly colocalizes with the mitochondrial marker MitoTracker (Fig. 1A). In addition, the protein that localizes at the PM of the parasite was observed, although with a lower fluorescence intensity (Fig. 1A). The localization pattern of the protein did not change when GFP-ABCI4<sup>K/M</sup> was expressed in *Leishmania* parasites (data not shown). Despite several attempts, we were unable to obtain parasites expressing GFP-tagged ABCI4 at the COOH terminus, thus

TABLE 1 Drug resistance profile in *L. major* lines<sup>a</sup>

Drug	Mean EC <sub>50</sub> (μM) ± SD [RI] <sup>b</sup>		
	pXG	ABCI4	ABCI4 <sup>K/M</sup>
<b>Promastigote</b>			
Sb(III)	20.87 ± 1.80	53.74 ± 3.35 [2.6]*	21.16 ± 3.60 [1.0]
As(III)	2.62 ± 0.69	5.14 ± 0.50 [2.0]*	1.97 ± 0.36 [0.8]
Amphotericin B	0.14 ± 0.01	0.11 ± 0.01 [0.8]	0.09 ± 0.01 [0.6]
Miltefosine	20.08 ± 1.30	16.39 ± 1.12 [0.8]	20.79 ± 0.60 [1.0]
Paromomycin	25.36 ± 2.36	27.54 ± 3.21 [1.1]	26.31 ± 0.97 [1.0]
Tafenoquine	4.98 ± 0.20	4.90 ± 0.16 [1.0]	3.47 ± 0.28 [0.7]
Sitamaquine	11.52 ± 1.23	11.72 ± 1.52 [1.1]	11.09 ± 0.98 [1.0]
Primaquine	3.69 ± 0.37	4.14 ± 0.65 [1.1]	2.27 ± 0.24 [0.6]
Chloroquine	2.82 ± 0.23	2.32 ± 0.14 [0.8]	1.88 ± 0.21 [0.7]
Ketoconazole	47.30 ± 3.56	45.07 ± 4.89 [1.0]	39.72 ± 2.23 [0.8]
Daunomycin	9.09 ± 0.36	9.54 ± 0.23 [1.1]	9.71 ± 0.36 [1.1]
Mefloquine	0.65 ± 0.03	0.66 ± 0.05 [1.0]	0.62 ± 0.08 [1.0]
Quinine	25.11 ± 1.45	33.23 ± 3.60 [1.3]	22.46 ± 2.14 [0.9]
ZPP <sup>c</sup>	4.35 ± 0.67	10.12 ± 0.23 [2.1]*	4.85 ± 0.16 [1.1]
Pheophorbide A <sup>c</sup>	10.01 ± 0.15	8.61 ± 0.53 [0.9]	8.90 ± 0.66 [0.9]
<b>Amastigote</b>			
Sb(III)	5.73 ± 0.41	14.97 ± 1.23 [2.6]*	6.45 ± 0.12 [1.1]
Pentostam [Sb(V)]	28.06 ± 1.98	53.09 ± 2.34 [1.9]*	28.16 ± 2.30 [1.0]

<sup>a</sup> Promastigotes were grown as described in Materials and Methods for 72 h at 28°C in the presence of increasing concentrations of drugs. Cell viability was determined by using an MTT-based assay. On the other hand, intracellular amastigotes *L. major* lines were obtained after infection of mouse peritoneal macrophages with the different promastigote lines using a macrophage/parasite ratio of 1:10. After 72 h, drug activity was determined from the percentage of infected cells and the number of amastigotes by cells in drug-treated cultures versus nontreated cultures. The infection was determined by DAPI staining in 200 macrophages/well. Significant differences were determined by using the Student *t* test (\*, *P* < 0.01).

<sup>b</sup> Resistance indexes (RI) were calculated by dividing the EC<sub>50</sub> for *Leishmania* line overexpressing ABCI4 or ABCI4<sup>K/M</sup> by that for *Leishmania* line control (pXG). Data are means from three independent experiments.

<sup>c</sup> Cell densities were measured with an electronic particle counter (Coulter Electronics, United Kingdom) and by direct counting with a hemocytometer.

suggesting that the C-terminal region is critical for maintaining ABCI4 stability. We also determined that ABCI4 is localized to mitochondria and PM using a FLAG-tagged ABCI4 (data not shown). Overall, these studies suggest that ABCI4 has a dual localization in both mitochondria and the PM of *Leishmania*.

Surface biotinylation experiments showed that GFP-ABCI4 localizes at the PM (Fig. 1B). ABCI4 was detected in the fraction eluted from streptavidin beads by immunoblotting with anti-GFP (Fig. 1B). LRos3, which is known to be present at the PM of *Leishmania* parasites (41), was used as a positive control (Fig. 1B). Furthermore, no immunoreactive bands were detected after immunoblotting of biotinylated proteins against anti- $\alpha$ -tubulin (Fig. 1B). This control confirms that the labeling reagent did not penetrate the PM, thereby demonstrating the specificity of the biotinylation procedure.

The dimerization requirement for ABC half-transporters to become functional led us to determine whether ABCI4 forms homodimers or heterodimers to be functionally active. The coimmunoprecipitation assay was performed using parasites coexpressing GFP- and 3×FLAG-ABCI4, and the proteins bound to magnetic bead anti-GFP fractions were visualized by immunoblotting with anti-GFP and anti-FLAG antibodies. Western blot analysis showed that anti-FLAG and anti-GFP antibodies detected a specific band of the expected size for tagged-ABCI4 in parasites overexpressing 3×FLAG-ABCI4 and coexpressing 3×FLAG-ABCI4 and GFP-ABCI4 (Fig. 1Ca and b). The coimmunoprecipitation assays revealed that anti-FLAG antibody only detected a specific band only in the eluted fraction of parasites coexpressing 3×FLAG-ABCI4 and GFP-ABCI4 after incubation of the solubi-

lized membrane-enriched fraction with magnetic beads covalently bound to anti-GFP (Fig. 1Cc), thus suggesting that ABCI4 forms homodimers.

**Overexpression of ABCI4 confers resistance to metal ions, antimonials, and toxic porphyrins in *Leishmania*.** Since several ABC transporters have been implicated in drug resistance in *Leishmania* (10–13), we analyzed whether overexpression of ABCI4 could confer resistance against several compounds. Different unrelated antileishmanial drugs and other unrelated compounds with potential use as antiprotozoal drugs, including Sb(III), amphotericin B, miltefosine, paromomycin, aminoquinolines (sitamaquine, tafenoquine, chloroquine, mefloquine, and primaquine), quinine, azoles (ketoconazole), daunomycin, and As(III), were tested (Table 1). Parasites overexpressing ABCI4 were ~2-fold more resistant to Sb(III) and As(III) than the control (parasites transfected with the empty vector pXG). These results suggest that metal ions are possible substrates for ABCI4 (Table 1). Further analysis showed that overexpression of ABCI4 conferred resistance to the metal ions Cd(II) and Pb(II) but did not affect the susceptibility to Cu(II), Zn(II), Co(II), and Mn(II) (Table 2). These results suggest that some heavy metals, mainly Sb(III), are putative ABCI4 substrates. The above results were validated in a second transfection event with ABCI4 (Table 2). Promastigotes overexpressing GFP-ABCI4 showed similar behavior to parasites overexpressing untagged ABCI4, thus showing that tagging at the NH<sub>2</sub> terminus did not interfere with the functionality of ABCI4 (Table 2). In addition, the cross-resistance profile obtained in *Leishmania* promastigotes overexpressing ABCI4<sup>K/M</sup> was similar to that for control parasites (Tables 1 and 2). To verify that the

TABLE 2 Heavy metal sensitivity in *L. major* promastigote lines<sup>a</sup>

Metal	Mean EC <sub>50</sub> (μM) ± SD [RI] <sup>b</sup>						
	pXG	ABCI4 <sup>c</sup>	2-ABCI4 <sup>d</sup>	ABCI4rev	GFP-ABCI4 <sup>e</sup>	3FLAG-ABCI4 <sup>f</sup>	ABCI4 <sup>K/M</sup>
Sb(III)	20.87 ± 1.80	53.74 ± 3.35 [2.6]*	40.61 ± 3.46 [2.0]*	21.92 ± 0.36 [1.0]	63.46 ± 2.12 [3.0]*	50.75 ± 1.32 [2.5]*	21.16 ± 3.60 [1.0]
As(III)	2.62 ± 0.69	5.14 ± 0.50 [2.0]*	4.97 ± 0.19 [1.9]*	2.86 ± 0.27 [1.0]	5.76 ± 0.47 [2.2]*	5.06 ± 0.37 [2.0]*	1.97 ± 0.36 [0.8]
Cd(II)	42.36 ± 4.12	82.55 ± 8.84 [2.0]*					40.96 ± 2.30 [1.0]
Pb(II)	825.54 ± 25.36	1,321.22 ± 52.14 [1.6]*					826.15 ± 38.50 [1.0]
Cu(II)	164.31 ± 5.45	221.73 ± 4.73 [1.4]					162.63 ± 4.50 [1.0]
Zn(II)	590.04 ± 0.50	728.95 ± 1.43 [1.2]					555.43 ± 12.60 [0.9]
Co(II)	35.33 ± 1.23	35.89 ± 1.57 [1.0]					38.20 ± 2.01 [1.1]
Mn(II)	30.27 ± 2.96	32.68 ± 1.25 [1.1]					32.13 ± 2.63 [1.1]

<sup>a</sup> Parasites were grown as described in Materials and Methods for 72 h at 28°C in the presence of increasing concentrations of drugs. Cell viability was determined using an MTT-based assay. Significant differences were determined by using the Student *t* test (\*, *P* < 0.01).

<sup>b</sup> Resistance indexes (RI) were calculated by dividing the EC<sub>50</sub> for *Leishmania* lines overexpressing ABCI4, GFP-ABCI4, 3FLAG-ABCI4, ABCI4<sup>K/M</sup>, or reverted line (ABCI4rev) by that for *Leishmania* control line (pXG). Data are means from three independent experiments.

<sup>c</sup> First ABCI4 transfection event in *L. major*.

<sup>d</sup> Second ABCI4 transfection event in *L. major*.

<sup>e</sup> *L. major* overexpressing ABCI4 fused to GFP in the N-terminal position.

<sup>f</sup> *L. major* overexpressing ABCI4 fused to 3×FLAG epitope tag in the N-terminal position.

resistance to some heavy metals observed in parasites overexpressing ABCI4 was due to overexpression of the ABC transporter, ABCI4 parasites were cured for the plasmid pXG-Hyg (reverted line, ABCI4rev) by culturing the parasites in the absence of plasmid drug selection pressure for 1 month. This reverted line showed a similar resistance to some heavy metals as the control (pXG) *Leishmania* line (Table 2). In addition, parasites coexpressing ABCI4-ABCI4<sup>K/M</sup> showed similar Sb(III) sensitivity to the controls (see Fig. S3 in the supplemental material). This finding indicates that the mutated version of the transporter binds and inhibits ABCI4 activity and also suggests a low basal expression level of this transporter in wild-type parasites.

The Sb(III) resistance shown by the promastigote forms of *Leishmania* was maintained in intracellular amastigotes obtained after infection of mouse peritoneal macrophages (Table 1). Furthermore, amastigotes overexpressing ABCI4 were also resistant to Pentostam, a leishmanicidal drug containing pentavalent antimony, which is reduced to Sb(III) in the amastigote forms. These findings indicated that the resistance indices to antimonials in the intracellular amastigotes overexpressing ABCI4 were very similar to those observed in their promastigote counterparts (Tables 1 and 2).

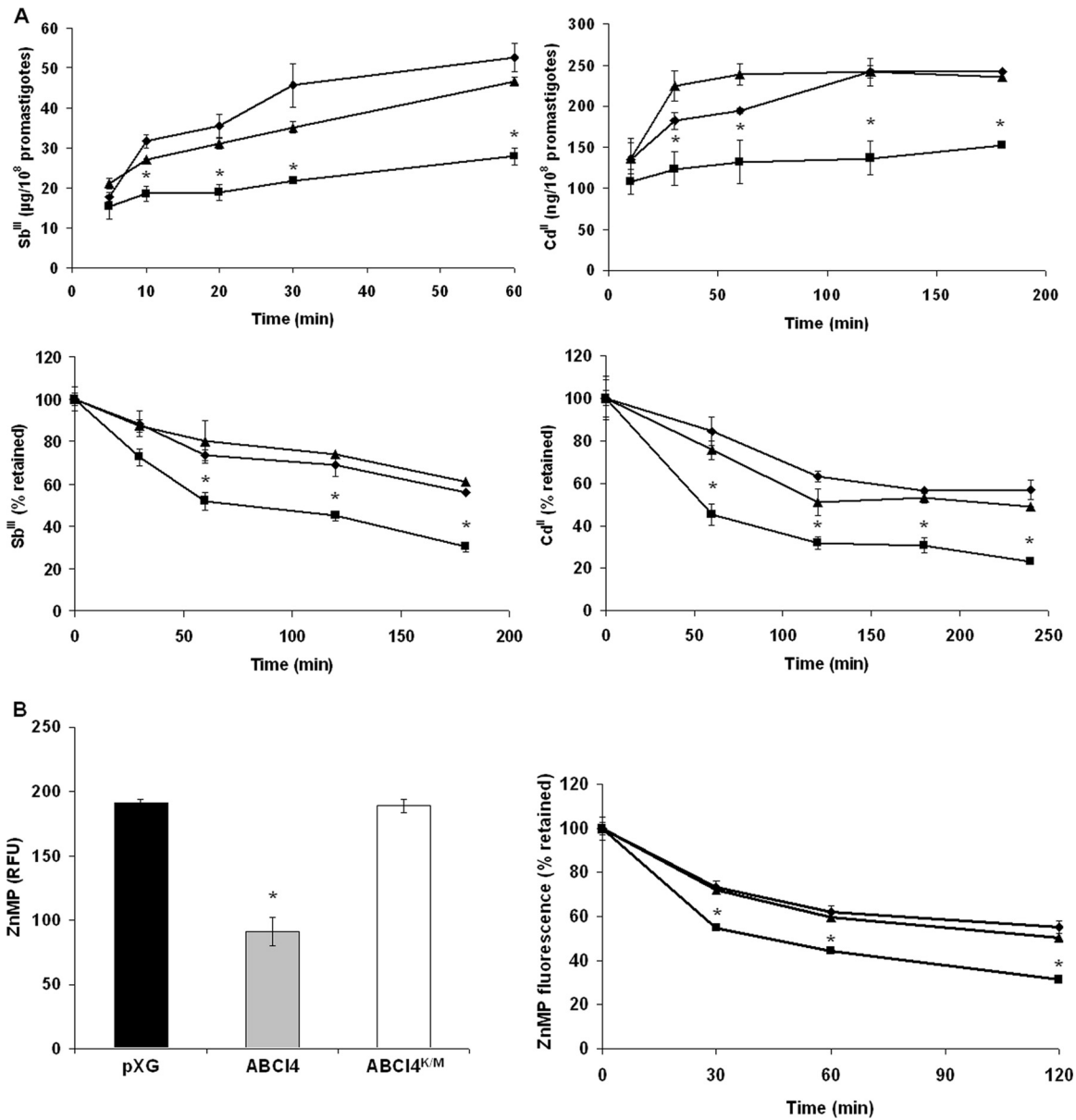
As far as the mitochondrial localization of ABCI4 and the possibility of its involvement in heme transport is concerned, as described for other ABC transporters, we determined whether porphyrins are a substrate for ABCI4, and consequently, whether the overexpression of ABCI4 confers resistance to some toxic porphyrins such as zinc-protoporphyrin (ZPP), a validated heme analog, and pheophorbide A, which is structurally related to protoporphyrins. As can be seen from Table 1, ABCI4 overexpression ABCI4 confers a significant resistance to ZPP (2-fold) but not to pheophorbide A. The mutant ABCI4<sup>K/M</sup> showed the same sensitivity levels as observed in control parasites.

**Reduction in the accumulation of Sb(III), Cd(II) and porphyrins due to an increased efflux in *L. major* overexpressing ABCI4.** To corroborate that ABCI4 has Sb(III) and Cd(II) as potential substrates, the intracellular accumulation of these metal ions was measured in *L. major* lines as a function of time by ICP-MS and using the fluorimetric dye Leadmium Green, respectively. Accumulation of Sb(III) and Cd(II) was found to be time-

dependent (Fig. 2A), with parasites overexpressing ABCI4 accumulating 52% of the Sb(III) and 63% of the Cd(II) of control parasites at the final incubation time (Fig. 2A). The lower Sb(III) accumulation could explain the resistance to antimonials observed in parasites overexpressing the ABCI4 transporter. To determine whether the reduced level of accumulation of heavy metals in the resistant parasites was due to an increased efflux, *L. major* lines were loaded under conditions that yielded similar amounts of intracellular compounds and the amount of heavy metals retained in the parasites measured at different time points. The efflux of Sb(III) and Cd(II) was found to be time-dependent in the *Leishmania* lines (Fig. 2A) and was faster for parasites overexpressing ABCI4, thus confirming that the differences in Sb(III) and Cd(II) accumulation are due to an increased ABCI4-mediated efflux activity.

We also determined accumulation of the fluorescent zinc-mesoporphyrin (ZnMP), as a validated heme analog, and found that *Leishmania* parasites overexpressing ABCI4 present a lower accumulation of ZnMP (2.1-fold) than controls (Fig. 2B) due to a significant efflux (Fig. 2B). Parasites overexpressing ABCI4<sup>K/M</sup> present a similar accumulation and efflux to control parasites (Fig. 2B). In contrast, the accumulation/efflux of pheophorbide A did not differ between the *Leishmania* lines (data not shown), thus supporting the sensitivity studies and suggesting that pheophorbide A does not interact with ABCI4.

**Involvement of thiol in ABCI4-mediated drug resistance.** An increase in thiol levels has been considered to be one of the main detoxification mechanisms observed in *Leishmania* lines selected for resistance to Sb(III) (23). In light of this, we determined the drug sensitivity profile for *L. major* lines overexpressing ABCI4 in the presence of BSO (a γ-glutamylcysteine synthetase inhibitor). After incubation with BSO (3 mM) for 48 h, *Leishmania* parasites presented a decrease in thiol levels, as measured by flow cytometry using CellTracker (data not shown). The drug sensitivity profile for *Leishmania* lines treated with BSO showed a significant decrease in the EC<sub>50</sub>s for Sb(III) and Cd(II), with higher rates in parasites overexpressing ABCI4 than ABCI4<sup>K/M</sup> or control (Table 3). Consequently, the Sb(III) and Cd(II) resistance of *L. major* overexpressing ABCI4 is associated with the thiol levels in the



**FIG 2** Time-dependent accumulation and efflux of Sb(III), Cd(II), and ZnMP in *Leishmania* lines. (A) *L. major* pXG (control; ◆), overexpressing ABC14 (■) and ABC14<sup>K/M</sup> (▲) were incubated with 100  $\mu$ M Sb(III) (upper left graphic) or Cd(II) (upper right graphic), and samples were taken at different time points as described in Materials and Methods. Antimony accumulation was measured by ICP-MS. For Cd(II) accumulation, samples were taken at different time points, mixed with Leadmium Green, and the fluorescence determined (upper right graphic) as described in Materials and Methods. The efflux assay was performed after incubation of *Leishmania* lines with compensated concentrations of Sb(III) (lower left graphic) or Cd(II) (lower right graphic) for 1 h to ensure similar labeling in the different lines. The parasites were then washed and resuspended in PBS buffer without Sb(III) or Cd(II) and pelleted at different time points. (B) Promastigotes of *L. major* lines pXG (control; black histogram), ABC14 (gray histogram), and ABC14<sup>K/M</sup> (white histogram) were incubated with 10  $\mu$ M ZnMP for 10 min at 28°C, as described in Materials and Methods (left graphic). Relative fluorescence units (RFU). The efflux assay was performed in *L. major* lines loaded with different compensated ZnMP concentrations in order to ensure similar labeling, as described in Materials and Methods (right graphic). In both graphics, the accumulated fluorescence at different time points was measured by flow cytometry using a FACS Aria Cell Sorter III. The data are the means  $\pm$  SD of three independent experiments. Significant differences versus the control line were determined by using the Student *t* test (\*,  $P < 0.01$ ).

parasites, probably due to the ability of the transporter to efflux thiol-conjugated complexes.

Since both conjugation and extrusion of thiol adducts of Sb(III) are required for resistance to antimonials (23), we analyzed the non-protein thiol efflux in *L. major* lines using ThioStar. In the presence of Sb(III), *L. major* lines overexpressing ABC14 showed significantly higher thiol efflux levels than control and

mutant lines (Fig. 3A). As expected, no differences in thiol efflux levels were observed in the absence of Sb(III) (Fig. 3B). However, we found that in parasites overexpressing ABC14, the efflux of ZnMP in *Leishmania* lines is not thiol-dependent (data not shown). As a result, we suggest that ABC14 confers resistance to Sb(III) via an efflux of Sb(III)-thiol complex and that this transporter could be considered to be a potential thiol-X-pump.



TABLE 3 Metal sensitivity profile of *L. major* lines in the presence of BSO<sup>a</sup>

Compound	Mean EC <sub>50</sub> (μM) ± SD [EC <sub>50</sub> decrease] <sup>b</sup>		
	pXG	ABCI4	ABCI4 <sup>K/M</sup>
Sb(III)	20.87 ± 1.80	53.74 ± 3.35	21.16 ± 3.60
Sb(III) + BSO <sup>c</sup>	9.28 ± 0.48 [2.2]*	15.30 ± 1.23 [3.6]*	11.48 ± 0.96 [1.9]*
Cd(II)	42.36 ± 4.12	82.55 ± 8.84	40.96 ± 2.30
Cd(II) + BSO	6.30 ± 0.23 [6.7]*	6.85 ± 0.45 [13.7]*	6.36 ± 0.37 [6.4]*

<sup>a</sup> Parasites were grown as described in Materials and Methods for 72 h at 28°C in the presence of increasing concentrations of drugs. Cell viability was determined by using an MTT-based assay. Data are means from three independent experiments. Significant differences were determined by the Student *t* test (\*, *P* < 0.01).

<sup>b</sup> The EC<sub>50</sub> decrease, indicated between brackets, was calculated by dividing the EC<sub>50</sub>s after metal treatment by that for metal plus BSO in each *Leishmania* line.

<sup>c</sup> 3 mM BSO (a γ-glutamylcysteine synthetase inhibitor) was added to the culture medium 48 h before the sensitivity experiment.

**ATP and ΔΨ<sub>m</sub> levels in *Leishmania* lines overexpressing ABCI4.** It has previously been reported that antimony induces mitochondrial dysfunction in *Leishmania*, as demonstrated by a decrease in ΔΨ<sub>m</sub> and ATP loss (41). As a result, we determined whether ABCI4 overexpression confers a protective effect against antimony-induced mitochondrial dysfunction in *Leishmania* parasites. A decrease in ΔΨ<sub>m</sub> was observed within the first 360 min post-Sb(III) exposure in both control and ABCI4<sup>K/M</sup> lines (Fig. 4A); however, ΔΨ<sub>m</sub> was altered to a lesser extent after Sb(III) exposure in parasites overexpressing ABCI4 (Fig. 4A).

Since ΔΨ<sub>m</sub> is essential for mitochondrial ATP synthesis, its variation with Sb(III) exposure was monitored in *Leishmania* lines. Thus, although a progressive decrease in ATP levels was observed after Sb(III) treatment (Fig. 4B), parasites overexpressing ABCI4 maintained significantly higher ATP values than control and ABCI4<sup>K/M</sup> parasites (Fig. 4B). The above data therefore provide clear evidence for the ability of ABCI4 to protect against the mitochondrial toxicity of antimony as manifested by the maintenance of ΔΨ<sub>m</sub> and ATP levels, probably through reduction of antimony accumulation.

**ROS production induced by Sb(III) exposure in *Leishmania* lines.** The decrease of ΔΨ<sub>m</sub> induced in *Leishmania* by a variety of drug treatments, including antimonials (42), has been associated with ROS production, which induces damage to the components of the electron transport chain, disrupts mitochondrial function, decreases cellular ATP levels, and produces cell death. We therefore explored the ability of ABCI4 to protect parasites from ROS production after treatment with Sb(III). ROS levels were measured using the cell-permeable probes H<sub>2</sub>DCFDA and MitoSOX Red, the latter of which selectively targets mitochondria. After treatment with Sb(III) for 48 h, it was observed that ROS generation increased significantly with Sb(III) concentration, in a time-dependent manner, at both cytosolic and mitochondrial levels (Fig. 4C and D). The results showed that *Leishmania* line overexpressing ABCI4 generated lower ROS levels than control and mutant lines (Fig. 4C and D), probably due to a decreased intracellular accumulation of Sb(III). Remarkably, ROS generation occurred 48 h after treatment with Sb(III), whereas a marked decrease in ΔΨ<sub>m</sub> was observed at 60 min (Fig. 4A), thus showing that the Sb(III)-induced ROS increase is a postmitochondrial event that is significantly reduced by ABCI4 overexpression.

**Infectivity and surveillance of *Leishmania* lines in mouse peritoneal macrophages.** We analyzed whether ABCI4 overex-

pression confers an advantage in terms of the survival ability of intracellular amastigotes of *Leishmania*. Specifically, we determined the capacity of *Leishmania* lines to maintain their infectivity and intracellular replication in mouse peritoneal macrophages after 72 h postinfection, as a measure of the ability to resist stress conditions encountered inside the host mammalian cells. Thus, mouse peritoneal macrophages were infected and the infection index evaluated at 24 and 72 h postinfection to assess their infectivity and the mean number of amastigotes per infected macrophage. In the early stages of infection (24 h postinfection), the different *Leishmania* lines showed a similar percentage of infection in macrophages (Fig. 5A); similarly, no statistically significant differences were observed in the percentage of infection after 72 h of infection (Fig. 5A). In addition, the study of the ability of intracellular amastigotes to replicate inside the host peritoneal macrophages showed an increased replication of *Leishmania* lines overexpressing ABCI4 versus control and ABCI4<sup>K/M</sup> parasites after 72 h of infection (Fig. 5B). Consequently, these results lead to the conclusion that *Leishmania* lines overexpressing ABCI4 are better able to survive inside host mammalian cells than the other *Leishmania* lines, although the impact of ABCI4 overexpression on the biological fitness of these parasites still needs to be explored.

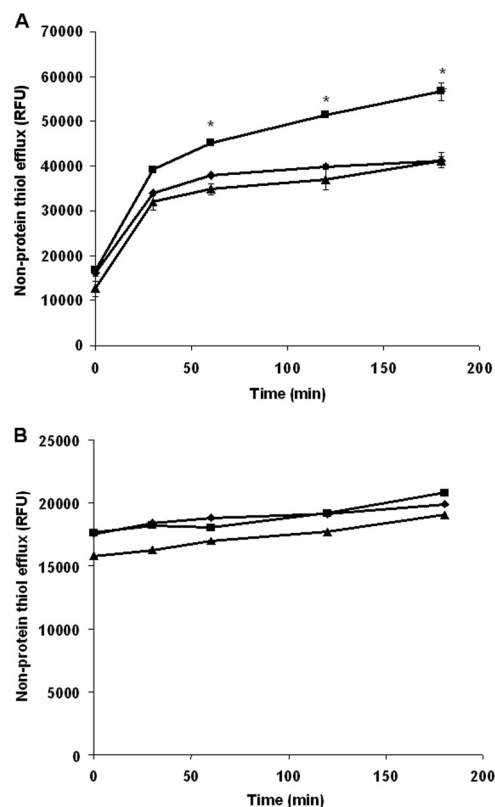
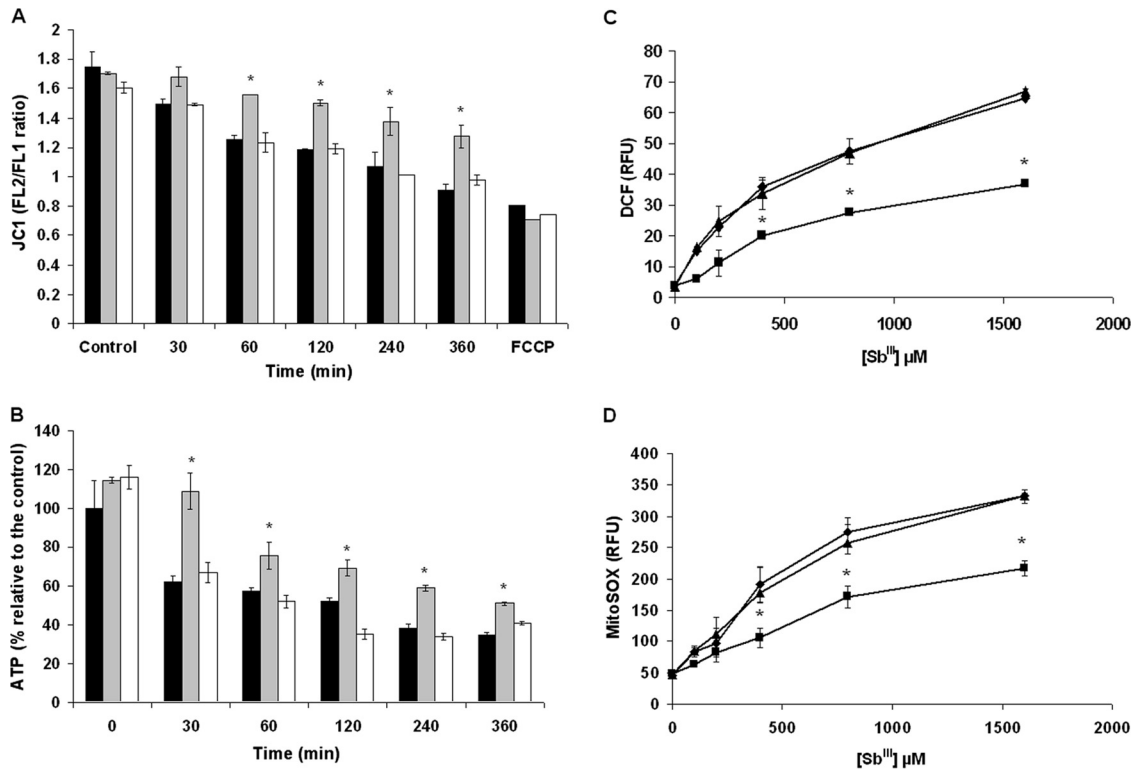


FIG 3 Nonprotein thiol efflux in *Leishmania* lines. *L. major* lines pXG (control; ◆), ABCI4 (■), and ABCI4<sup>K/M</sup> (▲) were incubated with (A) or without (B) 100 μM Sb(III) for 1 h. The promastigotes were then washed with PBS, and the supernatants processed at different time points, as described in Materials and Methods. Sample fluorescence (excitation, 380 nm; emission, 510 nm) was collected using an Infinite F200 luminescence system (Tecan Austria GmbH) and expressed as relative fluorescence units (RFU). The data are the means ± the standard deviation (SD) of three independent experiments. Significant differences versus the control line (\*, *P* < 0.01) were determined by using the Student *t* test.



**FIG 4** Changes of  $\Delta\Psi_m$ , ATP, and ROS generation in *Leishmania* lines exposed to Sb(III). *L. major* lines pXG (control; black histograms), ABCI4 (gray histograms), and ABCI4<sup>K/M</sup> (white histograms) were preincubated with 100  $\mu\text{M}$  Sb(III) for different times (30, 60, 120, 240, and 360 min) and then incubated with 5  $\mu\text{M}$  JC1 for 10 min for  $\Delta\Psi_m$  determination (A) or mixed with the same volume of CellTiter-Glo (Promega) for ATP measurement (B), as described in Materials and Methods. The FL2/FL1 fluorescence ratio was measured by flow cytometric analysis. Parasites were pretreated with 10  $\mu\text{M}$  FCCP for depolarization control. Intracellular ROS levels were measured using the fluorescent probes H<sub>2</sub>DCFDA (C) and MitoSOX Red (D). *L. major* lines pXG (controls;  $\blacklozenge$ ) and overexpressing ABCI4 ( $\blacksquare$ ) and ABCI4<sup>K/M</sup> ( $\blacktriangle$ ) were incubated with different concentrations of Sb(III), as described in Materials and Methods. (C) After Sb(III) treatment, parasites were incubated with 40 nM H<sub>2</sub>DCFDA for 30 min at 28°C. (D) Prior to the addition of Sb(III), parasites were incubated with 5  $\mu\text{M}$  MitoSOX for 2 h at 28°C. The fluorescence intensity was determined by flow cytometric analysis and expressed as relative fluorescence units (RFU). The data are the means  $\pm$  the SD of at least three independent experiments. Significant differences versus the control line were determined by using the Student *t* test (\*,  $P < 0.01$ ).

## DISCUSSION

ABC transporters are one of the most intriguing protein families and are of considerable medical significance. However, although eight subfamilies (ABCA to ABCH) (25) have been identified since the first ABC transporter, which is involved in drug resistance, was described in *Leishmania* (43), only a limited amount of information regarding the functionality of these proteins has been obtained, mainly as regards drug resistance and lipid/heme trafficking (17, 38). In addition, the family of ABC transporters in *Leishmania* contains an unclassified group of proteins termed as “others” that includes four different transporters with no homology with other eukaryotic ABC proteins, but with orthologues in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* (15). We are interested in the functional characterization of this divergent and unclassified group of transporters specific to trypanosomatids and absent in eukaryotic cells. The group “others” includes four different genes, which we have named ABCI1 (LmjF12.1190), ABCI2 (LmjF32.2060), ABCI3 (LmjF33.3040), and ABCI4 (LmjF33.3260), all of which code for half-transporters with a variable topological disposition of the NBD and TMD but with a common requirement to form homo-/heterodimers in order to be functionally active proteins.

We describe here the characterization of ABCI4, a new *Leishmania* ABC half-transporter with an unusual structure bearing the highly conserved NBD at the COOH terminus and TMD at the

NH<sub>2</sub> terminus. Coimmunoprecipitation experiments suggest that ABCI4 homodimerizes, although we cannot discard the possibility that it forms heterodimers.

We have determined that ABCI4 has a dual localization in both mitochondria and the PM of *Leishmania*. Somewhat surprisingly, a similar dual localization has previously been described for human ABCB6, which localizes in both the mitochondria and the PM, thereby contributing to a decreased cellular accumulation of pheophorbide A and hemin (44). Similarly, human ABCG2 has been reported to be distributed in both the PM and in intracellular organelles, including mitochondria, where it regulates ALA-mediated protoporphyrin IX levels via export from mitochondria to the cytosol (45).

We decided to investigate the functionality of ABCI4 by studying the overexpression of this transporter in *Leishmania* parasites. Interestingly, we found evidence for the antimony transport activity of ABCI4 in *Leishmania*. Thus, parasites overexpressing ABCI4 were found to be resistant to antimony as well as to other metal ions such as As(III), Cd(II), and Pb(II), suggesting that heavy metals are potential substrates for this transporter.

In addition, ABCI4 overexpression confers resistance to ZPP, a validated fluorescent heme analog transported by ABCG2 (46). Similarly, the resistance to antimonials [Sb(III)] was found to be due to a lower accumulation as a consequence of an increased

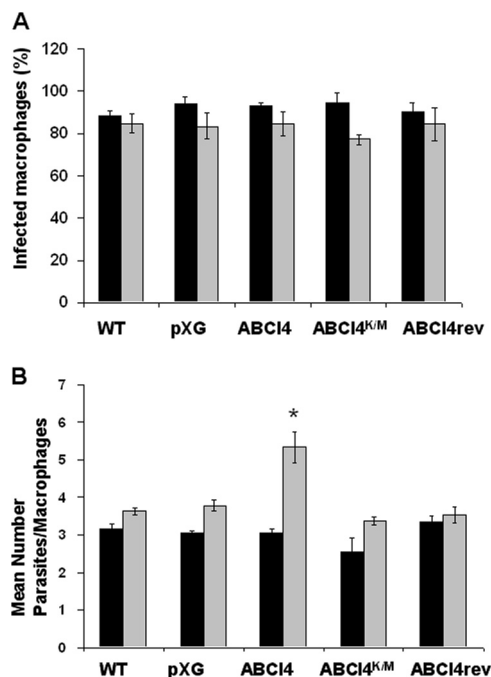


FIG 5 Infectivity and surveillance of *Leishmania* lines in mouse peritoneal macrophages. Infection of mouse peritoneal macrophages with stationary wild-type (WT), pXG (control), ABCI4, ABCI4<sup>KM</sup>, and reverted (ABCI4<sup>rev</sup>) *Leishmania* lines using a macrophage/parasite ratio of 1:5 was performed as described in Materials and Methods. The percentage of infected macrophages (A) and the mean number of parasites per macrophage (B) were determined 24 h (black histograms) and 72 h (gray histograms) postinfection. The data are the means  $\pm$  the SD of three independent experiments. Significant differences versus the control line were determined by using the Student *t* test (\*,  $P < 0.01$  versus respective control).

ABCI4-mediated Sb(III) efflux activity; similar observations were obtained for Cd(II). Since ABCI4 has a significant ability to efflux thiol-conjugated complexes, our results suggest that ABCI4 confers resistance to Sb(III) through an efflux of Sb(III)-thiol complexes. Consequently, the ABCI4 transporter could be considered to be a thiol-X-pump that is able to recognize thiol-conjugated metals. Furthermore, our findings indicate that the ABCI4 localized in the mitochondria is functionally active and may contribute to the traffic of porphyrins as parasites overexpressing ABCI4 are resistant to ZPP, a heme analog, and present a lower accumulation of fluorescent ZnMP due to a significant efflux. In this context, it has previously been described that ABC transporters in mitochondria play important roles in the intracellular traffic of heme and various protoporphyrin intermediates of heme synthesis (47). By analogy, the *Leishmania* ABCC3 (also known as PGPA or MRPA), which is located in the intracellular vesicular membrane close to the flagellar pocket, has been described to be involved in arsenite and antimonial resistance in *Leishmania*, although it was initially detected in DNA amplicons (H-circles) of methotrexate-resistant promastigotes (18, 48). The overexpression of MRPA has been described to confer resistance to Sb(III) with an EC<sub>50</sub> ~2-fold increase (19); these results are analogous to the observed in parasites overexpressing ABCI4. In addition, the overexpression of MRPA in combination with other proteins such as  $\gamma$ -glutamylcysteine synthase, increase the resistance index to Sb(III) ~15-fold (18). These results support that antimony resistance is a multifac-

torial process that require the combination of different mechanisms to increase the level of resistance. The high levels of ABCC3-mediated arsenite and antimony resistance in *Leishmania* are associated with the sequestering of metal-thiol conjugates into the intracellular vesicles (18). These conjugates may then move outside the cell by exocytosis, which occurs exclusively through the flagellar pocket, or may be extruded directly outside the cell by a PM thiol-X-efflux pump. Here, the influence of thiol levels on ABCI4-mediated antimonial resistance was confirmed from the decrease in the drug sensitivity profile in *Leishmania* lines after treatment with BSO and by the ability of this transporter to efflux thiol-conjugated complexes in the presence of Sb(III). We therefore consider that ABCI4 confers resistance to Sb(III) by effluxing an Sb(III)-thiol complex, thereby suggesting that this transporter could be considered to be a putative thiol-X-pump.

Several ABC transporters other than ABCC3 also appear to confer metal resistance by sequestration (49). Thus, the yeast ABC transporter HMT1 confers cadmium tolerance by sequestering phytochelatin (a glutathione-like molecule) cadmium complexes in the fission yeast vacuole (50). Similarly, the yeast ABC transporter YCF1 confers cadmium and arsenite resistance by the vacuolar accumulation of metal-glutathione complexes (51), a mechanism that bears a strong resemblance to the MRP1-encoded transporter found in mammalian cells.

The efflux of Sb(III)-thiol complex observed in the *Leishmania* line overexpressing ABCI4 was supported by the decrease in mitochondrial toxicity of antimony, as determined by the maintenance of  $\Delta\Psi_m$  and ATP levels, as well as by the lower ROS production at both a cytosolic and a mitochondrial level.

*Leishmania* parasites are able to survive in macrophages, which provide a hostile environment due to the production and intracellular release of ROS, among other species. *Leishmania* survives and replicates by inhibiting the oxidative burst or increasing antioxidant protection (52). Interestingly, we have observed that the *Leishmania* line overexpressing ABCI4 has a better survival inside mouse peritoneal macrophages than the other parasite lines, as determined by the significantly higher replication at 72 h postinfection. Although the mechanism underlying this increased survival capacity is unknown, we suggest that ABCI4 may be able to transport unidentified substrates associated with detoxification mechanisms.

As described previously, Sb(III) resistance is a multifactorial process (22), with differences in the expression level of the known proteins involved in the resistance depending on the resistant line studied, supporting the heterogeneity among drug-resistant parasites (6). Omics techniques, including high-throughput sequencing technologies and mass spectrometry, have been used to screen the whole genome, transcriptome, and metabolome for detection of molecular adaptations to antimony resistance in *Leishmania*; however, not all changes in expression levels of proteins involved in Sb(III) resistance are detected in all *Leishmania* clones resistant to Sb(III), explaining the fail of these techniques to detect that ABCI4 is involved in antimony resistance.

In conclusion, overexpression of ABCI4 in the PM may help to protect cells against the toxic effects of antimony and other compounds by efflux as conjugated thiol complexes. In addition, ABCI4 overexpression in mitochondria decreases the toxicity and accumulation of antimony and porphyrins, probably through efflux of these compounds to the cytosol. Future work should lead to the obtention of null mutants for ABCI4 that could potentially



be used to understand the role of ABCI4 in *Leishmania*, and to determine whether clinical antimony-resistant *Leishmania* lines overexpress this transporter.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Spanish grants SAF2012-34267 (to F.G.) and SAF2011-28102 (to S.C.), by the Plan Andaluz de Investigación (Cod. BIO130), and by FEDER funds from the EU to F.G. and S.C.

We thank Stephen M. Beverley (Washington University School of Medicine) for providing the vectors pXG-GFP+2' and pXG-GFP+ used throughout this research work. We are grateful to José M. Pérez-Victoria for his valuable comments on the manuscript.

## REFERENCES

- Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7:e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671.
- Sundar S. 2001. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health* 6:849–854.
- Olliaro PL. 2010. Drug combinations for visceral leishmaniasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 23:595–602.
- García-Hernández R, Manzano JI, Castanys S, Gamarro F. 2012. *Leishmania donovani* develops resistance to drug combinations. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1974. doi:10.1371/journal.pntd.0001974.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* 19:111–126.
- Decuyper S, Vanaerschoot M, Bruncker K, Imamura H, Muller S, Khanal B, Rijal S, Dujardin JC, Coombs GH. 2012. Molecular mechanisms of drug resistance in natural *Leishmania* populations vary with genetic background. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1514. doi:10.1371/journal.pntd.0001514.
- Brochu C, Wang J, Roy G, Messier N, Wang XY, Saravia NG, Ouellette M. 2003. Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47:3073–3079.
- Dey S, Papadopoulos B, Haimeur A, Roy G, Grondin K, Dou D, Rosen BP, Ouellette M. 1994. High level arsenite resistance in *Leishmania tarentolae* is mediated by an active extrusion system. *Mol. Biochem. Parasitol.* 67:49–57.
- Higgins CF. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8:67–113.
- Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulos B. 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist. Update* 7:257–266.
- Perez-Victoria JM, Perez-Victoria FJ, Parodi-Talice A, Jimenez IA, Ravelo AG, Castanys S, Gamarro F. 2001. Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2468–2474.
- Coelho AC, Beverley SM, Cotrim PC. 2003. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 130: 83–90.
- Castanys-Munoz E, Perez-Victoria JM, Gamarro F, Castanys S. 2008. Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite *Leishmania* with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:3573–3579.
- Bates SE, Robey R, Miyake K, Rao K, Ross DD, Litman T. 2001. The role of half-transporters in multidrug resistance. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33: 503–511.
- Leprohon P, Legare D, Girard I, Papadopoulos B, Ouellette M. 2006. Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryot. Cell* 5:1713–1725.
- Perez-Victoria JM, Parodi-Talice A, Torres C, Gamarro F, Castanys S. 2001. ABC transporters in the protozoan parasite *Leishmania*. *Int. Microbiol.* 4:159–166.
- Coelho AC, Cotrim PC. 2013. The role of ABC transporters in drug-resistant *Leishmania*, p 237–258. In Ponte-Sucre A, Padrón-Nieves EDM (ed), *Drug resistance in leishmania parasites*. Springer-Verlag, Vienna, Austria.
- Légaré D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof YD, Rosen BP, Haimeur A, Papadopoulos B, Ouellette M. 2001. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J. Biol. Chem.* 276:26301–26307.
- El Fadili K, Messier N, Leprohon P, Roy G, Guimond C, Trudel N, Saravia NG, Papadopoulos B, Legare D, Ouellette M. 2005. Role of the ABC transporter MRP1 (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49:1988–1993.
- Dey S, Ouellette M, Lightbody J, Papadopoulos B, Rosen BP. 1996. An ATP-dependent As(III)-glutathione transport system in membrane vesicles of *Leishmania tarentolae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93:2192–2197.
- Haimeur A, Guimond C, Pilote S, Mukhopadhyay R, Rosen BP, Poulin R, Ouellette M. 1999. Elevated levels of polyamines and trypanothione resulting from overexpression of the ornithine decarboxylase gene in arsenite-resistant *Leishmania*. *Mol. Microbiol.* 34:726–735.
- Leprohon P, Legare D, Ouellette M. 2009. Intracellular localization of the ABC proteins of *Leishmania* and their role in resistance to antimonials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:2646–2649.
- Mukhopadhyay R, Dey S, Xu N, Gage D, Lightbody J, Ouellette M, Rosen BP. 1996. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 10383–10387.
- Mukherjee A, Padmanabhan PK, Singh S, Roy G, Girard I, Chatterjee M, Ouellette M, Madhubala R. 2007. Role of ABC transporter MRP1, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.* 59:204–211.
- Mandal G, Wyllie S, Singh N, Sundar S, Fairlamb AH, Chatterjee M. 2007. Increased levels of thiols protect antimony unresponsive *Leishmania donovani* field isolates against reactive oxygen species generated by trivalent antimony. *Parasitology* 134:1679–1687.
- Coelho AC, Messier N, Ouellette M, Cotrim PC. 2007. Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania* amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3030–3032.
- Coelho AC, Gentil LG, JF da Silveira Cotrim PC. 2008. Characterization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine. *Exp. Parasitol.* 120:98–102.
- Manzano JI, Carvalho L, Perez-Victoria JM, Castanys S, Gamarro F. 2011. Increased glycolytic ATP synthesis is associated with tafenoquine resistance in *Leishmania major*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:1045–1052.
- Ha DS, Schwarz JK, Turco SJ, Beverley SM. 1996. Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77:57–64.
- Perez-Victoria FJ, Gamarro F, Ouellette M, Castanys S. 2003. Functional cloning of the miltefosine transporter: a novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J. Biol. Chem.* 278:49965–49971.
- Kennedy ML, Cortes-Selva F, Perez-Victoria JM, Jimenez IA, Gonzalez AG, Munoz OM, Gamarro F, Castanys S, Ravelo AG. 2001. Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *J. Med. Chem.* 44:4668–4676.
- Sanchez-Canete MP, Carvalho L, Perez-Victoria FJ, Gamarro F, Castanys S. 2009. Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:1305–1313.
- Mahto SK, Yoon TH, Rhee SW. 2010. A new perspective on in vitro assessment method for evaluating quantum dot toxicity by using microfluidics technology. *Biomicrofluidics* 4:3.
- Robey RW, Steadman K, Polgar O, Morisaki K, Blayney M, Mistry P, Bates SE. 2004. Pheophorbide, a is a specific probe for ABCG2 function and inhibition. *Cancer Res.* 64:1242–1246.
- Sarkar A, Mandal G, Singh N, Sundar S, Chatterjee M. 2009. Flow cytometric determination of intracellular non-protein thiols in *Leishmania* promastigotes using 5-chloromethyl fluorescein diacetate. *Exp. Parasitol.* 122:299–305.
- Goemann IM, Gereben B, Harney JW, Zhu B, Maia AL, Larsen PR. 2010. Substitution of serine for proline in the active center of type 2 iodothyronine deiodinase substantially alters its in vitro biochemical properties with dithiothreitol but not its function in intact cells. *Endocrinology* 151:821–829.
- Moreira W, Leprohon P, Ouellette M. 2011. Tolerance to drug-induced

- cell death favours the acquisition of multidrug resistance in *Leishmania*. *Cell Death Dis.* 2:e201.
38. Campos-Salinas J, Cabello-Donayre M, Garcia-Hernandez R, Perez-Victoria I, Castans S, Gamarro F, Perez-Victoria JM. 2011. A new ATP-binding cassette protein is involved in intracellular haem trafficking in *Leishmania*. *Mol. Microbiol.* 79:1430–1444.
  39. Ozvegy C, Varadi A, Sarkadi B. 2002. Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter: modulation of substrate specificity by a point mutation. *J. Biol. Chem.* 277:47980–47990.
  40. Henriksen U, Gether U, Litman T. 2005. Effect of Walker A mutation (K86M) on oligomerization and surface targeting of the multidrug resistance transporter ABCG2. *J. Cell Sci.* 118:1417–1426.
  41. Mehta A, Shaha C. 2006. Mechanism of metalloid-induced death in *Leishmania* spp.: role of iron, reactive oxygen species, Ca<sup>2+</sup>, and glutathione. *Free Radic. Biol. Med.* 40:1857–1868.
  42. Sudhandiran G, Shaha C. 2003. Antimonial-induced increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J. Biol. Chem.* 278:25120–25132.
  43. Ouellette M, Fase-Fowler F, Borst P. 1990. The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. *EMBO J.* 9:1027–1033.
  44. Paterson JK, Shukla S, Black CM, Tachiwada T, Garfield S, Wincovitch S, Ernst DN, Agadir A, Li X, Ambudkar SV, Szakacs G, Akiyama S, Gottesman MM. 2007. Human ABCB6 localizes to both the outer mitochondrial membrane and the plasma membrane. *Biochemistry* 46:9443–9452.
  45. Kobuchi H, Moriya K, Ogino T, Fujita H, Inoue K, Shuin T, Yasuda T, Utsumi K, Utsumi T. 2012. Mitochondrial localization of ABC transporter ABCG2 and its function in 5-aminolevulinic acid-mediated protoporphyrin IX accumulation. *PLoS One* 7:e50082. doi:10.1371/journal.pone.0050082.
  46. Desuzinges-Mandon E, Arnaud O, Martinez L, Huche F, Di Pietro A, Falson P. 2010. ABCG2 transports and transfers heme to albumin through its large extracellular loop. *J. Biol. Chem.* 285:33123–33133.
  47. Zutz A, Gompf S, Schagger H, Tampe R. 2009. Mitochondrial ABC proteins in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1787:681–690.
  48. Callahan HL, Beverley SM. 1991. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* 266:18427–18430.
  49. Ishikawa T, Li ZS, Lu YP, Rea PA. 1997. The GS-X pump in plant, yeast, and animal cells: structure, function, and gene expression. *Biosci. Rep.* 17:189–207.
  50. Ortiz DF, Ruscitti T, McCue KF, Ow DW. 1995. Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J. Biol. Chem.* 270:4721–4728.
  51. Li ZS, Szczypka M, Lu YP, Thiele DJ, Rea PA. 1996. The yeast cadmium factor protein (YCF1) is a vacuolar glutathione S-conjugate pump. *J. Biol. Chem.* 271:6509–6517.
  52. Van Assche T, Deschacht M, RA da Luz Maes L, Cos P. 2011. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic. Biol. Med.* 51:337–351.
  53. Verrier PJ, Bird D, Burla B, Dassa E, Forestier C, Geisler M, Klein M, Kolukisaoglu U, Lee Y, Martinoia E, Murphy A, Rea PA, Samuels L, Schulz B, Spalding EJ, Yazaki K, Theodoulou FL. 2008. Plant ABC proteins—a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci.* 13:151–159.

## **ANEXO 2**

**Identification of specific reversal agents for *Leishmania* ABCI4-mediated antimony resistance by flavonoid and trolox derivative screening.**

**Journal of Antimicrobial Chemotherapy; 14 Octubre 2013 *In press***

José Ignacio Manzano, Florine Lecerf-Schmidt, Marie-Ange Lespinasse, Attilio Di Pietro, Santiago Castanys, Ahcène Boumendjel y Francisco Gamarro.

**Objetivos:** Identificar agentes revertidores para el transportador de *Leishmania* ABCI4 que confiere resistencia a antimonio.

**Métodos:** Potenciales inhibidores de ABCI4 de una serie de 15 derivados o análogos de flavonoides y trolox se ensayaron evaluando su capacidad de revertir la resistencia a antimonio en parásitos de *Leishmania* que sobreexpresaban ABCI4. Entre los compuestos ensayados, N-etiltrolox carboxamida (compuesto D2) produjo la mayor actividad revertidora. Con objeto de optimizar la actividad de D2, sintetizamos una serie de 10 derivados mediante la condensación de varias aminas con trolox.

**Resultados:** El análisis de la actividad revertidora de la resistencia a antimonio mostró que el N-propiltrolox carboxamida (compuesto D4) fue el inhibidor más potente, con una actividad revertidora que se mantenía en la fase amastigota intracelular. Además, los derivados de trolox revertían significativamente la resistencia a zinc-protoporfirina. El mecanismo de acción de estos derivados se encuentra relacionado con una significativa reversión en la acumulación de Sb (III) y zinc-protoporfirina y en el descenso en el eflujo de los fármacos.

**Conclusiones:** Nuestros hallazgos sugieren que los derivados de trolox D2 y D4 podrían ser considerados agentes revertidores específicos del transportador ABCI4 de *Leishmania*. La relación estructura-actividad obtenida del presente estudio remarca la importancia del tamaño y longitud del sustituyente alquilo

unido a trolox. Además, los datos estructurales obtenidos proporcionan una valiosa información para el desarrollo de nuevos revertidores del transportador ABCI4 más específicos y potentes.

## Identification of specific reversal agents for *Leishmania* ABCI4-mediated antimony resistance by flavonoid and trolox derivative screening

José Ignacio Manzano<sup>1</sup>, Florine Lecerf-Schmidt<sup>2</sup>, Marie-Ange Lespinasse<sup>2</sup>, Attilio Di Pietro<sup>3</sup>, Santiago Castanys<sup>1†</sup>, Ahcène Boumendjel<sup>2†</sup> and Francisco Gamarro<sup>1\*†</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina 'López-Neyra', IPBLN-CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avda. del Conocimiento s/n, 18016 Armilla, Granada, Spain; <sup>2</sup>Département de Pharmaco-chimie Moléculaire, Université Joseph Fourier, Grenoble 1, CNRS UMR 5063, Grenoble, France; <sup>3</sup>Equipe Labellisée Ligue 2013, BMSSI, UMR 5086 CNRS-Université Lyon 1, IBCP, 7, Passage du Vercors, 69367 Lyon cedex 07, France

\*Corresponding author. Tel: +34-958-181667; Fax: +34-958-181632; E-mail: gamarro@ipb.csic.es  
†Equal senior investigators in this study.

Received 27 June 2013; returned 16 August 2013; revised 10 September 2013; accepted 15 September 2013

**Objectives:** To identify reversal agents for the *Leishmania* ABCI4 transporter that confers resistance to antimony.

**Methods:** Selective ABCI4 inhibitors among a series of 15 flavonoid and trolox derivatives or analogues were investigated by evaluating their ability to reverse antimony resistance in *Leishmania* parasites overexpressing ABCI4. Among the compounds screened, *N*-ethyltrolox carboxamide (compound D2) produced the highest reversal activity. In order to optimize the activity of D2, we synthesized a series of 10 derivatives by condensation of various amines with trolox.

**Results:** Analysis of antimony resistance reversal activity showed that *N*-propyltrolox carboxamide (compound D4) was the most potent ABCI4 inhibitor, with reversal activity being maintained in the intracellular amastigote stage. In addition, trolox derivatives significantly reverted the resistance to zinc protoporphyrin. The mechanism of action of these active derivatives was found to be related to significant reversion of Sb<sup>III</sup> and zinc protoporphyrin accumulation and to a decrease in drug efflux.

**Conclusions:** Our findings suggest that trolox derivatives D2 and D4 could be considered to be specific reversal agents targeting the *Leishmania* ABCI4 transporter. The structure–activity relationship obtained in the present study highlights the importance of the size and length of the alkyl substituent linked to trolox. Furthermore, the structural data obtained provide valuable information for the further development of new, even more specific and potent *Leishmania* ABCI4 reversal agents.

**Keywords:** ABC transporters, flavonoid derivatives, trolox derivatives, drug efflux

### Introduction

Leishmaniasis is a neglected tropical parasitic disease caused by protozoan parasites belonging to the genus *Leishmania* and is prevalent in 98 countries.<sup>1</sup> The estimated annual incidence of this disease is 0.2–0.4 million cases of visceral leishmaniasis and 0.7–1.2 million cases of the cutaneous form.<sup>1</sup> Although chemotherapy is the only current treatment option for leishmaniasis, its efficacy is increasingly limited by growing resistance to first-line drugs, especially antimonials, the frequent side effects associated with their use and the high cost of treatment.<sup>1,2</sup> One mechanism of resistance to antimony in *Leishmania* involves a reduction in its accumulation, by either reduced uptake or increased efflux, with the latter being mediated by the ABC transporter LABCC3 (also known

as PGPA or MRPA).<sup>3,4</sup> ABC transporters constitute one of the largest families of proteins ever described and as such play a broad variety of physiological roles with major medical consequences. These proteins are evolutionarily highly conserved, they are present in different species, ranging from prokaryotes to humans, and they use the energy provided by ATP hydrolysis to transport different compounds, including a variety of leishmanicidal agents, such as antimonials,<sup>5</sup> miltefosine,<sup>6</sup> pentamidine<sup>7</sup> and sitamaquine,<sup>8</sup> across biological membranes.

The *Leishmania* genome contains 42 ABC genes, with representative members from every subfamily (from ABCA to ABCH) commonly found in eukaryotes.<sup>9</sup> Several modulators, such as calcium channel blockers (verapamil),<sup>10</sup> calmodulin antagonists (phenothiazine derivatives),<sup>11</sup> statins (lovastatin),<sup>12</sup> pyridine analogues



(PAK-104P),<sup>11</sup> sulfonylurea derivatives (glibenclamide)<sup>13</sup> and acridonecarboxamide derivatives (elacridar and zosuquidar),<sup>14</sup> have been proposed to experimentally revert ABC transporter-mediated resistance in *Leishmania*. Additionally, natural compounds such as dihydro- $\beta$ -agarofuran sesquiterpenes have been considered to be promising reversal agents for the multidrug-resistant phenotype in *Leishmania* mediated by overexpression of the ABCB subfamily member P-glycoprotein-like transporter.<sup>15,16</sup> The oral leishmanicidal drug sitamaquine has been shown to be effective in overcoming miltefosine and antimony resistance in *Leishmania* mediated by overexpression of P-glycoprotein and LABCA3, respectively.<sup>17</sup>

The family of ABC transporters in *Leishmania* contains an unclassified group of proteins, termed 'others', that includes four distinct transporters with no known homology with other eukaryotic ABC proteins, but with orthologues in *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*.<sup>9</sup> One member of this group, namely ABCI4, is located in the plasma membrane and mitochondria and pumps out antimony and other heavy metals as conjugated thiol complexes, as well as some toxic porphyrins [such as zinc protoporphyrin (ZPP)].<sup>18</sup>

In order to identify efficient and safe reversal agents for the ABCI4 transporter in *Leishmania*, we focused our efforts on inhibitors having, amongst other requirements, low toxicity for mammalian cells and, if possible, specific leishmanicidal effects. We initially concentrated our search on flavonoid derivatives since a literature survey revealed this class of compounds to be pharmacophores of interest due to their ability to act as ABC transporter reversal agents that confer resistance to chemotherapeutics. We have previously reported that aurones, a subclass of flavonoids, are able to bind and inhibit the ABC transporter P-glycoprotein.<sup>19</sup> Furthermore, isoflavone analogues have recently been reported to be potential inhibitors of NorA, the bacterial pump responsible for efflux of fluoroquinolones,<sup>20</sup> and flavones have been reported to be effective inhibitors of P-glycoprotein and breast cancer resistance protein (BCRP).<sup>21–23</sup> Similarly, xanthenes have been identified as effectors of the human transporter MRP1,<sup>24</sup> and finally, depending on their substitution pattern, chalcones have been found to act as inhibitors of P-glycoprotein and BCRP.<sup>25–28</sup>

In *Leishmania*, we found that flavonoids, such as derivatives of the flavanolignan silybin, effectively inhibit P-glycoprotein by interacting with its nucleotide-binding sites.<sup>14,29,30</sup>

In the light of the above, we focused our study on investigating 15 diversely substituted compounds belonging to different flavonoid subclasses, including aurones, isoflavone analogues, flavones, xanthenes and chalcones (Figure 1). In order to broaden the chemical diversity, we included two trolox derivatives as trolox partly shares a flavonoid-type structure and could be a ligand for ABC proteins. Based on the first-line primary screening results, our goal was then to identify a drug candidate by pharmacomodulation and optimization of the most active candidate.

## Materials and methods

### Chemicals

The syntheses of compounds A1–A4, B1, B2, C1, C2, E1 and F1–F4 (Figure 1) have been described previously<sup>20,24,25,31,32</sup> and those of trolox carboxamides (D compounds; Table 2) are provided in the Supplementary data (available at JAC Online). Trivalent antimony (Sb<sup>III</sup>); potassium antimony tartrate, 4',6'-diamidino-2-phenylindole dilactate (DAPI), MTT and glutathione

(GSH) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). ZPP and zinc mesoporphyrin (ZMP) were purchased from Frontier Scientific (Logan, UT, USA). All chemicals were of the highest quality available. Pentostam was provided by GlaxoSmithKline (Greenford, UK).

### *Leishmania* lines and culture conditions

The promastigotes of *Leishmania major* (MHOM/JL/80/Friedlin) and derived lines used in this study have been described previously.<sup>18</sup> Specifically, we used an *L. major* control line (pXG) transfected with the empty vector pXG, and an *L. major* ABCI4 line (ABCI4) that overexpresses a newly identified *Leishmania* ABC half-transporter that shows resistance to antimony as well as to some toxic porphyrins, such as ZPP.<sup>18</sup> Promastigote forms were grown at 28°C in M-199 medium (Invitrogen) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (hiFBS, Invitrogen).

### Human myelomonocytic cell line (THP-1) and culture

The THP-1 cell line was grown at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in RPMI-1640 supplemented with 10% hiFBS, 2 mM glutamate, 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin.

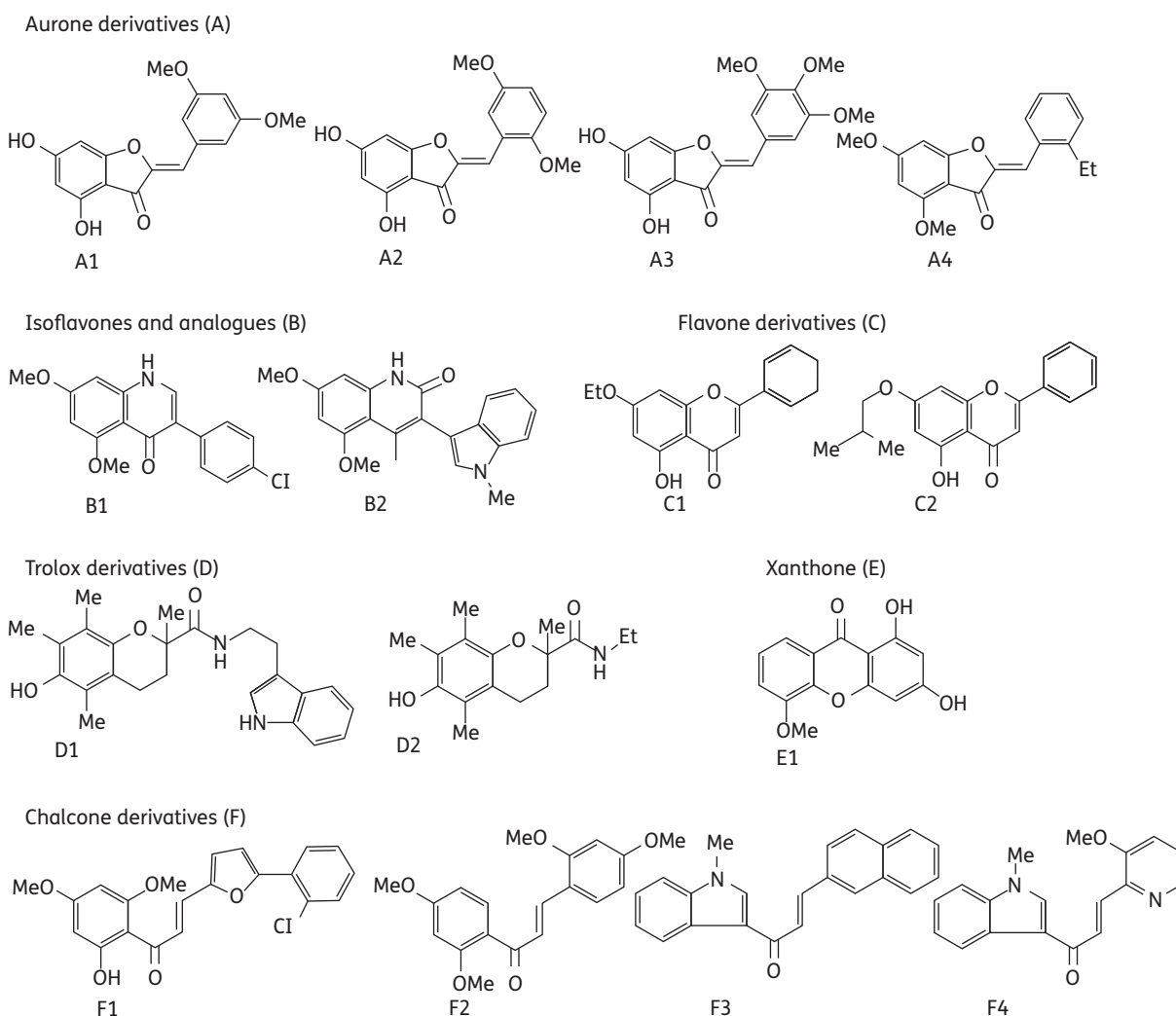
### Infection of THP-1 cells

In order to induce the differentiation of THP-1 cells into monocyte-derived macrophages, cells ( $5 \times 10^5$ /well) were transferred into a 24-well microplate provided with glass coverslips (22 mm<sup>2</sup>). Cells were treated with phorbol myristate acetate (20 ng/mL) for 48 h to make them adherent. These cells were then infected with the different *Leishmania* lines at 35°C with stationary-phase promastigotes at a parasite-to-cell ratio of 10:1 in RPMI-1640 medium supplemented with 5% hiFBS. After 6 h of infection, unphagocytosed parasites were removed by washing with serum-free medium. The infected macrophages were further incubated in RPMI 1640 medium supplemented with 10% hiFBS for 72 h at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. Following incubation, samples were fixed for 20 min at 4°C with 2.5% paraformaldehyde in PBS (1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 130 mM NaCl and 2.6 mM KCl, pH 7), then permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min. Intracellular parasites were detected by nuclear staining with Prolong Gold antifade agent with DAPI (Invitrogen).

### Antimony chemosensitization experiments

In order to assess the ability of compounds to chemosensitize parasites to antimony, promastigotes from the *L. major* lines pXG (control) and overexpressing ABCI4 were exposed to different concentrations of Sb<sup>III</sup> in the presence of 0.5, 5 or 20 µM of the different compounds, depending on their intrinsic toxicity, for 72 h at 28°C. The concentration of Sb<sup>III</sup> required to inhibit parasite growth by 50% (EC<sub>50</sub>) was determined using the MTT colorimetric assay as described previously.<sup>16</sup> The susceptibility indexes were calculated by dividing the EC<sub>50</sub> for *Leishmania* lines in the absence of compound by the EC<sub>50</sub> in the presence of compound. LY335979 (zosuquidar), GF120918 (elacridar), cyclosporin A (CsA) and Cuzco 5 were used as reference ABC transporter inhibitors.<sup>33</sup> To determine the intrinsic toxicity of the compounds, the pXG and ABCI4 *L. major* lines were exposed to them in the absence of Sb<sup>III</sup>. After 72 h of incubation at 28°C, the viability of promastigotes was determined using the colorimetric MTT assay.

To assess the susceptibility of *Leishmania* amastigotes to Sb<sup>V</sup> (Pentostam), macrophages from THP-1 differentiated cells were infected at a ratio of 1:10 macrophages/parasites, as described above. Infected macrophage cultures were incubated for 72 h with different concentrations of Pentostam in the presence or absence of the potential inhibitors. The percentage of infection and the mean number of amastigotes from infected macrophages were determined in 200 macrophages/well.



**Figure 1.** Structures of the flavonoids and analogues screened in this study.

### Determination of cellular toxicity of investigated compounds

Cellular toxicity was determined using the colorimetric MTT-based assay,<sup>16</sup> as described previously for *Leishmania* promastigotes, except for the incubation temperature, which was 37°C in this study. Briefly,  $3 \times 10^4$  THP-1 cells/well were transferred to 96-well microplates and differentiated for 48 h as described above, followed by 24 h of culture in fresh medium. The culture medium was then extracted and replaced by culture medium supplemented with MTT to determine the EC<sub>50</sub> values, as described previously.

### Antimony accumulation and efflux using inductively coupled plasma mass spectrometry

Antimony accumulation and efflux were determined as described previously<sup>18</sup> with some modifications. Thus, promastigotes ( $1 \times 10^8$ /mL) were incubated with 100  $\mu$ M Sb<sup>III</sup> in culture medium for 60 min at 28°C in the presence or absence of the potential inhibitor at a final concentration of 20  $\mu$ M, then centrifuged, and the resulting pellet was stored at -80°C until measurement of the antimony accumulation as described below. To perform the antimony efflux assays, the different *Leishmania* lines were incubated for 1 h with 100  $\mu$ M Sb<sup>III</sup> in culture medium at 28°C as described above. After washing with PBS, the parasites were resuspended in culture

medium at 28°C with or without potential inhibitors at a concentration of 20  $\mu$ M, and the parasites were then pelleted at 180 min and stored at -80°C. Intracellular antimony was determined as described previously.<sup>3</sup> Briefly, the cell pellet was dissolved in 200  $\mu$ L of concentrated nitric acid for 24 h at room temperature; the sample was diluted to 100 mL with distilled water and then injected into an inductively coupled plasma mass spectrometer (PerkinElmer) for quantification. Antimony was measured at its *m/z* ratios of 121 and 123 with rhodium as an internal standard.

### ZMP accumulation and efflux

The methodology for determining ZMP accumulation and efflux has been described previously.<sup>18</sup> Briefly, promastigotes ( $5 \times 10^7$ ) were resuspended in HPMI medium (120 mM NaCl, 5 mM KCl, 400  $\mu$ M MgCl<sub>2</sub>, 40  $\mu$ M CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES, 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM glucose and 5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) and then incubated with 10  $\mu$ M ZMP at 28°C for 10 min before being washed with PBS buffer plus 5% BSA. Finally, the parasites were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS and the fluorescence retained was measured by flow cytometry (with excitation at 405 nm and emission at 575–585 nm) using a FACS Aria Cell Sorter III (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). To perform the ZMP efflux assays, *Leishmania* parasites were incubated with ZMP as described above, then washed and transferred into ZMP-free HPMI for

180 min. Potential inhibitors were added at the concentration of 20  $\mu\text{M}$  during ZMP accumulation and were present throughout the efflux experiment. Finally, parasites were fixed with 2% paraformaldehyde in PBS and the fluorescence retained was measured by flow cytometry.

### Determination of non-protein thiol

Thiol effluxed into the culture medium was determined using the thiol fluorescent detection reagent ThioStar (Luminos, Ann Arbor, MI, USA) as described previously.<sup>18</sup> Briefly, promastigotes ( $1 \times 10^8$ ) were incubated with 100  $\mu\text{M}$   $\text{Sb}^{\text{III}}$  for 1 h in HBS buffer (21 mM HEPES, 0.7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 137 mM NaCl, 5 mM KCl and 6 mM glucose, pH 7), washed twice with PBS buffer, then resuspended again in  $\text{Sb}^{\text{III}}$ -free HBS buffer for 180 min. Potential reversal compounds were added at a concentration of 20  $\mu\text{M}$  during the  $\text{Sb}^{\text{III}}$  incubation and remained present throughout the efflux experiment. Parasites were pelleted and the supernatants were treated with 12% trichloroacetic acid at 4°C for 30 min to deproteinize them, then centrifuged at 13 000 g. The supernatants were diluted with HBS buffer to reduce the trichloroacetic acid concentration to 2% and were then transferred into a 96-well microplate and incubated with 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  ThioStar for 1 h at room temperature. Sample fluorescence (excitation 380 nm, emission 510 nm) was measured using an Infinite F200 Luminescence System (Tecan

Austria GmbH). Different GSH concentrations were used as a control of the thiol concentration-dependence signal of ThioStar.

### Statistical analysis

Statistical comparisons between groups were performed using Student's *t*-test. Differences were considered significant at a level of  $P < 0.05$ .

## Results and discussion

The first study highlighting the activity of flavonoids against ABC proteins was reported by Scambia et al.<sup>34</sup> and showed that the naturally occurring flavonoid quercetin can restore susceptibility to adriamycin in multidrug-resistant cells overexpressing P-glycoprotein. That report has inspired many research groups to investigate synthetic analogues of flavonoids as potential modulators of multidrug resistance to enhance the anticancer effects of the conventional chemotherapeutic drugs. P-glycoprotein and BCRP were the most commonly targeted in this regard, and several literature reviews concerning the use of flavonoid derivatives as reversal agents are available. However, to the best of our knowledge, flavonoid analogues have never been investigated as reversal agents for the *Leishmania*

**Table 1.** Effect of different compounds on the susceptibility index to  $\text{Sb}^{\text{III}}$  in *L. major* lines

	Susceptibility index <sup>a</sup>	
	pXG	ABC14
CsA <sup>b</sup>	3.28 ± 0.56	8.04 ± 0.64*
GF <sup>b</sup>	1.69 ± 0.23	1.35 ± 0.17
LY <sup>c</sup>	1.54 ± 0.27	1.26 ± 0.11
Cuzco <sup>c</sup>	1.09 ± 0.17	0.97 ± 0.07
A1	3.12 ± 0.60	6.59 ± 0.84*
A2	1.90 ± 0.53	5.82 ± 1.27*
A3	1.03 ± 0.10	1.06 ± 0.15
A4	1.90 ± 1.14	2.47 ± 0.50
B1	1.46 ± 0.50	3.38 ± 0.50*
B2	0.76 ± 0.15	0.88 ± 0.12
C1	1.31 ± 0.41	1.84 ± 0.29
C2	1.06 ± 0.26	0.90 ± 0.16
D1	0.73 ± 0.07	1.12 ± 0.20
D2	0.74 ± 0.09	3.60 ± 0.60*
E1	1.04 ± 0.15	1.00 ± 0.11
F1	0.80 ± 0.09	0.81 ± 0.12
F2	1.74 ± 0.41	2.48 ± 0.63
F3	0.73 ± 0.16	1.05 ± 0.14
F4	4.51 ± 0.76	10.62 ± 2.19*

Data are means ± SD of three independent experiments. LY335979 (LY, zosuquidar), GF120918 (GF, elacridar), CsA and Cuzco 5 were used as reference ABC transporter inhibitors.

Parasites were grown as described in the Materials and methods section for 72 h at 28°C in the presence of increasing concentrations of  $\text{Sb}^{\text{III}}$ . Cell viability was determined using an MTT-based assay.

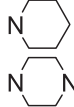
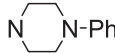


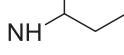
<sup>a</sup>Calculated as described in the Materials and methods section in the presence of 20  $\mu\text{M}$  compound.

<sup>b</sup>Due to intrinsic toxicity we used a concentration of 0.5  $\mu\text{M}$ .

<sup>c</sup>Due to intrinsic toxicity we used a concentration of 5  $\mu\text{M}$ .

\* $P < 0.05$  in comparison with the control (pXG).

**Table 2.** Effect of the carboxamides derived from trolox on the susceptibility index to  $\text{Sb}^{\text{III}}$  in *L. major* lines

	R	Susceptibility index <sup>a</sup>	
		pXG	ABC14
Trolox	OH	1.51 ± 0.15	1.92 ± 0.12*
D3	NH <sub>2</sub>	1.42 ± 0.23	2.24 ± 0.13*
D4	NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>	0.93 ± 0.05	3.75 ± 0.22*
D5	NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CH <sub>3</sub>	0.90 ± 0.03	1.73 ± 0.13*
D6	NH-CH <sub>2</sub> -Ph	1.10 ± 0.12	1.51 ± 0.14*
D7	NH-(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -Ph	1.35 ± 0.10	1.89 ± 0.15*
D8		0.93 ± 0.11	1.56 ± 0.06*
D9		1.09 ± 0.14	1.01 ± 0.06
D10		0.94 ± 0.11	1.54 ± 0.16*
D11		0.94 ± 0.10	1.44 ± 0.14*
D12		0.96 ± 0.11	1.76 ± 0.05*

Data are means ± SD of three independent experiments.

Parasites were grown as described in the Materials and methods section for 72 h at 28°C in the presence of increasing concentrations of  $\text{Sb}^{\text{III}}$ . Cell viability was determined using an MTT-based assay.

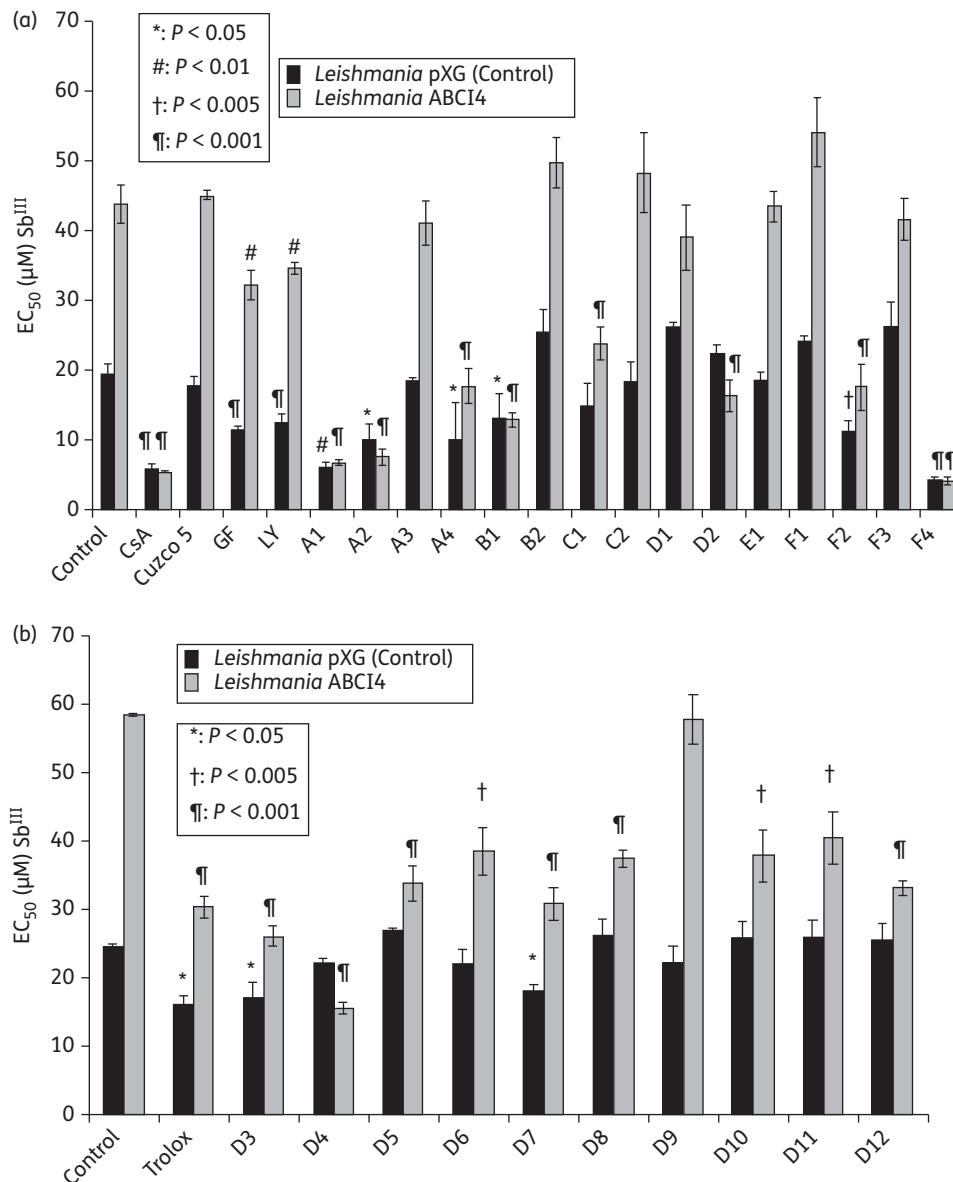
<sup>a</sup>Calculated as described in the Materials and methods section in the presence of 20  $\mu\text{M}$  compound.

\* $P < 0.05$  in comparison with the control (pXG).

ABCI4 transporter. Hence, we focused our study on flavonoid analogues with the aim of identifying structural frameworks for the development of ABCI4 transporter reversal agents. An initial library of 15 flavonoid derivatives and analogues (Figure 1) from different flavonoid subclasses was constituted and evaluated for its ability to revert the resistance to antimony mediated by ABCI4 overexpression in *Leishmania* parasites. Our aim was to identify potential hits and then use them as candidates for pharmacomodulation and optimization.

As described previously,<sup>18</sup> ABCI4 is involved in drug susceptibility to antimony and other heavy metals by catalysing the efflux of conjugated thiol complexes. Our results showed that the trolox

analogue D2 presented the highest efficiency at 20  $\mu$ M by fully reverting the resistance to antimony in *Leishmania* parasites overexpressing ABCI4 (Figure 2a), thus giving a high selective susceptibility index (3.60; Table 1), with very low toxicity in both control parasites and THP-1 cells ( $EC_{50}$  values  $>500$   $\mu$ M; Table S1, available as Supplementary data at JAC Online). As shown in Figure 1, compound D2 is an ethyl carboxamide derivative of trolox, Hoffman-LaRoche's trade name for 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, a derivative of vitamin E that is known to be a potent antioxidant.<sup>35</sup> Aurones (A1 and A2), isoflavone B1 and chalcone F4 were also found to sensitize parasites overexpressing ABCI4 to antimony (Figure 2a), although their effect was not specific since it was



**Figure 2.** Susceptibility of *L. major* lines treated with various representative compounds (a) and trolox derivatives (b) to  $Sb^{III}$ . *L. major* lines pXG and ABCI4 were assayed for  $Sb^{III}$  susceptibility at 72 h in the presence of (a) 20  $\mu$ M different flavonoid derivatives and (b) 20  $\mu$ M trolox derivatives. Reference reversal agents were 0.5  $\mu$ M CsA, 5  $\mu$ M Cuzco 5, 0.5  $\mu$ M GF120918 (GF, elacridar) and 5  $\mu$ M LY335979 (LY, zosuquidar). Cell viability was determined using an MTT-based assay as described in the Materials and methods section. Data are the means  $\pm$  SD of three independent experiments. Significant differences with respect to the corresponding control line incubated in the absence of compounds are indicated.

also partly produced in control parasites (Table 1), possibly due to the overall cytotoxicity of these compounds (Table S1, available as Supplementary data at JAC Online), as was also observed with the reference inhibitor CsA. These primary results are indicative of a promising ability of these compounds to sensitize *Leishmania* parasites to antimony. The other reference inhibitors (LY335979, GF120918 and Cuzco 5) were both non-specific and inefficient. Consequently, the high inhibition potency of compound D2 against antimony resistance prompted us to synthesize a new series of trolox carboxamides (compounds D3–D12) by replacing the ethyl moiety of compound D2 with various substituents (Table 2). The compounds shown in Table 2 were synthesized in a single step, in reasonable yields, starting from the commercially available trolox and amines. The compounds in this series were not toxic for either the parasites or THP-1 cells ( $EC_{50} > 500 \mu\text{M}$ ; data not shown).

An analysis of the reversal activity of this new series (Figure 2b) showed that the most active derivative (compound D4) decreased the  $EC_{50}$  of  $\text{Sb}^{\text{III}}$  in parasites overexpressing ABCI4, thus leading to a susceptibility index of 3.75 (Table 2). Lower but significant sensitization of *Leishmania* parasites overexpressing ABCI4 to antimony was also observed for the other derivatives, except for D9. Based on the structure of compound D2, we decided to prepare a homologous series (derivatives D3, D4 and D5) differing by a single constant unit, in this case a  $\text{CH}_2$  group, in order to check the effect of the carboxamide chain on the reversal activity. As shown in Tables 1 and 2, the derivative with an *N*-propyl carboxamide substituent (D4) behaved similarly to that with an *N*-ethyl substituent (D2), both being much more active than their counterpart with an *N*-butyl substituent (D5). Interestingly, branching of the propyl group (D10 and D12 versus D4) led to a strong decrease in the selectivity index, thus indicating that the size of the alkyl group is important. A similar effect was observed for compound D8, where the alkyl group forms part of a bulky piperidine ring. Considering that the potential of flavonoid derivatives is due to their tricyclic aromatic rings, we decided to graft a phenyl ring to the alkyl chain of

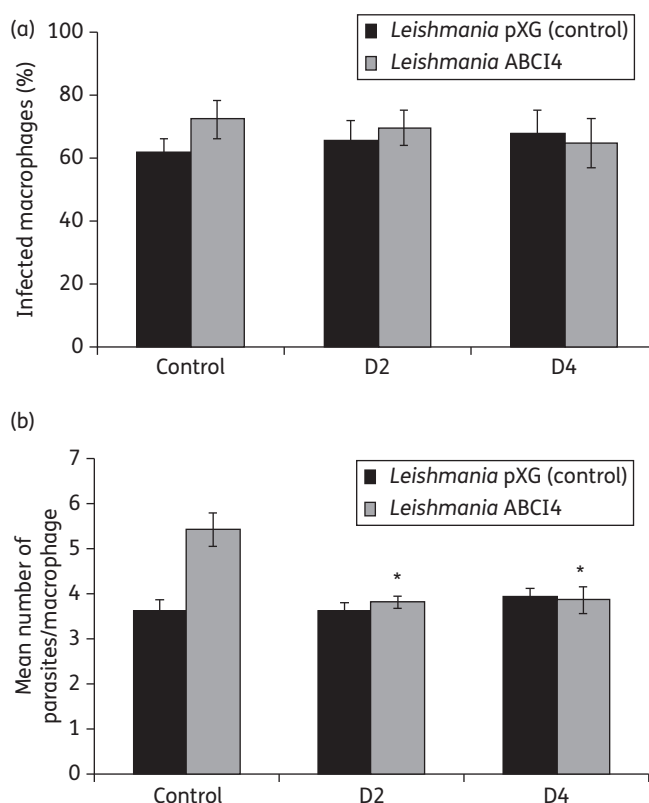
**Table 3.** Susceptibility to Pentostam ( $\text{Sb}^{\text{V}}$ ) in intracellular amastigotes of *L. major* lines

	$EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) (susceptibility index) <sup>a</sup>	
	pXG	pXG-ABCI4
Control	20.29 ± 1.96	40.64 ± 3.17
D2	16.23 ± 0.91 (1.25)	15.79 ± 0.57 (2.57)*
D4	14.90 ± 1.28 (1.36)	15.78 ± 0.84 (2.57)*

Data are means ± SD of three independent experiments. Intracellular amastigotes of *L. major* lines were obtained after infection of monocyte-derived macrophages with the different promastigote lines as described in the Materials and methods section. After 72 h, drug susceptibility was determined from the percentage of infected cells and the mean number of amastigotes per macrophage in drug-treated cultures versus non-treated cultures. We used the different potential inhibitors at a concentration of 20  $\mu\text{M}$  and they were present throughout the experiment. The percentage of infection was determined by DAPI staining in 200 macrophages/well.

<sup>a</sup>Calculated as described in the Materials and methods section.

\* $P < 0.01$  in comparison with the control.



**Figure 3.** Infectivity and survival of different *L. major* lines in monocyte-derived macrophages in the presence of trolox derivatives D2 and D4. Infection of monocyte-derived macrophages from THP-1 cells with *Leishmania* pXG and ABCI4 lines was performed as described in the Materials and methods section. The percentage of infected macrophages (a) and the mean number of parasites/macrophage (b) were determined at 72 h post-infection in the presence or absence of 20  $\mu\text{M}$  D2 or D4. Data are the means ± SD of three independent experiments. \* $P < 0.01$  in comparison with the control without compounds.

**Table 4.** ZPP susceptibility in *L. major* lines

	$EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) (susceptibility index) <sup>a</sup>	
	pXG	pXG-ABCI4
Control	4.35 ± 0.67	10.12 ± 0.23
D2	3.03 ± 0.21 (1.43)	3.40 ± 0.36 (2.97)*
D4	3.26 ± 0.16 (1.33)	3.57 ± 0.29 (2.83)*

Data are means ± SD of three independent experiments. Parasites were grown as described in the Materials and methods section in the presence of increasing concentrations of ZPP. Cell densities were measured with an electronic particle counter (Coulter Electronics, UK) and by direct counting with a haemocytometer. We used the potential inhibitors D2 and D4 at a concentration of 20  $\mu\text{M}$  and they were present throughout the experiment.

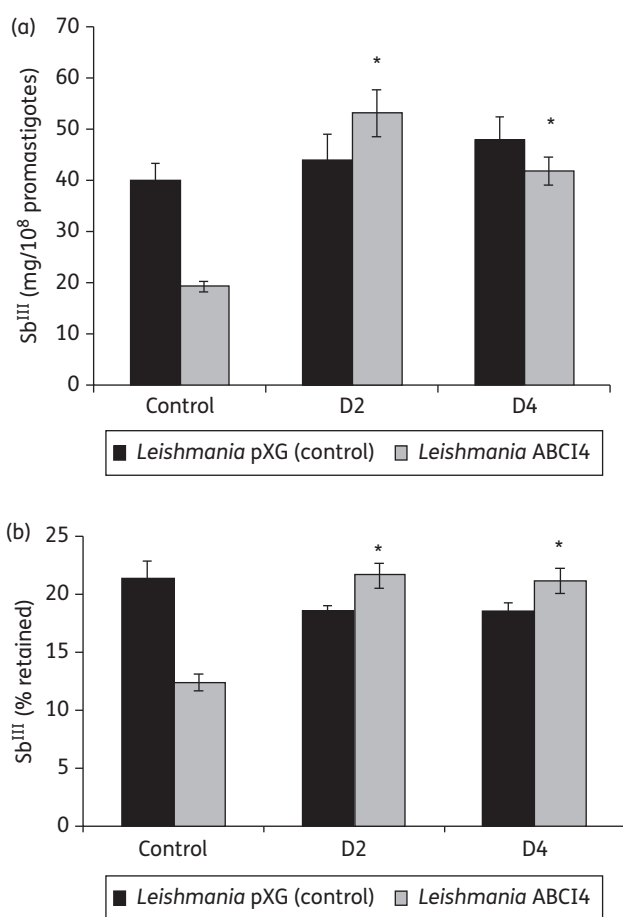
<sup>a</sup>Calculated as described in the Materials and methods section.

\* $P < 0.01$  in comparison with the control.



trolox (compounds D6, D7 and D9). However, as shown in Table 2, this modification failed to increase activity, again highlighting the possibly critical role of the size of the substituent. The addition of an extra ethyl group to compound D2 (compound D11; Table 2) led to an important decrease in activity.

The reversion of antimony resistance induced by compounds D2 and D4 in the promastigote forms of *Leishmania* was recovered in the intracellular amastigotes obtained after infection of THP-1 cells (Table 3). Indeed, in intracellular amastigotes overexpressing ABCI4, which were resistant to antimony, D2 and D4 reverted the resistance with a susceptibility index of 2.6 for both compounds, similar to the values observed in their promastigote counterparts. As described previously,<sup>18</sup> *Leishmania* lines overexpressing ABCI4 survive longer inside mouse peritoneal macrophages than the other parasite lines, as determined by the significantly better ability of intracellular amastigotes to replicate inside the host peritoneal macrophages than controls. Although the mechanism

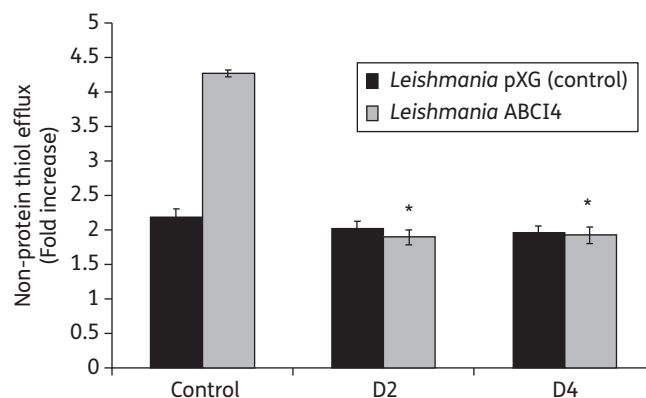


**Figure 4.** Antimony accumulation and efflux in *L. major* lines in the presence of trolox derivatives D2 and D4. (a) *Leishmania* lines pXG and ABCI4 were incubated with 100  $\mu$ M Sb<sup>III</sup> for 60 min in the presence or absence of 20  $\mu$ M D2 or D4, as described in the Materials and methods section. (b) After the accumulation assays, promastigotes were resuspended in Sb<sup>III</sup>-free HBS buffer in the presence or absence of 20  $\mu$ M of inhibitor for 180 min at 28°C as described previously. The antimony retained was measured by inductively coupled plasma mass spectrometry. Data are the means  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $P < 0.01$  in comparison with the control without compounds.

underlying this increased survival capacity is unknown, we suggest that ABCI4 may be able to transport unknown unidentified substrates associated with detoxification mechanisms. We have determined the ability of compounds D2 and D4 to influence the infectivity and replication of *Leishmania* lines inside macrophages (Figure 3). As observed, the different *Leishmania* lines showed a similar percentage of infection in macrophages in either the presence or absence of compounds D2 and D4 at 72 h post-infection (Figure 3a). Additionally, study of the ability of intracellular amastigotes to replicate inside macrophages showed that these compounds fully reverted the increased replication of *Leishmania* lines overexpressing ABCI4 at 72 h post-infection, probably blocking the ability of ABCI4 to transport unknown substrates associated with detoxification mechanisms (Figure 3b).

ABCI4 overexpression confers resistance to some toxic porphyrins, such as ZPP,<sup>18</sup> a validated fluorescent haem analogue transported by ABCG2.<sup>36</sup> As shown in Table 4, compounds D2 and D4 efficiently reverted resistance to ZPP with a susceptibility index of 3. Consequently, these results clearly highlight the potential of compounds D2 and D4 as effective inhibitors of the ABCI4 activity involved in resistance to both antimonials and toxic porphyrins in *Leishmania*.

Flavonoid derivatives display a wide range of biological effects, including antioxidant, anti-inflammatory, antimicrobial and anti-protozoan activities. Under our experimental conditions, we have not observed any modification in susceptibility to antimonials or ZMP in wild-type intracellular amastigotes after treatment with compounds D2 and D4. Additionally, these compounds do not affect the percentage of infection in macrophages. Consequently, the putative antioxidant properties of these compounds do not reduce the efficacy of antimony or ZMP in *Leishmania*.

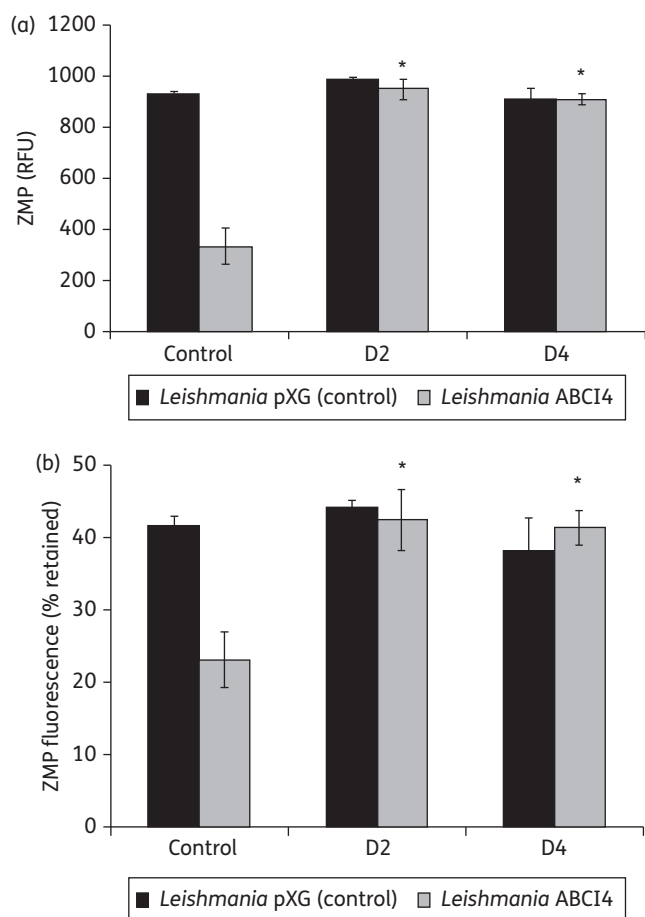


**Figure 5.** Non-protein thiol efflux in *Leishmania* lines in the presence of trolox derivatives D2 and D4. *L. major* lines pXG and ABCI4 were incubated with 100  $\mu$ M Sb<sup>III</sup> for 1 h, and efflux was performed for 180 min at 28°C, as described in the Materials and methods section. Compounds D2 and D4 were added at a concentration of 20  $\mu$ M during Sb<sup>III</sup> incubation and remained present throughout the efflux experiment. Parasites were pelleted and the supernatants were incubated with 3  $\mu$ g/mL ThioStar for 1 h at room temperature, as described in the Materials and methods section. Sample fluorescence at 510 nm was determined upon excitation at 380 nm using an Infinite F200 Luminescence System (Tecan Austria GmbH). The fold increase in non-protein thiol efflux is relative to the initial time point of efflux. Data are the means  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $P < 0.01$  in comparison with the control without compounds.

As described,<sup>18</sup> ABCI4 presents a dual localization in both mitochondria and the plasma membrane. ABCI4-mediated resistance to antimonials ( $\text{Sb}^{\text{III}}$ ) has been reported to be due to lower accumulation as a consequence of increased ABCI4-mediated  $\text{Sb}^{\text{III}}$  efflux activity.<sup>18</sup> In this context, we studied the ability of compounds D2 and D4 to revert antimony accumulation in *Leishmania* lines overexpressing ABCI4. As shown in Figure 4(a), compounds D2 and D4 both increased the accumulation of  $\text{Sb}^{\text{III}}$  about 3-fold with respect to untreated parasites. To determine whether the increased accumulation of antimony in the resistant parasites was due to decreased antimony efflux, *L. major* lines were loaded with  $\text{Sb}^{\text{III}}$  for 1 h then washed, and the amount of antimony retained in the parasites in the presence or absence of compounds D2 and D4 was measured at 180 min. As shown (Figure 4b), compounds D2 and D4 induced a significant inhibition of drug efflux due to specific inhibition of ABCI4 activity. As ABCI4 has a significant

ability to efflux thiol-conjugated complexes, we studied the ability of compounds D2 and D4 to revert non-protein thiol efflux in *L. major* lines in the presence of  $\text{Sb}^{\text{III}}$  using ThioStar. Our results indicate that compounds D2 and D4 fully reverted the non-protein thiol efflux mediated by ABCI4 (Figure 5).

As reported previously,<sup>18</sup> ABCI4 may contribute to porphyrin trafficking as parasites overexpressing ABCI4 are resistant to ZPP and present lower accumulation of fluorescent ZMP due to significant efflux. We determined that compounds D2 and D4 efficiently reverted ZMP accumulation (Figure 6a) by reversing ZMP efflux (Figure 6b), thereby confirming that the increased accumulation of  $\text{Sb}^{\text{III}}$  and ZMP was due to inhibition of ABCI4-mediated efflux activity. Consequently, compounds D2 and D4 could be considered to be specific reversal agents that inhibit the transport activity of ABCI4. It should be noted at this point that compound D2 did not inhibit human ABCG2 drug efflux activity (A. Di Pietro and A. Boumendjel, unpublished results). Additionally, these compounds were not toxic to THP-1 cells. Thus, their ability to sensitize antimony-resistant *Leishmania* lines opens the way to their possible use in combination with conventional chemotherapy against leishmaniasis. The ready synthesis of these compounds (in only one step) makes scale-up a simple process for further development.



**Figure 6.** Accumulation and efflux of ZMP in *L. major* lines in the presence of trolox derivatives D2 and D4. (a) *L. major* lines pXG and ABCI4 were incubated with 10  $\mu\text{M}$  ZMP in the presence or absence of D2 or D4. RFU, relative fluorescence units. (b) The efflux assay was performed in the *L. major* lines loaded with 10  $\mu\text{M}$  ZMP and then resuspended in ZMP-free HPMI buffer, as described in the Materials and methods section. The fluorescence retained in both uptake and efflux assays was measured by flow cytometry using a FACS Aria Cell Sorter III. Data are the means  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $P < 0.01$  in comparison with the control without compounds.

## Acknowledgements

We thank Stephen M. Beverley (Washington University School of Medicine, USA) for providing the vectors used throughout this research work.

## Funding

This work was supported by the Spanish Grants SAF2012-34267 (to F. G.) and SAF2011-28102 (to S. C.), the Plan Andaluz de Investigación (Proyecto de Excelencia CTS-7282) and by FEDER funds from the EU to F. G. and S. C.

## Transparency declarations

None to declare.

## Supplementary data

The synthesis procedures and the analytical data of Trolox carboxamides (D compounds) and Table S1 are available as Supplementary data at JAC Online (<http://jac.oxfordjournals.org/>).

## References

- Alvar J, Velez ID, Bern C et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 2012; **7**: e35671.
- Richard JV, Werbovetz KA. New antileishmanial candidates and lead compounds. *Curr Opin Chem Biol* 2010; **14**: 447–55.
- Brochu C, Wang J, Roy G et al. Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3073–9.
- Dey S, Papadopoulou B, Haimeur A et al. High level arsenite resistance in *Leishmania tarentolae* is mediated by an active extrusion system. *Mol Biochem Parasitol* 1994; **67**: 49–57.
- Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* 2004; **7**: 257–66.

- 6 Pérez-Victoria JM, Pérez-Victoria FJ, Parodi-Talice A *et al.* Alkyllysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 2468–74.
- 7 Coelho AC, Beverley SM, Cotrim PC. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* 2003; **130**: 83–90.
- 8 Castanys-Muñoz E, Pérez-Victoria JM, Gamarro F *et al.* Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite *Leishmania* with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 3573–9.
- 9 Leprohon P, Legare D, Girard I *et al.* Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryot Cell* 2006; **5**: 1713–25.
- 10 BoseDasgupta S, Ganguly A, Roy A *et al.* A novel ATP-binding cassette transporter, ABCG6 is involved in chemoresistance of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 2008; **158**: 176–88.
- 11 Essodaigui M, Frezard F, Moreira ES *et al.* Energy-dependent efflux from *Leishmania* promastigotes of substrates of the mammalian multidrug resistance pumps. *Mol Biochem Parasitol* 1999; **100**: 73–84.
- 12 Mookerjee Basu J, Mookerjee A, Banerjee R *et al.* Inhibition of ABC transporters abolishes antimony resistance in *Leishmania* infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1080–93.
- 13 Padron-Nieves M, Diaz E, Machuca C *et al.* Glibenclamide modulates glucantime activity and disposition in *Leishmania major*. *Exp Parasitol* 2009; **121**: 331–7.
- 14 Pérez-Victoria JM, Cortés-Selva F, Parodi-Talice A *et al.* Combination of suboptimal doses of inhibitors targeting different domains of LtrMDR1 efficiently overcomes resistance of *Leishmania* spp. to miltefosine by inhibiting drug efflux. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 3102–10.
- 15 Cortés-Selva F, Jiménez IA, Muñoz-Martínez F *et al.* Dihydro- $\beta$ -agarofuran sesquiterpenes: a new class of reversal agents of the multidrug resistance phenotype mediated by P-glycoprotein in the protozoan parasite *Leishmania*. *Curr Pharm Des* 2005; **11**: 3125–39.
- 16 Kennedy ML, Cortés-Selva F, Pérez-Victoria JM *et al.* Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *J Med Chem* 2001; **44**: 4668–76.
- 17 Pérez-Victoria JM, Bavchvarov BI, Torrecillas IR *et al.* Sitamaquine overcomes ABC-mediated resistance to miltefosine and antimony in *Leishmania*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 3838–44.
- 18 Manzano JI, García-Hernández R, Castanys S *et al.* A new ABC half-transporter in *Leishmania* is involved in resistance to antimony. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; **57**: 3719–30.
- 19 Boumendjel A, Beney C, Deka N *et al.* 4-Hydroxy-6-methoxyaurones with high-affinity binding to cytosolic site of P-glycoprotein. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2002; **50**: 854–6.
- 20 Doleans-Jordheim A, Veron JB, Fendrich O *et al.* 3-Aryl-4-methyl-2-quinolones targeting multiresistant *Staphylococcus aureus* bacteria. *ChemMedChem* 2013; **8**: 652–7.
- 21 Boumendjel A, Macalou S, Valdameri G *et al.* Targeting the multidrug ABCG2 transporter with flavonoidic inhibitors: in vitro optimization and in vivo validation. *Curr Med Chem* 2011; **18**: 3387–401.
- 22 Vaclavikova R, Kondrova E, Ehrlichova M *et al.* The effect of flavonoid derivatives on doxorubicin transport and metabolism. *Bioorg Med Chem* 2008; **16**: 2034–42.
- 23 Boccard J, Bajot F, Di Pietro A *et al.* A 3D linear solvation energy model to quantify the affinity of flavonoid derivatives toward P-glycoprotein. *Eur J Pharm Sci* 2009; **36**: 254–64.
- 24 Genoux-Bastide E, Lorendeau D, Nicolle E *et al.* Identification of xanthenes as selective killers of cancer cells overexpressing the ABC transporter MRP1. *ChemMedChem* 2011; **6**: 1478–84.
- 25 Valdameri G, Gauthier C, Terreux R *et al.* Investigation of chalcones as selective inhibitors of the breast cancer resistance protein: critical role of methoxylation in both inhibition potency and cytotoxicity. *J Med Chem* 2012; **55**: 3193–200.
- 26 Bois F, Beney C, Boumendjel A *et al.* Halogenated chalcones with high-affinity binding to P-glycoprotein: potential modulators of multidrug resistance. *J Med Chem* 1998; **41**: 4161–4.
- 27 Han Y, Riwanto M, Go ML *et al.* Modulation of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) by non-basic chalcone analogues. *Eur J Pharm Sci* 2008; **35**: 30–41.
- 28 Juvale K, Pape VF, Wiese M. Investigation of chalcones and benzochalcones as inhibitors of breast cancer resistance protein. *Bioorg Med Chem* 2012; **20**: 346–55.
- 29 Pérez-Victoria JM, Di Pietro A, Barron D *et al.* Multidrug resistance phenotype mediated by the P-glycoprotein-like transporter in *Leishmania*: a search for reversal agents. *Curr Drug Targets* 2002; **3**: 311–33.
- 30 Pérez-Victoria JM, Chiquero MJ, Conseil G *et al.* Correlation between the affinity of flavonoids binding to the cytosolic site of *Leishmania tropica* multidrug transporter and their efficiency to revert parasite resistance to daunomycin. *Biochemistry* 1999; **38**: 1736–43.
- 31 Haudecoeur R, Ahmed-Belkacem A, Yi W *et al.* Discovery of naturally occurring aurones that are potent allosteric inhibitors of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Med Chem* 2011; **54**: 5395–402.
- 32 Okombi S, Rival D, Bonnet S *et al.* Discovery of benzylidenebenzofuran-3(2H)-one (aurones) as inhibitors of tyrosinase derived from human melanocytes. *J Med Chem* 2006; **49**: 329–33.
- 33 Cortés-Selva F, Campillo M, Reyes CP *et al.* SAR studies of dihydro- $\beta$ -agarofuran sesquiterpenes as inhibitors of the multidrug-resistance phenotype in a *Leishmania tropica* line overexpressing a P-glycoprotein-like transporter. *J Med Chem* 2004; **47**: 576–87.
- 34 Scambia G, Panici PB, Ranelletti FO *et al.* Quercetin enhances transforming growth factor beta 1 secretion by human ovarian cancer cells. *Int J Cancer* 1994; **57**: 211–5.
- 35 Lúcio M, Nunes C, Gaspar D *et al.* Antioxidant activity of vitamin E and trolox: understanding of the factors that govern lipid peroxidation studies in vitro. *Food Biophys* 2009; **4**: 312–20.
- 36 Desuzinges-Mandon E, Arnaud O, Martinez L *et al.* ABCG2 transports and transfers heme to albumin through its large extracellular loop. *J Biol Chem* 2010; **285**: 33123–33.





### **ANEXO 3**

***Leishmania donovani* develops resistance to drug combinations.**

**PLoS Neglected Tropical Disease 6:e1974; 2012.**

Raquel García-Hernández , José Ignacio Manzano, Santiago Castanys y Francisco Gamarro.

La combinación de fármacos para el tratamiento de la leishmaniasis representa una prometedora y desafiante estrategia quimioterapéutica que se ha implementado recientemente en diferentes áreas endémicas. Sin embargo, la inmensa mayoría de los estudios llevados a cabo hasta la fecha han ignorado el riesgo potencial de que los parásitos de *Leishmania* puedan desarrollar resistencia a los diferentes fármacos empleados en estas combinaciones. Como resultado, este estudio se diseñó para elucidar la capacidad de *Leishmania donovani* de desarrollar resistencia experimental a combinaciones de fármacos anti-leishmania. La inducción de resistencia a anfotericina B/miltefosina, anfotericina B/paromomicina, anfotericina B/Sb(III), miltefosina/paromomicina, y Sb(III)/paromomicina se realizó mediante adaptación progresiva a concentraciones crecientes de fármacos. Los amastigotes intracelulares resistentes a las diferentes combinaciones de fármacos se obtuvieron a partir de promastigotes de *L. donovani* resistentes, y se analizaron los niveles de tioles y ATP, además de el potencial de membrana mitocondrial de las líneas resistentes. Igualmente, esta resistencia se comprobó que era inestable. Más importante, observamos que los promastigotes/amastigotes resistentes a una combinación de fármacos mostraban una marcada resistencia cruzada a otros fármacos leishmanicidas. Además, los niveles de tioles se incrementaban en las líneas resistentes protegiendo contra la pérdida de ATP y potencial de membrana mitocondrial inducido por los fármacos. Demostramos que se obtienen diferentes patrones de resistencia dependiendo de la combinación de fármacos empleada. La resistencia a las combinaciones miltefosina/paromomicina y

Sb(III)/paromomicina se obtiene fácilmente de forma experimental. Estos resultados han sido validados en amastigotes intracelulares, y tienen una importante relevancia para asegurar la eficacia a largo plazo de las combinaciones de fármacos.

# *Leishmania donovani* Develops Resistance to Drug Combinations

Raquel García-Hernández, José Ignacio Manzano, Santiago Castanys<sup>9</sup>, Francisco Gamarro<sup>\*9</sup>

Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", IPBLN-CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Granada, Spain

## Abstract

Drug combinations for the treatment of leishmaniasis represent a promising and challenging chemotherapeutic strategy that has recently been implemented in different endemic areas. However, the vast majority of studies undertaken to date have ignored the potential risk that *Leishmania* parasites could develop resistance to the different drugs used in such combinations. As a result, this study was designed to elucidate the ability of *Leishmania donovani* to develop experimental resistance to anti-leishmanial drug combinations. The induction of resistance to amphotericin B/miltefosine, amphotericin B/paromomycin, amphotericin B/Sb<sup>III</sup>, miltefosine/paromomycin, and Sb<sup>III</sup>/paromomycin was determined using a step-wise adaptation process to increasing drug concentrations. Intracellular amastigotes resistant to these drug combinations were obtained from resistant *L. donovani* promastigote forms, and the thiol and ATP levels and the mitochondrial membrane potential of the resistant lines were analysed. Resistance to drug combinations was obtained after 10 weeks and remained in the intracellular amastigotes. Additionally, this resistance proved to be unstable. More importantly, we observed that promastigotes/amastigotes resistant to one drug combination showed a marked cross-resistant profile to other anti-leishmanial drugs. Additionally, the thiol levels increased in resistant lines that remained protected against the drug-induced loss of ATP and mitochondrial membrane potential. We have therefore demonstrated that different resistance patterns can be obtained in *L. donovani* depending upon the drug combinations used. Resistance to the combinations miltefosine/paromomycin and Sb<sup>III</sup>/paromomycin is easily obtained experimentally. These results have been validated in intracellular amastigotes, and have important relevance for ensuring the long-term efficacy of drug combinations.

**Citation:** García-Hernández R, Manzano JI, Castanys S, Gamarro F (2012) *Leishmania donovani* Develops Resistance to Drug Combinations. PLoS Negl Trop Dis 6(12): e1974. doi:10.1371/journal.pntd.0001974

**Editor:** Louis Maes, University of Antwerp, Belgium

**Received:** July 6, 2012; **Accepted:** November 3, 2012; **Published:** December 20, 2012

**Copyright:** © 2012 García-Hernández et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the Plan Andaluz de Investigación, Proyecto de Excelencia (CTS-7282), Junta de Andalucía (Spain) and by the Spanish Grants SAF2009-07440 (to FG) and SAF2011-28102 (to SC). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: gamarro@ipb.csic.es

<sup>9</sup> These authors contributed equally to this work.

## Introduction

The use of drug combinations, either in co-formulations or co-administrations, is an established approach for the treatment of several infectious diseases including malaria and tuberculosis [1]. This approach has also recently become a priority for other tropical parasitic diseases, such as visceral leishmaniasis [2–6]. Leishmaniasis, a neglected tropical parasitic disease that is prevalent in 98 countries spread across three continents, is caused by protozoan parasites belonging to the genus *Leishmania* [7]. The estimated incidence of leishmaniasis is 0.2–0.4 million cases of the visceral form (VL) and 0.7–1.2 million cases of the cutaneous form (CL) [7]. Although chemotherapy is the only current treatment option for leishmaniasis, its efficacy is increasingly limited by growing resistance to first-line drugs, especially antimonials, the frequent side-effects associated with their use, and the high cost of treatment [7,8]. The recommended first-line therapies for VL include: i) pentavalent antimonials (meglumine antimoniate and sodium stibogluconate), except in some regions in the Indian subcontinent where there are significant areas of drug resistance [9]; ii) the polyene antibiotic amphotericin B (AmB); iii) the liposomal formulation AmBisome; iv) the aminoglycoside paromomycin (PMM); and v) the oral drug miltefosine (MLF).

Recently, the WHO [7,10], recommended to use either a single dose of AmBisome or combinations of anti-leishmanial drugs in order to reduce the duration and toxicity of treatment, prolong the therapeutic life span of existing drugs and delay the emergence of resistance.

Although recent clinical trials have highlighted the efficacy and safety of anti-leishmanial drug combinations [4,5,10–12], additional clinical studies are needed to investigate various other factors, such as the identification of an effective, well-tolerated and short treatment regimen, logistical aspects, and the potential risk of developing resistance considering that compliance in field conditions can be low [13].

Herein we describe the selection and characterization of experimental resistance to drug combinations in *Leishmania* parasites. Our findings clearly demonstrate the acquisition of resistance to different drug combinations in *Leishmania donovani* promastigotes using a step-wise adaptation process to increasing drug concentrations. Similarly, and perhaps importantly, we have obtained intracellular *L. donovani* amastigotes that are resistant to different drug combinations from promastigote forms resistant to these same combinations. These results indicate different patterns of resistance depending on the drug combinations used, with the combination MLF/PMM selecting resistant *L. donovani* more

## Author Summary

*Leishmania* is a protozoan parasite that infects human macrophages to produce the neglected tropical disease known as leishmaniasis. Chemotherapy is currently the only treatment option for leishmaniasis. First-line therapies include pentavalent antimonials, except in some regions in the Indian subcontinent, the liposomal formulation of amphotericin B, miltefosine and paromomycin. The WHO has recently recommended a combined therapy in order to extend the life expectancy of these compounds. However, resistance could be induced in *Leishmania* if this approach is not applied in a controlled and regulated way, thus resulting in a rapid loss of efficacy of not one but two therapeutic options. In light of this, we have designed relevant experimental studies in order to determine whether *Leishmania* parasites are able to develop resistance to the different potential anti-leishmanial drug combinations that will be used in the near future. The results obtained could help us to predict the success of drug combination therapy. Experimental resistance of *Leishmania donovani* promastigotes to drug combinations was obtained after 10 weeks and remained in the intracellular amastigotes. We therefore conclude that *L. donovani* can easily develop resistance to drug combinations mainly miltefosine/paromomycin and Sb<sup>III</sup>/paromomycin. These results have been validated in intracellular amastigotes and are of considerable interest for future prediction of the success of drug combination therapy.

rapidly than the combination AmB/PMM. Significantly, we have also observed that promastigotes/amastigotes resistant to one drug combination show a marked cross-resistance profile to other anti-leishmanial drugs, a finding that could be of major clinical relevance. Additionally, our results indicate that the resistant lines remain protected against the drug-induced loss of ATP and mitochondrial membrane potential.

## Materials and Methods

### Chemicals

Trivalent antimony (Sb<sup>III</sup>), paromomycin (PMM), amphotericin B (AmB), paraformaldehyde, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], Rhodamine 123 (Rh123), buthionine sulfoximine (BSO), FCCP (carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxyphenylhydrazone), and Triton X-100 were obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Miltefosine (MLF) was purchased from Zentaris GmbH (Frankfurt am Main, Germany), and CellTiter-Glo, CellTracker, and 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) were purchased from Invitrogen. L-glutamine and penicillin/streptomycin were obtained from Gibco. All chemicals were of the highest quality available.

### *Leishmania* culture conditions

The *L. donovani* promastigotes (MHOM/ET/67/HU3) and derivative lines used in this study were grown at 28°C in RPMI 1640-modified medium (Invitrogen) supplemented with 20% or 10% heat-inactivated fetal bovine serum (HIFBS, Invitrogen). For thiol assays, they were grown in M-199 medium (Gibco) supplemented with 10% HIFBS.

### Development of drug-resistant *Leishmania* promastigotes

The resistant lines were obtained following a previously described step-wise adaptation process [14,15]. This process

started with drug pressure in the wild-type (WT) *L. donovani* line at a concentration below the drug EC<sub>50</sub> (the concentration of the drug required to inhibit parasite growth by 50%), gradually increasing the drug pressure over 10 weeks. After this period, the resistant lines were maintained for eight further weeks at the final drug concentration. The drug combination resistant lines generated, based on WHO recommendations [7], were AmB+MLF (AM), AmB+PMM (AP), AmB+Sb<sup>III</sup> (the antimonial active form; AS), MLF+PMM (MP) and Sb<sup>III</sup>+PMM (SP). Singly resistant lines named A, M, P, and S were obtained in a similar manner. All resistant lines were maintained in the continuous presence of drugs. Resistance stability was checked at one and four months after removal from drug pressure. The EC<sub>50</sub>, resistance index (EC<sub>50</sub> ratio for resistant and WT parasites), and cross-resistance profile were determined for each line using an MTT colorimetric assay after incubation for 72 h at 28°C in the presence of increasing concentrations of the drug, as described previously [16].

### Animals

Six-week-old male BALB/c mice were purchased from Charles River Breeding Laboratories and maintained in the Animal Facility Service of our Institute under pathogen-free conditions. They were fed a regular rodent diet and given drinking water *ad libitum*. These mice were used to collect primary peritoneal macrophages.

### Ethics statement

All experiments were performed according to National/EU guidelines regarding the care and use of laboratory animals in research. Approval for these studies was obtained from the Ethics Committee of the Spanish National Research Council (CSIC file CEA-213-1-11).

### Drug sensitivity in intracellular *Leishmania* amastigotes

Mouse peritoneal macrophages were obtained as described previously [17] and plated at a density of 1×10<sup>5</sup> macrophages/well in RPMI 1640 medium supplemented with 10% HIFBS, 2 mM glutamate, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) in 24-well tissue culture chamber slides. Late-stage promastigotes from WT and resistant lines were used to infect macrophages at a macrophage/parasite ratio of 1:10. Eight hours after infection at 35°C in an atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>, extracellular parasites were removed by washing with serum-free medium. Infected macrophage cultures were maintained in RPMI 1640 medium plus 10% HIFBS at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> at different drug concentrations. After 72 h, macrophages were fixed for 30 min at 4°C with 2.5% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS; 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 130 mM NaCl, and 2.6 mM KCl adjusted to pH 7), and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 30 min. Intracellular parasites were detected by nuclear staining with Prolong Gold antifade reagent plus DAPI. Drug activity was determined from the percentage of infected cells and the number of amastigotes per cell in drug-treated versus non-treated cultures [17].

### Determination of intracellular levels of non-protein thiols

The levels of non-protein thiols were measured by flow cytometry using CellTracker, as described previously [18]. Parasites (10<sup>7</sup> promastigotes/mL), grown in M199 medium plus 10% HIFBS were washed twice with PBS and incubated with 2 µM CellTracker for 15 min at 37°C. They were then washed again with PBS and analysed by flow cytometry in a FACScan

flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA) equipped with an argon laser operating at 488 nm. Fluorescence emission between 515 and 545 nm was quantified using the Cell Quest software. Non-protein thiol-depleted parasites obtained after incubation with 3 mM BSO (a  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase inhibitor) for 48 h at 28°C were used as controls.

### ATP measurements

ATP was measured using a CellTiter-Glo luminescence assay, which generates a luminescent signal proportional to the amount of ATP present, as described previously [19]. Promastigotes ( $4 \times 10^6$ /mL) were incubated at 28°C in RPMI plus 20% HIFBS containing 0.2  $\mu$ M AmB or 25  $\mu$ M MLF for 3 h, or 2 mM Sb<sup>III</sup> for 8 h. The drug concentration and incubation time were selected by monitoring parasite viability under a microscope. A 25- $\mu$ L aliquot of parasites was then transferred to a 96-well plate, mixed with the same volume of CellTiter-Glo, and incubated in the dark for 10 min. The resulting bioluminescence was measured using an Infinite F200 microplate reader (Tecan Austria GmbH, Austria).

### Measurement of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ )

$\Delta\Psi_m$  was measured by flow cytometry using Rh123 accumulation, as described previously [20]. The parasites ( $4 \times 10^6$  promastigotes/mL) were incubated with the drugs as described above. 0.5  $\mu$ M Rh123 was then added and the parasites incubated for a further 10 min. They were then washed twice, resuspended in PBS and analysed by flow cytometry in a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA) equipped with an argon laser operating at 488 nm. Fluorescence emission between 515 and 545 nm was quantified using the Cell Quest software. Parasites fully depolarized by incubation in 10  $\mu$ M FCCP for 10 min at 28°C were used as controls.

### Statistical analysis

Statistical comparisons between groups were performed using Student's *t*-test. Differences were considered significant at a level of  $p < 0.05$ .

## Results

### Generation of singly and drug combination resistant promastigote lines

The resistant lines were selected *in vitro* in *L. donovani* promastigotes by a stepwise adaptation process, with drug concentrations starting below the EC<sub>50</sub> values and gradually increasing, over 10 weeks (equivalent to 90 generations), to a maximum concentration of 0.1, 8, 20 and 80  $\mu$ M for AmB, MLF, PMM and Sb<sup>III</sup>, respectively. Resistance to single drugs and to double drug combinations was induced. The singly AmB-resistant line (A) and the lines resistant to the combination of AmB with MLF (AM), PMM (AP) or Sb<sup>III</sup> (AS) showed similar EC<sub>50</sub> values for AmB of 0.14  $\mu$ M, a value two-fold higher than for the WT line (Table 1). In contrast, the singly MLF-resistant line (M) and the lines resistant to the combination of MLF with AmB (AM) or PMM (MP) showed EC<sub>50</sub> values for MLF 1.81, 3.10, and 4.43-fold higher than for the WT line, respectively (Table 1). Likewise, the singly PMM-resistant line (P) and the lines resistant to combinations with AmB (AP), MLF (MP) or Sb<sup>III</sup> (SP), showed EC<sub>50</sub> values for PMM 11.02, 2.12, 14.25, and 18.35-fold higher than for the WT line, respectively (Table 1). Finally, the line resistant to Sb<sup>III</sup> alone (S) and the lines resistant to Sb<sup>III</sup> in combination with AmB (AS) or PMM (SP) showed EC<sub>50</sub> values for Sb<sup>III</sup> that were 3.04, 2.05, and 2.18-fold higher than for the WT line, respectively (Table 1). All the resistant lines showed a similar growth rate, morphology, motility and macrophage infectivity to the WT line (data not shown).

### Maintenance of drug resistance in intracellular amastigotes

We undertook additional experiments to determine whether the resistance to single drugs and drug combinations shown by the promastigote forms was maintained in intracellular amastigotes obtained after infection of mouse peritoneal macrophages (Table 2). The results indicated that the resistance indices to drugs in the different resistant intracellular amastigote lines were maintained and were very similar to those observed in their promastigote counterparts (Tables 1 and 2). The exception was the S-resistant

**Table 1.** Drugs sensitivity profile in *L. donovani* promastigote lines.

Lines	Drugs EC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)-Resistance Index			
	AmB	MLF	PMM	Sb <sup>III</sup>
WT	0.07±0.01	5.84±0.43	12.09±1.76	87.33±5.72
A	0.14±0.04* (2.00±0.57)	5.28±0.58 (0.90±0.16)	19.67±1.30**** (1.63±0.34)	74.38±4.98* (0.85±0.12)
M	0.07±0.03 (1.00±0.56)	10.56±1.06**** <sup>a</sup> (1.81±0.31)	6.93±0.80 (0.57±0.15)	92.23±7.09 (1.06±0.16)
P	0.07±0.02 (1.00±0.42)	4.98±0.38* (0.85±0.12)	133.29±12.36**** <sup>b,c</sup> (11.02±1.63)	138.15±15.54**** (1.58±0.29)
S	0.07±0.02 (1.00±0.42)	4.25±0.44*** (0.73±0.13)	109.34±2.94**** (9.04±0.85)	266.07±10.12**** <sup>d,e</sup> (3.04±0.32)
AM	0.14±0.04* (2.00±0.86)	18.03±1.07**** (3.09±0.40)	19.35±3.67* (1.60±0.53)	108.97±4.67**** (1.25±0.14)
AP	0.14±0.04* (2.00±0.86)	10.86±1.67**** (1.86±0.42)	25.67±2.26**** (2.12±0.40)	96.69±5.60 (1.11±0.14)
AS	0.14±0.04* (2.00±0.86)	5.79±0.40 (0.99±0.13)	22.82±2.92**** (1.89±0.51)	178.88±5.91**** (2.05±0.49)
MP	0.07±0.03 (1.00±0.56)	25.90±1.74**** (4.43±0.61)	172.27±3.52**** (14.25±1.35)	74.59±3.85** (0.85±0.10)
SP	0.07±0.02 (1.00±0.42)	4.61±1.02 (0.79±0.23)	221.88±30.15**** (18.35±2.15)	190.57±20.96**** (2.18±0.39)

Promastigote forms of *L. donovani* lines: wild-type (WT) and resistant lines to AmB (A), MLF (M), PMM (P), Sb<sup>III</sup> (S), AmB+MLF (AM), AmB+PMM (AP), AmB+Sb<sup>III</sup> (AS), MLF+PMM (MP), and Sb<sup>III</sup>+PMM (SP), were grown as described in Materials and Methods section for 72 h at 28°C in the presence of increasing concentrations of drugs. Cell viability was determined using an MTT-based assay. Resistance indexes, between parentheses, were calculated by dividing the EC<sub>50</sub> for each resistant line by that for WT line. Data are means of EC<sub>50</sub> or resistance indexes values  $\pm$  SD from three independent experiments. Significant differences versus the WT were determined using Student's *t*-test (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.005$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.001$ ) and for comparison of singly versus doubly-resistant lines (<sup>a</sup>:  $p < 0.001$  M vs. AM or MP; <sup>b</sup>:  $p < 0.05$  P vs. MP or SP; <sup>c</sup>:  $p < 0.001$  P vs. AP; <sup>d</sup>:  $p < 0.05$  S vs. SP; <sup>e</sup>:  $p < 0.005$  S vs. AS). doi:10.1371/journal.pntd.0001974.t001

line, which showed a significantly higher resistance index to Sb<sup>III</sup> (12-fold, Table 2) than that observed for the promastigote form (3-fold, Table 1). The higher resistance index for PMM in the singly P-resistant line (11-fold) and in the MP-(11- and 14-fold for intracellular amastigotes and promastigotes, respectively) and SP-resistant lines (16- and 18-fold for intracellular amastigotes and promastigotes, respectively) it worthy of note. Furthermore, a comparison of AP with P, and AS or SP with S, shows that the doubly resistant lines exhibit lower EC<sub>50</sub> values for PMM or Sb<sup>III</sup> than their singly resistant counterparts. In contrast, the SP line exhibits a higher EC<sub>50</sub> value for PMM than the P line (Table 2).

### Stability of resistance to drug combinations

The resistant phenotypes were stable in a drug-free medium for 1 month in the singly A-resistant and AM, AP, and AS doubly-resistant lines for AmB. In contrast, the remaining resistances were unstable, although the EC<sub>50</sub> values were higher than for the WT line, except for the M and AP lines, which lost resistance against MLF and PMM, respectively (Figure 1). After culture for four months in a drug-free medium, all lines lost their resistance levels either completely or partially, except the AP line, which maintained a similar initial resistance level for AmB (Figure 1). These findings suggest that the resistance phenotype of the induced drug combination resistance is unstable.

### Cross-resistance profile to drugs in resistant lines

We investigated the cross-resistance profile of the promastigote and intracellular amastigote forms of each resistant line to different anti-leishmanial drugs (Tables 1 and 2). Both the A- and S-resistant lines showed a significant cross-resistance profile to PMM (Table 1), and the P-resistant line showed resistance to Sb<sup>III</sup> (Table 1). However, the M and P lines only showed resistance to Sb<sup>III</sup> in their intracellular amastigote forms (Table 2). In the case of drug combination resistant lines, we found that the AP-resistant line showed significant cross-resistance to MLF in both its promastigote and intracellular amastigote forms. Similarly, the AS-resistant promastigote line shows cross-resistance to PMM, and the AM-resistant promastigote line shows cross-resistance to PMM

and Sb<sup>III</sup> (Tables 1 and 2). However, the MP and SP lines showed no cross-resistance to other anti-leishmanial drugs as either promastigotes or intracellular amastigotes (Tables 1 and 2). Our results concerning the stability of the cross-resistance in resistant lines maintained without drug pressure for one month showed that all lines maintained their resistance, except the AM line, which lost its cross-resistance to Sb<sup>III</sup> (Figure 2).

### Intracellular thiol levels in resistant lines

An increase in thiol levels has been considered to be one of the main detoxification mechanisms observed in lines selected for resistance to Sb<sup>III</sup> [21]. In light of this, we determined the total intracellular non-protein thiol content in the different resistant promastigote lines using CellTracker. The results of this study showed significantly higher thiol levels in the resistant lines than in the WT line, except for the M and S lines (Figure 3). The highest thiol values were found in the MP and SP lines. As expected, a drastic decrease in thiol content was observed in all lines after incubation with BSO (Figure 3).

### The effect of anti-leishmanial drugs on ATP synthesis in drug-resistant lines

We assessed the ATP levels in the presence of AmB, MLF and Sb<sup>III</sup>, which are known to induce an apoptotic-like process associated with ATP depletion in *Leishmania* [22]. PMM was not assessed as this drug kills the parasites by a different mechanism [22–24]. The WT parasites exhibited a significant decrease in total ATP levels after treatment with AmB, MLF or Sb<sup>III</sup>, with the former showing the highest decrease (Figure 4A). The lines resistant to single and drug combinations remained protected or were more tolerant to ATP loss (Figure 4A), with the AS-resistant line in particular showing a very small decrease in ATP levels after treatment with AmB or Sb<sup>III</sup>. A similarly small decrease in ATP levels was also observed after treatment of the M- and MP-resistant lines with MLF, and the S-resistant line with Sb<sup>III</sup> (Figure 4A). Additionally, we observed that the M- and S-resistant lines presented significantly higher basal ATP levels without drug pressure (Figure 4A), thus suggesting that these resistant lines have

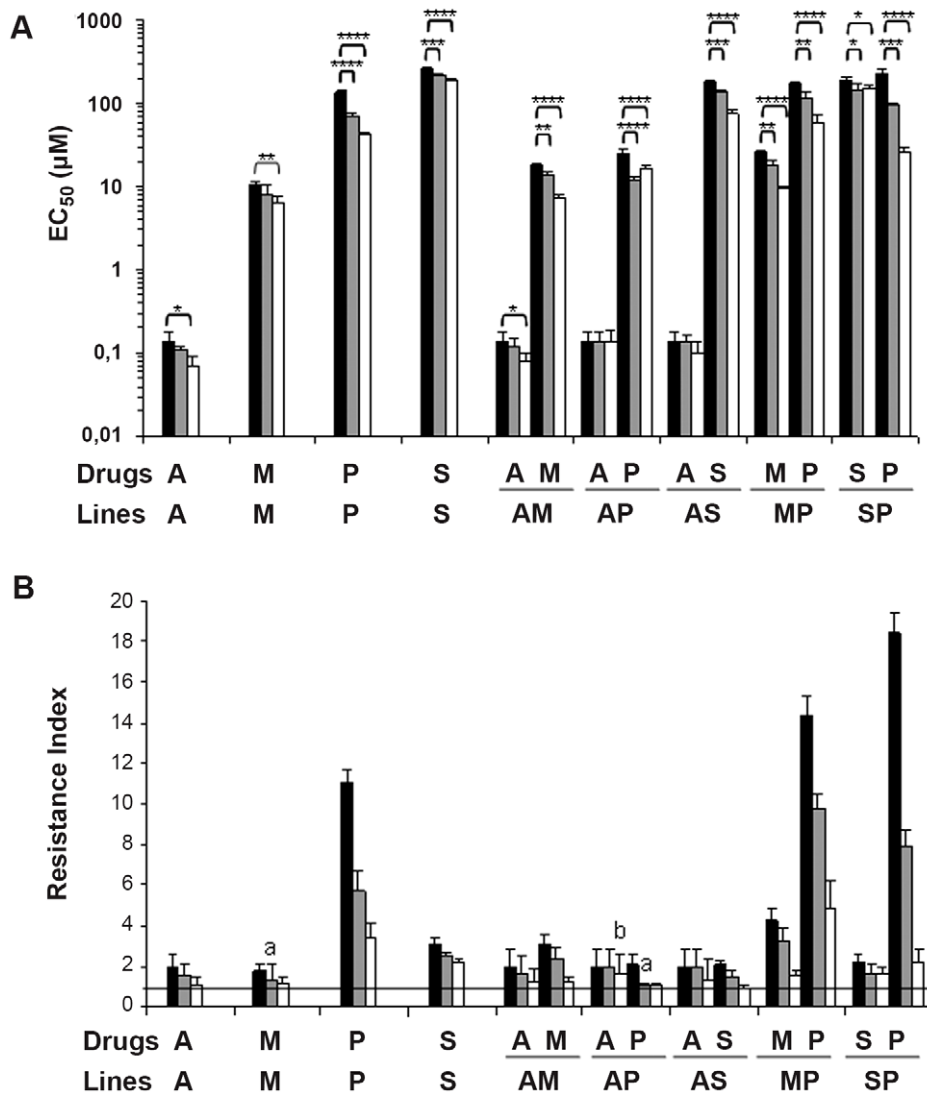
**Table 2.** Drugs sensitivity profile in *L. donovani* intracellular amastigote lines.

Lines	Drugs EC <sub>50</sub> (μM)-Resistance Index			
	AmB	MLF	PMM	Sb <sup>III</sup>
WT	0.027±0.002	2.18±0.43	3.93±0.60	3.66±0.14
A	0.057±0.003**** <sup>a</sup> (2.110±0.270)	2.03±0.33 (0.93±0.13)	4.43±0.45 (1.13±0.28)	2.38±0.19*** (0.65±0.07)
M	0.028±0.002 (1.037±0.145)	5.12±0.51*** (2.35±0.69)	5.26±0.35 (1.34±0.29)	5.11±0.46* (1.40±0.18)
P	0.026±0.003 (0.963±0.180)	1.98±0.23 (0.91±0.28)	41.45±3.78**** <sup>b,c</sup> (10.55±1.57)	4.66±0.35* (1.27±0.14)
S	0.024±0.002 (0.889±0.140)	2.08±0.17 (0.95±0.26)	4.36±0.53 (1.11±0.30)	44.47±4.23**** <sup>d,e</sup> (12.15±0.92)
AM	0.064±0.002**** (2.370±0.251)	4.62±0.39** (2.12±0.87)	3.45±0.49 (0.88±0.26)	3.36±0.23 (0.92±0.09)
AP	0.058±0.003**** (2.148±0.273)	3.98±0.41* (1.83±0.24)	7.10±0.62**** (1.81±0.43)	3.98±0.29 (1.09±0.09)
AS	0.042±0.003** (1.556±0.342)	3.46±0.54 (1.59±0.16)	3.93±0.51 (1.00±0.28)	6.61±0.57*** (1.81±0.22)
MP	0.036±0.004 (1.333±0.256)	7.09±1.07*** (3.25±1.31)	41.58±3.44**** (10.58±1.49)	3.48±0.27 (0.95±0.14)
SP	0.026±0.004 (0.963±0.226)	2.46±0.47 (1.13±0.23)	64.48±5.34**** (16.41±1.84)	14.05±2.04*** (3.84±0.69)

Intracellular amastigote *L. donovani* lines were obtained after infection of mouse peritoneal macrophages with the different promastigote resistant lines as described in Material and Methods section. After 72 h, drug activity was determined from the percentage of infected cells and the number of amastigotes by cells in drug-treated cultures versus non-treated cultures. Resistance indexes, between parentheses, were determined as previously described in Table 1. Data are means of EC<sub>50</sub> or resistance indexes values ± SD from three independent experiments. Significant differences versus the WT were determined using Student's *t*-test (·: *p*<0.05; \*\*: *p*<0.01; \*\*\*: *p*<0.005; \*\*\*\*: *p*<0.001) and for comparison of singly versus doubly-resistant lines (°: *p*<0.05 A vs. AS; °: *p*<0.05 P vs. SP; °: *p*<0.001 P vs. AP; °: *p*<0.005 S vs. SP; °: *p*<0.001 S vs. AS).

doi:10.1371/journal.pntd.0001974.t002





**Figure 1. Stability of resistance to drugs in *L. donovani* promastigote lines.** (A) The stability of resistance with respect to the initial EC<sub>50</sub> (black columns) is determined at 1 (gray columns) and 4 months (white columns) after removal of the drug pressure. The results shown are the average of three independent experiments  $\pm$  SD. Significant differences versus the initial EC<sub>50</sub> were determined using Student's *t*-test (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.01$ ; \*\*\*:  $p < 0.005$ ; \*\*\*\*:  $p < 0.001$ ). (B) Results from panel A expressed in terms of the resistance index. The horizontal black line represents a resistance index of 1 equivalent to a completely loss of resistance. <sup>a</sup>: line that lose resistance after 1 month in a drug-free medium; <sup>b</sup>: line that maintain similar initial resistance levels after 4 months in a drug-free medium. doi:10.1371/journal.pntd.0001974.g001

developed, amongst other resistance mechanisms, an increase in ATP levels. In contrast, the AM- and AP-resistant lines presented significantly lower basal ATP levels (Figure 4A).

#### Tolerance to drug-induced depolarization of $\Delta\Psi_m$ in drug-resistant lines

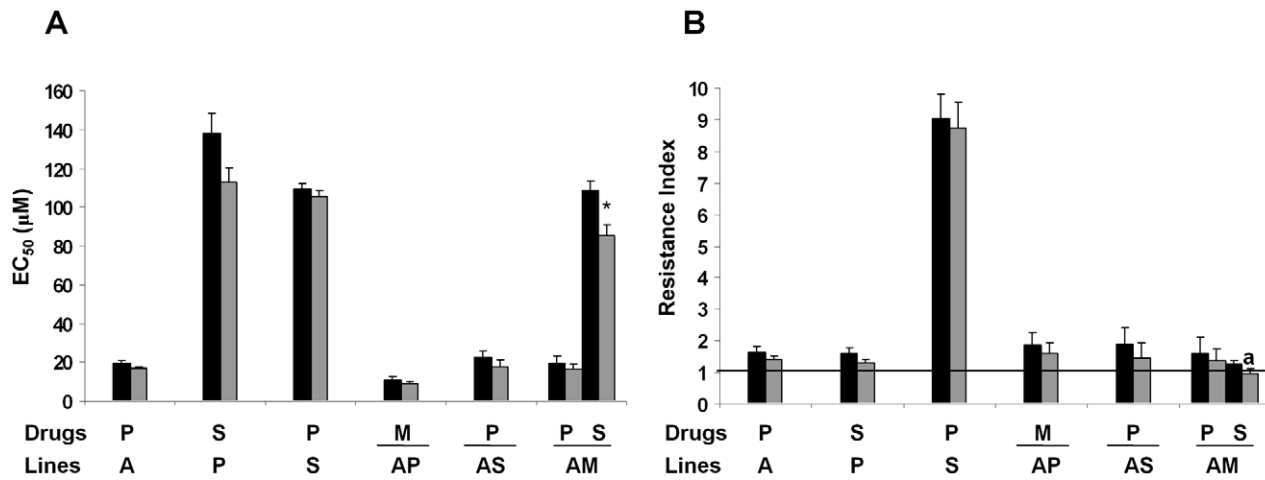
$\Delta\Psi_m$  is essential to mitochondrial ATP synthesis and changes to it are one of the markers for apoptosis induced by exposure to AmB, MLF and Sb<sup>III</sup> (but not exposure to PMM) [22]. Furthermore, mitochondrial oxidative phosphorylation in *Leishmania* accounts for most of the ATP expenditure of *Leishmania* parasites [25]. As a result, we tested the  $\Delta\Psi_m$  of WT and the various resistant lines by measuring Rh123 accumulation (Figure 4B). WT parasites incubated with AmB, MLF or Sb<sup>III</sup> showed a significant decrease in Rh123 accumulation (7.7-, 2.6- and 1.4-fold, respectively). These values (except for that for Sb<sup>III</sup>)

were even lower than those obtained upon incubation of parasites with the control uncoupling reagent FCCP (Figure 4B). Except for the M-resistant line, the untreated resistant lines showed a significantly lower accumulation of Rh123; however, after treatment with the different anti-leishmanial drugs, the resistant lines showed a lower reduction ratio of Rh123 accumulation than the WT line (Figure 4B). Consequently, the resistant parasites remain protected against the oxidative stress induced by treatment with the anti-leishmanial drugs AmB, MLF and Sb<sup>III</sup>.

#### Discussion

Drug combinations for the treatment of leishmaniasis represent a promising and challenging chemotherapeutic strategy that has recently been implemented in different endemic areas. This approach has several advantages over single-drug therapies, including shortening of the treatment period and reduction of

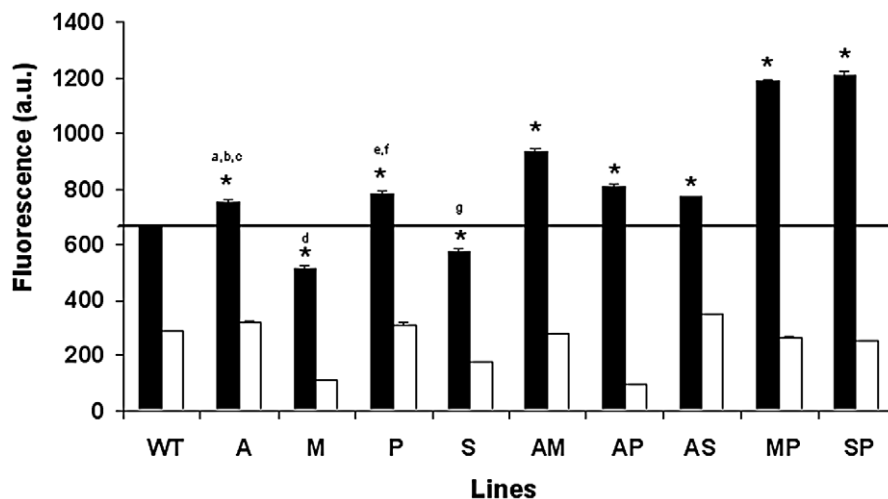




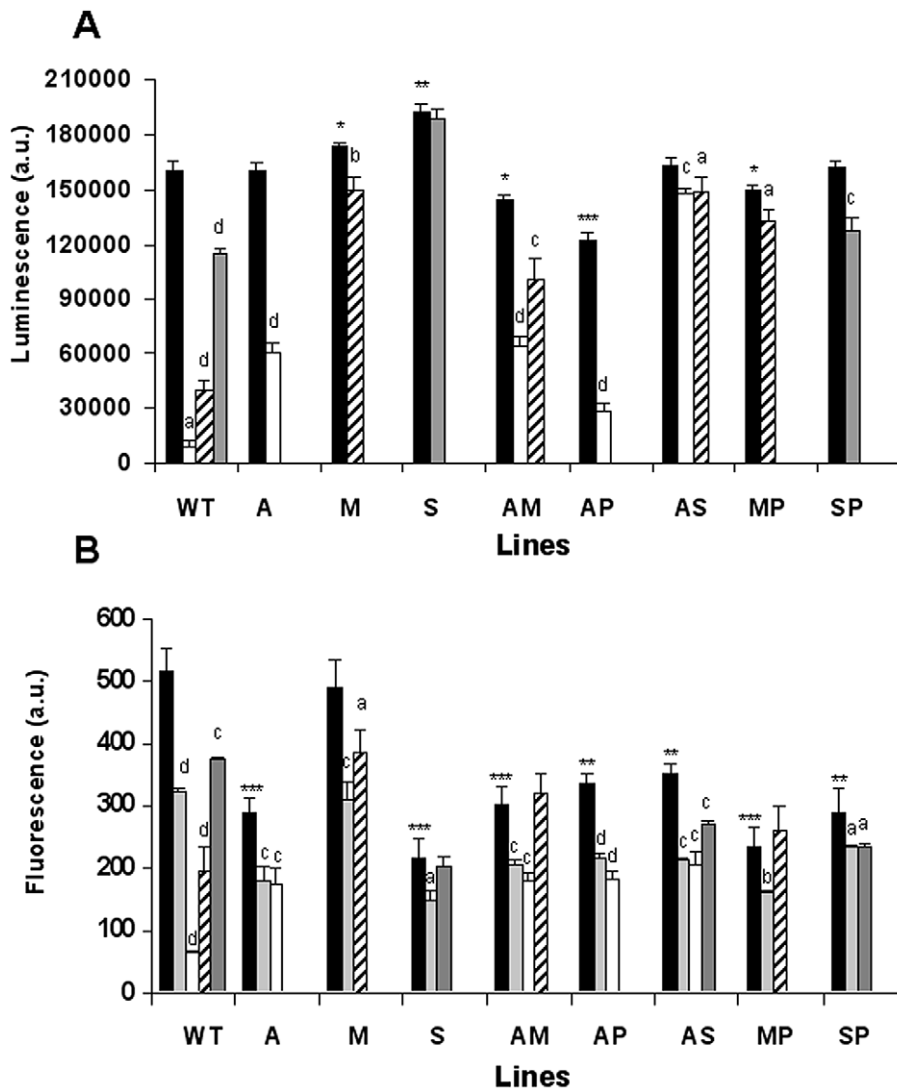
**Figure 2. Stability of cross-resistance to drugs in *L. donovani* promastigote lines.** (A) The stability of cross-resistance at 1 month after removal of drug pressure (gray columns), relative to initial EC<sub>50</sub> (black columns), was determined. The results are the average of three independent experiments  $\pm$  SD. Significant differences versus the initial EC<sub>50</sub> were determined using Student's *t*-test (\*:  $p < 0.005$ ). (B) Results from panel A expressed in terms of resistance index. The horizontal black line represents a resistance index of 1 equivalent to a completely loss of resistance. <sup>a</sup>: line that lose resistance after 1 month in a drug-free medium. doi:10.1371/journal.pntd.0001974.g002

the probability of selecting drug-resistant parasites. However, this approach must be used with care given to the possibility that, if not applied in a controlled and regulated way, resistance could be induced in *Leishmania*, thus resulting in a rapid loss of efficacy of not one but two therapeutic options [13]. It is therefore important to design relevant experimental studies in order to determine whether *Leishmania* parasites are able to develop resistance to the different potential anti-leishmanial drug combinations that are likely to be used in the near future. The results obtained from such experimental studies could help to predict the likely success of drug combination therapy.

There is still a great deal of debate concerning the clinical relevance of findings in promastigotes since this is not the stage that will eventually become exposed to the drug. It has recently been shown that differences can be obtained during the experimental induction of resistance to PMM using promastigotes and intracellular amastigotes depending on the resistance-selection protocol [26]. The methodology and technical difficulties required in inducing resistance to drug combinations justify the use of promastigote forms in this manuscript. However, experiments using intracellular amastigotes derived from resistant promastigotes could be useful when considering future recommendations



**Figure 3. Thiol levels in *L. donovani* promastigote lines.** Log-phase promastigotes from WT and resistant lines were labelled with 2  $\mu$ M CellTracker (black columns), and fluorescence was analyzed as described in the Materials and Methods section. Promastigotes were depleted of thiols by treatment with 3 mM BSO (a  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase inhibitor) for 48 h at 28°C (white columns). The results are the average of three independent experiments  $\pm$  SD. All lines show significant differences with respect to WT (\*:  $p < 0.001$ ) and when comparing singly versus doubly-resistant lines using Student's *t*-test (<sup>a</sup>:  $p < 0.05$  A vs. AS; <sup>b</sup>:  $p < 0.005$  A vs. AP; <sup>c</sup>:  $p < 0.001$  A vs. AM; <sup>d</sup>:  $p < 0.001$  M vs. AM or MP; <sup>e</sup>:  $p < 0.05$  P vs. AP; <sup>f</sup>:  $p < 0.001$  P vs. MP or SP; <sup>g</sup>:  $p < 0.001$  S vs. AS or SP). The black line indicates the threshold at which the thiol levels have been modified with respect to WT. doi:10.1371/journal.pntd.0001974.g003



**Figure 4. Effect of anti-leishmanial drugs on ATP synthesis and  $\Delta\Psi_m$  in resistant *L. donovani* promastigote lines.** (A) ATP levels were measured using CellTiter-Glo. (B)  $\Delta\Psi_m$  was measured by determining the accumulation of Rh123 (0.5  $\mu\text{M}$ ) in WT and resistant lines. In both cases, promastigote log-phase cultures were left untreated (controls, black columns) or exposed to 0.2  $\mu\text{M}$  AmB (white columns), 25  $\mu\text{M}$  MLF (oblique lines columns) for 3 h, 2 mM  $\text{Sb}^{\text{III}}$  (gray columns) for 8 h, or 10  $\mu\text{M}$  FCCP as a depolarization control (light gray columns) for 10 min. Measurements are expressed in arbitrary luminescence (panel A) or fluorescence (panel B) units  $\pm$  SD from three independent experiments and show significant differences (<sup>a</sup>:  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup>:  $p < 0.01$ ; <sup>c</sup>:  $p < 0.005$ ; <sup>d</sup>:  $p < 0.001$ ) when comparing the corresponding control values for each line with itself after treatment. A comparison of the different untreated lines with untreated WT lines also shows significant differences (\*:  $p < 0.05$ ; \*\*:  $p < 0.005$ ; \*\*\*:  $p < 0.001$ ). doi:10.1371/journal.pntd.0001974.g004

for optimal drug combinations to combat different *Leishmania* species.

Studies in clinically resistant isolates, where the mechanisms of resistance involve multi-factorial events that contribute to the tolerance to chemotherapeutic agents in *Leishmania*, are somewhat more complex [27,28]. In this paper, we have induced experimental resistance to the drug combinations AM, AP, AS, MP and SP in *L. donovani* (MHOM/ET/67/HU3, also known as LV9 or L82). The sensitivity values of the parental *L. donovani* strain to the different anti-leishmanial drugs used were similar to, or even lower than, the published data for this and other *L. donovani* strains [11,26,29–31]. It is important to point out that this is the first description of an experimental induction of resistance to a combination of different anti-leishmanial drugs. Consequently, the conditions and times required for the induction of resistance can not be compared to the previously described induction of

resistance to single anti-leishmanial drugs. Additionally, the single-drug resistance studies in *L. donovani* described by different groups, obtained higher levels of resistance after increasing the drug pressure and exposure times. Thus, an approximately 14-fold resistance has been obtained for MLF resistance [32], an approximately 5- to 11-fold resistance for PMM, depending on the *L. donovani* strain used [26], and an approximately 20-fold resistance for AmB [31]. Moreover, it is important to note that, in clinical isolates resistant to sodium stibogluconate, an up to 41-fold higher tolerance to  $\text{Sb}^{\text{III}}$  has been observed with respect to the susceptible clones of promastigote forms in the stationary growth phase [27].

In summary, the results of this study show that *L. donovani* can easily develop resistance to the drug combinations MLF/PMM and  $\text{Sb}^{\text{III}}$ /PMM, with higher resistance indices than those found for AmB/MLF, AmB/PMM or AmB/ $\text{Sb}^{\text{III}}$ . These results have

been validated in intracellular amastigotes and are of considerable interest for future applications. Experimental resistance of *L. donovani* to the drug combination MLF/PMM, a combination that could, in theory, have advantages over other drug combinations as regards future use, is easily achieved. Similarly, the experimental studies described herein confirm how the ease with which experimental resistance to Sb<sup>III</sup>/PMM is induced in *Leishmania*. These studies should therefore be taken into account when it comes to future recommendations for their use in endemic areas, especially as the Sb<sup>III</sup>/PMM combination appears to be effective against VL (in East Africa) and has the additional advantage of low cost [7]. Consequently, further research into combination regimens when given for a short period and at lower total dose are required.

We have also confirmed that *Leishmania*-resistant parasites develop an increase in cellular thiol redox metabolism as a drug-detoxification mechanism to protect against drug-induced loss of ATP and mitochondrial membrane potential. As described previously, the anti-leishmanial drugs AmB, MLF and Sb<sup>III</sup> (but not PMM) induce a significant decrease in the mitochondrial membrane potential, thus leading to a bioenergetic collapse of the parasite and drug-induced cell-death [22]. A link between the mode of killing of drugs against *Leishmania infantum* (such as AmB, MLF and Sb, which share a similar mode of killing), and the tolerance towards cell death induced by their respective anti-leishmanial drugs, has been described previously [22]. Although, in contrast to PMM, this was thought to facilitate the emergence of multidrug resistance, similar findings were not observed under our experimental conditions. Instead, our results show a significant cross-resistance profile to PMM in the AM- and AS-resistant lines and to MLF in the AP-resistant line. Conversely, the AP-resistant intracellular amastigote line acquired cross-resistance to MLF. A similar absence of a link between cross-resistance to drugs with

similar mechanism-of-death pathways was observed in the singly A- and S-resistant promastigote lines, with a cross-resistance to PMM, and in the P-resistant line, with resistance to Sb<sup>III</sup>. The absence of any such correlation could be explained by taking into account that different *Leishmania* species present different drug susceptibilities and different abilities to respond to drug pressure.

In light of the characteristics of this infectious disease and the existence of different *Leishmania* species, with their different drug susceptibilities, it is possible that each *Leishmania* species will require a different drug combination. Suitable options for combination treatment must therefore be optimised in further experimental studies. In this respect, genome-sequencing and metabolomics experiments are currently underway to determine the specific resistance mechanisms developed by *Leishmania* parasites to different drug combinations. Finally, in view of the proven value of these results for the research community, and considering the debate as regards the use of promastigotes or intracellular amastigotes for induction of drug resistance to drug combinations, we are currently attempting to induce resistance to drug combinations in intracellular amastigotes, as the results obtained will be of greater significance in terms of the conditions found in the field.

## Acknowledgments

The authors acknowledge the support of Zentaris GmbH for the miltefosine used throughout this research work. We are grateful to Dr. Jorge Alvar for his valuable comments on the manuscript.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FG SC. Performed the experiments: RG JIM. Analyzed the data: FG SC RG. Contributed reagents/materials/analysis tools: FG SC. Wrote the paper: FG SC RG.

## References

- Bryceson A (2001) A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. *Trop Med Int Health* 6: 928–934.
- Chunge CN, Owate J, Pamba HO, Donno L (1990) Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 84: 221–225.
- Olliaro PL, Guerin PJ, Gerstl S, Haaskjold AA, Rottingen JA, et al. (2005) Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980–2004. *Lancet Infect Dis* 5: 763–774.
- Sundar S, Rai M, Chakravarty J, Agarwal D, Agarwal N, et al. (2008) New treatment approach in Indian visceral leishmaniasis: single-dose liposomal amphotericin B followed by short-course oral miltefosine. *Clin Infect Dis* 47: 1000–1006.
- Meheus F, Balasegaram M, Olliaro P, Sundar S, Suman R, et al. (2010) Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e818.
- Sundar S, Sinha PK, Rai M, Verma DK, Nawin K, et al. (2011) Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet* 377: 477–486.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, et al. (2012) WHO Leishmaniasis control team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7: e35671.
- Richard JV, Werbovetz KA (2010) New antileishmanial candidates and lead compounds. *Curr Opin Chem Biol* 14: 447–455.
- Sundar S (2001) Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 6: 840–854.
- Olliaro PL (2010) Drug combinations for visceral leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* 23: 595–602.
- Seifert K, Croft SL (2006) In vitro and in vivo interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 73–79.
- Omollo R, Alexander N, Edwards T, Khalil EA, Younis BM, et al. (2011) Safety and Efficacy of miltefosine alone and in combination with sodium stibogluconate and liposomal amphotericin B for the treatment of primary visceral leishmaniasis in East Africa: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials* 12: 166.
- van Griensven J, Balasegaram M, Meheus F, Alvar J, Lynen L, et al. (2010) Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 10: 184–194.
- Chiquero MJ, Perez-Victoria JM, O'Valle F, González-Ros JM, del Moral RG, et al. (1998) Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. *Biochem Pharmacol* 55: 131–139.
- Seifert K., Matu S, Pérez-Victoria F, Castany S, Gamarro F, et al. (2003) Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int J Antimicrob Agents* 22: 380–387.
- Kennedy ML, Cortés-Selva F, Pérez-Victoria JM, Jiménez IA, González AG, et al. (2001) Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *J Med Chem* 44: 4668–4676.
- Seifert K, Pérez-Victoria FJ, Stettler M, Sánchez-Cañete MP, Castany S, et al. (2007) Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists in vivo. *Int J Antimicrob Agents* 30: 229–235.
- Sarkar A, Mandal G, Singh N, Sundar S, Chatterjee M (2009) Flow cytometric determination of intracellular non-protein thiols in *Leishmania* promastigotes using 5-chloromethyl fluorescein diacetate. *Exp Parasitol* 122: 299–305.
- Manzano JI, Carvalho L, Pérez-Victoria JM, Castany S, Gamarro F (2011) Increased glycolytic ATP synthesis is associated with Tafenoquine resistance in *Leishmania major*. *Antimicrob Agents Chemother* 55: 1045–1052.
- Carvalho L, Luque-Ortega JR, Manzano JI, Castany S, Rivas L, et al. (2010) Tafenoquine, an antiparasitic 8-aminoquinoline, targets *Leishmania* respiratory Complex III and induces apoptosis. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 5344–5351.
- Mukhopadhyay R, Dey S, Xu N, Gade D, Lightbody J, et al. (1996) Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 10383–10387.
- Moreira W, Leprohon P, Ouellette M (2011) Tolerance to drug-induced cell death favours the acquisition of multidrug resistance in *Leishmania*. *Cell Death Dis*: doi: 10.1038.
- Maarouf M, Lawrence F, Croft SL, Robert-Gero M (1995) Ribosomes of *Leishmania* are a target for the aminoglycosides. *Parasitol Res* 81: 421–425.
- Maarouf M, de Kouchkovsky Y, Brown S, Petit PX, Robert-Gero M (1997) In vivo interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Exp Cell Res* 232: 339–348.
- Van Hellemond JJ, Tielens AG (1997) Inhibition of the respiratory chain results in a reversible metabolic arrest in *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 85: 135–138.

26. Hendrickx S, Inocêncio da Luz R, Bhandari V, Kuypers K, Shaw CD, et al. (2012). Experimental induction of paromomycin resistance in antimony-resistant strains of *L. donovani*: outcome dependent on in vitro selection protocol. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1664.
27. Decuyper S, Vanaerschot M, Bruncker K, Imamura H, Müller S, et al. (2012). Molecular mechanisms of drug resistance in natural *Leishmania* populations vary with genetic background. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1514.
28. Bhandari V, Kulshrestha A, Deep DK, Stark O, Prajapati VK, et al. (2012). Drug susceptibility in *Leishmania* isolates following miltefosine treatment in cases of visceral leishmaniasis and post kala-azar dermal leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1657.
29. Seifert K, Escobar P, Croft SL (2010). In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *J Antimicrob Chemother* 65: 508–511.
30. Vermeersch M, da Luz RI, Toté K, Timmermans JP, Cos P, et al. (2009). In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 3855–3859.
31. Mbongo N, Loiseau PM, Billion MA, Robert-Gero M (1998). Mechanism of Amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 352–357.
32. Pérez-Victoria FJ, Sánchez-Cañete MP, Seifert K, Croft SL, Sundar S, et al. (2006). Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resist Updat* 9: 26–39.



## **ANEXO 4**

### **Oxazolo[3,2-a]pyridine. A new structural scaffold for the reversal of multi-drug resistance in *Leishmania*.**

**Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 22:6272-5; 2012.**

Esther Caballero , José Ignacio Manzano, Pilar Puebla, Santiago Castanys, Francisco Gamarro y Arturo San Feliciano.

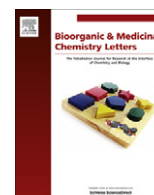
Compuestos pertenecientes a tres diferentes clases de sistemas heterocíclicos fusionados, estructuralmente relacionados con bloqueantes de canales de calcio de la familia 1,4-dihidropiridina, se evaluaron en su capacidad para revertir la resistencia a fármacos leishmanicidas comunes en una línea MDR de *Leishmania tropica*. Compuestos con un esqueleto de oxazolo[3,2-a]piridina mostraron una reversión significativa de la resistencia a daunomicina y miltefosina con índices de reversión de 6,7 y 8,7 veces, respectivamente. Lo más interesante es que el compuesto enantiopuro 20S alcanzó a revertir la resistencia a ambos fármacos y de forma más significativa que su enantiómero 20R.





Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Bioorganic &amp; Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/bmcl](http://www.elsevier.com/locate/bmcl)

## Oxazolo[3,2-*a*]pyridine. A new structural scaffold for the reversal of multi-drug resistance in *Leishmania*

Esther Caballero<sup>a,\*</sup>, José Ignacio Manzano<sup>b</sup>, Pilar Puebla<sup>a</sup>, Santiago Castanys<sup>b</sup>, Francisco Gamarro<sup>b,\*</sup>, Arturo San Feliciano<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Química Farmacéutica, Facultad de Farmacia, CIETUS, IBSAL, Universidad de Salamanca, 37007-Salamanca, Spain

<sup>b</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina 'López Neyra', IPBLN-CSIC, Granada, Spain

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 12 July 2012

Revised 26 July 2012

Accepted 30 July 2012

Available online 10 August 2012

## Keywords:

Oxazolo[3,2-*a*]pyridines

MDR-reversal

Leishmaniasis

Daunomycin

Miltefosine

## ABSTRACT

Compounds belonging to three different classes of fused heterocyclic systems, structurally related to Calcium-channel blockers of the 1,4-dihydropyridine family, were evaluated in their ability to overcome leishmanial resistance to common drugs in a MDR *Leishmania tropica* strain. Compounds with the skeletal basis of oxazolo[3,2-*a*]pyridine displayed significant reversion of resistance to daunomycin and miltefosine, with reversion indexes up to 6.7-fold and 8.7-fold, respectively. Most interestingly, the enantiopure compound **20S** attained to revert the resistance to both drugs and fairly more significantly than its enantiomer **20R**.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Leishmaniasis is a poverty-related neglected disease characterized by its high morbidity, being the most important emerging and uncontrolled infectious disease and the second cause of death among the protozoan parasitic diseases, after Malaria. Globally there are an estimated 70,000 deaths each year and 350 million people are at risk of infection. To date there are no protective vaccines, and chemotherapy is the only effective weapon, limited to a few first-line drugs, including miltefosine, paromomycin, amphotericin B and its derivatives, along with pentavalent antimonials, although the latter are no longer effective in endemic areas as in Bihar (India) due to drug resistance. One of the major problems of leishmaniasis chemotherapy is the intrinsic or acquired resistance of parasites to the available drugs. ATP-binding cassette (ABC) transporters are commonly involved in the resistance to different antiparasitic drugs such as antimonials,<sup>1</sup> pentamidine,<sup>2</sup> miltefosine,<sup>3</sup> and sitamaquine.<sup>4</sup> *Leishmania* P-glycoprotein-like transporter (Pgp-like) is included in the ABC subfamily B and its overexpression confers a multi-drug resistance (MDR) phenotype involved in a significantly reduction in intracellular accumulation of drugs, similar to that characterised in mammalian cells overexpressing Pgp.<sup>5,6</sup> Inhibitors of Pgp have thus been advocated as promising candidates for overcoming MDR.

Parasite resistance to drugs has emerged as a major problem in current medicine, and therefore, there is great clinical interest in

developing compounds that overcome resistances with lower host toxicity.<sup>7</sup> Several types of compounds with diverse levels of MDR reversal properties have been described.<sup>8</sup> One of the physio-pharmacological categories of drugs displaying such reversion ability is that of Calcium channel blockers represented by verapamil and nifedipine related drugs.<sup>9</sup> Here we report on the evaluation of the MDR reversal abilities of representative members of three types of fused heterocyclic compounds structurally related to nifedipine and 1,4-dihydropyridines, that had previously displayed long-acting antihypertensive effects, presumably due to its probable Ca<sup>2+</sup>-channel blocker pro-drug character.<sup>10</sup>

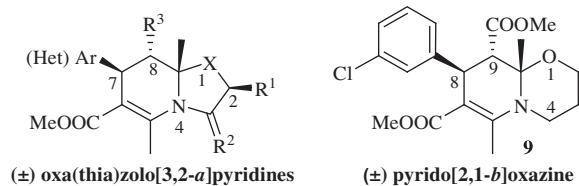
The syntheses of the heterocyclic compounds shown in Table 1 were achieved following the known Hantzsch procedure as previously reported (Scheme 1).<sup>11</sup> This methodology afforded compounds **1–7** in good yields, starting with enamines of acetoacetate esters obtained from 2-aminoethanol (compounds **1–4**, **6** and **7**, Table 1) and 1-amino-2-propanol (**5**). The use of thi-ethanolamine enamine led to the thiazolopyridine **8** and that of 3-aminopropanol enamine rendered the pyrido-oxazine **9**.

Compounds **1–9** include three types of fused heterocyclic systems, with seven diversely substituted oxazolo[3,2-*a*]pyridines, one thiazolo[3,2-*a*]pyridine and one pyrido[2,1-*b*]oxazine, which were initially evaluated in their MDR reversal potentiality on promastigotes of a highly daunomycin-resistant strain of *Leishmania tropica*.<sup>12</sup> Daunomycin (DNM) resistance in this line is related to a decreased intracellular drug accumulation mainly due to the Pgp-like transporter overexpression.<sup>13</sup> This resistant line

\* Corresponding authors. Tel.: +34 923294528 (E.C.), +34 958181667 (F.G.).

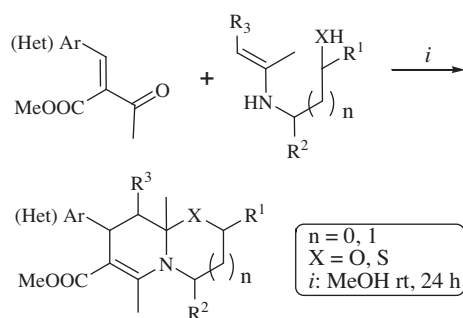
E-mail addresses: [escab@usal.es](mailto:escab@usal.es) (E. Caballero), [gamarro@ipb.csic.es](mailto:gamarro@ipb.csic.es) (F. Gamarro).



**Table 1**Structures and growth inhibition results (%) of wild-type (WT) and MDR *L. tropica* lines by daunomycin (DNM, 150  $\mu$ M) in the presence of selected heterocyclic compounds

Compound	X	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	Ar (Het)	[Comp.] = 3 $\mu$ M		[Comp.] = 6 $\mu$ M		[Comp.] = 8 $\mu$ M	
						WT	MDR	WT	MDR	WT	MDR
<b>1</b>	O	H	H,H	CH <sub>2</sub> OH	3-NO <sub>2</sub> Ph	<10	<10	<10	<10	<10	26.3 $\pm$ 0.2
<b>2</b>	O	H	H,H	COOMe	3-NO <sub>2</sub> Ph	<10	<b>75.3 <math>\pm</math> 2.3</b>	<10	<b>92.3 <math>\pm</math> 0.9</b>	21.8 $\pm$ 1.0	<b>97.6 <math>\pm</math> 0.5</b>
<b>3</b>	O	H	H,H	COOBn	3-NO <sub>2</sub> Ph	<10	23.9 $\pm$ 1.0	16.4 $\pm$ 0.2	71.6 $\pm$ 3.7	65.1 $\pm$ 3.3	<b>93.3 <math>\pm</math> 0.4</b>
<b>4</b>	O	H	H,H	COOBn	3-ClPh	<10	<10	<10	<10	<10	<10
<b>5</b>	O	Me	O	COOMe	3-ClPh	<10	<10	<10	<10	<10	<10
<b>6</b>	O	H	H,H	COOMe	2-furyl	<10	<10	<10	<10	<10	<10
<b>7</b>	O	H	H,H	COOMe	2-pyrrolyl	<10	57.3 $\pm$ 3.3	<10	<b>77.8 <math>\pm</math> 1.5</b>	<10	<b>80.3 <math>\pm</math> 4.2</b>
<b>8</b>	S	H	H,H	COOMe	3-ClPh	<10	43.2 $\pm$ 2.5	<10	<b>78.9 <math>\pm</math> 2.0</b>	<10	<b>83.8 <math>\pm</math> 5.8</b>
<b>9</b>	S	H	H,H	COOMe	3-ClPh	<10	18.1 $\pm$ 0.2	<10	36.8 $\pm$ 1.1	<10	74.8 $\pm$ 3.6

Data shown are the average of three independent experiments  $\pm$  SD, relative to the control, grown in the absence of DNM and compounds. Values above 75% inhibition are boldfaced to facilitate comparisons.



**Scheme 1.** The synthesis of oxa(thia)zolo[3,2-*a*]pyridines ( $n = 0$ ) and pyrido[2,1-*b*]oxazines ( $n = 1$ ).

has an MDR phenotype similar to tumour cells, with a cross-resistance profile to several unrelated drugs and an overexpressed drug-efflux Pgp-like transporter (LMDR1).<sup>14</sup> The wild-type (WT) *L. tropica* LCR-strain was also included in the assays. To determine the intrinsic toxicity of compounds, the WT and MDR *Leishmania* lines were exposed to compounds in the absence of DNM.<sup>15</sup> The cytotoxicity of compounds for human myelomonocytic THP-1 cells was also determined,<sup>16</sup> and the results (data not shown) showed that these compounds present a significantly low toxicity with IC<sub>50</sub> values higher than 400  $\mu$ M.

In order to assess the chemosensitising activity of the compounds, promastigotes of the *L. tropica* MDR line were exposed to both 150  $\mu$ M DNM and three different concentrations (3, 6 and 8  $\mu$ M) of the compounds in racemic form. The preliminary evaluation results included in Table 1 showed that several oxazolo[3,2-*a*]pyridines were able to revert the resistance to DNM and that compound **2** achieved a 75% parasite inhibition after 72 h at a low 3  $\mu$ M concentration. Additionally, compounds **7**, **8** and **9** displayed a moderate MDR reversal activity with lower toxicity.

These encouraging results moved us to design and perform new evaluation experiments focused on establishing IC<sub>50</sub> values of resistance reversion for the most active compounds. Considering that the MDR *Leishmania* line showed a significant cross-resistance to miltefosine (MLF),<sup>16</sup> the IC<sub>50</sub> and the reversal index (RI) values to DNM and MLF were determined for compounds **2**, **7**, **8** and **9**.

Parasites were exposed to increasing concentrations of drugs in the absence or presence of a 6  $\mu$ M concentration of the compounds. The RI is defined as the ratio between the IC<sub>50</sub> values found for a certain drug in absence or in presence of each compound. In other words, a RI value of 3 indicates a 3-fold enhancement of drug effectiveness against the multi-resistant parasite. The calculated maximum RI value with DNM (ratio between IC<sub>50</sub> values for MDR and parental drug-sensitive parasites) is 64. The maximum RI value with MLF is 22.

As shown in Table 2, the selected compounds showed RI values ranging from 3.9 to 1.3 for DNM, and from 3.5 to 1.5 for MLF. As can be observed, among the oxazolo[3,2-*a*]pyridines, compound **2** displayed the strongest MDR reversal potential with RI values of 3.9 and 3.4 for both drugs DNM and MLF, respectively. These values are of the same order and comparable to those obtained with **Cuzco 5** (1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ -diacetoxy-6 $\beta$ ,9 $\beta$ -difuroxyloxy-4 $\beta$ -hydroxydihydro- $\beta$ -agarofuran), a known and rather complex natural sesquiterpenoid isolated from *Maytenus canariensis*, being considered up to date as the most promising reversal compound of MDR phenotype in *Leishmania*.<sup>18</sup> Consequently, **Cuzco 5** was used in this research as the positive control of MDR reversion.

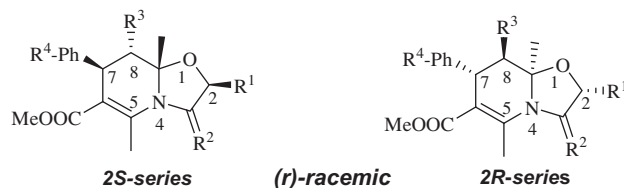
Aiming at discovering better MDR reversal agents of this type, we evaluated a larger number of oxazolo[3,2-*a*]pyridines, including several enantiomerically pure compounds. The structures of the evaluated compounds **10–25** are shown in Table 3. The enantioselective synthesis of 2,3,8,8a-tetrahydro-7*H*-oxazolo[3,2-*a*]pyridines

**Table 2**Quantitative effects of compounds **2**, **7**, **8**, and **9** on the IC<sub>50</sub> values for daunomycin (DNM) and miltefosine (MLF) in the MDR *L. tropica* line

Compound (6 $\mu$ M)	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) for DNM	RI <sub>DNM</sub>	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) for MLF	RI <sub>MLF</sub>
–	179.8 $\pm$ 1.1	–	239.5 $\pm$ 2.1	–
<b>2</b>	47.0 $\pm$ 6.4	<b>3.9</b>	70.8 $\pm$ 3.9	<b>3.4</b>
<b>7</b>	138.6 $\pm$ 4.4	1.3	123.2 $\pm$ 2.7	1.9
<b>8</b>	83.0 $\pm$ 4.0	2.2	69.2 $\pm$ 6.3	<b>3.5</b>
<b>9</b>	55.7 $\pm$ 0.4	<b>3.2</b>	161.2 $\pm$ 2.8	1.5
<b>Cuzco5</b>	38.3 $\pm$ 0.6	<b>4.7</b>	39.7 $\pm$ 2.1	<b>6.0</b>

IC<sub>50</sub> values for the WT line in absence of compounds were: 2.8  $\pm$  0.1 (DNM), and 10.9  $\pm$  2.1 (MLF). RI values above 3.0 are boldfaced for comparison purposes. Data are expressed as average  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) of concentrations of DNM and MLF necessary to inhibit parasite growth by 50%.

**Table 3**  
Resistance reversal effects for further oxazolo[3,2-*a*]pyridine derivatives on the MDR line of *L. tropica*



Compound (6 $\mu$ M)	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	R <sup>4</sup>	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) for DNM	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) for MLF
—					179.8 $\pm$ 1.1	239.5 $\pm$ 2.1
<b>10(r)</b>	H	H,H	CH <sub>2</sub> OAc	3-NO <sub>2</sub>	179.7 $\pm$ 4.2	131.7 $\pm$ 0.0
<b>11(r)</b>	H	H,H	COOMe	3-Cl	189.0 $\pm$ 2.0	154.2 $\pm$ 4.2
<b>12(r)</b>	H	H,H	COOEt	3-NO <sub>2</sub>	187.6 $\pm$ 2.1	185.1 $\pm$ 5.4
<b>13(r)</b>	H	H,H	COOEt	3-Cl	206.7 $\pm$ 11	124.5 $\pm$ 1.4
<b>14(r)</b>	H	H,H	COOAllyl	3-Cl	<b>34.2 <math>\pm</math> 0.4</b>	71.1 $\pm$ 2.4
<b>15(r)</b>	H	H,H	COOtBu	3-NO <sub>2</sub>	187.9 $\pm$ 2.2	238.3 $\pm$ 8.4
<b>16(r)</b>	H	H,Et	COOMe	3-NO <sub>2</sub>	54.2 $\pm$ 0.8	58.1 $\pm$ 0.6
<b>17(r)</b>	H	H,Et	COOMe	3-Cl	56.9 $\pm$ 2.1	<b>38.7 <math>\pm</math> 0.3</b>
<b>18S</b>	Me	H,H	CH <sub>2</sub> OAc	3-Cl	50.7 $\pm$ 0.3	55.1 $\pm$ 2.3
<b>19(r)</b>	Me	H,H	COOMe	3-NO <sub>2</sub>	173.5 $\pm$ 3.5	133.7 $\pm$ 7.1
<b>19R</b>	Me	H,H	COOMe	3-NO <sub>2</sub>	172.6 $\pm$ 5.1	171.3 $\pm$ 2.5
<b>20R</b>	Me	H,H	COOMe	3-Cl	79.6 $\pm$ 4.6	84.3 $\pm$ 2.0
<b>20S</b>	Me	H,H	COOMe	3-Cl	<b>26.7 <math>\pm</math> 4.2</b>	<b>45.6 <math>\pm</math> 3.6</b>
<b>21(r)</b>	Me	H,H	COOEt	3-NO <sub>2</sub>	172.1 $\pm$ 8.4	151.6 $\pm$ 0.4
<b>22R</b>	Me	H,H	COOEt	3-Cl	<b>42.1 <math>\pm</math> 2.0</b>	55.5 $\pm$ 2.9
<b>22S</b>	Me	H,H	COOEt	3-Cl	57.9 $\pm$ 3.2	<b>45.8 <math>\pm</math> 2.8</b>
<b>23R</b>	Me	H,H	COOtBu	3-Cl	51.4 $\pm$ 2.3	<b>27.7 <math>\pm</math> 2.2</b>
<b>24R</b>	Me	H,H	COOBn	3-Cl	<b>45.7 <math>\pm</math> 1.4</b>	50.9 $\pm$ 3.6
<b>24S</b>	Me	H,H	COOBn	3-Cl	61.2 $\pm$ 0.2	<b>46.0 <math>\pm</math> 3.3</b>
<b>25R</b>	Me	O	COOEt	3-Cl	88.8 $\pm$ 0.7	62.1 $\pm$ 4.3
<b>Cuzco5</b>					<b>38.3 <math>\pm</math> 0.6</b>	<b>39.7 <math>\pm</math> 2.1</b>

IC<sub>50</sub> values for the WT line in absence of compounds were: 2.8  $\pm$  0.1  $\mu$ M (DNM) and 10.9  $\pm$  2.1  $\mu$ M (MLF). Data are expressed as average  $\pm$  SD ( $n = 3$ ) of concentrations of DNM and MLF necessary to inhibit parasite growth by 50%. IC<sub>50</sub> values similar as or better than those found for **Cuzco 5** are boldfaced for comparison purposes.

was carried out with enamines prepared from homochiral 1-amino-2-propanols as previously reported by some of us.<sup>19</sup> It is noticeable that the formation of three new stereocenters in the bicyclic system is highly controlled by the presence of a single chiral carbon atom in the starting enamine reagent, and placed in the end product three, four and five bonds away from the newly created stereocenters. When racemic 1-amino-2-propanol and 2-aminobutanol were used, racemic **16**, **17**, **19** or **21** were obviously produced.

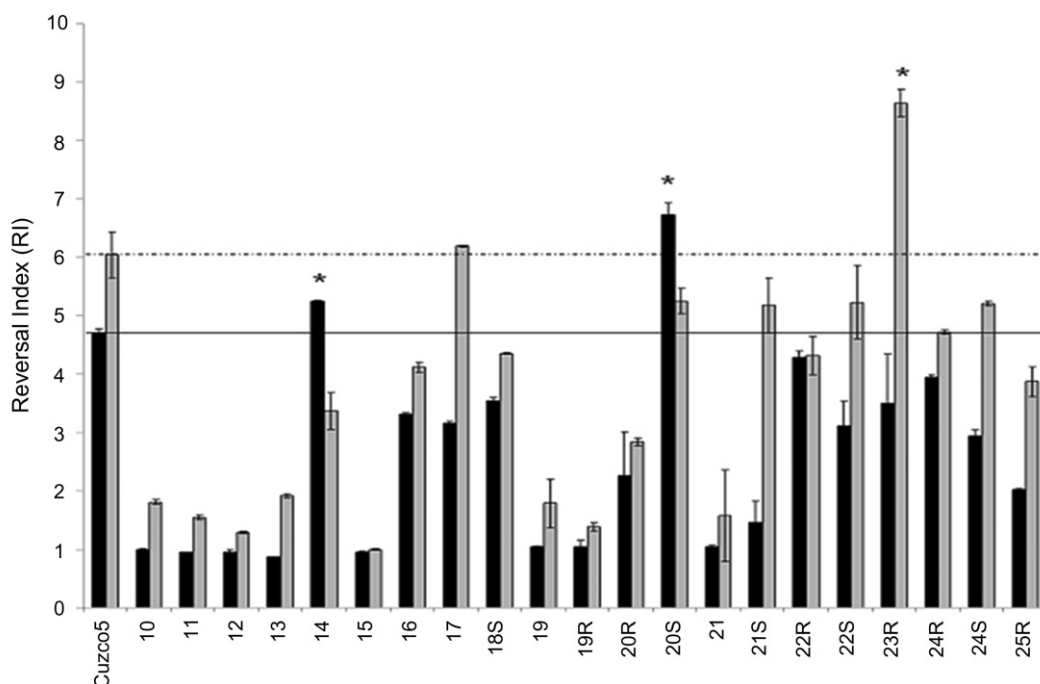
The results of the MDR reversal evaluation are shown in Table 3. As it can be seen, the tested compounds behave differently depending on their respective structures and on the antileishmanial drug being considered. Thus, while most compounds reverted *Leishmania* resistance to one or both drugs in a similar manner as the mentioned above for compounds **2** and **8**, several of them resulted practically inactive and even one compound (**13**) increased the resistance to DNM. These experimental facts support the existence of fair structure/resistance–reversal relationships that can also be extended to the stereochemical aspects, as in the case of the enantiomers **20R** and **20S**.

A first observation related to the influence of the *m*-substituted phenyl group attached to position C-7 reveals that the 3-chlorophenyl group is preferred to the nitro group at the same position.

It can also be observed that compounds **14** and **20S** significantly revert the IC<sub>50</sub> values for DNM, by more than 5- and 6-fold, respectively, with higher RI values than the reference **Cuzco5** (Table 3, Fig. 1). Indeed, among the tested compounds, **20S** showed the highest potency for DNM-resistance reversion. Additionally, compound **23R** reverts around 8.7-folds the IC<sub>50</sub> value for MLF, with higher RI than **Cuzco 5** for this drug (Fig. 1). Interestingly, both compounds **20S** and **23R** present a low toxicity for human THP-1 cells, with IC<sub>50</sub> values higher than 400  $\mu$ M (data not shown). Therefore, within

the series of oxazolo[3,2-*a*]pyridine derivatives tested, compound **20S** which produces a significant reversion of resistance to both drugs DNM and MLF, is considered as a good candidate for further studies as reversal agent of *Leishmania* MDR. Similarly, compound **23R**, with the highest RI against the modern antileishmanial agent MLF would play a similar role. Complementarily, we attempted to determine the MDR reversal activity of these compounds on intracellular amastigotes, however due to the high intrinsic cytotoxicity of MLF and DNM for the human THP-1 cells, with IC<sub>50</sub> values: 26.9  $\pm$  3.1  $\mu$ M (MLF) and 7.0  $\pm$  0.04  $\mu$ M (DNM), it was difficult to quantify the resistance reversion.

In order to assess the expectancy of these oxazolo-pyridines as potential lead compounds is important to note that several representative compounds of this series were tested already in vivo, having demonstrated their antihypertensive efficacy with low toxicity.<sup>10</sup> However, such assays were performed under intraperitoneal administration only, and some doubts emerged about their bioavailability under oral administration, the ordinary route of administering MLF and DNM. At this respect, the expectancy for the potential clinical use of compounds **17**, **20**, **22** and **23** results reinforced by fulfilling of the Lipinski rules, and complemented with favourable theoretical physico-chemical, ADME and toxicological calculations and predictions (data not shown) obtained for those compounds. Consequently, compounds **20S** and **23R** could be considered as drug leads for MDR reversal in the treatment of resistant leishmaniasis. Furthermore, the good results found for **20S**, **14** and other compounds of the series in the reversal of resistance to DNM, a well established and clinically used anti-cancer drug, suggest the potential interest of these family of compounds for the treatment of anthracycline-resistant neoplastic diseases. In this sense, in vitro MDR reversal studies on human neoplastic cells have been initiated.



**Figure 1.** Reversal indexes of oxazolo[3,2-*a*]pyridine derivatives, showing their comparative effects on the resistance to DNM and MLF by the MDR line of *L. tropica*. Reversal index (RI) values for a compound and drug (DNM: black; MLF: grey) correspond to the ratio  $IC_{50}$  (without)/ $IC_{50}$  (with compound). Continuous (DNM) and dotted (MLF) lines define the RI values for **Cuzco 5** to allow an easy comparison of compounds with the positive reference. Bars represent the average of three independent experiments  $\pm$  SD (\* $p$  < 0.05).

As a conclusion, the results here shown constitute a first report which justifies the interest of the oxazolo[3,2-*a*]pyridine moiety as a good structural base for MDR reversal. Accordingly, it seems recommendable to continue the research with evaluation of a wider family of compounds, including further variants in substituents and arrangements all around the fused heterocyclic system, and to extend the research to other therapeutic areas. In order to bring about this task, experimental studies of *in vivo* efficacy and acute toxicity, and the establishment of the mechanism of action with identification of the target molecule(s) or the biochemical pathway(s) of MDR reversion used by this type of compounds will be necessary.

#### Acknowledgments

This work was supported by the Spanish research funds SAF2009-07440 (to FG), SAF2011-28102 (to SC), JCyL-SA063A09 (to EC), ISCIII-Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET)-FEDER RD06/0021/0002 (FG) and RD 06/0021/0022 (ASF).

#### References and notes

- Mukherjee, A.; Padmanabhan, P. K.; Singh, S.; Roy, G.; Girard, I.; Chatterjee, M.; Ouellette, M.; Madhubala, R. *J. Antimicrob. Chemother.* **2007**, *59*, 204.
- Coelho, A. C.; Beverley, S. M.; Cotrim, P. C. *Mol. Biochem. Parasitol.* **2003**, *130*, 83.
- Castanys-Muñoz, E.; Alder-Baerens, N.; Pomorski, T.; Gamarro, F.; Castanys, S. *Mol. Microbiol.* **2007**, *64*, 1141.
- Castanys-Muñoz, E.; Pérez-Victoria, J. M.; Gamarro, F.; Castanys, S. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 3573.
- Chiquero, J. M.; Pérez-Victoria, F.; O'Valle, J. M.; González-Ros, R. G.; del Moral, J. A.; Ferragut, S.; Castanys, S.; Gamarro, F. *Biochem. Pharmacol.* **1998**, *55*, 131.
- Perez-Victoria, J. M.; Di Pietro, A.; Barron, D.; Ravelo, A. G.; Castanys, S.; Gamarro, F. *Curr. Drug Targets* **2002**, *3*, 311.
- Eckford, P. D. W.; Sharom, F. J. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2989.
- Teodori, E.; Dei, S.; Scapecchi, S.; Gualtieri, F. *Farmaco* **2002**, *57*, 385.
- Miri, R.; Mehdipour, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2008**, *16*, 8329.
- Moran, A.; Martín, E.; Velasco, C.; Martín, M. L.; San Román, L.; Caballero, E.; Puebla, P.; Medarde, M.; San Feliciano, A.; Martín, M. L. *J. Pharm. Pharmacol.* **1997**, *49*, 421; Martín, E.; Moran, A.; Martín, M. L.; San Román, L.; Puebla, P.; Medarde, M.; Caballero, E.; San Feliciano, A. *Bioorg. Med. Chem.* **2000**, *10*, 319.
- Caballero, E.; Puebla, P.; Medarde, M.; San Feliciano, A. *Tetrahedron* **1993**, *49*, 10079; San Feliciano, A.; Caballero, E.; Puebla, P.; Pereira, J. A.; Gras, J.; Valenti, C. *Eur. J. Med. Chem.* **1992**, *27*, 527; Caballero, E.; Puebla, P.; Medarde, M.; Honores, Z.; Sastre, P.; López, J. L.; San Feliciano, A. *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 455.
- Leishmania strains and culture*: The wild-type (WT) *L. tropica* LRC-strain was a clone obtained by agar plating. <sup>5</sup> A *L. tropica* line highly resistant to DNM was maintained in the presence of 150  $\mu$ M DNM (or 30  $\mu$ M MLF) and used as previously described. <sup>17</sup> Promastigote forms were grown at 28 °C in RPMI 1640-modified medium (Gibco), and supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (Gibco).
- Kennedy, M. L.; Cortés-Selva, F.; Pérez-Victoria, J. M.; Jiménez, I. A.; González, A. G.; Muñoz, O. M.; Gamarro, F.; Castanys, S.; Ravelo, A. G. *J. Med. Chem.* **2001**, *44*, 4668.
- Núñez, M. J.; Cortés-Selva, F.; Bazzocchi, I. L.; Jiménez, I. A.; González, A. G.; Ravelo, A. G.; Gavin, J. A. *J. Nat. Prod.* **2003**, *66*, 572.
- Parasite growth control*: After 72 h of incubation at 28 °C, the viability of promastigotes was determined by the colorimetric MTT assay and absorbance was read at 540 nm using a microplate reader (Beckman Biomek 2000). Growth inhibition respect to non-treated parasites was quantified by the ratio of absorbance at a given compound concentration with respect to control.
- Human cells toxicity*: THP-1 cells were grown at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> in RPMI-1640 supplemented with 10% iFBS, 2 mM glutamate, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin.  $3 \times 10^4$  cells/well, in 96 wells-plate, were differentiated to macrophages with 20 ng/mL of PMA treatment for 48 h followed to 24 h of culture in fresh medium. The MTT-based assay procedures were the same as for *Leishmania* parasites with the exception of incubation temperature, 37 °C in this case.
- Pérez-Victoria, J. M.; Pérez-Victoria, F. J.; Parodi-Talice, A.; Jiménez, I. A.; Ravelo, A. G.; Castanys, S.; Gamarro, F. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2001**, *45*, 2468.
- Cortés-Selva, F.; Campillo, M.; Reyes, C. P.; Jiménez, I. A.; Castanys, S.; Bazzochi, I. L.; Pardo, L.; Gamarro, F.; Ravelo, A. G. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 576.
- Caballero, E.; Puebla, P.; Medarde, M.; Sánchez, M.; Salvadó, M. A.; García-Granda, S.; San Feliciano, A. *J. Org. Chem.* **1996**, *61*, 1890.

## **ANEXO 5**

### **Uptake of the Antileishmania Drug Tafenoquine Follows a Sterol-Dependent Diffusion Process in *Leishmania*.**

**Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 66:2562-5; 2011.**

José Ignacio Manzano, Luis Carvalho, Raquel García-Hernández, José Antonio Poveda, José Antonio Ferragut, Santiago Castanys y Francisco Gamarro.

Este trabajo se diseñó para dilucidar el mecanismo de entrada de la tafenoquina en *Leishmania*, y su dependencia de esteroides. Al ser la tafenoquina un compuesto fluorescente, mediante espectrofluorimetría pudimos monitorizar su entrada al parásito. El fármaco presenta una cinética rápida en la entrada, el proceso es independiente de energía y no saturable, pero dependiente del gradiente de protones y de temperatura. La reducción de esteroides de la membrana plasmática, obtenida tras el tratamiento con metil- $\beta$ -ciclodextrina, produce una disminución significativa de la entrada de tafenoquina en el parásito. Estos resultados sugieren que la entrada de tafenoquina en *Leishmania* tiene lugar mediante un proceso de difusión y que los cambios en el contenido de esteroides de la membrana plasmática pueden causar una disminución en la entrada del fármaco.



## Uptake of the antileishmania drug tafenoquine follows a sterol-dependent diffusion process in *Leishmania*

José Ignacio Manzano<sup>1</sup>, Luis Carvalho<sup>1</sup>, Raquel García-Hernández<sup>1</sup>, José Antonio Poveda<sup>2</sup>, José Antonio Ferragut<sup>2</sup>, Santiago Castanys<sup>1†</sup> and Francisco Gamarro<sup>1\*†</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina 'López-Neyra', CSIC (IPBLN-CSIC), Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain; <sup>2</sup>IBMC-Universidad Miguel Hernández, Elche (Alicante), Spain

\*Corresponding author. Tel: +34-958-181667; Fax: +34-958-181632; E-mail: gamarro@ipb.csic.es

†Dr Francisco Gamarro and Dr Santiago Castanys contributed equally to this work.

Received 10 May 2011; returned 13 June 2011; revised 25 July 2011; accepted 26 July 2011

**Objectives:** The present study was designed to elucidate the mechanism of tafenoquine uptake in *Leishmania* and its sterol dependence.

**Methods:** Because tafenoquine is a fluorescent compound, spectrofluorimetric analysis allowed us to monitor its uptake by *Leishmania* promastigotes and intracellular amastigotes, and to evaluate the effect of temperature, energy and H<sup>+</sup> gradient on drug entry. The influence of sterols on tafenoquine uptake in *Leishmania* parasites was determined in experiments using sterol-depleting agents such as methyl- $\beta$ -cyclodextrin or cholesterol oxidase.

**Results:** Tafenoquine exhibited fast entry kinetics into *Leishmania* in an energy-independent, but pH- and temperature-dependent, non-saturable process. Furthermore, sterol depletion decreased tafenoquine uptake.

**Conclusions:** These findings suggest that *Leishmania* takes up tafenoquine by a diffusion process and that decreases in membrane sterol content may induce a decrease in drug uptake.

**Keywords:** 8-aminoquinolines, tafenoquine uptake, plasma membrane fluidity, sterol depletion

### Introduction

Leishmaniasis, which is caused by the parasitic protozoan *Leishmania*, has a wide variety of clinical manifestations, ranging from self-healing cutaneous lesions to visceral disease,<sup>1</sup> with an annual incidence of more than 2 million new cases. Treatment of this disease relies exclusively on chemotherapy, limited to a few first-line drugs, including miltefosine, paromomycin, amphotericin B deoxycholate and lipid amphotericin B, along with pentavalent antimonials, although the last group are no longer effective in endemic areas in Bihar (India) due to drug resistance. The limited number of active drugs has prompted the WHO to recommend combination therapy in order to extend the life expectancy of these compounds. New drugs, including the 8-aminoquinolines, are being developed as part of the search for cheaper oral treatments for visceral leishmaniasis. The 8-aminoquinoline scaffold has been extensively used in the development of antiprotozoal drugs,<sup>2</sup> typically as antiplasmodial compounds. The most recent application for these drugs is the use of sitamaquine and tafenoquine as alternative leishmanicidal compounds; these two drugs are at different stages of introduction because of differences in their

haematological toxicity (primarily methaemoglobinemia and haemolysis).

Tafenoquine, an 8-aminoquinoline analogue of primaquine that is in clinical trials for the treatment and prevention of *Plasmodium* infections,<sup>3</sup> may be a good candidate for an alternative leishmaniasis therapy. Indeed, tafenoquine has shown potent *in vivo* leishmanicidal activity by affecting mitochondrial activity in *Leishmania* parasites, leading to an apoptosis-like death process;<sup>4,5</sup> however, the precise mechanism of tafenoquine uptake in *Leishmania* remains unknown. The present article is focused on elucidating the mechanism of tafenoquine uptake in *Leishmania* and its sterol dependence.

### Methods

#### *Leishmania* strain and culture

*Leishmania major* (MHOM/JL/80/Friedlin) promastigotes were grown at 28°C in RPMI 1640 modified medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (HIFBS) (Invitrogen).<sup>6</sup> Intracellular amastigotes were obtained as described previously.<sup>7</sup> Briefly, macrophages differentiated from THP-1 cells were



infected with late-stage promastigotes at a ratio of 1:10 macrophages/parasites. Infected macrophages were maintained for 96 h at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in RPMI 1640 medium plus 10% HIFBS. Amastigotes were harvested from macrophages selectively lysed with 0.0125% SDS in PBS (1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 130 mM NaCl and 2.6 mM KCl, pH 7).

### Tafenoquine uptake

Promastigotes ( $2 \times 10^7$  cells/mL) were treated with 5 μM tafenoquine for different times (1, 3, 5, 8, 10 and 15 min) or with different tafenoquine concentrations (0.2, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 20 μM) for 1 min in culture medium at 28°C. For tafenoquine uptake experiments in amastigotes,  $10^7$  cells/mL were treated with 10 μM tafenoquine for different times (1, 5 and 15 min) in culture medium (pH 5.5) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Parasites were then washed with the same medium followed by PBS and re-suspended in 10% SDS. Tafenoquine accumulation was determined fluorimetrically by recording an emission spectrum in the range 360–460 nm upon excitation at 340 nm using an Aminco-Bowman Series 2 spectrometer as described previously.<sup>8</sup>

### Effects of temperature, energy and H<sup>+</sup> gradient on tafenoquine uptake

These experiments were performed as described previously.<sup>9</sup> Briefly, promastigotes ( $2 \times 10^7$  cells/mL) or amastigotes ( $10^7$  cells/mL) were incubated for 10 min with 5 μM tafenoquine at 28 and 4°C or with 10 μM tafenoquine at 37 and 4°C, respectively, in HEPES-buffered saline (HBS; 21 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 6 mM glucose, adjusted to pH 7.4 for promastigotes or pH 5.5 for amastigotes), and the amount of drug incorporated into the cells was determined as described above. For energy depletion studies, promastigotes or amastigotes were pre-incubated for 30 min with 5 mM 2-deoxy-D-glucose and 20 mM NaN<sub>3</sub> at 28 or 37°C, respectively, in HBS buffer without glucose. H<sup>+</sup>-gradient dependence was determined in parasites pre-treated with 10 μM of the ionophores nigericin and monensin in HBS for 10 min at 28 or 37°C.

### Preparation of parasite surface membrane-enriched fraction

*Leishmania* promastigotes ( $10^9$  cells/mL) in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA and 25 μg/mL leupeptin, pH 8.0) were disrupted for 45 min in a pre-chilled, high-pressure cavitor. The parasite lysates were centrifuged at 1000 g to eliminate cell debris, then the supernatant was centrifuged at 8000 g at 4°C for 30 min to obtain parasite surface membrane-enriched fractions. The supernatant was removed and the pellets were washed twice with 10 mM HEPES/145 mM NaCl, pH 7.4, buffer before being re-suspended in the same buffer. Alkaline phosphatase tartrate-resistant activity was determined as a control for membrane-enriched fractions, as described previously.<sup>10</sup>

### Anisotropy of parasite plasma membrane

*Leishmania* plasma membrane samples (0.14–0.15 mg/mL) in 10 mM HEPES/145 mM NaCl, pH 7.4, buffer were incubated with 1,6-diphenylhexa-1,3,5-triene (DPH) or 1-[4-(trimethylamino) phenyl]-6-phenylhexa-1,3,5-triene (TMA-DPH) probes in *N,N*-dimethylformamide (DMF) in the dark for 30 min at a 1/2500 probe/protein weight ratio. The final DMF concentration in the membrane suspension was always <0.05%. The slit widths for both excitation and emission were 5 nm and the integration time was 1 s. Steady-state fluorescence anisotropy (*r*), as defined by Lackowicz,<sup>11</sup> was determined by measuring the vertical and horizontal components of the fluorescence emission with

excitation polarized vertically. The excitation wavelength for DPH and TMA-DPH was 360 nm, with emission being monitored at 430 nm. Temperature ramps were done from 4 to 40°C in steps of 0.5°C, with an equilibration time at each temperature of 30 s and a heating rate of 30°C/min. The data point at each temperature was the average of ten 1 s anisotropy measurements.

### Tafenoquine uptake after sterol depletion in *L. major*

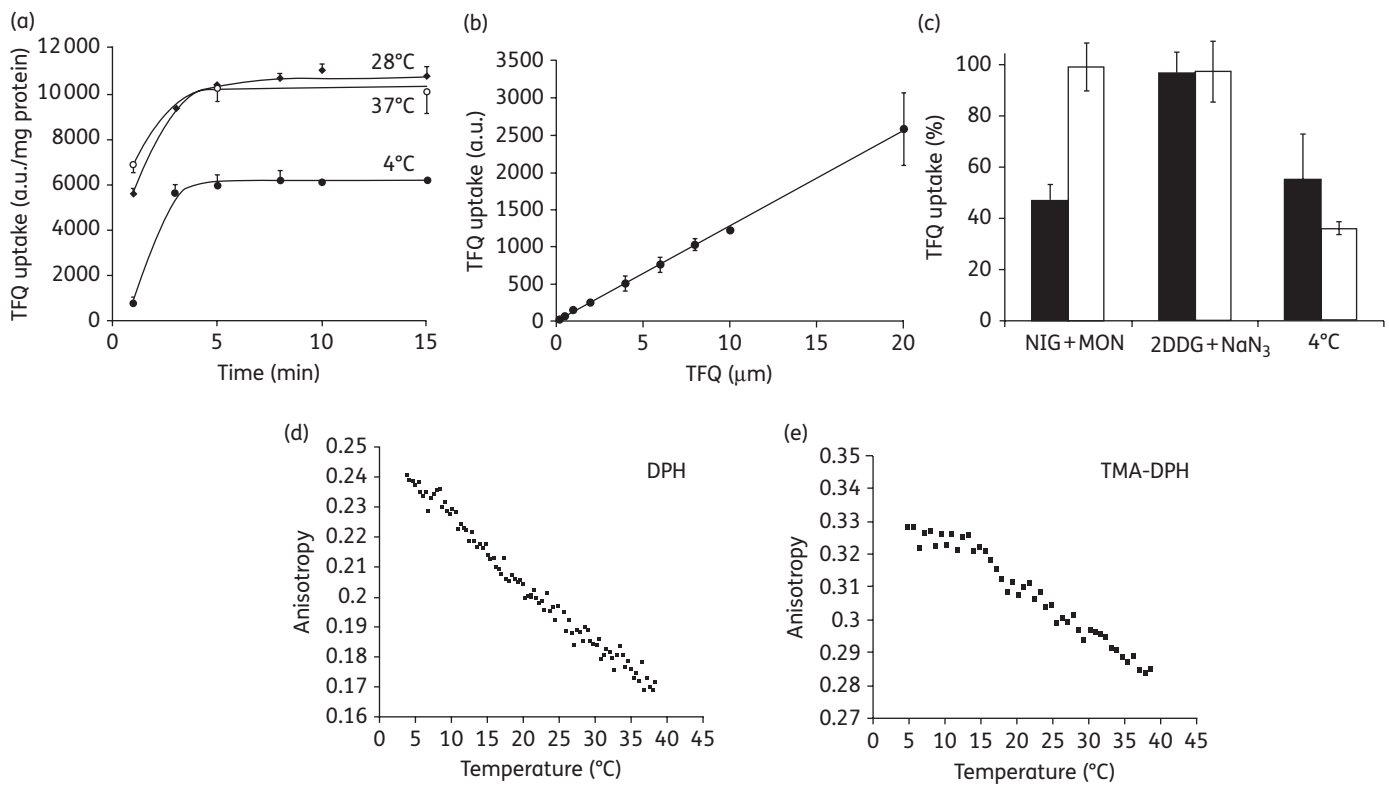
Promastigotes ( $10^7$  cells/mL) were pre-incubated with 10 mM methyl-β-cyclodextrin (MCD) or 1 U/mL cholesterol oxidase (CH-OX) for 1 h in culture medium without HIFBS at 4°C in order to deplete sterols from the plasma membrane, as described previously.<sup>12</sup> Similar experiments with intracellular amastigotes ( $10^7$  cells/mL) were determined using 10 mM MCD in culture medium (pH 5.5). After washing twice with PBS, parasites were stained with the sterol dye marker filipin.<sup>13</sup> *Leishmania* parasites were incubated on ice with 10 μg/mL filipin for 10 min in culture medium without HIFBS and washed twice with PBS, and the sample fluorescence was determined by recording an emission spectrum (400–600 nm) upon excitation at 350 nm. After sterol depletion, promastigotes and amastigotes were incubated, respectively, with 5 μM tafenoquine at 28°C and 10 μM at 37°C for 15 min in culture medium. Tafenoquine accumulation was measured as described above.

### Statistical analysis

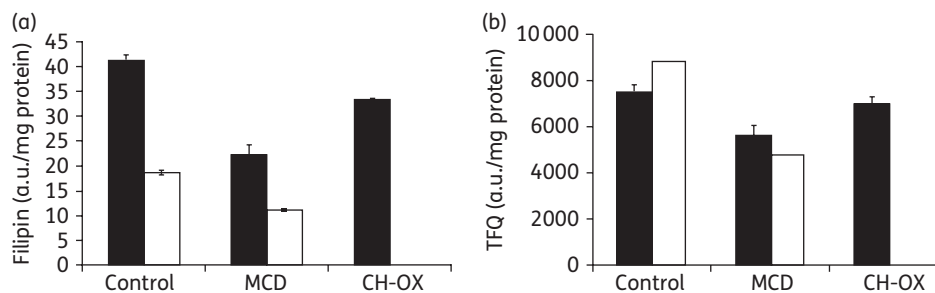
Statistical comparisons between groups were performed using Student's *t*-test. Differences were considered significant at a level of *P* < 0.05.

## Results and discussion

The present work aimed to examine the mechanism of tafenoquine uptake in the protozoan parasite *Leishmania*; tafenoquine is a promising leishmanicidal oral drug with less haematological toxicity than sitamaquine. The tafenoquine concentrations used in these experiments were designed considering the EC<sub>50</sub> value of tafenoquine in *L. major* promastigotes (2.24 μM), as previously described.<sup>8</sup> The uptake of tafenoquine at 28°C reached saturation in about 5 min (Figure 1a); similar behaviour was observed at 4°C, but with lower accumulation than at 28°C (Figure 1a). Similar results were obtained in amastigotes incubated at 37°C (Figure 1a). Furthermore, the initial rate of tafenoquine uptake was not saturable at up to at least 20 μM tafenoquine (Figure 1b). No differences in tafenoquine uptake were observed in the ATP-depleted parasites (Figure 1c), although tafenoquine uptake was found to be 50% lower at 4°C than at 28°C (*P* < 0.05) for promastigotes and 60% lower at 4°C than at 37°C for amastigotes (*P* < 0.05) (Figure 1c). In summary, tafenoquine shows fast entry kinetics into *Leishmania* parasites in a protein- and energy-independent, but temperature-dependent, non-saturable process. Furthermore, the accumulation of weakly basic aminoquinolines such as chloroquine and, more recently, sitamaquine seems to be pH-dependent.<sup>14,15</sup> This finding was confirmed by the observation of a significant reduction in tafenoquine accumulation only in promastigotes pre-incubated with the ionophores monensin and nigericin (*P* < 0.05) (Figure 1c), which enable the exchange of sodium and potassium ions with protons, respectively, thereby affecting the pH gradient in the cell. No differences in drug accumulation



**Figure 1.** Tafenoquine (TFQ) uptake by *Leishmania* parasites. (a) Kinetics of tafenoquine uptake at 28°C (diamonds) and 4°C (filled circles) in promastigotes and at 37°C in amastigotes (open circles). a.u., arbitrary units. (b) Concentration-dependent uptake of tafenoquine in promastigotes. a.u., arbitrary units. (c) Inhibition of tafenoquine uptake. Non-treated parasites (100% uptake), parasites treated with nigericin plus monensin (NIG+MON) or 2-deoxy-D-glucose plus NaN<sub>3</sub> (2DDG+NaN<sub>3</sub>) and parasites incubated at 4°C. Promastigotes, black bars; amastigotes, white bars. Data are the means  $\pm$  SD of three and two independent experiments for promastigotes and amastigotes, respectively. Temperature-dependent steady-state fluorescence anisotropy experiments in promastigotes using DPH (d) and TMA-DPH (e) probes. Data are averages of three independent experiments.



**Figure 2.** Tafenoquine (TFQ) accumulation after sterol depletion. (a) Filipin staining after incubation without (Control) or with MCD or CH-OX for 1 h at 4°C. a.u., arbitrary units. (b) Tafenoquine uptake after sterol depletion. Promastigotes, black bars; amastigotes, white bars. Results are means  $\pm$  SD of three and two independent experiments for promastigotes and amastigotes, respectively.

were observed in amastigotes after ionophore treatment due to the acidic pH of the incubation medium (pH 5.5). Finally, fluorescence anisotropy studies showed significant differences between the anisotropy values for the measurements at 4 and 40°C (Figure 1d and e). Since the anisotropy values for TMA-DPH and DPH give an estimate of their free rotation in the lipid bilayer, higher fluorescence anisotropy should correspond to a decrease in membrane fluidity. This could explain the

lower tafenoquine uptake observed at 4°C (with lower fluidity). Consequently, tafenoquine appears to cross the plasma membrane via a diffusion process driven by its chemical potential gradient and the pH gradient, as well as being influenced by the lipophilicity of this compound (XlogP3=5.4; <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=115358>).

The plasma membrane is the site where the drug is taken up, and any modification to its composition or dynamics is therefore



likely to have an impact on drug–membrane interactions, especially when the drug must be solubilized into the lipid bilayer before it can be taken up. To study the influence of sterols on tafenoquine uptake in *Leishmania* parasites, we first examined whether treatment with MCD or CH-OX induced changes in the sterol content of *L. major*, using filipin fluorescence to monitor sterol depletion. The relationship between sterol content and plasma membrane fluidity has been described in a previous study<sup>12</sup> showing that a decrease in sterol content in *Leishmania* was associated with higher fluidity. As can be seen from Figure 2(a), treatment with MCD and CH-OX produced a 45% and 21% decrease in filipin fluorescence, respectively. Similar behaviour was observed in amastigotes after MCD treatment (Figure 2a). Furthermore, sterol depletion induced by MCD and CH-OX did not have a significant effect on parasite viability, as assessed by morphology and motility (data not shown), in agreement with previous findings.<sup>12</sup> Sterol depletion resulted in a significant 26% reduction in tafenoquine uptake in promastigotes after MCD treatment ( $P < 0.05$ ), whereas no significant difference was observed after treatment with CH-OX (Figure 2b). In amastigotes, a 45% reduction in tafenoquine uptake was observed after MCD treatment ( $P < 0.05$ ) (Figure 2b). These results can be explained by the extent of sterol extraction observed in Figure 2(a). These results were consistent with possible drug entry through lipid raft domains, as previously described for the uptake of other antileishmania drugs.<sup>12</sup> However, recent studies have shown that sitamaquine uptake in *Leishmania* parasites is a sterol-independent diffusion process.<sup>15</sup> Thus, there is significant variability in the uptake phenomena of different compounds included in the 8-aminoquinoline family.

In conclusion, our results suggest that tafenoquine uptake in *Leishmania* follows a sterol-dependent diffusion process.

## Acknowledgements

We acknowledge the support of GlaxoSmithKline (Greenford, UK) for the tafenoquine used throughout this research work.

## Funding

This work was supported by the Spanish grant SAF2009-07440 (to F. G.) and by FEDER funds from the EU to F. G. and S. C.

## Transparency declarations

None to declare.

## References

- Alvar J, Croft S, Olliaro P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2006; **61**: 223–74.
- Tekwani BL, Walker LA. 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Curr Opin Infect Dis* 2006; **19**: 623–31.
- Walsh DS, Wilairatana P, Tang DB et al. Randomized trial of 3-dose regimens of tafenoquine (WR238605) versus low-dose primaquine for preventing *Plasmodium vivax* malaria relapse. *Clin Infect Dis* 2004; **39**: 1095–103.
- Yardley V, Gamarro F, Croft SL. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal activity of the 8-aminoquinoline tafenoquine. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 5356–8.
- Carvalho L, Laque-Ortega JR, Manzano JI et al. Tafenoquine, an antiplasmodial 8-aminoquinoline, targets *Leishmania* respiratory complex III and induces apoptosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 5344–51.
- Jackson PR, Wohlhieter JA, Jackson JE et al. Restriction endonuclease analysis of *Leishmania* kinetoplast DNA characterizes parasites responsible for visceral and cutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg* 1984; **33**: 808–19.
- Seifert K, Pérez-Victoria FJ, Stettler M et al. Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists in vivo. *Int J Antimicrob Agents* 2007; **30**: 229–35.
- Manzano JI, Carvalho L, Pérez-Victoria JM et al. Increased glycolytic ATP synthesis is associated with tafenoquine resistance in *Leishmania major*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 1045–52.
- López-Martin C, Pérez-Victoria JM, Carvalho L et al. Sitamaquine sensitivity in *Leishmania* species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 4030–6.
- Basselín M, Robert-Gero M. Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity, and lipophosphoglycan expression in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Parasitol Res* 1998; **84**: 78–83.
- Lackowicz JR, ed. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Plenum Press, 1983.
- Saint-Pierre-Chazalet M, Ben Brahim M, Le Moyec L et al. Membrane sterol depletion impairs miltefosine action in wild-type and miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 993–1001.
- Van Leeuwen MR, Smant W, de Boer W et al. Filipin is a reliable *in situ* marker of ergosterol in the plasma membrane of germinating conidia (spores) of *Penicillium discolor* and stains intensively at the site of germ tube formation. *J Microbiol Methods* 2008; **74**: 64–73.
- Augustijns PF. Uptake and transport characteristics of chloroquine in an *in-vitro* cell culture system of the intestinal mucosa, Caco-2. *J Pharm Pharmacol* 1996; **48**: 277–80.
- Coimbra ES, Libong D, Cojean S et al. Mechanism of interaction of sitamaquine with *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 2548–55.

## **ANEXO 6**

### **Increased Glycolytic ATP Synthesis is Associated with Tafenoquine Resistance in *Leishmania major*.**

**Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 55, p. 1045-52; 2011.**

José Ignacio Manzano, Luis Carvalho, José M. Pérez-Victoria, Santiago Castanys y Francisco Gamarro.

La tafenoquina, una 8-aminoquinolina usada para prevenir y tratar infecciones con *Plasmodium*, puede representar una terapia alternativa para tratar la leishmaniasis. La tafenoquina ha mostrado tener una significativa actividad leishmanicida tanto *in vitro* como *in vivo*, tiene como blanco de acción la mitocondria del parásito y le induce un proceso de muerte similar a la apoptosis. Con el objetivo de aportar datos sobre la durabilidad que tendría en clínica este potencial fármaco leishmanicida, es importante determinar la probabilidad de que *Leishmania* pueda desarrollar resistencia a tafenoquina y los mecanismos de resistencia que pueda generar. Para abordar este estudio, se seleccionó una línea de promastigotes de *Leishmania major* resistente a tafenoquina (R4). Esta resistencia, la cual resultó inestable en medio libre de fármaco (línea revertida), se mantuvo en la forma amastigote intracelular en macrófagos. Además, los promastigotes de la línea R4 presentaron resistencia cruzada a otras 8-aminoquinolinas. Tanto en la línea R4 como en la línea revertida, se observó una disminución en la acumulación de la tafenoquina, lo cual probablemente esté asociado con la alcalinización del pH intracelular y una reducción en el contenido de acidocalcisomas que desarrollan ambas líneas, dado que no se apreciaron diferencias en el eflujo de tafenoquina en comparación con la línea salvaje. En todas las líneas de *Leishmania* se observó una disminución en la síntesis de ATP debido a la acción de la tafenoquina, aunque los niveles de ATP total se mantuvieron más altos en los parásitos de la línea R4. Igualmente, se observó que la síntesis de ATP mediante la vía glucolítica estaba significativamente

incrementada en los parásitos de la línea R4, mientras que la síntesis de ATP mitocondrial era similar a la de los parásitos salvajes. Por lo tanto, concluimos que el incremento en la síntesis de ATP glucolítico es el principal mecanismo responsable de la resistencia a tafenoquina en la línea R4 de *Leishmania*.

## Increased Glycolytic ATP Synthesis Is Associated with Tafenoquine Resistance in *Leishmania major*<sup>∇</sup>

José Ignacio Manzano, Luis Carvalho, José M. Pérez-Victoria,  
Santiago Castanys,\* and Francisco Gamarro\*

*Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud,  
Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain*

Received 8 November 2010/Returned for modification 15 December 2010/Accepted 22 December 2010

**Tafenoquine (TFQ), an 8-aminoquinoline used to treat and prevent *Plasmodium* infections, could represent an alternative therapy for leishmaniasis. Indeed, TFQ has shown significant leishmanicidal activity both *in vitro* and *in vivo*, where it targets *Leishmania* mitochondria and activates a final apoptosis-like process. In order not to jeopardize the life span of this potential antileishmania drug, it is important to determine the likelihood that *Leishmania* will develop resistance to TFQ and the mechanisms of resistance induced. To address this issue, a TFQ-resistant *Leishmania major* promastigote line (R4) was selected. This resistance, which is unstable in a drug-free medium (revertant line), was maintained in intramacrophage amastigote forms, and R4 promastigotes were found to be cross-resistant to other 8-aminoquinolines. A decreased TFQ uptake, which is probably associated with an alkalinization of the intracellular pH rather than drug efflux, was observed for both the R4 and revertant lines. TFQ induces a decrease in ATP synthesis in all *Leishmania* lines, although total ATP levels were maintained at higher values in R4 parasites. In contrast, ATP synthesis by glycolysis was significantly increased in R4 parasites, whereas mitochondrial ATP synthesis was similar to that in wild-type parasites. We therefore conclude that increased glycolytic ATP synthesis is the main mechanism underlying TFQ resistance in *Leishmania*.**

Treatment for leishmaniasis currently relies on a reduced arsenal of drugs, including pentavalent antimonials (which cannot be given in areas where drug resistance is endemic), amphotericin B deoxycholate, lipid formulations of amphotericin B, miltefosine, and paromomycin, all of which have drawbacks in terms of toxicity, efficacy, price, and inconvenient treatment schedules (6, 17). To increase the therapeutic life span of these drugs and delay the emergence of resistance, the World Health Organization has recommended combination therapy as a strategy to be implemented in clinical trials. Of the new drugs under development, 8-aminoquinolines such as sitamaquine (WR6026; GlaxoSmithKline), which is currently in phase 2b clinical trials (12, 34), represent a promising new oral leishmanicidal treatment. Although the mechanism of action of sitamaquine is still unknown, it has been reported that acidocalcisomes play a key role in the accumulation of sitamaquine, although they do not determine the leishmanicidal potency of the drug (14). Other 8-aminoquinolines chemically related to primaquine have been synthesized and evaluated for their antiparasitic activity (1, 25). Thus, tafenoquine (TFQ), formerly known as WR238605, is a primaquine analogue which is being developed jointly by the Walter Reed Army Institute of Research and GlaxoSmithKline pharmaceuticals for the treatment and prevention of relapsing malaria (31). Phase I, II, and III clinical studies with this drug have shown that TFQ is a safe,

well-tolerated, and highly effective oral chemoprophylactic agent for the treatment of plasmodial infections (8, 24, 30). Recently, we have proposed that TFQ could be used as a new leishmanicidal drug (33) and have determined that TFQ targets *Leishmania* mitochondria by specifically inhibiting mitochondrial cytochrome *c* reductase, thus leading to a final apoptosis-like process (3). However, to ensure the future long life of this promising leishmanicidal drug, it is important to determine how easy it is to induce TFQ resistance experimentally, as this information can then be extrapolated to the possible emergence of drug resistance in the field. The mechanism of resistance to other aminoquinoline derivatives, such as the 4-aminoquinoline derivative chloroquine, in *Plasmodium*, for example, has been associated with a reduction in drug accumulation (13, 27).

In the present study, we have determined the mechanism of resistance to TFQ in *Leishmania* parasites and have found that TFQ resistance is unstable. TFQ accumulation was lower in resistant parasites than in sensitive parasites, although reduced drug accumulation was found not to be a mechanism of resistance, as it was present in revertant (i.e., nonresistant) lines. However, the mechanism of TFQ resistance does appear to be linked to increased ATP synthesis from glycolysis.

### MATERIALS AND METHODS

**Chemical compounds.** TFQ [2-methoxy-4-methyl-5-(3-trifluoromethylphenoxy)primaquine succinate], sitamaquine [*N,N*-diethyl-*N'*-(6-methoxy-4-methylquinolin-8-yl)hexane-1,6-diamine] dihydrochloride and [benzene ring-<sup>14</sup>C]sitamaquine (<sup>14</sup>C]sitamaquine; 2.07 GBq/mmol) were provided by GlaxoSmithKline (Greenford, United Kingdom). [<sup>14</sup>C]Glucose (11.8 GBq/mmol) was purchased from PerkinElmer. Amplex Red, LysoTracker Green DND-26, LysoTracker Red DND-99, BCECF-AM [2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester], and BCECF (free acid) were purchased from Invitrogen. Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD), trivalent anti-

\* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain. Phone for Francisco Gamarro: 34 958 181667. Fax: 34 958 181632. E-mail: gamarro@ipb.csic.es. Phone for Santiago Castanys: 34 958 181666. Fax: 34 958 181632. E-mail: castanys@ipb.csic.es.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 3 January 2011.

mony, pentamidine, paromomycin, amphotericin B, ketoconazole, chloroquine, quinine, mefloquine, primaquine, glucose, sodium azide, ammonium chloride, nigericin sodium salt, 2-deoxy-D-glucose, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dilactate), phosphoenolpyruvate, propidium iodide, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), flavin adenine dinucleotide (FAD), thiamine pyrophosphate (TPP), horseradish peroxidase (HRP), pyruvate oxidase, and sodium pyruvate were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Lactate dehydrogenase was purchased from Roche Applied Science, and miltefosine was purchased from Aeterna Zentaris (Frankfurt, Germany). All chemicals were of the highest quality available.

**Leishmania culture conditions.** Promastigotes of *Leishmania major* (MHOM/JL/80/Friedlin) and derivative lines used in this study were cultured at 28°C in RPMI 1640 modified medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (iFBS; Invitrogen), as described previously (10). All parasite lines were collected from culture by centrifugation after 48 h of growth and washed in phosphate-buffered saline (PBS; 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 130 mM NaCl, and 2.6 mM KCl adjusted to pH 7). The final parasite concentration was determined using a Coulter Z1 counter.

**Generation of a TFQ-resistant *L. major* line.** A TFQ-resistant *L. major* line was obtained by following a previously described stepwise selection process (4, 23) with a starting concentration of 2.5 μM TFQ increasing to 4 μM TFQ over 10 weeks. The TFQ-resistant (R4) line was maintained in the continuous presence of 4 μM TFQ. To determine the stability of the resistant phenotype, the R4 line was grown in a drug-free medium for 1 month (revertant line; revR4). The sensitivity of wild-type (WT), R4 and revR4 *L. major* promastigotes to TFQ and the cross-resistance profile of the R4 line to different compounds were determined after incubation for 72 h at 28°C in the presence of increasing concentrations of the drug. The concentration of TFQ required to inhibit parasite growth by 50% (EC<sub>50</sub>), and the resistance indices (ratio of EC<sub>50</sub>s for resistant and WT parasites) were calculated using an MTT colorimetric assay, as described previously (11).

**TFQ sensitivity in intracellular amastigotes of *Leishmania*.** Late-stage promastigotes from the WT and R4 lines were used to infect mouse peritoneal macrophages from BALB/c mice (Charles River, Ltd.) at a macrophage/parasite ratio of 1:10, as described previously (14). After infection for 6 h, extracellular parasites were removed by washing with serum-free medium. Infected macrophage cultures were maintained at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> at different TFQ concentrations in RPMI 1640 medium plus 10% iFBS, as described previously (14). After 72 h, macrophages were fixed for 20 min at 4°C with 2.5% paraformaldehyde in PBS, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min, and treated with RNase A (1 mg/ml) for 30 min. Intracellular parasites were detected by nuclear staining with 5 μg/ml propidium iodide and Prolong Gold antifade reagent without DAPI (Invitrogen).

**TFQ uptake and efflux.** *L. major* promastigotes (2 × 10<sup>7</sup> per ml) were incubated with 5 μM TFQ for 15 min at 28°C in culture medium and then washed twice with PBS and lysed by the addition of 10% SDS, pH 4. Sample fluorescence (in the range of 360 to 460 nm) was then measured using an Aminco Bowman series 2 spectrometer upon excitation at 340 nm. The time course uptake of TFQ at 28°C was determined at different time intervals (1, 3, 5, 8, 10, and 15 min). To determine TFQ efflux, WT and R4 parasites (2 × 10<sup>7</sup> per ml) were incubated with 2 and 2.5 μM TFQ, respectively, for 1 h in culture medium at 28°C to allow for a similar labeling in the two lines. The parasites were then washed with PBS and resuspended in culture medium at 28°C, and the fluorescence retained was measured at different time points (0, 15, 30, 60, and 90 min).

**Accumulation of sitamaquine.** Sitamaquine accumulation was determined as described previously (14). Briefly, promastigotes were incubated at 28°C with 0.5 μM [<sup>14</sup>C]sitamaquine for 15 min and then washed with PBS containing 100 μM nonradioactive sitamaquine. The cell-associated radioactivity was measured by liquid scintillation counting, and the protein concentration was determined using a Bradford kit (Bio-Rad).

**Microscopy analysis.** Promastigotes (10<sup>7</sup> per ml) were incubated with 5 μM TFQ for 15 min in culture medium. After being washed twice with PBS, the pellet was resuspended in PBS and analyzed by fluorescence microscopy (Zeiss). Acidocalcisome accumulation of the acidotropic dye LysoTracker Red DND-99 was determined by confocal microscopy analysis, as described previously (14). Briefly, promastigotes were incubated with 75 nM LysoTracker Red DND-99 in HBS buffer (21 mM HEPES, 0.7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, and 6 mM glucose [pH 7]), and the parasites were then washed with PBS and analyzed with a confocal microscope (TCS SP5 model; Leica) equipped with a He/Ne laser (633 nm) and coupled to an MRC1024 model confocal scanning laser equipment.

**pHi measurement.** The intracellular pH (pHi) of *L. major* lines was determined fluorimetrically using a BCECF-AM probe, as described previously (28). Briefly, promastigotes (2 × 10<sup>7</sup> per ml) were resuspended in standard buffer (136.89 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.46 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 11.1 mM glucose, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.8 mM MgSO<sub>4</sub>, and 20 mM HEPES [pH 7.4]). After incubation for 30 min at 28°C in the presence of BCECF-AM (5 μg/ml), the parasites were washed twice. The fluorescence ratios (excitation ratio, 490 nm/440 nm; emission, 535 nm) were monitored continuously using an Aminco Bowman series 2 spectrometer. For calibration curves, the BCECF ratio fluorescence as a function of pH was obtained using a parasite suspension incubated with BCECF-AM and treated with the ionophore nigericin (5 μg/ml). Different pH values were obtained by the addition of 1 M MES (morpholineethanesulfonic acid; pH 5.0) or 1.5 M Tris-ClH (pH 8.8) followed by measurement of the pH. The intracellular alkalinization of parasites was obtained after pretreatment of *L. major* lines at 28°C with 20 mM NH<sub>4</sub>Cl for 1 min, followed by incubation with 5 μM TFQ in the presence of NH<sub>4</sub>Cl for 15 min. For the studies involving parasite acidification, the pHi was lowered using the NH<sub>4</sub>Cl prepulse technique, as described previously (15). Thus, promastigotes (2 × 10<sup>7</sup>) were resuspended in 50 μl of standard buffer (described above) containing 40 mM NH<sub>4</sub>Cl at 28°C for 15 min. The parasites were then centrifuged and resuspended in standard buffer with or without the H<sup>+</sup>-ATPase inhibitor DCCD and in chloride-free buffer (135 mM sodium gluconate, 5 mM potassium gluconate, 5 mM glucose, 1 mM calcium gluconate, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, and 10 mM HEPES-Tris [pH 7.4]). The rate of recovery from acidification was determined from the slope of the initial 100 s of recovery, and the final pHi was determined after 10 min. To determine the acidification produced by TFQ and sodium azide, BCECF-loaded promastigotes (2 × 10<sup>7</sup> per ml) were incubated in culture medium with 5 μM TFQ or 20 mM sodium azide for different times (1, 3, 5, 10, and 30 min).

**Proton efflux measurements for *Leishmania* parasites.** Extracellular pH, which reflects the proton efflux activity of parasites, was determined as described previously (15). Thus, parasites (1 × 10<sup>8</sup>) were washed and resuspended in 2 ml of weakly buffered (0.1 mM HEPES-Tris; pH 7.4) standard buffer containing 0.38 μM BCECF (free acid). The fluorescence excitation ratio (490 nm/440 nm; emission, 535 nm) was then recorded and translated into nmol of H<sup>+</sup> released/min on the basis of ratios obtained at various extracellular pHs by the addition of known HCl equivalents.

**ATP measurements for *L. major* lines.** ATP was measured using a CellTiter-Glo luminescent assay (Promega), which generates a luminescent signal proportional to the amount of ATP present. Promastigotes (4 × 10<sup>6</sup> per ml) were incubated in culture medium at different TFQ concentrations (1, 2, 5, 10, and 20 μM) for 60 min. For glycolytic and mitochondrial ATP determination, parasites were incubated separately in HBS buffer plus 20 mM sodium azide to inhibit mitochondrial oxidative ATP generation, and glucose-free HBS buffer plus 5 mM 2-deoxy-D-glucose and 5 mM sodium pyruvate to inhibit glycolytic ATP generation, for 1 h at 28°C. For the study of ATP levels at different pHi values, promastigotes (2 × 10<sup>7</sup> per ml) were incubated in distinct buffers to obtain a different pHi, as described previously (15). The buffers used were regular buffer (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM glucose, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, and 10 mM HEPES-Tris for pH 7.4 or 10 mM MES-Tris for pH 5.5), regular buffer containing 25 mM HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, sodium-free buffer (135 mM choline Cl, 5 mM KCl, 5 mM glucose, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MgSO<sub>4</sub>, and 10 mM HEPES-Tris [pH 7.4]) and chloride-free buffer (described above). The pHi of parasites was measured using BCECF-AM as the pHi fluorescent probe, as described above. A 25-μl aliquot of parasites was then transferred to a 96-well plate, mixed with the same volume of CellTiter-Glo, and incubated in the dark for 10 min, and the bioluminescence was measured using an Infinite F200 microplate reader (Tecan Austria GmbH, Austria).

**Determination of intracellular pyruvate levels in *Leishmania* lines.** Pyruvate was extracted as described by Zhu et al. (35). Briefly, 5 × 10<sup>8</sup> parasites were incubated in HBS buffer or in glucose-free HBS buffer plus 5 mM 2-deoxy-D-glucose for 1 h at 28°C. The parasites were then collected and resuspended in 0.1 ml of ice-cold 0.25 M HClO<sub>4</sub> and incubated on ice for 5 min. The resulting mixture was neutralized with 2.8 μl of 5 M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (pH ≈ 6.5). The supernatant was collected after centrifugation at 10,000 × g for 5 min. Pyruvate was measured using a fluorimetric assay (35) based on the oxidation of pyruvate by pyruvate oxidase. The hydrogen peroxide generated reacts with nonfluorescent Amplex Red at a 1:1 stoichiometry to form the red fluorescent product resorufin. This fluorescence is proportional to the initial pyruvate concentration in the solution. Briefly, 20 μl of intracellular pyruvate extract was pipetted into a 96-well white plate, and 180 μl of reaction solution (final concentration, 100 mM potassium phosphate with 1 mM EDTA [pH 6.7], 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 μM FAD, 0.2 mM TPP, 0.2 U/ml pyruvate oxidase, 50 μM Amplex Red, and 0.2 U/ml HRP) was then



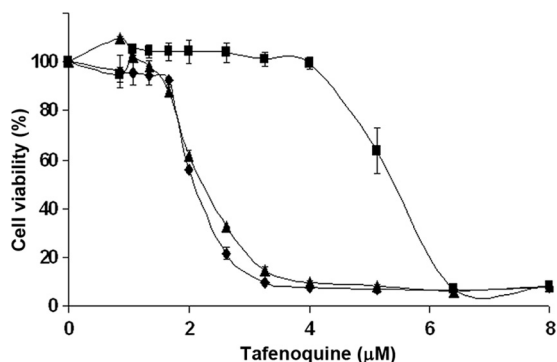


FIG. 1. TFQ sensitivity of *L. major* promastigotes. *L. major* WT (diamonds), R4 (squares), and revR4 (triangles) lines were assayed for TFQ sensitivity by determination of the percent cell viability using an MTT-based assay, as described in Materials and Methods. Shown are the means  $\pm$  standard deviations (SD) from four independent experiments.

added. Fluorescence at 590 nm was measured upon excitation at 535 nm using a microplate reader (Infinite F200; Tecan Austria GmbH, Austria).

**Determination of pyruvate kinase activity in *Leishmania* lines.** Pyruvate kinase activity was determined as described previously (21). Briefly, parasites ( $1 \times 10^8$ ) were washed twice in PBS, resuspended in hypotonic buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4) plus a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) for 10 min at 4°C, and then disrupted by nitrogen cavitation (90 bar, 30 min, 4°C). Cell debris was removed by centrifugation at  $800 \times g$  and 4°C for 10 min, and the supernatant was then centrifuged at  $100,000 \times g$  and 4°C for 60 min. Pyruvate kinase activity was determined with a lactate dehydrogenase-coupled assay system by measuring the decrease of NADH absorbance at 340 nm. The enzymatic assay was performed at 25°C in 1 ml of reaction mixture containing 50 mM triethanolamine buffer (pH 7.2), 2.5 mM phosphoenolpyruvate, 2 mM ADP, 6 mM  $MgSO_4$ , 50 mM KCl, 0.42 mM NADH, and 6.25  $\mu g$  lactate dehydrogenase. The reaction was initiated by the addition of 50  $\mu g$  of protein from the supernatant from the centrifugation performed at  $100,000 \times g$ .

**Glucose uptake assay for *Leishmania* lines.** The accumulation of glucose was determined after incubation of  $2 \times 10^7$  promastigotes with 0.15  $\mu Ci/ml$  [ $^{14}C$ ]glucose for 10 min at 28°C in glucose-free HBS buffer. The parasites were subsequently washed with PBS containing 6 mM nonradioactive glucose at 4°C and then with PBS alone. The cell-associated radioactivity was measured by liquid scintillation counting, and the protein concentration was determined using a Bradford kit (Bio-Rad).

**Statistical analysis.** Statistical significance was calculated by using Student's *t* test. Differences were considered significant at a *P* value of  $<0.05$ .

## RESULTS

**Generation of a TFQ-resistant *L. major* line.** A TFQ-resistant *L. major* line was selected *in vitro* by a stepwise adaptation process up to a maximum of 4  $\mu M$  TFQ. Subsequent attempts to increase the level of TFQ resistance were unsuccessful. This TFQ-resistant line (R4) has an  $EC_{50}$  of  $5.45 \pm 0.35 \mu M$ , a 2.5-fold-higher concentration than for the WT line (Fig. 1 and Table 1). The R4 parasites showed a growth rate similar to that of the WT line. Additionally, no morphological differences were observed between the two lines, as determined by light microscopy and flow cytometry analyses (data not shown). The resistance phenotype was unstable in drug-free medium for up to 4 weeks; the revertant line (revR4) presented a sensitivity ( $2.26 \pm 0.02 \mu M$ ) that was similar to that of the WT parasites (Fig. 1). Additionally, we found that TFQ resistance in the promastigote forms was maintained in intracellular amastigotes obtained after infection of mouse peritoneal macrophages with WT and R4 promastigotes ( $EC_{50}$ s of  $0.38 \pm 0.03$

and  $0.95 \pm 0.02 \mu M$  for intracellular WT and R4 amastigotes, respectively) and that R4 amastigotes were 2.5-fold more resistant, similar to the value obtained for R4 promastigotes. Additionally, the R4 line profile showed significant cross-resistance to the 8-aminoquinolines sitamaquine (2-fold more resistant) and primaquine (1.9-fold; Table 1); no cross-resistance to the 4-aminoquinolines chloroquine and mefloquine and the quinoline derivative quinine was observed. As can be seen from Table 1, the R4 parasites did not show any significant cross-resistance to other antileishmanial drugs, such as trivalent antimony, pentamidine, miltefosine, paromomycin, and ketoconazole.

**TFQ uptake and accumulation in acidic vesicles.** To determine whether TFQ resistance in R4 parasites was associated with a failure to accumulate the drug, TFQ uptake experiments were therefore carried out using spectrofluorometric techniques. The time course uptake of TFQ in WT, R4, and revR4 lines showed that TFQ uptake became saturated after 5 min (data not shown), with a 24% lower uptake in R4 parasites with respect to their WT counterparts and intermediate values for the revR4 line (data not shown). Additionally, no significant differences in TFQ efflux between the R4 and WT parasites were observed (data not shown). A decrease in R4 and revR4 drug uptake was also observed for [ $^{14}C$ ]sitamaquine, which present a 55% lower uptake in R4 parasites than in WT parasites, and the revR4 line presents accumulation values of 25% (data not shown). Since TFQ and sitamaquine accumulate in acidic vesicles, such as acidocalcisomes (3, 14), the differences in the size of such organelles could determine the TFQ accumulation. In fact, with the acidic organelles in WT parasites being larger than those in the R4 and revR4 lines, as can be seen from the significantly lower accumulation of LysoTracker Green (data not shown), a fluorescent acidotropic probe was used to label acidic organelles (mainly acidocalcisomes) in *Leishmania* (18).

TABLE 1. Drug sensitivity profile for *L. major* promastigote lines<sup>a</sup>

Drug	$EC_{50}$ ( $\mu M$ ) <sup>b</sup>		RI <sup>c</sup>
	WT	R4	
Tafenoquine	$2.24 \pm 0.15$	$5.49 \pm 0.35$	2.5*
Sitamaquine	$12.02 \pm 0.38$	$24.49 \pm 1.92$	2*
Primaquine	$27.73 \pm 0.24$	$53.04 \pm 1.14$	1.9*
Quinine	$9.41 \pm 0.11$	$9.53 \pm 0.06$	1
Chloroquine	$18.75 \pm 1.25$	$23.82 \pm 0.81$	1.3
Mefloquine	$12.48 \pm 0.55$	$13.92 \pm 0.86$	1.1
Sb <sup>III</sup>	$15.43 \pm 0.73$	$21.12 \pm 0.88$	1.4
Amphotericin B	$1.87 \pm 0.12$	$3.16 \pm 0.23$	1.7
Ketoconazole	$19.98 \pm 0.56$	$28.05 \pm 0.71$	1.4
Pentamidine	$0.28 \pm 0.02$	$0.45 \pm 0.04$	1.8
Miltefosine	$17.69 \pm 0.51$	$25.69 \pm 1.12$	1.5
Paromomycin	$4.29 \pm 0.04$	$3.98 \pm 0.14$	1
Daunomycin	$0.22 \pm 0.01$	$0.38 \pm 0.01$	1.7

<sup>a</sup> *L. major* WT and R4 lines were grown as described in Materials and Methods for 72 h at 28°C in the presence of increasing concentrations of drugs. Subsequently, cell viability was determined using an MTT-based assay.

<sup>b</sup> Data are means of  $EC_{50}$ s  $\pm$  SD from three independent experiments.

<sup>c</sup> Resistance index (RI) was calculated by dividing the  $EC_{50}$ s for R4 parasites by that for WT parasites. Significant differences were determined by Student's *t* test (\*, *P*  $<0.05$ ).

<sup>d</sup>  $EC_{50}$ s for Sb<sup>III</sup> are expressed in  $\mu g/ml$ .

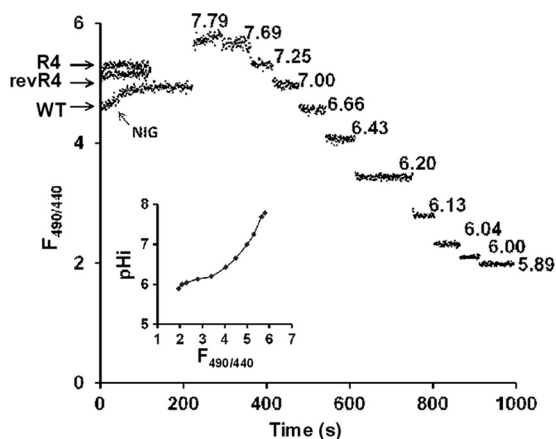


FIG. 2. Determination of intracellular pH (pHi) in *L. major* lines. *Leishmania* WT promastigotes loaded with BCECF-AM (5  $\mu$ g/ml, 30 min) were exposed to a KCl/HEPES-nigericin (NIG)-containing solution (pH 7.1). The traces represent the fluorescence signal ratio (excitation ratio, 490 nm/440 nm; emission, 535 nm) obtained at different pHs after the addition of acidic MES or basic Tris-CIH. The inset represents the dependence of the fluorescence excitation ratio on pHi, i.e., extracellular pH. According to this calibration curve, *L. major* WT has a pHi of 6.75. Similar calibration curves were obtained for R4 and revR4 parasites (data not shown). R4 has a pHi of 7.21, and revR4 has a pHi of 7.11.

**An increase in pHi reduces TFQ accumulation.** The accumulation of weakly basic aminoquinolines, such as amodiaquine, chloroquine, and more recently, sitamaquine, seems to be pH dependent (9, 14). Initially, we determined the pHi of *Leishmania* lines using BCECF as a fluorescent-dependent pH indicator (28). Under physiological culture conditions, WT promastigotes maintained a steady-state pHi of  $6.75 \pm 0.01$  ( $n = 5$ ) (Fig. 2), a value similar to that reported by other authors (28), whereas R4 parasites presented a pHi of  $7.21 \pm 0.02$  ( $n = 5$ ) (Fig. 2), which is 0.46 pH units higher than that observed for WT parasites. Interestingly, a similar pHi alkalinization was observed in revR4 parasites, which presented a pHi of  $7.11 \pm 0.01$  (Fig. 2), 0.36 units higher than that for WT parasites. These findings suggest that an increased pHi could be associated, in part, with decreased TFQ accumulation in R4 parasites. To validate this hypothesis, we induced an intracellular alkalinization of parasites with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and then incubated the parasites with TFQ. The pHi obtained for WT parasites pretreated with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  increased by 0.94 units ( $n = 4$ ) and was associated with a significant reduction in TFQ accumulation (close to 35%) with respect to the control parasites (Table 2). Similar experiments using R4 and revR4 parasites led to a moderate increase in the pHi values (0.24 and 0.30 units, respectively), both of which were associated with a lower, but nevertheless significant, decrease in TFQ accumulation (4% and 11.7% for R4 and revR4, respectively; Table 2).

**Activation of a plasma membrane P-type  $\text{H}^+$ -ATPase in R4 parasites.** One proposed mechanism for pHi regulation in *Leishmania* promastigotes involves a plasma membrane P-type  $\text{H}^+$ -ATPase (15) identified for other unicellular organisms (15, 28). In light of the possibility that the increased pHi observed with the R4 and revR4 *Leishmania* lines could be due to an increased P-type  $\text{H}^+$ -ATPase activity, we determined the pro-

ton efflux activity as described previously (15). The fluorescence ratios obtained (excitation at 505/440 nm and emission detected at 530 nm) were transformed into the amount of  $\text{H}^+$  released  $\text{min}^{-1}$ . The results confirmed that the proton efflux in R4 parasites was significantly higher, with a value of  $24.58 \pm 0.05$   $\text{nmol H}^+/\text{min}$  per  $10^8$  cells ( $7.65 \pm 0.44$   $\text{nmol H}^+/\text{min}$  per  $10^8$  WT parasites). The R4 parasites therefore presented a higher proton efflux activity (3.21-fold) than WT parasites as a mechanism of pHi alkalinization. Additionally, revR4 parasites presented a proton efflux activity similar to that of R4 parasites ( $22.63 \pm 0.37$   $\text{nmol H}^+/\text{min}$  per  $10^8$  cells). Experiments to determine the recovery capacity of pHi following acidification support these findings. Thus, as can be seen from Table 3, R4 parasites recovered their pHi significantly faster than WT parasites (recovery rates of  $0.32 \pm 0.04$  and  $0.17 \pm 0.02$ , respectively). Similar results were obtained for revR4 parasites, which presented a recovery rate intermediate between those for WT and R4 parasites ( $0.28 \pm 0.02$ ; Table 3). The recovery rates for the different *Leishmania* lines were slightly lower when using the specific  $\text{H}^+$ -ATPase inhibitor DCCD, and a significant decrease in the final pHi was also observed. These results support the presence of a plasma membrane  $\text{H}^+$ -ATPase as a major pHi regulator (15). The pHi recovery was also determined by using chloride-free buffer, as the chloride ion is essential for acid extrusion in *Leishmania* promastigotes (29). The recovery rates for the R4 and revR4 *Leishmania* lines were found to be higher than that for WT parasites under these conditions (Table 3).

**The effect of TFQ on ATP synthesis.** We assessed the ATP levels in *L. major* lines in the presence of TFQ and found that WT parasites exhibit a significant decrease in total ATP levels in response to different TFQ concentrations (Fig. 3A). Furthermore, R4 parasites showed significantly higher basal ATP levels than WT parasites, along with a lower decrease in ATP levels in response to TFQ treatment (Fig. 3A). Additionally, revR4 parasites presented ATP levels intermediate between those for the WT and R4 lines, although the levels were similar to those for WT parasites at TFQ concentrations above 5  $\mu\text{M}$  (Fig. 3A). We also examined whether the increased total ATP levels observed for R4 parasites were due to an increase in mitochondrial ATP synthesis or increased glycolysis. Sodium azide treatment inhibits the F1-ATPase and cytochrome *c* oxidase from complex IV, thus producing a loss of mitochondrial membrane potential that is critical for the electron transport

TABLE 2. pHi dependence of tafenoquine accumulation in *Leishmania* promastigotes<sup>a</sup>

Promastigote	pHi		TFQ uptake (AU/mg protein)	
	Control	$\text{NH}_4\text{Cl}$	Control	$\text{NH}_4\text{Cl}$
WT	$6.75 \pm 0.01$	$7.69 \pm 0.02^*$	$10,775 \pm 149$	$7,009 \pm 95^*$
R4	$7.21 \pm 0.02$	$7.45 \pm 0.01^*$	$8,809 \pm 84$	$8,462 \pm 67^*$
revR4	$7.11 \pm 0.01$	$7.41 \pm 0.02^*$	$9,657 \pm 127$	$8,524 \pm 59^*$

<sup>a</sup> WT, R4, and revR4 *L. major* promastigotes were pretreated at 28°C with 20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  for 1 min and incubated with 5  $\mu\text{M}$  tafenoquine (TFQ) in the presence of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  for 15 min. pHi values were determined as described in the legend of Fig. 2. Data are the means  $\pm$  SD from three independent experiments. Significant differences were determined by Student's *t* test (\*, *P* value was  $<0.05$  versus the corresponding control without  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). AU, arbitrary units.

TABLE 3. pH<sub>i</sub> recovery in *L. major* lines<sup>a</sup>

Buffer (pH 7.4)	Final pH <sub>i</sub>			Recovery rate		
	WT	R4	revR4	WT	R4	revR4
Standard	6.73 ± 0.03	7.13 ± 0.02*	7.03 ± 0.02*	0.17 ± 0.02	0.32 ± 0.04*	0.28 ± 0.02*
DCCD (50 μM)	6.52 ± 0.04†	7.03 ± 0.03*†	6.88 ± 0.03*†	0.14 ± 0.01	0.26 ± 0.03*	0.21 ± 0.01*†
Cl <sup>-</sup> -free	6.37 ± 0.03†	6.87 ± 0.01*†	6.78 ± 0.02*†	0.06 ± 0.01†	0.18 ± 0.02*†	0.15 ± 0.02*†

<sup>a</sup> BCECF-loaded (5 mg/ml, 30 min) WT, R4, and revR4 promastigotes were acidified by NH<sub>4</sub>Cl pretreatment (40 mM) for 15 min and resuspended in standard or Cl<sup>-</sup>-free buffers at pH 7.4. The H<sup>+</sup>-ATPase inhibitor DCCD (dicyclohexylcarbodiimide) was added to the standard buffer at 50 μM. Rate of recovery from acidification was determined from the slope of the initial 100 s of recovery, and final intracellular pH (pH<sub>i</sub>) was determined after 10 min as described by Marchesini and Docampo (15). Data are the means ± SD from three independent experiments. Significant differences (\*,  $P < 0.05$  versus WT parasites; †,  $P < 0.05$  versus standard buffer) were determined by Student's *t* test.

chain activity involved in the generation of ATP. Under our experimental conditions, sodium azide decreased the ATP levels in all *Leishmania* lines studied, although the ATP levels in R4 parasites were significantly higher than those observed for

the WT and revR4 lines (Fig. 3B), thus suggesting that glycolytically generated ATP is higher in R4 parasites. We therefore inhibited glycolysis in *Leishmania* lines deprived of glucose but provided with 2-deoxy-D-glucose, a competing substrate for hexokinase, and pyruvate to ensure that the majority of ATP generation was dependent on mitochondrial electron transport and the function of complex V. This inhibition of glycolytic ATP synthesis significantly reduced ATP levels to reach similar values in all *Leishmania* lines (Fig. 3B).

**Increased ATP synthesis by glycolysis in R4 parasites.** The TFQ-resistant *Leishmania* line upregulates glycolysis, whose final step involves the conversion of phosphoenolpyruvate into pyruvate by the enzyme pyruvate kinase. The change in intracellular pyruvate concentration is therefore proportional to the glycolytic activity. We compared the levels of pyruvate between *Leishmania* lines using a highly sensitive Amplex Red-based fluorescent assay. As shown in Fig. 4A, the pyruvate concentration in R4 parasites was higher (approximately 3-fold) than that observed for the WT line, in agreement with the higher levels of glycolytically generated ATP. The revR4 parasites presented pyruvate levels intermediate between those for the WT and R4 lines. Furthermore, when parasites were pretreated with the glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose, the amount of pyruvate in the three lines dropped significantly (Fig. 4A), thereby supporting the hypothesis that the higher pyruvate levels present in the R4 line result from glycolysis. As pyruvate kinase activity is known to be critical in glycolysis, we determined this activity in *Leishmania* lines; no significant differences between parasite lines were observed (data not shown). Furthermore, as trypanosomatids normally use glucose as their main carbon source, we tested whether R4 parasites increased their glucose uptake as the starting product for glycolysis. Thus, the parasites were cultured in the presence of 0.5 mM [<sup>14</sup>C]glucose for 10 min, and analysis of the uptake of [<sup>14</sup>C]glucose showed no significant differences between the different *Leishmania* lines (data not shown). Additionally, to discard the possibility that the observed higher level of ATP produced by glycolysis in the R4 line could be due to a different pH<sub>i</sub>, which could influence the activity of key enzymes involved in glycolysis, we determined the ATP levels for the *Leishmania* WT line with different pH<sub>i</sub> values. The results showed that total ATP values were similar at the different *Leishmania* pH<sub>i</sub> values studied (Fig. 4B).

**TFQ induces a decrease in pH<sub>i</sub>.** As TFQ induces a reduction in intracellular ATP levels and the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase is the major regulator of pH<sub>i</sub> in *Leishmania*, we investigated whether TFQ treatment modified the pH<sub>i</sub> of para-

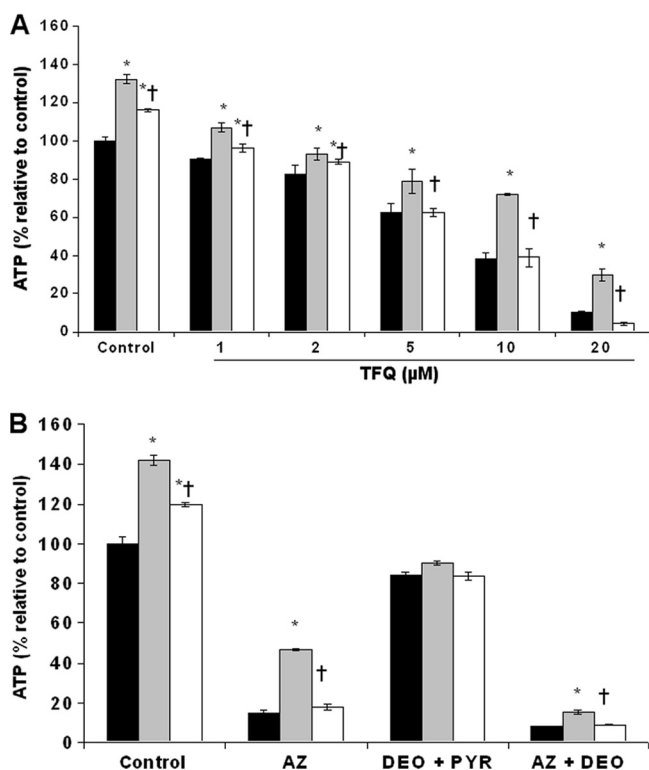


FIG. 3. Effect of TFQ on ATP levels in *L. major* promastigotes. Promastigotes ( $4 \times 10^6$  per ml) of WT (black histograms), R4 (gray histograms), and revR4 (white histograms) *L. major* lines were incubated (A) in culture medium with different concentrations (1, 2, 5, 10, and 20 μM) of TFQ for 60 min or (B) in HBS buffer (control), HBS buffer plus 20 mM sodium azide (AZ) to inhibit mitochondrial oxidative ATP generation, glucose-free HBS buffer plus 5 mM 2-deoxy-D-glucose (DEO) and 5 mM sodium pyruvate (PYR) to inhibit glycolytic ATP generation (DEO + PYR), and glucose-free HBS buffer plus 5 mM DEO and 20 mM AZ to inhibit both glycolytic and oxidative ATP generation (AZ + DEO). Afterward, 25-μl aliquots of the parasites were transferred to a 96-well plate, mixed with the same volume of CellTiter-Glo (Promega), and incubated for 10 min in the dark, and the sample bioluminescence was measured. ATP levels were calculated relative to 100% of the control WT. Data are the means ± SD from three independent experiments. Significant differences were determined using Student's *t* test (\*,  $P < 0.05$  versus WT parasites; †,  $P < 0.05$  versus R4 parasites).



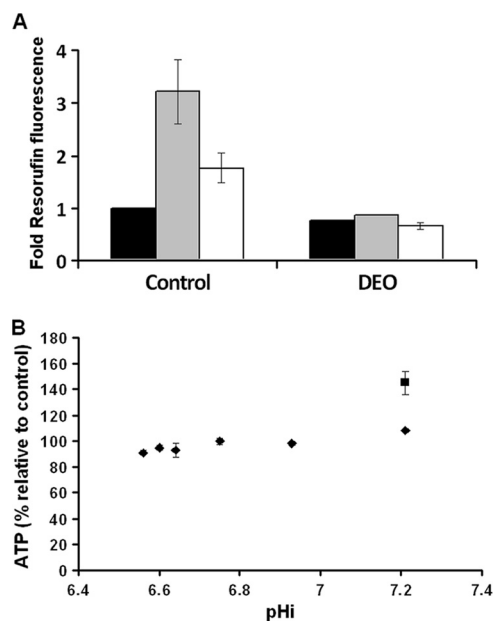


FIG. 4. Intracellular pyruvate values and the effect of pH<sub>i</sub> on ATP levels. (A) Intracellular pyruvate levels for WT (black), R4 (gray), and revR4 (white) lines pretreated without (Control) or with (DEO) 2-deoxy-D-glucose were determined by a fluorimetric assay, as described in Materials and Methods. Different intracellular pyruvate levels of the samples were compared with that of the WT control. The fluorescence of resorufin is proportional to the initial pyruvate concentration in the solution. Data are the means  $\pm$  SD from three independent experiments. (B) The effect of pH<sub>i</sub> on ATP levels was determined for WT promastigotes (diamonds) at different pH<sub>i</sub> values as described in Materials and Methods. The *Leishmania* R4 line (square) was used as the control. Data are the means  $\pm$  SD from three independent experiments.

sites. The results of this study showed that TFQ produces a significant and rapid acidification of pH<sub>i</sub> after 1 min of treatment (Fig. 5A). Indeed, after 30 min, the pH<sub>i</sub> values for WT and revR4 parasites were 6.50 and 6.49, respectively, whereas the acidification induced by TFQ in R4 parasites was significantly lower (pH<sub>i</sub> 6.94) (Fig. 5A). These results support our hypothesis that R4 parasites increase their ATP synthesis in order to maintain the functionality of a plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase involved in the regulation and recovery of pH<sub>i</sub> as a defensive strategy against the TFQ toxicity. Similar results were observed after treatment with sodium azide (Fig. 5B), which produces a reduction in pH<sub>i</sub> as a consequence of ATP depletion and nonoptimal functioning of the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase in *Leishmania*.

## DISCUSSION

8-Aminoquinolines, such as sitamaquine and TFQ, have recently been reported to be promising antileishmania drugs (12, 33, 34). Furthermore, we have shown that TFQ induces mitochondrial dysfunction in *Leishmania*, with the resulting decreased oxygen consumption and depolarization of the mitochondrial membrane potential leading to a final apoptosis-like process (3). In this study, we induced experimental resistance to TFQ in order to determine the ability of *Leishmania* to generate resistance to this 8-aminoquinoline and as a strategy

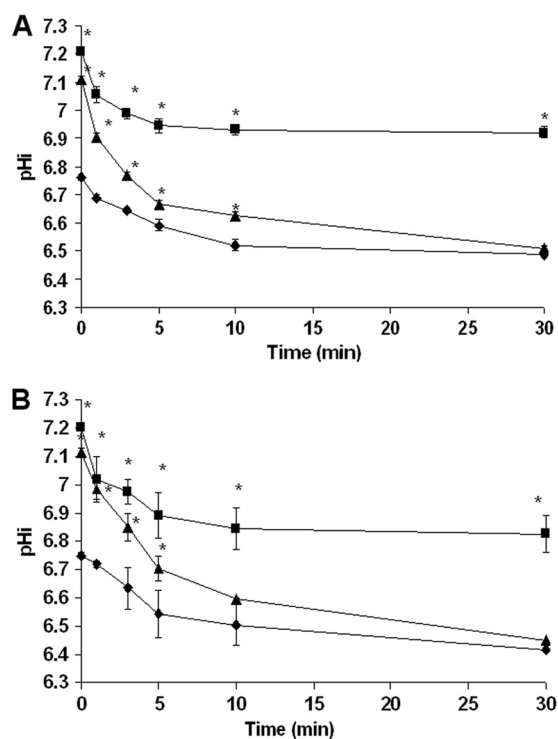


FIG. 5. Acidification of pH<sub>i</sub> by TFQ and sodium azide in *L. major* lines. WT (diamonds), R4 (squares), and revR4 (triangles) BCECF-loaded promastigotes were incubated with 5  $\mu$ M TFQ (A) or with 20 mM sodium azide (B) at different time points (1, 3, 5, 10, and 30 min). The pH<sub>i</sub> was calculated from a calibration curve as described in the legend of Fig. 2. The results are the means  $\pm$  SD from three independent experiments. Significant differences versus the WT were determined using Student's *t* test (\*,  $P < 0.05$  versus WT parasites).

to validate the mechanism of action of these compounds in this protozoan parasite. Thus, we selected for a TFQ-resistant *L. major* (R4) line that presents 2.5-fold higher EC<sub>50</sub>s for TFQ in both the promastigote and intracellular amastigote stages, with an unstable resistant phenotype after 1 month without drug pressure. Experiments to increase the TFQ resistance level further were unsuccessful, although it should be noted that other authors have obtained 5- and 3-fold-higher resistance levels for sitamaquine in the promastigote and intracellular amastigote forms of *Leishmania*, respectively (2). None of the standard leishmanicidal drugs (Sb<sup>III</sup>, amphotericin B, miltefosine, and paromomycin) displayed a cross-resistance profile with TFQ in the R4 line; cross-resistance was limited to other 8-aminoquinolines, such as sitamaquine and primaquine. The cross-resistance to sitamaquine detected is interesting, as this is a promising oral drug against leishmaniasis.

Reduced drug uptake is one of the main mechanisms of resistance in *Leishmania* (2, 5, 19); however, this mechanism was not relevant for the resistance to TFQ, as decreased TFQ uptake levels were similar for the R4 and revR4 lines.

Similarly to sitamaquine (14) and other aminoquinolines (9), TFQ appears to cross the plasma membrane by a pH gradient-driven diffusion process. The R4 parasites present a higher pH<sub>i</sub> than WT parasites, as does the revR4 line, thus suggesting that these parasites maintain a phenotype with characteristics similar to that of the resistant line even though the TFQ sensitivity

was identical to that for WT parasites. The increase of pHi in R4 and revR4 *Leishmania* lines could contribute to the lower TFQ accumulation observed for these parasites. Indeed, the change in pHi observed as a result of pretreatment with NH<sub>4</sub>Cl resulted in a significant reduction in TFQ accumulation. Additionally, we observed that R4 and revR4 *Leishmania* lines have a higher capacity to regulate the pHi than the WT line, although this regulation is not sufficient to prevent the toxicity of this drug in revR4.

Under physiological conditions, approximately 70% of the total bioenergetic requirements of *Leishmania* are fulfilled by oxidative phosphorylation in the mitochondria, a metabolic process which produces more ATP molecules from a given amount of glucose than glycolysis. However, when the ability of parasites to generate ATP through mitochondrial oxidative phosphorylation is compromised, parasites are able to adapt alternative metabolic pathways, such as increasing their glycolytic activity, to maintain their energy supply. We have demonstrated that an increase in glycolytic metabolism observed for R4 parasites is associated with increased ATP delivery to essential ATP-consuming cell processes, such as the maintenance of ion-motive ATPases required to retain their pHi values. A similar situation has been described for cancer cells, where mitochondrial metabolic defects due, in part, to mutations in mitochondrial DNA, dysfunction of the electron transport chain, aberrant expression of enzymes involved in energy metabolism, and insufficient oxygen available in the cellular microenvironment contribute to an increased dependency on glycolysis (32). This results in increased expression of enzymes required for glycolysis, such as hexokinase II, the enzyme catalyzing the first step of the glycolytic pathway (16). *Leishmania* R4 parasites can increase glycolytic ATP synthesis in several different ways, including upregulation of glycolytic enzymes or an increased uptake of glucose as a carbon source. Additionally, the modification of pHi in the R4 line can also change the enzymatic activities of glycolytic enzymes. We have observed that *Leishmania* R4 parasites present an increased accumulation of pyruvate as the end product of glycolysis but with no modification of their pyruvate kinase activity, this kinase being one of the key enzymes involved in glycolysis in trypanosomatids (26). Additionally, R4 parasites do not modify the accumulation of glucose as a carbon source. Thus, *Leishmania* R4 parasites can increase glycolytic ATP either through upregulation of the metabolism using other substrates as a carbon and energy source or by upregulation of other glycolytic enzymes. The first option can be ruled out in light of the fact that the ATP levels after treatment with sodium azide and deoxyglucose, which inhibits both mitochondrial synthesis and glycolysis, are significantly diminished. This indicates that R4 parasites cannot make use of other carbon sources, such as  $\beta$ -oxidation of fatty acids or the catabolism of certain amino acids (22). Experiments are under way to determine which glycolytic enzymes are upregulated and could therefore be used as molecular markers of TFQ resistance in *Leishmania*. Additionally, further studies using a metabolomics-based approach will be undertaken to identify the metabolic pathways associated with TFQ resistance.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Spanish grants SAF2009-07440 (to F.G.), ISCIII-Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET) RD06/0021/0002 (to F.G.), and MSC-FIS PI081902 (to J.M.P.-V.) and by the Plan Andaluz de Investigación (code BIO130).

We acknowledge the support of GlaxoSmithKline (Greenford, United Kingdom) for the tafenoquine, sitamaquine, and [<sup>14</sup>C]sitamaquine used throughout this research work.

We thank Roberto Docampo for his useful suggestions for the manuscript.

## REFERENCES

- Berman, J. D., and L. S. Lee. 1983. Activity of 8-aminoquinolines against *Leishmania tropica* within human macrophages in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**:753–759.
- Bories, C., S. Cojean, F. Huteau, and P. M. Loiseau. 2008. Selection and phenotype characterisation of sitamaquine-resistant promastigotes of *Leishmania donovani*. *Biomed. Pharmacother.* **62**:164–167.
- Carvalho, L., et al. 2010. Tafenoquine, an antiplasmodial 8-aminoquinoline, targets *Leishmania* respiratory complex III and induces apoptosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:5344–5351.
- Chiquero, M. J., et al. 1998. Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. *Biochem. Pharmacol.* **55**:131–139.
- Croft, S. L., S. Sundar, and A. H. Fairlamb. 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**:111–126.
- Guerin, P. J., et al. 2002. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect. Dis.* **2**:494–501.
- Reference deleted.
- Hale, B. R., et al. 2003. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial of tafenoquine for weekly prophylaxis against *Plasmodium falciparum*. *Clin. Infect. Dis.* **36**:541–549.
- Hawley, S. R., P. G. Bray, B. K. Park, and S. A. Ward. 1996. Amodiaquine accumulation in *Plasmodium falciparum* as a possible explanation for its superior antimalarial activity over chloroquine. *Mol. Biochem. Parasitol.* **80**:15–25.
- Jackson, P. R., et al. 1986. Detection and characterization of *Leishmania* species and strains from mammals and vectors by hybridization and restriction endonuclease digestion of kinetoplast DNA. *Vet. Parasitol.* **20**:195–215.
- Kennedy, M. L., et al. 2001. Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *J. Med. Chem.* **44**:4668–4676.
- Kinnamon, K. E., et al. 1978. The antileishmanial activity of lepidines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**:751–757.
- Krogstad, D. J., et al. 1987. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. *Science* **238**:1283–1285.
- López-Martín, C., J. M. Pérez-Victoria, L. Carvalho, S. Castans, and F. Gamarro. 2008. Sitamaquine sensitivity in *Leishmania* species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:4030–4036.
- Marchesini, N., and R. Docampo. 2002. A plasma membrane P-type H(+)-ATPase regulates intracellular pH in *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **119**:225–236.
- Mathupala, S. P., A. Rempel, and P. L. Pedersen. 2001. Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J. Biol. Chem.* **276**:43407–43412.
- Moore, E. M., and D. N. Lockwood. 2010. Treatment of visceral leishmaniasis. *J. Glob. Infect. Dis.* **2**:151–158.
- Mullin, K. A., et al. 2001. Regulated degradation of an endoplasmic reticulum membrane protein in a tubular lysosome in *Leishmania mexicana*. *Mol. Biol. Cell* **12**:2364–2377.
- Ouellette, M., J. Drummelsmith, and B. Papadopolou. 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist. Updat.* **7**:257–266.
- Reference deleted.
- Sandoval, W., R. Isea, E. Rodriguez, and J. L. Ramirez. 2008. A biochemical and genetic study of *Leishmania donovani* pyruvate kinase. *Gene* **424**:25–32.
- Saunders, E. C., et al. 2010. Central carbon metabolism of *Leishmania* parasites. *Parasitology* **137**:1303–1313.
- Seifert, K., et al. 2003. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int. J. Antimicrob. Agents* **22**:380–387.
- Shanks, G. D., et al. 2001. A new primaquine analogue, tafenoquine (WR 238605), for prophylaxis against *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin. Infect. Dis.* **33**:1968–1974.
- Tekwani, B. L., and L. A. Walker. 2006. 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **19**:623–631.

26. **van Schaftingen, E., F. R. Opperdoes, and H. G. Hers.** 1985. Stimulation of *Trypanosoma brucei* pyruvate kinase by fructose 2,6-bisphosphate. *Eur. J. Biochem.* **153**:403–406.
27. **Verdier, F., J. Le Bras, F. Clavier, I. Hatin, and M. C. Blayo.** 1985. Chloroquine uptake by *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes during in vitro culture and its relationship to chloroquine resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**:561–564.
28. **Vieira, L., A. Lavan, F. Dagger, and Z. I. Cabantchik.** 1994. The role of anions in pH regulation of *Leishmania major* promastigotes. *J. Biol. Chem.* **269**:16254–16259.
29. **Vieira, L., I. Slotki, and Z. I. Cabantchik.** 1995. Chloride conductive pathways which support electrogenic H<sup>+</sup> pumping by *Leishmania major* promastigotes. *J. Biol. Chem.* **270**:5299–5304.
30. **Walsh, D. S., et al.** 2004. Efficacy of monthly tafenoquine for prophylaxis of *Plasmodium vivax* and multidrug-resistant *P. falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.* **190**:1456–1463.
31. **Walsh, D. S., et al.** 2004. Randomized trial of 3-dose regimens of tafenoquine (WR238605) versus low-dose primaquine for preventing *Plasmodium vivax* malaria relapse. *Clin. Infect. Dis.* **39**:1095–1103.
32. **Xu, R. H., et al.** 2005. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res.* **65**:613–621.
33. **Yardley, V., F. Gamarro, and S. L. Croft.** 2010. Antileishmanial and anti-trypanosomal activity of the 8-aminoquinoline tafenoquine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:5356–5358.
34. **Yeates, C.** 2002. Sitamaquine (GlaxoSmithKline/Walter Reed Army Institute). *Curr. Opin. Investig. Drugs* **3**:1446–1452.
35. **Zhu, A., R. Romero, and H. R. Petty.** 2010. A sensitive fluorimetric assay for pyruvate. *Anal. Biochem.* **396**:146–151.

## **ANEXO 7**

### **Tafenoquine, an Antiplasmodial 8-Aminoquinoline, Targets *Leishmania* Respiratory Complex III and Induces Apoptosis.**

**Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 54, p. 5344-51; 2010.**

Luis Carvalho, Juan Román Luque-Ortega, José Ignacio Manzano, Santiago Castanys, Luis Rivas y Francisco Gamarro.

La tafenoquina, una 8-aminoquinolina análoga de la primaquina, con la que se están llevando a cabo ensayos clínicos de fase IIb/III para el tratamiento y la prevención de la malaria, puede representar una alternativa para el tratamiento de la leishmaniasis dado que ha mostrado ser eficaz frente infecciones experimentales de *Leishmania donovani* en ratón. En este trabajo, hemos estudiado el mecanismo de acción de la tafenoquina frente a *Leishmania*. Al igual que sucede con la sitamaquina, la toxicidad de la tafenoquina es independiente del contenido de acidocalcisomas. La tafenoquina afecta al metabolismo energético de los promastigotes de *Leishmania*, causando una rápida caída en el nivel de ATP intracelular sin afectar la permeabilidad de la membrana plasmática. La tafenoquina induce disfunción mitocondrial a través de la inhibición de la citocromo c reductasa (complejo III de la cadena respiratoria), lo que lleva aparejado una disminución en la tasa de consumo de oxígeno y la despolarización del potencial de la membrana mitocondrial; a esto le sucede una producción de especies reactivas de oxígeno, la elevación del nivel de  $\text{Ca}^{2+}$  libre intracelular y una posterior fragmentación del ADN. En base a estos resultados, concluimos que la tafenoquina tiene como blanco de acción en *Leishmania* a la mitocondria, e induce la muerte del parásito mediante un proceso similar a la apoptosis.



# Tafenoquine, an Antiplasmodial 8-Aminoquinoline, Targets *Leishmania* Respiratory Complex III and Induces Apoptosis<sup>∇</sup>

Luis Carvalho,<sup>1</sup> Juan Román Luque-Ortega,<sup>2</sup> José Ignacio Manzano,<sup>1</sup> Santiago Castanys,<sup>1</sup> Luis Rivas,<sup>2\*</sup> and Francisco Gamarro<sup>1\*</sup>

*Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra,” CSIC, Granada, Spain,<sup>1</sup> and Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid, Spain<sup>2</sup>*

Received 9 June 2010/Returned for modification 6 July 2010/Accepted 30 August 2010

**Tafenoquine (TFQ), an 8-aminoquinoline analogue of primaquine, which is currently under clinical trial (phase IIb/III) for the treatment and prevention of malaria, may represent an alternative treatment for leishmaniasis. In this work, we have studied the mechanism of action of TFQ against *Leishmania* parasites. TFQ impaired the overall bioenergetic metabolism of *Leishmania* promastigotes, causing a rapid drop in intracellular ATP levels without affecting plasma membrane permeability. TFQ induced mitochondrial dysfunction through the inhibition of cytochrome *c* reductase (respiratory complex III) with a decrease in the oxygen consumption rate and depolarization of mitochondrial membrane potential. This was accompanied by ROS production, elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> levels and concomitant nuclear DNA fragmentation. We conclude that TFQ targets *Leishmania* mitochondria, leading to an apoptosis-like death process.**

Leishmaniasis includes a wide variety of clinical manifestations caused by the protozoan parasite *Leishmania*. Visceral leishmaniasis is the most severe form of the disease and is usually fatal if not treated (<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>). In the absence of a reliable vaccine, leishmaniasis treatment relies exclusively on chemotherapy. Resistance to organic pentavalent antimonials (until recently considered to be the standard treatment) in northeast India (4), together with the severe side effects associated with their use, has led to the use of alternative treatments based on the incorporation of drugs such as amphotericin B, miltefosine, and paromomycin into the arsenal of antileishmanial drugs (8). Nevertheless, the limited number of active drugs has prompted the WHO to recommend a combined therapy in order to extend the life expectancy of these compounds.

Among the new drugs under development, sitamaquine (WR6026; GlaxoSmithKline), an 8-aminoquinoline, currently under phase IIb clinical trials, represents a promising drug for the oral treatment of leishmaniasis (35). In addition, another 8-aminoquinolines have been synthesized and evaluated for their leishmanicidal activity (29, 36). However, the leishmanicidal mechanism of 8-aminoquinolines is still unknown. Sitamaquine, for example, accumulates in the acidocalcisomes, but this organelle has been ruled out as its final target (17). The collapse of mitochondrial potential in digitonized *Leishmania donovani* promastigotes has also been reported (39). Tafenoquine (TFQ), formerly known as WR238605, is an analogue of

primaquine with much lower toxicity than the parental drug. It has demonstrated significant leishmanicidal activity in the mouse experimental model (41) and may represent an alternative treatment for leishmaniasis.

In the present study, we have shown that TFQ inhibits the mitochondrial cytochrome *c* reductase of *Leishmania* promastigotes. This inhibition causes a drop in the intracellular ATP levels of the parasite and the loss of mitochondrial membrane potential. TFQ induces ROS production and deregulation of Ca<sup>2+</sup> homeostasis, followed by nicking and fragmentation of DNA in *Leishmania* promastigotes leading to an apoptosis-like death. Our results provide the first insight into the mechanistic lethal pathway of an 8-aminoquinoline in *Leishmania*. This information may be useful for the design of more specific and less toxic compounds against leishmaniasis.

## MATERIALS AND METHODS

**Reagents.** Tafenoquine (TFQ) was kindly provided by GlaxoSmithKline (Greenford, United Kingdom). A stock solution of 10 mM TFQ was prepared in ethanol. DMNPE-luciferin {D-luciferin-1-[-(4, 5-dimethoxy-2-nitrophenyl) ethyl ester]}, Fluo4-AM, LysoTracker Green DND-26, MitoSOX Red, Pluronic F-127, rhodamine 123 (Rh123) and SYTOX Green, were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). Fatty acid-free bovine serum albumin (BSA), digitonin, ADP, antimycin A, ascorbate, cytochrome *c* (from equine heart), FCCP (carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxyphenylhydrazone),  $\alpha$ -glycerophosphate, malonate, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), KCN, TMPD (tetramethyl-*p*-phenylenediamine), succinate, propidium iodide (PI), and Triton X-100 were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). All other chemicals were of the highest quality available.

**Strains and parasite cultures.** *Leishmania donovani* promastigotes (MHOM/ET/67/HU3) were grown at 28°C in RPMI 1640-modified medium (Invitrogen) supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (HIFBS; Invitrogen). The *L. donovani* strain MHOM/SD/00/1S-2D and its derived line, *L. donovani* 3-Luc, which expresses cytoplasmic firefly luciferase (19), were grown at 25°C in RPMI 1640 medium with 10% HIFBS. *L. major* MHOM/JL/80/Friedlin parental and AP38-null mutant ( $\Delta$ AP3) were kindly provided by J. Mottram (Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom) (2) and cultured at 28°C in RPMI 1640-modified medium supplemented with 20% HIFBS.

\* Corresponding author. Mailing address for F. Gamarro: Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra,” CSIC, Granada, Spain. Phone: 34 958 181667. Fax: 34 958 181632. E-mail: gamarro@ipb.csic.es. Mailing address for L. Rivas: Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid, Spain. Phone: 34 91 8373112, ext. 4234. Fax: 34 91 5360432. E-mail: luis.rivas@cib.csic.es.

<sup>∇</sup> Published ahead of print on 13 September 2010.



**TFQ sensitivity assay.** Logarithmic-phase parasites ( $2 \times 10^6$  promastigotes/ml) were incubated with TFQ (0.5 to 20  $\mu$ M) for 72 h at 28°C in culture medium. Cell proliferation was determined by the MTT colorimetric assay, as described previously (15). Parasites incubated with 0.2% ethanol were used as control.

**Bioluminescence assays.** The *in vivo* variation in intracellular ATP levels was monitored in promastigotes expressing a cytoplasmic form of firefly luciferase, as described previously (19). Briefly, parasites from the *L. donovani* 3-Luc strain ( $2 \times 10^7$  promastigotes/ml) were resuspended in HEPES-buffered saline (HBS; 21 mM HEPES, 0.7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 137 mM NaCl, 5 mM KCl and 6 mM D-glucose, pH 7.1) and DMNPE-luciferin was added at a final concentration of 25  $\mu$ M. Aliquots of this suspension (100  $\mu$ l/well) were immediately distributed into a 96-well black polystyrene microplate. Once the luminescence reached a plateau, different TFQ concentrations were added. Changes in luminescence were recorded with an Infinite F200 microplate reader (Tecan Austria GmbH, Austria). *In vitro* inhibition of recombinant firefly luciferase activity by TFQ was discarded using the ATP determination kit (Invitrogen) in the presence of saturable ATP concentrations. The release of ATP from *L. donovani* promastigotes into the external medium was determined using the same kit.

**Plasma membrane permeabilization.** Plasma membrane integrity was assessed by the entry of the vital dye SYTOX Green, as described previously (20) with some modifications. Briefly, parasites ( $2 \times 10^6$  promastigotes/ml) were treated with 1, 5, and 10  $\mu$ M TFQ for 45 min at 28°C in HBS, washed twice with HBS, and incubated with 2  $\mu$ M SYTOX Green (final concentration) for 15 min at 28°C. The parasites were then transferred into a 96-well microplate (100  $\mu$ l/well) and fluorescence, due to the binding of the dye to intracellular nucleic acids, was recorded with an Infinite F200 microplate reader (Tecan Austria GmbH, Austria) equipped with 485- and 535-nm filters for excitation and emission wavelengths, respectively. Control for maximum fluorescence was obtained by addition of 0.05% Triton X-100.

**Analysis of  $\Delta\Psi_m$ .** The variation of mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) in the promastigotes was monitored using rhodamine 123 (Rh123) accumulation, as described previously (9). To this end, the parasites ( $10^7$  promastigotes/ml) were incubated with 5  $\mu$ M TFQ for 1, 5, 10, and 30 min at 28°C in HBS, and then 0.8  $\mu$ M Rh123 was added and incubated for 5 min. Subsequently, the parasites were washed twice, resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) and analyzed by flow cytometry in a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA) equipped with an argon laser operating at 488 nm. Fluorescence emission between 515 and 545 nm was quantified using Cell Quest software. Parasites that were either untreated or fully depolarized by incubation with 10  $\mu$ M FCCP for 10 min were used as controls.

**Determination of oxygen consumption rates.** Oxygen consumption rates were measured with a Clark-oxygen electrode (Hansatech, KingsLynn, United Kingdom) at 25°C, using 1 ml of promastigote suspension ( $10^8$  cells/ml) in respiration buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 125 mM saccharose, 65 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2.5 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0.3 mM EGTA) supplemented with 5 mM succinate and 1 mg/ml fatty acid-free BSA, as described previously (1). Cells were permeabilized with 60  $\mu$ M digitonin, which allows selective permeation of the plasma membrane but not of the inner mitochondrial membrane (38). Subsequently, 100  $\mu$ M ADP was added to restore state 3 respiration; once a steady rate was reached, TFQ was added. In order to map the site of inhibition by TFQ within the respiratory chain, a set of substrates and inhibitors specific to the different complexes inside the respiratory chain were used. Their final concentrations were: 6.7 mM  $\alpha$ -glycerophosphate, 0.1 mM TMPD plus 1.7 mM ascorbate, and 2 mM malonate.

**Isolation of mitochondrial fraction.** A mitochondrion-enriched fraction was obtained as described by Chen et al. (5). *Leishmania* promastigotes were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), resuspended in hypo-osmotic buffer (5 mM Tris-HCl, pH 7.4) for 10 min at 25°C, and homogenized in a Potter-Elvehjem homogenizer on ice. Cell debris was removed by centrifugation ( $1,000 \times g$ , 10 min, 4°C). The supernatant was next centrifuged at  $13,000 \times g$  (20 min, 4°C). The pellet, containing the mitochondrial fraction, was resuspended in 75 mM sodium phosphate, pH 7.4, and the protein content was adjusted to 2 mg/ml, as measured using Bradford reagent (Bio-Rad).

**Measurement of CcR activity.** Determination of cytochrome *c* reductase (CcR) activity was carried out according to Sottocasa et al. (34), based on the reduction of oxidized cytochrome *c*. Briefly, different TFQ concentrations were added to the incubation mixture (200  $\mu$ g/ml of mitochondrial fraction, 0.02% Triton X-100 and 32  $\mu$ M oxidized cytochrome *c* in 75 mM sodium phosphate pH 7.4). The reaction started by addition of 10 mM succinate (final concentration). The increase of absorbance at 550 nm was monitored for 5 min at 37°C in a Varioskan Flash (Thermo Scientific) microplate reader. Oxidation of reduced cytochrome *c* by cytochrome *c* oxidase (respiratory complex IV) was precluded by previous inhibition of this enzyme with 10 mM KCN. Samples without suc-

cinatase or in the presence of 2  $\mu$ M antimycin A, an inhibitor of cytochrome *c* reductase, were taken as controls.

**Determination of ROS production.** To detect mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production we used the cell-permeable fluorogenic probe MitoSOX Red, which targets mitochondria selectively, being oxidized by local superoxide (32). Parasites ( $2 \times 10^7$  promastigotes/ml) were preincubated with 0.5  $\mu$ M MitoSOX Red for 30 min at 28°C in HBS and then treated with 5  $\mu$ M TFQ for 1, 5, 10, and 30 min. Fluorescence emission at 580 nm was measured by flow cytometry, in a FACScan flow cytometer, with an excitation wavelength of 488 nm. Antimycin A (0.3  $\mu$ g/ml) was used as a positive control for ROS generation.

**Variation in free intracellular  $\text{Ca}^{2+}$ .** Changes in the cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  levels were monitored using Fluo4-AM, as described previously (11). Briefly, parasites ( $2 \times 10^7$  promastigotes/ml) were incubated with 5  $\mu$ M Fluo4-AM for 60 min at 28°C in RPMI 1640 medium devoid of phenol red and supplemented with 0.02% pluronic acid F127 to improve dispersion of the nonpolar acetyloxy-methyl ester in aqueous media. After incubation, cells were washed and incubated with 2, 5, and 10  $\mu$ M TFQ in a fresh medium, with and without addition of 8 mM EGTA. The fluorescence of  $\text{Ca}^{2+}$ -bound Fluo4 was analyzed at 28°C in an Aminco-Bowman series 2 fluorometer (490/518 nm, excitation and emission wavelengths, respectively). Parasites treated with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (20 mM) were used as positive control for calcium release from intracellular organelles as described previously (18).

**TFQ-induced alkalinization.** Parasites ( $4 \times 10^6$  promastigotes/ml), treated either with or without 5  $\mu$ M TFQ (10 min at 28°C), were incubated with 100 nM the acidotropic dye LysoTracker Green DND-26 for 10 min in HBS at 28°C. Afterwards, the parasites were washed and then resuspended in PBS, and dye fluorescence was measured by flow cytometry in a FACScan flow cytometer (excitation at 488 nm; emission between 515 and 545 nm).

**TFQ localization.** Using the intrinsic fluorescence of TFQ (excitation at 340 nm; emission at 388 nm), its intracellular distribution was ascertained by fluorescence microscopy. Parasites were treated with 5  $\mu$ M TFQ for 15 min at 28°C in culture medium, washed successively with the same medium and then with PBS, and finally observed under a Zeiss Axiophot (Germany) epifluorescence microscope; images were captured with a SPOT camera (Diagnostic Instrument, Inc.). Parasites labeled with LysoTracker Green (as mentioned above) were used to visualize the distribution of acidocalcisomes and analyzed in parallel by fluorescence microscopy.

**Analysis of autophagy in *Leishmania* induced by TFQ treatment.** Induction of autophagy by TFQ was analyzed in *L. donovani* lines using autophagy-related protein 8 (ATG8) fused to green fluorescent protein (GFP) as a marker of autophagosomes (3). Parasites were transfected with an episomal expression vector plasmid containing the GFP-ATG8 construct, kindly provided by J. Mottram, as described previously (31). Parasites expressing GFP-ATG8 were treated with 5  $\mu$ M TFQ for 24 h in culture medium at 28°C. The presence of autophagic bodies was observed under a Zeiss Axiophot epifluorescence microscope. Images were captured with a SPOT camera. The percentage of autophagosome-bearing cells and the number of these structures per cell were analyzed. At least four series of 200 cells were counted, and this was repeated three times.

**DNA fragmentation analysis.** DNA fragmentation was analyzed by terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT)-mediated dUTP end labeling (TUNEL) using the Roche *in situ* cell death detection kit. Parasites ( $10^7$  promastigotes/ml) were incubated with 5, 10, and 20  $\mu$ M TFQ for 4 h at 28°C in culture medium, fixed with 4% formaldehyde in PBS for 15 min at room temperature, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 2 min at 4°C. The cells were labeled with TUNEL reaction mixture following the manufacturer's instructions. Fluorescence was measured by flow cytometry, in a FACScan flow cytometer, with excitation and emission wavelengths of 488/520 nm. Unfixed parasites were labeled with 0.4  $\mu$ g/ml PI for 5 min at 4°C and measured at 488/617 nm to detect necrotic cells.

Additionally, DNA fragmentation was detected as described by Vergnes et al. (40). After treatment with TFQ, total DNA was extracted from the parasites using the "salting-out DNA extraction" method. Briefly, parasites were pelleted and treated with lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 8.0, 0.5% SDS, 200 mM NaCl, 100  $\mu$ g/ml proteinase K) for 1 h at 65°C. Two volumes of ice-cold absolute ethanol were added, and the DNA was centrifuged for 15 min at  $13,000 \times g$ . The supernatant was discarded, and the dried pellet was resuspended in 100  $\mu$ l of a mixture of 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 0.1 mM EDTA and treated with RNase A (0.3  $\mu$ g/ml) for 1 h at 37°C. The DNA was analyzed on 2% agarose gel.

## RESULTS

**TFQ inhibits *Leishmania* proliferation in vitro.** After 72 h of TFQ exposure, proliferation of *L. donovani* and *Leishmania major* promastigotes was inhibited at the micromolar range in a dose-dependent manner, with 50% effective concentrations ( $EC_{50}$ s) of  $5.6 \pm 1.0 \mu\text{M}$  and  $5.3 \pm 2.1 \mu\text{M}$  for *L. donovani* MHOM/ET/67/HU3 and MHOM/SD/00/1S-2D, respectively, and  $2.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$  and  $2.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$  for *L. major* MHOM/JL/80/Friedlin parental strain and  $\Delta\text{AP3}$  mutant, respectively.

**TFQ reduces the intracellular ATP level of *L. donovani* promastigotes.** In order to ascertain the general metabolic processes underlying the leishmanicidal effect of this drug, the bioenergetic state of *L. donovani* promastigotes was first studied. Parasites of the 3-Luc strain, expressing a cytoplasmic form of luciferase, were employed together with the membrane-permeable luciferase substrate DMNPE-luciferin. Under these conditions, the luminescence of these promastigotes is directly related to the concentration of free cytoplasmic ATP, the limiting substrate of the reaction (21). TFQ decreased the luminescence in a concentration-dependent manner, reaching the respective endpoint level about 15 min after addition of the drug (Fig. 1A), leading to the bioenergetic collapse of the promastigotes.

**TFQ does not affect the plasma membrane integrity.** One of the more likely reasons to account for the observed decrease in the intracellular ATP content may be that TFQ compromises plasma membrane integrity. To test this hypothesis, the entrance of the vital dye SYTOX Green (molecular weight [MW], 600) into the cytoplasm of *L. donovani* promastigotes, induced by TFQ, was monitored. At the highest TFQ concentration assayed (10  $\mu\text{M}$ , 45 min), the increase in SYTOX Green fluorescence accounted for only 11% of the maximal permeabilization, defined as that obtained with 0.05% Triton X-100 (Fig. 1B), ruling out the formation of large lesions on the parasite plasma membrane as a key event in the mechanism of action of TFQ. Furthermore, we measured leakage of ATP into the supernatant; TFQ does not induce an enhanced ATP liberation to the medium when compared to the control parasites ( $<50 \text{ pmol ATP} \times 10^{-6} \text{ cells}$ ).

**TFQ induces  $\Delta\Psi_m$  depolarization.** The decrease in intracellular ATP levels caused by TFQ is consistent with impairment of the processes involved in ATP synthesis. In *Leishmania*, mitochondrial oxidative phosphorylation accounts for most of the ATP expenditure of the parasite, with glycolysis being of minor importance in this process (37). As  $\Delta\Psi_m$  is essential to drive mitochondrial ATP synthesis, its variation with TFQ was monitored in *Leishmania* promastigotes by cytofluorometry using Rh123 accumulation. After the addition of 5  $\mu\text{M}$  TFQ to promastigotes, in the first 30 min, dye accumulation falls to levels approximately 7 times lower than that for the untreated parasites, similar to those obtained by incubation of parasites with the uncoupling reagent FCCP (10  $\mu\text{M}$ , 30 min), used as control for full depolarized promastigotes (Fig. 2).

**Inhibition of CcR activity by TFQ.** Mitochondrial respiratory chain complexes I, III, and IV drive the maintenance of  $\Delta\Psi_m$  through the proton pumping generated during electron transfer. In trypanosomatids, the contribution of complex I to this process was questioned as it lacks subunits essential for  $\text{H}^+$  extrusion present in other eukaryotes (30). We hypothesized

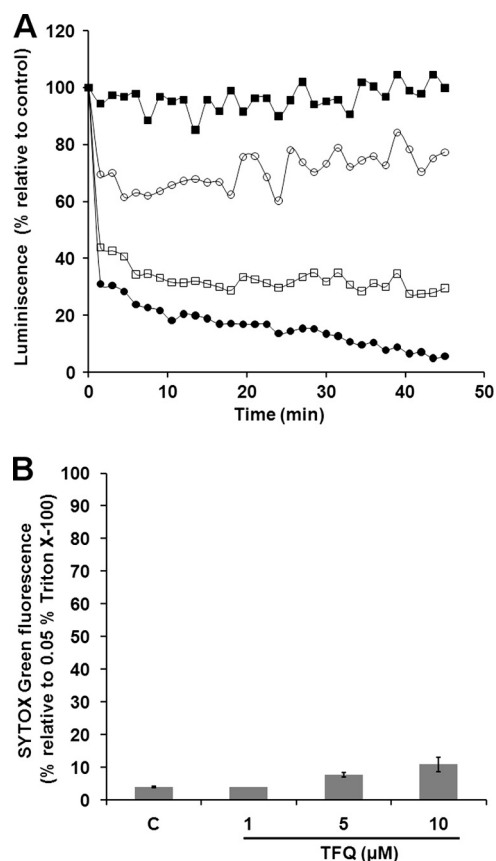


FIG. 1. TFQ reduces intracellular ATP level without plasma membrane permeabilization. (A) Changes in the intracellular ATP levels were determined by variation of luminescence in *L. donovani* 3-Luc promastigotes treated with different TFQ concentrations: 2 ( $\blacksquare$ ), 5 ( $\circ$ ), 8 ( $\square$ ), and 10  $\mu\text{M}$  ( $\bullet$ ). Promastigotes were preloaded with 25  $\mu\text{M}$  DMNPE-luciferin, and when luminescence reached a plateau, TFQ was added ( $t = 0$ ) and luminescence was monitored as described in Materials and Methods. Variation of luminescence was normalized relative to the level in the control untreated parasites. Similar results were obtained in three independent experiments. At the concentrations tested, TFQ did not inhibit the activity of recombinant firefly luciferase. (B) The effect of TFQ on the plasma membrane permeability was determined by incubating promastigotes without (control [c]) and with 1, 5, and 10  $\mu\text{M}$  TFQ for 45 min in HBS at 28°C and then treating them with 2  $\mu\text{M}$  SYTOX Green for 15 min at 28°C. SYTOX Green fluorescence is represented relative to parasites treated with 0.05% Triton X-100 used as 100% permeabilization. Results are means  $\pm$  standard deviations (SD) from three independent experiments.

whether the observed TFQ-induced  $\Delta\Psi_m$  depolarization may correspond to a specific inhibition within the respiratory chain. To pinpoint the TFQ target in the respiratory chain of *Leishmania*, parasites were permeabilized with digitonin to allow unrestricted access of specific substrates and inhibitors to the different complexes of the respiratory chain. Preservation of the integrity of the inner mitochondrial membrane was demonstrated by the increase of respiration after the addition of ADP (state 3), as it is no longer the limiting substrate for oxidative phosphorylation. At this state, using succinate as the sole substrate that feeds complex II (Fig. 3A and B), the oxygen consumption rate of digitonin-permeabilized parasites



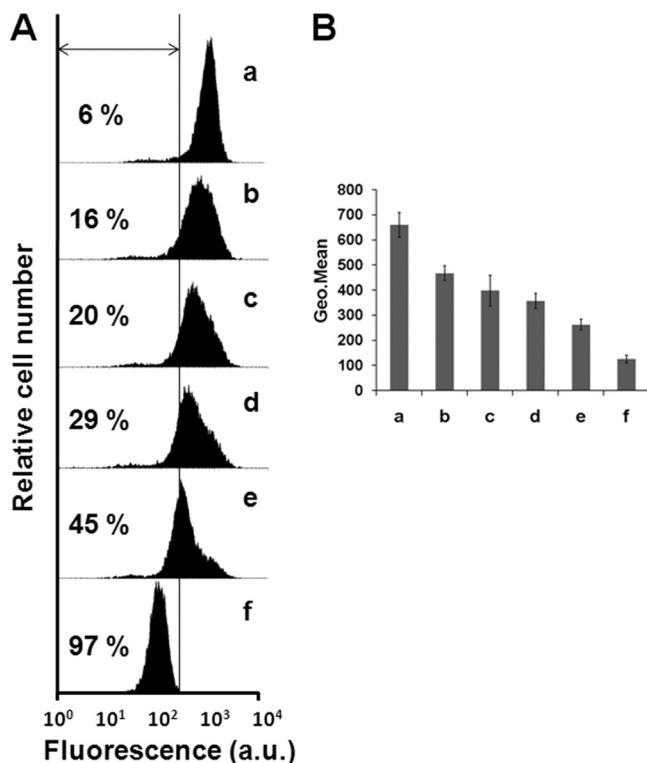


FIG. 2.  $\Delta\Psi_m$  depolarization induced by TFQ. *L. donovani* promastigotes were treated with 5  $\mu\text{M}$  TFQ for 1, 5, 10, and 30 min (b to e, respectively) and analyzed for fluorescence by flow cytometry, after being stained with 0.8  $\mu\text{M}$  Rh123. TFQ-untreated parasites were used as a control (a), and treatment with 10  $\mu\text{M}$  FCCP for 10 min was used as a depolarization control (f). (A) Histogram of a representative experiment. Percentages of depolarized cells are shown. (B) Geometrical (Geo.) mean channel fluorescence values  $\pm$  SD from three experiments versus the control were significantly different by Student's *t* test ( $P < 0.05$ ).

was  $8.9 \pm 0.6 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times 10^{-8}$  cells (Fig. 3A). The addition of 5  $\mu\text{M}$  TFQ led to a full inhibition of this process (Fig. 3A), which was restored to 50% after addition of TMPD-ascorbate, an electron donor to cytochrome *c* (Fig. 3A). This excluded cytochrome *c* oxidase (complex IV) as the site for TFQ inhibition, and pinpoints the potential target as complex II or III (Fig. 4).

In *Leishmania*, the pool of reduced ubiquinone used by complex III as substrate to reduce cytochrome *c* comes from two sources: the mitochondrial FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, channeling the  $\alpha$ -glycerophosphate produced by glycolysis (13); and complex II, which is of much higher relevance in *Leishmania*, using succinate as substrate. The addition of 5  $\mu\text{M}$  TFQ led to a full inhibition of the oxygen consumption rate using succinate as sole substrate (Fig. 3A), and a further addition of 6.7 mM  $\alpha$ -glycerophosphate did not reverse at all the inhibition caused by TFQ (Fig. 3A). The modest rate increase obtained by  $\alpha$ -glycerophosphate after full inhibition of complex II by malonate was also inhibited after the addition of TFQ (Fig. 3B). Altogether, these results pinpointed complex III (cytochrome *c* reductase [CcR]) as the main target for TFQ inside the respiratory chain. To corroborate this result, the inhibition of CcR by increasing TFQ

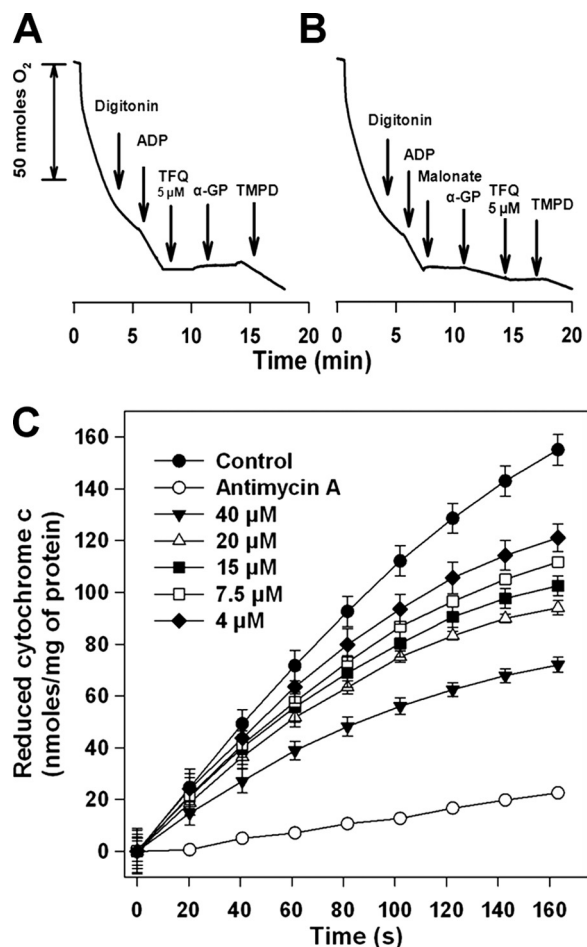


FIG. 3. Identification of the inhibition site of the respiratory chain of *Leishmania* by TFQ. (A and B) Inhibition of the oxygen consumption rates of permeabilized *L. donovani* promastigotes in the presence of 5 mM succinate as the substrate. The arrows indicate the addition of the indicated substrates and inhibitors at their respective final concentrations as stated: 60  $\mu\text{M}$  digitonin, 100  $\mu\text{M}$  ADP, 0.1 mM TMPD plus 1.7 mM ascorbate, 2 mM malonate, 6.7 mM  $\alpha$ -glycerophosphate ( $\alpha$ -GP), and 5  $\mu\text{M}$  TFQ. (C) Inhibition of CcR activity by TFQ. CcR activity  $\pm$  SD was monitored by the increase of absorbance at 550 nm due to the reduction of initially oxidized cytochrome *c* solution (32  $\mu\text{M}$ ) after addition of different TFQ concentrations to mitochondrial fraction as described in Materials and Methods. Samples without succinate or in the presence of antimycin A, as the inhibitor of CcR, were considered as controls. Activity was measured at 37°C.

concentrations was assayed in mitochondrial fractions. Figure 3C shows the specific dose-dependent inhibition of CcR activity by TFQ. Total inhibition of this enzyme was achieved with 2  $\mu\text{M}$  antimycin A.

**ROS production in *Leishmania* by TFQ.** Due to the inherent relationship between ROS generation and respiratory chain inhibition, and as respiratory complex III was described as the main source of superoxide anion radicals in both mammals and *Leishmania* (12, 24), we explored the potential of TFQ to induce ROS production. *Leishmania* promastigotes were incubated with the ROS-sensitive probe MitoSOX Red and treated with 5  $\mu\text{M}$  TFQ for 30 min. Flow cytometry analysis showed a time-dependent increase in ROS generation after treatment with TFQ (Fig. 5A and B). As a positive control for ROS

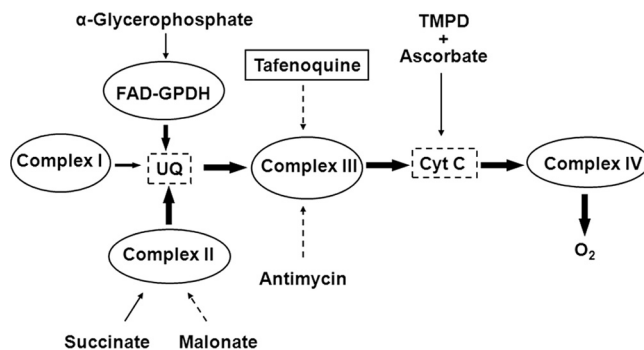


FIG. 4. Scheme of the respiratory chain in *Leishmania* with the specific substrates and inhibitors used in this study. Sites of electron feeding or inhibition are indicated by solid or dotted lines, respectively. UQ, ubiquinone; Cyt C, cytochrome *c*. Feeding of the respiratory chain by  $\alpha$ -glycerophosphate through flavin adenine dinucleotide-dependent glycerophosphate dehydrogenase (FAD-GPDH) is according to references 13 and 30.

generation, parasites were treated with antimycin A (0.3  $\mu$ g/ml) as reported previously (24).

**TFQ increases free cytosolic  $Ca^{2+}$  level.** Mitochondrial damage, exemplified by  $\Delta\Psi_m$  depolarization, is frequently associated not only with ROS production but also with an increase of intracellular  $Ca^{2+}$  concentration (28). The relevance of  $Ca^{2+}$  mobilization from intracellular stores during the progression of apoptosis in *Leishmania* has been reported previously (33). With this premise in mind, we studied the variation of cytosolic  $Ca^{2+}$  levels in both control and TFQ-treated *Leishmania* promastigotes, using Fluo4 as a calcium fluorescent probe. In the presence of EGTA, 5 and 10  $\mu$ M TFQ induced  $Ca^{2+}$  mobilization from its intracellular stores, resulting in a significant increase of cytosolic  $Ca^{2+}$  concentration (Fig. 5C). In the absence of EGTA, parasites treated for 30 min with 5  $\mu$ M TFQ showed a  $Ca^{2+}$ -bound Fluo4 fluorescence 30% higher than that obtained with EGTA (data not shown), suggesting that

mobilization from intracellular stores is the main source of the observed cytosolic  $Ca^{2+}$  increase.

**TFQ is partly localized in acidocalcisomes.** Acidocalcisomes are important  $Ca^{2+}$  reservoirs in *Leishmania* (10); this, together with our previous report on the privileged accumulation of sitamaquine, a close analogue of TFQ (17), in these organelles, prompted us to investigate whether TFQ may accumulate in acidocalcisomes, inducing the release of  $Ca^{2+}$ .

First, we studied the decrease in the accumulation of the acidotropic probe LysoTracker Green, mediated by TFQ through the alkalization of acidic organelles. The results showed that TFQ reduced the cellular accumulation of LysoTracker Green measured by flow cytometry (Fig. 6A), due, at least in part, to an increase in the pH of acidocalcisomes induced by TFQ. The feasibility of quenching of the LysoTracker Green fluorescence signal by TFQ was discarded by spectrofluorometry (data not shown).

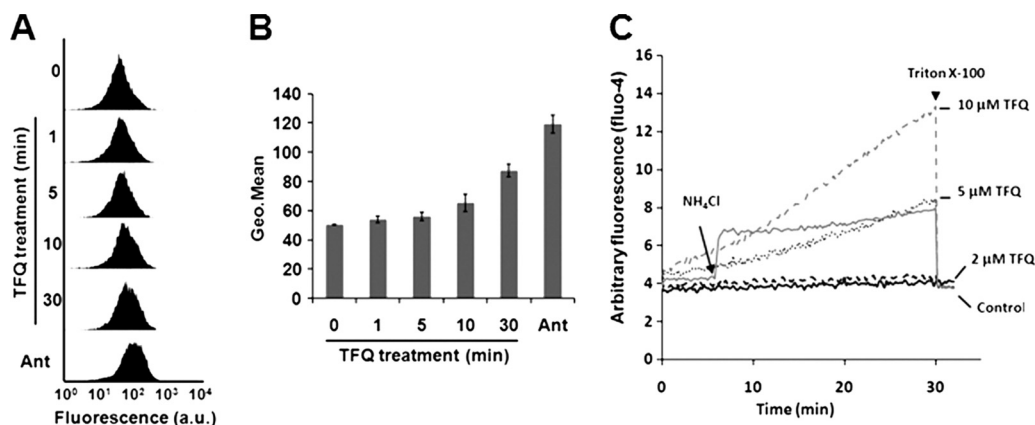


FIG. 5. TFQ induces ROS generation and changes in cytosolic  $Ca^{2+}$  levels. ROS levels were measured using the specific fluorescent dye MitoSOX Red. *L. donovani* promastigotes preloaded with 0.5  $\mu$ M MitoSOX Red were incubated without (0) and with 5  $\mu$ M TFQ at the time points indicated. Antimycin A (Ant) (0.3  $\mu$ g/ml, 30 min) was used as the control of ROS generation. Fluorescence intensity (arbitrary units [a.u.]) was determined by flow cytometry analysis, as described in Materials and Methods. (A) Histogram of a representative experiment. (B) Geometrical (Geo.) mean channel fluorescence values  $\pm$  SD of three experiments were significantly different versus control by Student's *t* test ( $P < 0.05$ ), except for parasites treated for 1 min. (C) Variation in cytosolic  $Ca^{2+}$  levels of *L. donovani* promastigotes. Fluo4-preloaded parasites were treated with different concentrations of TFQ as indicated and then analyzed for increasing fluorescence over a period of 30 min at 28°C using an Aminco-Bowman series 2 spectrometer. The experiments were assessed in the presence of  $Ca^{2+}$  chelator EGTA. The arrow indicates the addition of  $NH_4Cl$ , taken as positive control. The arrowhead ( $t = 30$  min) indicates the addition of 0.05% Triton X-100 to assess complete permeabilization of parasites. The trace "Control" represents TFQ-untreated parasites. Similar results were obtained in three independent experiments.

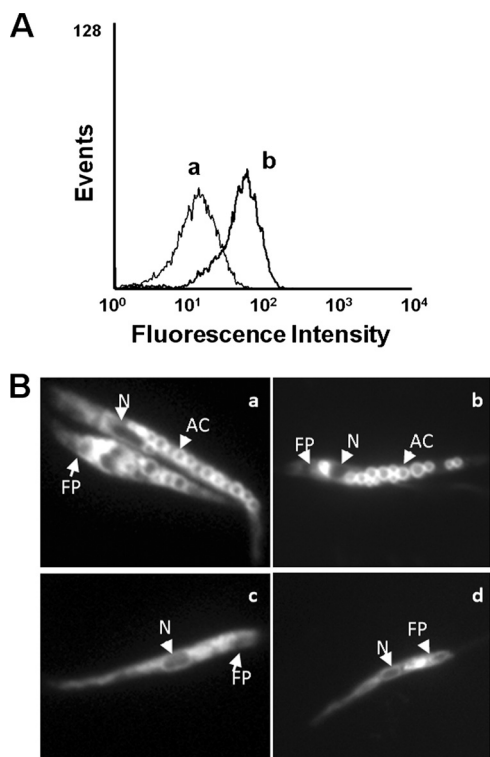


FIG. 6. Intracellular localization of TFQ in *Leishmania*. (A) *L. donovani* promastigotes were pretreated with (a) and without (b) 5  $\mu$ M TFQ for 10 min at 28°C and then labeled with 100 nM LysoTracker Green DND-26 for 10 min. Fluorescence was analyzed by flow cytometry as described in Materials and Methods. Representative histograms of three independent experiments are shown. (B) Intracellular localization of TFQ and LysoTracker Green in the control (a and b, respectively) and  $\Delta$ AP3 (c and d, respectively) *L. major* promastigote lines were visualized by fluorescence microscopy after incubation with 5  $\mu$ M TFQ or 100 nM LysoTracker Green DND-26 for 10 min at 28°C, as described in Materials and Methods. AC, acidocalcisome; N, nucleus; FP, flagellar pocket.

Subsequently, the intrinsic fluorescence of TFQ was used to assess its intracellular distribution. Fluorescence microscopy images showed a vesiculated pattern throughout the whole cell body (Fig. 6Ba), resembling that for acidocalcisomes stained with LysoTracker Green (Fig. 6Bb), pointing toward a privileged accumulation of TFQ in these organelles. Apparently, TFQ did not localize in the acidocalcisomes of *L. major*  $\Delta$ AP3 (Fig. 6Bc); a mutant line that is devoid of several acidocalcisome membrane proteins, which is therefore defective for polyphosphate accumulation and internal acidic milieu, and has an alkaline pH inside these organelles (2). As no differences for TFQ sensitivity were observed between the wild type and the  $\Delta$ AP3 mutant, resembling the results with sitamaquine, the acidocalcisome could be ruled out as final target for TFQ (17). However, an increase in pH reduced the TFQ fluorescence intensity (data not shown), and consequently, we cannot exclude the possibility that TFQ accumulates in the acidocalcisomes of the  $\Delta$ AP3 mutant.

**TFQ induces an apoptosis-like death in *Leishmania*.** Since elevation of cytosolic  $Ca^{2+}$ , mitochondrial dysfunction, ROS generation, and reduction of intracellular ATP levels are all distinctive events during the progression of an apoptosis-like

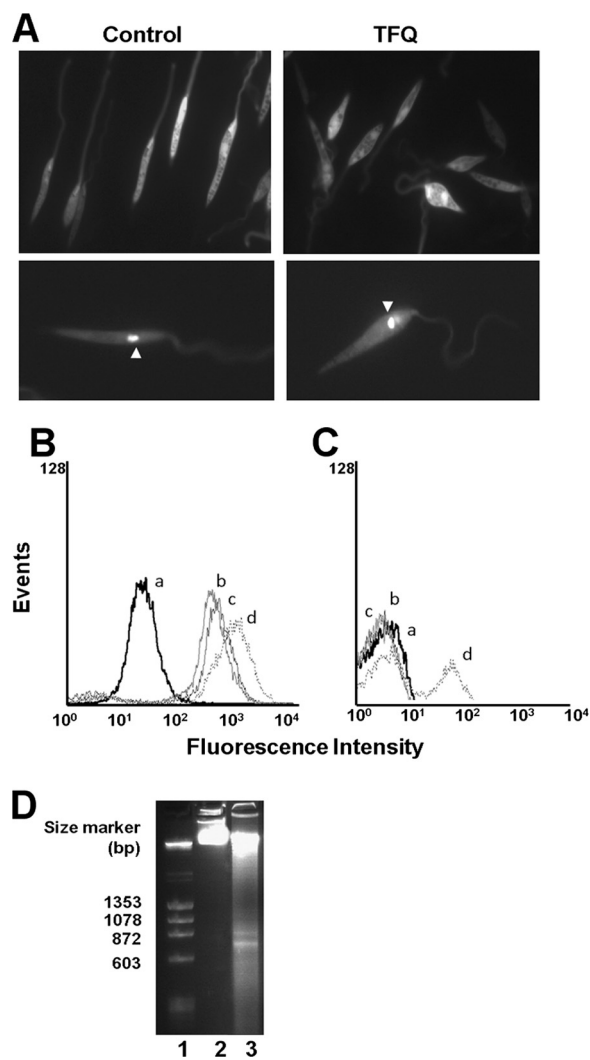


FIG. 7. TFQ induces programmed cell death in *Leishmania*. (A) Autophagosome formation in *L. donovani* promastigotes. (Upper panel) Distribution of GFP-ATG8 in *L. donovani* promastigotes untreated or treated with 5  $\mu$ M TFQ. (Lower panel) Autophagosomes could be identified as punctate structures clearly observable in the cytoplasm (arrowhead). (B and C) Representative histogram of TUNEL analysis and PI labeling, respectively, of *L. donovani* promastigotes treated with TFQ. Parasites were treated with different concentrations of TFQ: 5 (b), 10 (c) and 20 (d)  $\mu$ M for 4 h at 28°C, using untreated parasites (a) as controls. Fluorescein-dUTP and PI nucleic acid labeling were analyzed by flow cytometry as described in Materials and Methods. PI was used as the control of necrosis. Histograms are representative of three independent experiments with 10,000 parasites analyzed per group. (D) DNA fragmentation in *L. donovani* promastigotes. Genomic DNAs were isolated from parasites either untreated (lane 2) or treated for 4 h with 5  $\mu$ M TFQ in HBS (lane 3), run through a 2% agarose gel, and visualized by ethidium bromide as described in Materials and Methods. DNA size markers (lane 1) are shown in base pairs (bp).

death process, we examined this possibility for TFQ. In trypanosomatids, there are several classes of programmed cell death (25). The induction of autophagy by TFQ was determined by using an *L. donovani* line overexpressing the autophagosome marker GFP-ATG8 (3). No significant increase in the number of autophagosomes was observed after 24 h of TFQ treatment versus untreated parasites (Fig. 7A). Accord-

ingly, in a further step, TFQ-induced DNA nicking, typical of apoptotic-like processes, was tested using the TUNEL assay. Parasites treated with different concentrations of TFQ for 4 h were significantly TUNEL positive (Fig. 7B). Necrotic cell death was rejected due to the lack of parasite staining with PI, as it requires a permeable plasma membrane in order to reach the intracellular nucleic acid. Only at 20  $\mu$ M TFQ, a concentration 4-fold higher than the  $EC_{50}$ , were parasites PI positive (Fig. 7C). These conclusions were confirmed by the fragmentation of genomic DNA in parasites treated with 5  $\mu$ M TFQ for 4 h (Fig. 7D).

## DISCUSSION

The 8-aminoquinoline scaffold has been extensively used in the development of antiprotozoal drugs (36), typically as antiplasmodial compounds. The most recent application for these drugs is the use of sitamaquine and TFQ as alternative leishmanicidal compounds, currently at different stages of implementation (35, 41). Unfortunately their mechanism of action is scarcely known, jeopardizing the rational optimization of new analogues. In order to address this problem, we decided to outline the leishmanicidal mechanism of TFQ.

At the concentrations at which TFQ inhibits promastigote proliferation, the most conspicuous effect observed is the rapid drop in the intracellular ATP levels. A similar effect has been described for the mechanism of action of other potential and established leishmanicidal drugs (19–23). Arguably, the two most likely hypotheses to account for this result are (i) inhibition of ATP synthesis and (ii) permeabilization of the plasma membrane with release of intracellular ATP into the external medium. The last hypothesis is typical for the membrane active reagents, including antimicrobial peptides and polyenes such as amphotericin B (21, 22). Nevertheless, even at concentrations producing above 95% growth inhibition, entry of the vital dye SYTOX Green only reached a small percentage (11%) of that corresponding to full permeabilization. Thus, the observed drop in ATP levels is more likely to be due to inhibition of ATP synthesis. In *Leishmania*, approximately 70% of the total bioenergetic requirements are fulfilled by oxidative phosphorylation, tightly coupled with  $\Delta\Psi_m$ , which appeared to be decreased in TFQ-treated parasites. This prompted us to carry out a systematic study to identify the TFQ target among the different complexes involved in oxidative phosphorylation. As a result, complex III was defined as its main target; this statement was further validated by the inhibition of CcR *in vitro* by TFQ. It is noteworthy that, complex III is the crossroads where the reduced ubiquinone pools from complex II and the oxidation of  $\alpha$ -glycerophosphate converge (13).

There is a wealth of knowledge linking 8-aminoquinolines to mitochondrial dysfunction in their respective target cells, such as primaquine in *Plasmodium falciparum* gametocytes (16) or sitamaquine in *Leishmania* mitochondria (39). The *Leishmania* mitochondrion is the target for a wide variety of leishmanicidal drugs; including some in clinical use such as pentamidine (27) and miltefosine (20), and others at different stages of development, such as chalcones or histatin 5, (5, 23). The inhibition of complex III by TFQ led to the production of superoxide radicals at levels similar to those produced by antimycin A (24).

ROS, either produced inside the cell by drugs (7) or added exogenously (6), trigger an apoptosis-like death process.

Programmed cell death (PCD) was classified by biochemical and morphological criteria under three major classes, which are not mutually exclusive (25). Autophagy was discarded as being the predominant PCD induced by TFQ, as no significant differences were found between treated and control parasites for distribution and expression levels of the autophagosome marker GFP-ATG8. Necrosis (another PCD class) was also ruled out as plasma membrane disruption (one of its hallmarks) only reached significant values at concentrations far higher than those that are lethal. In contrast, TFQ-treated parasites showed typical features for apoptosis-like PCD, including a decrease in  $\Delta\Psi_m$  (28), a rise in intracellular  $Ca^{2+}$  levels, and late-stage apoptosis markers (such as DNA nucleosomal fragmentation), which is similar in many aspects to that described in metazoan organisms (6).

The increased intracellular  $Ca^{2+}$  levels induced by TFQ came from both an external medium and intracellular stores, as the addition of EGTA led to only a 30% abrogation. The entry of external  $Ca^{2+}$  was described in *Leishmania* apoptosis induced by external  $H_2O_2$  (28), camptothecin (33), and curcumin (7) and mediated by specific channels activated by ROS or its derived metabolites inside the cells (14). Accordingly, the remaining 70% came from intracellular stores, mainly the endoplasmic reticulum, glycosomes, acidocalcisomes, and/or mitochondria (26).

All these molecular events activate PCD with DNA nicking and fragmentation as the final outcome, both of which are characteristic of an apoptosis-like death in *Leishmania*. Studies are currently in progress to determine whether other potential leishmanicidal 8-aminoquinolines act through a similar mechanism. In conclusion, our studies suggest that TFQ inhibits the functionality of the mitochondrial respiratory chain through CcR (complex III) inhibition, inducing a rapid drop in the intracellular ATP levels in *Leishmania*. At the same time, the increase in mitochondrial ROS production and elevation of intracellular  $Ca^{2+}$  leads to a depolarization of  $\Delta\Psi_m$ . Taken together, these biological events induced by TFQ, trigger an apoptosis-like death in *Leishmania*.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Spanish grants SAF2006-02093 (to F.G.), ISCIII-Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET)-FEDER RD06/0021/0002 (F.G.) and RD 06/0021/0006 (L.R.) European Union (HEALTH—2007-223414) (L.R.) and FIS PS09-01928 (L.R.) and by the Plan Andaluz de Investigación (Cod. BIO130).

We acknowledge the support of GlaxoSmithKline (Greenford, United Kingdom) for the tafenoquine used throughout this research work.

## REFERENCES

- Alvarez-Fortes, E., L. M. Ruiz-Perez, F. Bouillaud, E. Rial, and L. Rivas. 1998. Expression and regulation of mitochondrial uncoupling protein 1 from brown adipose tissue in *Leishmania major* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **93**:191–202.
- Besteiro, S., D. Tonn, L. Tetley, G. H. Coombs, and J. C. Mottram. 2008. The AP3 adaptor is involved in the transport of membrane proteins to acidocalcisomes of *Leishmania*. *J. Cell Sci.* **121**:561–570.
- Besteiro, S., R. A. Williams, L. S. Morrison, G. H. Coombs, and J. C. Mottram. 2006. Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* **281**:11384–11396.
- Chappuis, F., S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R. W. Peeling, J.



- Alvar, and M. Boelaert. 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* **5**:873–882.
5. Chen, M., L. Zhai, S. B. Christensen, T. G. Theander, and A. Kharazmi. 2001. Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by chalcones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2023–2029.
  6. Das, M., S. B. Mukherjee, and C. Shaha. 2001. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Cell Sci.* **114**:2461–2469.
  7. Das, R., A. Roy, N. Dutta, and H. K. Majumder. 2008. Reactive oxygen species and imbalance of calcium homeostasis contributes to curcumin induced programmed cell death in *Leishmania donovani*. *Apoptosis* **13**:867–882.
  8. den Boer, M. L., J. Alvar, R. N. Davidson, K. Ritmeijer, and M. Balasegaram. 2009. Developments in the treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **14**:395–410.
  9. Diaz-Achirica, P., J. Ubach, A. Guinea, D. Andreu, and L. Rivas. 1998. The plasma membrane of *Leishmania donovani* promastigotes is the main target for CA(1–8)M(1–18), a synthetic cecropin A-melittin hybrid peptide. *Biochem. J.* **330**:453–460.
  10. Docampo, R., W. de Souza, K. Miranda, P. Rohloff, and S. N. Moreno. 2005. Acidocalcisomes—conserved from bacteria to man. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:251–261.
  11. Dolai, S., R. K. Yadav, S. Pal, and S. Adak. 2009. Overexpression of mitochondrial *Leishmania major* ascorbate peroxidase enhances tolerance to oxidative stress-induced programmed cell death and protein damage. *Eukaryot. Cell* **8**:1721–1731.
  12. Droese, S., and U. Brandt. 2008. The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex. *J. Biol. Chem.* **283**:21649–21654.
  13. Guerra, D. G., A. Decottignies, B. M. Bakker, and P. A. Michels. 2006. The mitochondrial FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Trypanosomatidae* and the glycosomal redox balance of insect stages of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania spp.* *Mol. Biochem. Parasitol.* **149**:155–169.
  14. Halliwell, B., and J. M. Gutteridge. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**:1–85.
  15. Kennedy, M. L., F. Cortes-Selva, J. M. Perez-Victoria, I. A. Jimenez, A. G. Gonzalez, O. M. Munoz, F. Gamarro, S. Castanys, and A. G. Ravelo. 2001. Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *J. Med. Chem.* **44**:4668–4676.
  16. Lanners, H. N. 1991. Effect of the 8-aminoquinoline primaquine on culture-derived gametocytes of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Res.* **77**:478–481.
  17. Lopez-Martin, C., J. M. Perez-Victoria, L. Carvalho, S. Castanys, and F. Gamarro. 2008. Sitamaquine sensitivity in *Leishmania* species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:4030–4036.
  18. Lu, H. G., L. Zhong, K. P. Chang, and R. Docampo. 1997. Intracellular Ca<sup>2+</sup> pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes. *J. Biol. Chem.* **272**:9464–9473.
  19. Luque-Ortega, J. R., S. Martinez, J. M. Saugar, L. R. Izquierdo, T. Abad, J. G. Luis, J. Pinero, B. Valladares, and L. Rivas. 2004. Fungus-elicited metabolites from plants as an enriched source for new leishmanicidal agents: antifungal phenyl-phenalenone phytoalexins from the banana plant (*Musa acuminata*) target mitochondria of *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1534–1540.
  20. Luque-Ortega, J. R., and L. Rivas. 2007. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome *c* oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1327–1332.
  21. Luque-Ortega, J. R., O. M. Rivero-Lezcano, S. L. Croft, and L. Rivas. 2001. In vivo monitoring of intracellular ATP levels in *Leishmania donovani* promastigotes as a rapid method to screen drugs targeting bioenergetic metabolism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1121–1125.
  22. Luque-Ortega, J. R., J. M. Saugar, C. Chiva, D. Andreu, and L. Rivas. 2003. Identification of new leishmanicidal peptide lead structures by automated real-time monitoring of changes in intracellular ATP. *Biochem. J.* **375**:221–230.
  23. Luque-Ortega, J. R., W. van't Hof, E. C. Veerman, J. M. Saugar, and L. Rivas. 2008. Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in *Leishmania*. *FASEB J.* **22**:1817–1828.
  24. Mehta, A., and C. Shaha. 2004. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **279**:11798–11813.
  25. Menna-Barreto, R. F., K. Salomao, A. P. Dantas, R. M. Santa-Rita, M. J. Soares, H. S. Barbosa, and S. L. de Castro. 2009. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron* **40**:157–168.
  26. Moreno, S. N., and R. Docampo. 2003. Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:359–364.
  27. Mukherjee, A., P. K. Padmanabhan, M. H. Sahani, M. P. Barrett, and R. Madhubala. 2006. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **145**:1–10.
  28. Mukherjee, S. B., M. Das, G. Sudhandiran, and C. Shaha. 2002. Increase in cytosolic Ca<sup>2+</sup> levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Biol. Chem.* **277**:24717–24727.
  29. Nanayakkara, N. P., A. L. Ager, Jr., M. S. Bartlett, V. Yardley, S. L. Croft, I. A. Khan, J. D. McChesney, and L. A. Walker. 2008. Antiparasitic activities and toxicities of individual enantiomers of the 8-aminoquinoline 8-[(4-amino-1-methylbutyl)amino]-6-methoxy-4-methyl-5-[3,4-dichlorophenoxy] quinoline succinate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:2130–2137.
  30. Opperdoes, F. R., and P. A. Michels. 2008. Complex I of *Trypanosomatidae*: does it exist? *Trends Parasitol.* **24**:310–317.
  31. Perez-Victoria, F. J., F. Gamarro, M. Ouellette, and S. Castanys. 2003. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J. Biol. Chem.* **278**:49965–49971.
  32. Piacenza, L., F. Irigoien, M. N. Alvarez, G. Peluffo, M. C. Taylor, J. M. Kelly, S. R. Wilkinson, and R. Radi. 2007. Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. *Biochem. J.* **403**:323–334.
  33. Sen, N., B. B. Das, A. Ganguly, T. Mukherjee, S. Bandyopadhyay, and H. K. Majumder. 2004. Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **279**:52366–52375.
  34. Sottocasa, G. L., B. Kuylenstierna, L. Ernster, and A. Bergstrand. 1967. An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study. *J. Cell Biol.* **32**:415–438.
  35. Sundar, S., and M. Chatterjee. 2006. Visceral leishmaniasis—current therapeutic modalities. *Indian J. Med. Res.* **123**:345–352.
  36. Tekwani, B. L., and L. A. Walker. 2006. 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **19**:623–631.
  37. Van Hellemond, J. J., and A. G. Tielens. 1997. Inhibition of the respiratory chain results in a reversible metabolic arrest in *Leishmania* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **85**:135–138.
  38. Vercesi, A. E., C. F. Bernardes, M. E. Hoffmann, F. R. Gadelha, and R. Docampo. 1991. Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ. *J. Biol. Chem.* **266**:14431–14434.
  39. Vercesi, A. E., and R. Docampo. 1992. Ca<sup>2+</sup> transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca<sup>2+</sup>, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. *Biochem. J.* **284**:463–467.
  40. Vergnes, B., B. Gourbal, I. Girard, S. Sundar, J. Drummel-Smith, and M. Ouellette. 2007. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplast calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol. Cell Proteomics* **6**:88–101.
  41. Yardley, V., F. Gamarro, and S. L. Croft. 2010. Antileishmanial and anti-trypanosomal activities of the 8-aminoquinoline tafenoquine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:XXX–XXX.