



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



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

Mecanismo de resistencia a miltefosina en *Leishmania*: Caracterización de la subunidad proteica LiRos3



cristinaGarg

Sebastián García Sánchez
Tesis Doctoral

Programa Oficial de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Sebastián García Sánchez
ISBN: 978-84-9125-650-2
URI: <http://hdl.handle.net/10481/43406>



Instituto de Parasitología y Biomedicina
"López-Neyra" (CSIC)

Universidad de Granada

**Mecanismo de resistencia a miltefosina en
Leishmania: Caracterización de la
subunidad proteica LiRos3**

Directores de Tesis:

Dr. Santiago Castanys Cuello

Dr. Francisco Gamarro Conde

Memoria presentada por el Licenciado **Sebastián García Sánchez**
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada en el
Programa Oficial de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular.

Octubre de 2015

D. Santiago Castanys Cuello y D. Francisco Gamarro Conde,
Investigadores Científicos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “**Mecanismo de resistencia a miltefosina en *Leishmania*: Caracterización de la subunidad proteica LiRos3**” 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. Sebastián García Sánchez**, Licenciado en Farmacia por la Universidad de Granada, para optar al grado de Doctor por esta misma Universidad. 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.

En Granada, a 30 de octubre de 2015

Fdo. Dr. Santiago Castanys Cuello
Investigador Científico del CSIC

Fdo. Dr. Francisco Gamarro Conde
Investigador Científico del CSIC

Fdo. Sebastián García Sánchez
Doctorando

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC), y ha sido financiada con una beca predoctoral del Programa “Junta para la Ampliación de Estudios” (Programa JAE) del CSIC, dentro del Proyecto SAF2011-28102, titulado “*Mecanismo de resistencia a miltefosina en Leishmania: Caracterización del complejo de transporte del fármaco*”, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (2012-2014).

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

García-Sánchez, S., Sánchez-Cañete, M. P., Gamarro, F. y Castanys, S. (2014) Functional role of evolutionarily highly conserved residues, N-glycosylation level and domains of the *Leishmania* miltefosine transporter-Cdc50 subunit. *Biochem. J.* **459**:83-94.

*A mis compañeros de fatigas,
los jóvenes investigadores,
que dedican los mejores años
de su vida a la ciencia, trabajando
en condiciones frecuentemente precarias
con la esperanza de un futuro mejor.
A los que continúan a pesar de todo
y a los que se quedaron en el camino.*

El aspecto más triste de la vida actual es que la ciencia gana en conocimiento más rápidamente que la sociedad en sabiduría

Isaac Asimov (1920-1992), bioquímico y escritor de ciencia ficción y divulgación científica.

¿Qué se fue de tus muros para siempre, Granada?

*Fue el perfume potente de tu raza encantada
que dejando raudales de bruma te dejó.*

*¿O acaso tu tristeza es tristeza nativa
y desde que naciste aún sigues pensativa
enredando tus torres al tiempo que pasó?*

"Granada (Elegía humilde)" (1919), de Federico García Lorca.

AGRADECIMIENTOS

Aunque realizar una tesis doctoral requiera muchas horas en soledad y mucha autodisciplina, todo el trabajo que aquí se presenta hubiera sido imposible o mucho menos llevadero sin la existencia de mucha gente a la que estoy muy agradecido por unos u otros motivos.

En primer lugar, a Santiago y a Paco, por permitirme formar parte de un laboratorio con una gran trayectoria. Por la formación recibida durante estos años e, indudablemente, por la dirección de este trabajo y por las sugerencias y correcciones de esta tesis.

Al Consejo Superior de Investigaciones Científicas y a la Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación, por conceder, en tiempos de crisis, la ayuda económica necesaria para que este trabajo se haya podido ver materializado.

A todo el personal técnico, administrativo y de servicios del López-Neyra (mantenimiento, proteómica, genómica, síntesis de oligos, citometría, limpieza, esterilización, etc.), porque su trabajo resulta imprescindible para que investigaciones como esta puedan salir adelante.

A todos los integrantes del laboratorio 203-204, a los que se fueron y a los que continúan, espero que por muchos años. Solo por conocerles ya ha merecido la pena realizar esta tesis. A todos ellos, por su buen humor, por su ayuda desinteresada y por los pequeños detalles que podían marcar la diferencia entre que un experimento funcionase o no. A María, por confiar siempre en mí; por enseñarme, orientarme y ayudarme desde mis primeros pasos hasta los últimos, y porque esta tesis no hubiera sido posible sin todo el trabajo que viene desarrollando desde hace muchos años. A Raquel, por ser una compañera de trabajo excepcional y una gran amiga, por la ayuda prestada para algunos experimentos y por todo lo que he podido aprender de ella gracias a sus charlas dentro y fuera del laboratorio. A Nacho, soriano de pro, y a David, ceutí de pro, a quienes tengo por muy buenos amigos, por haber compartido conmigo grandes momentos y por acompañarme en tantas aventuras fuera del laboratorio; de no ser por las habilidades como celestino del primero o de la pericia como piragüista en aguas africanas del segundo, quizás hoy día mi vida fuera muy diferente. A Talia, por ser de las mejores compañeras que haya podido conocer. A Luis, por ayudarme en los primeros meses y por haberme enseñado la intrahistoria del "López". A Rubén, por darle más vida al sector 203 desde su llegada. A Vero, por contrarrestar a Rubén y equilibrar la balanza de la sensatez en el 203. A Ana, por no enfadarse cuando le gano al pádel. A Laura y a las chicas del 208 (María, Marta, Lina, Sophie), por completar este grupo y a quienes hago extensible lo que comentaba al principio de este párrafo.

A mucha gente de otros laboratorios (Sole, Michael, Alfredo, Ana, Adri, Darien, Antonio, Jean-Mathieu, Juandi, Pepe, Sandra, Morell, Virginia y un largo etcétera), por conseguir que haber formado parte de este centro sea motivo de orgullo y deje una huella imborrable en mi memoria. Por transmitirme su entusiasmo por la ciencia y/o por haber compartido numerosas horas, comidas, salidas, excursiones y cervezas. De entre todos ellos, gracias en especial a los *gañanes* (Paco, Jose, Patxi, Kiko, Canario, Carlos, Santi, Antonio, y nuevamente Luis) porque, de no haberles conocido, mi paso por aquí hubiera sido indudablemente mucho más aburrido.

A mis anteriores *jefas*, *jefe* y compañeros de Micro (Emilia, Victoria, Ana, Inma, Fernando, Ali, Nahid, Marga, Carmen), por abrirme el camino de la investigación y permitirme pasar una época que guardo con especial cariño. A mis compañeros y amigos de Farmacia (especialmente a Bea, Emi y Víctor) y de Bioquímica, por haberme acompañado durante mis años de formación y habérmelo hecho pasar tan bien.

Pero además estas líneas sirven también para agradecer a todos aquellos que, fuera del ambiente científico, han estado durante todo este tiempo conmigo, en los buenos y en los malos momentos. A mis amigos de Murcia y de Granada, a la *Hermandad Big Mac* y a la *Peña El Botijo*, por los días de fiesta y los momentos compartidos durante tanto tiempo. Porque, aunque durante los años necesarios para realizar esta tesis nuestros caminos se hayan ido separando, los recuerdos y los reencuentros siguen vivos. A Miguelón y demás gente del Van Gogh, por mantener esa atmósfera que tanto ha influido en mi vida.

A mis padres, no solo porque su aporte genético y el ambiente creado desde que era niño hayan podido resultar decisivos para que terminase expresando el fenotipo *predoc*; principalmente les doy las gracias por su apoyo incondicional y por darme toda la libertad posible para elegir mi camino, así como todas las facilidades para poder seguirlo. A mi hermana, por la ayuda que siempre me ha prestado, y qué mejor prueba que la realización de la portada que ilustra esta tesis. A mis tíos y mis primos. A mis abuelos, que no me han podido acompañar hasta este día, pero que siempre se mostraron orgullosos de su nieto.

A Coco y a Diana, que han pasado conmigo más horas que nadie durante la redacción de esta tesis, por brindarme su compañía y esperar pacientemente para dar su paseo matinal mientras terminaba de redactar algún párrafo o de componer alguna figura. A mi *suegra*, cuyo sincero apoyo también me ha hecho llegar durante este periodo.

Y, por último, a Minerva, por alegrarme la vida un día detrás de otro. Por tener el valor de aguantarme, por creer en mí y no enfadarse por las horas que este trabajo le haya podido quitar. Gracias a ella esta tesis y los proyectos que tenga en mente tienen mucho más sentido.



RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	7
I. P4-ATPasas Y PROTEÍNAS Cdc50	
I.1. Transporte de fosfolípidos y asimetría de membrana.....	9
I.2. P4-ATPasas: implicaciones fisiológicas y patológicas.....	10
I.3. Estructura de las P4-ATPasas.....	15
I.4. Mecanismo de acción de las P4-ATPasas.....	17
I.5. Regulación de las P4-ATPasas.....	22
I.6. Proteínas Cdc50.....	23
I.7. Funciones de las proteínas Cdc50.....	27
I.8. Caracterización de las proteínas Cdc50.....	28
II. LEISHMANIASIS	
II.1. Leishmaniasis: Epidemiología.....	31
II.2. Situación de la leishmaniasis en España.....	33
II.3. Manifestaciones clínicas.....	34
II.4. Transmisión de la leishmaniasis.....	36
II.5. <i>Leishmania</i> : Taxonomía.....	37
II.6. Ciclo de vida.....	37
II.7. Establecimiento de la infección.....	40
II.8. Biología y bioquímica de <i>Leishmania</i>	42
II.9. Tratamiento de la leishmaniasis.....	47
II.10. Generación de resistencias a fármacos.....	51
III. MILTEFOSINA	
III.1. Introducción histórica.....	55
III.2. Características químicas de la miltefosina.....	55
III.3. Farmacocinética de la miltefosina.....	56
III.4. Mecanismo de acción de la miltefosina.....	58
III.5. Eficacia de la miltefosina en el tratamiento de la leishmaniasis.....	61
III.6. Características del tratamiento con miltefosina y efectos adversos....	63
III.7. Variaciones de sensibilidad a miltefosina y recaídas.....	63
III.8. Resistencia a miltefosina en <i>Leishmania</i>	64
IV. COMPLEJO DE TRANSPORTE DE MILTEFOSINA EN LEISHMANIA	
IV.1. Internalización de miltefosina en <i>Leishmania</i>	69
IV.2. Complejo de transporte de miltefosina y resistencia al fármaco.....	71
OBJETIVOS	75

MATERIALES Y MÉTODOS 77
I. MATERIALES

I.1. Líneas celulares.....	79
I.2. Medios y reactivos de cultivo.....	79
I.2.1. <i>Leishmania infantum</i>	79
I.2.2. Bacterias.....	80
I.2.3. Células THP-1.....	80
I.3. Tampones, soluciones y reactivos.....	81
I.3.1. Soluciones generales.....	81
I.3.2. Soluciones para Southern blot.....	81
I.3.3. Soluciones y reactivos para la hibridación de ácidos nucleicos y su detección mediante el sistema DIG.....	81
I.3.4. Reactivos de Biología Molecular.....	82
I.3.5. Soluciones y reactivos para el análisis de proteínas.....	83
I.3.6. Soluciones y reactivos para Western blot e inmunodetección	84
I.3.7. Soluciones y reactivos para los ensayos de microscopía.....	85
I.3.8. Soluciones y reactivos para el estudio funcional de la proteína LiRos3.....	85
I.4. Vectores plasmídicos.....	86
I.4.1. Vectores de clonaje.....	86
I.4.2. Vectores de expresión para <i>Leishmania</i>	86
I.5. Oligonucleótidos.....	87

II. MÉTODOS

II.1. Cultivo y manipulación de <i>L. infantum</i>	93
II.1.1. Cultivo <i>in vitro</i>	93
II.1.2. Criopreservación y congelación de promastigotes.....	93
II.1.3. Recuento de promastigotes.....	93
II.1.4. Transfección de DNA plasmídico por electroporación.....	93
II.2. Cultivo y manipulación de bacterias.....	94
II.2.1. Cultivo de bacterias.....	94
II.2.2. Preparación de células competentes por choque térmico.....	94
II.3. Manipulación de ácidos nucleicos.....	94
II.3.1. Aislamiento de DNA genómico de promastigotes.....	94
II.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	94
II.3.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	94
II.3.4. Purificación del DNA incluido en agarosa.....	95
II.3.5. Aislamiento de DNA plasmídico.....	95
II.3.6. Digestión de DNA con enzimas de restricción.....	95
II.3.7. Tratamiento con fosfatasa alcalina.....	95
II.3.8. Reacción de ligación.....	96

II.3.9. Transformación de células competentes y selección de clones.....	96
II.3.10. Secuenciación de DNA.....	96
II.3.11. Generación de sondas de DNA marcadas con digoxigenina.....	96
II.4. Obtención de una línea mutante nulo del gen <i>LiRos3</i>	96
II.5. Análisis de DNA mediante Southern blot.....	97
II.6. Generación de construcciones con el gen <i>LiRos3</i> mutado, truncado y quimeras.....	98
II.7. Técnicas para el estudio funcional de la proteína LiRos3.....	99
II.7.1. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC ₅₀) en formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	99
II.7.2. Ensayos de acumulación de miltefosina.....	100
II.7.3. Acumulación de análogos fluorescentes de fosfolípidos.....	100
II.7.4. Ensayos de actividad lipasa.....	101
II.7.5. Sensibilidad a miltefosina de los amastigotes intracelulares <i>in vitro</i>	102
II.8. Técnicas de obtención y análisis de proteínas.....	102
II.8.1. Preparación de extractos totales de <i>L. infantum</i> para electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE.....	102
II.8.2. Biotinilación de las proteínas de superficie.....	103
II.8.3. Co-inmunoprecipitación.....	103
II.8.4. Reacción de N-desglucosilación.....	103
II.8.5. Cuantificación de proteínas.....	104
II.8.6. Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE.....	104
II.8.7. Transferencia de proteínas a membrana y detección con anticuerpos (Western blot).....	104
II.9. Microscopía de fluorescencia.....	105
II.10. Análisis bioinformático.....	105
II.11. Análisis estadístico.....	106
RESULTADOS	107
I. Características generales de LiRos3 y homología con otras proteínas Cdc50.....	109
II. Generación y caracterización de promastigotes de <i>L. infantum</i> mutantes nulos del gen <i>LiRos3</i>	111
III. Identificación de residuos de LiRos3 implicados en la funcionalidad del complejo de transporte de miltefosina.....	113
IV. Influencia de mutaciones en LiRos3 sobre el tráfico del transportador de miltefosina a la membrana plasmática.....	122
V. Influencia de mutaciones en LiRos3 sobre la interacción con su subunidad asociada LiMT.....	124
VI. Actividad de transporte de los mutantes Q16L, Q17L, L19Q, D218V y N176Q.....	126
VII. Caracterización adicional del dominio N-terminal de LiRos3.....	129
VIII. Efecto de la tasa de glicosilación de LiRos3 sobre su función.....	133

IX. Caracterización funcional de las proteínas LiRos3 truncadas y de las proteínas Cdc50 quiméricas.....	137
X. Funcionalidad del complejo de transporte de miltefosina en amastigotes intracelulares de <i>L. infantum</i>	146
DISCUSIÓN	149
I. Caracterización de las P4-ATPasas y las proteínas Cdc50: últimos avances y situación actual.....	151
II. Estudio mutacional de LiRos3.....	152
II.1. Identificación de residuos importantes en la función de LiRos3.....	152
II.2. Efectos de las mutaciones en LiRos3 sobre el tráfico del complejo a la membrana plasmática.....	153
II.3. Efectos de las mutaciones en LiRos3 sobre la actividad flipasa.....	155
III. Otros aspectos funcionales de LiRos3.....	156
III.1. Efecto de la tasa de glicosilación de LiRos3 sobre su función.....	156
III.2. Caracterización funcional de los dominios de LiRos3.....	156
III.3. Contribución de LiRos3 en el transporte de fosfolípidos.....	159
IV. Interacción de la miltefosina con su complejo de transporte.....	161
V. Resistencia a miltefosina en <i>Leishmania</i>	162
V.1. Empleo de la miltefosina para la leishmaniasis: necesidad de mecanismos de control.....	162
V.2. Importancia del complejo de transporte de miltefosina en la resistencia natural a miltefosina.....	164
V.3. Marcadores de resistencia a miltefosina.....	166
VI. Consideraciones finales y perspectivas.....	169
CONCLUSIONES	173
BIBLIOGRAFÍA	175

ABREVIATURAS

ABC	<i>ATP-binding Cassette</i>
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ALIS	<i>ALA-interacting subunit</i>
APX	Ascorbato peroxidasa
ARF	Factor de ribosilación de ADP
BiP	Proteína de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina
BRIC	Colestasis intrahepática recurrente benigna
BSA	Albúmina de suero bovino
Cdc50	<i>Cell-division-cycle protein 50</i>
CR	Receptor del complemento
CRP	Proteína C reactiva
DAPI	Dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DDM	n-dodecil- β -D-maltopiranosido
DIG	Digoxigenina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EF	Factor de elongación
eIF	Factor de iniciación de eucariotas
Fpk	Flipasa quinasa
Fw	<i>Forward</i> (sentido)
GAP	Proteína activadora de GTPasa
GEF	Proteína intercambiadora de guanina
GFP	Proteína verde fluorescente
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
hiFBS	Suero bovino fetal inactivado por calor
Hsp	<i>Heat-shock protein</i> (proteína de choque térmico)
IC ₅₀	Concentración inhibitoria del 50% del crecimiento
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IFN- γ	Interferón gamma
IgG	Inmunoglobulina G
kb	Kilobase
kDa	KiloDalton
K _M	Constante de Michaelis-Menten
LC	Leishmaniasis cutánea
LdMT	Transportador de miltefosina de <i>Leishmania donovani</i>
Lem3p	<i>Ligand-effect modulator 3</i>
LiMT	Transportador de miltefosina de <i>Leishmania infantum</i>
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LPG	Lipofosfoglicano
LV	Leishmaniasis visceral

MDR	Multirresistencia a fármacos
MLF	Miltefosina
MP	Membrana plasmática
MRP	Proteína asociada a multirresistencia
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
NBD	Nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
OMS	Organización Mundial de la Salud
ORF	<i>Open Reading Frame</i> (Marco abierto de lectura)
PAF	Factor activador de plaquetas
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PC	Fosfatidilcolina
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Fosfatidiletanolamina
PFIC	Colestasis intrahepática familiar progresiva
Pgp	Glicoproteína P
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PI4P	Fosfatidilinositol-4-fosfato
PKB	Proteína quinasa B
PKDL	Leishmaniasis dérmica post kala-azar
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PNGasaF	Péptido N-glicosidasa F
pre-mRNA	Precursor de RNA mensajero
PS	Fosfatidilserina
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
RE	Retículo endoplasmático
RNS	Especies reactivas de nitrógeno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rv	<i>Reverse</i> (antisentido)
SDS	Dodecil sulfato sódico
SERCA	Ca ⁺⁺ -ATPasa del retículo sarco-endoplasmático
Sir	Regulador de información silenciado
SL	<i>Spliced leader</i>
SOD	Superóxido dismutasa
TDR	Programa de investigaciones sobre enfermedades tropicales
TGN	Red del trans-Golgi
TLR	Receptor de tipo Toll
TM	Transmembrana
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
UTR	Región no codificante
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana
WT	<i>Wild-type</i> (línea salvaje)



Resumen

El mecanismo de resistencia más relevante descrito hasta la fecha que pueden desarrollar los parásitos del género *Leishmania* a la miltefosina (MLF, hexadecilfosfocolina), uno de los fármacos que más se emplean en la actualidad contra la leishmaniasis, consiste en la inactivación del complejo proteico encargado de su internalización.

Este complejo se sitúa en la membrana plasmática de los parásitos y está constituido al menos por dos proteínas: una subunidad catalítica (**MT**, de *Miltefosine Transporter*), perteneciente a la familia de las fosfolípido translocasas o P4-ATPasas, y una subunidad beta (**Ros3**), perteneciente a la familia de proteínas Cdc50. En el caso de *Leishmania infantum*, especie utilizada a lo largo de los experimentos descritos en esta tesis doctoral, ambas proteínas se denominan LiMT y LiRos3, respectivamente. Nuestro laboratorio ha descrito anteriormente en *Leishmania donovani* que la pérdida de cualquiera de los ortólogos de estas dos subunidades (LdMT y LdRos3) o la ausencia de su expresión a nivel de la membrana plasmática conlleva elevados valores de resistencia a MLF por la incapacidad del parásito para incorporar este fármaco. De hecho, el nivel de sensibilidad *in vitro* a MLF está claramente relacionado con su tasa de captación y con el nivel de expresión de la proteína transportadora en la membrana del parásito.

Las P4-ATPasas son responsables del transporte activo de glicerofosfolípidos desde la cara exoplasmática hasta la cara citosólica de las membranas de las células eucariotas, una función que comúnmente se denomina como actividad flipasa. Estas proteínas son esenciales para crear y mantener una distribución asimétrica de fosfolípidos a ambos lados de la membrana, un fenómeno que está asociado con numerosos procesos fisiológicos y celulares, así como para incorporar determinados lípidos exógenos o para la formación de las vesículas que forman parte del tráfico intracelular. Estas proteínas están siendo muy estudiadas en los últimos años en diferentes modelos, habiéndose obtenido importantes avances en el conocimiento de su mecanismo de acción. Aunque el papel de las proteínas Cdc50 no esté del todo aclarado, existen evidencias de su participación tanto en la salida del complejo del retículo endoplasmático como en el ciclo de reacción llevado a cabo por las P4-ATPasas.

Al igual que las P4-ATPasas, las proteínas Cdc50 son proteínas integrales de membrana exclusivas de organismos eucariotas. Poseen una estructura muy conservada, estando constituidas por dos hélices transmembrana, un dominio extracitosólico de gran tamaño, estabilizado por dos puentes disulfuro y fuertemente N-glicosilado, y dos pequeñas colas dirigidas al citoplasma situadas en los extremos amino y carboxilo terminal. La caracterización de estas proteínas, que carecen de motivos aminoacídicos funcionales conocidos, se encuentra todavía en una etapa inicial, habiéndose realizado hasta la fecha muy pocos estudios moleculares dirigidos a la identificación de los residuos o dominios implicados en su funcionalidad.

Debido a ello, el objetivo principal de esta tesis doctoral consistió en la caracterización de la proteína LiRos3, analizando el papel que desempeñan sus diferentes dominios y determinados residuos con un alto grado de conservación, con la finalidad de profundizar en la caracterización del complejo de transporte de miltefosina en *Leishmania*, que comenzó nuestro laboratorio hace ya más de diez años, y tratar de

que los resultados obtenidos pudieran ser aplicables al estudio de las proteínas Cdc50 de otros organismos.

Durante el trabajo que aquí se presenta, se han generado promastigotes mutantes nulos del gen *LiRos3* que han permitido el estudio de diferentes modificaciones de la proteína, observando los fenotipos que se derivan de la expresión de las mismas, puesto que, para que se produzca el transporte de MLF, es esencial que tenga lugar la interacción entre *LiRos3* y *LiMT* y que el complejo se exprese correctamente en la membrana plasmática del parásito.

Estas modificaciones consistieron en la introducción mediante mutagénesis dirigida de sustituciones conservativas y no conservativas y en el empleo de proteínas quiméricas generadas sustituyendo los diferentes dominios de *LiRos3* por los correspondientes dominios de los otros dos miembros de la familia Cdc50 de *L. infantum*, denominados *LiRos1* y *LiRos2*. Se identificaron 22 residuos de *LiRos3* conservados en las proteínas Cdc50 de humanos, levaduras y *Leishmania* y se realizaron mutaciones en todos ellos. Se observó que el nivel de conservación de ocho de estos residuos, localizados en el lazo exoplasmático, es crítico para la interacción con *LiMT* y el tráfico del complejo de transporte de MLF hacia la membrana plasmática. Al margen de este efecto, cuando se muta uno de estos residuos, que forma parte de un motivo invariable de N-glicosilación, también se altera la actividad translocasa de fosfolípidos. Además, otro residuo invariable localizado en el lazo exoplasmático y cuatro residuos localizados en el dominio N-terminal están implicados en esta actividad flipasa sin afectar a la llegada del complejo a la membrana plasmática.

Por otro lado, se ha observado que el nivel de N-glicosilación de *LiRos3* también puede afectar a la actividad translocasa y a la expresión de *LiMT* en la membrana plasmática. Además, se ha comprobado que los dominios amino y carboxilo terminal no son esenciales para la interacción con *LiMT*, pero sí se requieren para el correcto tráfico del complejo hacia la membrana plasmática. Aunque *LiRos1* y *LiRos3* tienen una baja identidad en la secuencia de aminoácidos, la sustitución de los dominios amino terminal, primer transmembrana y carboxilo terminal de *LiRos3* por los correspondientes dominios de *LiRos1* genera proteínas funcionales. Por el contrario, cuando se sustituyen los dominios extracitosólico y segundo transmembrana, se pierde la interacción con *LiMT*.

Los resultados sugieren, como ya se había publicado anteriormente, que el dominio N-terminal de las proteínas Cdc50 juega un papel importante durante el ciclo de reacción de las P4-ATPasas. Además, se puede deducir que, para la correcta interacción con *LiMT*, aparte de los residuos identificados, se necesita de la participación de otros residuos aún sin identificar situados en los segmentos transmembrana y en el lazo extracelular de *LiRos3*. En conclusión, los resultados de esta tesis doctoral proporcionan nuevos y relevantes datos sobre la estructura de las proteínas Cdc50 y sobre el papel de determinados residuos en el tráfico y actividad de las P4-ATPasas translocadoras de fosfolípidos.

Al margen de esto, los resultados obtenidos podrían ser de utilidad para mejorar el abordaje terapéutico de la leishmaniasis, considerada como la segunda enfermedad protozoaria humana más importante, tan solo por detrás de la malaria, con 12 millones de afectados en todo el planeta y responsable de entre 20.000 y 30.000 muertes al año.

En la actualidad sigue constituyendo un grave problema sanitario, debido entre otras causas a su asociación con pacientes infectados por el VIH y al escaso arsenal terapéutico del que se dispone, amenazado además por la posibilidad de aparición de resistencias, como ha sucedido en el subcontinente indio frente a los antimoniales pentavalentes.

En 2002 la MLF se introdujo como el primer fármaco oral usado frente a la leishmaniasis, presentando un porcentaje de cura aproximado del 95% en la India frente a la leishmaniasis visceral, la forma más letal de la enfermedad. Sin embargo, el porcentaje de pacientes que no responden al tratamiento ha experimentado un significativo aumento en los últimos años. Entre otras medidas a adoptar para evitar la propagación de resistencias y así alargar la vida útil de la MLF, se encuentra la necesidad de desarrollar marcadores de resistencia al fármaco con los que poder monitorizar la existencia de las mismas.

En anteriores estudios se ha observado que *L. donovani*, cuando se somete *in vitro* a la presión selectiva del fármaco, puede generar rápidamente resistencia debida a la aparición de mutaciones de la proteína LdMT y, en menor medida, de LdRos3. Recientemente, se ha descrito resistencia a MLF en un caso de leishmaniasis visceral producida por *L. infantum* donde el parásito aislado portaba una mutación en LiMT. Por estos motivos, resultaría de gran interés analizar tanto los niveles de expresión de estas proteínas como buscar mutaciones que pudieran ser responsables de la resistencia a MLF en aislados clínicos. La caracterización de LiRos3 que se describe en esta tesis doctoral, y especialmente las mutaciones observadas que confieren resistencia a MLF, suponen un importante avance en este sentido, más aún si cabe teniendo en cuenta que se ha comprobado que este efecto se mantiene en las formas amastigotas intracelulares de *Leishmania*.



INTRODUCCIÓN

I. P4-ATPasas Y PROTEÍNAS Cdc50

I.1. Transporte de fosfolípidos y asimetría de membrana

Las membranas de las células eucariotas están organizadas como bicapas compuestas por numerosas especies lipídicas diferentes. Los **glicerofosfolípidos**, que son sus constituyentes fundamentales, están formados por una cabeza hidrófila dirigida hacia el ambiente acuoso celular o extracelular y dos colas hidrófobas que se sitúan en el interior de la bicapa lipídica (revisado por van Meer *et al.*, 2008). Estas moléculas se sintetizan principalmente en la cara citoplasmática de la membrana del retículo endoplasmático (RE) y, debido a la acción de proteínas que actúan sin gasto de energía, se produce una distribución equilibrada de fosfolípidos a ambos lados de la membrana.

Sin embargo, una característica estructural de la mayoría de membranas es la **distribución asimétrica** de fosfolípidos en la bicapa lipídica, lo que constituye un claro ejemplo de la gran variabilidad que existe entre las membranas de los distintos orgánulos celulares en cuanto a la composición y distribución lipídica (revisado por van Meer y de Kroon, 2011). La asimetría de membrana se genera en primer lugar en el aparato de Golgi y se mantiene en las vesículas secretoras, así como en los endosomas y en la membrana plasmática, donde la fosfatidilserina (PS) y la fosfatidiletanolamina (PE) se encuentran en mayor proporción en la cara citoplasmática, mientras que la fosfatidilcolina (PC), la esfingomiélna (SM) y los glucoesfingolípidos (GL) aparecen más concentrados en la cara exoplasmática (revisado por Holthuis y Levine, 2005; van Meer *et al.*, 2008) (Fig. 1).

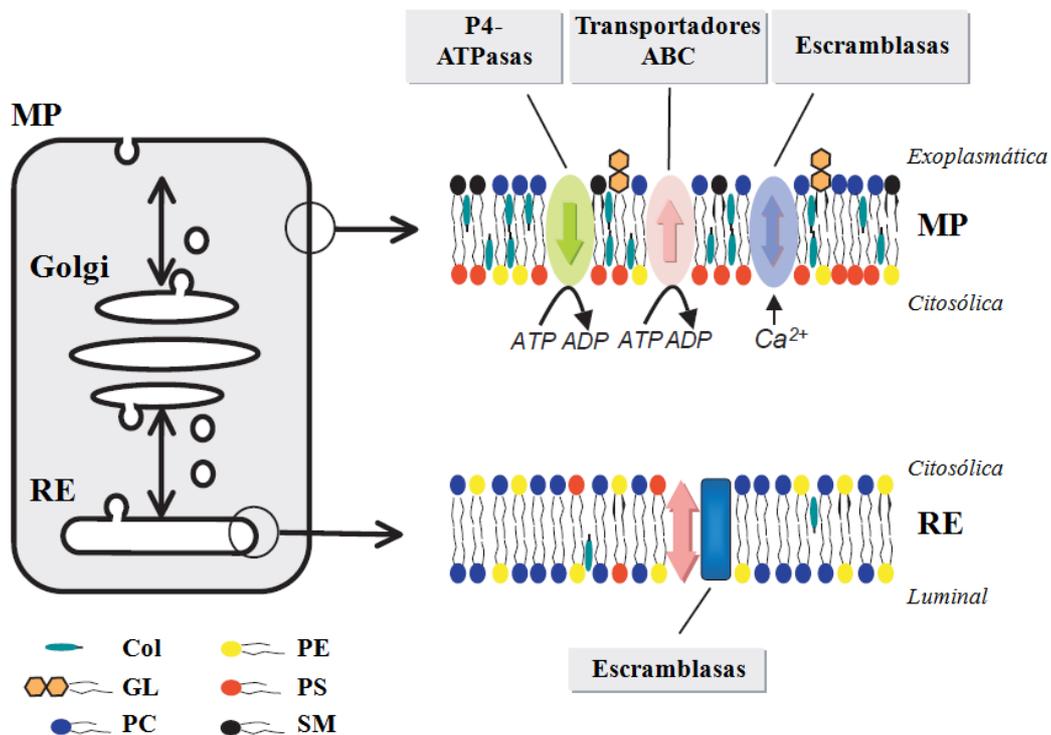


Figura 1. Regulación de la distribución lipídica en las membranas biológicas.

MP, membrana plasmática; RE, retículo endoplasmático; Col, colesterol; GL, glucolípidos; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PS, fosfatidilserina; SM, esfingomiélna. Adaptada de Pomorski *et al.*, 2004.

Esta asimetría es esencial para la curvatura, estabilidad mecánica e impermeabilidad de la membrana plasmática, y se ha asociado con numerosos procesos fisiológicos y celulares. Por ejemplo, la exposición de PS en la membrana plasmática es una señal de gran importancia para el reconocimiento y fagocitosis de células apoptóticas, la activación de la coagulación sanguínea y la fusión de mioblastos (Zwaal y Schroit, 1997; van den Eijnde *et al.*, 2001; Williamson y Schlegel, 2002). Otros procesos asociados con la asimetría de membrana son la capacitación espermática, la división celular o las interacciones entre virus y célula hospedadora (revisado por López-Marqués *et al.*, 2011; van der Mark *et al.*, 2013).

El movimiento de difusión de los fosfolípidos en una monocapa lipídica es muy rápido. Sin embargo, el movimiento desde una cara a otra de la bicapa lipídica, conocido como **movimiento flip-flop**, es generalmente muy lento. En la membrana plasmática, el movimiento de fosfolípidos está además limitado por la existencia de altos niveles de colesterol y esfingolípidos (revisado por Pomorski *et al.*, 2004). Por todo esto, para poder generar y mantener la organización asimétrica de las membranas son necesarias una serie de proteínas que sean capaces de translocar los glicerofosfolípidos desde una cara a la otra de las mismas. Estos transportadores presentan variabilidad en cuanto a la especificidad de sustrato, dependencia de energía y dirección del transporte, dividiéndose en tres clases principales (Fig. 1):

1 - **Flipasas**: Son generalmente ATPasas tipo P pertenecientes a la familia de las fosfolípido translocasas (P4-ATPasas), aunque recientemente se han identificado algunos transportadores ABC (*ATP-binding Cassette*) que también pueden actuar como tales (Quazi *et al.*, 2012; Coleman *et al.*, 2013). Translocan glicerofosfolípidos desde la cara exoplasmática (extracelular o luminal) hasta la cara citosólica de las membranas, utilizando la energía procedente de la hidrólisis del ATP (revisado por Daleke, 2007).

2 - **Flopasas**: Son transportadores ABC entre los que destacan los miembros de la familia ABCB, ABCB1/MDR1 y ABCB4/MDR3, así como componentes de las familias ABCA, ABCC/MRP y ABCG. Realizan el transporte en dirección opuesta, translocando por tanto glicerofosfolípidos desde la cara citoplasmática a la exocitoplasmática (revisado por Quazi y Molday, 2011). Al igual que las P4-ATPasas, son dependientes de energía.

3 - **Escramblasas**: Su identidad molecular no está establecida con claridad, aunque se han identificado varios candidatos (Zhou *et al.*, 1997; Wiedmer *et al.*, 2000; Suzuki *et al.*, 2010; Shettihalli y Gummadi, 2013; Suzuki *et al.*, 2013; Goren *et al.*, 2014). Estos transportadores son dependientes de Ca^{2+} , actúan de manera bidireccional, sin consumo de ATP y tienen por lo general baja especificidad de sustrato (Sahu *et al.*, 2007; Bevers y Williamson, 2010; Coleman *et al.*, 2013). Su actividad contribuye a la ruptura de la asimetría creada por los translocadores dependientes de ATP.

I.2. P4-ATPasas: implicaciones fisiológicas y patológicas

Como se ha comentado, el transporte activo de lípidos llevado a cabo por las fosfolípido translocasas o P4-ATPasas es necesario para crear y mantener una distribución asimétrica de fosfolípidos en la membrana plasmática de las células eucariotas, así como en las membranas de los componentes de la ruta de secreción y de

los compartimentos endocíticos (revisado por Coleman *et al.*, 2013; Hankins *et al.*, 2015; López-Marqués *et al.*, 2015).

Además de esto, los análisis funcionales llevados a cabo sobre todo en levaduras han revelado que las P4-ATPasas están involucradas en otros destacados procesos celulares (revisado por Van der Velden *et al.*, 2010a; Paulusma y Elferink, 2010) (Fig. 2). Por ejemplo, influyen directa o indirectamente en la incorporación de lípidos exógenos, la cascada de señales dependientes de PE o PS, la dinámica del citoesqueleto, el metabolismo de esteroides, la migración celular y el crecimiento polarizado. Se desconoce el papel funcional de muchas P4-ATPasas humanas, posiblemente debido a la existencia de redundancia funcional (revisado por van der Mark *et al.*, 2013; López-Marqués *et al.*, 2014).

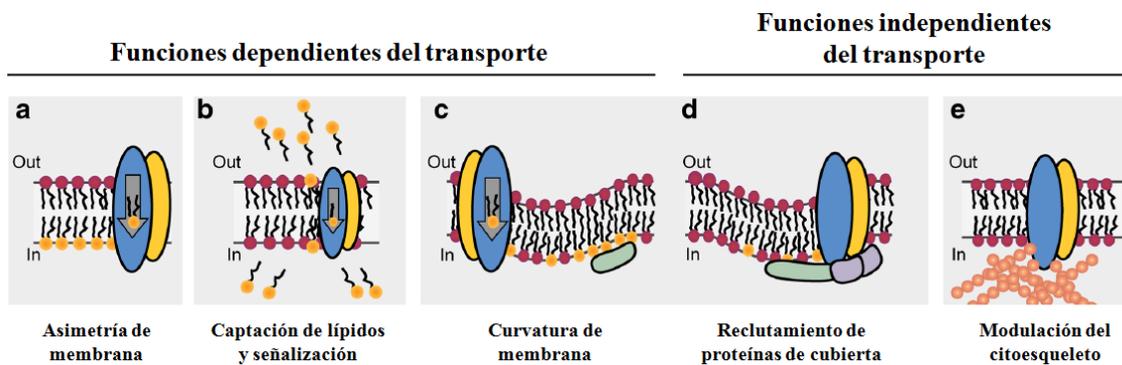


Figura 2. Funciones celulares de las P4-ATPasas. Tomada de López-Marqués *et al.*, 2014.

Incorporación de lípidos exógenos

Estudios realizados sobre distintas P4-ATPasas de levaduras, *Leishmania*, plantas y animales han demostrado que estas proteínas actúan sobre un numeroso grupo de sustratos lipídicos, incluyendo lisofosfolípidos (fosfolípidos que carecen de la cadena de ácido graso en la posición *sn2*) y alquil-lisofosfolípidos sintéticos, y que los diferentes miembros de esta familia presentan diferente especificidad de sustrato (revisado por López-Marqués *et al.*, 2014).

Algunas P4-ATPasas situadas en la membrana plasmática se han caracterizado como flipasas con una especificidad de sustrato relativamente amplia. Por ejemplo, las levaduras pueden captar lisofosfolípidos exógenos para ser usados como sustrato en la regeneración de fosfolípidos (Riekhof *et al.*, 2007). Su importancia en la nutrición de las células se manifiesta en que la pérdida de las P4-ATPasas Dnf1p y Dnf2p, o de su subunidad asociada Cdc50 Lem3p, bloquea la captación de liso-fosfatidiletanolamina (liso-PE) y liso-fosfatidilcolina (liso-PC), inhibiendo el crecimiento dependiente de estos sustratos (Riekhof y Voelker, 2006; Riekhof *et al.*, 2007).

Por otro lado, estudios realizados en células de mamíferos han mostrado que la subunidad CDC50A, asociada a diversas P4-ATPasas humanas, participa en la captación del factor activador de plaquetas (PAF), un mediador inflamatorio de naturaleza lipídica (PC de cadena corta), implicando que el complejo que constituyen

puede participar en la translocación de moléculas señalizadoras procedentes del exterior celular (Chen *et al.*, 2011) (Fig. 2b).

Los antecedentes relativos a *Leishmania* serán comentados en el apartado IV de la introducción de esta tesis doctoral.

Tráfico vesicular

Entre las principales funciones descritas para las P4-ATPasas puede destacarse también su participación en la formación y el transporte de vesículas en diversos puntos de las rutas de tráfico intracelular (Hua *et al.*, 2002; Pomorski *et al.*, 2003). Las membranas y proteínas sintetizadas en el RE se asocian formando pequeñas vesículas que se fusionan con otros orgánulos membranosos como el aparato de Golgi. Las proteínas son también procesadas por la red del trans-Golgi (TGN), desde donde se dirigirán a la ruta endosomal/lisosomal o a la ruta exocítica.

Existen numerosas evidencias de la importancia que tienen las P4-ATPasas en estos procesos (revisado por Sebastian *et al.*, 2012). Por ejemplo, la pérdida de Drs2p en levaduras conlleva la acumulación de membranas anormales y la incapacidad para formar vesículas recubiertas de clatrina (Chen *et al.*, 1999; Gall *et al.*, 2002), muy importantes en el tráfico desde la TGN hacia los endosomas. Además, recientemente se ha observado que el silenciamiento de las P4-ATPasas humanas ATP8B1, ATP8B2 y ATP9A, así como de la subunidad CDC50A, inhibe la secreción de insulina en células beta pancreáticas (Ansari *et al.*, 2015).

Aunque no se conoce con exactitud la función de las P4-ATPasas en la formación de vesículas, se sabe que es realizada a través de dos mecanismos (Coleman *et al.*, 2013) (Fig. 2c y 2d):

(i) En primer lugar, la translocación unidireccional de fosfolípidos llevada a cabo por las P4-ATPasas genera una diferencia de áreas entre las dos caras de las membranas, lo que conlleva que se induzca su curvatura, paso necesario para el transporte de proteínas mediado por vesículas (Xu *et al.*, 2013).

(ii) En segundo lugar, la concentración de PS y PE en la cara citosólica de la membrana crea un ambiente en la membrana óptimo para el correcto reclutamiento y/o actividad de la maquinaria de formación de vesículas (revisado por Pomorski y Menon, 2006). Se han descrito interacciones de determinadas P4-ATPasas como Drs2p y Neo1p con proteínas importantes para el tráfico vesicular, como los factores de ribosilación de ADP (ARFs) (Tsai *et al.*, 2013; revisado por López-Marqués *et al.*, 2014), que son pequeñas GTPasas reguladas por proteínas intercambiadoras de guanina (GEFs) y proteínas activadoras de GTPasas (GAPs). Las GEFs catalizan el intercambio de GDP por GTP, mientras que las GAPs incrementan la tasa de hidrólisis de GTP. Cuando están unidos a GTP, los ARFs participan en el reclutamiento de clatrina y proteínas COPII, esenciales para el revestimiento de las vesículas, del que dependerá su destino subcelular (revisado por Coleman *et al.*, 2013). Además, se ha descrito que la unión de ArfGEF con Drs2p estimula su actividad flipasa (Natarajan *et al.*, 2009). Por tanto, para explicar la formación de las vesículas, se ha propuesto que las ArfGEFs reclutan ARFs activados y estimulan a las P4-ATPasas, lo que conlleva que se concentren aminofosfolípidos en la cara citosólica de las vesículas (Sebastian *et al.*, 2012) (Fig. 3).

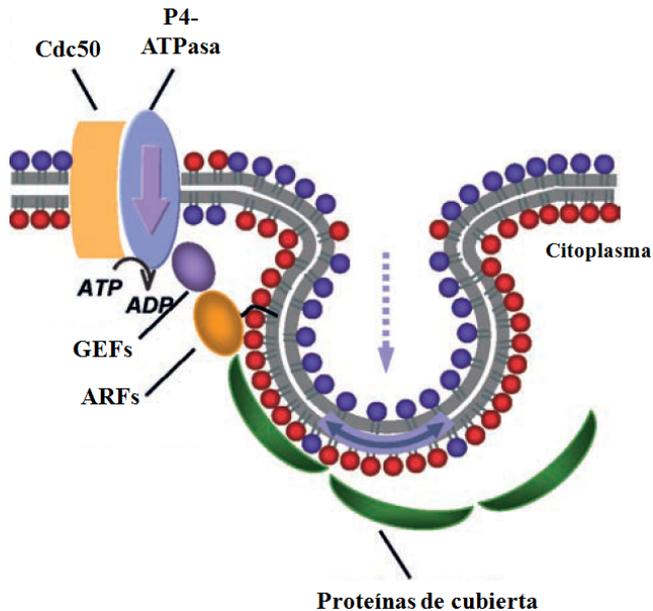


Figura 3. Papel de las P4-ATPasas en la formación de vesículas.

La maquinaria de formación de vesículas se concentra alrededor de determinadas P4-ATPasas, que interactúan con proteínas ARFs y GEFs. Los ARFs participan en el reclutamiento de clatrina y proteínas COPII, esenciales para el revestimiento de las vesículas. Se cree que las GEFs reclutan ARFs activados y estimulan a las P4-ATPasas, lo que conlleva una mayor concentración de fosfolípidos en la cara citosólica de las vesículas. Adaptada de Pomorski y Menon, 2006.

Regulación del citoesqueleto

Otra función de determinadas P4-ATPasas independiente de su actividad de transporte estaría relacionada con la dinámica del citoesqueleto (revisado por López-Marqués *et al.*, 2014) (Fig. 2e). Estas proteínas parece que participan reclutando componentes estructurales o moduladores del citoesqueleto de actina, uniendo de esta manera el citoesqueleto a áreas especializadas de la membrana plasmática.

Por ejemplo, se han descrito interacciones de Drs2p y Dnf1p con Sla1p (Liu *et al.*, 2007), una proteína que participa en la activación de proteínas implicadas en la polimerización de actina (Warren *et al.*, 2002). Además, en células de mamíferos se ha observado que el bloqueo de la expresión de ATP8B1 resulta en una desorganización profunda del citoesqueleto apical de actina y en una pérdida importante de microvilli (Verhulst *et al.*, 2010).

Implicaciones patológicas

Como se ha comentado anteriormente, las flipasas son necesarias para generar la curvatura de la membrana plasmática. Relacionado con este mecanismo, se ha visto que estas proteínas son necesarias para el mantenimiento de la correcta forma de los glóbulos rojos. La translocación de determinados fosfolípidos exógenos o la ausencia de actividad de la flipasa pueden dar como resultado **cambios dramáticos en la forma de los eritrocitos** que se han relacionado con procesos patológicos (Devaux *et al.*, 2008).

Por otro lado, el transporte de fosfolípidos a través de las membranas es esencial para la homeostasis lipídica, por lo que algunas alteraciones de determinadas P4-ATPasas se han asociado con la aparición de enfermedades (Tabla 1; revisado por Folmer *et al.*, 2009; revisado por van der Mark *et al.*, 2013). Todas las P4-ATPasas humanas tienen sus proteínas ortólogas en ratón, lo que facilita el estudio de posibles enfermedades asociadas a mutaciones (Paulusma y Oude Elferink, 2005). Así, en modelos murinos se ha visto que las deficiencias en algunas P4-ATPasas se asocian con

determinadas **enfermedades neurodegenerativas, diabetes tipo 2 y obesidad** inducida por la dieta (revisado por Coleman *et al.*, 2013; van der Mark *et al.*, 2013), aunque falta mucho por conocer acerca de los mecanismos que conducen a las mismas (López-Marqués *et al.*, 2014). Por ejemplo, se han observado recientemente mutaciones en la P4-ATPasa ATP8A2 que conducen a la degeneración axonal, un fenotipo que se observa en numerosas enfermedades neurodegenerativas (Zhu *et al.*, 2012).

Además, desde hace tiempo se conoce que determinadas mutaciones en el gen que codifica para la ATP8B1, una P4-ATPasa humana localizada en la membrana de los canalículos de los hepatocitos (Eppens *et al.*, 2001), producen la **enfermedad de Byler** o **colestasis intrahepática familiar progresiva de tipo I** (PFIC1), y la relacionada, pero menos grave, **colestasis intrahepática recurrente benigna** (BRIC1) (Bull *et al.*, 1998). Se trata de enfermedades raras autosómicas recesivas caracterizadas por un defecto en la secreción de sales biliares que conduce a episodios de prurito intenso e ictericia. Los afectados suelen desarrollar muy pronto la enfermedad, resultando en cirrosis durante la primera década de vida (Klomp *et al.*, 2004).

Tabla 1. Alteraciones de P4-ATPasas asociadas a patologías en ratones y humanos

P4-ATPasa	Fisiopatología en ratones	Fisiopatología en humanos
ATP8A1	Problemas de aprendizaje, incremento de la actividad física	
ATP8A2	Enfermedad neurodegenerativa, degeneración axonal, retraso del crecimiento	Retraso mental, hipotonía, CAMRQ
ATP8B1	Colestasis intrahepática, pérdida auditiva	PFIC1, BRIC1
ATP8B3	Anomalías en la capacitación espermática	
ATP8B4		Enfermedad de Alzheimer
ATP10A	Resistencia a insulina, obesidad inducida por la dieta, hiperlipidemia, hiperinsulinemia	Diabetes tipo 2, resistencia a insulina en afroamericanos, obesidad inducida por la dieta
ATP10D	Obesidad inducida por la dieta, hiperinsulinemia, hiperglucemia	
ATP11A		Metástasis en cáncer colorrectal
ATP11C	Detención en el desarrollo de células B, distocia, anemia, carcinoma hepatocelular, hiperbilirrubinemia conjugada, hipercolanemia no conjugada	

CAMRQ, síndrome de ataxia cerebelosa, retraso mental y desequilibrio. Adaptada de van der Mark *et al.*, 2013.

I.3. Estructura de las P4-ATPasas

Las P4-ATPasas representan la subfamilia más amplia dentro de la superfamilia de **ATPasas tipo P** (Palmgren y Nissen, 2011). Los miembros de esta superfamilia son proteínas transportadoras de lípidos e iones que se encuentran ampliamente distribuidas tanto en organismos eucariotas como procariotas (Paulusma y Oude Elferink, 2005) y que actúan como bombas implicadas en procesos biológicos fundamentales como la generación del potencial de membrana, la contracción muscular o la eliminación de iones tóxicos de la célula (Kühlbrandt, 2004).

Las ATPasas de tipo P se clasifican en cinco familias, divididas a su vez en varias subfamilias, en función de su secuencia y de la especificidad del sustrato que transportan (Palmgren y Nissen, 2011; Coleman *et al.*, 2013). Las de tipo IA son bombas bacterianas de K^+ y las de tipo IB son bombas de metales pesados, como Cu^+ , Ag^+ , Zn^{2+} , Cd^{2+} o Pb^{2+} . Las ATPasas de tipo II y III son los miembros más estudiados. Entre las de tipo IIA se encuentra la Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarco-endoplasmático (SERCA), mientras que la bomba de Ca^{2+} de la membrana plasmática pertenece al grupo IIB. El grupo IIC incluye la H^+/K^+ -ATPasa y la Na^+/K^+ -ATPasa, que es la proteína que genera el potencial de membrana en células de mamíferos, mientras que el grupo IID está compuesto por Na^+ -ATPasas eucariotas. Las ATPasas del grupo IIIA son bombas de H^+ localizadas casi exclusivamente en la membrana plasmática de plantas, hongos y protozoos parásitos, encargadas de generar el potencial de membrana en estos organismos; en el grupo IIIB se encuentran pequeñas bombas de Mg^{2+} bacterianas. Se desconoce la especificidad de sustrato de las ATPasas de tipo V.

Las **ATPasas de tipo IV, P4-ATPasas o fosfolípido translocasas** son transportadores que, a diferencia de los transportadores ABC, son exclusivos de organismos eucariotas y siempre están constituidos por un único polipéptido (López-Marqués *et al.*, 2015). En el genoma humano existen 14 genes codificantes de P4-ATPasas, organizados en cinco subfamilias en función de la similitud de sus secuencias (Coleman *et al.*, 2013). Sin embargo, en ratones se han identificado 15 genes codificantes (Xu *et al.*, 2009; van der Mark *et al.*, 2013), mientras que en levaduras y *Leishmania* existen 5 de estos genes (www.genedb.org).

En los últimos años se ha logrado obtener la estructura cristalina de diversas ATPasas tipo P (Na^+/K^+ -ATPasa, H^+ -ATPasa, Cu^+ -ATPasa y SERCA), lo que ha resultado de gran importancia para conocer la estructura y el funcionamiento de estos transportadores. Aunque esto aún no ha sido posible para las P4-ATPasas (López-Marqués *et al.*, 2015), el análisis de su secuencia revela que presentan la estructura general típica de las ATPasas tipo P (Puts y Holthuis, 2009; Palmgren y Nissen, 2011). Son proteínas integrales de membrana en las que se distinguen cuatro dominios principales, denominados TM (transmembrana), P (fosforilación), N (unión a nucleótidos) y A (actuador). Estos tres últimos dominios, así como los extremos amino y carboxilo terminal, están localizados en el citoplasma, de tal modo que tan solo una pequeña parte de la proteína está expuesta al lumen de los orgánulos o al exterior de la célula (Fig. 4).

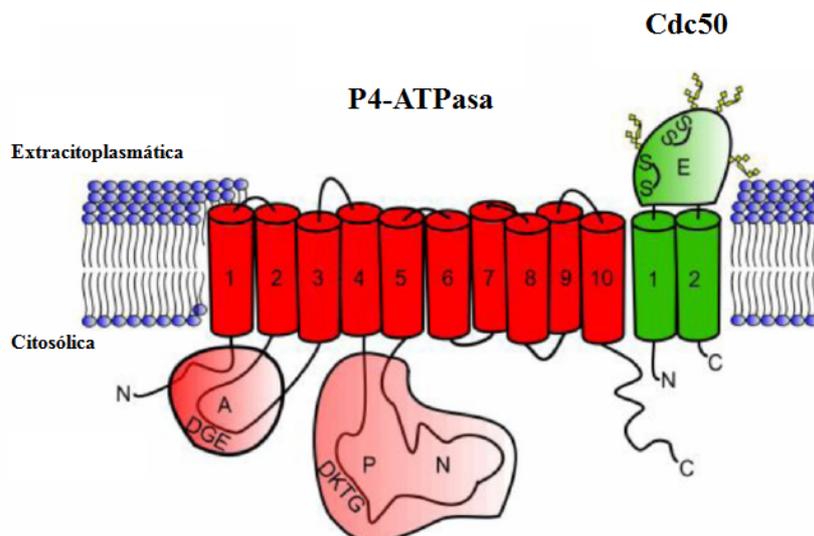


Figura 4. Dominios y organización estructural de una P4-ATPasa y su subunidad asociada Cdc50. Las P4-ATPasas y las proteínas Cdc50 son proteínas integrales de membrana cuyas regiones N- y C-terminales se encuentran dirigidas hacia el citoplasma. Las P4-ATPasas adoptan una estructura en la que se pueden distinguir cuatro dominios principales: A (actuador, con actividad fosfatasa), P (fosforilación), N (unión a nucleótidos) y TM (transmembrana; constituido por diez hélices). Se resaltan los motivos invariables donde se localizan el residuo de aspártico que es fosforilado durante el ciclo de reacción (DKTG) y el residuo de glutámico que cataliza la desfosforilación (DGE). La mayoría de las P4-ATPasas se encuentran asociadas a proteínas Cdc50, constituidas por dos segmentos transmembrana separados por un dominio exoplasmático (E) que se encuentra N-glicosilado y estabilizado por puentes disulfuro. Tomada de Coleman *et al.*, 2013.

El **dominio TM**, constituido por diez hélices transmembrana (TM1-TM10) y los cortos lazos que los conectan por fuera de la superficie de la membrana, es la región por donde tiene lugar la translocación de los fosfolípidos en las P4-ATPasas. Las distintas hélices TM presentan muy poca homología entre ellas. En la mayoría de las ATPasas tipo P, se cree que las hélices transmembrana TM1-TM6 constituyen el armazón donde se encuentra el lugar de unión de la molécula que es transportada, mientras que las hélices TM7-TM10 soportan este armazón y podrían facilitar las interacciones con la subunidad β asociada a algunos de estos transportadores. Muchas P4-ATPasas se asocian con las denominadas **proteínas Cdc50**, que se describirán con detalle más adelante en esta tesis doctoral; sin embargo, se desconoce qué dominios de las P4-ATPasas interaccionan con estas subunidades β .

Los otros tres dominios de las ATPasas tipo P son citosólicos. El **dominio N**, que contiene una secuencia motivo conservada que define el sitio de unión a nucleótidos, es el lugar donde se une e hidroliza el ATP. Contiene un residuo conservado de fenilalanina que interviene en interacciones hidrofóbicas con el anillo de adenosina del ATP. Estructuralmente, el dominio N es un fragmento largo insertado dentro del **dominio P**, que está localizado en el gran lazo citoplasmático situado entre los segmentos transmembrana TM4 y TM5, y constituye el centro catalítico de la enzima. La secuencia motivo invariable DKTG contiene el residuo de aspártico susceptible de ser reversiblemente fosforilado durante el ciclo de reacción. El dominio P contiene además los motivos conservados TGDN y GDGXND, implicados en la coordinación de Mg^{2+} , un ion que se requiere para que el ATP se una al sitio de fosforilación. Por

último, el **dominio A**, está formado por aminoácidos localizados en el extremo amino terminal y el lazo citoplasmático situado entre TM2 y TM3. Este dominio actúa como impulsor del transporte, ya que el residuo de glutámico presente en el motivo conservado TGE (DGE en las P4-ATPasas) es el responsable de catalizar la desfosforilación.

I.4. Mecanismo de acción de las P4-ATPasas

Las ATPasas de tipo P se distinguen de otras ATPasas, como las de tipo F, tipo V o los transportadores ABC, en que pasan por un estadio intermediario en el cual un residuo de aspártico queda covalentemente fosforilado durante el ciclo de transporte que llevan a cabo. De hecho, se denominan de tipo P en alusión a esta fosforilación. Durante el ciclo de reacción de las P4-ATPasas, al igual que sucede en el resto de ATPasas de tipo P (Bublitz *et al.*, 2011), se presentan cuatro conformaciones diferentes debidas a los movimientos de los dominios citosólicos A, N y P. Se piensa que una región flexible de la proteína acoplaría estos cambios conformacionales al dominio TM, facilitando la translocación del fosfolípido (Palmgren y Nissen, 2011) (Fig. 5). Los segmentos TM1-TM6 son más flexibles, mientras que los segmentos TM7-TM10 permanecen rígidos durante el ciclo de reacción (Coleman *et al.*, 2013).

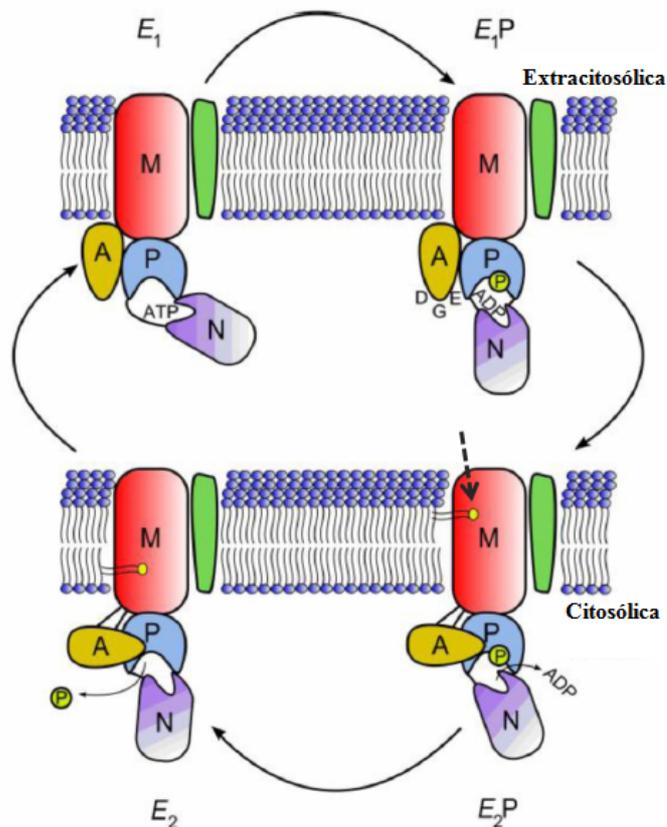


Figura 5. Ciclo de reacción de las P4-ATPasas.

Las P4-ATPasas pueden encontrarse en cuatro estados conformacionales diferentes. La unión del ATP al dominio N durante el estado E_1 conduce a la fosforilación del dominio P, generándose el estado E_1P . Durante la transición hacia el estado E_2P se produce la liberación del ADP y la rotación del dominio A (actuador), lo que permite que el fosfolípido que va a ser transportado (señalado con una flecha) se una a su sitio de alta afinidad, situado en el dominio M (transmembrana). La desfosforilación catalizada por el dominio A permite la translocación del fosfolípido. El estado resultante E_2 es inestable, por lo que la P4-ATPasa retorna a la conformación inicial E_1 . Se desconoce el papel de la subunidad asociada Cdc50 (señalada en verde) durante este ciclo. Para más detalles, consultar el texto. Tomada de Coleman *et al.*, 2013.

En el estado conformacional inicial E_1 se produce la unión del ATP al dominio N, que rápidamente fosforila el residuo de ácido aspártico invariable del dominio P (Coleman *et al.*, 2012), lo que conlleva un pequeño cambio conformacional que genera el estado E_1P . Al contrario de lo que sucede en muchas ATPasas de tipo P, para que se produzca esta fosforilación no se requiere la unión de la molécula que va a ser transportada. Una vez fosforilada, tiene lugar la transición del estado E_1P a E_2P , durante la cual se produce la liberación del ADP y la rotación del dominio A, lo que permite que en el estado E_2P los fosfolípidos puedan unirse hacia su sitio de alta afinidad, situado en el dominio M. Además, se introduce el motivo DGE del dominio A en el espacio que ocupaba el ADP, situándose cerca del residuo de ácido aspártico fosforilado (Palmgren y Nissen, 2011). El fosfolípido que va a ser transportado activa la desfosforilación de la P4-ATPasa (Coleman *et al.*, 2012; Jacquot *et al.*, 2012), catalizada mediante ataque nucleofílico del residuo de ácido glutámico del motivo DGE, lo que favorece su translocación. En la conformación E_2 resultante, el sitio extracitoplasmático de alta afinidad de los fosfolípidos se transforma en un sitio citoplasmático de baja afinidad, lo que favorece que la molécula transportada abandone la P4-ATPasa. La conformación E_2 es inestable, por lo que el dominio A se aleja del dominio P, produciéndose el regreso a la conformación inicial E_1 . Se desconoce el papel de las proteínas Cdc50 durante este ciclo de reacción (Coleman *et al.*, 2013), pero sí se sabe que su participación en el mismo es de vital importancia, especialmente en la transición del estado conformacional E_2P hacia el estado E_2 (Lenoir *et al.*, 2009; van der Mark *et al.*, 2013).

Aunque el mecanismo de acción de las P4-ATPasas está bien definido en cuestiones como la hidrólisis de ATP, la trayectoria que siguen los fosfolípidos durante su transporte es actualmente objeto de una intensa investigación (Williamson, 2014). Aún no se ha podido establecer con claridad el mecanismo por el cual las P4-ATPasas son capaces de transportar moléculas tan voluminosas como los fosfolípidos en lugar de pequeños iones como sucede en las demás ATPasas de tipo P (Fig. 6A). Este hecho se conoce como el "problema del sustrato gigante" (Baldrige y Graham, 2012; Stone y Williamson, 2012), ya que los fosfolípidos son diez veces más grandes que iones como Ca^{2+} o K^+ . Otras propiedades a tener en cuenta para explicar el transporte son el carácter anfipático de los fosfolípidos y la reorientación que debe producirse durante su translocación. En base a estudios mutacionales recientes, se han propuesto dos rutas mediante las cuales las P4-ATPasas podrían transportar este sustrato, que se han denominado ruta clásica o canónica, y ruta no clásica o no canónica (Fig. 6B y 6C). El hecho de que no haya sido posible todavía lograr la cristalización de ningún miembro de las P4-ATPasas, para poder elucidar con mayor claridad su estructura, implica que no se pueda descartar ninguna de las dos rutas, aparentemente opuestas. De hecho, cada vez existen más evidencias bioquímicas que hacen pensar que el mecanismo de transporte de las flipasas combina aspectos de ambos modelos (López-Marqués *et al.*, 2014 y 2015).

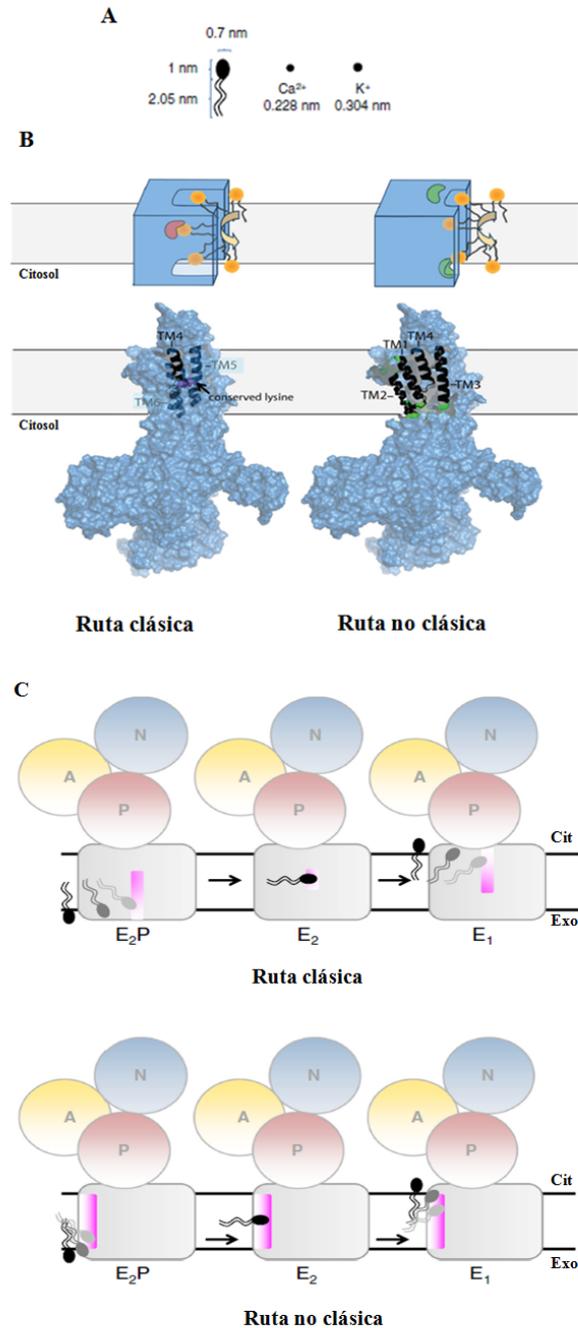


Figura 6. Mecanismos de acción propuestos para las P4-ATPasas.

(A) Tamaño relativo de algunos de los sustratos transportados por las ATPasas de tipo P. Las P4-ATPasas transportan fosfolípidos, de tamaño mucho mayor que los cationes transportados por otros miembros de esta superfamilia. (B) y (C) Representación esquemática de las dos rutas de transporte propuestas para las P4-ATPasas. En la ruta clásica, el fosfolípido entraría de forma análoga a como sucede en las P2-ATPasas y se alojaría en una cavidad central, momento en el que las puertas de entrada y de salida estarían cerradas. Tras ello, el reordenamiento de los segmentos transmembrana conduciría a la salida del fosfolípido a la otra cara de la membrana. En la ruta no clásica, existen unas puertas de entrada y salida que actúan secuencialmente a ambos lados de la membrana (representadas en verde en la figura B). La cabeza polar del fosfolípido interaccionaría con residuos de los segmentos transmembrana situados a lo largo de la superficie de la proteína. En ambos modelos, el reordenamiento y la posición relativa de los segmentos transmembrana resultan críticos para la unión y el transporte de los fosfolípidos, al igual que sucede en la Na⁺/K⁺ ATPasa, que se ha podido cristalizar en la conformación E₂P. Adaptada de López-Marqués *et al.*, 2014 y 2015.

Ruta clásica

Según este modelo, los fosfolípidos se transportarían a través del interior de las P4-ATPasas (Fig. 6B y 6C), al igual que sucede en las P2-ATPasas, familia que incluye los transportadores de cationes H^+/K^+ -ATPasa y Na^+/K^+ -ATPasa, mucho mejor caracterizados y de los que se han obtenido numerosas estructuras cristalinas (Bublitz *et al.*, 2011).

Las P2-ATPasas contienen residuos polares o con carga en la parte central de los transmembrana TM4, TM5 y TM6, que consituyen una pequeña cavidad que permite la unión del catión que va a ser transportado (Bublitz *et al.*, 2010). Además, todas las ATPasas de tipo P transportadoras de cationes contienen uno o más residuos de prolina en el TM4 que alteran la estructura de la hélice transmembrana, lo que contribuye a la formación de esta cavidad y permite que los átomos de oxígeno de los grupos carbonilo de la proteína participen en la coordinación del catión (Palmgren y Nissen, 2011).

Uno de estos residuos de prolina está conservado en el TM4 de todas las P4-ATPasas, por lo que podría desestabilizar la hélice transmembrana para crear una cavidad central en la que se podría producir la coordinación de grupos hidrofílicos como lo son las cabezas polares de los fosfolípidos (López-Marqués *et al.*, 2014 y 2015). Gran parte de los aminoácidos polares o con carga de los segmentos TM4-TM6 de las P2-ATPasas se han reemplazado en las P4-ATPasas por aminoácidos hidrofóbicos, que podrían interactuar con sustratos anfipáticos como los fosfolípidos (Paulusma y Olde Elferink, 2005). Sin embargo, las flipasas sí comparten con las P2-ATPasas la presencia de dos asparaginas en TM5 y TM6 que intervienen en la coordinación de iones.

Las P4-ATPasas carecen de los residuos de carácter ácido situados en los dominios TM4 y TM6 de las P2-ATPasas, los cuales participan en la neutralización de la carga del catión transportado (López-Marqués *et al.*, 2014). Además, un residuo situado en la zona media de TM5 que participa en la coordinación de cationes en las P2-ATPasas se ha sustituido por un residuo básico de lisina conservado en todas las P4-ATPasas (Coleman *et al.*, 2012). Una mutación en esta lisina tiene un gran impacto sobre la actividad de ATP8A2, una P4-ATPasa humana situada en los fotorreceptores. Estos descubrimientos han hecho pensar que las P4-ATPasas han evolucionado para poder alojar los fosfolípidos dentro de su estructura, sugiriéndose que esta lisina altamente conservada participaría en la neutralización de un grupo ácido, como es el caso del grupo fosfato de los fosfolípidos (Coleman *et al.*, 2012).

Sin embargo, las cavidades observadas en la estructura de las P2-ATPasas son demasiado pequeñas para poder alojar fosfolípidos. Por ello, debido al tamaño y estructura de los fosfolípidos, para que esta ruta clásica sea válida, las P4-ATPasas deberían poseer una considerable flexibilidad estructural, sobre todo para poder acomodar la cola lipídica cuando atraviesa la membrana. Esta flexibilidad se ha podido observar en las regiones transmembrana de otra ATPasa tipo P, la Ca^{++} -ATPasa del retículo sarco-endoplasmático (SERCA), que en algunos estados conformacionales es capaz de alojar la molécula de PE y las cadenas de ácidos grasos de los análogos de cadena larga de la tapsigargina (Obara *et al.*, 2005; Sohoel *et al.*, 2006; Winther *et al.*, 2010; Denmeade *et al.*, 2012; Baldrige *et al.*, 2013; revisado por López-Marqués *et al.*, 2015). Por otro lado, los aminoácidos responsables de la unión y el transporte de H^+ en las H^+ -ATPasas de la subfamilia P3A constituyen una cavidad de carácter hidrófilo lo

suficientemente grande como para alojar la cabeza polar de los fosfolípidos (Pedersen *et al.*, 2007; Stone y Williamson, 2012).

Ruta no clásica

El otro mecanismo propuesto para explicar el transporte de fosfolípidos mediado por las P4-ATPasas se ha denominado ruta no clásica o "modelo de la tarjeta de crédito" (van der Mark *et al.*, 2013), según el cual el transporte de fosfolípidos se produce en la interfase entre la membrana y la P4-ATPasa (Fig. 6B y 6C), lo que recuerda el paso de una tarjeta con banda magnética por su lector. Según este modelo, solo existiría interacción entre la cabeza hidrofílica de los fosfolípidos y determinados aminoácidos situados en la superficie de la flipasa a nivel del dominio transmembrana. Por su parte, las cadenas acílicas de los fosfolípidos permanecerían en el entorno de la bicapa lipídica durante el proceso de translocación (Pomorski y Menon, 2006; Baldrige y Graham, 2012).

Mediante experimentos basados en mutagénesis dirigida y construcción de proteínas quiméricas a partir de Drs2p y Dnf1p, se han podido identificar dos grupos de residuos que participan en la especificidad de sustrato de las P4-ATPasas de levaduras (Baldrige y Graham, 2012 y 2013). Uno de ellos se localiza en la cara exocitoplasmática de las hélices transmembrana TM1 y TM2 y se ha denominado "puerta de entrada", resultando ser importante en el reconocimiento de PS por Drs2p y de PC por Dnf1p. Sin embargo, algunos de estos residuos no están conservados en las P4-ATPasas humanas translocadoras de PS y PC (Naito *et al.*, 2015). El segundo grupo de residuos identificado por estos autores, denominado "puerta de salida", se localiza cerca de la cara citosólica de los segmentos TM3 y TM4 y participaría en la unión del fosfolípido antes o durante la transición E_2P-E_2 del ciclo de reacción, es decir, justo antes de ser liberado en la cara citosólica de la membrana (Baldrige y Graham, 2013; Baldrige *et al.*, 2013). Los residuos importantes para la selección del fosfolípido no se corresponden con los que constituyen la cavidad donde se une el sustrato en las P2-ATPasas; de hecho, en este amplio estudio mutacional no se identificó ningún residuo situado en el interior de las regiones transmembrana que pudiese estar implicado en estas funciones. La sustitución de la lisina altamente conservada de las P4-ATPasas redujo la actividad de Drs2p pero no alteró la especificidad de sustrato.

Mediante mutagénesis, modelado estructural por homología con SERCA y simulaciones de dinámica molecular se ha propuesto un mecanismo de translocación de fosfolípidos que también se adapta a la ruta no clásica, pero que presenta algunas diferencias y aporta nuevos datos (revisado por Hankins *et al.*, 2015). Se ha identificado un residuo conservado de isoleucina en el TM4 que formaría junto a sus residuos adyacentes una zona hidrofóbica que separaría las puertas de entrada y de salida y que además permitiría la formación de otras cavidades donde podría entrar el agua a ambos lados de la zona comprendida por los segmentos TM1, TM2, TM4 y TM6. Estas cavidades se formarían y desaparecerían durante la transición entre las conformaciones E_2P y E_2 (Vestergaard *et al.*, 2014). Esta isoleucina se corresponde en otras ATPasas tipo P con un residuo de glutamato al que se une el catión que es transportado (Vilsen y Andersen, 1998; Olesen *et al.*, 2007). En las P4-ATPasas, se situaría cerca de la cabeza polar del fosfolípido durante su transporte. El movimiento del segmento TM4, especialmente el de la isoleucina conservada, sería crucial para la transducción de la energía, el transporte y la liberación del fosfolípido en la cara citosólica de la

membrana. Las cavidades hidrofílicas protegerían la cabeza polar del fosfolípido y constituirían un canal por el que se movería el fosfolípido, mientras que sus colas hidrófobas se moverían libremente por el ambiente hidrofóbico del interior de la membrana (Vestergaard *et al.*, 2014).

I.5. Regulación de las P4-ATPasas

Existe un limitado conocimiento a nivel molecular de los mecanismos y de las interacciones requeridas en los diferentes procesos en los que intervienen las P4-ATPasas aunque, debido a su importancia fisiológica, es de esperar que estas proteínas estén sometidas a numerosos procesos de regulación (López-Marqués *et al.*, 2014). Por tanto, resulta probable que otras proteínas y factores lipídicos estén implicados en completar el ciclo de reacción llevado a cabo por el complejo constituido por las P4-ATPasas y las proteínas Cdc50 (van der Mark *et al.*, 2013).

Se ha descrito en algunas ATPasas tipo P que los extremos **N-y C-terminal** citosólicas pueden inhibir la actividad de la proteína, previniendo los cambios conformacionales que se requieren para el transporte de su sustrato, acción que llevan a cabo mediante una interacción de tipo intramolecular con otras partes de la proteína (Baekgaard *et al.*, 2005; Ekberg *et al.*, 2010). La interacción de determinadas proteínas con secuencias reguladoras presentes en estos extremos terminales de las ATPasas tipo P desencadena su activación (Palmgren y Nissen, 2011). Se cree que esta autoinhibición podría suceder también en las P4-ATPasas a causa de su extremo C-terminal ya que, cuando se elimina en Drs2p, se estimula su actividad ATPasa (Zhou *et al.*, 2013). El extremo C-terminal es el que menos similitud presenta entre las secuencias de las diferentes P4-ATPasas (Coleman *et al.*, 2013) y se ha sugerido que podría contener señales de localización específica para diferentes membranas celulares. Además, experimentos recientes indican que actúa en la regulación de la actividad de la proteína.

La proteína Drs2p de levaduras, una de las P4-ATPasas más estudiadas, está asociada con Cdc50p y participa en procesos de tráfico vesicular. Su actividad está regulada por la interacción con proteínas citosólicas como **Gea2p**, que es una proteína intercambiadora de guanina (ArfGEF), o por la acción de **Sac1**, una proteína con actividad fosfatidilinositol-4-fosfatasa. Los fosfoinosítidos, grupo de moléculas al que pertenece el fosfatidilinositol-4-fosfato (**PI4P**), son fosfolípidos que tienen gran importancia en la regulación del tráfico de membranas y de proteínas (revisado por Mayinger, 2012). Se ha observado que la unión de Gea2p y PI4P al extremo carboxilo terminal de Drs2p resultan esenciales para su actividad lipasa (Chantalat *et al.*, 2004; Natarajan *et al.*, 2009; Jacquot *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2013). Concretamente, la unión del PI4P estabiliza el complejo Drs2p-Cdc50p y activa la desfosforilación del estado E₂P (Jacquot *et al.*, 2012; Azouaoui *et al.*, 2014). Por otro lado, la interacción del extremo amino terminal de Drs2p con **Arl1p**, una pequeña GTPasa, también conduce a la estimulación de la actividad de la P4-ATPasa (Tsai *et al.*, 2013).

Drs2p además interacciona con otras proteínas implicadas en el metabolismo de fosfoinosítidos, con proteínas implicadas en la endocitosis dependiente de actina y clatrina, o con proteínas implicadas en la biosíntesis de ergosterol (Van der Velden *et al.*, 2010a; Puts *et al.*, 2010; López-Marqués *et al.*, 2014). Se han confirmado también interacciones proteína-proteína del complejo Drs2p-Cdc50p con proteínas de la

maquinaria del tráfico de vesículas, como las subunidades alfa y beta de la proteína adaptadora AP1 y Rcy1p, que está involucrada en el reciclaje de endosomas, así como con enzimas implicadas en la síntesis y metabolismo de inosítoles.

Se desconoce el orden y la regulación de las múltiples interacciones presentadas anteriormente, así como cuáles podrían ser sus consecuencias en procesos como la formación de vesículas. Del mismo modo, resta por saber las moléculas con las que interaccionan otras P4-ATPasas como Dnf1p, Dnf2p o las de otros organismos eucariotas (López-Marqués *et al.*, 2014).

En otro orden de cosas, el tráfico de glicerofosfolípidos mediado por las P4-ATPasas podría estar regulado por una cascada de protein quinazas, proteínas implicadas habitualmente en la regulación de las ATPasas de tipo P. En levaduras se ha observado *in vitro* que Dnf1p y Dnf2p pueden ser fosforiladas por la flipasa quinasa 1 (**Fpk1p**). Experimentos *in vivo* muestran que esta quinasa y su homóloga Fpk2p se necesitan para que existan unos niveles normales de transporte de fosfolípidos (Nakano *et al.*, 2008). A su vez, Fpk1p es fosforilada y regulada negativamente por la serin treonin quinasa Ypk1 (Roelants *et al.*, 2010). También se ha comprobado *in vitro* que Fpk1p fosforila a Drs2p y Dnf3p, aunque en menor grado. La restante P4-ATPasa de levaduras, Neo1p, que no parece participar en el transporte de fosfolípidos, no es fosforilada por esta quinasa. Pese a estos descubrimientos, aún falta por determinar la verdadera relevancia fisiológica de estas fosforilaciones. Aparte de Fpk1p, no se han descubierto otras quinazas capaces de interaccionar con las P4-ATPasas (López-Marqués *et al.*, 2014).

I.6. Proteínas Cdc50

Como se ha comentado con anterioridad, la mayoría de las P4-ATPasas actúan como heterodímeros mediante su asociación con una subunidad beta perteneciente a la familia de **proteínas Cdc50** (*cell-division-cycle protein 50*) (Saito *et al.*, 2004; van der Mark *et al.*, 2013; López-Marqués *et al.*, 2014). Su importancia se descubrió hace más de diez años, cuando se observó en levaduras que la proteína Lem3p/Ros3p está implicada en la translocación de glicerofosfolípidos y que los mutantes deficientes son resistentes a análogos de alquil-lisofosfolípidos como la miltefosina (Kato *et al.*, 2002; Hanson *et al.*, 2003).

Las proteínas Cdc50 son proteínas integrales de membrana exclusivas de eucariotas cuya estructura está ampliamente conservada desde humanos a levaduras, conteniendo dos segmentos transmembrana separados por un dominio exoplasmático relativamente grande, que se encuentra N-glicosilado y estabilizado por uno o más puentes disulfuro; su estructura se completa con dos secuencias dirigidas hacia el citoplasma en las regiones N- y C-terminales (Tanaka *et al.*, 2011; Coleman *et al.*, 2013) (Fig. 4).

Esta estructura es similar a la que surge al fusionar las **subunidades beta y gamma de las ATPasas tipo P pertenecientes a la subfamilia IIC**, la única que posee subunidades además de las P4-ATPasas, y que incluye la H⁺/K⁺-ATPasa y la Na⁺/K⁺-ATPasa (Fig. 7). Se considera que las proteínas Cdc50 son análogas de estas subunidades (Poulsen *et al.*, 2008b; Puts y Holthuis, 2009), puesto que la subunidad beta posee una pequeña cola citoplasmática, un dominio transmembrana y un gran

ectodominio glicosilado y con tres puentes disulfuro. Por su parte, la subunidad gamma de estas P2C-ATPasas pertenece a la familia de proteínas FXYPD y posee otro dominio transmembrana y unas prolongaciones muy cortas hacia el citoplasma y el lumen (López-Marqués *et al.*, 2014). A pesar de esto, no existe similitud entre las secuencias de las proteínas Cdc50 y estas subunidades de las P2C-ATPasas (Poulsen *et al.*, 2008b).

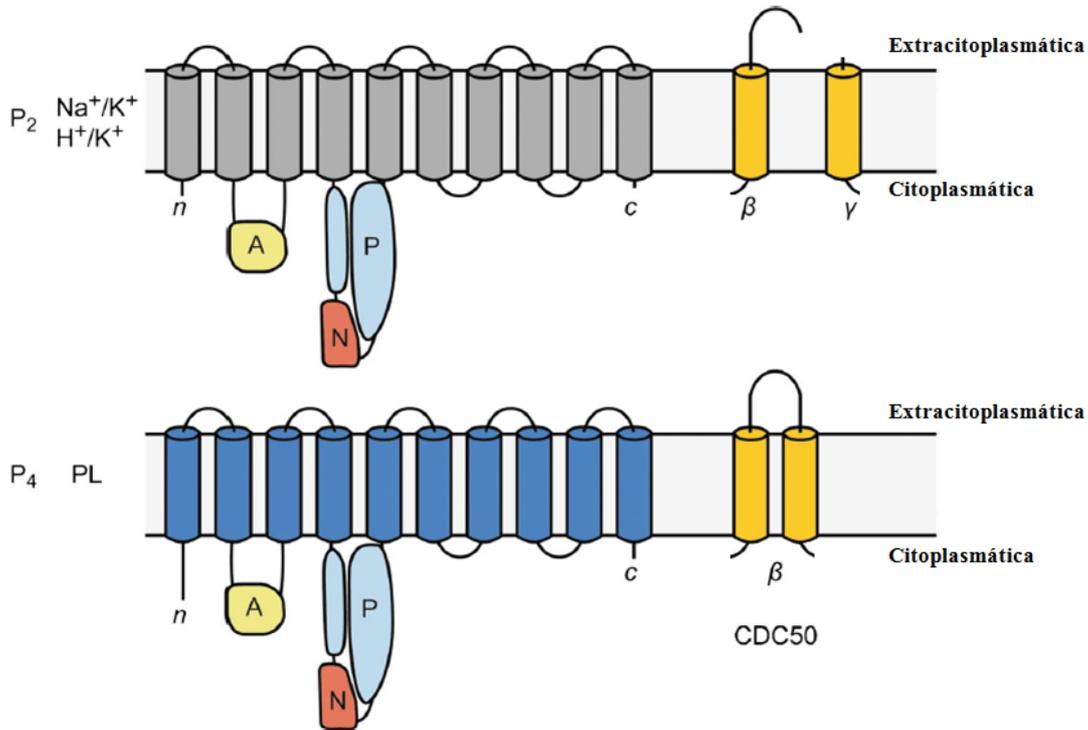


Figura 7. Topología de las P2- y P4-ATPasas con sus respectivas subunidades.

Se indican los dominios principales característicos de las ATPasas tipo P: A (actuador, con actividad fosfatasa), P (fosforilación) y N (unión a nucleótidos). PL, fosfolípidos. Adaptada de López-Marqués *et al.*, 2014.

Se han descrito proteínas Cdc50 en *Saccharomyces cerevisiae*, *Leishmania*, *Arabidopsis thaliana*, *Caenorhabditis elegans* y mamíferos (revisado por López-Marqués *et al.*, 2014). Existen 3 genes pertenecientes a la familia Cdc50 en el genoma humano (*CDC50A*, *CDC50B* y *CDC50C*) y en los de *S. cerevisiae* (*Cdc50p*, *Lem3p* y *Crf1p*), *Leishmania* (*LRos1*, *LRos2* y *LRos3*) y *C. elegans* (*CHAT-1*, *W03G11.2* y *F20C5.4*). En cambio, se han identificado cinco de estos genes en *A. thaliana* (*ALIS1*-*ALIS5*).

Pueden producirse interacciones de una proteína Cdc50 con más de una P4-ATPasa, algo lógico puesto que existen catorce o quince P4-ATPasas en mamíferos y solo tres proteínas Cdc50. Por ejemplo, las P4-ATPasas ATP8B1 (ATPasa, transportador de fosfolípidos, clase I, tipo 8B, miembro 1), ATP8B2, ATP8B4 y ATP8A1 pueden interaccionar con CDC50A y CDC50B, subunidades necesarias para el tráfico de esas ATPasas desde el retículo endoplasmático a la membrana plasmática (Bryde *et al.*, 2010; Van der Velden *et al.*, 2010b). CDC50A y CDC50B se expresan en numerosos tejidos, mientras que CDC50C lo hace sobre todo en los testículos y el cerebro (Folmer *et al.*, 2012).

En levaduras, cada subunidad se localiza en el mismo orgánulo que la fosfolípido translocasa a la que se asocia: Lem3p se asocia con Dnf1p y Dnf2p, Cdc50p con Drs2p, y Crf1p con Dnf3p, siendo Neo1p la única P4-ATPasa que no se ha encontrado asociada con ninguna subunidad β . En *Arabidopsis*, las P4-ATPasas ALA1, ALA2 y ALA3 presentan diferentes distribuciones celulares y pueden interactuar con tres proteínas Cdc50 (López-Marqués *et al.*, 2010 y 2012). Las interacciones descritas hasta la fecha de P4-ATPasas con proteínas Cdc50 pueden verse con más detalle en la Tabla 2.

Los antecedentes respecto a las proteínas Cdc50 de *Leishmania* están comentados en el apartado IV de la introducción de esta tesis doctoral.

Tabla 2. Características principales de los complejos P4-ATPasas/Cdc50 descritos

Organismo	P4-ATPasa	Cdc50	Localización	Sustratos	Papel biológico
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Drs2p	Cdc50p	Golgi, VS, endosoma	PS, PE	Formación de vesículas, polaridad celular
	Neo1p	-	Endosoma	-	Transporte vesicular
	Dnf1p	Lem3p	MP	PC, PE, (PS), LPC, LPE, LPS	Endocitosis, polaridad celular, captación de lisofosfolípidos, distribución de proteínas
	Dnf2p	Lem3p	MP	PC, PE, (PS), LPC, LPE	Endocitosis, captación de lisofosfolípidos, distribución de proteínas
	Dnf3p	Crf1p	Golgi, VS	PC, PE, (PS)	Transporte vesicular
Mamíferos	ATP8A1	CDC50 A/B	Golgi, VS	PS, (PE)	Migración celular
	ATP8A2	CDC50A	Golgi, disco	PS, PE	Formación de neuritas
	ATP8B1	CDC50 A/B	MP, MA	PC, (PS, PE)	Integridad de membranas
	ATP8B2	CDC50A /B	MP	PC	-
	ATP8B3	CDC50C	MP	PS	Formación del acrosoma y capacitación espermática
	ATP8B4	CDC50 A/B	MP	-	-
	ATP9A	No detectada	TGN, ET, MP	-	-
	ATP9B	No detectada	TGN	-	-
	ATP10A	CDC50A	MP	PC	-
	ATP10B	CDC50A	Vesículas	-	-
	ATP10D	CDC50A	MP	-	-
	ATP11A	CDC50A	MP, ET	PS, PE	-
	ATP11B	CDC50A	MP, ET	-	-
ATP11C	CDC50 A/B	MP	PS, PE	-	
<i>Leishmania donovani</i>	LdMT	LdRos3	MP	PC, PE, (PS)	-
<i>Caenorhabditis elegans</i>	TAT-1	CHAT-1	MP	PS	Endocitosis
	TAT-5	-	MP	PE	Transporte vesicular
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ALA1	ALIS 1/3/5	MP	(PS)	Tolerancia a la refrigeración
	ALA2	ALIS 1/3/5	CPV	PS	Transporte vesicular
	ALA3	ALIS 1/3/5	Golgi	PS, PE, PC	Transporte vesicular

CPV, compartimento prevacuolar; Disco, membrana del disco de los fotorreceptores; ET, endosomas tempranos; LPC, lisofosfatidilcolina; LPE, lisofosfatidiletanolamina; LPS, lisofosfatidilserina; MA, membrana apical; MP, membrana plasmática; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PS, fosfatidilserina; TGN, red del trans-Golgi; VS, vesícula secretora. Adaptada de López-Marqués *et al.*, 2014 y 2015, y actualizada con Takatsu *et al.*, 2014, Naito *et al.*, 2015 y Ansari *et al.*, 2015.

I.7. Funciones de las proteínas Cdc50

La función de las proteínas Cdc50 parece ser similar a la que poseen las subunidades beta y gamma de la Na^+/K^+ -ATPasa que, como se ha comentado previamente, se consideran análogas de las mismas (Fig. 7). Como se ha descrito en la Na^+/K^+ ATPasa (Geering, 2008), las proteínas Cdc50 actúan como chaperonas, puesto que su asociación con las P4-ATPasas es esencial para el correcto **plegamiento** del transportador, y para el **ensamblaje**, la **estabilidad**, la **salida del retículo endoplasmático** y la **llegada a su localización del complejo** que constituyen estas dos proteínas (Kato *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Pérez-Victoria *et al.*, 2006a; Furuta *et al.*, 2007; Paulusma *et al.*, 2008; Poulsen *et al.*, 2008a; Bryde *et al.*, 2010; Van der Velden *et al.*, 2010b; López-Marqués *et al.*, 2010 y 2012; Coleman y Molday, 2011; Naito *et al.*, 2015). Es interesante resaltar que existen P4-ATPasas que abandonan el retículo sin necesidad de asociarse a una proteína Cdc50, como Neo1p en levaduras, y las ortólogas ATP9A y ATP9B en mamíferos (Hua *et al.*, 2002; Takatsu *et al.*, 2011). Estas proteínas no forman un complejo estable con proteínas Cdc50, según se desprende de estudios de co-inmunoprecipitación, y además no existe evidencia de que estén implicadas en el transporte de fosfolípidos. Por ello, se cree que su actividad bioquímica es otra diferente y que, debido a esto, no necesitan asociarse con una proteína Cdc50.

Por otro lado, en la Na^+/K^+ -ATPasa existen señales de **localización celular** en la subunidad α y la subunidad β (Muth *et al.*, 1998; Vagin *et al.*, 2004). En levaduras se piensa que las proteínas Cdc50 también se necesitan para la adecuada localización de la P4-ATPasa (Saito *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Furuta *et al.*, 2007). Por ejemplo, Drs2p y su subunidad beta, Cdc50p, se localizan en la red del trans-Golgi, mientras que Dnf1p y Dnf2p, que interactúan con la misma subunidad beta (Lem3p), se encuentran en la membrana plasmática. Sin embargo, esta posible función no parece darse en organismos pluricelulares. En *Arabidopsis*, las P4-ATPasas ALA1, ALA2 y ALA3 pueden usar tres proteínas Cdc50 diferentes para abandonar el retículo endoplasmático. La localización celular del complejo depende de las P4-ATPasas puesto que, una vez que llegan a ella, las P4-ATPasas pueden aparecer unidas a cualquiera de las tres subunidades beta (López-Marqués *et al.*, 2010 y 2012). Del mismo modo, en humanos algunas P4-ATPasas pueden interactuar con más de una proteína Cdc50 diferente para salir del retículo (Bryde *et al.*, 2010), y la misma proteína Cdc50 puede interactuar con P4-ATPasas localizadas en orgánulos diferentes (Paulusma *et al.*, 2008).

Se han descrito otras posibles funciones para las proteínas Cdc50 una vez que el complejo formado con las P4-ATPasas ha llegado a su destino celular final. Por ejemplo, podrían participar en el correcto **anclaje y mantenimiento del complejo en la membrana**, una función que en la subunidad β de la Na^+/K^+ -ATPasa se ha asignado a los N-glicanos que posee (Vagin *et al.*, 2007).

En levaduras se pensaba que las proteínas Cdc50 podrían contribuir a la **especificidad de sustrato** en la actividad translocasa de fosfolípidos. Sin embargo, estudios recientes de co-inmunoprecipitación en plantas (López-Marqués *et al.*, 2010), y de mutagénesis dirigida y construcción de proteínas quiméricas en levaduras (Baldrige y Graham, 2012) han mostrado que la especificidad de sustrato depende exclusivamente de las P4-ATPasas (van der Mark *et al.*, 2013; López-Marqués *et al.*, 2015).

Además, hay que destacar que la asociación de las proteínas Cdc50 con las P4-ATPasas también se requiere para la **actividad catalítica** de algunos de estos transportadores de fosfolípidos (Lenoir *et al.*, 2009; Bryde *et al.*, 2010; Coleman y Molday, 2011; Takahashi *et al.*, 2011; Jacquot *et al.*, 2012). Determinadas P4-ATPasas humanas, de plantas y levaduras tienen que asociarse con miembros de la familia Cdc50 para que se pueda producir el ciclo de hidrólisis de ATP (Lenoir *et al.*, 2009; Paulusma y Elferink, 2010), pero se desconoce de qué manera contribuyen exactamente estas proteínas en la actividad de los transportadores. Se ha observado que la afinidad de la unión de Cdc50p con Drs2p fluctúa durante el ciclo de reacción de esta P4-ATPasa, siendo más alta en el estado conformacional E₂P (Lenoir *et al.*, 2009), en el que se cree que se produce la carga del fosfolípido en el complejo de translocación (Stone y Williamson, 2012). Esta asociación dinámica es de gran importancia para el ciclo de reacción, pero faltan por conocer con profundidad los determinantes estructurales que participan en ella (Puts *et al.*, 2012). Además, la fosforilación del residuo de aspartato catalíticamente importante de las P4-ATPasas Drs2p de levaduras y ATP8B1 y ATP8B2 de humanos depende de la presencia de una proteína Cdc50 (Lenoir *et al.*, 2009; Bryde *et al.*, 2010; Sebastian *et al.*, 2012). Sin embargo, se desconoce si el papel de esta subunidad está relacionado con la regulación de la actividad de la bomba o si forma parte de la maquinaria de translocación de fosfolípidos. Se ha descrito en *Arabidopsis* que las proteínas Cdc50 inducen una ganancia funcional en lo que respecta a la actividad translocasa de fosfolípidos (López-Marqués *et al.*, 2010), pero se desconoce si todas las P4-ATPasas necesitan de la unión a una proteína Cdc50 para llevar a cabo esta actividad (López-Marqués *et al.*, 2014).

Se ha descrito en algunas ATPasas de tipo P que las interacciones con las subunidades β y γ suponen importantes cambios en la cinética de translocación de iones (Toyoshima *et al.*, 2011). Por ejemplo, las proteínas FXYD modulan la cinética y la afinidad por los iones Na⁺ y K⁺ de la Na⁺/K⁺ ATPasa, dependiendo del tejido y las condiciones ambientales (Béguin *et al.*, 1997; Dempksi *et al.*, 2005; Gerring, 2008). En relación con las proteínas Cdc50, se ha observado que el dominio N-terminal de CDC50A modula la cinética de ATP8A2 (Coleman y Molday, 2011). Como sucede en las P2C-ATPasas (Dürr *et al.*, 2009; Shinoda *et al.*, 2009), las proteínas Cdc50 podrían ser necesarias para la estabilización de las P4-ATPasas en algunos de los estados conformacionales que se producen durante la catálisis (Stone y Williamson, 2012; López-Marqués *et al.*, 2015). Por ejemplo, el dominio N-terminal de la subunidad β de la H⁺/K⁺ ATPasa está situado en contacto directo con el dominio P de fosforilación de esta enzima y estabiliza el estado E₂P (Abe *et al.*, 2009).

I.8. Caracterización de las proteínas Cdc50

La caracterización de las proteínas Cdc50, que carecen de motivos aminoacídicos funcionales conocidos (Misu *et al.*, 2003), se encuentra todavía en una etapa inicial. Son pocos los estudios moleculares realizados sobre los residuos implicados en las funciones de estas proteínas, por lo que se tiene un conocimiento muy escaso sobre los residuos que son esenciales para la actividad de transporte e interacción con las P4-ATPasas.

El primer estudio se realizó mediante **mutagénesis aleatoria** y trató sobre el efecto que ejercen diversas mutaciones de Lem3p en levaduras (Noji *et al.*, 2006). Confirieron un fenotipo de reducción del crecimiento al expresarse en cepas delecionadas de

Cdc50p, pero no influyeron sobre su función como chaperona ni sobre la actividad translocasa de fosfolípidos realizada por la P4-ATPasa Dnf1p. Posteriores estudios de mutagénesis aleatoria en levaduras han mostrado que existen residuos conservados y no conservados dispersos a lo largo de las proteínas Lem3p y Cdc50p que contribuyen a formar el complejo heteromérico con sus P4-ATPasas correspondientes (Takahashi *et al.*, 2011; Puts *et al.*, 2012).

En otro trabajo en el que se analizó el complejo ATP8A2-CDC50A de mamíferos se observó, mediante **mutagénesis dirigida**, que la glicosilación de CDC50A es necesaria para que este complejo se exprese de manera estable, pero no para su funcionalidad (Coleman y Molday, 2011). Además, en levaduras se han identificado dos puentes disulfuro altamente conservados situados en el dominio exoplasmático que son importantes para la estabilidad, la funcionalidad y la afinidad de las proteínas Cdc50 (Puts *et al.*, 2012). Al eliminar el puente disulfuro más cercano al extremo N-terminal se produjo una gran disminución en la afinidad de la proteína Cdc50 por la P4-ATPasa, aunque su efecto en la translocación de fosfolípidos fue débil. Por el contrario, al eliminar el otro puente disulfuro se redujo considerablemente la actividad flipasa sin que el efecto sobre la afinidad por la P4-ATPasa fuese tan marcado.

En otro orden de cosas, el análisis de la estructura cristalina de la Na⁺/K⁺-ATPasa ha permitido observar que los segmentos transmembrana de su subunidad beta interactúan con las hélices TM1 y TM7 del transportador. Además, se producen amplios contactos entre el dominio extracelular de esta subunidad y los lazos de la subunidad catalítica situados entre los TM5 y TM6 y entre los TM7 y TM8 (Morth *et al.*, 2007; Shinoda *et al.*, 2009; Toyoshima *et al.*, 2011). Se cree que las proteínas Cdc50 podrían interactuar de manera similar con las P4-ATPasas, a tenor de los resultados obtenidos en algunos estudios recientes basados en el **intercambio de dominios** entre distintos miembros de la familia. Por ejemplo, en levaduras se cree que la especificidad y funcionalidad de la interacción entre las dos proteínas está asociada con una conformación precisa del lazo extracitoplasmático de las proteínas Cdc50, y no con una región concreta de este dominio (Puts *et al.*, 2012). Además, se ha observado que, para que las P4-ATPasas sean funcionales, no es suficiente su unión al lazo extracitoplasmático, sino que también se requiere la unión al dominio citosólico N-terminal y al primer segmento transmembrana, o al segundo segmento transmembrana y al dominio citosólico C-terminal de la correspondiente proteína Cdc50. De forma similar, en el trabajo realizado con el complejo ATP8A2-CDC50A de mamíferos se construyeron proteínas quimera en las que se intercambiaron dominios de CDC50A y CDC50B, observándose que los segmentos transmembrana y exocitoplasmáticos son necesarios para generar un complejo funcional, mientras que el dominio citoplasmático N-terminal parece desempeñar un papel directo durante el ciclo de reacción (Coleman y Molday, 2011).

II. LEISHMANIASIS

II.1. Leishmaniasis: Epidemiología

La leishmaniasis es el conjunto de manifestaciones clínicas causadas por los parásitos protozoarios intracelulares obligados del género *Leishmania*. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que existen unos 12 millones de personas afectadas en todo el mundo (OMS, 2015a), tratándose de la segunda enfermedad protozoaria humana más importante, tan solo por detrás de la malaria. Constituye un importante problema de salud pública en numerosos países tropicales y subtropicales, a pesar de lo cual está catalogada como una enfermedad olvidada.

La leishmaniasis presenta una amplia diversidad clínica y epidemiológica. En los últimos años se han registrado casos de transmisión endémica en un total de 98 países, distribuidos entre América, Europa, Asia y África, encontrándose la mayoría de ellos en vías de desarrollo (Alvar *et al.*, 2012). La forma más grave de la enfermedad es la **leishmaniasis visceral (LV)**, que puede provocar una muerte inminente si no se trata. Se estima que cada año se producen entre 200.000 y 400.000 casos nuevos de esta enfermedad, siendo responsable de entre 20.000 y 30.000 muertes anuales en todo el mundo (OMS, 2015b).

Leishmania donovani es el principal causante de la LV en la India y este de África, mientras que *Leishmania infantum/chagasi* lo es en la cuenca mediterránea, China y en Latinoamérica. Esta enfermedad es endémica en muchos países, principalmente del subcontinente indio y del Este de África (Fig. 8). Existen 310 millones de personas con riesgo de contraer LV en los seis países en los que se concentran más del 90% de los casos nuevos de esta enfermedad: India, Bangladesh, Sudán, Sudán del Sur, Brasil y Etiopía. El 50% de todos los casos de LV a nivel mundial se presentan en el estado de Bihar, situado al noreste de la India (Alvar *et al.*, 2012; OMS, 2015b).

La **leishmaniasis cutánea (LC)** está distribuida de manera más amplia (Fig. 8), aunque alrededor del 95% de casos se producen en América, la región mediterránea, Oriente Medio y Asia Central. Dos terceras partes de los nuevos casos registrados a nivel mundial se concentran en seis países: Afganistán, Argelia, Colombia, Brasil, Irán y Siria. Se cuentan de manera oficial unos 200.000 casos al año, pero muchos países no registran datos de esta enfermedad, por lo que se estima que, en realidad, cada año se producen entre 700.000 y 1.300.000 casos nuevos (Alvar *et al.*, 2012; OMS, 2015b). Otra forma de la enfermedad es la **leishmaniasis mucocutánea (LMC)**, de la que casi el 90% de casos tiene lugar en Bolivia, Brasil y Perú (OMS, 2015a).

La leishmaniasis está muy ligada a la pobreza, puesto que la mayoría de casos se producen en países en vías de desarrollo, que cuentan con pocos recursos para el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad (OMS, 2015a). Además, muchos pacientes viven en áreas remotas y apenas reciben atención médica. Para complicar la situación, en determinadas zonas los pacientes tienden a permanecer escondidos por la carga psicosocial que suponen las deformidades y las marcas desfigurantes características de la enfermedad (OMS, 2013a).

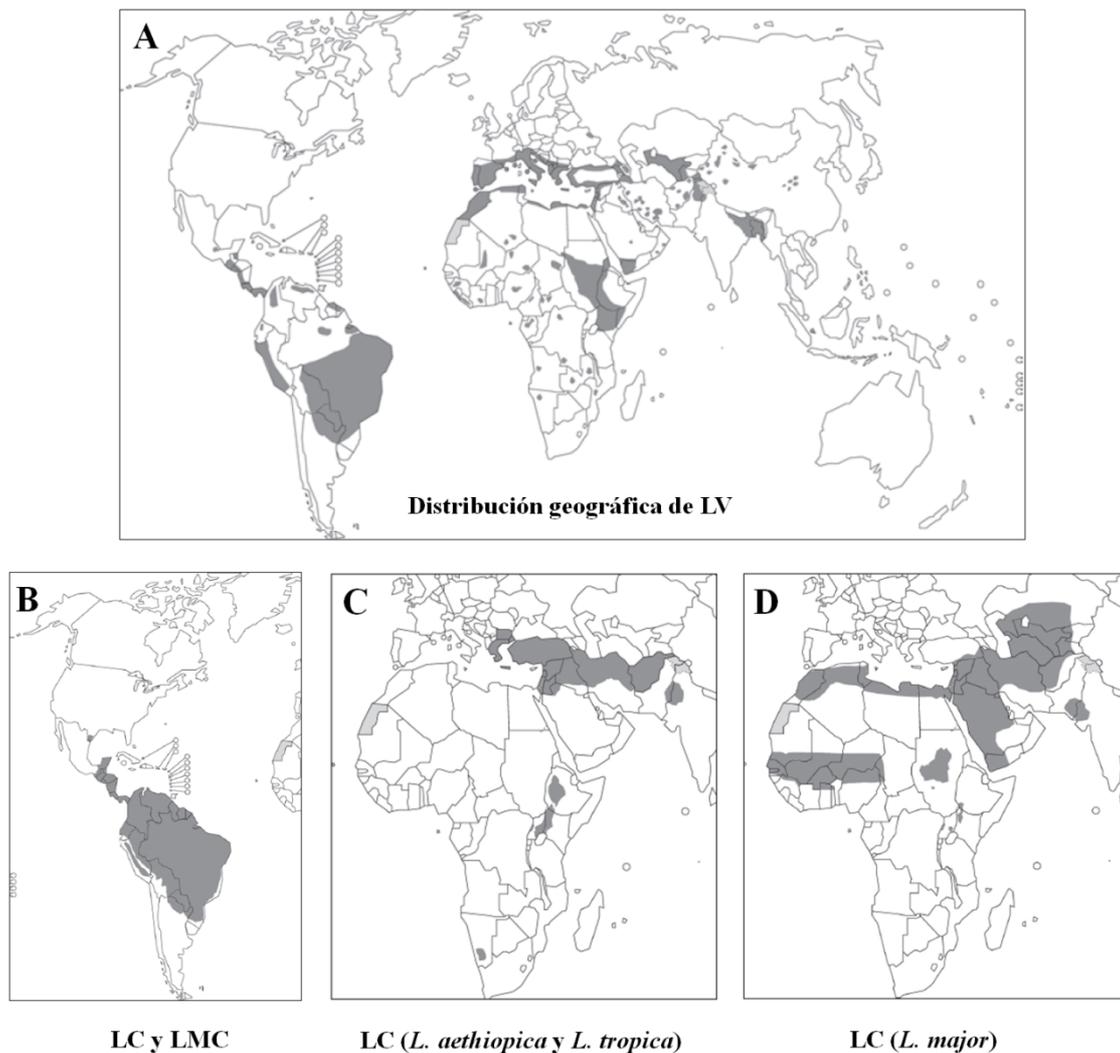


Figura 8. Distribución geográfica de la leishmaniasis.

(A) LV, (B) LC y LMC en el Nuevo Mundo, (C) LC debida a *Leishmania tropica* y *Leishmania aethiops* en el Viejo Mundo y (D) LC debida a *Leishmania major* en el Viejo Mundo. Las zonas en gris representan las zonas endémicas para leishmaniasis. Adaptada de OMS, 2010.

En la actualidad, la LV sigue constituyendo un grave problema sanitario a escala mundial, debido entre otras causas a su asociación con pacientes infectados por el VIH. El riesgo de contraer la enfermedad aumenta entre 100 y 2.320 veces en estos pacientes inmunodeprimidos, resultando además más difícil lograr una respuesta terapéutica adecuada y aumentando la posibilidad de recaídas (Alvar *et al.*, 2008; Sundar y Chakravarty, 2015a). Generalmente la enfermedad aparece tras la reactivación de infecciones subclínicas, pero también cabe la posibilidad de que se transmita por el intercambio de jeringuillas infectadas entre drogodependientes (Cruz *et al.*, 2002). Hasta 2012, un total de 35 países habían registrado casos de coinfección con VIH y leishmaniasis (OMS, 2013a). En la región mediterránea, este hecho fue un problema emergente durante los años 1990, pero la introducción en 1997 de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) ha contribuido a reducir de manera notable el número de casos (Alvar *et al.*, 2008; Monge-Maillo *et al.*, 2014). Sin embargo, en los países que apenas tienen acceso a este tratamiento, la prevalencia de esta coinfección está aumentando, como sucede en el norte de Etiopía (Alvar *et al.*, 2008; OMS, 2013a).

El perro es el principal reservorio de *L. infantum* y *L. chagasi*, desempeñando un papel central en el ciclo de transmisión a los humanos a través de los flebotomos. La **leishmaniasis canina** es una zoonosis con gran importancia en veterinaria, que puede causar la muerte del animal y que tiene una amplia prevalencia y distribución en Europa, Asia, África y América (Alvar *et al.*, 2004). Concretamente, en Europa se ha estimado que podría haber 2,5 millones de perros infectados, un 16,7% del total de perros existentes (Moreno y Alvar, 2002). Aunque la incidencia de la leishmaniasis en humanos en nuestro continente es muy baja, una alta prevalencia de infección canina supone un mayor riesgo de que las personas padezcan la enfermedad. El tratamiento de la leishmaniasis canina reduce la carga parasitaria y hace que la mayoría de perros mejoren o aparenten superar la enfermedad. Sin embargo, es extremadamente difícil eliminar por completo los parásitos y lograr así la cura parasitológica (Baneth y Shaw, 2002; Noli y Auxilia, 2005; Manna *et al.*, 2008; Paradies *et al.*, 2010). Debido a esto, existen numerosos perros con una infección latente, contribuyendo a la persistencia de los parásitos en las regiones endémicas.

II.2. Situación de la leishmaniasis en España

La LV y LC en España está causada por la especie *L. infantum* y es transmitida por flebotomos de las especies *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi*. Se trata de una enfermedad de declaración obligatoria en aquellas Comunidades Autónomas que consideran la leishmaniasis como endémica. Esto es así en la mayor parte del territorio peninsular y en las Islas Baleares (Suárez-Rodríguez *et al.*, 2012).

En el periodo comprendido entre 1996 y 2011, la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica (RENAVE) detectó 1.755 casos de leishmaniasis, con una incidencia media anual de 0,45 casos/100.000 hab. Las Comunidades Autónomas con mayor número de casos son Madrid, Baleares, Comunidad Valenciana, Andalucía y Cataluña (Suárez-Rodríguez *et al.*, 2012) (Fig. 9). En los últimos años, la incidencia de la leishmaniasis ha aumentado sustancialmente a raíz de un brote epidémico acontecido en el suroeste de la Comunidad de Madrid, donde se registraron 22,2 casos por 100.000 habitantes entre 2009 y 2012. El 35,9% de los pacientes afectados por este brote presentaron LV mientras que el 64,1% restante presentaron LC (Arce *et al.*, 2013).



Figura 9. Tasa de hospitalización por leishmaniasis en España (1997-2008). Los datos se refieren al número de hospitalizaciones por cada 100.000 habitantes. Tomada de Gil-Prieto *et al.*, 2011.

Los niños menores de cinco años y las personas inmunodeprimidas son los dos grupos de población en los que se presentan más casos de leishmaniasis en nuestro país (Suárez-Rodríguez *et al.*, 2012). Según un estudio realizado entre 1997 y 2008, un tercio de los afectados por leishmaniasis presentaba coinfección con VIH. La tasa de mortalidad durante ese periodo fue del 3,31%, mientras que el impacto económico de la enfermedad fue de más de 13 millones de euros (6.740 € por paciente) (Gil-Prieto *et al.*, 2011). La mayoría de casos registrados son de LV; tan solo un 2% de los enfermos por leishmaniasis entre 1989 y 2008 presentaron LC, aunque el número real de casos podría ser tres veces mayor (Alvar *et al.*, 2012).

La prevalencia de leishmaniasis canina en España es bastante elevada, aunque también se observan importantes diferencias entre regiones (Alvar *et al.*, 2012). Desde mediados de los años 1980, se han llevado a cabo numerosos estudios epidemiológicos en este sentido, obteniéndose en muchos de ellos elevados porcentajes de perros seropositivos, si bien muchos de ellos no presentan las manifestaciones clínicas de la enfermedad (Miró *et al.*, 2007; Morales-Yuste *et al.*, 2011). Por ejemplo, uno de los porcentajes más elevados se encontró en la comarca de la Axarquía (Málaga), donde la prevalencia se situó en el 34,6 % (Morillas *et al.*, 1996). También hay valores elevados en la Alpujarra granadina, donde se ha observado una seroprevalencia de hasta el 20,1% (Martín-Sánchez *et al.*, 2009). En el brote epidémico existente en la actualidad en la Comunidad de Madrid se comprobó que la prevalencia en perros no había aumentado (Arce *et al.*, 2013). En cambio, se observó por primera vez que la liebre podría actuar como reservorio de la leishmaniasis (Molina *et al.*, 2012; Miró *et al.*, 2014).

II.3. Manifestaciones clínicas

La leishmaniasis en humanos está causada por múltiples especies de *Leishmania*, específicas de varias áreas geográficas y que pueden dar como resultado diversas manifestaciones clínicas. Éstas dependen principalmente de la especie de *Leishmania*, pero también del estado inmunológico y de determinadas características genéticas del hospedador (revisado por Alexander *et al.*, 1999).

Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis se pueden agrupar en tres grandes grupos: LV, LC y LMC (revisado por Pace, 2014):

La **LV** o **kala-azar** (término que significa "fiebre negra" en hindi) es la forma más grave de la leishmaniasis. Sus agentes causales típicos son las especies pertenecientes al complejo de *L. donovani*: *L. infantum* y *L. chagasi* en la cuenca mediterránea, Asia Central y América del Sur, y *L. donovani* en la India, este de Asia y África. Esta forma de la enfermedad se caracteriza por una infección diseminada del sistema retículo-endotelial, afectando a órganos como el bazo, el hígado y la médula ósea, cuyo desenlace es fatal en ausencia de tratamiento. Las manifestaciones clínicas incluyen fiebre prolongada, espasmos irregulares, caquexia, pancitopenia, anemia progresiva, hipergammaglobulinemia, hepatoesplenomegalia, y aumento de los nódulos linfáticos y amígdalas (OMS, 2010) (Fig.10A). Después del tratamiento y la curación aparente de la enfermedad, se pueden producir una serie de complicaciones a nivel cutáneo, con nódulos endurecidos y máculas despigmentadas, que reciben el nombre de **leishmaniasis dérmica post kala-azar** (PKDL) (Fig. 10B), que pueden desaparecer con tratamiento sin mucha dificultad (Zijlstra *et al.*, 2003; OMS, 2010).

A pesar de su gravedad, conviene destacar que, en individuos inmunocompetentes, la mayoría de las infecciones viscerales son asintomáticas, con desarrollo de respuesta inmune protectora (Riera *et al.*, 2008).



Figura 10. Manifestaciones clínicas de la LV (A), PKDL (B), LC (C) y LMC (D). Fotografías tomadas de OMS, 2015a.

La LC o **botón de Oriente** es la forma más común de la enfermedad, aunque también la de menor gravedad. Está causada por *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. donovani* y *L. infantum* en el Viejo Mundo (sur de Europa, África, Asia Central y Oriente Medio), y por numerosas especies del subgénero *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. chagasi*, *L. mexicana*, *L. venezuelensis*) y del subgénero *Viannia* (*L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. peruviana*) en el Nuevo Mundo (México y América Latina) (Sundar y Chakravarty, 2015a). Las manifestaciones clínicas dependen de la región, la especie causante, el estado inmunológico y, quizás también, de respuestas de los pacientes determinadas genéticamente (Reithinger *et al.*, 2007). Entre estas manifestaciones, destaca la aparición de úlceras de tamaño variable en la piel, con una costra con un borde de color morado y aspecto escamoso (Fig. 10C). En ocasiones, estas úlceras se localizan en el lugar de la inoculación y suelen desaparecer de forma espontánea en un periodo comprendido entre dos meses y un año. Sin embargo, otras

veces aparecen numerosas lesiones nodulares diseminadas por todo el cuerpo, similares a las que produce la lepra. Estas lesiones tienden a confluir, lo que favorece su extensión. Se habla entonces de **leishmaniasis cutánea difusa**, compleja de tratar y que suele dejar cicatrices.

La **LMC** o **espundia** aparece a partir de la infección cutánea inicial causada por *L. braziliensis* o *L. panamensis* en el Nuevo Mundo (OMS, 2010; Sundar y Chakravarty, 2015a). En un principio, la lesión aparece en el lugar de la inoculación. Sin embargo, pasados unos meses, en el 20-50% de los pacientes los parásitos se diseminan a la boca y nasofaringe, originando lesiones granulomatosas hemorrágicas que provocan la destrucción de sus mucosas y la degeneración de los tejidos cartilagosos, lo que conlleva una desfiguración del rostro (Fig. 10D). *L. mexicana* también puede afectar al oído, provocando la pérdida del pabellón auditivo.

II.4. Transmisión de la leishmaniasis

La leishmaniasis se transmite por la picadura de insectos vectores hembra, pertenecientes a los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomya* en el Nuevo Mundo (OMS, 2010). Estos insectos, denominados comúnmente como **flebotomos**, poseen el tórax arqueado, alas lanceoladas, patas largas y un abdomen tubular largo (Bañuls *et al.*, 2007) (Fig. 11).

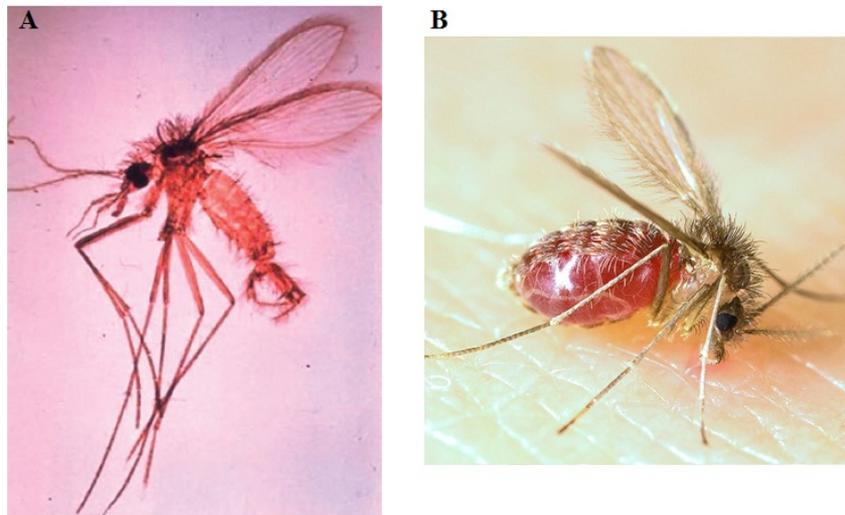


Figura 11. Insectos vectores de la leishmaniasis. (A) *Phlebotomus papatasi*. (B) *Lutzomya longipalpis*. Fotografías tomadas de Bañuls *et al.*, 2007 y PLoS Pathog 5(8): ev05.i08.

Los flebotomos se distribuyen en numerosos hábitats, pudiéndose encontrar tanto en bosques lluviosos como en regiones extremadamente secas, y desde el nivel del mar hasta los 1.500 metros de altitud. Viven en ambientes oscuros y tienen actividad crepuscular. Solo las hembras son hematófagas, necesitando sangre para la maduración de los huevos (Davies *et al.*, 2000; Bañuls *et al.*, 2007).

Normalmente la leishmaniasis es una enfermedad zoonótica puesto que se transmite al hombre a través de animales. El perro es el reservorio principal, pero se ha descrito la

existencia de otros mamíferos que también pueden actuar como reservorio, como el lobo, el zorro, la liebre, el gato, las ratas o el puercoespín (Maia y Campino, 2011; Molina *et al.*, 2012; Miró *et al.*, 2014). Sin embargo, en zonas donde la incidencia de la leishmaniasis es muy alta, como el subcontinente Indio y el este de África, la leishmaniasis se puede considerar una antroponosis puesto que es frecuente que los vectores transmitan la enfermedad entre seres humanos, habiéndose descrito epidemias de LV (Singh *et al.*, 2006) y de LC (Faulde *et al.*, 2008).

Otras formas de transmisión de la leishmaniasis mucho menos frecuentes son la transmisión congénita, la transmisión parenteral mediante transfusión de sangre o por jeringuillas compartidas entre drogodependientes, o el accidente en laboratorios de investigación (Herwaldt, 2001; Cruz *et al.*, 2002; Mansueto *et al.*, 2014a).

II.5. Leishmania: Taxonomía

Leishmania, llamada así en honor del escocés William Boog Leishman (1865-1926), uno de los descubridores del parásito, es un protozoo perteneciente a la familia *Trypanosomatidae*, orden *Kinetoplastida*, clase *Zoomastigophorea*, filo *Sarcomastigophora*.

El orden *Kinetoplastida* está constituido por un heterogéneo grupo de protozoos con un tamaño entre 5 y 89 μm , que poseen uno o dos flagelos en algún estado de su ciclo biológico. Una característica notable de su estructura es la presencia de una única mitocondria que contiene grandes cantidades de DNA empaquetado en el denominado kinetoplasto. Los miembros de la familia *Trypanosomatidae* son exclusivamente parásitos y se caracterizan por tener un único flagelo. Dentro de ella, además de *Leishmania*, destaca la presencia del género *Trypanosoma*, que incluye las especies causantes de la Enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana (*T. cruzi*) y la Enfermedad del Sueño o tripanosomiasis africana (*T. brucei*). El género *Leishmania* se divide en dos subgéneros según su desarrollo en el intestino de los flebotomos: *Leishmania* (intestino medio o anterior) y *Viannia* (intestino posterior, medio y anterior). Se han descrito alrededor de 20 especies patógenas para el hombre (OMS, 2010) clasificadas en base a hallazgos clínicos, serológicos, inmunopatológicos, epidemiológicos y geográficos. Con el empleo de diversos marcadores moleculares como la proteína de 70 kDa heat-shock-protein (*hsp70*) y *hsp20* se ha obtenido una clasificación filogenética molecular más precisa (Fraga *et al.* 2010; Fraga *et al.* 2013). Dichos estudios proponen agrupar las distintas especies o complejos de *Leishmania* de la siguiente forma: 1) **Subgénero *Leishmania*** que incluye a *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. mexicana* y *L. donovani*. En el complejo *L. donovani* se incluyen dos especies: *L. donovani* idéntica a *L. archibaldi* y *L. infantum* indistinguible de *L. chagasi*, y 2) **Subgénero *Viannia*** con *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. guyanensis* y *L. braziliensis*.

II.6. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *Leishmania* es digenético, con dos estadios claramente diferenciados:

El **promastigote** es extracelular, alargado y de aproximadamente 20 μm de longitud. Posee un núcleo central y un kinetoplasto terminal o subterminal en la parte anterior, del cual se origina un flagelo con un tamaño aproximado al del cuerpo del parásito (Fig. 12A). Este estadio reside en el tracto digestivo del insecto vector (hospedador invertebrado) en un ambiente hidrolítico, con pH neutro y una media de temperatura de 28°C.

Por su parte, el **amastigote** es intracelular, ovalado o redondeado, y con un tamaño de 2-5 μm . Cerca de su núcleo central está situado el kinetoplasto, en forma de barra asociada a un rudimento de flagelo que no sobresale del cuerpo del parásito (Fig. 12B). Reside en el interior de los macrófagos del hospedador vertebrado, donde hay un ambiente hidrolítico, con pH ácido (4,5-5,5), una temperatura cercana a los 37°C y numerosas especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS).

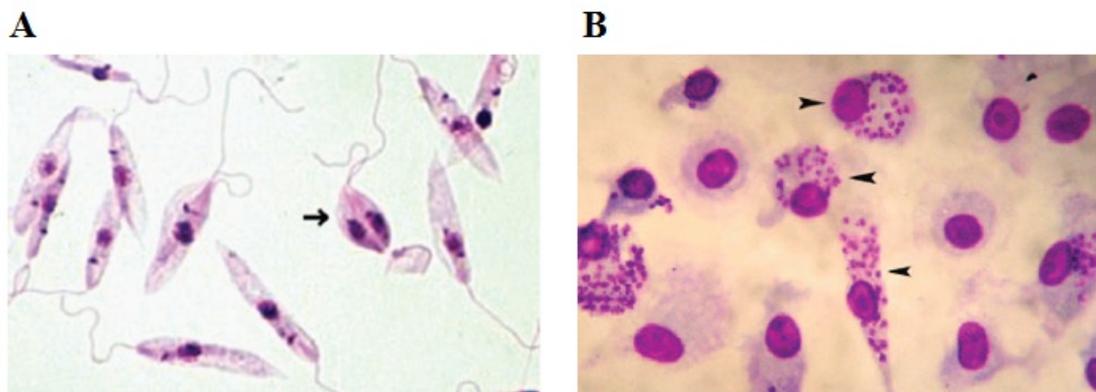


Figura 12. Formas promastigota y amastigota de *Leishmania*.

(A) Promastigotes de *Leishmania tropica* obtenidos a partir de un cultivo. La flecha indica un parásito multiplicándose por fisión binaria longitudinal. (B) Amastigotes de *L. donovani* localizados en el interior de macrófagos en cultivo, indicados con flechas. Fotografías tomadas de Bañuls *et al.*, 2007.

Un paso esencial del **ciclo de vida** del parásito lo constituye la **metaciclologénesis**, que es inducida por la escasez de nutrientes y la acidificación del medio, y que supone que las formas promastigotas procíclicas no infectivas pierdan su capacidad proliferativa y adquieran capacidad infectiva. Los **promastigotes metacíclicos** generados son inoculados al hospedador vertebrado cuando el insecto vector hembra ingiere su sangre. Posteriormente, son fagocitados por células dendríticas y macrófagos, diferenciándose al estadio **amastigote** en el interior de los fagolisosomas o vacuolas parasitóforas. Los amastigotes se multiplican por fisión binaria hasta provocar la rotura celular, que conlleva la liberación de los parásitos al torrente sanguíneo, a través del cual pueden invadir otros tejidos y ser fagocitados nuevamente por macrófagos. Para cerrar el ciclo, el insecto vector se alimenta nuevamente de la sangre de un hospedador infectado. Los macrófagos se destruyen en el tracto digestivo del insecto, liberándose los amastigotes, que se diferencian en **promastigotes procíclicos**, los cuales se multiplicarán activamente (Fig. 13).

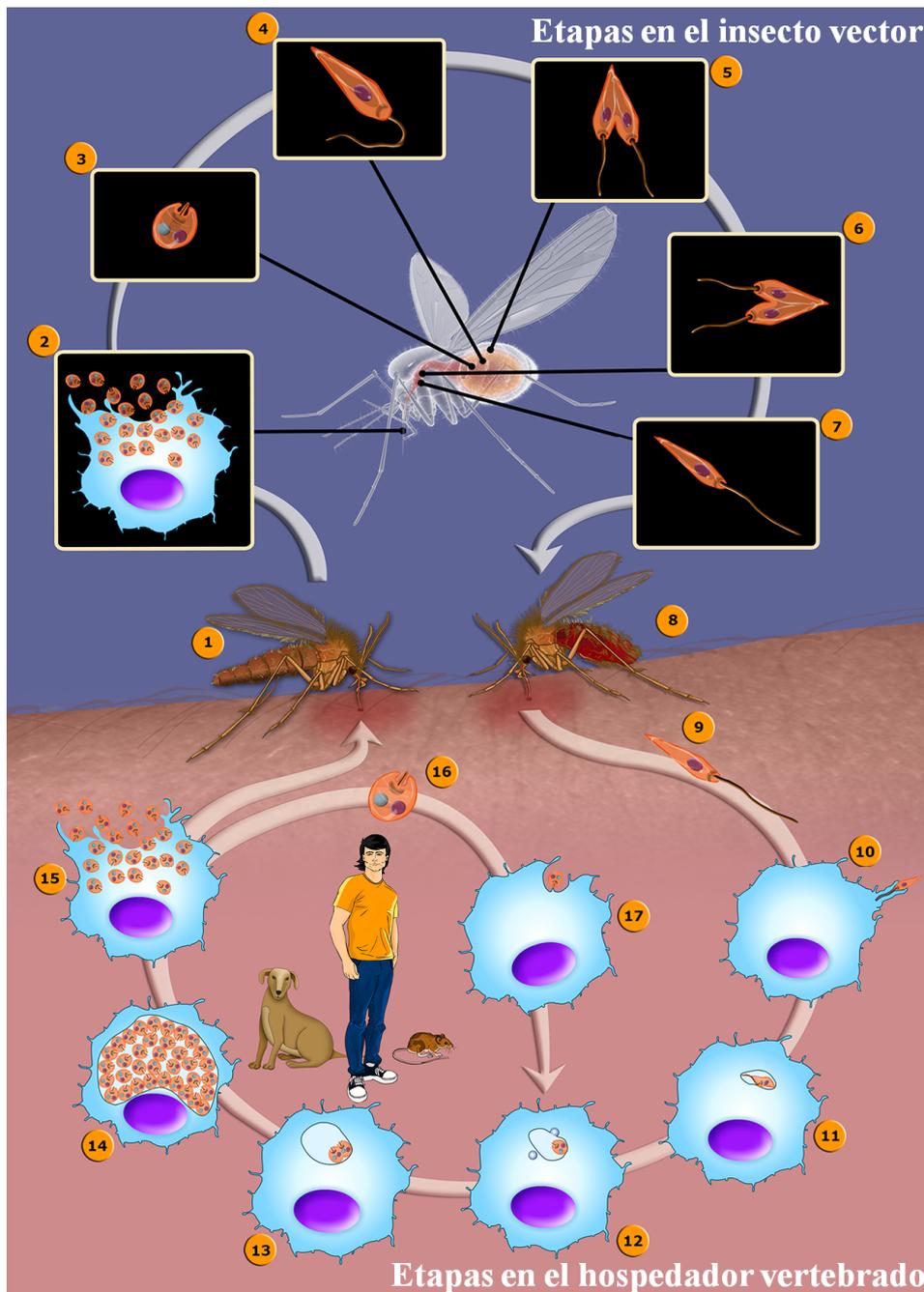


Figura 13. Ciclo de vida de *Leishmania*.

El insecto vector hembra (1) se alimenta de la sangre de un hospedador mamífero infectado, que contiene (2) macrófagos infectados por amastigotes. (3) Los amastigotes se liberan en el intestino del insecto y (4) se transforman en promastigotes procíclicos, los cuales (5) se multiplican activamente por fisión binaria longitudinal. (6) Los promastigotes procíclicos migran a la válvula faríngea, reinician la división celular y (7) se transforman en promastigotes metacíclicos, los cuales poseen capacidad infectiva. (8) El insecto vector hembra transfiere los promastigotes metacíclicos a un nuevo hospedador mamífero durante la picadura. (9) Los promastigotes metacíclicos (10) pueden infectar activamente los macrófagos o ser fagocitados. (11) En el interior del macrófago, los promastigotes metacíclicos se transforman en amastigotes, que (12) se adhieren a la membrana de la vacuola parasitófora y (13, 14) se multiplican de manera intensa por mitosis. (15) Finalmente, se produce la rotura del macrófago y (16) los amastigotes liberados (17) pueden infectar nuevos macrófagos. Adaptada de Teixeira *et al.*, 2013.

II.7. Establecimiento de la infección

Los parásitos del género *Leishmania* poseen una serie de moléculas de superficie que interactúan con su hospedador durante su ciclo de vida y que actúan como factores de virulencia, de entre las que pueden destacarse el **lipofosfoglicano (LPG)** (revisado por Forestier *et al.*, 2015) y la glicoproteína de superficie **gp63** (revisado por Arango Duque y Descoteaux, 2015). En el tracto digestivo del **insecto vector**, estas moléculas de superficie protegen a los promastigotes de la acción de enzimas hidrolíticas. Además, el LPG permite que los promastigotes procíclicos permanezcan adheridos al epitelio intestinal mediante su unión con galectinas del insecto (Kamhawi *et al.*, 2004). Durante la **metacicloogénesis**, las moléculas de LPG experimentan modificaciones como una elongación de su estructura y cambios de composición, lo que reduce su afinidad por las galectinas. Esto permite que los promastigotes metacíclicos puedan migrar hacia la faringe del insecto como paso previo a su inoculación al hospedador vertebrado (Cunningham, 2002).

Cuando los promastigotes se introducen en el torrente circulatorio del **hospedador vertebrado** tras la picadura del insecto vector hembra, su supervivencia depende de su capacidad para **evadir la respuesta inmune innata** del hospedador que se desencadena ante su presencia (revisado por Cecílio *et al.*, 2014; revisado por de Moraes *et al.*, 2015). En primer lugar, los promastigotes metacíclicos resisten la lisis mediada por el complemento, algo que no son capaces de hacer los promastigotes procíclicos. Esto se debe a cambios en la composición del LPG y a la mayor longitud de esta molécula en los promastigotes metacíclicos, lo que impediría la asociación de las subunidades C5b-C9 del complejo de ataque a membrana del complemento, que actúa como efector de la lisis celular (Puentes *et al.*, 1989 y 1990). Además, los promastigotes metacíclicos expresan gran cantidad de gp63, que es una metaloproteasa capaz de convertir C3b en la forma inactiva C3bi (Brittingham y Mosser, 1996).

Por otro lado, el LPG se une a los receptores de tipo Toll (TLR) 2 y 4 de macrófagos y células Natural Killer (NK), lo que interfiere con las respuestas proinflamatorias (revisado por Forestier *et al.*, 2015). Además, la presencia de promastigotes apoptóticos en el inóculo induce la liberación de citoquinas antiinflamatorias como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y la interleucina-10 (IL-10), así como la disminución en la expresión de una citoquina proinflamatoria, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) (van Zandbergen *et al.*, 2006). Estas acciones evitan la activación de los mecanismos antimicrobianos del hospedador, lo que favorece la supervivencia de los parásitos viables.

Para que se establezca y se perpetúe la infección, es necesario que se recluten células susceptibles de ser infectadas. Se ha observado que *Leishmania* modula la secreción de **quimiocinas**, habiéndose detectado un aumento de muchas de ellas tras la inoculación (revisado por Cecílio *et al.*, 2014). Las diferencias en la expresión de estas proteínas, que actúan induciendo y regulando la migración de células inmunes, pueden tener como consecuencia la aparición de diferentes patrones de infección y enfermedad.

Los promastigotes metacíclicos penetran en el **macrófago** mediante **fagocitosis mediada por receptores**. Para ello, juegan un papel importante el LPG y gp63, que son las principales moléculas responsables de la interacción con el macrófago (revisado por Forestier *et al.*, 2015; revisado por Arango Duque y Descoteaux, 2015). Las proteínas

del complemento C3b y C3bi interactúan con los receptores del macrófago CR1 y CR3, respectivamente. La opsonización de los promastigotes metacíclicos es mediada por C3bi (revisado por de Moraes *et al.*, 2015), por lo que la acción proteasa de la gp63 anteriormente descrita favorece la interacción con CR3, lo que resulta más ventajoso para evitar la acción oxidativa del macrófago durante la fagocitosis. Por otro lado, el LPG interactúa con la proteína C reactiva (CRP), lo que permite la fagocitosis mediada por el receptor de CRP sin que se active el macrófago. Además, el LPG también puede interactuar con el receptor de manosa-fucosa mientras que gp63 puede hacerlo con el receptor de fibronectina (revisado por Cecílio *et al.*, 2014).

Después de interactuar con el macrófago, los promastigotes metacíclicos se internalizan en el **fagolisosoma**. En algunas especies de *Leishmania* se ha observado un retraso en la fusión de las membranas del fagosoma y el endosoma, que puede deberse a una repulsión de las mismas provocada por el LPG. Esto permite que pueda producirse la conversión de las formas promastigotas en amastigotas, que son las únicas capaces de resistir la actividad hidrolítica del fagolisosoma. En otras especies, la existencia de una vacuola parasitófora de gran tamaño implica una dilución de las enzimas hidrolíticas del macrófago, lo que hace que sea innecesario un retraso en la fusión del fagolisosoma (revisado por Cecílio *et al.*, 2014). Otras moléculas que intervienen durante este proceso son las peroxirredoxinas así como una superóxido dismutasa, que producen la depleción de los derivados de nitrito y las especies reactivas de oxígeno intermedias (ROI) del fagosoma (Barr y Gedamu, 2001 y 2003), consideradas las moléculas microbicidas más importantes. Además, el LPG inhibe la proteína quinasa C (PKC) (revisado por de Moraes *et al.*, 2015), una enzima clave para la producción de ROS, y protege contra la acción de las enzimas lisosomales por su fuerte carga negativa y sus unidades repetidas de galactosa y manosa (Forestier *et al.*, 2015). Asimismo, gp63 actúa contra enzimas lisosomales, ya que su actividad proteolítica es óptima al pH ácido del fagolisosoma (Arango Duque y Descoteaux, 2015), y participa en la defensa contra los péptidos antimicrobianos (revisado por Cecílio *et al.*, 2014).

Los amastigotes se aprovechan de la célula hospedadora para poder sobrevivir y replicarse, obteniendo de ella la mayoría de los nutrientes que requieren para su metabolismo (Naderer y McConville, 2008). Parece que los parásitos pueden inhibir o retrasar la apoptosis del macrófago a la vez que pueden promover la apoptosis de los linfocitos T efectoros (revisado por Cecílio *et al.*, 2014). Además, son capaces de distorsionar las vías de señalización del macrófago para modular la producción de varias citoquinas y moléculas microbicidas, inhibir la presentación de antígenos y bloquear las moléculas coestimuladoras necesarias para la activación de células T específicas de antígeno (Bhardwaj *et al.*, 2010).

Por otra parte, los **neutrófilos** tienen un importante papel durante la fase inicial de la infección. Tras la picadura del insecto vector, se produce una rápida y numerosa movilización de estas células hacia el lugar de inoculación (Charmoy *et al.*, 2010). Los neutrófilos ingieren los parásitos y destruyen con facilidad la mayoría de ellos (Nathan, 2006), pero algunos pueden sobrevivir en su interior de manera transitoria. Esto lo consiguen evitando la generación de ROS y dirigiéndose a los compartimentos no líticos del neutrófilo (Laufs *et al.*, 2002; Gueirard *et al.*, 2008; Charmoy *et al.*, 2010). Además, los parásitos son capaces de inhibir la elastasa de los neutrófilos, previniendo la activación de TLR-4, lo que resulta crucial para la supervivencia de los parásitos (Faria *et al.*, 2011). Dentro del neutrófilo, los promastigotes no son capaces de crecer ni

de diferenciarse a amastigotes (Naderer y McConville, 2008). Los promastigotes deben transferirse desde los neutrófilos hasta los macrófagos, pero no está claro el modo en que esto sucede (Charmoy *et al.*, 2010). Se ha observado *in vitro* que los neutrófilos infectados se vuelven apoptóticos a los 2-4 días, exponiendo PS en su superficie, lo que facilita el reconocimiento por los macrófagos, que terminan fagocitándolos. Esta vía se denomina silenciosa o "Caballo de Troya", ya que los parásitos transferidos al macrófago podrán replicarse libremente (Laskay *et al.*, 2008). Sin embargo, al estudiar *in vivo* la interacción entre neutrófilos infectados por *Leishmania* y macrófagos, se observó que los parásitos se liberaban en primer lugar del neutrófilo para posteriormente entrar en los macrófagos (Peters *et al.*, 2008).

Finalmente, es de interés destacar que los parásitos pueden infectar células con reducida actividad antimicrobiana, como fibroblastos y hepatocitos, contribuyendo a que puedan mantenerse en el hospedador vertebrado durante largos periodos (revisado por Bogdan, 2008; revisado por Kaye y Scott, 2011).

II.8. Biología y bioquímica de *Leishmania*

Los parásitos del género *Leishmania* y otras especies del orden *Kinetoplastida* poseen una serie de características a nivel estructural y metabólico que los diferencian del resto de organismos eucariotas. Entre estas particularidades, puede destacarse la existencia de procesos como la transcripción policistronica, la maduración del mRNA mediante *trans-splicing* y la edición del RNA mitocondrial; la presencia de componentes específicos de membrana anclados a glicosilfosfatidilinositol (GPI); orgánulos característicos como el kinetoplasto, los acidocalcisomas o los glicosomas; o el papel del tripanotión en el mantenimiento del ambiente reductor en el interior del parásito.

Con respecto al material genético, se ha secuenciado el **genoma** de seis especies de *Leishmania*: *L. major*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. braziliensis*, *L. mexicana* y *L. tarentolae* (<http://www.genedb.org/>; <http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). Esto ha permitido conocer que estos organismos poseen alrededor de 8.200 genes por genoma aploide, de los cuales unos 6.200 están conservados en otros tripanosomátidos (*Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*) y más de 1.000 son específicos de *Leishmania* (Peacock *et al.*, 2007; Raymond *et al.*, 2012). En un principio se consideraba que *Leishmania* es un organismo diploide, pero actualmente se conoce que existe variación en el número de copias de varios cromosomas entre diferentes aislados y especies (Rogers *et al.*, 2011). Además, comparando los genomas de *L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis* se han encontrado alrededor de 200 genes que presentan una distribución diferencial entre estas especies y únicamente 78 genes que solo se encuentran en una de ellas (Peacock *et al.*, 2007). Algunos de esos genes están implicados en las interacciones con las células del hospedador y con la supervivencia de los parásitos dentro de los macrófagos. *L. infantum* y las demás especies del Viejo Mundo, *L. donovani* y *L. major*, tienen 36 cromosomas, pero las especies del Nuevo Mundo cuentan con 34 (*L. mexicana*) o 35 (*L. braziliensis*) (revisado por Rogers *et al.*, 2011).

El genoma de *Leishmania* tiene una elevada **plasticidad**, lo que significa que pueden amplificar el número de copias de genes individuales o grupos de genes en situaciones de estrés como la exposición a fármacos. Muchos genes de *Leishmania* se

encuentran organizados como repeticiones en tándem, pudiéndose transcribir de manera simultánea cuando sea necesario (Campbell *et al.*, 2003).

El **DNA mitocondrial** constituye un 10-20% del total de DNA del parásito. *Leishmania* cuenta con una única mitocondria, y este DNA se encuentra en una estructura denominada **kinetoplasto**, localizada cerca del bolsillo flagelar y perpendicular al eje del mismo (Fig. 14). El DNA mitocondrial está constituido por unas pocas docenas de maxicírculos con un tamaño de entre 20 y 40 kb y miles de minicírculos de entre 0,5 y 2,5 kb. Los maxicírculos son estructural y funcionalmente análogos al DNA mitocondrial de los eucariotas superiores y codifican rRNAs y subunidades de los complejos de la cadena respiratoria. Los minicírculos codifican moléculas de RNA guía (gRNA) que forman parte del editosoma, un complejo cuya función es procesar los transcritos de los maxicírculos mediante la inserción o delección de restos de uracilo para la creación de codones de inicio y de terminación, así como para modificar la secuencia codificante. Este proceso se conoce como **edición del RNA mitocondrial** o *RNA editing* (revisado por Lukes *et al.*, 2005).

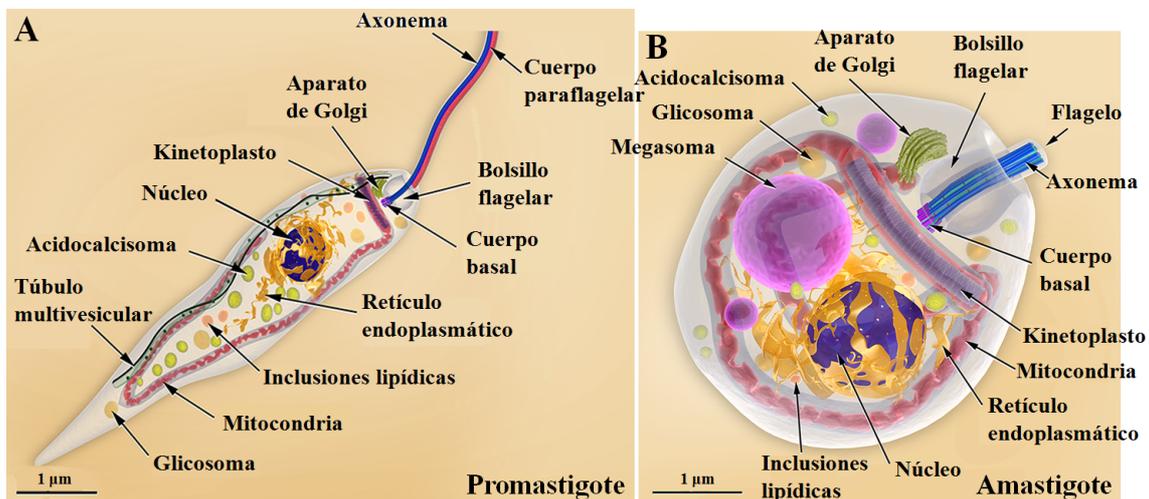


Figura 14. Orgánulos constitutivos presentes en las formas (A) promastigote y (B) amastigote de *Leishmania*. Adaptada de Teixeira *et al.*, 2013.

La RNA polimerasa II transcribe largos **precursores policistrónicos** de RNA, que son procesados posteriormente a mRNAs monocistrónicos maduros mediante **trans-splicing** en 5' y poliadenilación en 3'. El *trans-splicing* implica el empalme de dos moléculas diferentes de pre-mRNA, a diferencia de lo que sucede en el *cis-splicing*, que supone la eliminación de intrones dentro de la misma molécula de pre-mRNA (revisado por Yang y Walsh, 2005). Estos dos mecanismos de procesamiento de RNA parecen estar catalizados en *Leishmania* por el mismo espliceosoma, si bien tan solo se han podido identificar cuatro ejemplos de *cis-splicing* (Liang *et al.*, 2003; Ivens *et al.*, 2005). En *Leishmania*, durante el *trans-splicing* se añade una secuencia de 39 nucleótidos denominada miniexón o *spliced leader* (SL), que está codificada por centenares de copias repetidas en tándem. El sitio aceptor de esta secuencia es un dinucleótido de AG situado corriente abajo de una región de polipirimidinas (Teixeira, 1998; Liang *et al.*, 2003) (Fig. 15). No existe la secuencia consenso AAUAAA típica de

los eucariotas superiores para la poliadenilación, la cual está determinada espacialmente por el *trans-splicing* del mRNA situado corriente abajo (LeBowitz *et al.*, 1993).

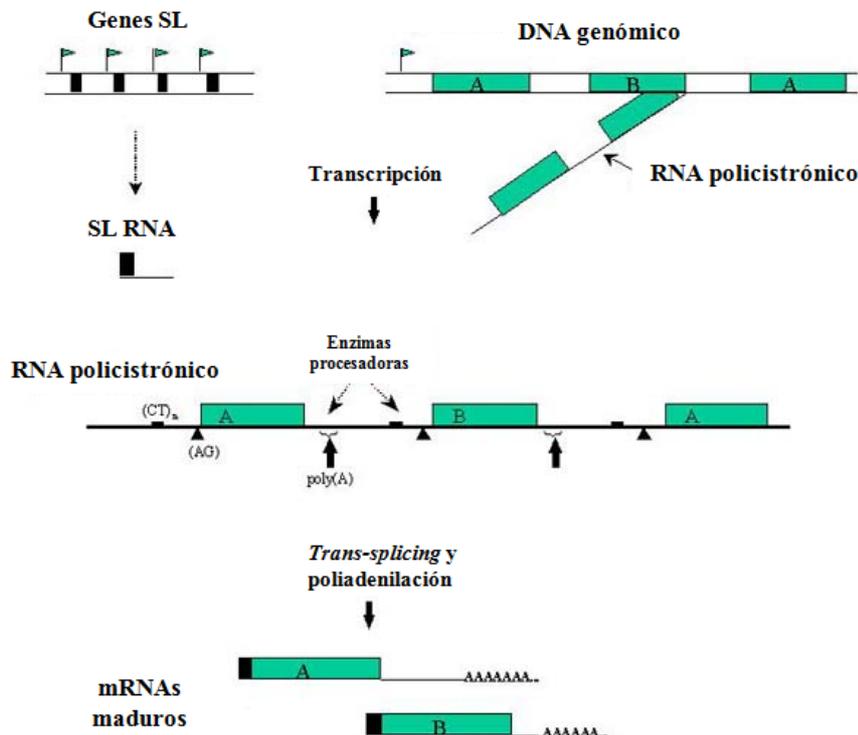


Figura 15. Proceso transcripcional en *Leishmania*. Adaptada de Teixeira, 1998.

Los genes de *Leishmania* normalmente no poseen promotores individuales y además el genoma cuenta con muy pocos potenciales factores de transcripción (Palenchar y Bellofatto, 2006). Consecuentemente, la **regulación de la expresión génica** es fundamentalmente post-transcripcional (Clayton y Shapira, 2007; revisado por Kramer, 2012). Por ejemplo, la degradación de mRNAs juega un papel importante en *Leishmania*, algo consistente con el gran número de genes que codifican proteínas con motivos de unión a RNA (Ivens *et al.*, 2005). La regulación de los niveles de mRNA está determinada por secuencias localizadas en la región 3'-UTR que controlan su estabilidad (revisado por Haile y Papadopoulou, 2007).

Muchas proteínas de *Leishmania* experimentan **modificaciones co- y post-traduccionales**, especialmente aquellas que se localizan en la superficie del parásito o cuyo destino es ser secretadas. Entre estas modificaciones se encuentran glicosilaciones, fosforilaciones y lipidaciones con el objetivo de conseguir su activación o su estabilización. Otras modificaciones como la adición de GPI, la acilación o la prenilación son esenciales para que puedan anclarse a la membrana y/o puedan interactuar con otras proteínas (Kramer, 2012). Existen fenómenos de regulación post-traduccionales relacionados con la expresión diferencial de genes entre los diferentes estadios del parásito (Myler y Fasel, 2006).

La **degradación de proteínas** también parece tener gran importancia en *Leishmania* puesto que, igual que sucede en la mayoría de organismos eucariotas, las peptidasas constituyen aproximadamente el 2% de los genes codificantes de proteínas

(Ivens *et al.*, 2005). Algunas de ellas se han identificado como factores de virulencia o como potenciales dianas de fármacos. Además, *Leishmania* posee numerosas enzimas conjugadoras de ubiquitina, lo que indica la existencia de un sistema citosólico de degradación de proteínas independiente de lisosomas. De hecho, otra característica diferencial de los tripanosomátidos es que son los únicos organismos eucariotas que poseen dos complejos proteasa dependientes de ATP: el proteasoma típico de eucariotas y un complejo denominado HsIVU, parecido al que presentan algunas bacterias. Ambos complejos parecen estar implicados en la regulación de diferentes eventos del ciclo celular de los tripanosomátidos (Li *et al.*, 2002; Mbang-Benet *et al.*, 2014).

La **membrana plasmática** de *Leishmania* presenta algunas características que la diferencian de la que poseen las células de los organismos eucariotas superiores. La mayor parte de los componentes de la superficie celular, como por ejemplo el LPG y gp63, se encuentran anclados a glicosilfosfatidilinositol (GPI), una estructura que, entre otras funciones, protege al parásito en procesos como la lisis mediada por complemento o por hidrolasas, y que se considera un factor de virulencia. Las macromoléculas más abundantes en esta envoltura son glicoproteínas, proteofosfoglicanos altamente glicosilados y lipofosfoglicanos complejos. En la fase amastigote, la expresión de macromoléculas ancladas a GPI disminuye notablemente, aunque sí se mantiene la expresión de GPIs libres (Ilgoutz y McConville, 2001) (Fig. 16). En cuanto a la composición lipídica de la membrana, la principal diferencia respecto a mamíferos reside en que el principal esteroles que se encuentra es el **ergosterol** (Urbina, 1997).

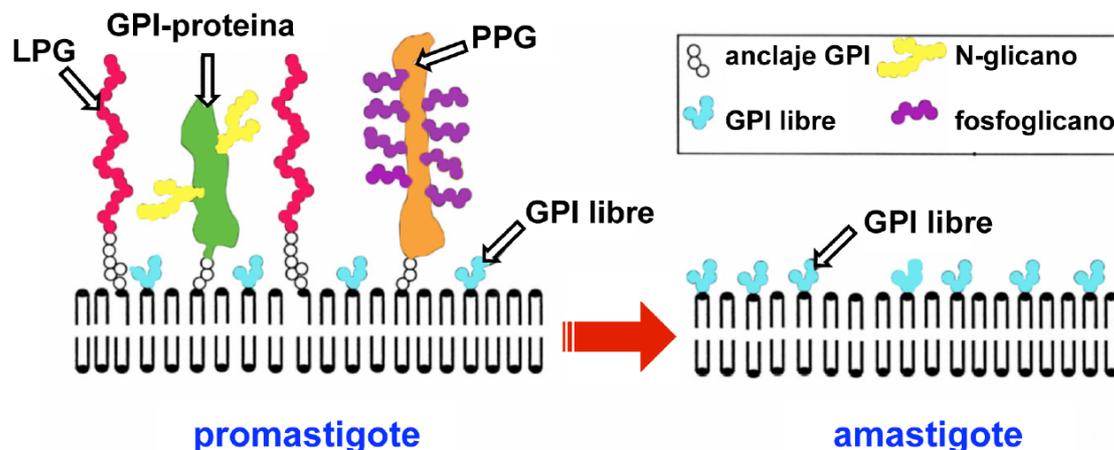


Figura 16. Representación esquemática de la membrana plasmática de las formas promastigote y amastigote.

LPG, lipofosfoglicano; GPI, glicosilfosfatidilinositol; PPG, proteofosfoglicano. Tomada de Ilgoutz y McConville, 2001.

Además, la membrana plasmática se encuentra recubierta en toda su cara citoplasmática por una red de microtúbulos. Esto le proporciona una rigidez que impide que se lleven a cabo los procesos de endocitosis y exocitosis, que solo pueden producirse en una zona denominada **bolsillo flagelar** (Fig. 14), localizada en el extremo flagelado del parásito y que carece de esta red de microtúbulos (Overath *et al.*, 1997). En el **tráfico vesicular** intervienen distintos orgánulos: un retículo endoplasmático de gran tamaño, numerosas vesículas ubicadas entre este retículo y la cara cis del aparato de Golgi, el propio aparato de Golgi, y un conjunto de vesículas y elementos

tubulovesiculares dispuestos entre la cara trans del aparato de Golgi y el bolsillo flagelar, que constituyen la red del trans-Golgi (TGN) (Landfear e Ignatushchenko, 2001). Por otro lado, en el tráfico vesicular de *Leishmania* también participa el **túbulo multivesicular** (MVT), que es un compartimento lisosomal terminal que se extiende desde el TGN hasta el extremo posterior de la célula (Ilgoutz *et al.*, 1999; Weise *et al.*, 2000; Mullin *et al.*, 2001).

Existen otros orgánulos característicos de los tripanosomátidos. Uno de ellos son los **acidocalcisomas**, electrodenso y con pH ácido, dentro de los cuales se acumulan grandes cantidades de pirofosfatos, polifosfatos, aminoácidos básicos, calcio y otros cationes. Son de forma esférica y están distribuidos por todo el citoplasma del parásito. Entre sus funciones están la homeostasis del calcio, el mantenimiento del pH intracelular y la osmorregulación del parásito (revisado por Moreno y Docampo, 2009).

Los **glicosomas** son otros orgánulos típicos de estos organismos. Dentro de ellos tiene lugar la mayor parte de la **glucólisis**, una ruta metabólica que en casi todos los eucariotas es exclusivamente citosólica. En *Leishmania*, otras rutas que suceden en los glicosomas, al menos de manera parcial, son la vía de las pentosas fosfato, la β -oxidación de ácidos grasos, la recuperación de purinas, y la biosíntesis de pirimidinas, éteres lipídicos e isoprenoides (revisado por Gualdrón-López *et al.*, 2012). También se han encontrado en los glicosomas algunas enzimas implicadas en la defensa frente al estrés oxidativo.

La compartimentalización de la glucólisis facilita la regulación de esta ruta metabólica y permite al parásito adaptarse rápida y eficientemente a nuevas condiciones, como cortos periodos de anaerobiosis (Michels *et al.*, 2006). Además de glucosa, otra de las principales fuentes de energía utilizada por *Leishmania* son los aminoácidos, especialmente la prolina. También es capaz de metabolizar otros azúcares, ya que en el glicosoma se han encontrado quinasas de azúcares como la ribuloquinasa y la xiluloquinasa (Oppendoes y Coombs, 2007). El balance energético obtenido en el interior del glicosoma es nulo. Sin embargo, el metabolismo mitocondrial en *Leishmania* es de gran importancia. Las especies del orden *Kinetoplastida* poseen una única **mitocondria** ramificada a lo largo del parásito (Fig. 14), en la que tienen lugar numerosas rutas del **metabolismo energético**. En ella se localiza una cadena de transporte de electrones muy activa, que constituye la principal fuente de energía del parásito. El mantenimiento del potencial de la membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) es indispensable para la supervivencia del parásito, puesto que de él dependen la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP (revisado por Menna-Barreto y de Castro, 2014).

Los tripanosomátidos se distinguen también de los eucariotas superiores porque su **metabolismo redox**, necesario para mantener un medio intracelular reductor, está fundamentalmente basado en la molécula N_1,N_8 -bis(glutationil)espermidina o **tripanotión** en lugar de glutatión. Esta molécula está implicada en funciones como la replicación del DNA, la defensa frente a agentes oxidantes y la detoxificación de cetoaldehídos, xenobióticos y metales pesados (revisado por Krauth-Siegel y Comini, 2008; Colotti e Ilari, 2011). Además del empleo de tioles (cisteína, glutatión, espermidina y tripanotión) como agentes antioxidantes, *Leishmania* ha desarrollado otros mecanismos para protegerse contra las defensas del hospedador, como la producción de enzimas que detoxifican las ROS y RNS (Castro y Tomás, 2008), y la

inhibición de los mecanismos de defensa oxidativa del hospedador (Bhardwaj *et al.*, 2010).

El **metabolismo de nucleótidos** también presenta algunas diferencias con respecto al de los eucariotas superiores. *Leishmania* no puede sintetizar el anillo de purina a partir de precursores metabólicos, por lo que debe obtener purinas preformadas a partir del hospedador. La recuperación se lleva a cabo a través de unos transportadores localizados en la membrana plasmática (Landfear *et al.*, 2004). Sí puede realizar síntesis de pirimidinas *de novo*, contando con la enzima bifuncional dihidrofolato reductasa y timidilato sintasa (DHFR-TS). En mamíferos, estas dos reacciones las llevan a cabo enzimas diferentes. *Leishmania* tampoco puede sintetizar folatos, por lo que debe obtenerlos del medio extracelular (Oppenheimer *et al.*, 2007).

Además, los tripanosomátidos son auxótrofos para el **hemo**, necesario para la correcta funcionalidad de algunas proteínas como los citocromos. A diferencia de los eucariotas superiores, *Leishmania* carece de al menos cinco de las enzimas necesarias para la síntesis de hemo (Dutta *et al.*, 2008). Por ello, necesita captar del medio externo la propia molécula de hemo, o bien su precursor inmediato, la protoporfirina IX (Pal y Joshi-Purandare, 2001; Rao *et al.*, 2005).

II.9. Tratamiento de la leishmaniasis

En la actualidad se carece de una vacuna eficaz frente a la leishmaniasis humana y los métodos de control de las poblaciones del insecto vector son poco efectivos, lo que supone que el tratamiento con fármacos sea la única herramienta para hacer frente a esta enfermedad. Sin embargo, el arsenal terapéutico del que se dispone es escaso y los fármacos empleados se caracterizan por su toxicidad, alto coste y aparición creciente de resistencias a los mismos. Un problema añadido lo representa el incremento progresivo de coinfecciones con VIH, en cuyo caso el tratamiento es poco eficaz, ya que son frecuentes las recaídas meses después del final del tratamiento. Aunque en menor proporción, estas recaídas pueden producirse también en individuos inmunocompetentes (revisado por Alvar *et al.*, 2008; revisado por van Griensven *et al.*, 2014).

Otras dificultades añadidas en el tratamiento son las diferencias de susceptibilidad a los fármacos empleados que presentan de forma intrínseca las distintas especies, así como las diferencias que se observan para un mismo fármaco y especie en función del área geográfica. Por ello, cada tratamiento debe ser reevaluado en las diferentes áreas geográficas endémicas de leishmaniasis (Dorlo *et al.*, 2012a).

El tratamiento de la LC se debe decidir en función de la gravedad de las lesiones, el agente etiológico y la posibilidad de que se convierta en un proceso de leishmaniasis mucocutánea (Sundary Chakravarty, 2015a). Se prefiere tratar de manera local para evitar la toxicidad sistémica de los fármacos empleados, a no ser que existan lesiones de gravedad o riesgo de desarrollar LMC. Además del empleo de algunos fármacos, también han demostrado su eficacia algunas técnicas de **termoterapia** (50 °C durante 30 s) y **crioterapia** con nitrógeno líquido (-195 °C) (OMS, 2010). Por el contrario, la LV requiere necesariamente de tratamiento farmacológico, puesto que el desenlace de esta forma de la enfermedad es fatal en ausencia del mismo.

De los fármacos disponibles en la actualidad pueden destacarse los siguientes aspectos:

Usados desde los años 1940, los **complejos de antimonio pentavalente** en forma de estibogluconato sódico (Pentostam[®]) (Fig. 17) o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) continúan usándose dentro de la primera línea de tratamiento frente a cualquier tipo de leishmaniasis en numerosas áreas geográficas. Estos fármacos resultan accesibles por su bajo precio, pero tienen como inconvenientes la necesidad de largos periodos de administración parenteral y la alta toxicidad, que incluye graves efectos secundarios como dolor en el lugar de la inyección, arritmias cardíacas o pancreatitis aguda. Para el tratamiento de ciertos casos de LC, estos antimoniales pentavalentes se pueden administrar de forma intralesional (Monge-Maillo y López-Vélez, 2013a; Sundar y Chakravarty, 2015a).

Estos compuestos actúan promoviendo el eflujo de tioles e inhibiendo la tripanotión reductasa y la glutatión sintetasa, lo que origina una acumulación de las formas oxidadas de tripanotión y de glutatión (Wyllie *et al.*, 2004). Su acción conduce a una depleción en los niveles de ATP, despolarización de la membrana mitocondrial y producción de ROS, lo que conduce al proceso de muerte celular similar a la apoptosis (Ouellette *et al.*, 2004). Es frecuente la aparición de resistencias en los parásitos, habiéndose descrito, por ejemplo, que hasta el 65% de los casos de LV en el estado de Bihar (India) son resistentes a Glucantime[®] (Chappuis *et al.*, 2007).

La **anfotericina B** es un antibiótico poliélico (Fig. 17), muy usado como antifúngico, pero que también posee una gran acción leishmanicida. Se viene administrando desde hace tiempo frente a la LV en forma de complejo con la sal biliar desoxicolato cuando falla el tratamiento con antimoniales pentavalentes, obteniéndose una tasa de curación cercana al 100% en el estado de Bihar (Thakur *et al.*, 2004; Sundar y Chakravarty, 2015a). Entre los inconvenientes de este fármaco se encuentran la necesidad de hospitalización del paciente y de una estricta monitorización durante 4 o 5 semanas, el alto coste y la alta incidencia de reacciones adversas, entre las que se incluyen fiebre, tromboflebitis, nefrotoxicidad, hipokalemia y miocarditis (Sundar y Chakravarty, 2015a).

La anfotericina B se encuentra también disponible en **formulaciones lipídicas** como el AmBisome[®] que, al igual que la forma desoxicolato, son de administración parenteral. Se prefieren a la anfotericina B convencional por su menor perfil de toxicidad, ya que con ellas se consigue disminuir la exposición del fármaco libre a los diferentes órganos. Por ello, se emplean como primera línea de tratamiento frente a la LV en la región mediterránea y Sudamérica, incluyendo los casos de coinfección con VIH (Sundar y Chakravarty, 2015a). También se han obtenido excelentes resultados frente a la LMC en Sudamérica. Su utilización en los países más desfavorecidos no está aún tan extendida debido a su alto coste, si bien en 2007 se acordó con la OMS un precio preferencial (18 \$ por un vial de 50 mg) para su uso en las regiones endémicas de LV (Olliaro y Sundar, 2009). Además, han mostrado una eficacia limitada en el tratamiento de las coinfecciones con VIH en Etiopía (Sundar y Chakravarty, 2015a). Por el contrario, sí que presentan gran eficacia frente a la LV en la India, con tasas de curación superiores al 95% (Sundar y Chakravarty, 2008), habiéndose obtenido también muy buenos resultados en este país con el empleo de una única dosis (Sundar *et al.*, 2010; Edwards *et al.*, 2011).

La anfotericina B se une al ergosterol de la membrana plasmática del parásito con alta afinidad, generando poros acuosos, aumentando la permeabilidad a iones y provocando la muerte del parásito (Leandro y Campino, 2003). La resistencia clínica a este fármaco es poco frecuente (Chappuis *et al.*, 2007; Ouellette *et al.*, 2013). En la actualidad se investigan otros sistemas de liberación de la anfotericina B y formulaciones orales, lo que podría abaratar su empleo y reducir los efectos tóxicos (Chávez-Fumagalli *et al.*, 2015; Sundar y Chakravarty, 2015b).

La **pentamidina** es una diamidina (Fig. 17) que se usó en los años 1980 frente a la LV en la India en casos de resistencia a antimoniales pentavalentes. Posteriormente, se ha usado principalmente para el tratamiento de la LC en Latinoamérica (Dorlo *et al.*, 2008a). La aparición de resistencias es muy rápida y sus efectos adversos son numerosos, por lo que su empleo ha ido disminuyendo con el tiempo. Sin embargo, se ha mostrado en los últimos años como un compuesto interesante para la profilaxis secundaria de LV en pacientes infectados por VIH (Patel *et al.*, 2009; ClinicalTrials.gov, 2015). Este compuesto se acumula en la mitocondria del parásito, donde inhibe la topoisomerasa II mitocondrial y la biosíntesis de poliaminas, y altera el potencial de membrana mitocondrial (Basselin *et al.*, 2002; Croft *et al.*, 2006).

Uno de los fármacos más prometedores es el antibiótico aminoglucósido-aminociclitol **paromomicina** o aminosidina (Fig. 17), para el que se observó actividad leishmanicida en los años 1980. Estudios llevados a cabo en la India, donde se aprobó en 2006 frente a la LV, muestran unas tasas de curación del 94-95% con su empleo por vía parenteral (Sundar y Chakravarty, 2008; Sinha *et al.*, 2011). En África se ha observado una tasa de curación menor que la obtenida con antimoniales pentavalentes y en la región mediterránea y en Sudamérica no se tiene experiencia de uso frente a la LV (Musa *et al.*, 2012; Sundar y Chakravarty, 2015a). Es un fármaco muy barato, pero tiene como desventajas la necesidad de inyectarlo intramuscularmente durante los 21 días que dura el tratamiento y de monitorizar los niveles de transaminasas en suero, así como la existencia de datos inadecuados para aprobar su uso en mujeres embarazadas (Chappuis *et al.*, 2007). También se ha administrado por vía tópica contra la LC, presentando resultados variables (Sundar y Chakravarty, 2015a). Su actividad leishmanicida se debería a su unión en el sitio A del ribosoma, lo que inhibe la traducción proteica e introduce errores de lectura (Fernández *et al.*, 2011). Hasta la fecha no se ha descrito la aparición de resistencia clínica al fármaco.

Todos los fármacos anteriores tienen el inconveniente de requerir administración por vía parenteral. Por ello, la introducción en la India en 2002 de un fármaco oral, la **miltefosina (MLF)**, que es una alquilfosfocolina (Fig. 17), supuso un importante avance al no requerir de hospitalización para su empleo. Las características de este compuesto, que continúa siendo en la actualidad el único de administración oral autorizado para el tratamiento de la leishmaniasis, serán desarrolladas ampliamente en el capítulo III de esta tesis doctoral.

Otros compuestos con actividad leishmanicida usados por vía oral son **azoles** como el fluconazol (Fig. 17), el ketoconazol o el itraconazol. Se utilizan ampliamente como antifúngicos, pero despertaron interés para el tratamiento de la leishmaniasis porque inhiben la lanosterol 14 α -desmetilasa, bloqueando la síntesis del ergosterol, principal esteroide de la membrana plasmática de estos parásitos (Balaña-Fouce *et al.*, 1998). Entre los efectos adversos se han descrito síntomas gastrointestinales y hepatotoxicidad

(Alrajhi *et al.*, 2002). Han mostrado eficacia clínica frente a la LC (revisado por Monge-Maillo y López-Vélez, 2013a), pero hay escasa evidencia al respecto frente a la LV (Monge-Maillo y López-Vélez 2013b).

Existen además algunos compuestos que poseen una acción coadyuvante cuando se combinan con los antimoniales pentavalentes. Por ejemplo, el **imiquimod** es una amina imidazoquinolina de administración tópica que se emplea en el tratamiento de pacientes con lesiones cutáneas que son refractarias al tratamiento previo con antimoniales. Tiene efectos inmunomoduladores en el sitio de aplicación, induciendo la producción de citoquinas y óxido nítrico en macrófagos (Croft *et al.*, 2006). La **pentoxifilina** es un derivado de la xantina que posee una acción inmunomoduladora coadyuvante cuando se combina con los antimoniales pentavalentes en el tratamiento de la LC y LMC (OMS, 2010). De hecho, esta combinación es una de las preferidas para tratar la LC en el Nuevo Mundo (Sundar y Chakravarty, 2015a). Este fármaco se administra por vía oral y actúa inhibiendo la síntesis del TNF- α . Por último, el **alopurinol** es un análogo tóxico de hipoxantina que interfiere en la síntesis del RNA del parásito. Se ha empleado en combinación con antimoniales pentavalentes (Singh y Sivakumar, 2004), ya que su aplicación en solitario no ha dado buenos resultados. Sin embargo, su uso está muy extendido en el tratamiento de la leishmaniasis canina (Noli y Saridomichelakis, 2014).

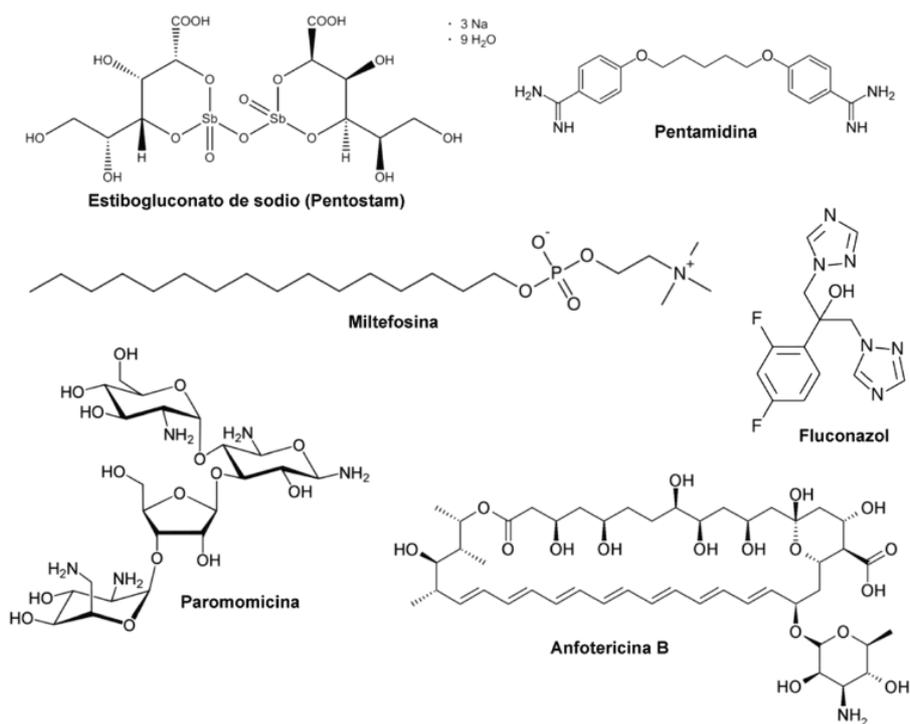


Figura 17. Estructura química de diversos fármacos leishmanicidas.

Como el arsenal terapéutico para tratar la leishmaniasis es reducido y además se ve amenazado por el desarrollo de resistencias y la pérdida de eficacia de los fármacos disponibles, hay numerosos compuestos que se encuentran en **fase de investigación**. Generalmente se trabaja con dianas farmacológicas que estén relacionadas con rutas bioquímicas y metabólicas esenciales para la supervivencia del parásito, y que presenten diferencias estructurales o funcionales significativas en comparación con las

correspondientes estructuras de mamíferos. Por ello, se investigan compuestos que afecten a la biosíntesis de folato, el metabolismo de purinas, de tioles o de poliaminas, la actividad de cisteín proteasas, la ruta glucolítica o la biosíntesis de ácidos grasos y de esteroides (revisado por Castillo *et al.*, 2010; revisado por Rajasekaran y Chen, 2015).

Entre los múltiples compuestos que han mostrado actividad leishmanicida *in vitro* se encuentran la buparvacuona, la doxorubicina, algunas chalconas, flavonoides, alquilfosfocolinas, bifosfonatos, sesquiterpenos, quinolinas, nitroimidazoles, compuestos bispiridínicos o fármacos que interfieren con el metabolismo del ergosterol, como el posaconazol y la amiodarona (Polonio y Efferth, 2008; Richard y Werbovetz, 2010; Gómez-Pérez *et al.*, 2014; Sundar y Chakravarty, 2015b). Sin embargo, teniendo en cuenta que la leishmaniasis es una enfermedad olvidada, no resulta extraño que sean muy pocos los compuestos que han alcanzado la fase II de los ensayos clínicos. Tal es el caso de la **sítamaquina**, un análogo de la primaquina de administración oral cuyo desarrollo clínico se ha detenido por su baja eficacia (Sundar y Chakravarty, 2015a), o el **fexinidazol**, que es un nitroimidazol que también podría ser efectivo frente a la tripanosomiasis africana (Sundar y Chakravarty, 2015b).

Por último, conviene destacar que la OMS ha recomendado en los últimos años el empleo de **terapias combinadas** de fármacos leishmanicidas con el objetivo de reducir las dosis, la duración, el coste y la toxicidad del tratamiento, así como para mejorar la eficacia en los casos especialmente complicados y en las coinfecciones con VIH (van Griensven *et al.*, 2010; Monge-Maillo y López-Velez, 2013b; Sundar y Chakravarty, 2015a). Otra importante ventaja de las terapias combinadas es que pueden retrasar al máximo la aparición de resistencias, por lo que se consideran de gran utilidad para prolongar la vida terapéutica de los fármacos ya existentes (Bryceson, 2001; Sundar, 2001; Croft *et al.*, 2006; den Boer *et al.*, 2009; van Griensven *et al.*, 2010). Usando compuestos que presenten interacciones sinérgicas se logra disminuir el tamaño de la población parasitaria y se reduce la tasa de resistencia, ya que la probabilidad de desarrollar simultáneamente resistencia a varios tipos de acciones farmacológicas es el producto de las probabilidades de desarrollar resistencia a cada una por separado (Anderson, 2005). No obstante, *Leishmania* es capaz experimentalmente de desarrollar resistencia a las combinaciones de diferentes fármacos leishmanicidas (García-Hernández *et al.*, 2012).

El tratamiento de elección para la LV en el Este de África y en Yemen en la actualidad es una combinación de antimoniales pentavalentes y paromomicina durante 17 días (Sundar y Chakravarty, 2015a). También se han obtenido muy buenos resultados con el empleo de anfotericina B liposomal y miltefosina o paromomicina, y con la combinación de miltefosina y paromomicina (Sundar *et al.*, 2008; Sundar *et al.*, 2011a y b). Estas últimas combinaciones, junto con el empleo de una dosis única de anfotericina B liposomal, constituyen el tratamiento de elección frente a la LV en el subcontinente indio (Sundar y Chakravarty, 2015a).

II.10. Generación de resistencias a fármacos

Como se ha visto en el apartado anterior, es relativamente frecuente que aparezca fallo terapéutico en las zonas endémicas de leishmaniasis. Esto puede deberse a factores que dependen del parásito responsable de la infección o a otros factores, como pueden

ser un tratamiento inadecuado, una alteración en la farmacocinética del fármaco, una reinfección o alteraciones de la respuesta inmune del paciente (revisado por Vanaerschot *et al.*, 2014).

La **resistencia a fármacos** es una de las principales problemáticas con las que se enfrenta la quimioterapia frente a las enfermedades infecciosas. Este fenómeno se define como la disminución de la eficacia de los fármacos sobre poblaciones celulares que previamente eran sensibles. En *Leishmania*, la resistencia puede ser natural, como la observada en *L. braziliensis* a miltefosina (Sánchez-Cañete *et al.*, 2009), o adquirida, que es la que pueden desarrollar los parásitos al ser expuestos a dosis subóptimas de los fármacos (Croft *et al.*, 2006; Croft, 2008). En muchas ocasiones, el mecanismo de resistencia a fármacos es multifactorial. La aparición de cepas de *Leishmania* resistentes a fármacos y su propagación, especialmente en el ciclo antroponótico, aumenta la posibilidad de que se generen parásitos con resistencia múltiple a otros fármacos.

Existen diversos mecanismos que se pueden asociar directamente con la resistencia a fármacos (Fig. 18):

- **Disminución de los niveles del fármaco en el sitio de actuación.** La primera barrera de resistencia se sitúa a nivel de la membrana plasmática, por lo que la resistencia se puede deber a la reducción en la permeabilidad de la membrana, que puede explicarse por alteraciones en la composición de la membrana plasmática o por la disminución en la expresión, mutaciones o pérdida del transportador encargado de la entrada del fármaco al parásito (Mandal *et al.*, 2010; Pérez-Victoria *et al.*, 2003a y b, 2006a y b). Otros mecanismos que reducen la concentración intracelular del fármaco son el aumento de su eflujo hacia el medio extracelular mediado por transportadores (Sauvage *et al.*, 2009; Kedzierski *et al.*, 2009), su inactivación por secuestro o metabolización (Ashutosh *et al.*, 2007) o, en el caso de profármacos, la ausencia de su activación.

- **Amplificación de los genes que codifican para la diana terapéutica** (Beverley *et al.*, 1984) o **mutaciones puntuales que conllevan cambios en la afinidad por el inhibidor** (Arrebola *et al.*, 1994). Otro posible mecanismo es la **amplificación génica de las dianas que constituyen una vía alternativa a la inhibida** (Papadopoulou *et al.*, 1992).

- **Incremento de los sistemas de reparación del daño provocado por el fármaco** (Ashutosh *et al.*, 2007), como puede ser la inducción de genes de respuesta a estrés y que puede dar como consecuencia la capacidad de evadirse de la apoptosis (Vergnes *et al.*, 2007).

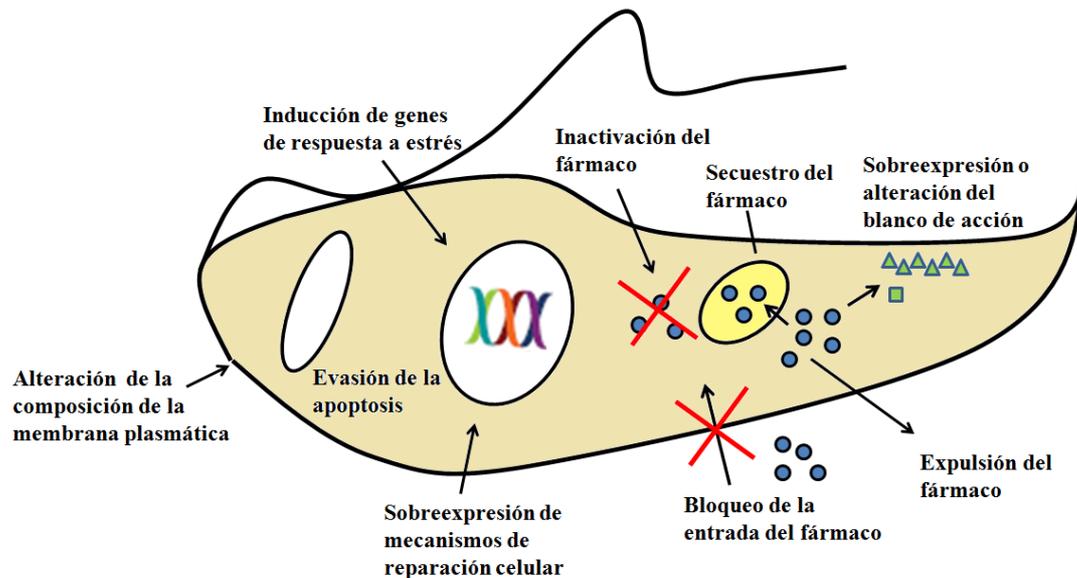


Figura 18. Principales mecanismos de resistencia a fármacos en *Leishmania*.

En nuestro laboratorio se ha demostrado que la sobreexpresión de la glicoproteína-P/MDR1/ABCB4 (Pgp) de *Leishmania*, una bomba de eflujo de fármacos perteneciente a la familia de transportadores ABC, confiere un fenotipo de **resistencia cruzada** a fármacos muy similar al descrito para la Pgp humana. Este fenotipo se revierte con diferentes inhibidores que también bloquean al ortólogo humano (Pérez-Victoria *et al.*, 2001a; Kennedy *et al.*, 2001; Cortés-Selva *et al.*, 2004; Pérez-Victoria *et al.*, 2006c; Delgado-Méndez *et al.*, 2008; Jiménez-Alonso *et al.*, 2008).

Se han descrito diversos mecanismos de resistencia a **antimoniales pentavalentes**. El principal está relacionado con la disminución del fármaco en el interior del parásito, lo que puede lograrse de diversas maneras: descenso en la incorporación mediada por la acuagliceroporina 1 AQP1 (Mandal *et al.*, 2010), aumento del secuestro y eflujo dependiente de tioles mediado por algunos transportadores ABC tales como MRPA/ABCC3, de especial relevancia en clínica, o ABCI4 (Mukherjee *et al.*, 2007; Leprohon *et al.*, 2009; Manzano *et al.*, 2013), inhibición de la activación del fármaco o inactivación mediante metabolismo (Ashutosh *et al.*, 2007).

El metabolismo de los tioles juega un papel central en la defensa contra el daño causado por el estrés oxidativo producido por los antimoniales. Por ello, no es de extrañar que algunas líneas resistentes presenten amplificación de genes codificantes de algunas de las enzimas implicadas en la formación de los precursores del tripanotión, como la GGCS (γ -glutamylcistein sintetasa) y la ODC (ornitina descarboxilasa), presentando incrementos significativos de los niveles de tioles intracelulares (Ashutosh *et al.*, 2007). Además, la sobreexpresión de la triparredoxina y la triparredoxina peroxidasa, claves en la detoxificación de peróxidos, también se ha observado en aislados clínicos de *Leishmania* resistentes a estos compuestos (Wyllie *et al.*, 2010). Otros efectos que se han relacionado con resistencia en aislados clínicos han sido modificaciones en el citoesqueleto y la sobreexpresión de algunas proteínas de choque térmico (Ashutosh *et al.*, 2007).

Aunque la resistencia clínica a **anfotericina B** es poco frecuente, se ha descrito un aislado clínico resistente al fármaco con mayor fluidez de la membrana plasmática y ausencia de ergosterol, reduciéndose así la afinidad por el compuesto, y que presentaba además sobreexpresión de la Pgp y una regulación positiva de la ruta metabólica de la triparredoxina (Purkait *et al.*, 2012). En otras líneas resistentes se han encontrado aumentos de proteínas de choque térmico, proteínas involucradas en la neutralización de ROS (Brotherton *et al.*, 2014), como la ascorbato peroxidasa (APX), una enzima ausente en humanos que transforma el H₂O₂ en agua y que protegería del estrés oxidativo y la muerte celular inducida por el fármaco (Kumar *et al.*, 2014), así como un incremento del regulador de información silenciado 2 (Sir2), proteína que participa en la regulación de Pgp, la concentración de ROS y la muerte celular similar a la apoptosis (Purkait *et al.*, 2015).

Los parásitos resistentes a **pentamidina** no acumulan el fármaco en la mitocondria, requisito necesario para que éste pueda actuar, y expulsan al exterior celular la fracción que se encuentra en el citoplasma (Basselin *et al.*, 2002), proceso en el que estaría implicado el transportador PRP1 (ABCC7), localizado en vesículas intracelulares (Coelho *et al.*, 2007).

Existen pocos estudios sobre los mecanismos de resistencia a **paromomicina** en *Leishmania*. Recientemente se ha propuesto que la resistencia a este compuesto puede ser un fenómeno multifactorial en el que se producen cambios en la fluidez de la membrana, una disminución en la acumulación del fármaco y una mayor tolerancia a los mecanismos de defensa del hospedador, y en el que estarían involucrados transportadores ABC como la Pgp y MRPA, y proteínas implicadas en la defensa frente al estrés nitrosativo (Bhandari *et al.*, 2014).

Por último, se han descrito diversos mecanismos de resistencia a **miltefosina**, que incluyen defectos en la entrada del fármaco al parásito, aumento del eflujo y tolerancia a la muerte celular inducida por el fármaco, y que serán descritos con detalle en el siguiente capítulo de esta tesis doctoral.

Además, recientemente se ha demostrado *in vitro* la posibilidad de generar líneas resistentes a las diferentes **combinaciones de fármacos** que se están empleando en la actualidad frente a la leishmaniasis (García-Hernández *et al.*, 2012). Estas líneas presentan un aumento de los niveles totales de tioles intracelulares y son capaces de mantener el potencial de la membrana mitocondrial y los niveles de ATP. Además, se han observado cambios en la fluidez de su membrana plasmática y adaptaciones metabólicas que les permiten protegerse tanto del estrés oxidativo (Berg *et al.*, 2015) como de otras condiciones de estrés, presentando una mayor capacidad de supervivencia en el interior de los macrófagos (García-Hernández *et al.*, 2015).

III. MILTEFOSINA

III.1. Introducción histórica

La miltefosina (MLF) es el único fármaco comercializado en la actualidad con reconocida eficacia por vía oral en el tratamiento de la LV y, junto con los azoles, en el de la LC (Monge-Maillo y López-Vélez, 2015).

Su actividad leishmanicida se observó en los años 1980 (Croft *et al.*, 1987), de manera independiente, pero simultánea, al descubrimiento de su actividad anticancerígena (revisado por Croft y Engel, 2006). Inicialmente, la MLF se seleccionó para su desarrollo clínico como fármaco de administración tópica en las metástasis cutáneas en pacientes con cáncer de pecho, registrado como Miltex[®] (Smorenburg *et al.*, 2000), y de administración oral frente al tratamiento de tumores sólidos, abandonándose en los ensayos clínicos en fase II debido a sus efectos adversos gastrointestinales dosis-dependientes (Sindermann y Engel, 2006).

Tras los buenos resultados obtenidos *in vitro* con el empleo de MLF frente a *Leishmania* y los valores altos de biodisponibilidad obtenidos en estudios preclínicos, se estudió su actividad leishmanicida por vía oral en animales de experimentación, mostrando mayor eficacia que con la administración intravenosa estándar de estibogluconato sódico (Kuhlencord *et al.*, 1992). Posteriormente, los buenos resultados obtenidos en las fases clínicas II y III realizados en la India frente a la LV (Sundar *et al.*, 1998 y 2002), condujeron al desarrollo de una colaboración especial entre la empresa farmacéutica alemana Zentaris GmbH, el Gobierno Indio y un programa en el que participaron el Banco Mundial, el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo y la OMS, dando como resultado la aprobación de la MLF en la India en 2002 bajo el nombre de Impavido[®] (Engel, 2002). El desarrollo clínico de la MLF y su aprobación en diferentes países endémicos de leishmaniasis han continuado desde entonces, tanto en régimen de monoterapia como en terapia combinada, con la colaboración, entre otros, de Médicos Sin Fronteras, la Iniciativa Medicamentos para Enfermedades Olvidadas (DNDi) y los gobiernos nacionales (Dorlo *et al.*, 2012a). En 2002 la MLF se catalogó como medicamento huérfano por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) y en 2006 por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de Estados Unidos (Dorlo *et al.*, 2012a). Además, actualmente está incluida en la Lista Modelo de Medicamentos esenciales de la OMS (OMS, 18^a lista, 2013), y se ha recomendado como fármaco de primera elección en regiones endémicas de la India, Nepal y Bangladesh, donde es muy usado en la actualidad (Banjara *et al.*, 2012; Ostyn *et al.*, 2014).

III.2. Características químicas de la miltefosina

La miltefosina o hexadecilfosfocolina (C₂₁H₄₆NO₄P; Pm = 407,57 g/mol) pertenece al grupo de las alquilfosfocolinas, constituido por ésteres de fosfocolina y alcoholes alifáticos de cadena larga. Estos compuestos están relacionados estructuralmente con el grupo de los alquil-lisofosfolípidos, en los que el esqueleto de glicerol presente en los fosfolípidos se sustituye por una simple cadena alquílica (Dorlo *et al.*, 2012a).

La MLF presenta características de tensioactivo anfótero, estando compuesta por una cadena hidrofóbica de 16 carbonos y una cabeza zwitteriónica con un grupo fosforilo negativo ($pK_a \approx 2$) y una colina positiva permanentemente cargada (Fig. 19). Se trata además de una molécula anfipática que posee una concentración micelar crítica de 8-12 μM . Es fácilmente soluble en disolventes acuosos y orgánicos. Su solubilidad en agua y PBS es superior a 2,5 mg/ml, mientras que en etanol y DMSO es de 1,25 y 0,8 mg/ml, respectivamente.

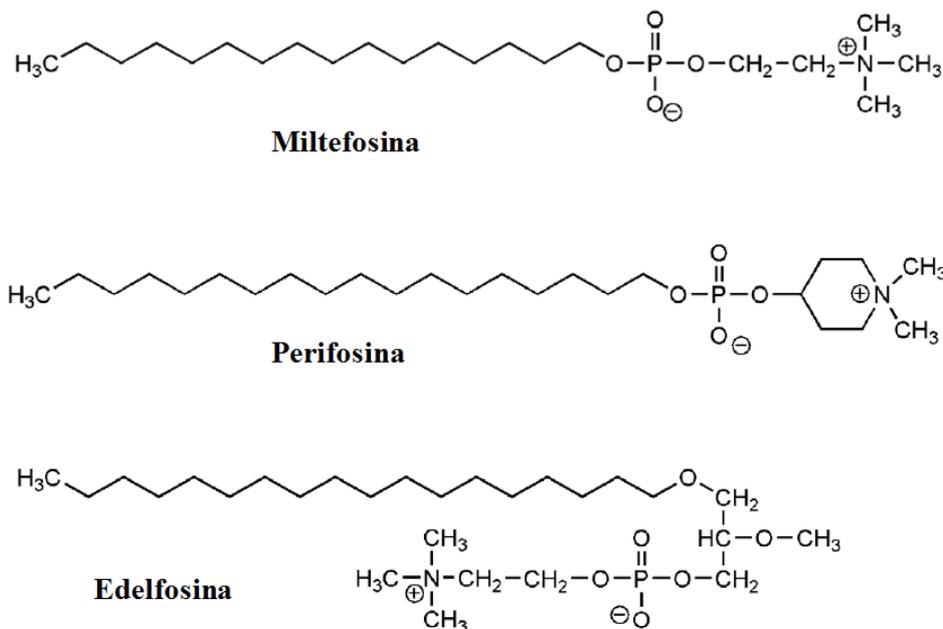


Figura 19. Estructura química de miltefosina y otros fármacos relacionados.

Se ha estudiado la actividad leishmanicida de otros compuestos relacionados estructuralmente con la MLF, diferenciándose de ésta en la longitud de la cadena alquílica, la presencia del esqueleto de glicerol o la distancia entre los átomos de N y P (Croft *et al.*, 2003). Algunos de ellos, como la perifosina, que es también una alquilfosfocolina, y la edelfosina, que pertenece a las alquilglicerofosfocolinas, también conocidas como éteres lipídicos (Brachwitz y Vollgraf, 1995) (Fig. 19), han demostrado tener una importante actividad leishmanicida en ensayos *in vitro* e *in vivo* (Cabrera-Serra *et al.*, 2007 y 2008; Varela-M *et al.*, 2012).

III.3. Farmacocinética de la miltefosina

Los estudios realizados sobre el mecanismo de **absorción** de la MLF han mostrado que, con concentraciones inferiores a 50 μM (20,4 $\mu\text{g/ml}$), este compuesto atraviesa el epitelio gastrointestinal principalmente mediante un transporte pasivo paracelular no saturable e independiente del pH. Con concentraciones superiores, la absorción es saturable, lo que sugiere la existencia de alguna proteína transportadora (Ménez *et al.*, 2007a y b). Es probable que ambos mecanismos participen normalmente en la absorción gastrointestinal de la MLF (Dorlo *et al.*, 2012a).

La biodisponibilidad absoluta de la MLF administrada por vía oral no se ha determinado en humanos porque podría causar hemólisis tras su administración intravenosa (Kötting *et al.*, 1992). El valor de este parámetro es del 82% en ratas y del 94% en perros. Cuando se aplica el modelo bicompartimental, que es el que suele usarse para describir la farmacocinética de la MLF, la semivida de absorción ($t_{1/2a}$) estimada es de 1,67 h (Dorlo *et al.*, 2012c). Se ha observado que la concentración máxima de MLF en sangre (C_{max}) se alcanza en adultos el día 23 de tratamiento (70 $\mu\text{g/ml}$), mientras que en niños esto sucede entre los días 23 y 28 (24 $\mu\text{g/ml}$) (Berman, 2008; Dorlo *et al.*, 2012a).

El modelo bicompartimental abierto indica que, una vez que alcanza la circulación sistémica, la **distribución** del fármaco es directa y rápida en el compartimento central, mientras que parte del fármaco se distribuye de forma más lenta a los tejidos periféricos. En ensayos realizados con animales de experimentación, se ha observado que la distribución de la MLF es amplia, llegando a numerosos tejidos y alcanzando las mayores concentraciones en el hígado, los pulmones, los riñones, el bazo, las glándulas adrenales y la piel (Breiser *et al.*, 1987; Marschner *et al.*, 1992; Sindermann y Engel, 2006). Es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica, aunque se desconoce en qué grado lo hace (Dorlo *et al.*, 2012a). Por otro lado, como la MLF ha demostrado ser teratógena en animales de experimentación (Sindermann y Engel, 2006), no se ha estudiado en humanos si atraviesa la placenta ni si se excreta por la leche materna, pero es de esperar que ambas cosas sucedan a tenor de sus propiedades fisicoquímicas (Dorlo *et al.*, 2012a).

La MLF presenta una elevada unión a proteínas plasmáticas, con un porcentaje de unión que varía entre el 96% y el 98%, y es independiente de su concentración en plasma. De esta fracción, el 97% va unida a albúmina y el 3% restante a lipoproteínas de baja densidad (Kötting *et al.*, 1992).

No se ha observado **metabolismo** oxidativo de la MLF mediado por el citocromo P450 (CYP) (Sindermann y Engel, 2006), por lo que no se espera que existan interacciones con otros fármacos a este nivel. La principal, y posiblemente única, vía metabólica de la MLF parece estar mediada por las fosfolipasas C y D (Dorlo *et al.*, 2012a). Practicamente el 100% de la cantidad administrada de MLF es eliminada por metabolización, aunque ésta ocurre de manera lenta. Se ha observado que la **excreción** de MLF inalterada en orina es muy baja, siendo inferior al 0,2% de la dosis administrada en el día 23 de tratamiento. Además, no se espera que exista excreción fecal, aunque este proceso no se ha investigado clínicamente en humanos (Dorlo *et al.*, 2012a).

Con todo, la característica farmacocinética más destacable de la MLF es su elevada **vida media** en el organismo, lo que conduce a una acumulación del fármaco durante el tratamiento. El estado estacionario no se alcanza hasta la última semana de tratamiento (Fig. 20), durante la cual se podrían monitorizar las concentraciones plasmáticas para conocer el grado de cumplimiento del tratamiento (Dorlo *et al.*, 2012a). Aplicando el modelo bicompartimental, la MLF tendría una vida media inicial de eliminación de 7,05 días y una vida media final de 30,9 días (Dorlo *et al.*, 2008b). La falta de adherencia al tratamiento y la larga vida media de la MLF podrían tener importantes consecuencias, ya que podrían contribuir a la selección de parásitos resistentes al fármaco (Bryceson, 2001).

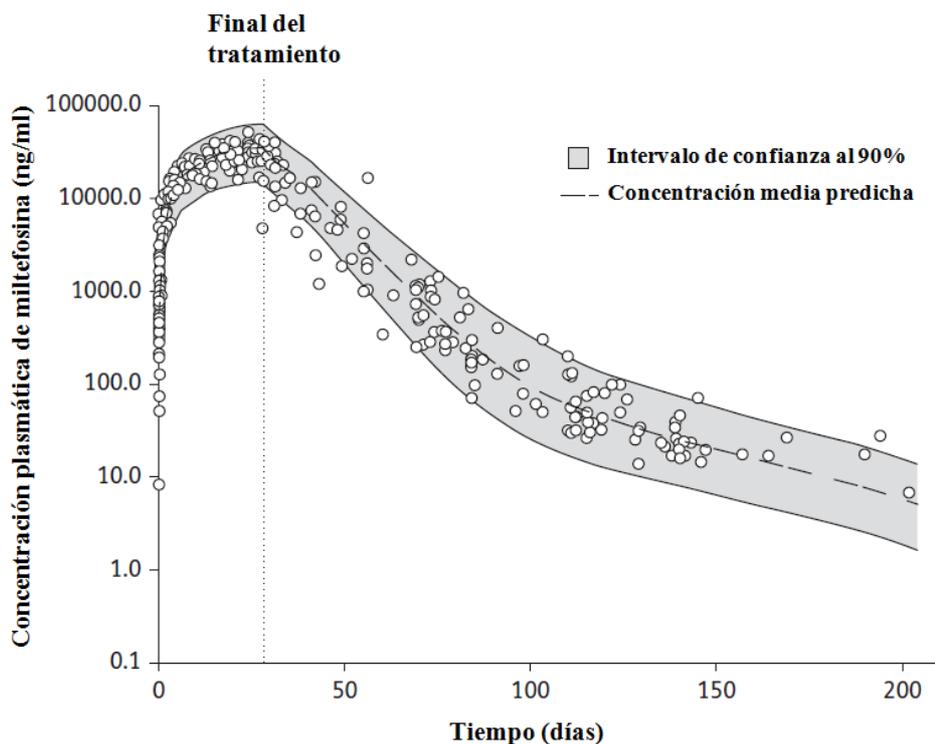


Figura 20. Concentración plasmática de miltefosina predicha por el modelo bicompartimental. La curva se construyó a partir de 382 datos procedentes de 31 pacientes con LC (causada por *L. major*), todos ellos tratados con 150 mg de miltefosina al día durante 28 días. El área gris representa el intervalo de confianza al 90% para la concentración media. Tomada de Dorlo *et al.*, 2008b.

III.4. Mecanismo de acción de la miltefosina

Existe bastante similitud entre los mecanismos de acción anticancerígena y leishmanicida propuestos para la MLF, si bien no están del todo elucidados en ambos casos. Parece que el efecto del fármaco depende más de la duración del tratamiento que de la concentración alcanzada (Dorlo *et al.*, 2014). En cualquier caso, para que la MLF sea efectiva, en primer lugar debe entrar en el parásito y acumularse dentro de él (Pérez-Victoria *et al.*, 2006b). Se ha observado que la MLF puede alterar las membranas de los orgánulos intracelulares de *Leishmania*, integrándose en ellas e incrementando su dinámica molecular a causa de un efecto similar al de un detergente (Croft y Coombs, 2003; Barratt *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2014), pero se desconoce cómo es su distribución intracelular o si existe algún orgánulo en el que se acumule (Gamarro *et al.*, 2013). Aun así, está claro que su acción leishmanicida tiene lugar dentro del parásito y los experimentos realizados hasta la fecha indican que ésta podría llevarse a cabo de diferentes maneras (Fig. 21).

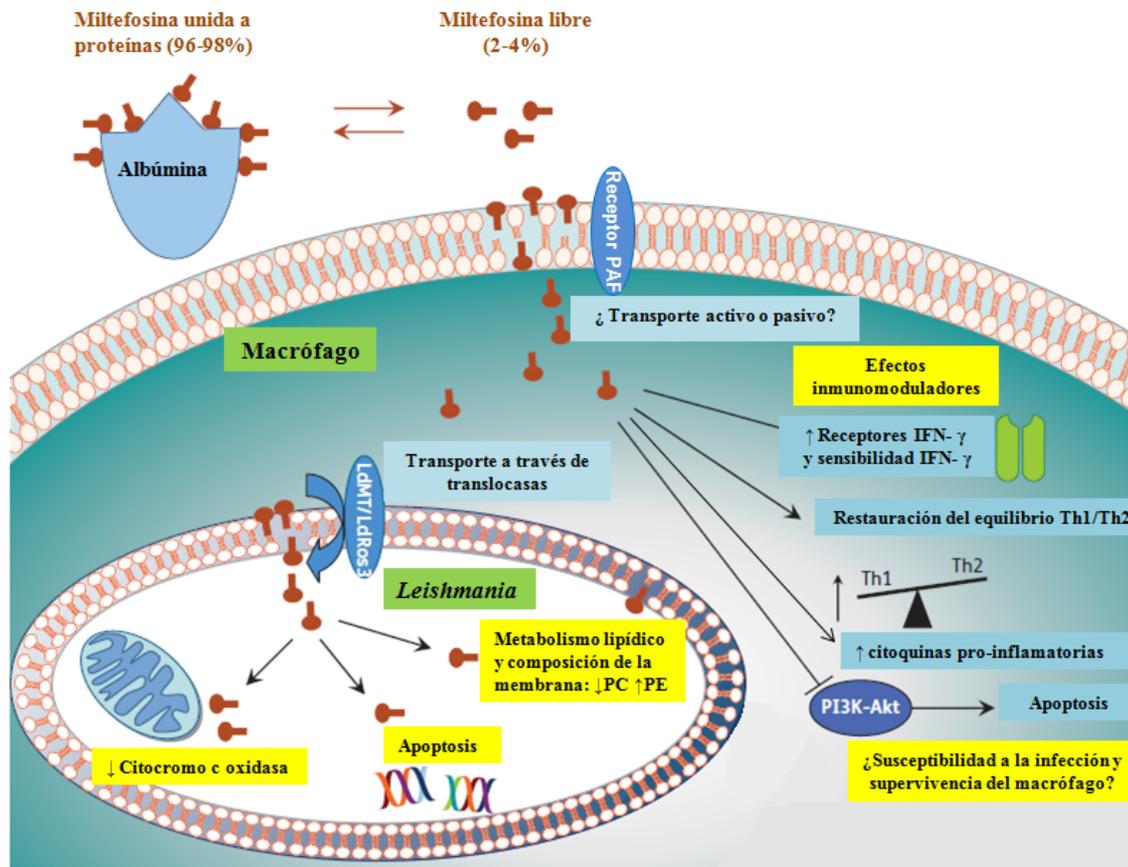


Figura 21. Mecanismo de acción leishmanicida de la miltefosina.

La MLF se transporta a nivel plasmático fundamentalmente mediante su unión a albúmina, que actúa como reservorio del fármaco. Se desconoce si su entrada al macrófago se produce de forma pasiva o de forma activa. Aunque su mecanismo de acción no está totalmente aclarado, existen evidencias de que la acción leishmanicida de la MLF tiene lugar en el interior del parásito. Para que tenga lugar, el fármaco debe ser incorporado por *Leishmania*, lo que sucede principalmente mediante un transporte activo llevado a cabo por el complejo MT-Ros3. A nivel del parásito se ha observado que este fármaco altera el metabolismo lipídico y la composición de la membrana plasmática. Además, inhibe la actividad de la citocromo c oxidasa y desencadena el proceso similar a la apoptosis que origina la muerte del parásito. Al margen de estos efectos, a nivel del macrófago se han descrito diversos efectos inmunomoduladores de la MLF que parecen contribuir a su acción leishmanicida, como el aumento de la respuesta citotóxica Th1 o el aumento en la producción de determinadas citoquinas pro-inflamatorias. En estas acciones podría estar implicada la interacción de la MLF con el receptor del factor activador de plaquetas (PAF). Por otro lado, se ha observado en células humanas que la MLF induce la apoptosis mediante la inhibición de la ruta PI3K-Akt, una inhibición que además conlleva que los macrófagos sean menos sensibles a la infección por *Leishmania*. Adaptada de Dorlo *et al.*, 2012a.

Por ejemplo, existen grandes evidencias de que la MLF **altera el metabolismo lipídico** de *Leishmania* (Barratt *et al.*, 2009; Imbert *et al.*, 2012), lo que podría afectar a las rutas de señalización celular dependientes de lípidos. Se han observado efectos moderados sobre el metabolismo de fosfolípidos y sobre la composición de la membrana plasmática, de manera que los parásitos presentan una disminución en la cantidad de fosfatidilcolina (PC) y un aumento en la de fosfatidiletanolamina (PE) (Rakotomanga *et al.*, 2007). Además, se ha observado un incremento del contenido de colesterol y una gran disminución del contenido de esteroides alquilados en C-24, lo que indica que el metabolismo de esteroides posiblemente sea una diana para la MLF (Rakotomanga *et al.*, 2005). *Leishmania* no es capaz de sintetizar colesterol, por lo que

su aumento podría deberse a un aumento en su captación del medio externo (Rakotomanga *et al.*, 2007). Es interesante resaltar que la MLF también afecta al metabolismo lipídico de las células de mamíferos, habiéndose observado, entre otros efectos, una reducción en la biosíntesis de PC y un aumento en la de colesterol (Carrasco *et al.*, 2008; revisado por Marco *et al.*, 2014). Otras alteraciones en el metabolismo de *Leishmania* que se han observado tras el tratamiento con MLF son el aumento en los niveles de alcanos, azúcares y nucleótidos (Vincent *et al.*, 2013).

A nivel mitocondrial, la MLF inhibe en *Leishmania*, de manera dosis-dependiente, la actividad de la **citocromo c oxidasa**, enzima que participa en la cadena de transporte de electrones, lo que origina una reducción del potencial de la membrana mitocondrial y un significativo declive de los niveles de ATP intracelular (Luque-Ortega y Rivas, 2007). En levaduras se ha observado que la inhibición de la citocromo c oxidasa induce muerte celular similar a la apoptosis (Zuo *et al.*, 2011).

Precisamente, este **proceso similar a la apoptosis** es el que finalmente causa la muerte del parásito tras el tratamiento con MLF (Paris *et al.*, 2004; Verma y Dey, 2004; Alzate *et al.*, 2008). Este proceso se produce de forma dosis y tiempo dependiente (Mishra y Singh, 2013), y se debe a que el fármaco aumenta los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que conduce a un aumento del estrés oxidativo, alterándose el metabolismo de poliaminas (Vincent *et al.*, 2013; Canuto *et al.*, 2014) y el potencial de la membrana mitocondrial, liberándose al citoplasma el citocromo c y la superóxido dismutasa A mitocondrial de hierro (FeSODA) (Getachew y Gedamu, 2012), y produciéndose finalmente la fragmentación del DNA nuclear (Moreira *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2013).

En células humanas, la MLF induce la apoptosis por inhibición de la ruta PI3K-Akt/PKB (Ruiter *et al.*, 2003; Chakrabandhu *et al.*, 2008). Se ha observado que, cuando se inhiben las fosfatidilinositol-3-quinasas PI3K- γ y PI3K- δ , los macrófagos son menos susceptibles a la infección por *Leishmania mexicana* (Liu *et al.*, 2009; Cummings *et al.*, 2012) por lo que, como acción adicional, la MLF podría hacer que estas células sean más resistentes frente a estos parásitos (Dorlo *et al.*, 2012a).

En modelos animales se ha descrito que la acción leishmanicida de la MLF no es dependiente de células T ni de activación de macrófagos (Murray y Delph-Etienne, 2000). Además, no afecta a la maduración de las células dendríticas, esenciales para el comienzo de la respuesta inmune frente a *Leishmania* (Griewank *et al.*, 2010). Según estos datos, a diferencia de los antimoniales pentavalentes, las acciones principales de la MLF serían independientes del sistema inmune; de hecho, ha mostrado actividad en ratones con inmunodeficiencia combinada severa (Escobar *et al.*, 2001). Por ello, se sugirió que este fármaco podría usarse para tratar la leishmaniasis en pacientes deficientes en células T, tales como los enfermos con SIDA. Este empleo se podría ver favorecido además por un reciente hallazgo, ya que se ha observado *in vitro* que la MLF puede reducir la replicación del VIH tipo 1 en células dendríticas y células CD4 (Garg y Tremblay, 2012).

Sin embargo, la MLF podría tener **propiedades inmunomoduladoras** que contribuirían a su acción leishmanicida, aunque se desconoce la importancia de las mismas. La MLF parece modular la actividad de los macrófagos en humanos, pudiendo inducir la destrucción del parásito (Wadhone *et al.*, 2009). Se ha observado que también

induce la liberación de diversas citoquinas pro-inflamatorias (Hochhuth *et al.*, 1992; Zeisig *et al.*, 1995; Hilgard *et al.*, 1997; Eue, 2002; Mukhopadhyay *et al.*, 2011). Además, en los macrófagos infectados, la MLF restaura la sensibilidad al interferón- γ (IFN- γ), potenciando la actividad de los receptores a esta citoquina activadora de macrófagos, y restaura el equilibrio Th1/Th2, promoviendo la respuesta citotóxica Th1 dependiente de IL-12 (Wadhone *et al.*, 2009). Por otro lado, se ha investigado el posible papel que desempeña en la actividad de la MLF el receptor del factor activador de plaquetas (PAF), un mediador inflamatorio que comparte algunas características estructurales con la MLF. Al bloquear la actividad de este receptor en macrófagos se ha observado un descenso en la producción de IFN- γ y TNF- α , dos citoquinas importantes en la respuesta inmune frente a *Leishmania*, y un descenso en la unión de un análogo fluorescente de MLF y en la actividad leishmanicida de la MLF (Gangalum *et al.*, 2015).

Aparte de sus acciones anticancerígena y leishmanicida, la MLF también ha mostrado actividad contra otros protozoos parásitos (*Trypanosoma sp.*, *Entamoeba sp.*, *Acanthamoeba sp.*, *Trichomonas vaginalis*), así como contra *Schistosoma mansoni* y algunas bacterias y hongos patógenos (revisado por Pachioni *et al.*, 2013). Finalmente, se ha observado que inhibe tanto la activación de los mastocitos como la liberación de los mediadores que producen (Weller *et al.*, 2009), por lo que se investiga su uso por vía tópica para el tratamiento de las enfermedades mediadas por estas células, como la mastocitosis, la urticaria o la dermatitis atópica (Maurer *et al.*, 2013).

III.5. Eficacia de la miltefosina en el tratamiento de la leishmaniasis

Como se ha comentado anteriormente, la MLF se aprobó en 2002 para su uso en la India contra la LV, presentando un porcentaje de cura del 94-95% en los ensayos clínicos en fase III y IV (Sundar *et al.*, 2006; Bhattacharya *et al.*, 2007), si bien esta tasa se ha visto reducida con su empleo posterior por la aparición de recaídas (Sundar *et al.*, 2012; Rijal *et al.*, 2013). En Bangladesh, donde la MLF se introdujo posteriormente, la tasa de curación observada es del 85% (Rahman *et al.*, 2011). En el Este de África, la eficacia de la MLF frente a la LV ha sido moderada, con una tasa de curación del 75,6% en pacientes inmunocompetentes (Ritmeijer *et al.*, 2006). En los países mediterráneos y en Latinoamérica los datos obtenidos al respecto son aún escasos (Monge-Maillo y López-Vélez, 2015). La eficacia del tratamiento parece ser superior en adultos que en niños, un grupo de población muy afectado por la LV (Bhattacharya *et al.*, 2004) pero que se ha estudiado muy poco en los ensayos clínicos realizados hasta la fecha (Ostyn *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha observado también una gran eficacia (96,6%) de la MLF frente a la PKDL (Sundar *et al.*, 2015).

La MLF también se está empleando en **terapia combinada** frente a la LV. Al respecto, se están realizando algunos ensayos clínicos controlados en varias zonas endémicas, como el sureste asiático y el este de África (Dorlo *et al.*, 2012a; Sundar y Chakravarty, 2015a). En la India se ha observado que, si se combina la MLF con una única infusión intravenosa de anfotericina B liposomal (5 mg/Kg), la duración del tratamiento con MLF puede pasar de 28 a 7-14 días sin que se afecte su eficacia. (Sundar *et al.*, 2008; Sundar *et al.*, 2011b). También se ha obtenido alta eficacia en un

tratamiento combinado de 10 días de duración de MLF e inyecciones de paromomicina por vía intramuscular (11 mg/Kg) (Sundar *et al.*, 2011a).

Los resultados obtenidos en el tratamiento de **coinfecciones con VIH** son escasos y difíciles de interpretar (revisado por Dorlo *et al.*, 2012a; Monge-Maillo y López-Vélez, 2015), pero poco prometedores, puesto que hay un alto porcentaje de recaídas (revisado por Monge-Maillo *et al.*, 2014). Sin embargo, la larga vida media de este fármaco y la ventaja que supone su administración oral podrían favorecer su empleo con fines profilácticos (Monge-Maillo y López-Vélez, 2015).

Su eficacia frente a la **LC** en el Viejo Mundo es variable, aunque los ensayos clínicos realizados son escasos (Monge-Maillo y López-Vélez, 2015). En diferentes regiones de Latinoamérica su eficacia ha resultado ser bastante inferior a la mostrada frente a la LV, presentando además una alta variabilidad dependiendo de la zona estudiada. Así, el porcentaje de cura observado con el tratamiento de MLF oral frente a *Leishmania braziliensis* en Guatemala es del 33% (Soto *et al.*, 2004), mientras que en Colombia, Bolivia y Brasil alcanza el 50, 70 y 75%, respectivamente (Soto *et al.*, 2009; Vélez *et al.*, 2010; Machado *et al.*, 2010). Existe una elevada variabilidad en la sensibilidad a MLF entre las distintas especies de *Leishmania* causantes de LC; por ejemplo, en otro estudio realizado en Colombia, donde es común *L. panamensis*, se obtuvo una tasa de curación del 91% (Soto *et al.*, 2004). De hecho, la Organización Panamericana de la Salud recomienda el empleo de la MLF para la LC causada por *L. panamensis* y *L. guyanensis* (OPS, 2013). Sin embargo, se considera que, en general, los ensayos clínicos realizados son de poca calidad y que se necesita un diseño mejor de los mismos para poder estudiar con garantías el efecto de la MLF sobre la LC (González *et al.*, 2010; Dorlo *et al.*, 2012a). Los resultados obtenidos frente a la **leishmaniasis cutánea difusa** son poco alentadores (Zerpa *et al.*, 2007; Sundar y Chakravarty, 2015a). También se ha usado MLF por vía tópica (Miltex[®]) para tratar la LC, pero no hay ensayos clínicos publicados sobre su eficacia (Dorlo *et al.*, 2012a).

Por otro lado, frente a la **LMC**, en Bolivia se han obtenido resultados equivalentes con el empleo de MLF oral y de anfotericina B intravenosa, por lo que se ha sugerido que la MLF podría ser el tratamiento de elección para esta forma de la enfermedad difícil de tratar (Soto *et al.*, 2007). Todavía no se ha establecido un régimen de tratamiento apropiado, pero parece que se obtienen mejores resultados cuando éste es de larga duración (Soto *et al.*, 2009; Monge-Maillo y López-Vélez, 2015).

Por último, hay que destacar que la MLF también se emplea para el tratamiento de la **leishmaniasis canina**. Debido a la frecuente aparición de recaídas si se usa en régimen de monoterapia (Manna *et al.*, 2008; Andrade *et al.*, 2011), actualmente suele combinarse una dosis de MLF de 2 mg/kg de peso durante 28 días con alopurinol durante al menos 6-12 meses (Noli y Saridomichelakis, 2014). Se ha observado una eficacia clínica del 60-90% en régimen de monoterapia (Mateo *et al.*, 2009; Woerly *et al.*, 2009). La combinación de MLF y alopurinol es más activa *in vitro* que la MLF sola (Farca *et al.*, 2012) y ha mostrado tener una eficacia clínica similar a la que posee el tratamiento estándar basado en antimoniato de meglumina y alopurinol (Miró *et al.*, 2009). Sin embargo, esta combinación tampoco elimina por completo la carga parasitaria (Manna *et al.*, 2009).

III.6. Características del tratamiento con miltefosina y efectos adversos

El efecto de la MLF y el consiguiente éxito terapéutico dependen de la **duración del tratamiento** (Dorlo *et al.*, 2014). El tratamiento estándar en régimen de monoterapia dura 28 días, con una **dosis** recomendada, tanto para LV como LC, de 2,5 mg/kg/día. Por razones prácticas, el Gobierno Indio recomienda la dosis de 100 mg/día para pacientes de más de 25 kg de peso, y 50 mg/día para los de peso inferior (Dorlo *et al.*, 2012a). Estas dosis podrían ser insuficientes para los niños menores de 12 años, que se ha observado que tienen mayor probabilidad de sufrir fallo terapéutico (Dorlo *et al.*, 2014). Para el tratamiento de la PKDL, que requiere un régimen de mayor duración, se han obtenido muy buenos resultados tras 12 semanas (Sundar *et al.*, 2015).

El fármaco se ha aprobado ya en numerosos países donde la leishmaniasis es endémica. Se ha negociado con la OMS un **precio** preferencial para su uso en los países con menos recursos económicos, con un coste aproximado de 50 € por tratamiento. En cambio, en los países más desarrollados el tratamiento puede llegar a costar 3.000 €. En Europa, la MLF solo está aprobada en Alemania, por lo que para poder emplearse en España es necesario solicitarla como medicamento extranjero (Dorlo *et al.*, 2012a; Pediamécum, 2015).

La MLF es habitualmente bien tolerada, exceptuando la aparición de **efectos adversos** gastrointestinales, como diarreas, vómitos, náuseas o anorexia (Monge-Maillo y López-Vélez, 2015). Estos efectos se reducen drásticamente al ingerir alimentos de naturaleza grasa de forma conjunta con el fármaco (van Thiel *et al.*, 2010; Dorlo *et al.*, 2011), probablemente sin que se vea afectada su biodisponibilidad (Dorlo *et al.*, 2012a).

Por otro lado, la MLF puede causar ocasionalmente nefro y hepatotoxicidad. Es rara la aparición de un cuadro grave de toxicidad renal (Dorlo *et al.*, 2012a). También es frecuente el incremento de los niveles de transaminasas (ALT y AST) en la primera semana de tratamiento, que se ha asociado con la necrosis de hepatocitos dañados con anterioridad al mismo (Sindermann y Engel, 2006).

Sin embargo, el **potencial abortivo y teratogénico** de la MLF mostrado en estudios de toxicidad en animales limita su empleo en la clínica (Sindermann y Engel, 2006), estando fuertemente contraindicada en pacientes embarazadas, por lo que se deben tomar medidas anticonceptivas en pacientes en edad fértil durante el tratamiento y entre 2 y 4 meses después del mismo, debido a la larga vida media de eliminación del compuesto (Fig. 20) (Dorlo *et al.*, 2012b).

III.7. Variaciones de sensibilidad a miltefosina y recaídas

Las diferentes especies causantes de la leishmaniasis presentan diferencias a nivel bioquímico y molecular (Cupolillo *et al.*, 2000; Quispe-Tintaya *et al.*, 2005) que pueden explicar algunas de las variaciones existentes en la sensibilidad a los fármacos usados contra la leishmaniasis. En el caso de la MLF hay una significativa variación de sensibilidad (Escobar *et al.*, 2002), demostrada *in vitro* en macrófagos infectados a partir de diferentes aislados clínicos de Perú y Nepal que habían sido sometidos al

tratamiento con antimoniales (Yardley *et al.*, 2005). Los aislados de *L. donovani* procedentes de Nepal presentaron alta sensibilidad a MLF, mientras que los de Perú, pertenecientes al complejo de *L. braziliensis*, mostraron escasa sensibilidad al fármaco. En el tratamiento de la LC se ha observado especialmente una gran variabilidad, incluso dentro de la misma subespecie de *Leishmania* (Soto *et al.*, 2008). La resistencia al fármaco puede ser además muy heterogénea a nivel de población, puesto que diversos clones aislados de una misma población pueden presentar genotipos y fenotipos de susceptibilidad con importantes diferencias (Coelho *et al.*, 2012; Hendrickx *et al.*, 2015a).

También se han aislado diversas cepas de *L. donovani* causantes de LV con reducida sensibilidad a MLF, aunque en la mayoría de casos no se ha podido relacionar el fallo terapéutico con resistencia adquirida al fármaco (Vergnes *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2009; Sundar *et al.*, 2012; Rijal *et al.*, 2013). Hasta la fecha, solo dos aislados clínicos, procedentes de pacientes coinfectados por VIH, se han presentado como portadores de resistencia a MLF (Cojean *et al.*, 2012; Hendrickx *et al.*, 2014). Se han registrado numerosos casos de pacientes inmunocompetentes con LV y LC que fueron tratados con MLF con éxito en un primer momento pero después sufrieron una recaída (Calvopina *et al.*, 2006; Zerpa *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2009; Rijal *et al.*, 2013; Ostyn *et al.*, 2014). Sin embargo, en los aislados clínicos obtenidos de estos pacientes no se han podido identificar cepas con una verdadera resistencia a MLF, sino que se habla de una mayor tolerancia al fármaco, que podría deberse a factores relacionados con el hospedador, como podría ser su estado inmune, y no con el parásito en sí (Bhandari *et al.*, 2012; Prajapati *et al.*, 2013; Rijal *et al.*, 2013; Ostyn *et al.*, 2014). Algunos aislados antes del tratamiento y después del mismo presentaron una diferencia de sensibilidad de dos veces, pero no se observaron diferencias entre los aislados procedentes de pacientes que se habían curado y los de pacientes que habían experimentado una recaída. De hecho, se ha observado que no existe necesariamente una correlación entre el perfil de sensibilidad de los aislados clínicos antes del tratamiento con MLF y el resultado del mismo (Hendrickx *et al.*, 2015a).

Recientemente se han observado tasas de recaídas de hasta el 20% en LV tratada con MLF, las cuales tampoco se han podido asociar a reinfección con nuevas cepas ni a una baja calidad o escasa exposición al fármaco, puesto que las concentraciones plasmáticas del fármaco eran similares en pacientes curados y con recaídas (Rijal *et al.*, 2013). Se piensa que estas numerosas recaídas se deben más bien a un aumento en la infectividad de los parásitos asociado con un incremento en la población de formas metacíclicas (Rai *et al.*, 2013). Sea cual sea la causa de las altas tasas de fallos terapéuticos que se están registrando en los últimos años, se está alertando sobre la necesidad de actuar con urgencia para prevenir el desarrollo y la propagación de resistencias a MLF (Monge-Maillo y López-Vélez, 2015).

III.8. Resistencia a miltefosina en *Leishmania*

Desde que comenzó el desarrollo clínico de la MLF, son numerosos los estudios que se han realizado con el objetivo de determinar los mecanismos moleculares que expliquen las diferencias de sensibilidad entre las diferentes especies o que ayuden a comprender cómo los parásitos pueden adquirir resistencia a este fármaco. Por ejemplo, en nuestro laboratorio se ha descrito que la **sobreexpresión de distintos**

transportadores ABC en *Leishmania* es causa de resistencia *in vitro* a MLF. Por ejemplo, la sobreexpresión de **ABCB4/Pgp**, proteína homóloga a la Pgp/MDR1 humana y que confiere un fenotipo de multiresistencia a fármacos, origina parásitos resistentes a MLF y a otros análogos de alquil-lisofosfolípidos (Pérez-Victoria *et al.*, 2001b) (Fig. 22). Esto se debería al secuestro del fármaco en vesículas intracelulares, que posteriormente se eliminarían por exocitosis, o bien a su expulsión directa al exterior a través de la membrana plasmática. El empleo de inhibidores de la Pgp elimina este incremento del eflujo del fármaco y conduce a que éste se acumule en mayor cantidad dentro del parásito (Pérez-Victoria *et al.*, 2006c).

Por otra parte, la sobreexpresión de ABCA1 y ABCA2 produce un descenso en la acumulación de análogos de glicerofosfolípidos, aunque los parásitos no son resistentes a MLF (Parodi-Talice *et al.*, 2003; Araújo-Santos *et al.*, 2005). Por el contrario, la sobreexpresión de los genes **ABCG4** y **ABCG6** en *Leishmania* no solo reduce la acumulación de análogos de glicerofosfolípidos, sino que también confiere resistencia a MLF por un incremento en el eflujo del fármaco (Castanys-Muñoz *et al.*, 2007 y 2008) (Fig. 22).

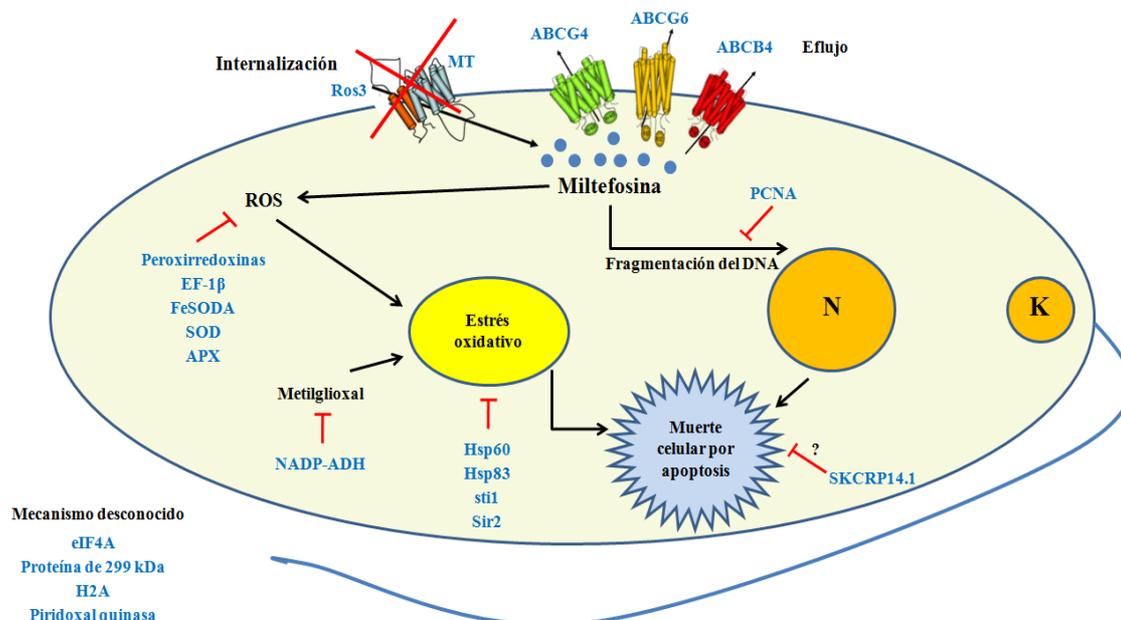


Figura 22. Mecanismos de resistencia a miltefosina propuestos para *Leishmania*.

El mecanismo de resistencia a MLF en *Leishmania* podría ser multifactorial. En relación con el transporte del fármaco, se ha observado el bloqueo de la captación realizada por el complejo MT-Ros3 y el aumento del eflujo mediado por determinados transportadores ABC. Además, en los últimos años se han llevado a cabo numerosos estudios donde se ha comparado el genoma, el transcriptoma, el proteoma y el metaboloma de líneas sensibles y resistentes a MLF. Entre las diferencias observadas, puede destacarse la inducción de algunos genes de respuesta a estrés (Hsp60, Hsp83, sti1, Sir2, NADP-ADH) o la sobreexpresión de proteínas que protegen frente a las ROS (peroxirredoxinas, EF-1 β , FeSODA, SOD y APX) y frente a la apoptosis (PCNA, SKCRP14.1). N, núcleo; K, kinetoplasto. Adaptada de Gamarro *et al.*, 2013 y Carnielli *et al.*, 2014.

En otro orden de cosas, se ha observado que la resistencia a MLF en *Leishmania* puede deberse a una mayor capacidad para **evitar el proceso similar a apoptosis** que causa la muerte de estos parásitos al incorporar el fármaco (Vergnes *et al.*, 2007;

Moreira *et al.*, 2011; Mishra y Singh, 2013) (Fig. 22). Cuando se produce esta resistencia, los parásitos se protegen de la pérdida del potencial de la membrana mitocondrial, la pérdida gradual de ATP y la liberación del citocromo c desde la mitocondria al citosol (Mishra y Singh, 2013). Además, esta adaptación puede conducir a un fenómeno de multirresistencia a otros fármacos que actúan produciendo ROS e induciendo este tipo de muerte celular, como los antimoniales y la anfotericina B (Vergnes *et al.*, 2007; Moreira *et al.*, 2011).

El mecanismo de la resistencia clínica a MLF podría ser multifactorial (Fig. 22), según se desprende de un reciente estudio proteómico donde se ha visto que líneas sensibles y resistentes a MLF procedentes de aislados clínicos presentan diferencias de expresión de proteínas relacionadas con la homeostasis redox, la respuesta al estrés celular, la protección frente a la apoptosis y la translocación del fármaco (Carnielli *et al.*, 2014). Algunas de estas proteínas ya se habían asociado previamente con resistencia a fármacos leishmanicidas. Es el caso de la chaperona **Hsp60**, que también se ha visto aumentada en líneas resistentes a antimoniales (Matrangolo *et al.*, 2013), y que pertenece a una clase de proteínas que se ha asociado con la prevención de la activación de la muerte celular programada, mediante la modulación de múltiples eventos de las rutas apoptóticas (revisado por Beere, 2004; Folgueira y Requena, 2007). También se observó un aumento de la proteína **sti1**, producida en respuesta a situaciones de estrés (Hombach *et al.*, 2013) y que forma un complejo con **Hsp83**, una proteína relacionada anteriormente con resistencia a MLF y antimoniales (Vergnes *et al.*, 2007) y que interfiere con el potencial de membrana mitocondrial, reduciendo la muerte celular programada. Otra proteína que también se había asociado con protección frente a la apoptosis inducida por la MLF en ese estudio fue **SKCRP14.1**, que es una proteína tipo calpaína (Vergnes *et al.*, 2007).

Volviendo a este reciente estudio proteómico, también se observó un aumento del antígeno nuclear de proliferación celular (**PCNA**), que participa en la replicación y reparación del DNA, y que también se ha observado aumentado en líneas resistentes a antimoniales (Kumar *et al.*, 2010; Matrangolo *et al.*, 2013). De este modo, los parásitos podrían hacer frente a la fragmentación del DNA que tiene lugar durante el proceso apoptótico (Carnielli *et al.*, 2014). Por otro lado, se observó un aumento de la **subunidad β de la ATPasa mitocondrial**, que es el elemento catalítico de un transportador de H^+ y que, en levaduras, se ha relacionado con la función y regulación de un eflujo mediado por transportadores ABC y se ha asociado con multirresistencia a fármacos (Zhang y Moye-Rowley, 2001).

Otras proteínas que estaban aumentadas en los parásitos resistentes a MLF analizados en este estudio proteómico fueron la alcohol deshidrogenasa dependiente de NADP (**NADP-ADH**), el factor de elongación 1β (**EF-1 β**) y las peroxirredoxinas mitocondrial y citosólica (Carnielli *et al.*, 2014), todas ellas con un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis redox. La NADP-ADH, también conocida como NADP aldehído reductasa, cataliza la oxidación reversible de etanol a acetaldehído (Reid y Fewson, 1994). En levaduras se ha observado que, en condiciones de estrés oxidativo, la actividad aldosa reductasa es responsable del 40% de la detoxificación del metilglioxal (Gomes *et al.*, 2005). El complejo EF-1 β tiene, entre otras funciones, actividad tripanotión-S-transferasa y actividad peroxidasa (Vickers *et al.*, 2004). Por su parte, la sobreexpresión de las **peroxirredoxinas**, que son las principales enzimas antioxidantes de los tripanosomátidos (Wilkinson *et al.*, 2000), protege de la muerte

celular programada inducida por peróxido de hidrógeno (Harder *et al.*, 2006) y se ha asociado con resistencia a antimoniales (Matrangolo *et al.*, 2013). Relacionado con este hallazgo, la sobreexpresión de la superóxido dismutasa A mitocondrial de hierro (**FeSODA**) también origina resistencia a MLF (Getachew y Gedamu, 2012). Además, en otro estudio en el que se comparó el transcriptoma de una línea sensible y otra resistente a MLF, realizado mediante PCR en tiempo real, se observó un aumento en la expresión del gen FeSODA y del gen del regulador de información silenciado 2 (**Sir2**) (Mishra y Singh, 2013). Ambos están involucrados en la respuesta al estrés celular asociado con la muerte celular por apoptosis.

También se han realizado estudios comparativos mediante microarrays del perfil de expresión génica de líneas sensibles y experimental o clínicamente resistentes a MLF, observándose diferencias de expresión de genes relacionados con los mecanismos de replicación y reparación del DNA, la síntesis y degradación de proteínas, el metabolismo lipídico y el metabolismo oxidativo, entre otros (Das *et al.*, 2013; Kulshrestha *et al.*, 2014). Anteriormente se había visto que la resistencia a MLF altera el metabolismo de ácidos grasos y de esteroides, cambiando la composición lipídica de la membrana plasmática de los promastigotes, y alterando su fluidez y su permeabilidad, lo que puede afectar a las interacciones del fármaco con la membrana (Rakotomanga *et al.*, 2005). En un reciente estudio sobre transcriptoma, se comprobó que una línea procedente de un aislado clínico resistente a MLF tenía **mayor capacidad para eliminar las ROS** respecto a la línea sensible, presentando mayor actividad superóxido dismutasa (**SOD**), enzima que convierte el ion superóxido en H₂O₂, y ascorbato peroxidasa (**APX**), que transforma el H₂O₂ en agua. Estos cambios en la línea resistente disminuirían el nivel intracelular de ROS, evitando el daño mitocondrial ocasionado por la MLF que conduce a la muerte celular por apoptosis (Das *et al.*, 2013).

Existen además otras proteínas, cuyo mecanismo se desconoce, que también se han asociado con la resistencia *in vitro* a MLF. Es el caso del factor de iniciación **eIF4A** (Singh *et al.*, 2008), el producto de un gen que codifica una **proteína de 299 kDa** (Choudhury *et al.*, 2008) y la histona 2A (**H2A**) (Singh *et al.*, 2010).

Además, cabe destacar otro estudio realizado con el objetivo de buscar otros genes que pudiesen estar implicados en la resistencia a MLF, que consistió en la secuenciación del genoma de distintas líneas resistentes *in vitro* de *L. major*. Se observaron **mutaciones en la piridoxal quinasa**, una enzima que participa en la formación de piridoxal-5-fosfato (vitamina B₆ activa). Al transfectar con el gen nativo de la piridoxal quinasa se obtuvieron parásitos sensibles a MLF, pero se desconoce el papel que podría jugar esta enzima en la susceptibilidad al fármaco (Coelho *et al.*, 2012). Además, durante este estudio se encontraron diferentes **mutaciones del transportador de MLF (MT)**, una P4-ATPasa que constituye un complejo con una proteína de la familia Cdc50, cuya importancia en el transporte de MLF y en el desarrollo de resistencia al fármaco es conocido por nuestro laboratorio desde hace tiempo y cuyos antecedentes se desarrollarán en el siguiente capítulo de esta tesis doctoral.

Por último, recientemente se están realizando estudios sobre el impacto de la resistencia a MLF en el ciclo de vida de *Leishmania*. Esta resistencia se ha relacionado en *L. major* con un incremento de la metaciclologénesis, habiéndose detectado un aumento de la expresión de **SHERP**, un gen que se expresa casi en exclusiva en las fases infectivas del parásito. A pesar de ello, esta línea resistente presentó una virulencia

atenuada respecto a la línea salvaje, lo que indicaría que los parásitos resistentes desarrollan un menor *fitness* que los sensibles (Turner *et al.*, 2015). Sin embargo, en otro estudio realizado con *L. donovani* se ha observado que los promastigotes resistentes a MLF toleran mejor que los sensibles situaciones de estrés propias del interior del macrófago como el pH ácido y altas temperaturas (García-Hernández *et al.*, 2015). Estos estudios son complementarios a diversos estudios metabolómicos realizados recientemente, en los que se han podido observar adaptaciones metabólicas en líneas resistentes a MLF que tendrían como objetivo hacer frente al estrés oxidativo que se produce tras el tratamiento con el fármaco (Berg *et al.*, 2015). Por ejemplo, se ha encontrado un aumento en los niveles de determinados compuestos de la ruta de las poliaminas y la biosíntesis de tripanotión (arginina, ornitina, citrulina, espermidina, glutationil espermidina y tripanotión disulfuro) (Canuto *et al.*, 2014). En este estudio se observó además un importante aumento en los niveles de numerosos aminoácidos, lo que podría relacionarse con una adaptación para la supervivencia dentro de la vacuola parasitófora, de tal manera que los parásitos resistentes podrían mantener su *fitness* en un ambiente en el que hay un reducido aporte de aminoácidos.

IV. COMPLEJO DE TRANSPORTE DE MILTEFOSINA EN *LEISHMANIA*

IV.1. Internalización de miltefosina en *Leishmania*

La MLF es un fármaco de administración oral y *Leishmania* es un parásito intracelular obligado de macrófagos. Por ello, hasta poder ejercer su acción leishmanicida, la MLF debe atravesar hasta cinco barreras biológicas: 1) epitelio gastrointestinal; 2) endotelio de los capilares sanguíneos; 3) membrana del macrófago (célula hospedadora); 4) membrana del fagolisosoma, y 5) membrana plasmática del parásito.

Aunque es posible que la MLF atravesase todas estas barreras de forma parecida (Gamarro *et al.*, 2013), el paso que más se ha estudiado es el de la membrana plasmática del parásito. La MLF se transporta en forma de micelas o unida a albúmina, que actúa como reservorio del fármaco. Como la MLF es soluble en agua y puede unirse a monocapas lipídicas (Rakotomanga *et al.*, 2005), se establece un equilibrio entre la fracción unida a albúmina y la fracción unida a las membranas celulares (Pérez-Victoria *et al.*, 2003a). Para poder atravesar la membrana plasmática de *Leishmania*, se ha observado que la MLF requiere de su anclaje en su cara externa en forma monomérica y su posterior internalización, en un proceso dependiente de energía y de proteínas (Araújo-Santos *et al.*, 2003; Pérez-Victoria *et al.*, 2003a; Pérez-Victoria *et al.*, 2006b) (Fig. 23).

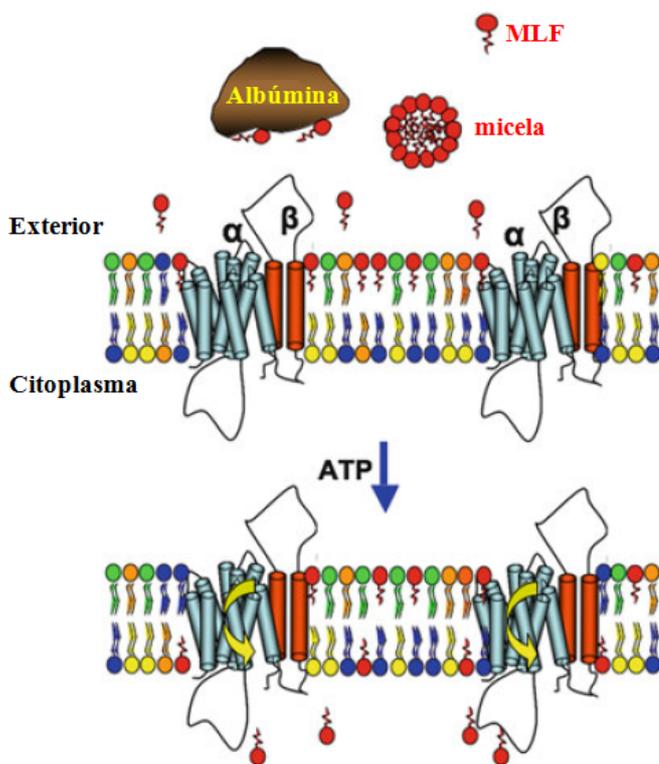


Figura 23. Mecanismo de internalización de miltefosina propuesto para *Leishmania*.

La miltefosina (MLF), en forma de micelas o unida a albúmina, se inserta en la cara externa de la membrana plasmática en forma monomérica y es internalizada hacia la cara citosólica por una P4-ATPasa denominada MT, en un proceso dependiente de ATP. Se representan las subunidades α (MT) y β (Ros3, perteneciente a la familia de proteínas Cdc50) del complejo de transporte de MLF. Adaptada de Gamarro *et al.*, 2013.

La MLF y otros compuestos antitumorales como la edelfosina o la perifosina son análogos sintéticos de lisofosfolípidos y pueden ser transportados mediante proteínas con **actividad flipasa**. Esto explica que se observase, inicialmente en levaduras, que la translocación hacia el interior de la célula de estos compuestos está mediada por un complejo translocasa de fosfolípidos situado en la membrana plasmática (Kato *et al.*, 2002; Hanson *et al.*, 2003). También se ha observado que algunas células tumorales translocan eficientemente MLF y perifosina mediante un proceso dependiente de energía (Muñoz-Martínez *et al.*, 2008). Además, la coexpresión de las proteínas humanas ATP8B1 y CDC50A promueve la internalización de aminofosfolípidos, edelfosina y perifosina en células tumorales (Muñoz-Martínez *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2011).

Al igual que en levaduras, el transporte de MLF también es llevado a cabo en *Leishmania* por un complejo situado en la membrana plasmática, que actúa como translocasa de fosfolípidos y que es además responsable de la internalización de edelfosina y de análogos de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina (Pérez-Victoria *et al.*, 2003b y 2006a). Este complejo inicialmente se describió en *L. donovani* y está constituido por una flipasa perteneciente a la familia de las P4-ATPasas, denominada **LdMT** (*L. donovani* Miltefosine Transporter), y por **LdRos3** (*L. donovani* Ros3), subunidad de 363 aminoácidos perteneciente a la familia Cdc50. La expresión de LdMT es necesaria, pero no suficiente, para que se produzca en la membrana plasmática la translocación de glicerosfosfolípidos y de MLF. Esta proteína tiene 1.097 aminoácidos y presenta homología con las P4-ATPasas humanas ATP8A1 y ATP8B1 y con las P4-ATPasas de *Saccharomyces cerevisiae* Drs2p, Dnf1p y Dnf2p.

Para que tenga lugar el transporte de MLF, es esencial la interacción de las dos subunidades del complejo. LdRos3 es esencial para que LdMT se localice en la membrana plasmática y ejerza su función. Además, LdRos3 se localiza en la membrana plasmática exclusivamente cuando el parásito expresa LdMT, puesto que de lo contrario queda retenida en el retículo endoplasmático (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a y 2006b). Mediante co-inmunoprecipitación y posterior análisis del complejo mediante espectrometría de masas MS/MS se ha observado que ambas proteínas interaccionan de manera estable y que el transportador no interacciona con ninguno de los otros miembros de la familia Cdc50 de *Leishmania* (Weingärtner *et al.*, 2010).

En *L. donovani*, la sobreexpresión de LdMT produce un incremento en los niveles de sensibilidad a MLF, debido a la capacidad para incorporar mayores cantidades del fármaco. Del mismo modo, la transfección de LdMT en *Leishmania tarentolae*, especie naturalmente resistente a MLF, produce un notable incremento en la sensibilidad al fármaco (Pérez-Victoria *et al.*, 2003b). Sin embargo, una sobreexpresión de LdRos3 no incrementa los niveles de sensibilidad al fármaco (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a).

En otro orden de cosas, solo cuando la cantidad de MLF unida a la membrana plasmática del parásito es extraordinariamente alta, se debe considerar otro mecanismo de internalización, relacionado con la **ruta endocítica** (Gamarro *et al.*, 2013). En este caso, los monómeros de MLF integrados en la membrana pasan a formar parte de las vesículas endocíticas que se están formando, lo que permite su paso al interior del parásito.

IV.2. Complejo de transporte de miltefosina y resistencia al fármaco

Una de las causas fundamentales de resistencia a MLF observadas *in vitro* es la **disminución en la entrada del fármaco** al parásito (Fig. 22) (Pérez-Victoria *et al.*, 2003a, 2003b y 2006a). Para explicar cómo se descubrió este mecanismo en nuestro laboratorio y la implicación en el mismo del complejo de transporte de MLF conviene decir, en primer lugar, que en *Leishmania* la resistencia a MLF se puede generar *in vitro* mediante adaptación a concentraciones crecientes del fármaco de forma rápida y sencilla. Por ejemplo, se han generado promastigotes de *L. donovani* con un fenotipo de resistencia de 15 veces a MLF y resistencia cruzada a edelfosina, manteniendo su sensibilidad a otros fármacos leishmanicidas (Seifert *et al.*, 2003). Los parásitos resistentes acumulaban tan solo alrededor del 3% de la cantidad de MLF acumulada por los parásitos salvajes (Pérez-Victoria *et al.*, 2003a). Estos parásitos tenían un fenotipo estable en ausencia de presión de fármaco y no presentaban amplificación génica ni sobreexpresión de ABCB4/Pgp. Además, se observó que eran deficientes en la translocación al interior celular no solo de MLF, sino también de análogos fluorescentes de glicerofosfolípidos, en un proceso dependiente de proteínas, de temperatura y energía. El metabolismo del fármaco, el eflujo del fármaco o la actividad endocítica no se veían alterados, por lo que la resistencia se basaba principalmente en la internalización de la MLF (Pérez-Victoria *et al.*, 2003a).

Esta línea resistente permitió identificar mediante rescate funcional la proteína implicada en el transporte de MLF, **LdMT**, cuya inactivación por mutaciones puntuales bloquea la incorporación tanto de MLF como de glicerofosfolípidos al interior celular (Pérez-Victoria *et al.*, 2003b). Ambos alelos presentaban dos mutaciones diferentes que impedían que LdMT pudiese llevar a cabo su función de transporte, de manera que la entrada del fármaco al interior del parásito se veía notablemente afectada. La transfección con el gen salvaje restableció la sensibilidad al fármaco en esta línea mutada. Por otro lado, tras realizar una mutagénesis al azar en la cepa salvaje, se pudo constatar que los clones resistentes a MLF obtenidos contenían mutaciones en este gen que anulaban su función.

En otro estudio posterior se corroboró la contribución de LdMT en el transporte de MLF. A partir de parásitos sensibles a MLF se obtuvo una línea con uno de los alelos de *LdMT* delecionados que mostró una disminución en la entrada del fármaco y una sensibilidad al mismo reducida a la mitad. Mediante la obtención de una línea delecionada para ambos alelos de *LdMT* (Δ LdMT), se confirmó que LdMT está implicada en la entrada de MLF en el parásito, puesto que su pérdida reduce la captación a valores muy bajos (<3%), originando resistencia a MLF (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a) (Fig. 22). La deleción del transportador da lugar a que la subunidad beta LdRos3 quede retenida en el retículo endoplasmático. Estos mutantes nulos también presentan una deficiencia en la translocación de glicerofosfolípidos endógenos, afectando a la asimetría de los fosfolípidos de membrana, sin que se vea afectada la composición en fosfolípidos (Weingärtner *et al.*, 2010).

Las formas amastigotes intracelulares procedentes de los mutantes Δ LdMT y la línea resistente con mutaciones inactivantes de LdMT son resistentes a MLF tanto en cultivo de macrófagos *in vitro* como en ratones infectados (Seifert *et al.*, 2007;

Weingärtner *et al.*, 2010), sin que se afecte su capacidad infectiva de macrófagos ni su virulencia.

Más adelante se identificó otra línea de *L. donovani* con altos niveles de resistencia a MLF que tenía un alelo de *LdMT* inactivo y el gen *LdRos3* mutado en su codón de iniciación (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a; Pérez-Victoria *et al.*, 2006b). Esto indica que ambas proteínas se ven sometidas a una alta presión selectiva cuando se administra MLF, y que el fenotipo de alta resistencia a MLF es el mismo sea cual sea la proteína afectada. Igual que se hizo con *LdMT*, se obtuvo una línea con ambos alelos de *LdRos3* delecionados (Δ LdRos3), observándose que la deleción en *L. donovani* de las dos copias de esta proteína también confiere resistencia a MLF dando lugar a que el transportador *LdMT* quede retenido en el retículo (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a). Además, la sobreexpresión de los otros dos miembros de la familia *Cdc50* (*LdRos1* y *LdRos2*) no logró restaurar la sensibilidad a MLF en los mutantes nulos para *LdRos3*.

Tanto en nuestro laboratorio como en estudios realizados por otros grupos se han encontrado mutaciones en el transportador de MLF en líneas de *Leishmania* resistentes al fármaco. Se han observado diferentes mutaciones tanto en parásitos generados *in vitro* (V176D, G276R, T420N, A653V, G821D, G852D, G852E, L856P, I914T, F414S + F430S + G824D, L366P + L780P + G824D) (Pérez-Victoria *et al.*, 2003b; Seifert *et al.*, 2007; Coelho *et al.*, 2012 y 2014; Vincent *et al.*, 2013; Kulshrestha *et al.*, 2014) como a partir de un aislado clínico de *L. infantum* de un paciente coinfectado con VIH después del tratamiento con el fármaco (L832F) (Cojean *et al.*, 2012). La mutación T420N afecta a la secuencia motivo invariable DKTG (dominio P; Figura 4) que contiene el residuo de aspártico fosforilado durante el ciclo de reacción de las P4-ATPasas, mientras que la mayoría de las restantes se encuentran en el gran lazo citosólico entre los segmentos TM4 y TM5, que alberga esta secuencia motivo y el dominio N (esquema en Figura 4).

Por otro lado, se ha determinado que existe una buena correlación en diferentes especies de *Leishmania* entre los niveles de expresión de las dos proteínas del complejo de transporte de MLF en la membrana plasmática, la acumulación del fármaco y la sensibilidad al mismo. Diversos aislados de *L. braziliensis* que mostraban una gran reducción en la captación de MLF presentaron una reducción en la expresión de *LbMT* (ortólogo de *LdMT*) en la membrana plasmática. Este hecho se asoció a la reducción en la expresión de *LbRos3* (ortólogo de *LdRos3*) sin que existiesen modificaciones significativas en los niveles globales de expresión de *LbMT* en comparación con los niveles de expresión de las proteínas ortólogas de *L. donovani*. La transfección en estos parásitos de *LbRos3* incrementó la expresión en la membrana plasmática tanto de *LbRos3* como de *LbMT*. Estos transfectantes, tanto en las formas promastigotas como amastigotas, adquirieron niveles de sensibilidad a MLF similares a los obtenidos para *L. donovani* (Sánchez-Cañete *et al.*, 2009). Por tanto, una baja expresión del complejo *LMT-LRos3* en la membrana plasmática está asociada con un descenso en la captación de MLF y en la sensibilidad de los parásitos a este compuesto.



La proteína LiRos3, de la especie endémica en España *L. infantum*, pertenece a la familia de proteínas Cdc50, cuya asociación con la mayoría de miembros de las fosfolípido translocasas (P4-ATPasas) es esencial para que se produzca la salida del retículo endoplasmático del complejo que constituyen así como para que se pueda llevar a cabo su actividad de transporte una vez que alcanza su localización correcta.

Las proteínas Cdc50 tienen una estructura muy conservada entre las células eucariotas pero carecen de motivos aminoacídicos funcionales conocidos. Su caracterización se encuentra todavía en una etapa inicial, siendo muy pocos los estudios moleculares realizados con el objeto de identificar los residuos implicados en su funcionalidad.

La miltefosina, el primer fármaco oral frente a la leishmaniasis y uno de los fármacos más empleados frente a esta enfermedad, se internaliza en *Leishmania* por la acción de un complejo constituido por una P4-ATPasa denominada LMT y por la subunidad beta LRos3. Nuestro laboratorio ha demostrado que la inactivación por mutaciones puntuales de LMT, la subunidad catalítica de este complejo de transporte, así como la pérdida de cualquiera de las dos subunidades, conllevan la aparición de elevados niveles de resistencia a miltefosina. Además, una baja expresión de este transportador en la membrana plasmática está asociada con un descenso en la captación de miltefosina y en la sensibilidad de los parásitos a este compuesto.

Teniendo en consideración estos antecedentes, nos propusimos como **objetivo general** caracterizar la proteína LiRos3 de *L. infantum*, analizando su implicación en el tráfico a la membrana plasmática y en la actividad del complejo de transporte LiMT-LiRos3 y, por tanto, en la sensibilidad y resistencia a miltefosina.

Para lo cual se plantearon los siguientes **objetivos específicos**:

1. Identificar residuos invariables entre las proteínas Cdc50 de humanos, levaduras y *Leishmania*, y analizar en LiRos3 cuáles de ellos son críticos para el transporte de miltefosina en *Leishmania*.
2. Analizar la expresión de LiMT en la membrana plasmática y la interacción con los mutantes de LiRos3 para conocer la implicación de los residuos invariables sobre el tráfico del complejo de transporte de miltefosina.
3. Determinar la actividad de transporte en aquellos mutantes que presenten reducción en la tasa de captación de miltefosina sin que se detecten alteraciones en el tráfico del complejo hacia la membrana plasmática.
4. Estudiar el efecto que se deriva de la pérdida del estado glicosilado de LiRos3 a nivel de la interacción con LiMT, la expresión del complejo en la membrana plasmática, la acumulación de miltefosina y la sensibilidad al fármaco.
5. Determinar las funciones de los diferentes dominios de LiRos3, y la posibilidad de que puedan ser reemplazados por los dominios de las otras dos proteínas Cdc50 presentes en *L. infantum*: LiRos1 y LiRos2.

6. Estudiar si los cambios en la sensibilidad al fármaco observados en los transfectantes en su fase de promastigote se mantienen en las formas amastigotas intracelulares de *Leishmania*.



I. MATERIALES

I.1. Líneas celulares

Parásitos: La línea empleada en este estudio fue *Leishmania infantum*, cepa MHOM/ES/1993/BCN-99.

Bacterias. Se utilizaron las siguientes cepas, correspondientes a la especie *Escherichia coli*:

- **DH5 α :** *supE44 Δ lacU169 (ϕ 80lacZ Δ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1* (GibcoBRL).

- **XL10-GOLD[®]:** Tet^R Δ (*mcrA*)183 Δ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI^q Z Δ M15 Tn10 (Tet^R) Amy Cam^R]^a* (Stratagene).

Células THP-1: línea celular mielomonocítica humana THP-1 (ATCC TIB-202).

I.2. Medios y reactivos de cultivo

I.2.1. *Leishmania infantum*

RPMI 1640 modificado suplementado con 20% de hiFBS: Este medio de cultivo se compone de 8,32 g de RPMI 1640 (Gibco); 4,75 g de HEPES; 1,6 g de bicarbonato sódico; 100 ml de solución de aminoácidos orgánicos y azúcares 10X, y 0,2 ml de solución de vitaminas (100X) en 800 ml de H₂O. El pH se ajusta a 7,2. El medio se esteriliza mediante filtración y, finalmente, se suplementa con suero bovino fetal inactivado por calor (hiFBS) (Invitrogen) al 20%. La inactivación del hiFBS se lleva a cabo a 56 °C durante 45 min. Para la obtención de medio semisólido se añadió agar al 1%, mezclando para ello medio de cultivo 2X y agar al 2% fundido.

Solución de aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos (SAA 10X): Esta solución se adiciona al medio de cultivo y está constituida por 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; α -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 mg/ml; clorhidrato de piridoxal 1 mg/ml; clorhidrato de tiamina 1 mg/ml; I-inositol 20 mg/ml; nicotinamida 1 mg/ml, y riboflavina 0,1 mg/ml.

Medio M-199: Gibco. Este medio se suplementa con hiFBS al 10%.

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

Higromicina B (Invitrogen): Antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus*. Se trata de un aminoglucósido utilizado frente a células procariotas y eucariotas que actúa inhibiendo la síntesis proteica. Se adicionó al medio en un rango de concentraciones comprendidas entre 40 y 500 µg/ml para la selección de parásitos transfectados con una construcción que contenía el cassette HYG diseñada para la obtención de promastigotes delecionados del gen *LiRos3*, como se describirá con detalle en el apartado II.4.

Geneticina (G-418) (Gibco): Antibiótico producido por la bacteria *Micromonospora rhodorangea*. Se trata de un aminoglicósido análogo de la neomicina que actúa bloqueando la síntesis proteica en células procariotas y eucariotas. Se utilizó como antibiótico de selección de los parásitos transfectados con el vector de expresión pXG-GFP+, que contiene el gen de la neomicina fosfotransferasa. Se utilizó en un rango de concentraciones comprendidas entre 5 y 200 µg/ml para la selección de parásitos transfectados y para modificar los niveles de expresión de las proteínas. Para el mantenimiento de las líneas transfectadas se empleó una concentración de 50 µg/ml.

Nourseotricina (Werner BioAgents): Antibiótico producido por la bacteria *Streptomyces noursei*, activo frente a procariotas y eucariotas. Su mecanismo de acción consiste en la inhibición de la síntesis proteica y en la introducción de errores de lectura. Se utilizó en un rango de concentraciones comprendidas entre 10 y 100 µg/ml para la selección de parásitos transfectados con el vector de expresión pIR1SAT, mientras que para el mantenimiento de las líneas transfectadas se empleó una concentración de 50 µg/ml.

I.2.2. Bacterias

LB líquido: Contiene 10 g de bacto triptona, 10 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura en 1 L de agua bidestilada. pH 7,5. Esterilizado mediante autoclave.

LB-Agar: Bacto Agar al 1,5% en LB líquido. Esterilizado mediante autoclave.

Medio NZY⁺ para mutagénesis: Contiene 10 g de NZ amina (caseína hidrolizada), 5 g de extracto de levadura y 5 g de NaCl en 1 L de agua bidestilada. pH 7,5. Esterilizado mediante autoclave. Previo a su utilización, es necesario adicionar 12,5 ml de una solución de MgCl₂ 1 M; 12,5 ml de una solución de MgSO₄ 1 M y 20 ml de una solución de glucosa 20%.

Medio de congelación: 15% de glicerol en LB líquido.

I.2.3. Células THP-1

Esta línea de monocitos se mantiene a 37 °C con 5% de CO₂ en medio RPMI 1640 suplementado con hiFBS al 10%, L-glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml.

PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) (Sigma): Se emplea para inducir la diferenciación de los monocitos THP-1 a macrófagos.

I.3. Tampones, soluciones y reactivos

I.3.1. 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 HBS: NaCl 137 mM; KCl 5 mM; Na₂HPO₄ 7 mM; glucosa 6 mM y Hepes 21 mM. pH 7,4. Utilizado durante la transfección de parásitos.

Tampón fosfato salino (PBS): NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; KH₂PO₄ 1,8 mM y Na₂HPO₄ 10 mM. pH 7,4. Solución isotónica empleada para la preparación de algunos reactivos, como medio de determinadas reacciones y para el lavado de los parásitos.

Tampón TE: Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM. pH 7,4. Utilizado para la resuspensión del DNA.

I.3.2. Soluciones para Southern blot

Solución de despurinización: HCl 0,25 M.

Solución de desnaturalización: NaCl 1,5 M; NaOH 0,5 M.

Solución de neutralización: NaCH₃COO 3 M; pH 5.5.

Solución de transferencia (SSC 20X): NaCl 3 M; citrato sódico 0,3 M. pH 7.

I.3.3. Soluciones y reactivos para la hibridación de ácidos nucleicos y su detección mediante el sistema DIG

Anticuerpo anti-digoxigenina-AP: Roche.

NBT/BCIP: Solución de Nitroazul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato. Roche.

Reactivo de bloqueo: Blocking reagent 10 g (Roche); solución de ácido maleico 100 ml. Disuelto por calentamiento. La solución obtenida se autoclava y se conserva a 4 °C.

Solución de ácido maleico: Ác. maleico 100 mM; NaCl 150 mM; pH 7,5. Autoclavada y conservada a 4°C.

Solución de bloqueo: Reactivo de bloqueo 10 ml; solución de ácido maleico 90 ml.

Solución de detección: Tris-HCl 0,1 M; NaCl 0,1 M; MgCl₂ 50 mM; pH 9,5.

Solución de hibridación: DIG Easy Hyb Granules. Roche.

Solución de lavado I: SSC 2X; SDS 0,1 %.

Solución de lavado II: SSC 0,1X; SDS 0,1 %.

Solución de lavado III: Solución de ácido maleico; Tween 20 3%.

I.3.4. Reactivos de Biología Molecular

5-bromo-4-cloro-3-indol- β -galactopiranósido (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.

DIG DNA Labeling Mix: Mezcla de dATP 1 mM, dCTP 1 mM, dGTP 1 mM, dTTP 0,65 mM y DIG-11-dUTP 0,35 mM; pH 7,5. Usada para obtener sondas de DNA marcadas con digoxigenina (DIG). Roche.

Enzimas de restricción: Roche, Fermentas.

Fenol: Sigma.

Filtros nylon Hybond-N[®]: Membranas optimizadas para Southern blot. GE Healthcare.

Fosfatasa alcalina: Roche.

Fragmento de Klenow: Roche.

Gel Extraction Kit[®]: Kit de limpieza de DNA. Omega.

Isopropil- β -D-tiogalacto-piranósido (IPTG): Roche. Solución 0,5 M en agua.

Marcadores de peso molecular: lambda DNA/*Hind*III (Promega); phi174 DNA/*Hae*III (Promega); Gene Ruler[®] 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

Mezcla de hexanucleótidos: Solución 10X de hexanucleótidos con secuencias aleatorias usados como cebadores por el fragmento de Klenow. Roche.

PCR Extender System: Kit para amplificar fragmentos de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). 5 Prime.

Plasmid Mini Kit[®]: Kit de extracción de DNA plasmídico a pequeña escala. Omega.

Puregene[®]: Kit de aislamiento de DNA genómico. Gentra Systems.

QuikChange II XL site-directed mutagenesis kit[®]: Kit para realizar mutagénesis dirigida *in vitro*. Stratagene.

T4 DNA ligasa: Invitrogen.

I.3.5. Soluciones y reactivos para el análisis de proteínas

Acrilamida-bisacrilamida: Bio-Rad.

Bio-Rad Protein Assay: Bio-Rad. Empleado para medir la concentración de proteínas.

n-dodecil- β -D-maltopiranosido (DDM): Thermo Scientific. Detergente no iónico muy usado para trabajar con proteínas de membrana (VanAken *et al.*, 1986).

Ditiotreitol (DTT): Sigma. Agente reductor capaz de romper los puentes disulfuro de las proteínas. Preparado a una concentración de 1 M en agua bidestilada.

IGEPAL[®] CA-630: Sigma. Detergente no iónico, químicamente indistinguible del Nonidet P-40.

Inhibidores de proteasas: Cóctel que contiene AEBSF (4-(2-aminoetil)-benceno sulfonilo fluoruro clorhidrato), aprotinina, bestatina, E64, leupeptina y pepstatina A. Pierce.

Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF): Inhibidor de proteasas. Sigma. Se disolvió en isopropanol a una concentración de 17,4 mg/ml (100 mM).

Marcadores de peso molecular: Kaleidoscope Prestained Standards (Bio-Rad); PageRuler[®] Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

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

Persulfato de amonio: Sigma. Preparado a una concentración de 100 mg/ml en agua destilada.

Rojo Ponceau-S: Sigma.

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

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 corrida 10X: Tris-HCl 250 mM; glicina 1,92 M; SDS 1%. pH 8,3. Filtrado.

Tampón de lisis A (extracto total de proteínas): Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; DDM 5%. pH 7,4.

Tampón de lisis B (biotinilación): Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; SDS 0,1%; Nonidet P-40 2%. pH 7,4.

Tampón de lisis C (co-inmunoprecipitación): PBS; DDM 2%. pH 7,4.

Tampón de lisis D (desglicosilación): Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; Nonidet P-40 1%. pH 7,4.

Tampón citrato: Citrato sódico 0,1 M. pH 2.

Tampón de muestra 2X (tampón de Laemmli): Tris-HCl 100 mM; SDS 4%; glicerol 20%; DTT 200 mM; 0,2% azul de bromofenol. pH 6,8.

I.3.6. Soluciones y reactivos para Western blot e inmunodetección

Albúmina de suero bovino (BSA): Sigma.

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

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

Anticuerpo anti-gp63: Anticuerpo monoclonal de ratón proporcionado por el Profesor Antonio Jiménez Ruiz (Universidad de Alcalá; Alcalá de Henares). Empleado para detectar la glicoproteína de superficie gp63, usada para el control de carga de proteínas de membrana.

Anticuerpo anti- α -tubulina: Anticuerpo monoclonal de ratón, empleado para el control de carga de proteínas. Sigma-Aldrich.

Anticuerpo anti-LdMT: Anticuerpo policlonal de conejo generado previamente en el laboratorio (Sánchez-Cañete *et al.*, 2009) que reconoce epítomos intracelulares de la proteína LiMT.

Anticuerpo anti-LdRos1: Anticuerpo policlonal de conejo generado previamente en el laboratorio (Sánchez-Cañete, 2009, Tesis Doctoral) dirigido frente al lazo extracitoplasmático de LdRos1. Se empleó para detectar la proteína quimérica que contiene ese lazo.

Anticuerpo anti-LdRos2: Anticuerpo policlonal de conejo generado previamente en el laboratorio (Sánchez-Cañete, 2009, Tesis Doctoral) dirigido frente al lazo extracitoplasmático de LdRos2. Se empleó para detectar la proteína quimérica que contiene ese lazo.

Anticuerpo anti-LdRos3: Anticuerpo policlonal de conejo generado previamente en el laboratorio (Sánchez-Cañete *et al.*, 2009) dirigido frente al segmento extracelular de LdRos3. Fue empleado para detectar todas las proteínas que contenían el lazo extracelular de la proteína LiRos3.

Membranas de transferencia Immobilon[®]-P (PVDF): Membranas de polifluoruro de vinilideno, optimizadas para Western blot. Millipore.

Solución de bloqueo: Leche desnatada en polvo al 5% en PBS.

Solución de inmunodetección: PBS con BSA al 0,1% y Tween 20 al 0,01%.

Sustrato ECL para Western Blot: Pierce.

Tampón de transferencia: Tris base 25 mM; glicina 192 mM y metanol 10%.

Tween 20: Merck.

I.3.7. Soluciones y reactivos para los ensayos de microscopía

Albúmina de suero bovino (BSA): Sigma.

Anticuerpo anti-BiP: Anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra la proteína de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina (BiP), localizada en el retículo endoplasmático de los promastigotes. Proporcionado por el Profesor James D. Bangs (Universidad de Búfalo; Búfalo, Estado de Nueva York, Estados Unidos).

Anticuerpo anti-IgG de conejo conjugado con Alexa FluorTM 594: Anticuerpo de cabra. Molecular Probes.

Glicina: Sigma.

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

Paraformaldehído: Sigma.

Tampón IFI: PBS + BSA 0,1%.

Triton X-100: Panreac.

I.3.8. Soluciones y reactivos para el estudio funcional de la proteína LiRos3

Albúmina de suero bovino (BSA): Sigma.

Anti-GFP-bolas magnéticas: MBL.

Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio (MTT): Sigma. Solución stock 5 mg/ml en PBS.

DAPI (dilactato de 4',6-diamidino-2-fenilindol): Invitrogen. Utilizado en su forma "Prolong[®] Gold antifade reagent with DAPI". Usado para la tinción de núcleos en muestras fijadas para microscopía.

Dimetilsulfóxido (DMSO): Sigma.

Dodecil sulfato sódico (SDS): Sigma. Solución stock al 20% en agua destilada.

EZ-LinkTM Sulfo-NHS-SS-biotina: Pierce. Sulfosuccinimidil-2-(biotinamido)etil-1,3-ditiopropionato. Empleado para marcar las proteínas de superficie en los experimentos de biotilación.

Líquido de centelleo Ecolume™: MP Biomedicals.

Miltefosina (hexadecilfosfocolina): Zentaris.

[¹⁴C] Miltefosina (hexadecilfosfo[1,2-etilen-¹⁴C]colina); 1,33 MBq/mmol: Amersham Pharmacia Biotech.

NBD-fosfolípidos: Avanti Polar Lipids. Son análogos de fosfolípidos, con un grupo NBD (nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il) que les confiere fluorescencia. Se emplearon la 1-palmitoil-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil}-*sn*-glicero-3-fosfocolina (16:0-06:0 NBD-PC) y la 1-palmitoil-2-{6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-il)amino]hexanoil}-*sn*-glicero-3-fosfoetanolamina (16:0-06:0 NBD-PE).

Paraformaldehído: Sigma.

Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF): Empleado por ser un inhibidor inespecífico de fosfolipasas. Sigma. Se disolvió en isopropanol a una concentración de 100 mM.

PNGasaF (Péptido N-glicosidasa F): New England Biolabs.

Resina de estreptavidina-agarosa: Pierce. Empleada para aislar proteínas marcadas mediante biotilación.

Solución stop: BSA 4%; Vanadato 200 μM. Solución preparada en PBS empleada en los ensayos de acumulación de análogos fluorescentes de fosfolípidos.

Tampón HPMI: NaCl 132 mM; KCl 3,5 mM; MgCl₂ 0,5 mM; CaCl₂ 1 mM; glucosa 5 mM y Hepes 20 mM. pH 7,25. Utilizado en la acumulación de análogos fluorescentes de fosfolípidos.

Triton X-100: Panreac.

I.4. Vectores plasmídicos

I.4.1. Vectores de clonaje

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

I.4.2. Vectores de expresión para *Leishmania*

Todos los vectores han sido cedidos por el Dr. Stephen M. Beverley (Washington University, School of Medicine).

pIR1SAT: Puede emplearse como vector episomal o integrativo en el locus del gen RNA 18S (Robinson y Beverley, 2003). Contiene el gen *sat* que codifica la streptotricina acetiltransferasa y confiere resistencia a nourseotricina.

pXG-Hyg: Derivado del pXG (Ha *et al.*, 1996) que contiene el gen *hyg* que codifica la higromicin B fosfotransferasa y confiere resistencia a higromicina.

pXG-'GFP+: Derivado del pXG (Ha *et al.*, 1996) que permite crear proteínas fusionadas con GFP en el extremo carboxilo terminal. Contiene el gen *neo* que codifica la aminoglicósido 3'-fosfotransferasa y confiere resistencia a geneticina (G-418).

I.5. Oligonucleótidos

Oligonucleotidos empleados en la obtención de parásitos mutantes nul os Δ LiRos3

Secuencia (5' → 3')	
KORos3 5'-UTR Fw	AACGCAGACGCTTCGTGATGG
KORos3 5'-UTR Rv	GCATTTAAATTTTCGAGTGTGGCTTAGGGGGT
KORos3 3'-UTR Fw	GCATTTAAATTCTAGATCATGGCAGTGACACTTCT
KORos3 3'-UTR Rv	TAAGGCTGTCATCAACGTATG
HYG Fw	GTAGATCTACCACTTTCTGCCTTCTG
HYG Rv	GGAAGCTTCTATTCCTTTGCCCTCGGACG

Oligonucleótidos descritos en Pérez-Victoria *et al.*, 2006a. Los nucleótidos subrayados se corresponden con las secuencias agregadas para introducir sitios de restricción.

Oligonucleótidos empleados para la validación mediante PCR de la obtención de parásitos mutantes nul os Δ LiRos3

Secuencia (5' → 3')	
CheqKO.1	ATGCCTGCCAAGGTTGC
CheqKO.2	GGCTCCAATAATAGCAGCG
CheqKO.3	CGATCGGGATAGCAGCG
CheqKO.4	CTATGGATGCCGATGATG

Oligonucleótidos empleados para la obtención de sondas para validar mediante Southern blot la obtención de parásitos Δ LiRos3

	Secuencia (5' → 3')	Región amplificada
S1 forward S2 reverse	CGCACATCTATGCTCGTC GATCCATGATCGGGTGC	ORF de LiRos3
S3 forward S4 reverse	ATGCCTGCCAAGGTTGC GCAAAAGCTGTATGTGCGAGC	5'UTR de LiRos3

Oligonucleótidos empleados para el clonaje de LiRos3, LiRos1 y LiRos2

Secuencia (5' → 3')

LiRos3 Fw	<u>G</u> CCCCGGGTCATGGCGCCTCTACCCCCT
LiRos3 Rv	GCGGATCCCTACTCTGTATAGACTGGCATGATCA
LiRos1 Fw	GCCCCGGGGCTTGACTCGAGTCGCTTTAC
LiRos1 Rv	GCGGATCCTTAGATATCGTCGTCCTTCAGCAGCAT
LiRos2 Fw	GCCCCGGGGCACACGTTGCCTTAGTCTGTT
LiRos2 Rv	GCAGATCTTCAGATATCCGCGCGCTGGCCATTGCC

Los nucleótidos subrayados se corresponden con las secuencias agregadas para introducir sitios de restricción.

Oligonucleótidos empleados para la mutagénesis dirigida del gen *LiRos3*

Secuencia (5' → 3')

F_I14D	CACACTCGAAAAACCGCGATGAGCAGCAGCAACTGC
R_I14D	GCAGTTGCTGCTGCTCAT <u>TC</u> GCGGTTTTTCGAGTGTG
F_Q16L	GAAAAACCGCATTGAGCTGCAGCAACTGCCGC
R_Q16L	GCGGCAGTTGCTGCAGCTCAATGCGGTTTTTC
F_Q16N	GGAAAAACCGCATTGAGAATCAGCAACTGCCGCACATC
R_Q16N	GATGTGCGGCAGTTGCTGAT <u>TT</u> CTCAATGCGGTTTTTCG
F_Q17L	CGCATTGAGCAGCTGCAACTGCCGCAC
R_Q17L	GTGCGGCAGTTGCAGCTGCTCAATGCG
F_Q17N	GAAAAACCGCATTGAGCAGAA <u>TC</u> CAACTGCCGCACATCTATG
R_Q17N	CATAGATGTGCGGCAGTTGAT <u>TT</u> CTGCTCAATGCGGTTTTTC
F_L19Q	CATTGAGCAGCAGCAACAGCCGCACATCTATGC
R_L19Q	GCATAGATGTGCGGCTGTTGCTGCTGCTCAATG
F_L19V	CCGCATTGAGCAGCAGCAAGTGCCGCACATC
R_L19V	GATGTGCGGCACTTGCTGCTGCTCAATGCGG
F_S27K	CCGCACATCTATGCTCGTCATAAGCCGCTGTCTG
R_S27K	CAGACAGCGGCTTATGACGAGCATAGATGTGCGG
F_S27L	CGCACATCTATGCTCGTCATTGCGGCTGTCTG
R_S27L	CAGACAGCGGCAATGACGAGCATAGATGTGCGG
F_Y63D	CACGGCTTGATTTTCGCGACGATCATATCAACAGC
R_Y63D	GCTGTTGATATGATCGTCGCGAAAATCAAGCCGTG
F_Y63K	GACACGGCTTGATTTTCGCAAGGATCATATCAACAGCTACAAG
R_Y63K	CTTGATGCTGTTGATATGATCCTTGCGAAAATCAAGCCGTGTC
F_Y63F	GACACGGCTTGATTTTCGCTTCGATCATATCAACAG
R_Y63F	CTGTTGATATGATCGAAGCGAAAATCAAGCCGTGTC
F_Y114D	CCGGTTTACATGCAGGATCGCCTCAGCCCATTTC
R_Y114D	GAATGGGCTGAGGCGATCCTGCATGTAAACCGG
F_Y114K	CTCCGGTTTACATGCAGAAGCGCCTCAGCCCATTCTTTC
R_Y114K	GAAAGAATGGGCTGAGGCGCTTCTGCATGTAAACCGGAG
F_Y114F	GCTCCGGTTTACATGCAGTTTCGCCTCAGC
R_Y114F	GCTGAGGCGAAACTGCATGTAAACCGGAGC

F_N122I	GCCTCAGCCCATTCTTTCAAATCTACCGCTACTTTAC
R_N122I	GTAAAGTAGCGGTAGATTTGAAAGAATGGGCTGAGGC
F_N122Q	GTATCGCCTCAGCCCATTCTTTCAACAGTACCGCTACTTTAC
R_N122Q	GTAAAGTAGCGGTACTGTTGAAAGAATGGGCTGAGGCGATAC
F_Q134L	CGTGGACTACTCGCTGCTTAGCGGGAGAG
R_Q134L	CTCTCCCGCTAAGCAGCGAGTAGTCCACG
F_Q134N	CCGTGGACTACTCGAATCTTAGCGGGAGAGCG
R_Q134N	CGCTCTCCCGCTAAGATTGAGTAGTCCACGG
F_G137V	CTCGCAGCTTAGCGTGAGAGCGTCTGCAATTC
R_G137V	GAAATTGCAGACGCTCTCAGCTAAGCTGCGAG
F_G137A	CGCAGCTTAGCGGAGAGCGTCTGC
R_G137A	GCAGACGCTCTCGCGTAAGCTGCG
F_P148A	CAATTTCAAAGATGTGTGCCGCATTCCGCTTTCCTGG
R_P148A	CCAGGAAAGCGGAATGCGGCACACATCTTTGAAATTG
F_P166A	CCGGCTACTACAACGCGTGTGGTGCATAC
R_P166A	GTATGCACCACACGCTTGTAGTAGCCGG
F_G168V	CTACAACCCGTGTGTGCATACCCGTGGG
R_G168V	CCCACGGGTATGCAACACACGGGTTGTAG
F_G168D	CTACAACCCGTGTGATGCATACCCGTGGG
R_G168D	CCCACGGGTATGCATCACACGGGTTGTAG
F_G168A	CTACAACCCGTGTGCTGCATACCCGTGGG
R_G168A	CCCACGGGTATGCAGCACACGGGTTGTAG
F_F175S	CATACCCGTGGGCTATGTCCAACGACAGCATCAGTC
R_F175S	GACTGATGCTGTCGTTGGACATAGCCCACGGGTATG
F_F175Y	CATACCCGTGGGCTATGTACAACGACAGCATCAGTCTG
R_F175Y	CAGACTGATGCTGTCGTTGTACATAGCCCACGGGTATG
F_N176I	CATACCCGTGGGCTATGTTCAATCGACAGCATCAG
R_N176I	CTGATGCTGTGATGAACATAGCCCACGGGTATG
F_N176D	CCGTGGGCTATGTTCCAGCAGCATCAGTC
R_N176D	GACTGATGCTGTCGTCGAACATAGCCCACGG
F_N176Q	CCCGTGGGCTATGTTCCAGGACAGCATCAGTCTG
R_N176Q	CAGACTGATGCTGTCCTGGAACATAGCCCACGGG
F_D177V	GTGGGCTATGTTCAACGTCAGCATCAGTCTGTATAG
R_D177V	CTATACAGACTGATGCTGACGTTGAACATAGCCCAC
F_D177K	CCGTGGGCTATGTTCAACAAGAGCATCAGTCTGTATAGG
R_D177K	CCTATACAGACTGATGCTCTTGTTGAACATAGCCCACGG
F_D177E	CCCGTGGGCTATGTTCAACGAGAGCATCAGTCTG
R_D177E	CAGACTGATGCTCTCGTTGAACATAGCCCACGGG
F_S178A	GTGGGCTATGTTCAACGACGCCATCAGTCTGTATAGGACTG
R_S178A	CAGTCCTATACAGACTGATGGCGTTCGTTGAACATAGCCCAC
F_D218V	CATTGCTCGTCCAAGTGTGTCGTCAAAGAGAGATAACAATC
R_D218V	GATTGTATCTCTTTGACGACACTTGGACGAGCAATG
F_D218E	CATTGCTCGTCCAAGTGAGGTCAAAGAGAGATAACAATC
R_D218E	GATTGTATCTCTTTGACCTCACTTGGACGAGCAATG

F_W273R	GATGAGGATTTGATAGTG <u>A</u> GGCTCGATCCGGCTTTC
R_W273R	GAAAGCCGGATCGAGCC <u>T</u> CACTATCAAATCCTCATC
F_W273Y	GATGAGGATTTGATAGTGT <u>A</u> TCTCGATCCGGCTTTCACGTC
R_W273Y	GACGTGAAAGCCGGATCGAG <u>A</u> TACACTATCAAATCCTCATC
F_K284M	CTTTCACGTCTGATGTGACGAT <u>G</u> AATTACCGTATTCTCAACGTC
R_K284M	GACGTTGAGAATACGGTAATT <u>C</u> ATCGTCACATCAGACGTGAAAG
F_K284R	CTTTCACGTCTGATGTGACGAG <u>A</u> AATTACCGTATTCTCAACG
R_K284R	CGTTGAGAATACGGTAATT <u>T</u> CTCGTCACATCAGACGTGAAAG
F_L293S	CGTATTCTCAACGTCGATT <u>C</u> GCCGGCCGGTG
R_L293S	CACCGGCCGGC <u>G</u> AATCGACGTTGAGAATACG
F_L293K	TACCGTATTCTCAACGTCGATA <u>A</u> AGCCGGCCGGTG
R_L293K	CACCGGCCGGC <u>T</u> TATCGACGTTGAGAATACGGTA
F_L293V	CCGTATTCTCAACGTCGAT <u>G</u> TGCCGGCCGG
R_L293V	CCGGCCGGC <u>A</u> CATCGACGTTGAGAATACGG
F_G296V	CGTCGATTTGCCGGCCG <u>T</u> TGACTATTACTTCGAAATC
R_G296V	GATTTCGAAGTAATAGTCA <u>A</u> CGGCCGGCAAATCGACG
F_G296A	GTCGATTTGCCGGCCG <u>C</u> TGACTATTACTTCGAAATC
R_G296A	GATTTCGAAGTAATAGTCA <u>G</u> CGGCCGGCAAATCGAC
F_Y298D	GATTTGCCGGCCGGTGACG <u>A</u> TACTTCGAAATCACAG
R_Y298D	CTGTGATTTCGAAGTAAT <u>C</u> GTACCGGCCGGCAAATC
F_Y298K	GATTTGCCGGCCGGTGAC <u>A</u> AGTACTTCGAAATCACAGAG
R_Y298K	CTCTGTGATTTCGAAGTACT <u>T</u> GTACCGGCCGGCAAATC
F_Y298F	GATTTGCCGGCCGGTGACT <u>T</u> TACTTCGAAATCACAG
R_Y298F	CTGTGATTTCGAAGTAA <u>A</u> AGTACCGGCCGGCAAATC
F_K315M	CCGTACGCATCGCATA <u>T</u> GTTTGTGCAACTCGCG
R_K315M	CGCGAGTTGCACAAAC <u>A</u> TATGCGATGCGTACGG
F_K315D	CGCCGTACGCATCGCAT <u>G</u> ATTTTGTGCAACTCGCGAC
R_K315D	GTCGCGAGTTGCACAA <u>A</u> T <u>C</u> ATGCGATGCGTACGGCG
F_K315R	CCGTACGCATCGCATA <u>G</u> GTTTGTGCAACTCGCG
R_K315R	CGCGAGTTGCACAAAC <u>C</u> TATGCGATGCGTACGG
F_G326V	CCCGATCATGGATCG <u>I</u> GGGTAGAAGCCATGTTC
R_G326V	GAACATGGCTTCTACCC <u>A</u> CGATCCATGATCGGG
F_G326A	CCGATCATGGATCG <u>C</u> GGGTAGAAGCCATG
R_G326A	CATGGCTTCTACCC <u>G</u> CGATCCATGATCGG
F_N86Q	GTTTGCCGTTAATTTTCCATT <u>C</u> AGGGCACCATGTACTCTTCTGG
R_N86Q	CCAGAAGAGTACATGGTGCC <u>T</u> TGGAATGGAAAATTAACGGCAAAC
F_N198Q	CGCCTTCACGGCC <u>C</u> AGGGAACGAGTCTGG
R_N198Q	CCAGACTCGTTC <u>C</u> TGGCCGTGAAGGCG
F_N241Q	GGAGTGCTGGCGGC <u>C</u> AGAAGTCAGCCACTGATC
R_N241Q	GATCAGTGGCTGACTT <u>T</u> TGGCCGCCAGCACTCC

Las mutaciones introducidas aparecen subrayadas. F, *forward*; R, *reverse*.

Oligonucleótidos empleados para la mutagénesis dirigida múltiple en el dominio N terminal del gen *LiRos3*

Secuencia (5' → 3')	
F_Q16L+Q17L R_Q16L+Q17L	CGCATTGAGCTGCT <u>G</u> CAACTGCCGCAC GTGCGGCAGTTGC <u>A</u> GCAGCTCAATGCG
F_Q16L+L19Q R_Q16L+L19Q	GATTGAGCTGCAGCAAC <u>A</u> GCCGCACATCTATGC GCATAGATGTGCGGC <u>T</u> GTTGCTGCAGCTCAATC
F_L19Q+Q17L R_L19Q+Q17L	CGCATTGAGCAGCT <u>G</u> CAACAGCCGCAC GTGCGGCTGTTGC <u>A</u> GCTGCTCAATGCG
F_L19Q+Q16L+Q17L R_L19Q+Q16L+Q17L	GAAAAACCGCATTGAGCT <u>G</u> CT <u>G</u> CAACAGCCGCACATC GATGTGCGGCTGTTGC <u>A</u> GC <u>A</u> GCTCAATGCGGTTTTTC

Las mutaciones introducidas aparecen subrayadas. F, *forward*; R, *reverse*.

Oligonucleótidos empleados para la obtención de secuencias truncadas del gen *LiRos3*

Segmento	Oligo	Secuencia (5' → 3')
ΔNR3	ΔNR3 Fw	<u>CCCGGG</u> ATGGTTTCCGTTGTCTTT
	LiRos3 Rv	G <u>CCGATCC</u> CTACTCTGTATAGACTGGCATGATCA
ΔCR3	LiRos3 Fw	G <u>CCCCGGG</u> T <u>CATGG</u> CGCCTCTACCCCT
	ΔCR3 Rv	<u>GGATCCT</u> TATGAAAGAAGTGTC <u>ACTGC</u>

Los nucleótidos subrayados se corresponden con las secuencias agregadas para introducir sitios de restricción.

Oligonucleótidos empleados para la obtención de quimeras		
Segmento	Oligo	Secuencia (5' → 3')
N1	F_N1a	TTCAAGCAACAGCGTCTGCCGGCGTGGCAACCCATCTTG ACACCGCAGCACGTTTCCGTTGTCTTTTTTT
	F_N1b	<u>ACCCGGG</u> GATGCCTGTCGCCCCCGCTGCGGTGGACCAGCG CCCGTCCATCTGGACGCTCTTCAAGCAACAGCGTCTG
N2	LiRos2 Fw	<u>GCCCCGGG</u> CACACGTTGCCTTAGTCTGTT
	R_N2	<u>GCTAGCGAAGGGCGAGGGG</u> TAGTT
C1	F_C1a	CGCGTAGGGCTCGGTCATCGTACCAGTGGTGAATTGAAA GAAGTGTCAC
	F_C1b	<u>GGATCCTTAGT</u> CGTCCTTCAGCAGCATCGCCACGGCGCG TAGGGCTCGGT
C2	F_C2	<u>CGCTAGCGAGTGCATGCTGCAG</u>
	LiRos2 Rv	<u>GCAGATCTTCAGATATCCGCGCGCTGGCCATTGCC</u>
L1	F_L1	<u>TCCGGAGCGAACCGGTCCGCGGTG</u>
	R_L1	<u>CACGTGAGTGTTCGGGCCACCGAG</u>
L2	F_L2	<u>ATCCGGAGGTCGTGAATACCAC</u>
	R_L2	<u>ACACGTGGATGTTGCGGCCGCC</u>
L3a	F_L3a	GTCCTCGTAATTGTGT <u>TCCGGAGATCTAACGACC</u> GG
	R_L3a	CCGTGTCGTTAGATCT <u>TCCGGACACAATTACGAG</u> GAC
L3b	F_L3b	GGGGGTAGAAGCC <u>CACGTGCTCGGCTCTCTG</u>
	R_L3b	CAGAGAGCCGAG <u>CACGTGGCTTCTACCCCC</u>
LM3	ΔNR3 Fw	<u>CCCGGGATGGTTTCCGTTGTCTTT</u>
	ΔCR3 Rv	<u>GGATCCTTATGAAAGAAGTGTC</u> ACTGC

Las secuencias subrayadas se corresponden con los sitios de restricción que se introdujeron para el posterior ensamblaje y clonado de los diferentes segmentos. F, *forward*; R, *reverse*.

Oligonucleótidos empleados para la secuenciación de construcciones		
Oligo	Secuencia (5' → 3')	Vector
SP6 T7	ATTTAGGTGACACTATAG TAATACGACTCACTATAGGG	pGEMT
pIR1SAT Fw pIR1SAT Rv	CCTCACTTTCAAGGCTTCC GCGAACTGGTCGTAGAAATC	pIR1SAT

II. MÉTODOS

II.1. Cultivo y manipulación de *L. infantum*

II.1.1. Cultivo *in vitro*

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

II.1.2. Criopreservación y congelación de promastigotes

Se tomaron 900 µl de promastigotes en fase logarítmica de crecimiento y se les adicionaron 100 µl de DMSO. Se sometieron a una congelación progresiva y se almacenaron a -80 °C o en nitrógeno líquido.

La descongelación se llevó a cabo introduciendo los viales en un baño a 37 °C. Posteriormente, los promastigotes se centrifugaron a 1000 g durante 5 min para eliminar los restos de DMSO y se resuspendieron en 5 ml de medio de cultivo para iniciar su crecimiento. En los casos necesarios, el antibiótico de selección se añadió a las 24 h.

II.1.3. Recuento de promastigotes

En todos aquellos experimentos que requirieron de recuento celular se utilizó un contador *Coulter Counter* modelo Z1, diluyendo 100 µl del cultivo de parásitos en 9,9 ml de medio isotón II (Coulter).

II.1.4. Transfección de DNA plasmídico por electroporación

La transfección es una técnica que permite introducir material genético extraño en células eucariotas. El proceso se llevó a cabo mediante electroporación (Kapler *et al.*, 1990) sobre 2×10^7 promastigotes de *L. infantum* en fase logarítmica tardía de crecimiento. Los parásitos se lavaron 2 veces con PBS estéril y se resuspendieron en HBS a una concentración de 5×10^7 /ml; 400 µl de esta suspensión se mezclaron con 20-40 µg de DNA plasmídico y se incubó durante 10 min en hielo. La electroporación se llevó a cabo en el sistema ECM 600[®] de BTX, utilizando como condiciones 450 voltios, 500 µF, 13 ohms y pulsos de 7,2 mseg. Tras la electroporación, los promastigotes se incubaron durante 10 min en hielo y se transfirieron a 4 ml de medio RPMI modificado suplementado con 20% hiFBS, incubándose a 28 °C. El antibiótico de selección se añadió a las 24 h y, tras sucesivos pases en presencia de concentraciones crecientes del mismo, se logró la selección de los transfectantes.

Alternativamente, los promastigotes de *L. infantum* también fueron transfectados empleando el kit de transfección Amaxa Nucleofector System (Lonza).

II.2. Cultivo y manipulación de bacterias

II.2.1. Cultivo de bacterias

Los cultivos líquidos de bacterias se hicieron en medio LB a 37 °C y agitación constante. Las bacterias también se cultivaron en medio semisólido, en placas de petri con LB agar, a 37 °C. En los casos necesarios, los medios se suplementaron con ampicilina, que actúa como antibiótico de selección. Los stocks de bacterias se conservaron a -80 °C en medio LB suplementado con glicerol al 15%.

II.2.2. Preparación de células competentes por choque térmico

Se cultivaron 5 ml de bacterias DH5 α durante 16 h en medio LB líquido con agitación a 37 °C. Se inocularon 2,5 ml de este pre-cultivo en 250 ml de LB, continuando su crecimiento hasta alcanzar una DO₅₉₀ de 0,375. Las bacterias se enfriaron en hielo durante 15 min y se centrifugaron durante 7 min a 3500 g a 4 °C. Una vez eliminado el sobrenadante, las células se resuspendieron en 1/5 del volumen inicial de MgCl₂ 100 mM 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 CaCl₂ 100 mM estéril frío y se incubaron en hielo durante 1 h. A esa suspensión se añadió glicerol para obtener una concentración final del 15%. Finalmente, las células se alicuotearon en 200 μ l en tubos eppendorf enfriados previamente. Estas células se pueden guardar a -80 °C hasta su uso.

II.3. Manipulación de ácidos nucleicos

II.3.1. Aislamiento de DNA genómico de promastigotes

Se realizó siguiendo el protocolo descrito en el Kit *Puregene DNA isolation* de Gentra, partiendo de 150 millones de promastigotes. El DNA se resuspendió en agua bidestilada y se determinó su concentración mediante espectrofotometría (1 DO₂₆₀ DNA doble hebra = 50 μ g/ml).

II.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se empleó el kit *PCR Extender System* de 5 Prime. Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l, con una mezcla de 20 pmol de cada oligonucleótido, 400 μ M de cada desoxinucleótido, 10-100 ng de DNA molde, tampón "High Fidelity Buffer" con Mg²⁺ y 1-2 U de la mezcla de polimerasas termoestables suministradas con el kit. Las condiciones de la PCR y el número de ciclos de amplificación se ajustaron para cada experimento.

II.3.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Mediante esta técnica, los fragmentos de DNA pueden separarse según su tamaño y posteriormente ser transferidos a membranas o bien purificados a partir del gel. Se

utilizaron geles de agarosa de porcentaje entre 0,7 y 1,5%, según los tamaños a separar, preparados en tampón TAE 1X. Las muestras se cargaron en los geles con solución de carga. El DNA se visualizó tiñendo los geles con 0,5 µg/ml de bromuro de etidio y observándolos bajo luz ultravioleta. Como marcadores de tamaño molecular se emplearon el DNA del fago lambda cortado con *Hind*III y el DNA del fago phiX174 digerido con *Hae*III (0,1 µg por pocillo).

II.3.4. Purificación del DNA incluido en agarosa

Los fragmentos de DNA se aislaron utilizando el kit comercial Gel Extraction Kit® (Omega) siguiendo el protocolo de la casa comercial. El fragmento de agarosa conteniendo el DNA se disolvió en el tampón de unión proporcionado en el kit a 55 °C durante 7 min, y el DNA se retuvo en una membrana de fibra de vidrio. Esta membrana se lavó con una solución de etanol para eliminar impurezas y, finalmente, el DNA se eluyó con agua.

II.3.5. Aislamiento de DNA plasmídico

Para las extracciones de DNA plasmídico a pequeña escala (3-5 ml de cultivo bacteriano) se utilizó el *Plasmid Mini Kit*® de Omega. El procedimiento se basa en el método de la lisis alcalina, con el que se consigue la desnaturalización y precipitación selectiva del DNA cromosómico en medios con NaOH y SDS. El DNA plasmídico permanece intacto debido a su pequeño tamaño y su naturaleza circular y superenrollada. El tratamiento con alta concentración de acetato potásico y SDS provoca la precipitación de la mayoría de proteínas mientras que el tratamiento con RNasa elimina el RNA. La purificación del DNA plasmídico se completa por precipitación con isopropanol. El sobrenadante se pasa por una resina para retener el DNA y, tras varios lavados, éste es eluído con un tampón Tris-HCl 10 mM pH 8,5.

Este método permite de forma rápida el aislamiento de pequeñas cantidades de DNA plasmídico en condiciones óptimas para realizar su tratamiento posterior (digestión con enzimas de restricción, ligación, subclonado, marcaje radiactivo, secuenciación, etc.).

II.3.6. Digestión de DNA con enzimas de restricción

Las enzimas se emplearon de acuerdo con las recomendaciones de cada casa comercial. De modo general, las reacciones de digestión se llevaron a cabo en un volumen final de 30 µl empleando de 1 a 10 U de enzima por µg de DNA a digerir, incubándose 2 h a la temperatura recomendada.

II.3.7. Tratamiento con fosfatasa alcalina

Esta enzima hidroliza el grupo fosfato en el extremo 5' del DNA. La ligasa necesita este grupo para la reacción de ligación, por lo que el tratamiento con fosfatasa alcalina de los vectores plasmídicos abiertos disminuye la posibilidad de religamiento. La reacción se realizó agregando 1 U de esta enzima tras la digestión con endonucleasas de restricción e incubando 30 min a 37 °C.

II.3.8. Reacción de ligación

Las reacciones de ligación de fragmentos de DNA se llevaron a cabo con la enzima T4 DNA ligasa (1U/μg de DNA), procedente del bacteriófago T4. El volumen final de reacción fue de 20 μl en el tampón suministrado por la casa comercial, utilizando por lo general relaciones molar inserto:vector de 3:1, incubándose durante 16 h a temperatura ambiente.

II.3.9. Transformación de células competentes y selección de clones

Para la transformación, se descongeló una alícuota de células competentes de *E. coli*, a las que se añadió el DNA plasmídico. 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 500 μl de LB y se incubó 1 h a 37 °C en agitación. Una alícuota de la mezcla se plaqueó en el correspondiente medio de selección y se incubó a 37 °C durante 14-16 h.

Los transformantes positivos se seleccionaron mediante el aislamiento del DNA plasmídico, análisis de restricción del plásmido y secuenciación.

II.3.10. Secuenciación de DNA

La secuenciación de DNA se realizó por el método de terminación de cadena por dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977). La secuenciación se realizó con un secuenciador automático capilar 3130XL Genetic Analyser (Applied Biosystems) utilizando el kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Thermo Fisher).

II.3.11. Generación de sondas de DNA marcadas con digoxigenina

Se empleó el procedimiento de "Random Primed" (Feinberg y Vogelstein, 1983), basado en la utilización de una mezcla de hexanucleótidos que actúan como cebadores para la síntesis de DNA por el fragmento de Klenow de la DNA Polimerasa I de *E. coli*. El marcaje con digoxigenina (DIG) se consigue usando una mezcla de dNTPs y DIG-11-dUTP. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 μl con 10-20 μg de DNA molde y 2 U de enzima de Klenow, siguiendo el protocolo de la casa comercial. El DNA se precipitó con etanol absoluto y 0,8 M LiCl y se resuspendió en 50 μl de tampón TE.

II.4. Obtención de una línea mutante nulo del gen *LiRos3*

La estrategia empleada para conseguir una línea de parásitos mutantes nulos del gen *LiRos3* fue la misma que está descrita para el gen ortólogo de *L. donovani* *LdRos3* (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a). Se utilizó una construcción previamente generada en el plásmido pGEMT en la que el cassette HYG que contiene el gen *hyg* se encuentra flanqueado en su extremo 5' por un fragmento de 1,3 kb de la región 5'-no codificante (5'-UTR) de *LdRos3* y en su extremo 3' por un fragmento de 1,2 kb de la región 3'-UTR de *LdRos3* (Fig. 24). Ambas regiones UTR de *LdRos3* y *LiRos3* presentan una identidad

en la secuencia cercana al 100%, por lo que se pueden emplear para la obtención de parásitos mutantes nulos $\Delta LiRos3$.

Esta construcción se linealizó mediante digestión enzimática y 7 μg de este DNA se emplearon para transfectar por electroporación promastigotes de *L. infantum*. Después de 1 día en 5 ml de medio de cultivo, los promastigotes se centrifugaron (1000 g durante 5 min) y se resuspendieron en 800 μl de medio que se emplearon para sembrar dos placas de medio de cultivo semisólido agar-RPMI al que se habían adicionado 40 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina B. Después de 10-15 días, se seleccionaron varios clones que se cultivaron en medio líquido para posteriormente extraerles el DNA y analizar mediante PCR la correcta integración de la construcción, con la consecuente sustitución del gen *LiRos3* por el cassette que contiene el gen de resistencia a higromicina B (Fig. 24). De este modo, se obtuvieron promastigotes heterocigotos (+/-) (Fig. 25).

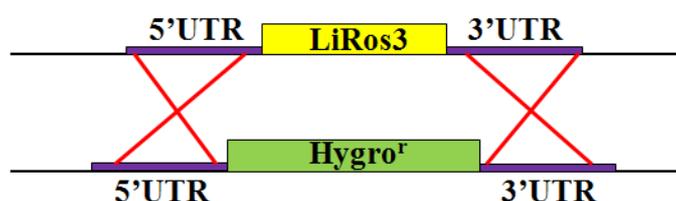


Figura 24. Modelo de la doble recombinación que se produce en la sustitución del gen *LiRos3* por el cassette HYG de resistencia a higromicina B en *Leishmania*. Los fragmentos de las regiones 5'UTR y 3'UTR de *LiRos3* tienen un tamaño de 1,3 kb y 1,2 kb, respectivamente.

Para obtener parásitos con el otro alelo deleciónado, los promastigotes $\Delta LiRos3$ (+/-) se cultivaron con una mayor presión de fármaco, llegando a 500 $\mu\text{g/ml}$ de higromicina B. Los promastigotes se centrifugaron nuevamente y se plaquearon para obtener clones, algunos de los cuales fueron elegidos para estudiar su sensibilidad a miltefosina, seleccionando aquellos que eran resistentes a una concentración de 80 μM (Fig. 25). La correcta integración del cassette HYG en ambos alelos fue de nuevo confirmada por PCR y también por Southern blot. Además, la pérdida de expresión de la proteína *LiRos3* se analizó por inmunodetección.

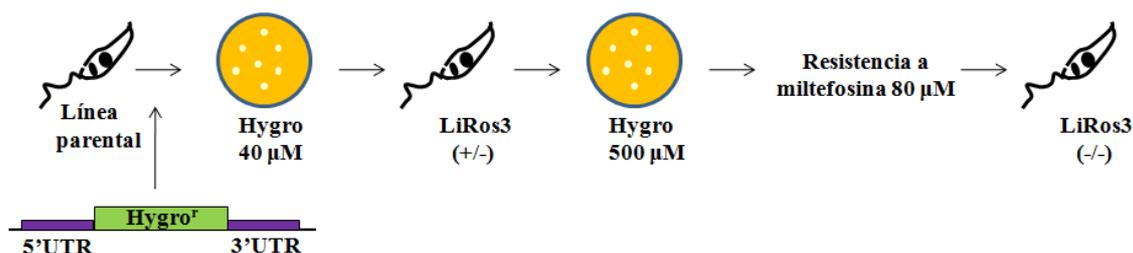


Figura 25. Estrategia para la generación de promastigotes de *L. infantum* mutantes nulos de *LiRos3*. Hygro, higromicina B.

II.5. Análisis de DNA mediante Southern blot

El DNA genómico purificado de promastigotes de la línea salvaje y de los mutantes nulos de *LiRos3* se digirió con BglI. El DNA digerido se separó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Tras ello, los gels se trataron 3 min con HCl 0,25 M para

despurinizar el DNA y facilitar su fragmentación. A continuación se trataron 30 min con solución desnaturalizante y otros 30 min con solución neutralizante. El DNA se transfirió entonces a una membrana de nylon durante toda la noche por capilaridad en tampón SSC 20X, según la técnica descrita por Southern (1974).

Finalizada la transferencia, la membrana se lavó en SSC 2X y se dejó secar. A continuación, el DNA se fijó covalentemente a la membrana por irradiación con luz ultravioleta a 250 nm durante 3 min. Las membranas se preincubaron en un horno de hibridación con la solución de hibridación a 42 °C durante 2 h. Posteriormente, se hibridaron con sondas de DNA marcadas con DIG (digoxigenina), generadas usando como molde la secuencia codificante (ORF) o la región 5'-UTR de *LiRos3*. La hibridación se realizó durante toda la noche a 42 °C con agitación suave.

Finalmente, el DNA se detectó por el sistema DIG (Roche), siguiéndose las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

II.6. Generación de construcciones con el gen *LiRos3* mutado, truncado y quimeras

Se aislaron los genes de los tres miembros de la familia Cdc50 de *L. infantum*, tal y como se ha descrito previamente para los ortólogos de *L. donovani* (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a). La secuencia de referencia del NCBI de estos genes se indica a continuación entre paréntesis: *LiRos3* (XM_001467713.2), *LiRos1* (XM_001469112.1) y *LiRos2* (XM_001463528.1). Se añadieron dianas de restricción para su posterior subclonaje. Estas secuencias se amplificaron mediante PCR empleando DNA genómico de *L. infantum* como molde y se clonaron en el vector pGEMT (Promega). Posteriormente, *LiRos3* se subclonó en el vector de expresión para *Leishmania* pIR1SAT por digestión con SmaI-BamHI.

Para generar proteínas de fusión con GFP en el extremo C-terminal de LiMT (*LiMT-GFP*), *LiRos1* (*LiRos1-GFP*) y *LiRos2* (*LiRos2-GFP*), se amplificaron los ORFs sin el codón de terminación y se subclonaron en el vector de expresión pXG-'GFP+ como se ha descrito previamente (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a).

Las **mutaciones puntuales en *LiRos3*** se obtuvieron mediante el kit de mutagénesis *QuikChange® II XL site-directed* (Stratagene), usando como molde el plásmido de expresión que contiene el gen *LiRos3*. Para realizar mutaciones múltiples en el dominio N terminal de la proteína se emplearon como molde los plásmidos Q16L (para las construcciones Q16L+Q17L y Q16L+L19Q) y L19Q (para las construcciones Q17L+L19Q y Q16L+Q17L+L19Q). Se realizaron mutaciones conservativas y no conservativas, en base a las características estructurales y fisicoquímicas de los aminoácidos. Para ello, se emplearon un par de oligonucleótidos, complementarios entre sí, que incluían la mutación deseada, y se realizó una reacción de PCR con la enzima *Pfu Ultra High Fidelity DNA Polimerasa*, dando como resultado dos hebras completas y complementarias del plásmido amplificado. El DNA de molde se eliminó en una reacción de digestión con la enzima *DpnI*, que corta el DNA metilado, y se transformaron bacterias con el DNA sin metilar, que se correspondía con el producto de

la amplificación. La existencia de la mutación en el plásmido aislado de las bacterias transformadas se chequeó mediante secuenciación.

Las **secuencias truncadas de LiRos3**, carentes del dominio N-terminal (Δ NR3) o del dominio C-terminal (Δ CR3), se obtuvieron por PCR a partir de DNA genómico. Para obtener **proteínas quimera** a partir de los tres genes de la familia Cdc50 se recurrió a la amplificación de los fragmentos de interés por PCR o a la creación de sitios de restricción silenciosos introducidos mediante mutagénesis dirigida, y a la posterior digestión y ligación de los correspondientes fragmentos de DNA.

Todas las construcciones se clonaron en el vector pIR1SAT y sus secuencias se determinaron automáticamente.

En la siguiente tabla se indican las posiciones inicial y final de los constituyentes de cada una de las proteínas truncadas e híbridas. Los tamaños de las proteínas LiRos1, LiRos2 y LiRos3 son de 421, 595 y 363 aminoácidos de longitud, respectivamente.

Proteínas truncadas y quiméricas generadas en esta tesis doctoral	
Proteína	Segmentos
Δ NR3	31-363 de LiRos3
Δ CR3	1-352 de LiRos3
N1R3	1-34 de LiRos1 y 31-363 de LiRos3
N2R3	1-146 de LiRos2 y 31-363 de LiRos3
C1R3	1-352 de LiRos3 y 402-421 de LiRos1
C2R3	1-352 de LiRos3 y 518-595 de LiRos2
L1R3	1-53 y 330-363 de LiRos3 y 56-379 de LiRos1
L2R3	1-53 y 330-363 de LiRos3 y 170-495 de LiRos2
L3R1	1-54 y 381-421 de LiRos1 y 52-331 de LiRos3
L3R2	1-168 y 497-595 de LiRos2 y 52-331 de LiRos3
LM3R1	1-34 y 402-421 de LiRos1 y 30-352 de LiRos3
L3M13R1	1-54 y 402-421 de LiRos1 y 52-352 de LiRos3
L3M31R1	1-34 y 381-421 de LiRos1 y 30-331 de LiRos3
LM3R2	1-146 y 518-595 de LiRos2 y 31-352 de LiRos3

II.7. Técnicas para el estudio funcional de la proteína LiRos3

II.7.1. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) en formas promastigotas de *L. infantum*

La Concentración Inhibitoria 50 (IC₅₀) se puede definir como la concentración de un compuesto requerida para inhibir el crecimiento de los parásitos al 50% en relación a un cultivo control en ausencia de fármaco y cuando se alcanza la fase logarítmica tardía de crecimiento (Ellenberger y Beverley, 1989).

Este parámetro se empleó para determinar la sensibilidad a MLF en las **formas promastigotas** de *L. infantum*, calculándose mediante un método colorimétrico basado en la reducción del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, más

conocido como MTT. Este sustrato, soluble y amarillo, es convertido por enzimas deshidrogenasas de los parásitos en el producto formazán, insoluble y de color violeta. La cantidad de producto formado depende del número de células y de la viabilidad de las mismas.

En los ensayos realizados, se partió de una concentración de 2×10^6 promastigotes/ml, sembrados en 100 μ l de medio de cultivo en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Después de 48 h de incubación a 28 °C en presencia de diferentes concentraciones de MLF, se añadieron 10 μ l de MTT (5 mg/ml), y se incubó 4 h a 28 °C. Los cristales de formazán formados se disolvieron añadiendo 50 μ l de SDS al 20% e incubando en oscuridad a 37 °C durante 4-6 h. La absorbancia se midió a 540 nm en un lector de placas. Los datos obtenidos permitieron el cálculo de la IC₅₀ mediante análisis de regresión no lineal usando el programa SigmaPlot 2000 para Windows (SPSS).

II.7.2. Ensayos de acumulación de miltefosina

Se determinó la captación de MLF radiactiva como se ha descrito previamente (Pérez-Victoria *et al.*, 2003a). Se incubaron 2×10^7 promastigotes de *L. infantum* en fase logarítmica de crecimiento con 0,09 μ Ci/ml de [¹⁴C]MLF (2,5 μ M) en medio de cultivo M-199 durante 60 min a 28 °C. Los promastigotes se lavaron con PBS frío adicionado con 10 mg/ml de BSA para extraer la fracción de fármaco incorporada en la cara externa de la membrana plasmática. Tras ello, se realizó un segundo lavado con PBS, y se resuspendieron los sedimentos celulares en Triton X-100 al 1%. La radiactividad acumulada en el parásito se midió usando el contador de centelleo 1209 *Rackbeta Liquid Scintillation Counter* (LKB-Wallac). Se determinó asimismo la concentración de proteínas mediante el método de Bradford.

II.7.3. Acumulación de análogos fluorescentes de fosfolípidos

Para estudiar la implicación de LiRos3 en el transporte de fosfolípidos se emplearon análogos fluorescentes de fosfatidilcolina (NBD-PC) y fosfatidiletanolamina (NBD-PE), marcados con el grupo fluorescente nitrobenzoxadiazol en un ácido graso de cadena corta (n=6) situado en posición 2 de la molécula de glicerol (Fig. 26).

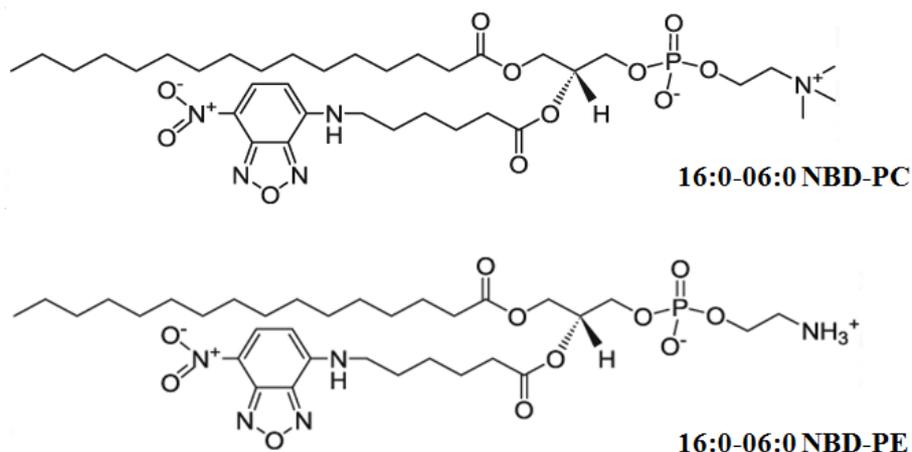


Figura 26. Estructura química de los análogos fluorescentes de fosfatidilcolina 16:0-06:0 NBD-PC y de fosfatidiletanolamina 16:0-06:0 NBD-PE.

Cantidades apropiadas de estos compuestos disueltos en cloroformo/metanol (1:1) se depositaron en un tubo de cristal de fondo cónico, se desecaron bajo atmósfera de nitrógeno, se resuspendieron en unas gotas de etanol absoluto y se diluyeron hasta la concentración adecuada (10 μ M) en tampón HPMI.

Los ensayos de acumulación de análogos de fosfolípidos se realizaron de manera similar a la descrita previamente (Pérez-Victoria *et al.*, 2003b). Se partió de promastigotes de *L. infantum* en fase logarítmica de crecimiento, que se lavaron dos veces con PBS y se resuspendieron en tampón HPMI suplementado con PMSF 1 mM (para inhibir la degradación de los análogos de fosfolípidos) a una concentración de 4×10^6 promastigotes/ml. Los parásitos se incubaron en este tampón con una concentración de 5 μ M de NBD-PC o NBD-PE durante 30 min a 28 °C. A continuación, se realizaron dos lavados con PBS + 1% BSA en frío para extraer la fracción unida a la cara externa de la membrana plasmática. Los parásitos se resuspendieron finalmente en PBS frío, dejándose las muestras en hielo hasta que se les midió la fluorescencia en un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson).

Se determinó la fluorescencia debida a la acumulación de los compuestos utilizados, medida como fluorescencia media en el canal FL1 (515-545 nm). Se establecieron regiones tras analizar la muestra utilizando los parámetros de dispersión frontal (*forward scatter* o FSC) y dispersión lateral (*side scatter* o SSC) y se analizaron 10.000 eventos en las mismas. Los datos se analizaron con el programa Cell Quest.

II.7.4. Ensayos de actividad flipasa

La actividad flipasa se determinó midiendo la acumulación de NBD-PC usando diferentes concentraciones de este análogo fluorescente de PC. Se partió de promastigotes de *L. infantum* en fase logarítmica de crecimiento, que se lavaron dos veces con PBS frío y se preincubaron en tampón HPMI suplementado con PMSF 1 mM, manteniéndolos con agitación suave durante 30 min a 28 °C. De forma paralela, se prepararon diluciones seriadas de NBD-PC en HPMI en una placa de 96 pocillos. Finalizada la preincubación, se añadieron $1,6 \times 10^6$ promastigotes en cada pocillo, de tal modo que el volumen de reacción fue de 100 μ l y la concentración máxima utilizada de NBD-PC fue de 5 μ M. La placa se incubó durante 8 min a 28 °C con agitación suave y en oscuridad, condiciones previamente determinadas en las cuales la incorporación de NBD-PC es lineal. Finalizada la incubación, la placa se centrifugó a 1000 g durante 3 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y se añadieron en cada pocillo 100 μ l de la solución stop (PBS + vanadato 200 μ M + BSA 4%) para inhibir la actividad ATPasa de LiMT por acción del vanadato y para eliminar la fracción de NBD-PC que hubiese quedado unida en la cara externa de la membrana plasmática de los promastigotes. Los promastigotes se incubaron en esta solución durante 5 min en hielo y las placas se volvieron a centrifugar a 1000 g durante 3 min a 4 °C. Tras ello, los promastigotes se resuspendieron en PBS frío y se pasaron a tubos de citometría, manteniéndose en hielo hasta que se les midió la fluorescencia de la manera descrita en los ensayos de acumulación de análogos fluorescentes de fosfolípidos.

A los datos obtenidos en cada línea se les sustrajo la fluorescencia asociada a la línea delecionada para ambos alelos de *LiRos3* (Δ LiRos3) debida a la captación no dependiente del sistema de transporte LiMT-LiRos3, ya sea por difusión o endocitosis, así como a la fluorescencia residual asociada no eliminada tras la extracción con BSA,

tal y como se ha descrito previamente (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a y b). Los resultados se normalizaron también en base a los niveles de expresión de LiMT en la membrana plasmática, obtenidos en los ensayos de biotilación.

Los datos obtenidos se ajustaron a la ecuación de Michaelis-Menten y se representaron gráficamente con el programa *GraphPad Prism 6*. La velocidad máxima aparente de transporte (V_{max}) de las diferentes líneas se expresó como el porcentaje respecto a la actividad máxima de los parásitos control (Δ LiRos3 transfectados con LiRos3).

II.7.5. Sensibilidad a miltefosina de los amastigotes intracelulares *in vitro*

Para determinar la sensibilidad de las **formas amastigotas** intracelulares a MLF de los diferentes mutantes de *L. infantum*, se empleó la línea de monocitos THP-1. Estas células se diferenciaron a macrófagos en placas de 24 pocillos mediante el empleo de 20 ng de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) durante 48 h, seguido de 24 h en medio fresco sin PMA, como se ha descrito previamente (Rochette *et al.*, 2008), permitiéndoles así adquirir la capacidad de adherencia. Los macrófagos se infectaron con promastigotes en fase estacionaria tardía de crecimiento a razón de 10:1 parásitos por macrófago. Transcurridas 12-18 h, las células se lavaron con medio de cultivo para eliminar los promastigotes que no habían penetrado. Los cultivos de macrófagos infectados se incubaron durante 72 h a 37 °C con CO₂ al 5% y con diferentes concentraciones de MLF para calcular la IC₅₀. Tras ello, las muestras se fijaron durante 20 min a 4 °C con paraformaldehído al 2% (p/v) en PBS y se permeabilizaron durante 30 min con Triton X-100 al 0,1% en PBS. Los amastigotes intracelulares se detectaron mediante marcaje con DAPI. El número de formas amastigotas intracelulares por macrófago infectado se determinó a partir del recuento de al menos 200 macrófagos por pocillo.

II.8. Técnicas de obtención y análisis de proteínas

II.8.1. Preparación de extractos totales de *L. infantum* para electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE

De forma general, se emplearon promastigotes en fase logarítmica tardía de crecimiento (3×10^7 células/ml). Los parásitos se centrifugaron a 1000 g durante 5 min a 4 °C y se lavaron tres veces con PBS en frío. Tras ello, se resuspendieron en PBS adicionado con un cóctel de inhibidor de proteasas (Pierce) y se mezclaron directamente con tampón de Laemmli 2X en proporción 1:1. De forma alternativa, los promastigotes se lisaron empleando tampón de lisis A (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; DDM 5%. pH 7,4) complementado con PMSF 1 mM y una combinación de inhibidores de proteasas (Pierce). Después de 2 h de incubación a 4 °C, las muestras se mezclaron en proporción 1:1 con tampón de Laemmli 2X. Se cargaron geles de poliacrilamida con alícuotas equivalentes a 2×10^6 promastigotes.

II.8.2. Biotinilación de las proteínas de superficie

Las proteínas de la membrana plasmática de *L. infantum* se marcaron mediante biotinilación como se ha descrito previamente (Sánchez-Cañete *et al.*, 2009). Se utilizaron 10^8 promastigotes en fase logarítmica de crecimiento, que se lavaron con PBS y se incubaron en hielo con EZ-Link™ Sulfo-NHS-SS-biotina (Pierce) 1 mM en 1 ml de PBS durante 1 h a 4 °C. La membrana plasmática no es permeable para este reactivo que actúa uniéndose específicamente a los grupos amino primario de las proteínas de la superficie celular a través de su grupo N-hidroxisulfosuccinimida (NHS) éster.

La reacción de biotinilación se detuvo mediante tres lavados con PBS suplementado con Tris-HCl 50 mM. Tras ello, los promastigotes se incubaron en hielo durante 1 h con 100 µl de tampón de lisis B (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; SDS 0,1%; Nonidet P-40 2%. pH 7,4) suplementado con PMSF 1 mM y una combinación de inhibidores de proteasas (Pierce) para solubilizar las proteínas presentes en la muestra. El lisado resultante se centrifugó a 21.000 g durante 20 min a 4 °C para eliminar los restos insolubles, y el sobrenadante obtenido se incubó durante 1 h con 100 µl de resina de estreptavidina-agarosa (Pierce), previamente lavada con el tampón de lisis, obteniéndose de este modo proteínas biotiniladas unidas a estreptavidina. La resina se lavó 4 veces con 400 µl de tampón de lisis y las proteínas biotiniladas se eluyeron con 30 µl de tampón de Laemmli 2X. El DTT presente en este tampón produjo la reducción del puente disulfuro del reactivo empleado en la reacción de biotinilación, logrando así separar las proteínas unidas a la resina que, a continuación, se desarrollaron en geles de SDS-poliacrilamida.

II.8.3. Co-inmunoprecipitación

Se emplearon promastigotes transfectados con la construcción LdMT-GFP, descrita previamente (Pérez-Victoria *et al.*, 2003b). LdMT de *L. donovani* es idéntico al 100% en secuencia de aminoácidos a su ortólogo de *L. infantum* LiMT. Se partió de 5×10^8 promastigotes de *L. infantum* en fase logarítmica tardía de crecimiento, que se lavaron tres veces con PBS y se lisaron durante 2 h con 1 ml de tampón de lisis C (PBS; DDM 2%. pH 7,4) suplementado con PMSF 1 mM y una combinación de inhibidores de proteasas (Pierce). Las muestras se aclararon por centrifugación a 21.000 g durante 20 min a 4 °C, y el sobrenadante obtenido se incubó durante toda la noche a 4 °C en rotación con bolitas magnéticas recubiertas con anti-GFP. Tras ello, las bolitas se separaron magnéticamente, se eliminó el sobrenadante y se realizaron 5 lavados con PBS suplementado con DDM al 0,05%. Las proteínas unidas al anticuerpo se eluyeron con 40 µl de tampón citrato 0,1 M pH 2 + DDM al 0,05%, se mezclaron en proporción 1:1 con tampón de Laemmli 2X y se desarrollaron en geles de SDS-poliacrilamida.

II.8.4. Reacción de N-desglicosilación

Para proceder a la liberación de los oligosacáridos unidos a los residuos de asparagina glicosilados de la proteína LiRos3, se empleó la enzima PNGasa F (New England Biolabs) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se partió de 5×10^7 promastigotes de *L. infantum*, que se lavaron con PBS y se solubilizaron en 100 µl de tampón de lisis D (Tris-HCl 50 mM; NaCl 150 mM; Nonidet P-40 1%. pH 7,4) complementado con una combinación de inhibidores de proteasas (Pierce). El material

insoluble se eliminó por centrifugación a 21.000 g durante 10 min a 4 °C, y el sobrenadante se mezcló con el tampón de la *N*-glicosidasa 10X y se incubó con PNGasa F (1000 unidades) durante 1 h a 37 °C. Finalmente, las muestras se mezclaron con tampón de Laemmli 2X y se separaron mediante electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE al 10%.

II.8.5. Cuantificación de proteínas

La concentración de proteínas se determinó utilizando el método colorimétrico de Bradford (1976), en el que se basa el kit *Bio-Rad Protein Assay*. Este método consiste en la cuantificación de la unión del colorante Azul de Coomassie a las proteínas de la muestra, medida por espectrofotometría a una longitud de onda de 595 nm.

II.8.6. Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE

La separación de proteínas en función de su tamaño se realizó mediante la técnica de electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida 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% de acrilamida/bisacrilamida y pH 6,8, y un gel inferior (separador) al 8-12% 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.

II.8.7. Transferencia de proteínas a membrana y detección con anticuerpos (Western blot)

Las proteínas separadas por electroforesis se transfirieron a membranas de PVDF *Immobilon-P* de Millipore. Estas membranas se activaron sumergiéndolas en metanol absoluto durante 20 s, pasándose posteriormente a agua bidestilada durante 1 min y, finalmente, a tampón de transferencia. Los geles de acrilamida y los papeles Whatman usados en la transferencia también se sumergieron brevemente en tampón de transferencia.

La transferencia se realizó empleando el procedimiento semiseco o húmedo. La **transferencia semiseca** se realizó en un aparato *Trans Blot SD Semidry Cell* (Bio-Rad) a 23 V durante 45 min. Por su parte, la **transferencia húmeda** se realizó en un aparato *Mini Trans-Blot Cell* (Bio-Rad) durante 1 h a un voltaje máximo de 25 V y un amperaje máximo de 100 mA.

Finalizada la transferencia, las membranas se tiñeron con una solución de Rojo Ponceau para visualizar las proteínas y determinar la eficiencia de la transferencia, destiñéndose con agua bidestilada. Seguidamente, la membrana se bloqueó en una solución de leche desnatada al 5% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente en agitación suave o durante 14 h a 4 °C, como paso previo a la inmunodetección de las proteínas transferidas.

Las membranas de PVDF se incubaron a temperatura ambiente, durante 1 h, con el anticuerpo primario correspondiente en la solución de inmunodetección. Las diluciones

empleadas de estos anticuerpos fueron de 1:300 para anti-LdMT; 1:1000 para anti-LdRos1, anti-LdRos2 y anti-LdRos3; 1:12500 para anti- α -tubulina, y 1:500 para anti-gp63.

Después de 3 lavados de 5 min con la solución de inmunodetección, las membranas se incubaron durante 1 h con una dilución 1:5000 de un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o ratón conjugados a peroxidasa. Después de 3 nuevos lavados de 5 min con la solución de inmunodetección, la membrana se reveló utilizando el sustrato quimioluminiscente ECL (Pierce).

II.9. Microscopía de fluorescencia

Se realizaron estudios de co-localización empleando promastigotes que expresaban las proteínas LiRos1 o LiRos2 fusionadas a la proteína verde fluorescente (GFP).

Para el marcaje del retículo endoplasmático se realizó un análisis mediante inmunofluorescencia indirecta utilizando un anticuerpo de conejo dirigido contra el marcador de retículo endoplasmático BiP (proteína de unión a la cadena pesada de la inmunoglobulina) de la manera que se ha descrito anteriormente (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a), con algunas modificaciones. Los promastigotes de *L. infantum* se fijaron durante 1 h a 4 °C con paraformaldehído en PBS y se resuspendieron a una concentración de $1,5 \times 10^7$ células/ml. Se depositaron 20 μ l de la suspensión sobre portaobjetos provistos con 10 círculos de 6 mm de diámetro (BioMérieux) y se dejó secar a temperatura ambiente durante toda la noche. Las muestras se incubaron con glicina 500 mM en PBS durante 30 min, tras lo cual se permeabilizaron con Triton X-100 al 0,2% en PBS durante 30 min y se bloquearon con BSA al 1% en PBS durante 30 min. Los portaobjetos se lavaron entonces tres veces con el tampón IFI (PBS con BSA al 0,1%) y se incubaron con una dilución 1:500 del anticuerpo anti-BiP en tampón IFI durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Después de tres nuevos lavados, los portaobjetos se incubaron con una dilución 1:1000 de un anticuerpo de cabra anti-IgG de conejo conjugado con Alexa FluorTM 594 en tampón IFI durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda. Finalmente, los portaobjetos se lavaron otras tres veces con el tampón IFI y se analizaron con un microscopio confocal Axiovert (TCS SP5; Leica).

Para el marcaje de la mitocondria, los promastigotes se incubaron con MitoTracker Red 50 nM durante 30 min a 28 °C en medio RPMI sin hiFBS. Tras ello, se lavaron con PBS en frío y se examinaron mediante microscopía confocal.

II.10. Análisis bioinformático

Los datos de la secuencia de los genes *LiRos1* (LinJ.35.3450), *LiRos2* (LinJ.09.1080) y *LiRos3* (LinJ.32.0540) se tomaron de la base de datos TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>).

Para la **predicción de las regiones transmembrana** de las proteínas Cdc50 de *L. infantum* LiRos1, LiRos2 y LiRos3 se utilizaron el servidor TMPred (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html) y los programas

MEMSAT3 y MEMSAT-SVM (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). Para determinar los posibles **sitios de N-glicosilación** de LiRos3 se empleó el servidor NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

El **porcentaje de identidad y de similitud** de LiRos3 con otras proteínas de la familia Cdc50 se determinó con el programa BLASTP (*Protein-protein Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.*, 1997), utilizando la base de datos UniProtKB (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) y la página web del Instituto Suizo de Bioinformática (SIB) (<http://web.expasy.org/blast/>).

El **alineamiento** de las secuencias de aminoácidos de las diferentes proteínas de la familia Cdc50 se realizó mediante el algoritmo ClustalW (Thompson *et al.*, 1996), utilizando el servidor NPS@ (Network Protein Sequence Analysis; https://npsa-prabi.ibcp.fr/cgi-bin/align_clustalw.pl) (Combet *et al.*, 2000). A partir de dicho alineamiento, las imágenes se crearon con el servidor ESPript 3 (<http://esprict.ibcp.fr>) (Robert y Gouet, 2014). En estas imágenes, el valor empleado en el parámetro que permite distinguir entre alta y baja similitud fue de 0,9 en una escala comprendida entre 0 y 1.

Para este alineamiento, las secuencias de referencia de las proteínas Cdc50 se obtuvieron de la base de datos del NCBI (Centro Nacional para la Información Biotecnológica). Entre paréntesis se indican los números de acceso de estas secuencias:

- *Leishmania infantum*: LiRos3 (XP_001467750.2), LiRos2 (XP_001463565.1) y LiRos1 (XP_001469149.1).
- *Saccharomyces cerevisiae*: Lem3p (NP_014076.1), Cdc50p (NP_010018.1) y Crf1p (NP_014446.3).
- *Homo sapiens*: CDC50A (NP_060717.1) y CDC50B (NP_001017970.1).
- *Mus musculus*: Cdc50C (NP_081927.1).
- *Drosophila melanogaster*: CG9947 (NP_573128.2).
- *Caenorhabditis elegans*: CHAT-1 (NP_001023332.1).
- *Arabidopsis thaliana*: ALIS1 (NP_566435.1), ALIS3 (NP_564656.1) y ALIS5 (NP_565210.1).

II.11. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media aritmética \pm desviación estándar (S.D.). Las comparaciones estadísticas entre diferentes grupos se llevaron a cabo mediante el test de la *t* de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas con $P < 0,05$.



I. Características generales de LiRos3 y homología con otras proteínas Cdc50

El gen *LiRos3* (GeneDB LinJ.32.0540) es ortólogo del gen *LdRos3*, descrito con anterioridad por nuestro laboratorio como subunidad esencial del complejo de transporte de MLF en *L. donovani* (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a). Forma parte del cromosoma 32 de *L. infantum* y codifica una proteína de 363 aminoácidos, con un peso molecular estimado de 40,3 kDa y un punto isoelectrico de 8,69.

Estudiando la topología de LiRos3 se puede comprobar que tiene la estructura típica de las proteínas Cdc50. Es una proteína integral de membrana con dos dominios transmembrana separados por un lazo extracitosólico de gran tamaño (aproximadamente 280 residuos) y con dos cortas regiones citosólicas en los extremos amino y carboxilo terminal, de 30 y 11 residuos respectivamente. Al analizar su secuencia, se deduce que es altamente probable que se encuentre N-glicosilada y que su lazo extracitosólico esté estabilizado por dos puentes disulfuro, al igual que sucede en otras proteínas de la familia (Fig. 27).

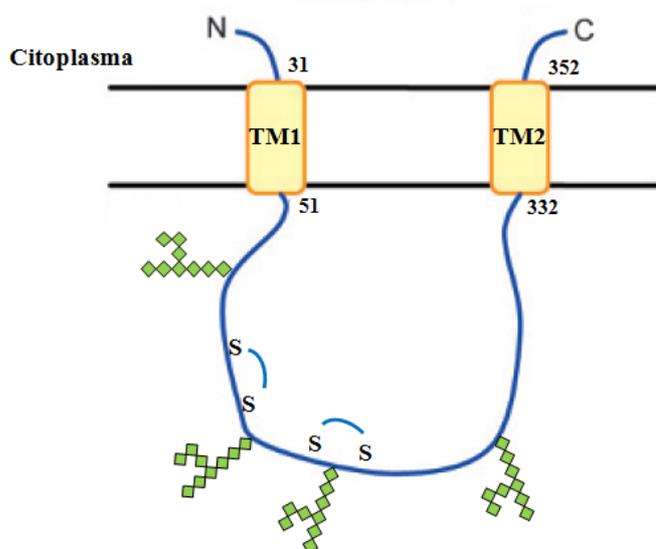


Figura 27. Modelo topológico de la proteína LiRos3 de *L. infantum*.

Se indican los residuos donde empiezan y terminan los dos segmentos transmembrana según la predicción de diversos programas bioinformáticos. Se resaltan además los puentes disulfuro y las N-glicosilaciones que se prevé que tengan lugar en la proteína.

Al estudiar la homología de LiRos3 con las otras proteínas de la familia Cdc50 de *L. infantum* se observó que presenta un porcentaje de identidad del 30% con LiRos1 y del 33% con LiRos2 (Tabla 3). Comparándola con los posibles ortólogos de otras especies de *Leishmania*, se observaron unas identidades que iban desde el 99% (*L. donovani*) o el 91% (*L. major*) hasta el 73% (*L. braziliensis*). Otras proteínas Cdc50 de otros tripanosomátidos, ninguna de las cuales se ha estudiado hasta la fecha, presentan unos porcentajes de identidad del 35-50% con LiRos3. Por último, también puede destacarse de este análisis que LiRos3 presenta una identidad del 22-30% con diversas proteínas Cdc50 de otros organismos eucariotas que se han estudiado en anteriores trabajos (revisado por López-Marqués *et al.*, 2014). Es el caso de las proteínas de levaduras Lem3p (que posee similitud funcional con LiRos3), Crf1p y Cdc50p; las proteínas CDC50A y CDC50B de humanos; las proteínas ALIS-1, ALIS-3 y ALIS-5 de *A. thaliana*, y la proteína CHAT-1 de *C. elegans*. (Tabla 3).

Tabla 3. Homología de LiRos3 con otras proteínas Cdc50

Especie	Proteína (número de acceso)	%I (%S)
<u>Leishmania</u>		
<i>L. infantum</i>	LiRos1 (A4IBN0)	30 (46)
	LiRos2 (A4HU24)	33 (49)
<i>L. donovani</i>	LdRos3 (Q0P0L8)	99 (100)
<i>L. major</i>	Q4Q5N2	91 (94)
<i>L. amazonensis</i>	A0A075DN10	85 (91)
<i>L. mexicana</i>	E9B2H4	85 (90)
<i>L. panamensis</i>	A0A088RYB7	74 (85)
<i>L. braziliensis</i>	LbRos3 (A4HK31)	73 (85)
<u>Otros tripanosomátidos</u>		
<i>Strigomonas culicis</i>	S9USM7	49 (68)
<i>Angomonas deanei</i>	S9V780	49 (69)
<i>Phytomonas sp.</i>	W6KZJ4	47 (66)
<i>Trypanosoma cruzi</i>	K2N5A4	43 (59)
<i>Trypanosoma brucei brucei</i>	Q382G0	40 (60)
<i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	D0A9R9	40 (60)
<i>Trypanosoma vivax</i>	G0U8P6	37 (58)
<i>Trypanosoma congolense</i>	G0V2M9	35 (49)
<u>Otros eucariotas</u>		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Crflp (P53740)	26 (38)
	Lem3p (P42838)	25 (40)
	Cdc50p (P25656)	24 (39)
<i>Homo sapiens</i>	CDC50A (Q9NV96)	30 (45)
	CDC50B (Q3MIR4)	28 (42)
<i>Mus musculus</i>	Cdc50A (Q8VEK0)	31 (46)
	Cdc50B (Q8BHG3)	27 (43)
	Cdc50C (Q9D4D7)	25 (41)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	ALIS1 (Q9LTW0)	28 (43)
	ALIS2 (Q67YS6)	26 (41)
	ALIS3 (Q9SLK2)	27 (42)
	ALIS4 (Q9SA35)	28 (42)
	ALIS5 (Q8L8W0)	27 (42)
<i>Drosophila melanogaster</i>	CG9947 (Q9VXG0)	28 (43)
<i>Caenorhabditis elegans</i>	CHAT-1 (H2L0H3)	22 (39)
	F20C5.4 (Q19635)	23 (39)
	W03G11.2 (Q23151)	22 (36)

Se han seleccionado las otras dos proteínas Cdc50 de *L. infantum*, las posibles proteínas ortólogas de otras especies de *Leishmania* y la proteína Cdc50 de otros tripanosomátidos que presenta mayor porcentaje de similitud con LiRos3. La tabla se completa con las proteínas Cdc50 identificadas en otros organismos eucariotas representativos. Se indica el número de acceso de las proteínas en la base de datos UniProtKB. El número de acceso de LiRos3 es A4I7N1. %I, porcentaje de identidad; %S, porcentaje de similitud.

II. Generación y caracterización de promastigotes de *L. infantum* mutantes nulos del gen *LiRos3*

La caracterización de la proteína LiRos3 que se describe en esta tesis doctoral se llevó a cabo utilizando una cepa de *L. infantum* denominada MHOM/ES/1993/BCN-99. Los trabajos previos realizados en nuestro laboratorio en los que se identificó el complejo de transporte de MLF y se analizó su funcionamiento y localización, se llevaron a cabo principalmente en una cepa de *L. donovani*. *L. infantum* es endémica en España y la cepa utilizada en esta tesis doctoral tiene la ventaja de bioseguridad, al ser poco virulenta en animales de experimentación. Es conveniente destacar que ambas especies presentan una sensibilidad a MLF muy parecida, que están clasificadas taxonómicamente dentro del mismo complejo y que los genes *LdMT* y *LdRos3* de *L. donovani* presentan con respecto a los ortólogos *LiMT* y *LiRos3* de *L. infantum* una identidad en la secuencia deducida de aminoácidos del 100% y 99%, respectivamente.

Para caracterizar la proteína LiRos3, en primer lugar se tuvieron que generar promastigotes en los cuales se eliminaron los dos alelos del gen *LiRos3*, tal y como se describió para *LdRos3* (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a). Los promastigotes heterocigotos *LiRos3* (+/-) se generaron con relativa facilidad después de transfectar promastigotes salvajes con una construcción linealizada en la que el cassette HYG, que confiere resistencia a higromicina B, se encontraba flanqueado por las regiones 5'-UTR y 3'-UTR de *LiRos3* (Fig. 28A). Tras chequear mediante PCR la correcta integración de la construcción a partir de DNA genómico, se incrementó la presión con higromicina B para obtener un clon mutante nulo *LiRos3* (-/-), línea Δ LiRos3, que se seleccionó por ser resistente a una concentración de MLF de 80 μ M. La correcta integración de la construcción usada para obtener la línea Δ LiRos3 se chequeó mediante un análisis por PCR a partir de DNA genómico (Fig. 28B) y un análisis por Southern blot (Fig. 28C). Además, la pérdida de expresión de LiRos3 se verificó mediante inmunodetección usando un anticuerpo policlonal de conejo previamente generado en nuestro laboratorio dirigido contra el lazo exoplasmático de LdRos3 (Sánchez-Cañete *et al.*, 2009), que también reconoce el lazo de LiRos3 (Fig. 28D).

En *L. donovani* se observó que la inactivación de los dos alelos de *LdRos3* genera parásitos que son incapaces de llevar a cabo la translocación del fármaco y, por tanto, completamente resistentes al mismo (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a). Al igual que en este estudio, para analizar el fenotipo de los promastigotes Δ LiRos3 generados en esta tesis doctoral se emplearon los ensayos de acumulación de MLF marcada radiactivamente y de sensibilidad a este fármaco mediante el método colorimétrico basado en la reducción del MTT. Estos dos ensayos permiten comparar la MLF acumulada por diferentes líneas y calcular la IC₅₀, respectivamente. Como era de esperar, los promastigotes Δ LiRos3 fueron resistentes a MLF e incapaces de internalizar el fármaco (Fig. 29). Estos mutantes nulos incorporaron alrededor del 4% de la cantidad de MLF incorporada por los promastigotes salvajes, un porcentaje similar al que se obtuvo cuando se generaron mutantes nulos de *LdMT* y *LdRos3* (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a). La transfección de la línea Δ LiRos3 con un vector episomal que contenía el gen *LiRos3* rescató estos dos fenotipos (Fig. 29), confirmando que se debían a la pérdida de esta proteína Cdc50.

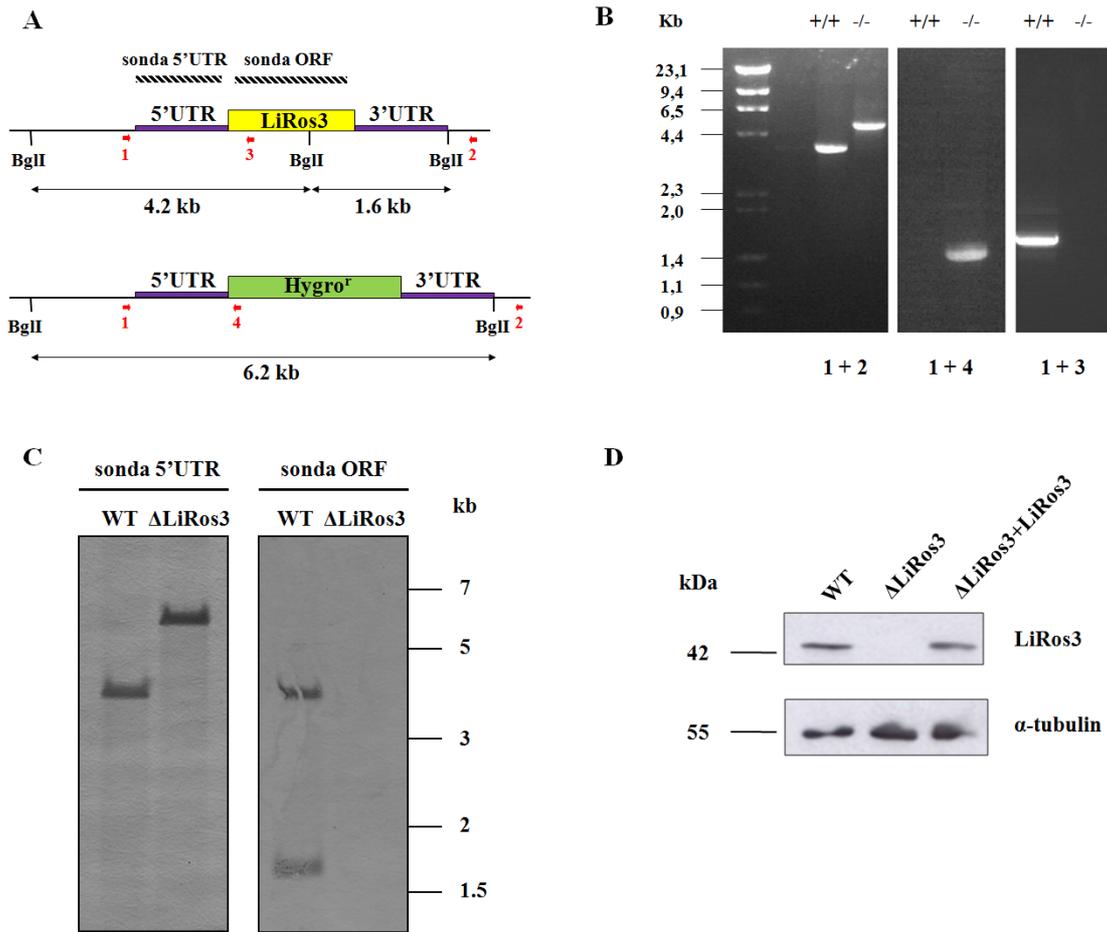


Figura 28. Generación de promastigotes mutantes nulos para LiRos3 (Δ LiRos3).

(A) Representación esquemática del locus de *LiRos3* y de la construcción que contiene el gen de resistencia a higromicina B utilizada para lograr el reemplazamiento génico. Los números 1-4 representan la posición de los oligonucleótidos utilizados para comprobar mediante PCR la correcta inserción de la construcción. Se muestran también los sitios de restricción de BglII y las sondas usadas para el análisis mediante Southern blot. (B) Análisis por PCR del locus de *LiRos3* en los promastigotes salvajes (+/+) y en los mutantes nulos de *LiRos3* (-/-). El tamaño esperado de los productos amplificados con el par de oligonucleótidos 1 y 2 es de 3,6 kb y 4,6 kb, respectivamente. El producto de PCR específico de la construcción (oligonucleótidos 1 y 4; 1,4 kb) confirmó que el reemplazamiento por el gen de resistencia a higromicina se produjo en el lugar correcto y el producto de PCR del interior del locus de *LiRos3* (oligonucleótidos 1 y 3; 1,5 kb) confirmó que se habían reemplazado los dos alelos en los promastigotes Δ LiRos3. (C) Análisis mediante Southern blot del DNA genómico de los promastigotes de la línea salvaje (WT) y la línea Δ LiRos3. Este DNA se digirió con BglII y se hibridó con sondas de DNA marcadas con digoxigenina procedentes de la región 5'-UTR y el ORF de *LiRos3*. La diana de BglII situada en el interior de *LiRos3* se pierde al producirse el reemplazamiento génico. (D) Análisis mediante Western blot de extractos proteicos totales de los promastigotes WT, Δ LiRos3 y Δ LiRos3 transfectados con el gen nativo (Δ LiRos3+LiRos3) con el anticuerpo policlonal anti-LdRos3 de conejo. Para el control de carga de proteínas se utilizó un anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina de ratón.

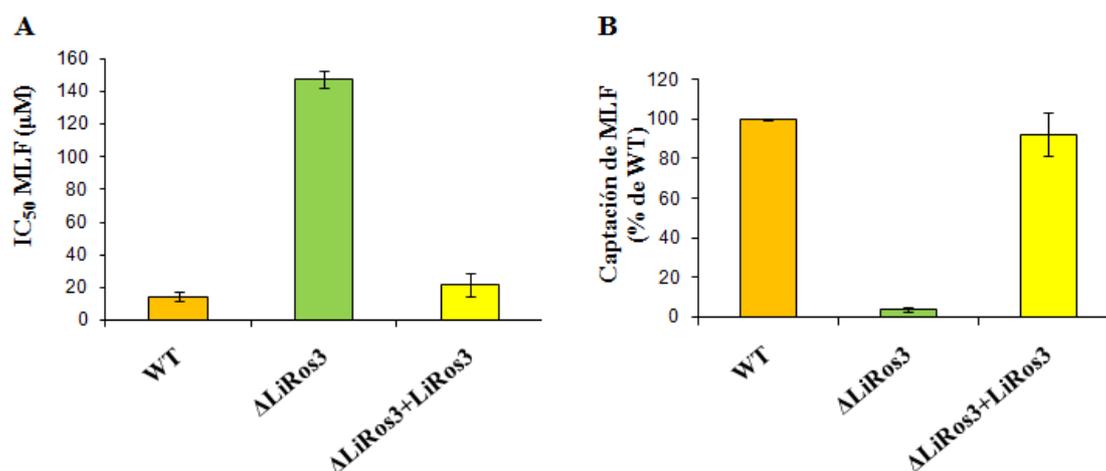


Figura 29. Caracterización funcional de los promastigotes Δ LiRos3.

(A) La sensibilidad a miltefosina (MLF) en promastigotes de *L. infantum* se determinó usando el método colorimétrico basado en la reducción del MTT. Se representa la IC₅₀ después de 48 h de cultivo. Los resultados son la media \pm S.D. de al menos tres experimentos independientes. (B) La captación de [¹⁴C]MLF se midió después de 60 min de incubación a 28°C. Se expresa como el porcentaje de MLF internalizada respecto a la línea salvaje (WT). Los resultados son la media \pm S.D. de al menos tres experimentos independientes.

III. Identificación de residuos de LiRos3 implicados en la funcionalidad del complejo de transporte de miltefosina

Existen tres miembros de la familia de proteínas Cdc50 en humanos (Katoh y Katoh, 2004), levaduras (Saito *et al.*, 2004) y *Leishmania* (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a; <http://tritypdb.org/tritypdb/>). Realizando un alineamiento de la secuencia completa de aminoácidos de las proteínas Cdc50 de humanos (CDC50A y CDC50B), ratón (Cdc50C; seleccionada porque la proteína ortóloga humana CDC50C está truncada) (Osada *et al.*, 2007), *S. cerevisiae* (Lem3p, Cdc50p y Crf1p) y *L. infantum* (LiRos1, LiRos2 y LiRos3), se observa la existencia de 22 residuos invariables (Fig. 30). Estos residuos también están conservados en la única proteína Cdc50 de *D. melanogaster* (CG9947) y en la proteína CHAT-1 de *C. elegans*. Sin embargo, de entre todos ellos, Gly¹³⁷ y Tyr²⁹⁸ no están conservados en las proteínas Cdc50 de *A. thaliana* ALIS1, ALIS3 y ALIS5 (Fig. 31), incluidas en el análisis porque se ha descrito que las tres interaccionan con las P4-ATPasas ALA1, ALA2 Y ALA3 (López-Marqués *et al.*, 2010 y 2012). Del alineamiento se excluyeron las proteínas Cdc50 de otros tripanosomátidos por su proximidad filogenética y porque no se ha realizado con ellos hasta la fecha ningún estudio funcional.

Ninguno de estos residuos invariables se habían analizado en los anteriores estudios publicados acerca de los residuos implicados en la actividad de proteínas Cdc50 de levaduras y mamíferos (Takahashi *et al.*, 2011; Coleman y Molday, 2011; Puts *et al.*, 2012). Mediante mutagénesis aleatoria, Takahashi *et al.* estudiaron proteínas Cdc50p mutantes capaces de unirse a Drs2p pero funcionalmente defectivas. Por ejemplo, identificaron dos residuos que podrían estar implicados en la interacción de Cdc50p con Drs2p durante su ciclo de reacción: Pro²³ y Thr³²⁰. Esta prolina se localiza en el dominio N-terminal y está conservada en las proteínas Cdc50 de levaduras y humanos, pero no

en las de *Leishmania*, si bien el residuo Pro⁸ de LiRos3 se podría corresponder con la misma. La treonina 320 está conservada en levaduras y en humanos se corresponde con una serina; sin embargo, en LiRos3 se corresponde con Ala³²⁰ (Fig. 30). Estos autores identificaron además un residuo, Gln⁷¹, que no afecta a la interacción de ambas proteínas, pero que podría participar en el ciclo de reacción (Takahashi *et al.*, 2011). Esta glutamina no está conservada en las proteínas Cdc50 de humanos y *Leishmania*; por ejemplo, en LiRos3 se corresponde con Thr⁵⁷ (Fig. 30). En otro estudio, Puts *et al.* también emplearon la mutagénesis aleatoria para identificar residuos críticos en la interacción de Lem3p con Dnf1p, y comprobaron que también afectaban a la interacción con Dnf2p. Estos residuos se encontraron dispersos en diferentes dominios de Lem3p: Ala⁶⁵ se localiza en el dominio N-terminal; Ala⁸³, en el primer segmento transmembrana; Ser²³⁷, en el lazo extracitosólico; Gly³⁷⁵, en el segundo segmento transmembrana, y Ala⁴⁰⁴, en el dominio C-terminal (Puts *et al.*, 2012). La alanina 65 está conservada en las proteínas Cdc50 de levaduras y en las proteínas CDC50A y CDC50B de humanos, pero en *Leishmania* solo se encuentra en LiRos1. La alanina 83 está conservada en LiRos3 (Ala³⁹), pero no en mamíferos. La serina 237 está conservada en todas las proteínas Cdc50 de humanos, levaduras y *Leishmania*, excepto en LiRos3 (Ala¹⁷³). La glicina 375 también está conservada en todas estas proteínas, excepto en LiRos1. Por último, la alanina 404 no está conservada en ninguna de las proteínas Cdc50 utilizadas en el alineamiento (Fig. 30).

Mediante mutagénesis dirigida, Puts *et al.* también identificaron dos puentes disulfuro situados en el dominio extracitosólico importantes para la función de las proteínas Cdc50 de levaduras (Puts *et al.*, 2012). Al eliminar uno de estos puentes disulfuro, que está conservado en LiRos3 (Cys¹⁴⁶- Cys¹⁶⁷) (Fig. 30), se observó un fuerte descenso en la actividad flipasa sin que se observase un marcado efecto en la afinidad de las proteínas Cdc50 por las P4-ATPasas. En cambio, el otro puente disulfuro mostró ser necesario para esta afinidad, pero no para la funcionalidad del complejo (Puts *et al.*, 2012). Aunque este puente disulfuro no está conservado en LiRos3, ya que las cisteínas están sustituidas por Ile⁶⁶ y Thr⁹⁶ (Fig. 30), esta proteína posee otros dos residuos de cisteína que probablemente formen un puente disulfuro (Cys¹⁹⁰ y Cys²⁰⁸) (Fig. 30).

Tres de los residuos invariables identificados en las proteínas Cdc50 de humanos, levaduras y *Leishmania* (Gln¹⁶, Gln¹⁷ y Leu¹⁹) pertenecen al dominio N-terminal, mientras que los diecinueve restantes están localizados en el dominio exoplasmático (Fig. 32). Para analizar si estos residuos están relacionados con la funcionalidad de LiRos3 en el complejo que constituye con LiMT, en esta tesis doctoral se generó un grupo de 22 líneas mutantes en las que cada uno de estos residuos invariables se sustituyó por un aminoácido con características químicas completamente diferentes (sustituciones no conservativas), y otro grupo de 20 líneas mutantes en las que se sustituyeron por aminoácidos con características químicas similares (sustituciones conservativas). Esta diferencia se debe a que los dos residuos invariables de prolina no pueden sustituirse por aminoácidos similares.

Este objetivo se consiguió transfectando los promastigotes Δ LiRos3 con vectores de expresión episomales que contenían cada una de las construcciones mutantes de *LiRos3* generadas por mutagénesis dirigida (Fig. 33A).

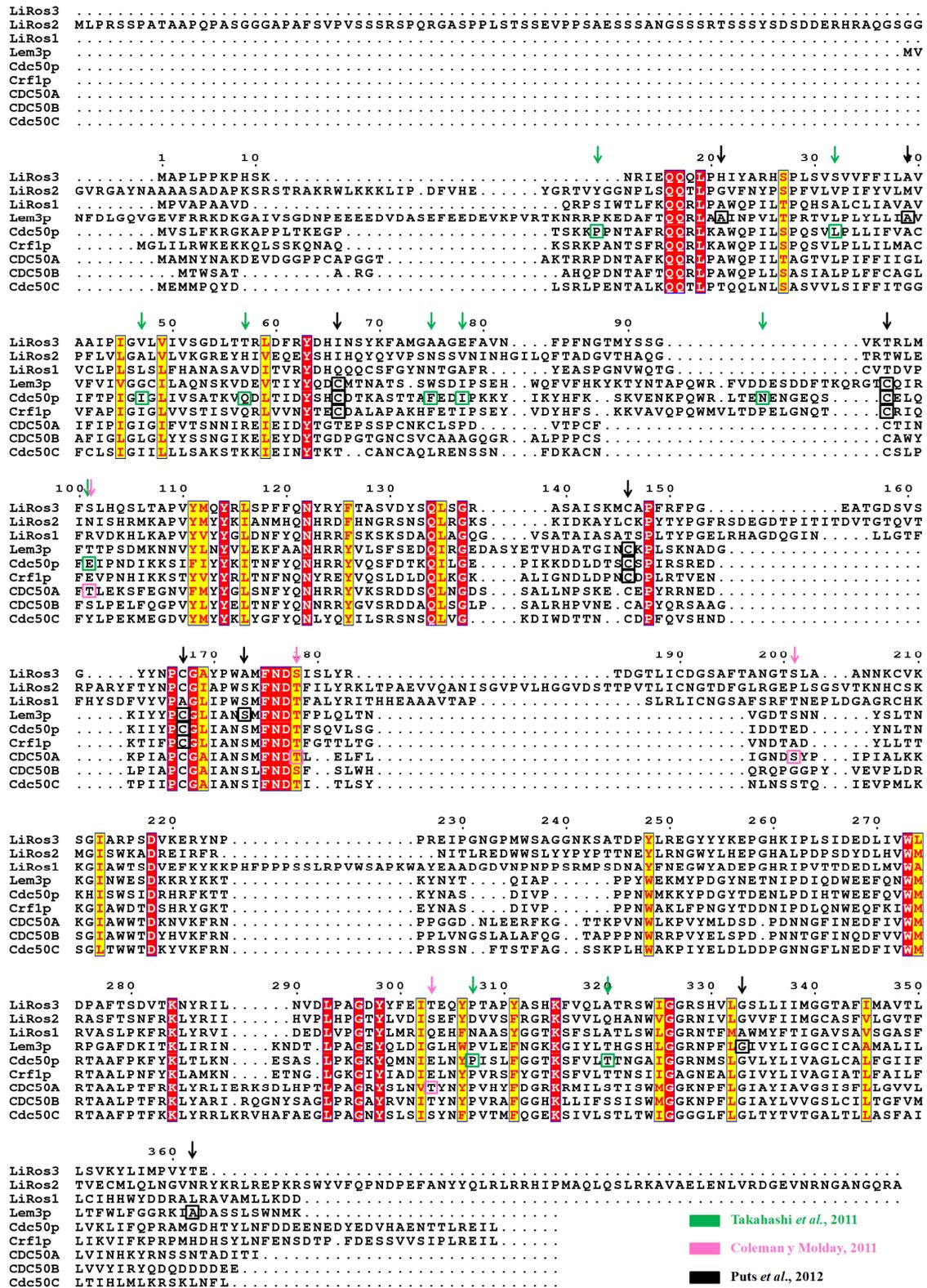


Figura 30. Alineamiento de las proteínas de la familia Cdc50 de *L. infantum*, levaduras y mamíferos. Se muestra el alineamiento de las secuencias completas de proteínas Cdc50 de *L. infantum* (LiRos3, LiRos2 y LiRos1), levaduras (Lem3p, Cdc50p y Crf1p), humanos (CDC50A y CDC50B) y ratón (Cdc50C). Los recuadros en rojo indican los 22 residuos invariables seleccionados para realizar mutaciones dirigidas en esta tesis doctoral, mientras que los recuadros en amarillo indican residuos con alto grado de conservación. Las flechas señalan los residuos analizados en anteriores estudios (Takahashi *et al.*, 2011; Coleman y Molday, 2011; Puts *et al.*, 2012) (ver texto para más detalles).

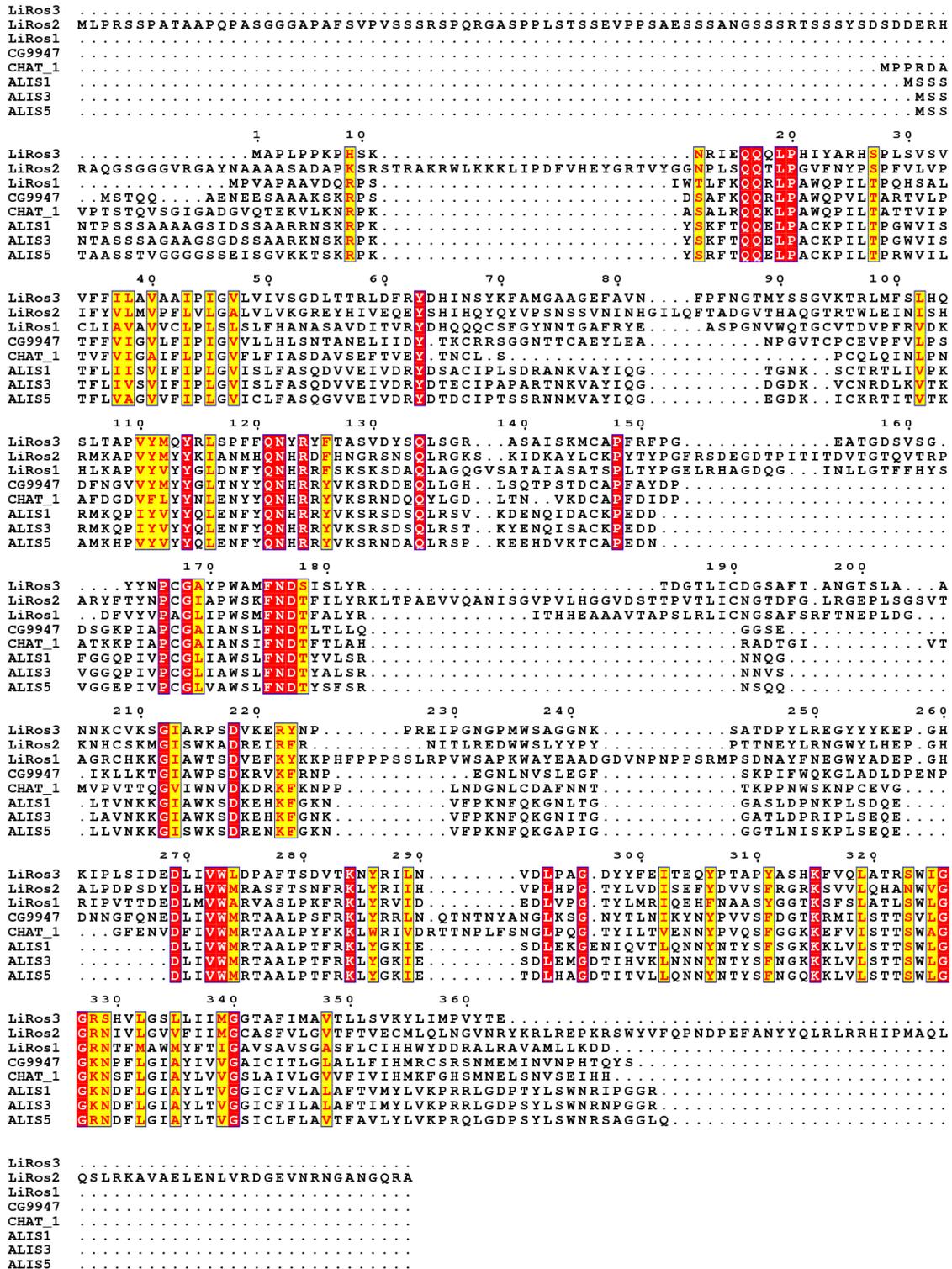


Figura 31. Alineamiento de las proteínas Cdc50 de *L. infantum* (LiRos1, LiRos2, LiRos3), *D. melanogaster* (CG9947), *C. elegans* (CHAT-1) y *A. thaliana* (ALIS1, ALIS3, ALIS5). Los recuadros en rojo indican los residuos invariables y los recuadros en amarillo indican residuos con alto grado de conservación.

```

MAPLPPKPHS KNRIEQQQLP HIYARHSPLS VSVVFFILAV AAIPIGVLVI VSRDLTTTRLD 60
FRYDHINSYK FAMGAAGEFA VNFPFNGTMY SSGVKTRLMF SLHQSLTAPV YMQYRLSPFF 120
QNYRYFTASV DYSQLSGRAS AISKMCAPFR FPGEATGDSV SGYYNPCGAY PWAMFNDSIS 180
LYRTDGTLIC DGSAFTANGT SLAANNKCVK SGIARPSDVK ERYNPPREIP GNGPMWSAGG 240
NKSATDPYLR EGYYYKEPGH KIPLSIDEDL IVWLDPAFTS DVTKNYRILN VDLPAGDYF 300
EITEQYPTAP YASHKFVQLA TRSWIGGRSH VLGSLLIIMG GTAFIMAVTL LSVKYLIMPV 360
YTE

```

Figura 32. Secuencia deducida en aminoácidos de la proteína LiRos3 de *L. infantum*.

En rojo están indicados los residuos invariables de las proteínas Cdc50 de *Leishmania*, levaduras y mamíferos. Con fondo negro se indican los residuos de cisteína probablemente implicados en la formación de dos puentes disulfuro. Con fondo verde se indican las asparaginas susceptibles de ser N-glicosiladas. Con fondo amarillo se indican los motivos conservados en la familia. Con fondo azul se representan los dos segmentos transmembrana de la proteína.

Antes de llevar a cabo los análisis funcionales de los mutantes de LiRos3, se analizó en qué medida afectaban las sustituciones a la expresión de la proteína. El análisis mediante Western blot de lisados celulares totales mostró un nivel de expresión de estas proteínas mutantes en la mayoría de líneas transfectantes muy parecido al que presentó la línea que expresaba la proteína nativa (línea control, denominada Δ LiRos3+LiRos3). La variación en el tamaño y en el número de péptidos que mostraron algunos transfectantes podría deberse a modificaciones post-traduccionales (Fig. 33B). De todos modos, los cambios en los niveles de expresión de LiRos3 podrían no afectar a la actividad translocasa de fosfolípidos, ya que la subunidad P4-ATPasa es el factor molecular limitante para la actividad de translocación de fosfolípidos, como se ha descrito en *L. donovani* (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a). Dicho de otra forma, los niveles de expresión de la subunidad beta son superiores a los de la subunidad P4-ATPasa y una reducción poco sustancial de los niveles de LiRos3 no debería afectar a los niveles del complejo de transporte en la membrana plasmática del parásito, considerando que la interacción entre ambas moléculas sería 1:1 (Weingärtner *et al.*, 2010; Azouaoui *et al.*, 2014).

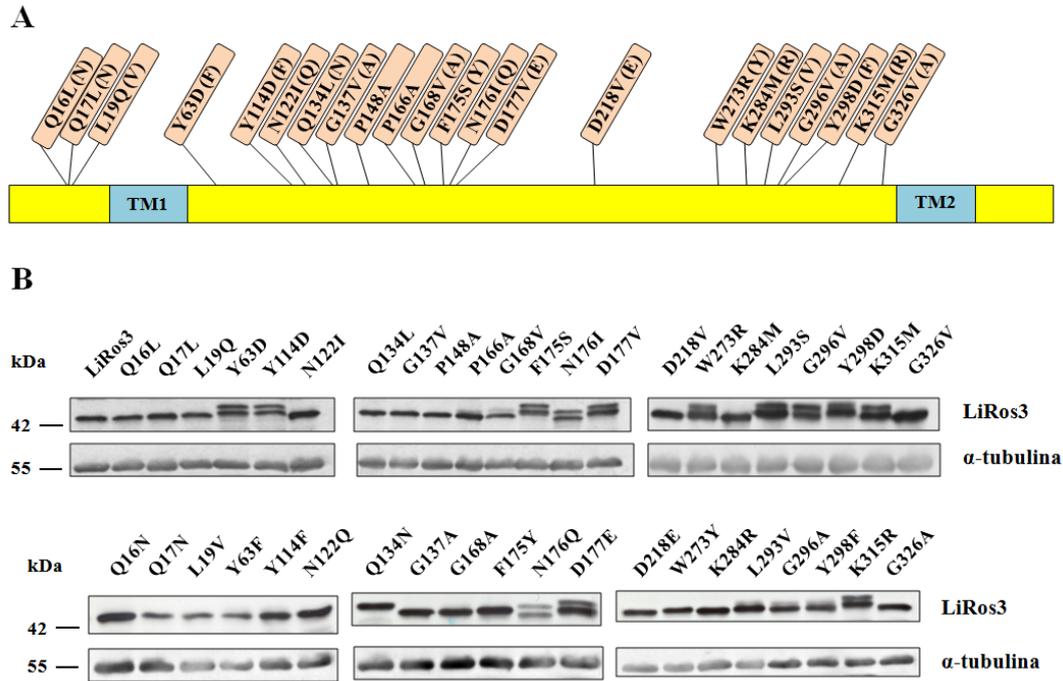


Figura 33. Sustituciones aminoacídicas en LiRos3 y expresión total de las proteínas mutantes.

(A) Representación esquemática de la proteína LiRos3 en la que se incluyen las mutaciones introducidas en los 22 residuos invariables de las proteínas Cdc50 de humanos, levaduras y *Leishmania*. En primer lugar se indican las sustituciones no conservativas y, entre paréntesis, las sustituciones conservativas. TM1 y TM2 representan los segmentos transmembrana 1 y 2. (B) Análisis de expresión de las proteínas LiRos3 mutantes mediante Western blot. Se realizó con un anticuerpo policlonal anti-LdRos3 a partir de extractos proteicos totales de los promastigotes Δ LiRos3 transfectados con las construcciones mutantes de *LiRos3* con sustituciones no conservativas (bloque superior) y conservativas (bloque inferior). La línea Δ LiRos3+LiRos3 (LiRos3) se empleó como control. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina para el control de carga de proteínas. Se muestra un resultado representativo de al menos tres experimentos.

Tras ello, se midió la sensibilidad a MLF en las diferentes líneas mutantes (Fig. 34A) y, de forma paralela, se determinó la captación de MLF marcada radiactivamente ($[^{14}\text{C}]\text{MLF}$) como prueba de la funcionalidad del complejo de transporte (Fig. 34B). Un total de 19 de las 22 líneas de transfectantes con mutaciones no conservativas de LiRos3 presentaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de IC_{50} comparado con el valor que presentaron los promastigotes Δ LiRos3 transfectados con el vector episomal que contenía el gen nativo (línea control Δ LiRos3 + LiRos3). Sin embargo, algunos de estos mutantes presentaron una sensibilidad a MLF solo 1,5 veces más baja respecto a esta línea control. Además, las diferencias en la captación de MLF no fueron estadísticamente significativas en todos los casos, por lo que se prestó mayor atención a ocho mutantes (Y63D, Y114D, G168V, N176I, D177V, L293S, Y298D y K315M), que presentaron una sensibilidad a MLF 6-8 veces inferior con respecto a los promastigotes de la línea control Δ LiRos3 + LiRos3 (Fig. 34A). Resulta destacable que tres de estos residuos (Gly¹⁶⁸, Asn¹⁷⁶ y Asp¹⁷⁷) forman parte de la secuencia motivo PCGLIANSMFNDT, conservada en las proteínas Cdc50 desde humanos a levaduras, que había sido descrita previamente y que contiene también una cisteína que participa en la formación de un puente disulfuro importante para la actividad flipasa de la P4-ATPasa asociada (Puts *et al.*, 2012).

El descenso en la sensibilidad a MLF se relacionó con la marcada reducción en la cantidad de fármaco internalizada por estos ocho mutantes, que fue inferior al 25% respecto a los promastigotes salvajes, empleados como control en los ensayos de captación de MLF. Este descenso fue especialmente marcado en cuatro líneas (Y63D, Y114D, D177V y Y298D), que presentaron una captación de MLF muy parecida a la que presentó la línea Δ LiRos3 (aproximadamente un 3-4% de la MLF internalizada por los promastigotes de la cepa salvaje; Fig. 34B).

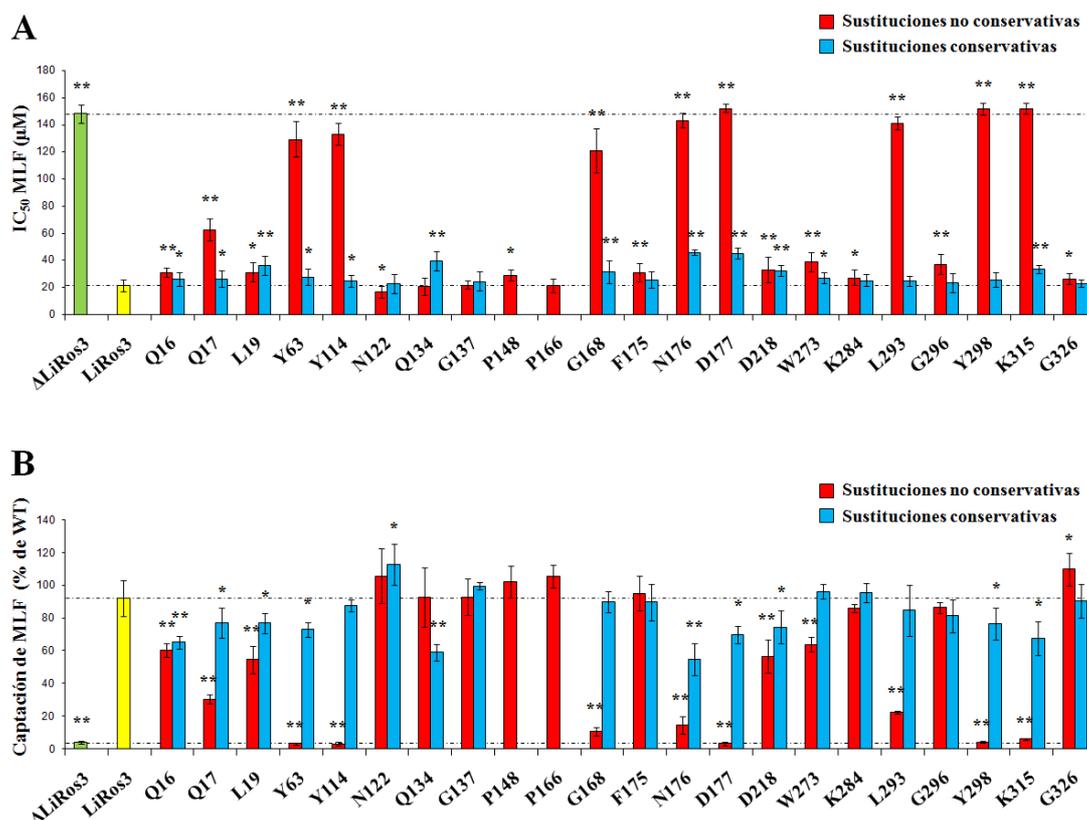


Figura 34. Caracterización funcional de los promastigotes de *L. infantum* mutantes para LiRos3.

(A) Sensibilidad a miltefosina (MLF) y (B) captación de [¹⁴C]MLF de los promastigotes Δ LiRos3 transfectados con las construcciones mutantes de *LiRos3* con las sustituciones no conservativas y conservativas que aparecen reflejadas en la Figura 33A. La columna LiRos3 se corresponde con la línea control Δ LiRos3+LiRos3. Los ensayos se llevaron a cabo de la manera descrita en la leyenda de la Figura 29. (A) Los resultados son la media \pm S.D. de los valores de IC₅₀ obtenidos en al menos tres experimentos independientes. Las líneas discontinuas indican los valores medios de los controles negativo (Δ LiRos3; línea superior) y positivo (Δ LiRos3+LiRos3; línea inferior). (B) Los resultados son la media \pm S.D. del porcentaje de MLF internalizada en relación con los promastigotes salvajes (WT) control obtenido en al menos tres experimentos independientes. Las líneas discontinuas indican los valores medios de los controles negativo (línea inferior) y positivo (línea superior). Las diferencias estadísticamente significativas con respecto a la línea Δ LiRos3+LiRos3 se determinaron mediante el test de la *t* de Student (**p* < 0,05 y ***p* < 0,001).

Para estudiar con más detalle estos ocho residuos se realizaron otras mutaciones no conservativas (Y63K, Y114K, G168D, N176D, D177K, L293K, Y298K y K315D). Tras verificar en las nuevas líneas transfectantes la correcta expresión de esta serie adicional de proteínas mutantes (Fig. 35A), se procedió a estudiar la sensibilidad a MLF y la acumulación del fármaco (Fig. 35B y 35C). De los resultados obtenidos, se puede destacar que la línea Y114K a diferencia con la Y114D fue sensible a MLF y presentó

una acumulación cercana al 70% respecto a la línea salvaje control. La línea N176D presentó una acumulación del 35%, un valor superior al 15% que mostró la línea N176I, y una sensibilidad a MLF 3 veces más baja que la línea control Δ LiRos3 + LiRos3. Por contra, la línea L293K presentó una acumulación del 4% frente al 22% que mostró la línea L293S. La acumulación de la línea G168D fue del 9%, un valor similar al 11% que presentaba la línea G168V. Las restantes líneas (Y63K, D177K, Y298K y K315D) tuvieron unos valores de acumulación inferiores al 5% y consecuentemente también fueron altamente resistentes a MLF, resaltando la importancia de los residuos mutados en la formación de un complejo LiMT-LiRos3 funcional.

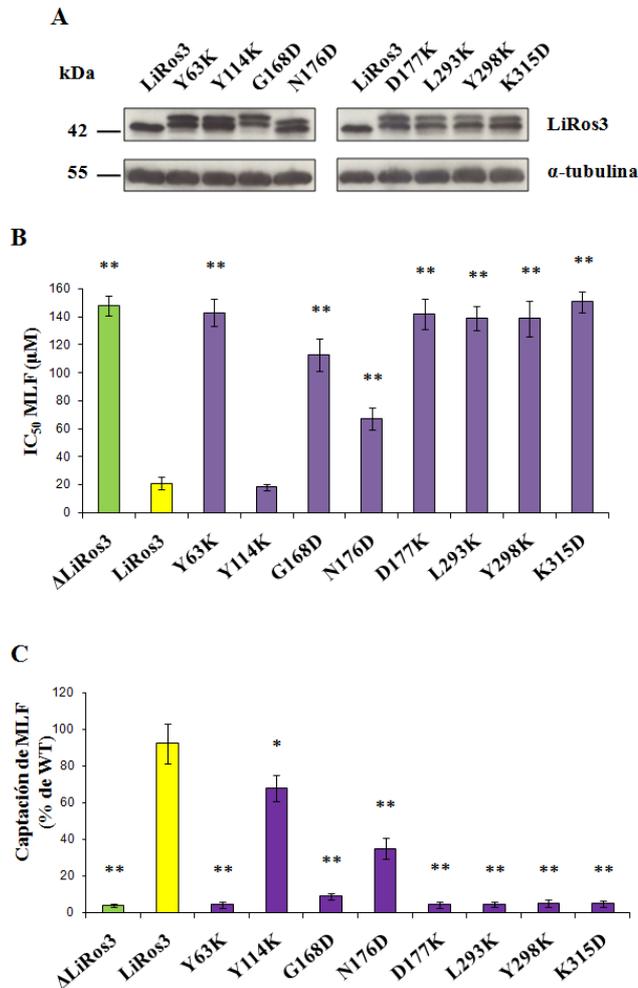


Figura 35. Caracterización de otros mutantes LiRos3 en residuos críticos de la proteína.

Se seleccionaron los ocho residuos cuya mutación no conservativa mostró unos efectos más marcados para estudiar el efecto de introducir otras mutaciones no conservativas diferentes. (A) Análisis de las proteínas LiRos3 mutantes mediante Western blot. Se realizó con un anticuerpo policlonal anti-LdRos3 a partir de extractos proteicos totales de los promastigotes Δ LiRos3 transfectados con las construcciones mutantes de *LiRos3*. La línea Δ LiRos3+LiRos3 (LiRos3) se empleó como control. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina para el control de carga de proteínas. Se muestra un resultado representativo de al menos tres experimentos. (B) La sensibilidad a miltefosina (MLF) y (C) la captación de [¹⁴C]MLF de los mutantes se determinaron de la manera descrita en la leyenda de la Figura 29. Los resultados son la media \pm S.D. de los valores de IC₅₀ y del porcentaje de MLF internalizada en relación con los promastigotes salvajes (WT) obtenido en al menos tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto a la línea Δ LiRos3+LiRos3 se determinaron mediante el test de la *t* de Student (**p* < 0,05 y ***p* < 0,001).

Cabe destacar que otras sustituciones no conservativas en residuos situados en el lazo extracitoplasmático de LiRos3 conllevaron un descenso significativo en la captación de MLF, aunque no tan elevado como en los ejemplos anteriores, como se observó en las líneas D218V (57% respecto a la línea salvaje) y W273R (64%) (Fig. 34B).

Para continuar indagando sobre el grado de conservación necesario en cada uno de los 22 residuos para mantener la funcionalidad, se generó una serie de líneas transfectantes conteniendo mutaciones conservativas en *LiRos3*. En ellas no se observaron unas diferencias tan altas en la funcionalidad del complejo respecto a las sustituciones no conservativas, pero cabe destacar que cinco de las sustituciones realizadas en los ocho residuos anteriormente comentados (Y63F, N176Q, D177E, Y298F y K315R) también suponían un descenso significativo en la captación del fármaco (55-77% respecto a la cantidad captada por la línea salvaje) (Fig. 34). La línea que menor captación presentó fue la N176Q, con un 55%. El descenso fue también significativo en el mutante D218E (75%). De todos modos, en esta serie de transfectantes la sensibilidad al fármaco fue similar o presentó un descenso máximo de 2 veces respecto a la línea control Δ LiRos3+LiRos3, como se observó en las líneas N176Q y D177E (Fig. 34).

Un resultado llamativo se obtuvo al realizar una sustitución conservativa en Gln¹³⁴ (Q134N), puesto que produjo un descenso significativo en la captación de MLF con respecto a la línea mutante no conservativa Q134L (59% en la línea Q134N y 93% en la Q134L) (Fig. 34B). La sustitución por un residuo de asparagina introduce en la posición 134 un sitio de N-glicosilación, lo que explica que en el análisis de expresión se observase un incremento en la masa molecular de la proteína Q134N (Fig. 33B), que sería probablemente debido a esta glicosilación adicional.

Por otro lado, diferentes mutaciones en los tres residuos invariables de la región N-terminal de LiRos3 dieron lugar a una alteración significativa de su función. La captación de MLF de las líneas Q16L y L19Q fue aproximadamente el 55-60% de la que presentó la línea salvaje, aunque el valor de IC₅₀ fue solo 1,5 veces más alto que el de la línea Δ LiRos3+LiRos3 (Fig. 34). Estos resultados podrían deberse al hecho de que los ensayos de internalización se llevaron a cabo tras 1 h de incubación, mientras que los estudios de viabilidad celular se determinaron después de 48 h de incubación, lo que implica menores diferencias en los efectos tóxicos debidos al efecto acumulativo del fármaco. El fenotipo de resistencia a MLF fue aún más pronunciado en la línea Q17L, que mostró un incremento de tres veces en la IC₅₀ con respecto a la línea control Δ LiRos3+LiRos3 y aproximadamente un 30% de captación de MLF con respecto a los promastigotes de la línea salvaje (Fig. 34). Cuando se realizaron sustituciones conservativas en estos tres residuos (Q16N, Q17N, L19V) se observó también un descenso significativo en la captación de MLF, aunque menos acusado que el obtenido con las sustituciones no conservativas anteriormente citadas (Fig. 34B).

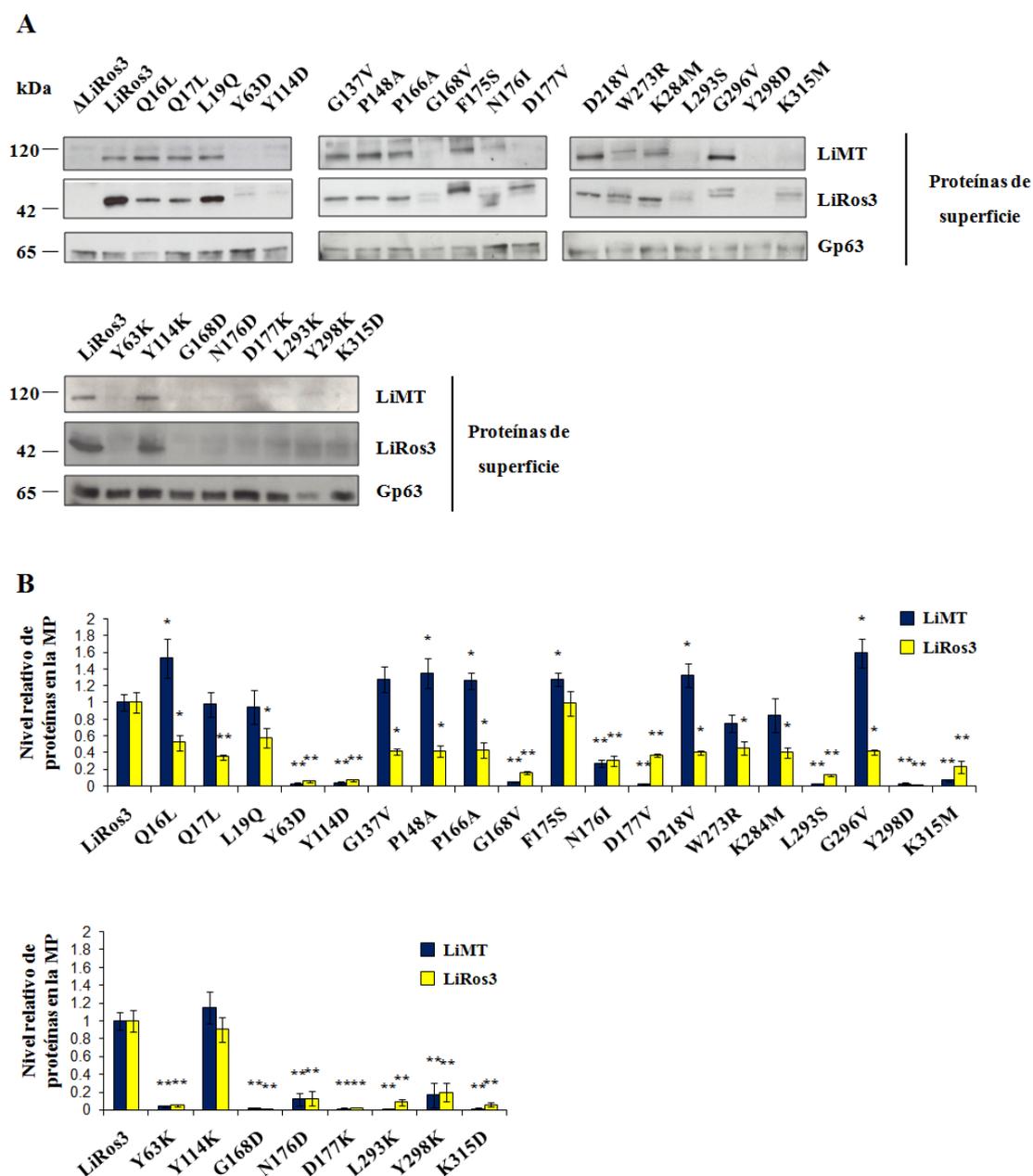
IV. Influencia de mutaciones en LiRos3 sobre el tráfico del transportador de miltefosina a la membrana plasmática

Las interacciones entre las proteínas Cdc50 y las P4-ATPasas son esenciales para la salida del retículo endoplasmático y la estabilidad de ambas subunidades (Kato *et al.*, 2002; Saito *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006; Furuta *et al.*, 2007; Poulsen *et al.*, 2008a; Bryde *et al.*, 2010; van der Velden *et al.*, 2010b; Coleman y Molday, 2011). Este hecho también se ha observado previamente en nuestro laboratorio, habiéndose descrito que las proteínas LdMT y LdRos3 de *L. donovani* dependen la una de la otra para alcanzar la membrana plasmática (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a). Existe una buena correlación entre los niveles de expresión de ambas proteínas en la membrana plasmática, la captación de MLF y la consecuente sensibilidad al fármaco (Sánchez-Cañete *et al.*, 2009).

Como las líneas mutantes con resistencia a MLF parcial o total presentaban niveles similares de expresión global de LiRos3 respecto a la línea control Δ LiRos3+LiRos3 (Figs. 33B, 34A, 35A y 35B), debía de haber otra causa que explicase su menor sensibilidad al fármaco. Para determinar si los cambios introducidos en LiRos3 conllevan alteraciones en el tráfico del complejo hacia la membrana plasmática o si una vez ubicado en ella presenta alteraciones en la actividad de transporte, se determinaron en estas líneas los niveles de expresión de ambas proteínas en la superficie del parásito. Para ello, las proteínas de la superficie del parásito se biotinilaron para su aislamiento y proceder mediante Western blot al análisis de los niveles de expresión de LiRos3 y LiMT. La línea Δ LiRos3 se usó como control negativo porque la cantidad producida de LiMT debería quedarse retenida en el retículo endoplasmático.

En la mayoría de las líneas con alta resistencia a MLF (superior a 100 μ M) (Y63D, Y114D, G168V, D177V, L293S, Y298D, K315M, Y63K, G168D, D177K, L293K, Y298K y K315D) se detectaron niveles muy bajos tanto de LiMT como de LiRos3 a nivel de la membrana plasmática (Fig. 36). La única excepción fue la línea N176I, en la que se observaron niveles de LiMT y LiRos3 algo mayores, siendo aproximadamente un 70-75% más bajos que los de la línea control Δ LiRos3+LiRos3. Inesperadamente, se detectaron unos niveles relativamente altos de expresión en la membrana plasmática de LiRos3 en los mutantes D177V en contraposición con unos niveles muy bajos de LiMT (Fig. 36).

Las mutaciones no conservativas en los tres residuos invariables localizados en el dominio citosólico N-terminal (Q16L, Q17L y L19Q), no redujeron significativamente la expresión de LiMT en la membrana plasmática (Fig. 36) pero, como ya se ha comentado, sí condujeron a un descenso significativo en la captación de MLF (Fig. 34B). Un fenotipo similar se observó en la línea D218V. En cambio, la línea W273R mostró un descenso tanto de la captación de MLF como de la expresión del complejo translocasa en la membrana plasmática (Figs. 34B y 36). Otras líneas mutantes con sustituciones no conservativas en las que no se observaron cambios en la captación de MLF (por ejemplo, G137V, P148A, P166A, F175S, K284M y G296V) expresaron niveles similares o incluso superiores de LiMT en la membrana plasmática respecto a la línea control Δ LiRos3+LiRos3 (Figs. 34B y 36).



El análisis llevado a cabo sobre los mutantes con sustituciones conservativas sobre los ocho residuos más relevantes, mostró que los promastigotes transfectados presentaban buenos niveles de expresión del complejo LiMT-LiRos3 en la membrana plasmática (Fig. 37), aunque se observó en todos ellos un pequeño descenso en la

expresión de LiMT, lo que podría explicar en parte que presentasen menores valores de captación de MLF que la línea control (Fig. 34B). Es el caso de los mutantes Q16N, Q17N, L19V, Y63F, Q134N, N176Q, D177E, Y298F y K315R, cuya captación de MLF oscilaba entre el 55 y el 77% respecto a los promastigotes salvajes. Sin embargo, como se describirá con detalle más adelante (Capítulo VI), pudimos comprobar en la línea que presentaba un descenso más acusado (N176Q) que esta menor acumulación se puede explicar también por un descenso en la actividad de transporte una vez que el complejo ha llegado a la membrana plasmática. La mutación N176Q implica adicionalmente la pérdida de uno de los sitios de N-glicosilación de la proteína, un aspecto que será detallado en el capítulo VIII de esta tesis doctoral.

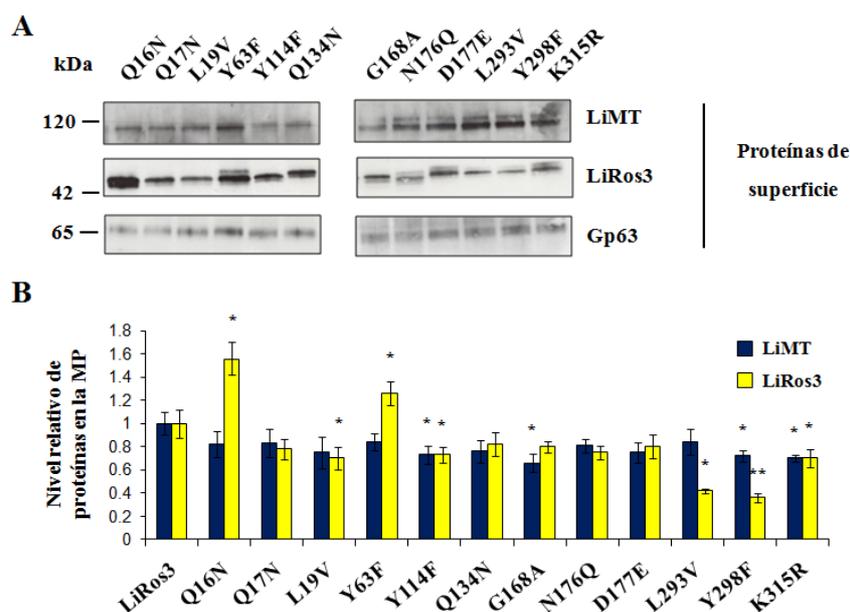


Figura 37. Niveles de expresión del complejo LiMT-LiRos3 en la membrana plasmática de los mutantes LiRos3 conservativos.

(A) Análisis mediante Western blot con anticuerpos anti-LdMT y anti-LdRos3 del nivel de proteínas biotiniladas procedentes de la membrana plasmática de algunos mutantes LiRos3 conservativos representativos. Se empleó un anticuerpo monoclonal anti-gp63 para el control de carga de proteínas de superficie. La línea Δ LiRos3+LiRos3 (LiRos3) se usó como control. Se muestra un resultado representativo de al menos tres experimentos independientes. (B) Expresión normalizada de LiMT y LiRos3 en la membrana plasmática (MP) en las líneas mutantes. Los resultados son la media \pm S.D. de los niveles de expresión relativos LiMT/gp63 y LiRos3/gp63 procedentes de al menos tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto a la línea control Δ LiRos3+LiRos3 se determinaron mediante el test de la *t* de Student (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$).

V. Influencia de mutaciones en LiRos3 sobre la interacción con su subunidad asociada LiMT

Para dilucidar si se veía afectada la interacción entre las subunidades del complejo de transporte de MLF en aquellos mutantes en los que el transportador LiMT presentaba niveles bajos o imperceptibles de expresión en la membrana plasmática, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación después de transfectar líneas representativas con la construcción LiMT-GFP. Con anterioridad se ha descrito que la inclusión de GFP en el

extremo carboxilo terminal de LdMT, que es 100% idéntica a LiMT, no interfiere con su función (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a).

Se analizaron mutaciones no conservativas de los ocho residuos de LiRos3 relevantes para el tráfico de LiMT a la membrana plasmática (Y63D, Y114, G168V, N176I, D177V, L293S, Y298D y K315M). En primer lugar se observó que estas líneas presentaban una menor expresión total tanto de la proteína endógena LiMT como de la construcción quimérica LiMT-GFP en relación con la línea control Δ LiRos3+LiRos3+LiMT-GFP (Fig. 38A). Por ello, en los ensayos de co-inmunoprecipitación realizados con estas líneas fue necesario partir de un número de promastigotes muy superior al de la línea control, para conseguir así partir de una cantidad similar de proteína LiMT-GFP, que es la que se queda retenida en las bolitas magnéticas marcadas con anti-GFP utilizadas en estos ensayos. Para comprobar la especificidad de la co-inmunoprecipitación, se emplearon como control negativo los promastigotes Δ LiRos3+LiRos3 sin transfectar con la construcción *LiMT-GFP*. Tras incubar los lisados celulares con las bolitas anti-GFP y analizar mediante Western blot las proteínas que quedaban retenidas a ellas, pudo comprobarse que en estos ocho mutantes existe un importante defecto en la interacción entre LiMT y LiRos3, puesto que en el eluido no se detectaron las proteínas LiRos3 mutantes o se detectó una cantidad muy inferior respecto a la línea control (Fig. 38B).

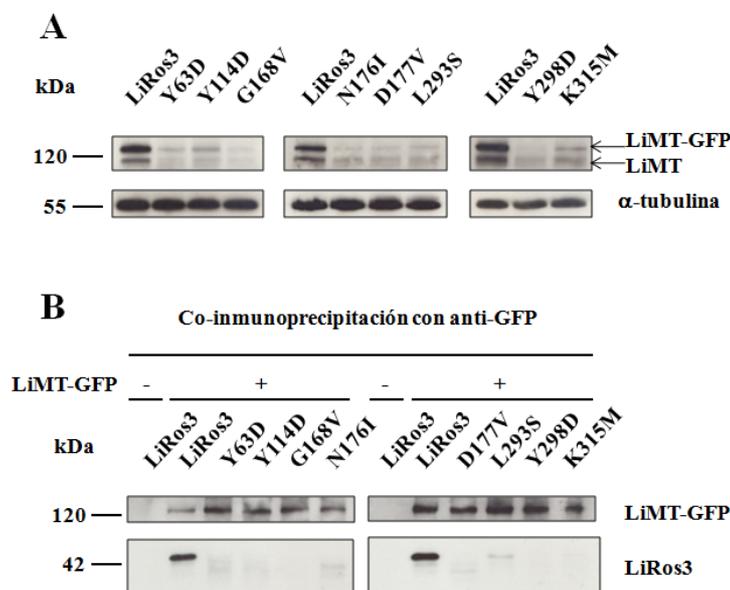


Figura 38. Expresión de LiMT en los mutantes con defecto en el tráfico del complejo y ensayos de co-inmunoprecipitación del complejo.

(A) Análisis mediante Western blot de la expresión de las proteínas LiMT y LiMT-GFP en las líneas transfectadas con la construcción LiMT-GFP. Se realizó sobre extractos proteicos totales utilizando un anticuerpo policlonal anti-LdMT. La línea Δ LiRos3+LiRos3+LiMT-GFP (LiRos3) se empleó como control. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina para el control de carga de proteínas. Se muestra un resultado representativo de al menos tres experimentos. (B) Co-inmunoprecipitación de LiMT-GFP y LiRos3. Los lisados celulares se incubaron con bolitas magnéticas marcadas con un anticuerpo anti-GFP y el eluido de las proteínas que quedaron retenidas se analizó mediante Western blot. Se emplearon anticuerpos policlones anti-LdMT y anti-LdRos3. La línea Δ LiRos3+LiRos3 no transfectada con LiMT-GFP (LiRos3 en el primer carril) se empleó como control negativo (-) y la línea Δ LiRos3+LiRos3 transfectada con LiMT-GFP (LiRos3 en el segundo carril) como control positivo (+). Se muestra un resultado representativo de al menos tres experimentos.

VI. Actividad de transporte de los mutantes Q16L, Q17L, L19Q, D218V y N176Q

Anteriores estudios realizados con el complejo ATP8A2-CDC50A de células de mamíferos han sugerido que el dominio citoplasmático N-terminal de las proteínas Cdc50 podría llevar a cabo un papel directo durante el ciclo de reacción de su P4-ATPasa asociada (Coleman y Molday, 2011). Como se ha comentado anteriormente, las mutaciones no conservativas realizadas en esta tesis doctoral en tres residuos del dominio N-terminal de LiRos3 (Gln¹⁶, Gln¹⁷ y Leu¹⁹), así como las mutaciones D218V y N176Q, realizadas sobre residuos situados en el dominio extracitoplasmático, suponen un importante descenso en la captación de MLF (30-60% respecto a los promastigotes salvajes) (Fig. 34B) sin que se reduzca la expresión de LiMT en la membrana plasmática de manera significativa (Fig. 36). Debido a esto, se planteó la posibilidad de realizar un estudio cinético de la actividad flipasa del complejo en formas promastigotas intactas.

Este estudio no es posible realizarlo con el empleo de [¹⁴C]MLF, porque se alcanzan concentraciones tóxicas para los promastigotes antes de llegar a la saturación de la enzima (Sánchez-Cañete *et al.*, 2009). Sin embargo, sí se puede llevar a cabo a partir de medidas de acumulación de análogos fluorescentes de cadena corta de fosfolípidos como fosfatidilcolina (NBD-PC) y fosfatidiletanolamina (NBD-PE), compuestos que son sustratos del transportador de MLF de *Leishmania* (Pérez-Victoria *et al.*, 2003b). Medir la translocación de fosfolípidos naturales no es una tarea sencilla, puesto que las P4-ATPasas se encuentran en las membranas celulares, que están constituidas principalmente por su propio sustrato (fosfolípidos). Por ello, en la mayoría de los estudios realizados en diversos modelos celulares, la actividad translocasa de fosfolípidos se determina usando análogos fluorescentes de fosfolípidos (López-Marqués *et al.*, 2015).

En primer lugar, para comprobar si las modificaciones introducidas en LiRos3, además del efecto sobre la captación de MLF, tenían también algún efecto sobre la translocación de PC y PE, se determinó la cantidad incorporada de NBD-PC y NBD-PE por cuatro líneas mutantes representativas durante 30 min, observándose una relación directa entre la reducción en la captación de MLF y estos compuestos (Fig. 39). Las diferencias de acumulación entre los promastigotes salvajes y la línea Δ LiRos3 fueron mayores con el empleo de NBD-PC que con el de NBD-PE, al igual que se había observado en la línea Δ LdRos3 de *L. donovani* (Weingärtner *et al.*, 2010).

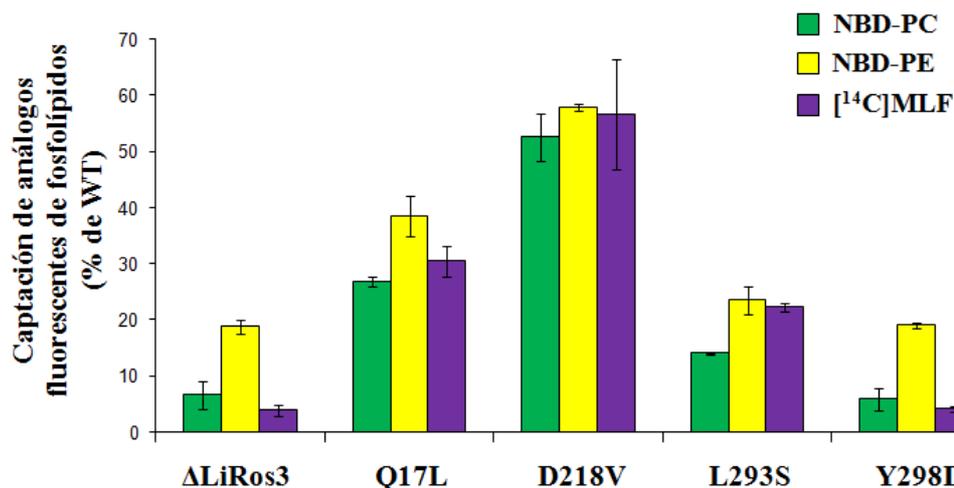


Figura 39. Captación de análogos fluorescentes de fosfolípidos (NBD-PC y NBD-PE) en diferentes líneas mutantes de LiRos3.

La captación de NBD-PC 5 μ M y NBD-PE 5 μ M durante 30 min se determinó por citometría de flujo como se describe en Materiales y Métodos. Los resultados son la media \pm S.D. del porcentaje internalizado en relación con los promastigotes salvajes (WT) obtenido en al menos tres experimentos independientes. Se muestra la comparación con el porcentaje de [¹⁴C]MLF internalizada por estas líneas.

Tras ello, se llevó a cabo un estudio cinético de la actividad flipasa empleando el análogo NBD-PC de forma similar a lo descrito para el análisis en células vivas de mutantes de la flipasa de membrana plasmática Dnf2 (Stone *et al.*, 2012). Al comparar los resultados obtenidos en las líneas con mutaciones no conservativas en el dominio amino terminal de LiRos3 (Q16L, Q17L y L19Q) y en la línea control Δ LiRos3+LiRos3, se observó que estas sustituciones resultan en una manifiesta reducción en la actividad flipasa. La velocidad máxima aparente de transporte (V_{max}) resultó ser el 29-35% de la que posee la línea control Δ LiRos3+LiRos3. Se observó además un descenso en la constante aparente K_M en la línea Q16L (1,6 veces respecto a la K_M de la línea control) (Fig. 40A; Tabla 4). En el mutante D218V se observó un descenso en la actividad flipasa (43% respecto a la línea control) y un aumento de la K_M aparente de 1,5 veces (Fig. 40B; Tabla 4). Por su parte, la línea N176Q presentó un descenso en la V_{max} comparable al de los anteriores mutantes sin que se viese afectada la K_M (Fig. 40C; Tabla 4).

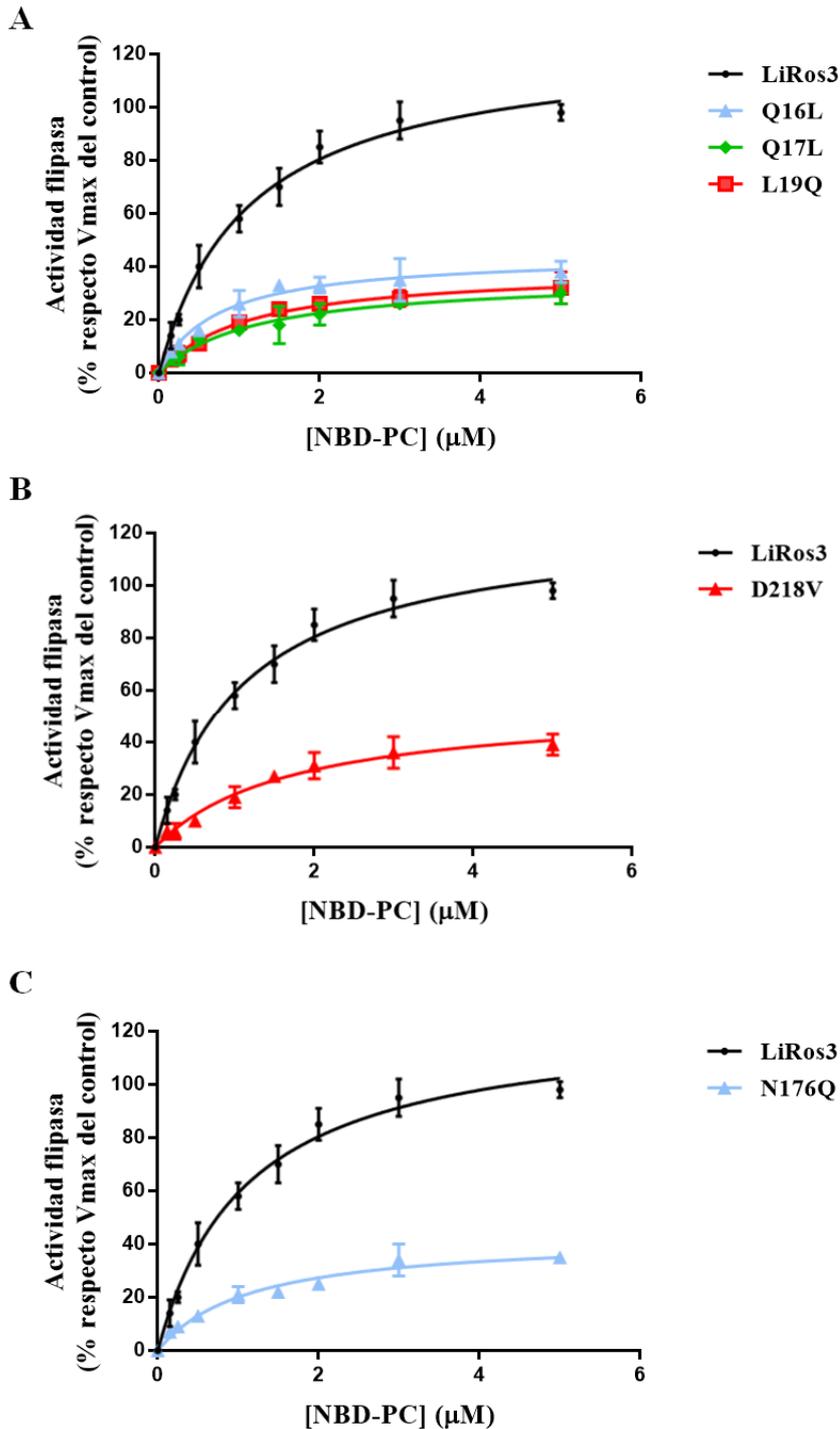


Figura 40. Actividad flipasa de promastigotes de *L. infantum* en presencia de proteínas LiRos3 mutantes.

La captación de diferentes concentraciones de NBD-PC se realizó sobre las líneas mutantes (A) Q16L, Q17L, L19Q, (B) D218V y (C) N176Q, durante 8 min mediante citometría de flujo como se describe en Materiales y Métodos. Los datos representan el porcentaje respecto a la V_{max} de la línea control Δ LiRos3+LiRos3 (LiRos3) \pm S.D. obtenido en tres experimentos independientes.

Tabla 4. Análisis de la actividad flipasa de los mutantes Q16L, Q17L, L19Q, D218V y N176Q

Línea	V _{max} (% de LiRos3)	K _M para NBD-PC (μM)
LiRos3	100	1,1 ± 0,1
Q16L	35 ± 2	0,7 ± 0,1 (1,6 x ↓)
Q17L	29 ± 2	1,4 ± 0,4 (1,3 x ↑)
L19Q	31 ± 1	1,0 ± 0,2 (1,1 x ↓)
D218V	43 ± 4	1,7 ± 0,4 (1,5 x ↑)
N176Q	34 ± 3	1,2 ± 0,2 (1,1 x ↑)

Se muestran los valores de la velocidad máxima aparente de transporte (V_{max}) y la constante aparente K_M, obtenidos a partir de los datos mostrados en la Figura 40. Entre paréntesis se muestra el descenso relativo respecto a la línea control ΔLiRos3+LiRos3 (LiRos3). Los resultados son la media ± S.D. de tres experimentos independientes.

VII. Caracterización adicional del dominio N-terminal de LiRos3

Una vez comprobada la importancia que tienen determinados residuos situados en el extremo amino terminal de LiRos3 para la actividad flipasa del complejo LiMT-LiRos3, se procedió a realizar una caracterización más detallada de este dominio de la proteína. En primer lugar, se realizaron mutaciones múltiples no conservativas en los residuos anteriormente identificados. Para ello, se generaron los mutantes dobles Q16L+Q17L, Q16L+L19Q y Q17L+L19Q, así como el mutante triple Q16L+Q17L+L19Q.

En comparación con la línea ΔLiRos3+LiRos3, se observó que todos estos mutantes múltiples presentaban un incremento en la resistencia a MLF así como un descenso significativo en la captación de MLF (Figs. 41A y 41B). La línea Q16L+L19Q fue la que presentó un fenotipo más acentuado, puesto que la acumulación de MLF fue de un 17% en relación con los promastigotes salvajes. Esto sugiere un efecto aditivo de las mutaciones Q16L y L19Q, puesto que los mutantes simples presentaban una acumulación del 60% y 55%, respectivamente. Por el contrario, todos los mutantes múltiples que contenían la mutación Q17L presentaron una acumulación cercana al 30%, la misma cantidad que se había observado en la línea mutante simple Q17L (Fig. 41B). No se observaron grandes diferencias de expresión de estas proteínas mutantes ni a nivel global ni a nivel de la membrana plasmática (Fig. 41C). Del mismo modo a lo observado en los mutantes simples, estas líneas presentaron una fuerte reducción en la actividad flipasa, más marcada en las líneas mutantes dobles Q16L+Q17L y Q16L+L19Q, cuya V_{max} aparente se situó en torno al 20% de la mostrada por la línea control. Por otro lado, todas las líneas que contenían la mutación Q16L presentaron un descenso en la K_M aparente para NBD-PC, llegando a ser de 2,2 veces en la línea Q16L+Q17L+L19Q (Fig. 41D; Tabla 5).

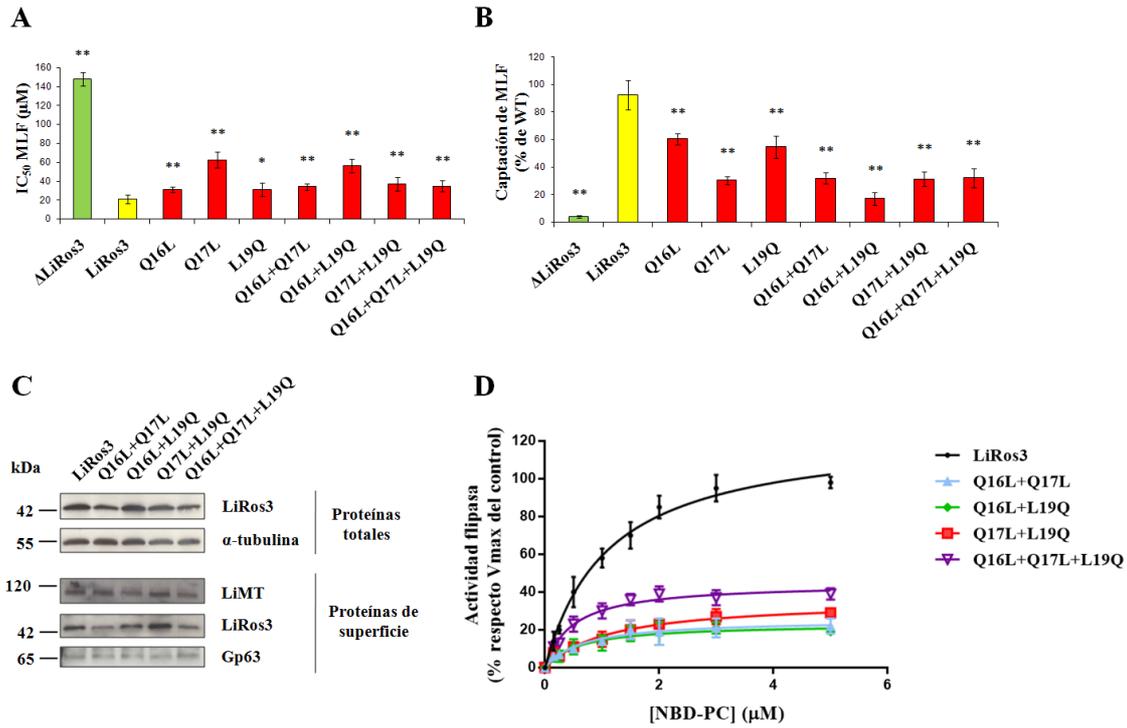


Figura 41. Caracterización de mutantes múltiples en el dominio N-terminal de LiRos3.

(A) La sensibilidad a miltefosina (MLF) y (B) la captación de [¹⁴C]MLF se determinaron de la manera descrita en la leyenda de la Figura 29. Los resultados son la media ± S.D. de los valores de IC₅₀ y del porcentaje de MLF internalizada en relación con los promastigotes salvajes (WT) obtenido en al menos tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto a la línea control ΔLiRos3+LiRos3 (LiRos3) se determinaron mediante el test de la *t* de Student (**p* < 0,05 y ***p* < 0,001). (C) Análisis de la expresión proteica mediante Western blot. Los niveles de expresión total de LiRos3 se determinaron a partir de extractos proteicos totales con un anticuerpo policlonal anti-LdRos3. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-α-tubulina para el control de carga de proteínas. Los niveles de expresión en la membrana plasmática se determinaron a partir de proteínas biotiniladas de la manera descrita en Materiales y Métodos. Se emplearon anticuerpos policlonales anti-LdMT y anti-LdRos3. Para el control de carga de proteínas de superficie se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-gp63. En ambos análisis, la línea ΔLiRos3+LiRos3 se empleó como control. Se muestra un resultado representativo de al menos tres experimentos. (D) Ensayos de actividad flipasa. La captación de diferentes concentraciones de NBD-PC durante 8 min se determinó por citometría de flujo como se describe en Materiales y Métodos. Los datos representan el porcentaje respecto a la V_{max} de la línea control ΔLiRos3+LiRos3 (LiRos3) ± S.D. obtenido en tres experimentos independientes.

Tabla 5. Análisis de la actividad flipasa de los mutantes múltiples en el dominio N terminal de LiRos3 y de la línea I14D

Línea	V _{max} (% de LiRos3)	K _M para NBD-PC (µM)
LiRos3	100	1,1 ± 0,1
Q16L+Q17L	21 ± 1	0,7 ± 0,2 (1,6 x ↓)
Q16L+L19Q	19 ± 1	0,6 ± 0,2 (1,8 x ↓)
Q17L+L19Q	30 ± 3	1,2 ± 0,4 (1,1 x ↑)
Q16L+Q17L+L19Q	37 ± 2	0,5 ± 0,1 (2,2 x ↓)
I14D	31 ± 2	1,0 ± 0,2 (1,1 x ↓)

Se muestran los valores de la velocidad máxima aparente de transporte (V_{max}) y la constante aparente K_M, obtenidos a partir de los datos mostrados en las Figuras 41D y 43D. Entre paréntesis se muestra el descenso relativo respecto a la línea control ΔLiRos3+LiRos3 (LiRos3). Los resultados son la media ± S.D. de tres experimentos independientes.

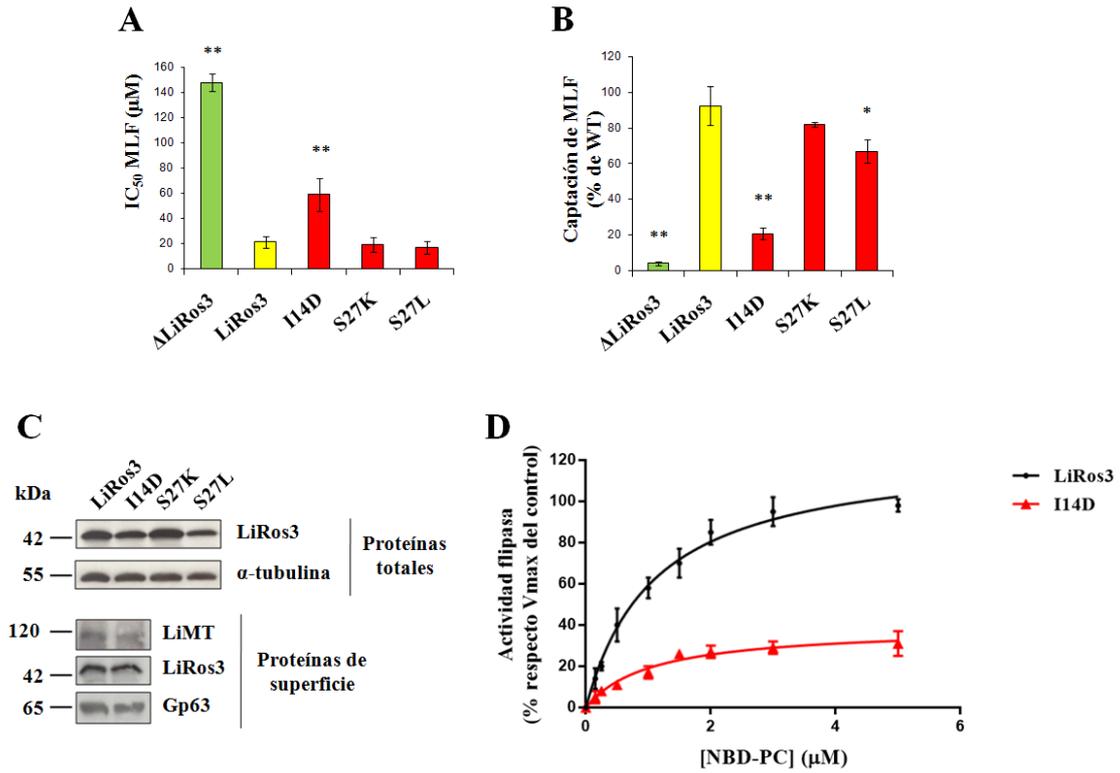


Figura 43. Caracterización de las líneas mutantes I14D, S27K y S27L.

(A) La sensibilidad a miltefosina (MLF) y (B) la captación de [¹⁴C]MLF se determinaron de la manera descrita en la leyenda de la Figura 29. Los resultados son la media ± S.D. de los valores de IC₅₀ y del porcentaje de MLF internalizada en relación con los promastigotes salvajes (WT) obtenido en al menos tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto a la línea control ΔLiRos3+LiRos3 (LiRos3) se determinaron mediante el test de la *t* de Student (**p* < 0,05 y ***p* < 0,001). (C) Análisis de la expresión proteica mediante Western blot. Los niveles de expresión total de LiRos3 se determinaron a partir de extractos proteicos totales con un anticuerpo policlonal anti-LdRos3. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-α-tubulina para el control de carga de proteínas. Los niveles de expresión en la membrana plasmática se determinaron a partir de proteínas biotiniladas de la manera descrita en Materiales y Métodos. Se emplearon anticuerpos policlonales anti-LdMT y anti-LdRos3. Para el control de carga de proteínas de superficie se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-gp63. En ambos análisis, la línea ΔLiRos3+LiRos3 se empleó como control. Se muestra un resultado representativo de al menos tres experimentos. (D) Actividad flipasa de la línea I14D. La captación de diferentes concentraciones de NBD-PC durante 8 min se determinó por citometría de flujo como se describe en Materiales y Métodos. Los datos representan el porcentaje respecto a la V_{max} de la línea control ΔLiRos3+LiRos3 (LiRos3) ± S.D. obtenido en tres experimentos independientes.

VIII. Efecto de la tasa de glicosilación de LiRos3 sobre su función

Las proteínas pertenecientes a la familia Cdc50 están normalmente N-glicosiladas. En células de mamíferos se ha descrito que esta glicosilación es necesaria para la expresión estable del complejo ATP8A2-CDC50A (Coleman y Molday, 2011). Sin embargo, se cree que no es necesaria para que se lleve a cabo el ciclo de fosforilación de las P4-ATPasas asociadas (Coleman y Molday, 2011; Jacquot *et al.*, 2012).

LiRos3 también se encuentra N-glicosilada, lo que explica que el tamaño de la proteína cuando se analiza mediante Western blot sea de unos 44 kDa, superior a su peso molecular estimado, que es de 40,3 kDa. Otro de los objetivos que se marcaron para esta tesis doctoral fue investigar el fenotipo que aparece al suprimir la N-glicosilación de LiRos3. Esta proteína tiene cuatro posibles sitios de N-glicosilación, tal y como predice el servidor NetNGlyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) (Fig. 32). Para estudiar si realmente todos estos sitios son N-glicosilados y para determinar cuál es el efecto de estas modificaciones se construyeron variantes de LiRos3 en las que se eliminaron las secuencias consenso para la N-glicosilación (Asn-X-Ser/Thr), obteniéndose mutantes simples y múltiples en los que se realizaron mutaciones conservativas que consistían en sustituir las asparaginas por glutaminas. Los promastigotes Δ LiRos3 se transfectaron con los plásmidos que codificaban estas proteínas mutantes y, en primer lugar, se analizó su expresión mediante Western blot. Los mutantes simples que carecían de uno de los sitios de N-glicosilación (N86Q, N176Q, N198Q y N241Q), así como los mutantes múltiples Δ N3 (N86Q + N198Q + N241Q) y Δ N4 (N86Q + N176Q + N198Q + N241Q) mostraron niveles normales de expresión de la proteína mutante, exceptuando la línea N176Q, cuya expresión se redujo (Fig. 44A). Como se esperaba, cuando todas estas proteínas se sometieron a un tratamiento con PNGasa F para eliminar los azúcares de estas proteínas N-glicosiladas, la movilidad aparente descendió hasta los 40 kDa, que es la masa molecular teórica de LiRos3. El mutante Δ N4 presentó una masa molecular aparente de 40 kDa sin tratamiento con PNGasa F, tamaño que no se modificó tras el tratamiento con esta enzima (Fig. 44B), lo que confirmó que todas las secuencias consenso para la N-glicosilación se habían eliminado en esta proteína.

Se llevaron a cabo ensayos de captación de MLF y de sensibilidad al fármaco en todas las líneas transfectantes. Aunque los mutantes simples y el mutante múltiple Δ N3 fueron capaces de internalizar entre un 55 y un 100% de la cantidad internalizada por los promastigotes salvajes, el mutante Δ N4 fue completamente resistente al fármaco e incapaz de internalizarlo (Figs. 44C y 44D).

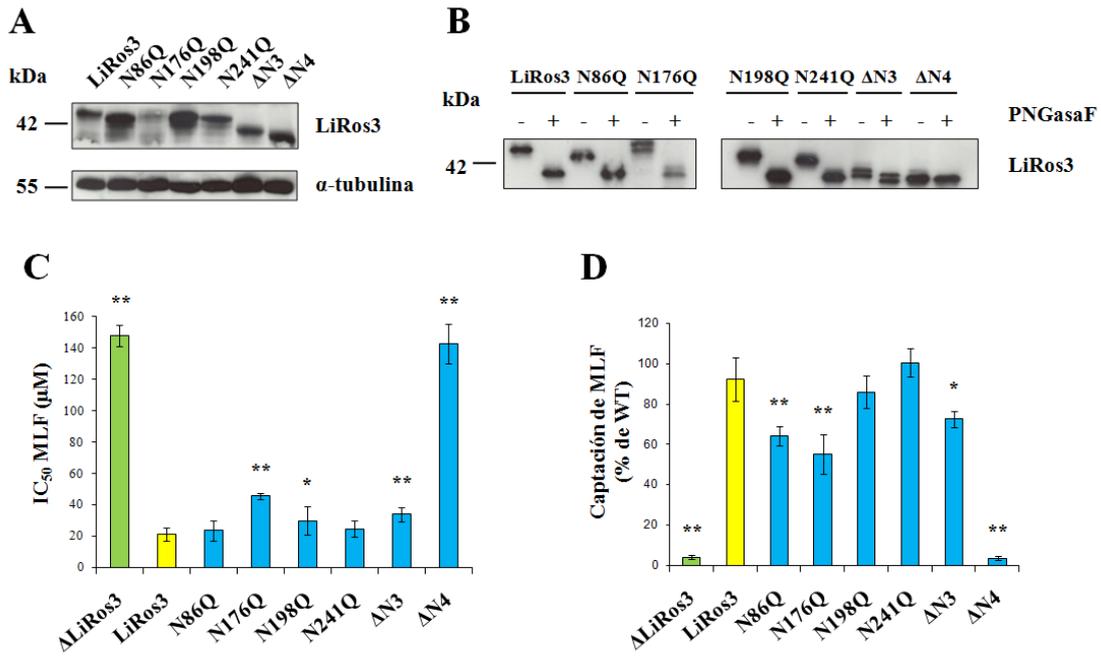


Figura 44. Expresión y caracterización funcional de los mutantes de LiRos3 en los sitios de N-glicosilación.

(A) Análisis mediante Western blot de los niveles de expresión total de las proteínas LiRos3 mutadas con un anticuerpo anti-LdRos3. Se realizó a partir de extractos proteicos totales de los promastigotes Δ LiRos3 transfectados con las construcciones mutantes de *LiRos3* en los sitios de N-glicosilación. La línea Δ LiRos3+LiRos3 (LiRos3) se empleó como control. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina para el control de carga de proteínas. Se muestra un resultado representativo de al menos tres experimentos. (B) Los extractos proteicos anteriormente descritos se trataron con la enzima PNGasaF como se detalla en Materiales y Métodos, y se analizaron mediante Western blot con un anticuerpo anti-LdRos3. (C) La sensibilidad a miltefosina (MLF) y (D) la captación de [¹⁴C]MLF se determinaron de la manera descrita en la leyenda de la Figura 29. Los resultados son la media \pm S.D. de los valores de IC₅₀ y del porcentaje de MLF internalizada en relación con los promastigotes salvajes (WT) obtenido en al menos tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto a la línea control Δ LiRos3+LiRos3 (LiRos3) se determinaron mediante el test de la *t* de Student (**p* < 0,05 y ***p* < 0,001).

Se realizaron ensayos de biotilación sobre todos los mutantes en los sitios de glicosilación, observando que LiRos3 siempre era capaz de alcanzar la membrana plasmática con independencia de su estado N-glicosilado. Por su parte, LiMT se detectó en la membrana plasmática de todas las líneas, exceptuando la línea completamente N-desglicosilada Δ N4 (Fig. 45), un resultado consistente con los valores de captación de MLF obtenidos.

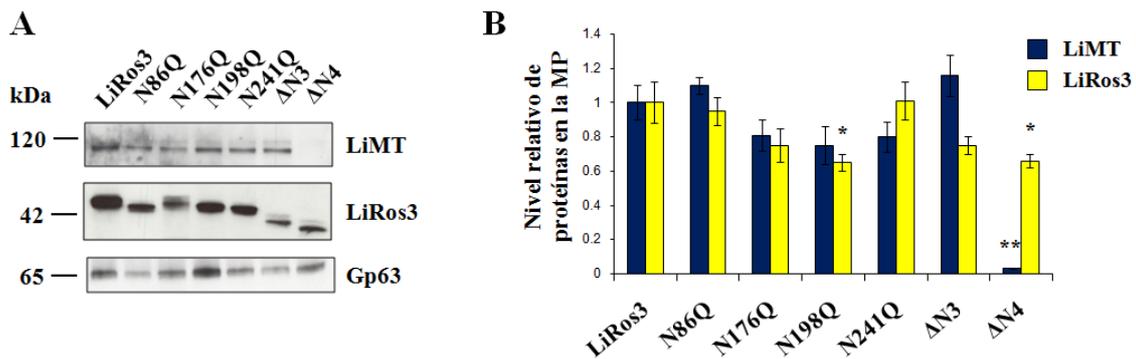


Figura 45. Niveles de expresión del complejo LiMT-LiRos3 en la membrana plasmática de los mutantes LiRos3 en los sitios de N-glicosilación.

(A) Análisis mediante Western blot con anticuerpos anti-LdMT y anti-LdRos3 del nivel de proteínas biotiniladas procedentes de la membrana plasmática de los mutantes LiRos3 en los sitios de N-glicosilación. Se empleó un anticuerpo monoclonal anti-gp63 para el control de carga de proteínas de superficie. La línea Δ LiRos3+LiRos3 (LiRos3) se usó como control. Se muestra un resultado representativo de al menos tres experimentos independientes. (B) Expresión normalizada de LiMT y LiRos3 en la membrana plasmática (MP) en las líneas mutantes. Los resultados son la media \pm S.D. de los niveles de expresión relativos LiMT/gp63 y LiRos3/gp63 procedentes de al menos tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto a la línea control Δ LiRos3+LiRos3 se determinaron mediante el test de la *t* de Student (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$).

La línea Δ N4 se transfectó entonces con la construcción LiMT-GFP para estudiar si existe interacción entre ambas subunidades. Al igual que sucede con las líneas mutantes no conservativas en las que LiMT no llega a la membrana plasmática (Fig. 38), se observó que los parásitos cotransfectados con las construcciones Δ N4 y LiMT-GFP expresan menor cantidad total tanto de LiMT como de LiMT-GFP (Fig. 46A). Los ensayos de co-inmunoprecipitación mostraron que LiMT no interacciona con LiRos3 cuando se encuentra totalmente desglucosilada (Fig. 46B).

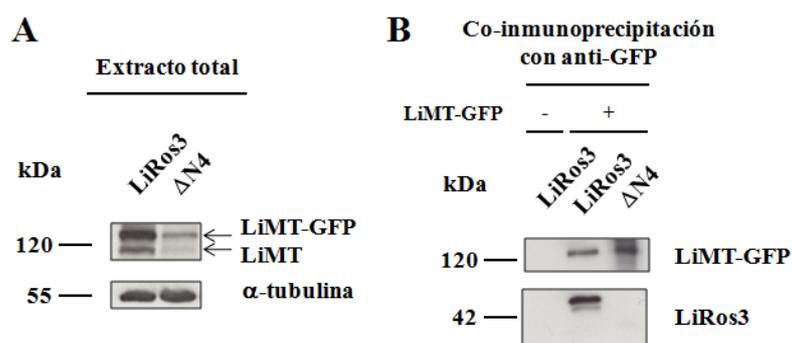


Figura 46. Expresión de LiMT y ensayo de co-inmunoprecipitación del complejo en el mutante Δ N4.

(A) Análisis mediante Western blot de las proteínas LiMT y LiMT-GFP en la línea Δ N4 transfectada con la construcción LiMT-GFP. Se realizó con un anticuerpo policlonal anti-LdMT a partir de extractos proteicos totales. La línea Δ LiRos3+LiRos3+LiMT-GFP (LiRos3) se empleó como control. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina para el control de carga de proteínas. Se muestra un resultado representativo de al menos tres experimentos. (B) Co-inmunoprecipitación de LiMT-GFP y LiRos3. Los lisados celulares se incubaron con bolitas magnéticas marcadas con un anticuerpo anti-GFP y el eluido de las proteínas que quedaron retenidas se analizó mediante Western blot. Se emplearon anticuerpos policlonales anti-LdMT y anti-LdRos3. La línea Δ LiRos3+LiRos3 no transfectada con LiMT-GFP (LiRos3 en el primer carril) se empleó como control negativo (-) y la línea Δ LiRos3+LiRos3 transfectada con LiMT-GFP (LiRos3 en el segundo carril) como control positivo (+). Se muestra un resultado representativo de al menos tres experimentos.

En otro orden de cosas, la línea N176Q destaca por ser la que menos MLF acumuló de entre todas las líneas mutantes simples en los sitios de N-glicosilación y, como se comentó anteriormente, por presentar un importante descenso en la actividad flipasa de NBD-PC sin que el tráfico del complejo se vea afectado de manera significativa. Para comprobar si el descenso en la acumulación de MLF se debía a la pérdida del residuo Asn¹⁷⁶ o a la pérdida de la N-glicosilación, se generó la línea S178A, en la que LiRos3 presenta una mutación con la que se consigue suprimir la N-glicosilación sin necesidad de sustituir el residuo Asn¹⁷⁶. Al igual que sucede con la proteína N176Q, la expresión de la proteína mutante S178A se redujo con respecto a la proteína nativa (Fig. 47A). Esta línea mostró una acumulación de MLF cercana al 70% respecto a la línea salvaje, una cantidad intermedia entre la que presentan la línea control Δ LiRos3+LiRos3 (92%) y la línea N176Q (55%), pero suficiente para que los promastigotes fuesen sensibles al fármaco (Figs. 47B y 47C).

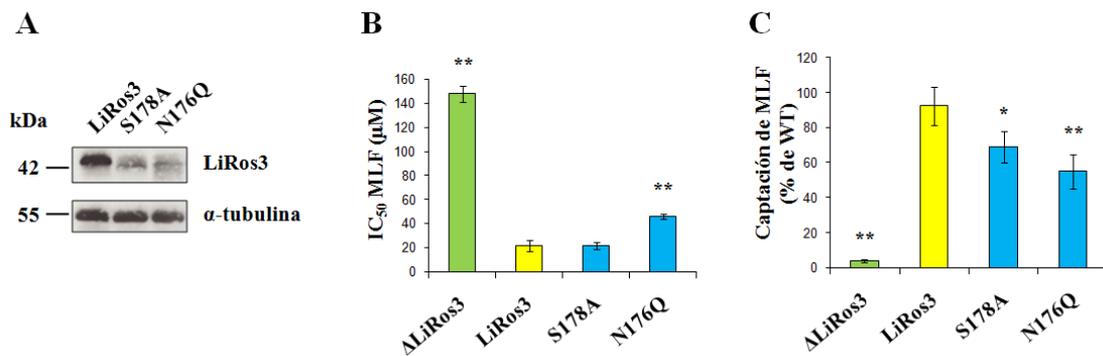


Figura 47. Caracterización de la línea mutante S178A.

(A) Análisis mediante Western blot de los niveles de expresión total de la proteína LiRos3 mutante S178A con un anticuerpo anti-LdRos3. Se realizó a partir de extractos proteicos totales de los promastigotes Δ LiRos3 transfectados con la construcción S178A. Las líneas Δ LiRos3+LiRos3 (LiRos3) y N176Q se emplearon como control. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina para el control de carga de proteínas. Se muestra un resultado representativo de al menos tres experimentos. (B) La sensibilidad a miltefosina (MLF) y (C) la captación de [¹⁴C]MLF se determinaron de la manera descrita en la leyenda de la Figura 29. Los resultados son la media \pm S.D. de los valores de IC₅₀ y del porcentaje de MLF internalizada en relación con los promastigotes salvajes (WT) obtenido en al menos tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto a la línea control Δ LiRos3+LiRos3 (LiRos3) se determinaron mediante el test de la *t* de Student (**p* < 0,05 y ***p* < 0,001).

IX. Caracterización funcional de las proteínas LiRos3 truncadas y de las proteínas Cdc50 quiméricas

Como se comentó en la introducción, las proteínas Cdc50 son exclusivas de los organismos eucariotas y poseen diferentes dominios que están ampliamente conservados. Estas proteínas están compuestas por dos regiones transmembrana separadas por un dominio exoplasmático relativamente grande y por dos colas dirigidas al citoplasma en los extremos N- y C- terminal.

Estudios llevados a cabo en células de mamíferos indican que los dominios transmembrana y exocitoplasmáticos de CDC50A son necesarios para el correcto plegamiento, ensamblaje y función del complejo ATP8A2-CDC50A (Coleman y Molday, 2011). Más concretamente, en levaduras se ha observado que una conformación precisa del dominio exocitoplasmático de las proteínas Cdc50 es la responsable de la especificidad en la unión a las P4-ATPasas (Puts *et al.*, 2012). Por otro lado, y como ya se ha comentado, el dominio citoplasmático N-terminal de las proteínas Cdc50 podría participar en el ciclo de reacción de su P4-ATPasa asociada (Coleman y Molday, 2011).

En esta tesis doctoral, para determinar las partes de LiRos3 que interactúan con la P4-ATPasa (LiMT) y que son importantes en la formación de un complejo funcional, se usaron varias proteínas quiméricas obtenidas a partir de los tres genes de *L. infantum* pertenecientes a la familia Cdc50, denominados *LiRos1*, *LiRos2* y *LiRos3*. Con anterioridad, en nuestro laboratorio se ha descrito que LdRos1 y LdRos2 (proteínas ortólogas de LiRos1 y LiRos2 en *L. donovani*, respectivamente) son incapaces de reemplazar la función de LdRos3 (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a). De hecho, tras llevar a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación y posterior análisis por espectrometría de masas, no se ha detectado asociación de LdMT con estas dos proteínas Cdc50 (Weingärtner *et al.*, 2010). Las dos proteínas no están caracterizadas y su identidad con LiRos3 es aproximadamente del 30%, como ya se ha comentado (Tabla 3).

Tras realizar un alineamiento de las tres proteínas y un análisis de homología entre los diferentes dominios de LiRos3 respecto a LiRos1 y LiRos2 (Fig. 48; Tabla 6) se observó que el lazo extracitosólico de estas proteínas, que es el dominio de mayor tamaño, presenta una identidad en torno al 30% y una similitud próxima al 50%. Los dos dominios transmembrana poseen un porcentaje de identidad por debajo del 15% con LiRos1 y del 30-45% con LiRos2, siendo similares en un 62-67% para el primer transmembrana y en un 48-76% para el segundo. La identidad de los dominios citosólicos amino y carboxilo terminal es muy baja, especialmente en el caso del carboxilo terminal (0% con LiRos1 y 1,3 con LiRos2); además, en el caso de LiRos2 el tamaño de estos dominios es mucho mayor. De entre estos dominios citosólicos, el amino terminal de LiRos1 es el que presenta mayor homología con el de LiRos3, con una similitud del 38%.

A

```

LiRos3 .....
LiRos1 .....
LiRos2 MLPRSSPATAAPQPASGGGAPAFSVPVSSRSRSPQRGASPLSTSSSEVPSPAESSANGSSSRSTSSSYSDS

          1      10      20      30      40      50      60      70      80
LiRos3 .....MAPLPPKPHSK.....NRIEQQLPHIY
LiRos1 .....MPVAPAAVDQRPS.....IWTLFKQORLPWAQ
LiRos2 DDERHRAQGGGVRGAYNAAASADAPKSRSTRAKRWLKKLIPDFVHEYGRTVYGGNPLSQOTLPVGF

          TMI
          30      40      50      60      70      80
LiRos3 ARHSPLSVSVVFFILAAIPIGVLVIVSGDLTTRLDYRHDHINSYKFAAMGAAGEFAVN...FPFNGTM
LiRos1 PILTPOHSALCLIAVAVVCLPLSLSLFHANASAVDITVRYDHOQOCSFGYNNTGAFRYE...ASPGNV
LiRos2 NYPSPFVFLVPIFYVLMVFFLVLGLALVHKGREYHIVEQEYSHIHQYQYVPSNSSVNINHGILQFTADGVT

          90      100      110      120      130      140      150
LiRos3 YSSGVKTRLMFSLHQSITAPVYMQYRLSPFFQNYRYFTASVDYSQISGR...ASAISKMCAPFRFPF...
LiRos1 WQTGCVTDVPPFRVDKHLKAPVYVYGLDNFYQNHRRFSSKSDAOLAGQGVSAATAIASATSPLTYPGELR
LiRos2 HAQGRTRTWLEINISHRKAPVYMYKIANMHQNHRRDFHNGRSNSQLRQKS...KIDKAYLCKEYTPGFRS

          160      170      180
LiRos3 .....EATQDSVSG...YVNPCCAYPWAMFNDSISLYR.....
LiRos1 HAGDQG...INLLCTFFHYS...DFVYVPAQLIPWSMFNDFALYR.....ITHHEAAAVTA
LiRos2 DEGDTPTITITVTCQVTRPARYFTYVNPCCGIAWPKFNDFI LYRKLTPAEVVQANISGVPVLHGGVDST

          190      200      210      220      230      240
LiRos3 TDGTLICDGSAFETANGTSLA...ANNKCVKSGIARPSDVKERYNP...PREIPNGPMSWAGGNGK
LiRos1 PSLRLICNGSAFSRFTNEPLDGL...AGRCHKGIAWTSDVEFKYKKPHFPPSSLRPWSAPKWAYEAA
LiRos2 TPVTLICNGTDFGLRGEPLSGSVTKNHCCKMGIWAKADREIR...NITLREDWWSLYYPY

          250      260      270      280      290      300
LiRos3 .....SATDPLRLEGYYKEPGHKIPLSIEDDLIWLDPAFVTSVTKNRYRLNVDLPAGDYFYE
LiRos1 GDVNPNPSPRMPSDNAYFNEGWYADEPGHRIPVTTDEDLMVWARVASLPKFRKLYRVIDEDLVPGTYLMLR
LiRos2 .....PTTNEYLRLNGWYLHEPGHALPDPDSDYDLHVMRASFTSNFRKLYRITHVEIHPGTYLVD

          TMI
          310      320      330      340      350      360
LiRos3 EITTEQYPTAPYASHKQVQLATRSWIGGRSHVIGSLLIIMGGTAFIMAVTLLSVKYLIMPVYTE.....
LiRos1 EITTEHFNAASYGGTKSFSLATLSWLGGRNTEFAWMYFTIGAVSAVSGASFLLCIHHWYDDRALRAVAMLLKD
LiRos2 ESEFYDVSVEFRGRKSVVLLQHANWVGGRNIVLGVVFIIMGCASFV LGVTFVTECMLQLNGVNRKRLREP

LiRos3 .....
LiRos1 D.....
LiRos2 RSWYVFQPNDEPFANYQLRLRRHIPMAQLQSLRKAVAELENLVRDGEVNRNGANGQRA
    
```

B

```

          TMI
          1      10      20      30      40      50      60
LiRos3 ...MAPLPPKPHSKNRIEQQLPHIYARHSPLSVSVVFFILAAIPIGVLVIVSGDLTTRLDYRHDH
LiRos1 MPVAPAAVDQRPSIWTLFKQORLPWAQPILTPOHSALCLIAVAVVCLPLSLSLFHANASAVDITVRYDHO

          70      80      90      100      110      120      130
LiRos3 NSYKFAAMGAAGEFAVNFPPNGTMYSSGVKTRLMFSLHQSITAPVYMQYRISPFFQNYRYFTASVDYSQIS
LiRos1 QOCSFGYNNTGAFRYEASP.GNVWQTGCVTDFEVRVDKHLKAPVYVYGLIDNFYQNHRRFSSKSDAOLA

          140      150      160      170      180
LiRos3 GR...ASAISKMCAPFRFPGEATGDSVSGY.....YVNPCCAYPWAMFNDSISLYRTDG...
LiRos1 GQGVSAATAIASATSPLTYPGELRHAGDQGINLLGTFHYSDFVYVPAQLIPWSMFNDFALYRITHHEAA

          190      200      210      220      230
LiRos3 .....TLICDGSAFETANG.TSLAANNKCVKSGIARPSDVKERYNPPREIPGN...GPMWSAG...
LiRos1 AVTAPSLRLICNGSAFSRFTNEPLDGLAGRCHKGIAWTSDVEFKYKKPHFPPSSLRPWSAPKWAYEAA

          240      250      260      270      280      290      300
LiRos3 .....GNKSATDPLRLEGYYKEPGHKIPLSIEDDLIWLDPAFVTSVTKNRYRLNVDLPAGDYFYE
LiRos1 GDVNPNPSPRMPSDNAYFNEGWYADEPGHRIPVTTDEDLMVWARVASLPKFRKLYRVIDEDLVPGTYLMLR

          TMI
          310      320      330      340      350      360
LiRos3 EITTEQYPTAPYASHKQVQLATRSWIGGRSHVIGSLLIIMGGTAFIMAVTLLSVKYLIMPVYTE.....
LiRos1 EITTEHFNAASYGGTKSFSLATLSWLGGRNTEFAWMYFTIGAVSAVSGASFLLCIHHWYDDRALRAVAMLLK

LiRos3 ..
LiRos1 DD
    
```

C

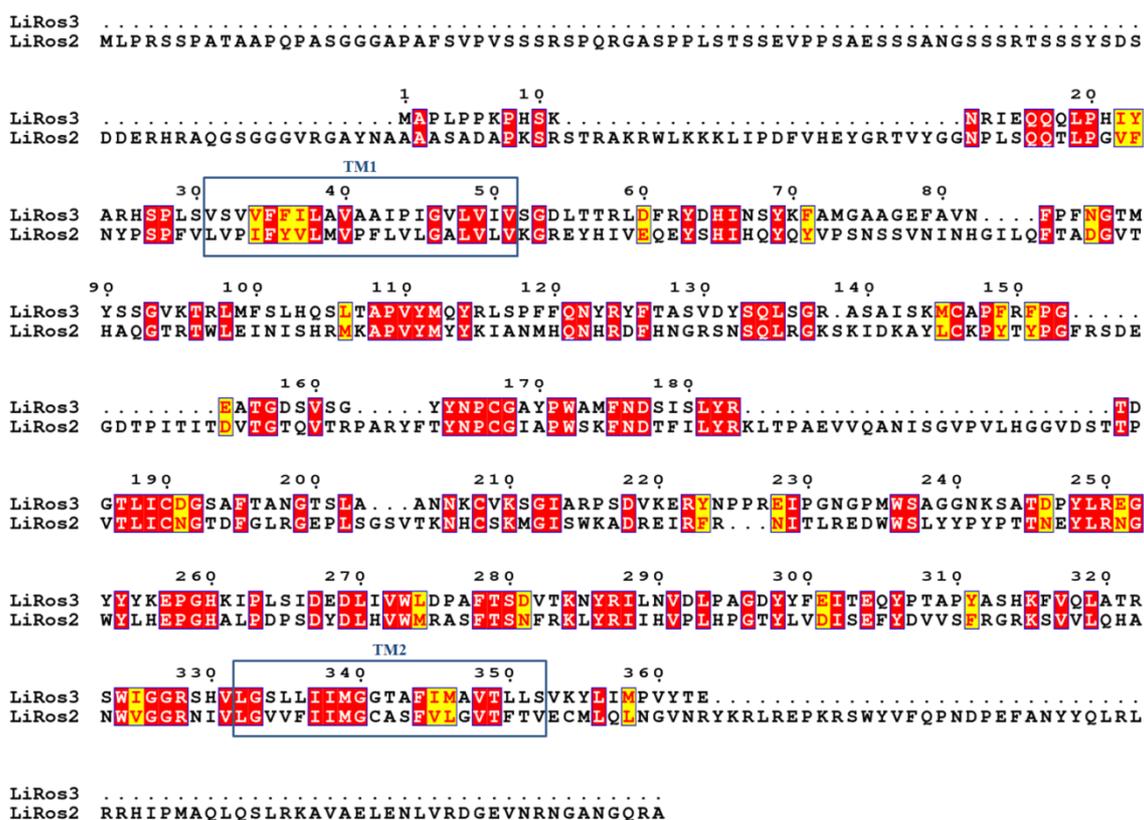


Figura 48. Alineamiento de las proteínas Cdc50 de *L. infantum*.

Se muestra el alineamiento de la secuencia completa de las proteínas Cdc50 de *L. infantum*: (A) LiRos3, LiRos1 y LiRos2, (B) LiRos3 y LiRos1, y (C) LiRos3 y LiRos2. Los recuadros en rojo indican los residuos invariables, mientras que los recuadros en amarillo indican residuos con alto grado de conservación. Se han resaltado los dos segmentos transmembrana (TM) de estas proteínas.

Tabla 6. Homología de los dominios de LiRos3 con los correspondientes dominios de LiRos1 y LiRos2

Dominio	%I (%S)	
	LiRos1	LiRos2
Amino terminal	20,6 (38,2)	6,8 (10,9)
Primer transmembrana	14,3 (61,9)	33,3 (66,6)
Lazo extracitosólico	32,8 (48,8)	30,5 (47,7)
Segundo transmembrana	9,5 (47,6)	42,9 (76,2)
Carboxilo terminal	0 (15,0)	1,3 (2,6)

%I, porcentaje de identidad; %S, porcentaje de similitud.

Para estudiar la localización de las proteínas LiRos1 y LiRos2 mediante microscopía confocal, se generaron proteínas de fusión a GFP que se expresaron en promastigotes salvajes de *L. infantum*. En ensayos de inmunofluorescencia indirecta se observó que tanto LiRos1 como LiRos2 co-localizan principalmente con la proteína chaperona BiP en el retículo endoplasmático (Figs. 49A y 49C). Por otro lado, también se observó una co-localización parcial con la mitocondria de los promastigotes, que fue marcada con la sonda MitoTracker Red (Figs. 49B y 49D).

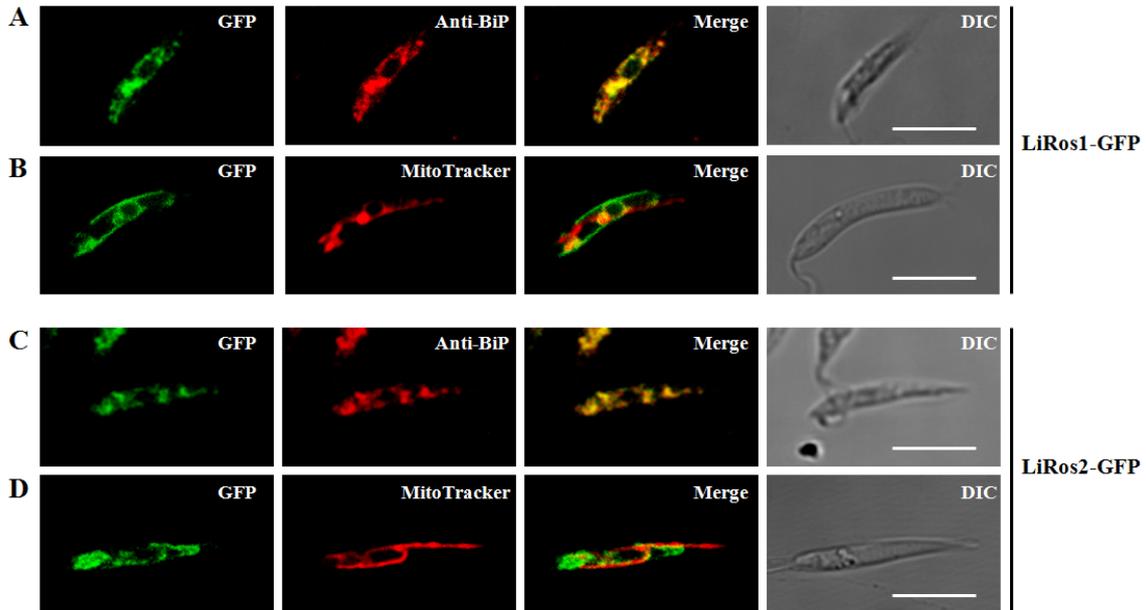


Figura 49. Localización de LiRos1-GFP y LiRos2-GFP en orgánulos intracelulares de promastigotes de *L. infantum*.

Se muestran imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de promastigotes transfectados con las construcciones LiRos1-GFP (A y B) y LiRos2-GFP (C y D). La fluorescencia verde asociada con la proteína de fusión GFP se muestra en la columna de la izquierda. (A y C) Para el marcaje del retículo endoplasmático se llevó a cabo un análisis mediante inmunofluorescencia indirecta de la manera descrita en Materiales y Métodos usando un anticuerpo anti-BiP. (B y D) Para el marcaje de la mitocondria, los promastigotes se incubaron a 28°C con MitoTracker Red 50 nM durante 30 min. Las imágenes de la tercera columna (*merge*) se obtuvieron superponiendo las imágenes de las dos primeras columnas. El color amarillo indica la co-localización de LiRos1 o LiRos2 con los marcadores de retículo endoplasmático o mitocondria. Se seleccionó una imagen representativa de cada línea transfectada. La barra blanca indica una longitud de 5 μ m. DIC, contraste de interferencia diferencial.

Las proteínas quiméricas estudiadas en esta tesis doctoral se generaron por ingeniería genética reemplazando diferentes dominios de LiRos3 por los correspondientes dominios de LiRos1 o LiRos2. También se obtuvieron dos formas truncadas de LiRos3, en las que se eliminaron los dominios citosólicos amino o carboxilo terminal (Fig. 50A). De esta manera, se intentó determinar el papel de cada dominio en el tráfico de la proteína funcional LiMT hacia la membrana plasmática.

Una vez transfectados los promastigotes Δ LiRos3 con estas construcciones, la expresión de todas las proteínas quiméricas se verificó mediante Western blot a partir de lisados totales celulares, usando anticuerpos anti-LdRos3 para todas aquellas proteínas que contenían intacto el segmento extracelular de LiRos3. En el caso de las quimeras L1R3 y L2R3, las cuales contienen respectivamente el lazo de LiRos1 y LiRos2, fue necesario usar los anticuerpos anti-LdRos1 y anti-LdRos2, respectivamente. Estos tres

anticuerpos, que habían sido previamente obtenidos en nuestro laboratorio, reconocen el lazo extracitoplasmático de estas proteínas. La expresión de las diferentes proteínas con respecto a los promastigotes Δ LiRos3 transfectados con el gen nativo *LiRos3* (línea control Δ LiRos3+*LiRos3*) fue variable, observándose unos niveles similares (Δ CR3, N2R3, C2R3, LM3R1 y L3M13R1), más bajos (L3M31R1, L3R1, L3R2 y LM3R2) o incluso más altos (Δ NR3, N1R3 y C1R3) (Fig. 50B). Como previamente se ha sugerido para LiRos3, una reducida expresión de estas proteínas quiméricas no tendría por qué alterar la expresión del complejo de transporte en la membrana plasmática.

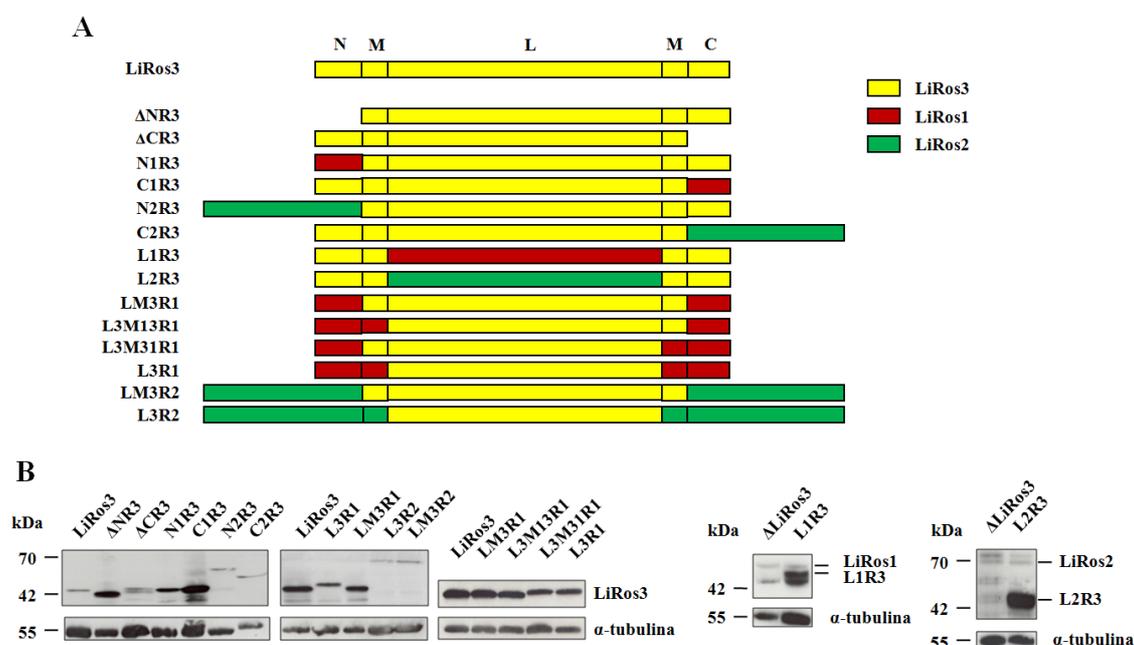


Figura 50. Expresión de proteínas Cdc50 quiméricas y truncadas.

(A) Representación esquemática de las proteínas Cdc50 quiméricas y truncadas analizadas en este estudio. Se indican los dominios citosólico N-terminal (N), transmembrana (M), lazo extracitosólico (L) y citosólico C-terminal (C). Los dominios correspondientes a LiRos3 se indican en amarillo, mientras que los de LiRos1 aparecen en rojo y los de LiRos2, en verde. (B) Los niveles de expresión total se analizaron mediante Western blot a partir de extractos proteicos de los promastigotes Δ LiRos3 transfectados con las diferentes construcciones. Se empleó un anticuerpo anti-LdRos3, excepto para las proteínas L1R3 y L2R3, que se analizaron con anticuerpos anti-LdRos1 y anti-LdRos2, respectivamente. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina para el control de carga de proteínas. Se muestra un resultado representativo de al menos tres experimentos.

El análisis funcional de estas líneas reveló en un primer momento que los promastigotes Δ LiRos3 internalizan una cantidad significativa de MLF cuando se transfectan con las construcciones quiméricas N1R3, en la que el dominio citosólico N-terminal de LiRos3 ha sido reemplazado por el dominio correspondiente de LiRos1; C1R3, en la que el dominio citosólico C-terminal de LiRos3 se sustituye por el dominio correspondiente de LiRos1, y LM3R1, en la que se reemplazan ambos dominios (Fig. 51B). Las líneas N1R3 y LM3R1 incluso presentaron un aumento significativo en la tasa de captación de MLF respecto a la línea control Δ LiRos3+*LiRos3*. Estas tres líneas presentaron una sensibilidad a MLF similar a la de la línea Δ LiRos3+*LiRos3* (Fig. 51A). En cambio, todas las proteínas quiméricas que contienen uno o más dominios de LiRos2 no modificaron significativamente el fenotipo original de la línea Δ LiRos3 (Fig. 51). Tampoco fue funcional LiRos3 truncado en su extremo N- o C-terminal.

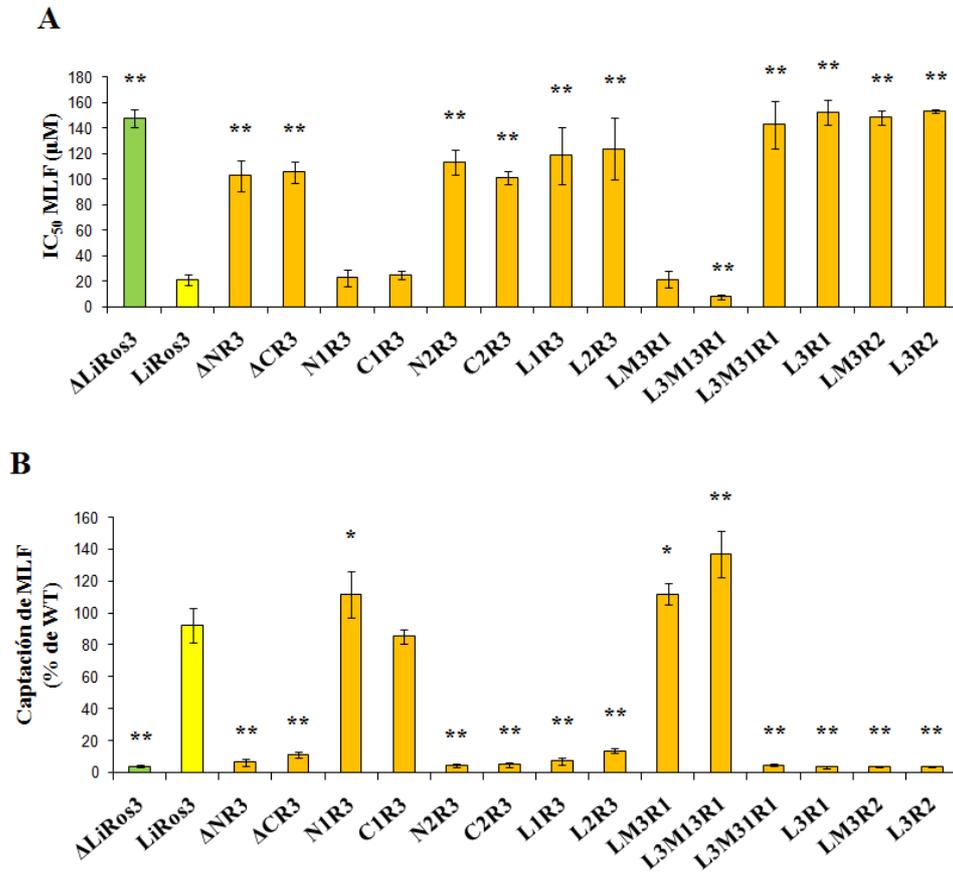


Figura 51. Caracterización funcional de las proteínas Cdc50 quiméricas y truncadas.

(A) La sensibilidad a miltefosina (MLF) y (B) la captación de [¹⁴C]MLF se determinaron de la manera descrita en la leyenda de la Figura 29. Los resultados son la media ± S.D. de los valores de IC₅₀ y del porcentaje de MLF internalizada en relación con los promastigotes salvajes (WT) obtenido en al menos tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto a la línea control ΔLiRos3+LiRos3 (LiRos3) se determinaron mediante el test de la *t* de Student (**p* < 0,05 y ***p* < 0,001).

Como la línea L3R1, que contiene los dominios citosólicos y transmembrana de LiRos1, es altamente resistente a MLF, se quiso comprobar si esto se debía a la presencia de las dos hélices transmembrana, o solo a una de ellas. Por ello, se generaron con posterioridad las proteínas quiméricas L3M13R1 y L3M31R1. Ambas están constituidas por los dominios citosólicos de LiRos1 y el lazo extracitosólico de LiRos3, pero se diferencian en que L3M13R1 contiene el primer segmento transmembrana de LiRos1 y el segundo de LiRos3, mientras que L3M31R1 contiene el primer segmento transmembrana de LiRos3 y el segundo de LiRos1. La línea L3M13R1 resultó ser la que más MLF acumula de entre todas las analizadas, al captar casi el 140% de la cantidad acumulada por los promastigotes salvajes (Fig. 51B). En consecuencia, esta línea presentó una sensibilidad al fármaco mayor incluso que la línea salvaje. Por el contrario, la línea L3M31R1 presentó una acumulación de MLF del 4% (Fig. 51B), indicando que el segundo transmembrana de LiRos3 no puede reemplazarse por el de LiRos1 para generar una proteína funcional.

Los ensayos de biotilación mostraron que las proteínas quiméricas N1R3, C1R3 y LM3R1 alcanzan la membrana plasmática al igual que LiMT (Fig. 52A), lo que se

relaciona con la óptima internalización de MLF observada. Por el contrario, no se detectaron niveles significativos de LiMT en el resto de líneas, todas ellas resistentes a MLF. Inesperadamente, las proteínas Δ NR3 y C2R3 se expresan en la membrana plasmática a pesar de que no se detectase LiMT (Fig. 52A). El hecho de que otras proteínas quiméricas o truncadas no se exportasen hacia la membrana plasmática (Δ CR3, N2R3, LM3R2, L3R1, L3R2, L1R3 y L2R3) concuerda con la ausencia del transportador a este nivel. En los ensayos con las proteínas L1R3 y L2R3 (quimeras formadas con los lazos de LiRos1 y LiRos2), la ausencia de bandas correspondientes a LiRos1 y LiRos2 en la superficie corroboró la localización interna de estas dos proteínas previamente demostrada por microscopía confocal (Fig. 49).

Para estudiar si se produce interacción entre ambas subunidades en aquellas líneas donde el complejo no se expresa en la membrana plasmática, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación después de transfectar las líneas con la construcción *LiMT-GFP*. Tal y como había sucedido en otras líneas mutantes resistentes a MLF, se observó un descenso en la expresión total de LiMT-GFP y LiMT en las líneas resistentes (Δ NR3, C2R3, Δ CR3, N2R3, LM3R2, L3R1, L3R2, L1R3 y L2R3) respecto a la línea control Δ LiRos3+LiRos3+LiMT-GFP. La línea Δ LiRos3+LM3R1+LiMT-GFP, que es sensible a MLF, presentó unos niveles de expresión similares a los de la línea control (Fig. 52B).

En los ensayos de co-inmunoprecipitación se observó que los extremos citosólicos N-terminal y C-terminal de LiRos3 no son necesarios para la interacción con LiMT, puesto que las proteínas Δ NR3 y Δ CR3 co-inmunoprecipitan con LiMT-GFP. Del mismo modo, la sustitución con los extremos N-terminalo C-terminal y con ambos de LiRos2 (N2R3, C2R3 y LM3R2) mantiene una interacción estable con LiMT-GFP. Pese a ello, en ninguna de esas líneas el complejo de transporte alcanza la membrana plasmática (Fig. 52A). Además, estos ensayos mostraron que, para que se produzca la interacción entre ambas subunidades, son necesarios el segundo segmento transmembrana y el lazo extracitosólico de LiRos3, ya que las proteínas L3R1, L3R2 y L3M31R1, correspondientes al primer supuesto, así como L1R3 y L2R3, donde se ha sustituido el lazo, no co-inmunoprecipitan con LiMT-GFP (Fig. 52C).

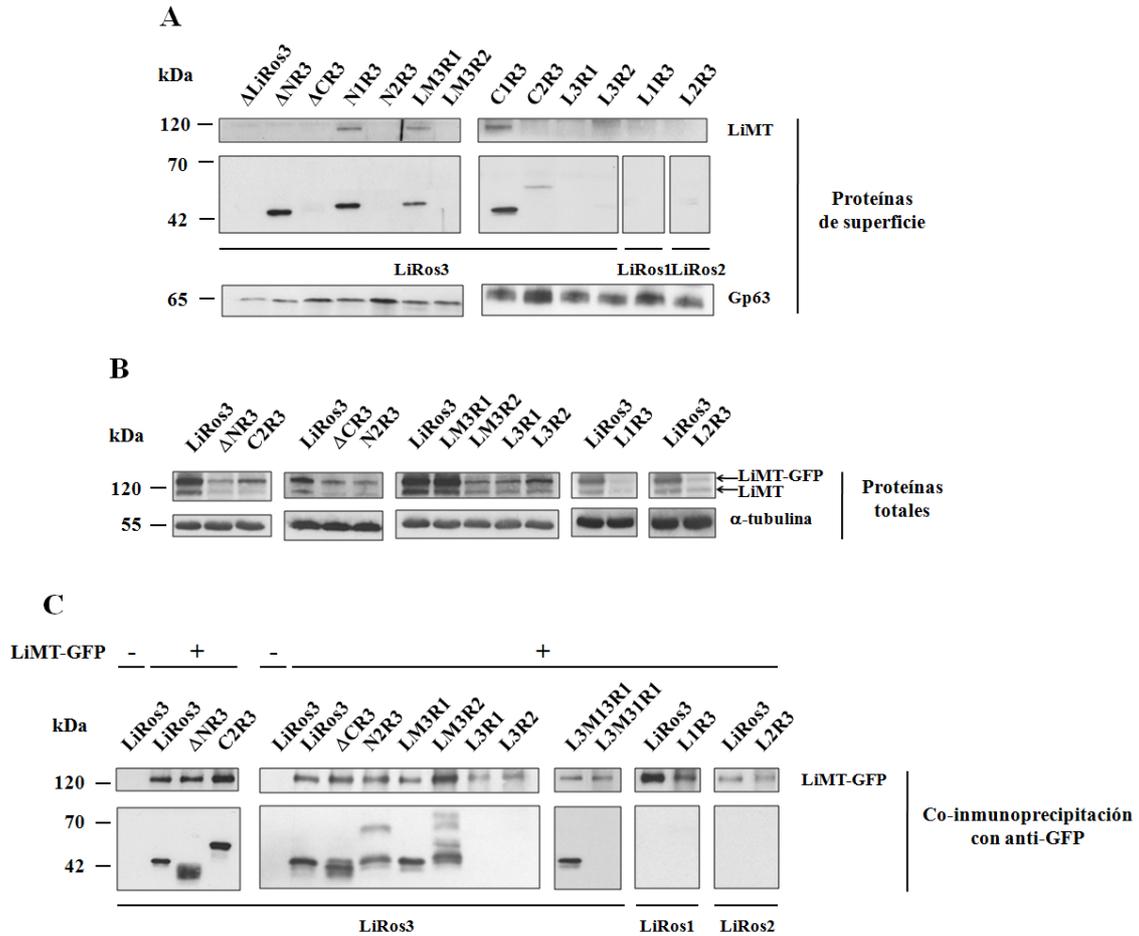


Figura 52. Ensayos de biotinylación y co-inmunoprecipitación con las proteínas Cdc50 quiméricas y truncadas.

(A) Análisis mediante Western blot del nivel de proteínas biotinylladas procedentes de la membrana plasmática con anticuerpos anti-LdMT y anti-LdRos3 (L1R3 se analizó con anti-LdRos1 y L2R3 con anti-LdRos2). Se empleó un anticuerpo monoclonal anti-gp63 para el control de carga de proteínas de superficie. Se muestra un resultado representativo de al menos tres experimentos independientes. (B) Análisis mediante Western blot de la expresión de las proteínas LiMT y LiMT-GFP en líneas transfectadas con la construcción LiMT-GFP. Se realizó con un anticuerpo policlonal anti-LdMT a partir de extractos proteicos totales. La línea Δ LiRos3+LiRos3+LiMT-GFP (LiRos3) se empleó como control. Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina para el control de carga de proteínas. Se muestra un resultado representativo de al menos tres experimentos. (C) Ensayos de co-inmunoprecipitación de LiMT-GFP con proteínas Cdc50 quiméricas y truncadas. Los lisados celulares se incubaron con bolitas magnéticas marcadas con un anticuerpo anti-GFP y el eluido de las proteínas que quedaron retenidas se analizó mediante Western blot. Se emplearon anticuerpos policlonales anti-LdMT y anti-LdRos3 (excepto L1R3 y L2R3, que se analizaron con anti-LdRos1 y anti-LdRos2, respectivamente). La línea Δ LiRos3+LiRos3 no transfectada con LiMT-GFP (LiRos3 en el primer carril) se empleó como control negativo (-) y la línea Δ LiRos3+LiRos3 transfectada con LiMT-GFP (LiRos3 en el segundo carril) como control positivo (+). Se muestra un resultado representativo de al menos tres experimentos.

Como se ha comentado anteriormente, en las líneas que expresan las proteínas truncadas Δ NR3 y Δ CR3 existe interacción entre las dos subunidades del complejo pero no hay llegada del mismo a la membrana plasmática, lo que implica en consecuencia un defecto en la captación de MLF y la generación de parásitos resistentes al fármaco. Siendo así, estas proteínas truncadas podrían competir con la proteína nativa LiRos3 en su unión a LiMT, y así producir un descenso en la eficiencia en el tráfico del

transportador a la membrana plasmática. Para ello, ambas proteínas truncadas se sobreexpresaron en promastigotes salvajes, utilizando como control promastigotes salvajes que sobreexpresaban la proteína nativa (Fig. 53A). Se observó cierto aumento en el valor de la IC_{50} (Fig. 53B) y un significativo descenso en la captación de MLF, más acusado en la línea que sobreexpresaba la proteína $\Delta NR3$ (55% de la cantidad acumulada por la línea salvaje) (Fig. 53C). Se quiso comprobar que la sensibilidad a MLF se recuperaba cuando los promastigotes dejaban de sobreexpresar estas proteínas truncadas. Para ello, los cultivos se mantuvieron durante 3 meses sin la presión selectiva del antibiótico de selección y, aunque la expresión de $\Delta NR3$ no había desaparecido por completo (Fig. 53D), se observó que los promastigotes presentaban una sensibilidad a MLF similar a la que poseían con anterioridad a la sobreexpresión de $\Delta NR3$ o $\Delta CR3$ (Fig. 53E).

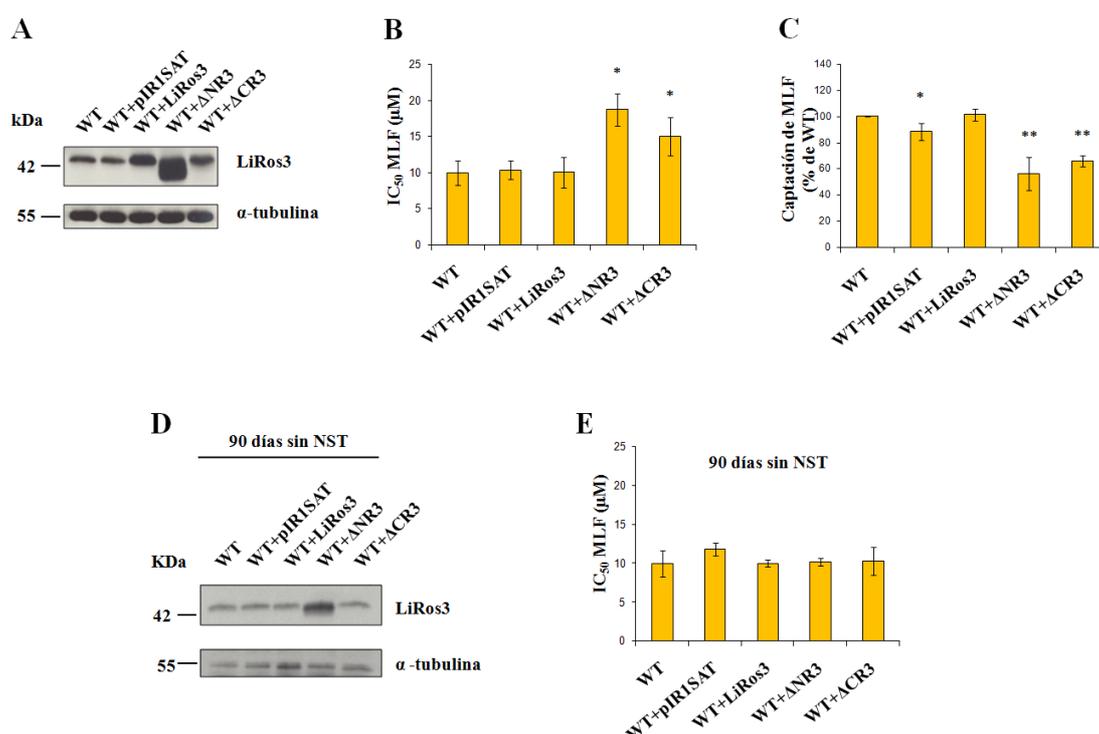


Figura 53. Efecto negativo de las proteínas truncadas $\Delta NR3$ y $\Delta CR3$ sobre la formación del complejo LiRos3-LiMT.

(A) Los niveles de expresión total se analizaron mediante Western blot con un anticuerpo anti-LdRos3 a partir de extractos proteicos de promastigotes salvajes (WT) transfectados con las construcciones truncadas $\Delta NR3$ y $\Delta CR3$. Como controles se utilizaron promastigotes salvajes transfectados con el vector vacío (WT+pIR1SAT) y transfectados con el gen nativo (WT+LiRos3). Se utilizó un anticuerpo monoclonal anti- α -tubulina para el control de carga de proteínas. Se muestra un resultado representativo de al menos tres experimentos. (B) La sensibilidad a miltefosina (MLF) y (C) la captación de [^{14}C]MLF se determinaron de la manera descrita en la leyenda de la Figura 29. Los resultados son la media \pm S.D. de los valores de IC_{50} y del porcentaje de MLF internalizada en relación con los promastigotes salvajes (WT) obtenido en al menos tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas con respecto a la línea control WT+LiRos3 se determinaron mediante el test de la t de Student (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,001$). (D) Los niveles de expresión total y (E) la sensibilidad a MLF se volvieron a examinar después de mantener los cultivos 90 días sin la presión del antibiótico de selección de los transfectantes (NST, nourseotricina).

X. Funcionalidad del complejo de transporte de miltefosina en amastigotes intracelulares de *L. infantum*

Leishmania tiene dos fases en su ciclo de vida: los promastigotes extracelulares, que crecen a 28 °C, y las formas amastigotes intracelulares, que crecen a 37 °C dentro de macrófagos y que representan la fase con mayor relevancia clínica. Previamente, en nuestro laboratorio se ha descrito que la delección de cualquiera de las dos subunidades del complejo de transporte de MLF también origina amastigotes resistentes al fármaco sin que éstos pierdan su infectividad (Seifert *et al.*, 2007). Contando con este precedente, para determinar si la pérdida de función de las proteínas mutantes de LiRos3 es independiente de la fase del ciclo de vida de *Leishmania*, así como de cambios de temperatura o fisiológicos, se investigó si algunos de los cambios más representativos introducidos en LiRos3 modifican la funcionalidad del complejo de transporte de MLF en los amastigotes intracelulares de *Leishmania*. Para ello, se infectaron macrófagos procedentes de células THP-1 con promastigotes de *L. infantum* en fase estacionaria tardía de crecimiento, tanto de la línea Δ LiRos3 como de algunos transfectantes representativos. Los macrófagos infectados se incubaron durante 72 h en presencia de distintas concentraciones de MLF y los valores de IC₅₀ se pudieron determinar contando el número de amastigotes que permanecían dentro de los macrófagos tras la incubación.

La resistencia a MLF se mantuvo en las formas amastigotas intracelulares de las líneas Δ LiRos3, N176I, L293S, K315M, Δ NR3 y Δ N4, que presentaron valores de IC₅₀ a MLF superiores a 20 μ M, una concentración próxima a la IC₅₀ de las células THP-1, motivo por el cual fue la máxima concentración que se evaluó. Por el contrario, los parásitos Δ LiRos3 transfectados con LiRos3 o que expresaban otras proteínas como Q17L, D218V, G326V y LM3R1, presentaron valores de IC₅₀ inferiores a 15 μ M en la fase amastigote, lo que concuerda con los valores obtenidos en la fase promastigote (Tabla 7). Estos resultados muestran que la resistencia a MLF relacionada con la inactivación del complejo LiRos3-LiMT se transfiere a la fase amastigote intracelular, tal y como se ha descrito previamente (Seifert *et al.*, 2007).

Tabla 7. Sensibilidad a miltefosina de promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. infantum* de algunas líneas mutantes representativas

Línea	IC ₅₀ μM (Índice de resistencia)	
	Promastigotes	Amastigotes
ΔLiRos3+LiRos3	21,24 ± 4,06	3,58 ± 1,30
ΔLiRos3	146,24 ± 7,59 (6,88 ± 1,67)	> 20 (> 5,60)
Q17L	62,58 ± 8,17 (2,95 ± 0,95)	9,18 ± 1,19 (2,56 ± 1,26)
N176I	142,89 ± 5,44 (6,72 ± 1,54)	> 20
D218V	32,99 ± 9,67 (1,55 ± 0,75)	4,39 ± 1,15 (1,22 ± 0,77)
L293S	141,01 ± 4,58 (6,63 ± 1,48)	> 20
K315M	151,82 ± 4,02 (7,15 ± 1,55)	> 20
G326V	26,20 ± 4,18 (1,23 ± 0,43)	3,27 ± 1,60 (0,91 ± 0,78)
ΔNR3	102,77 ± 11,85 (4,84 ± 1,48)	> 20
LM3R1	21,50 ± 6,45 (1,01 ± 0,50)	10,47 ± 2,49 (2,92 ± 1,76)
ΔN4	142,77 ± 12,59 (6,72 ± 1,88)	> 20

Los índices de resistencia, indicados entre paréntesis, se calcularon dividiendo el valor de la IC₅₀ de las diferentes líneas por el de los promastigotes ΔLiRos3 que expresan el gen nativo (línea control ΔLiRos3+LiRos3). La sensibilidad a miltefosina de los promastigotes de *L. infantum* se midió por el método colorimétrico basado en la reducción del MTT. La IC₅₀ se determinó después de 48 h de cultivo a 28 °C. Los amastigotes intracelulares se obtuvieron después de la infección de macrófagos THP-1 con promastigotes en fase estacionaria tardía de la manera descrita en Materiales y Métodos. Después de 72 h a 37 °C, la IC₅₀ se determinó a partir del recuento del número de amastigotes presentes en un mínimo de 200 macrófagos, comparando cultivos tratados con el fármaco con cultivos no tratados. Los resultados son la media ± S.D. de tres experimentos independientes.



I. Caracterización de las P4-ATPasas y las proteínas Cdc50: últimos avances y situación actual

Desde que se descubriese en 1996 que las P4-ATPasas tienen como actividad la translocación de aminofosfolípidos (Tang *et al.*, 1996), se han logrado significativos avances en el conocimiento del funcionamiento de este transporte a nivel molecular y de las consecuencias celulares y fisiológicas que conlleva (Coleman *et al.*, 2013). Esto ha sido posible gracias a numerosos estudios genéticos, bioquímicos, y de biología celular y molecular, en los que se han empleado distintos modelos eucariotas, como levaduras, plantas, ratones, humanos y otros organismos.

Sin embargo, quedan muchos puntos aún por resolver. Por ejemplo, solo se ha conseguido purificar para su caracterización una de las catorce P4-ATPasas presentes en el genoma de mamíferos, la denominada ATP8A2 (Coleman *et al.*, 2009) o una de las cinco de levaduras, la proteína Drs2 (Azouaoui *et al.*, 2014). Existe un gran número de P4-ATPasas que aún no se han caracterizado (Takatsu *et al.*, 2014), quedando por conocer aspectos tan importantes como su especificidad de sustrato, sus interacciones con proteínas Cdc50 y otras proteínas, su localización subcelular o su distribución tisular *in vivo*. Asimismo, falta mucho por conocer acerca de los mecanismos de regulación de la actividad de las P4-ATPasas (Coleman *et al.*, 2013).

El mecanismo de acción y muchas de las propiedades estructurales de las P4-ATPasas parecen ser similares a las que poseen otros miembros de la superfamilia de ATPasas de tipo P. En los últimos años se han realizado estudios de mutagénesis que, gracias a las mejoras en los sistemas de expresión de proteínas y al modelado molecular basado en otras ATPasas de tipo P, han permitido identificar algunos residuos de las P4-ATPasas clave para la translocación de fosfolípidos. También se ha logrado un importante progreso en la reconstitución funcional de las P4-ATPasas en vesículas (revisado por Coleman *et al.*, 2013; López-Marqués *et al.*, 2015). No obstante, para conocer con mayor profundidad los mecanismos de reconocimiento y transporte de fosfolípidos serán necesarios más estudios, entre los que resultaría de gran relevancia la obtención de la estructura cristalina de estas proteínas. Entre otros aspectos, este avance podría permitir identificar los sitios de unión de los fosfolípidos o analizar si existe un estado de oclusión para el sustrato durante su transporte, lo cual implicaría el cierre transitorio del acceso al sitio de unión del fosfolípido desde la cara exoplasmática de la P4-ATPasa.

Algunos estudios se han centrado en las proteínas Cdc50 y han servido para empezar a definir su papel en la modulación de la actividad de las P4-ATPasas, y en la estabilidad, transporte y localización del complejo. La importancia de estas funciones acentúa la necesidad de conocer cómo interaccionan ambas proteínas. Sin embargo, la caracterización estructural de las proteínas Cdc50, que no poseen motivos aminoacídicos conocidos, se encuentra en una etapa inicial y son muy pocos los estudios que se han realizado al respecto (Takahashi *et al.*, 2011; Coleman y Molday, 2011; Puts *et al.*, 2012). En este contexto, esta tesis doctoral se ha centrado en la caracterización de LiRos3, una proteína Cdc50 de *L. infantum*, analizando una serie de aspectos que serán comentados a continuación.

II. Estudio mutacional de LiRos3

II.1. Identificación de residuos importantes en la función de LiRos3

Los análisis mediante mutagénesis dirigida constituyen una herramienta de gran utilidad para la identificación de residuos importantes para la actividad de una proteína, como se ha observado en los recientes estudios realizados con objeto de comprender el mecanismo de acción de las P4-ATPasas (revisado por Williamson, 2014).

Para ello, es necesario disponer de un ensayo que permita comprobar el efecto de estas mutaciones. Esto ha sido posible en esta tesis doctoral, ya que unos ensayos permitieron analizar la interacción entre LiRos3 y su subunidad asociada LiMT, perteneciente a las P4-ATPasas, mientras que otros sirvieron para evaluar la relación entre esta interacción, la actividad catalítica de LiMT y los fenotipos asociados a la misma.

Estudios mutacionales en levaduras han mostrado que existen residuos dispersos a lo largo de las proteínas Lem3p y Cdc50p que contribuyen a formar el complejo heteromérico con sus P4-ATPasas correspondientes o que pueden estar implicados en la actividad translocasa del complejo (Takahashi *et al.*, 2011; Puts *et al.*, 2012). Por ejemplo, se han identificado cinco residuos de Lem3p que resultan críticos para la interacción con Dnf1p y Dnf2p. Cada uno de ellos estaba localizado en una región diferente: amino terminal, primer transmembrana, lazo extracitosólico, segundo transmembrana y carboxilo terminal. Los mismos autores identificaron además dos puentes disulfuro cuya eliminación conlleva una menor unión de su subunidad o un fuerte descenso en la actividad flipasa (Puts *et al.*, 2012).

Usando una estrategia basada en la mutagénesis dirigida de LiRos3, en esta tesis doctoral se han identificado ocho residuos adicionales localizados en el ectodominio de esta proteína importantes para la interacción entre el transportador y su subunidad (Tyr⁶³, Tyr¹¹⁴, Gly¹⁶⁸, Asn¹⁷⁶, Asp¹⁷⁷, Leu²⁹³, Tyr²⁹⁸ y Lys³¹⁵) (Fig. 54). Estos residuos son invariables en levaduras, humanos, *D. melanogaster* y *C. elegans* y, exceptuando Tyr²⁹⁸, también lo son en *Arabidopsis*. Su sustitución por determinados aminoácidos no conservativos no afecta a los niveles de expresión total de la proteína, pero sí implica un fuerte descenso en la afinidad de LiRos3 por LiMT, tal y como se observó mediante co-inmunoprecipitación; esto conlleva que el complejo no pueda alcanzar correctamente la membrana plasmática de los promastigotes de *Leishmania*, como se comprobó en los ensayos de biotinylación. Debido a ello, estas sustituciones resultan dramáticas para que el complejo de transporte de miltefosina (MLF) pueda llevar a cabo su función, por lo que los promastigotes son incapaces de incorporar cantidades altas de MLF, fármaco perteneciente al grupo de las alquilfosfolinas, resultando por tanto resistentes a su acción. De entre estos ocho residuos, Tyr⁶³, Asp¹⁷⁷, Tyr²⁹⁸ y Lys³¹⁵ son probablemente los más importantes, puesto que en ninguna de las dos mutaciones no conservativas que se realizaron se obtuvieron valores de acumulación de MLF superiores al 6% respecto a los promastigotes salvajes. Los resultados aquí mostrados concuerdan con descubrimientos previos que indicaron la presencia de amplios contactos entre el ectodominio de las proteínas Cdc50 de levaduras y los lazos externos de las P4-ATPasas (Puts *et al.*, 2012).

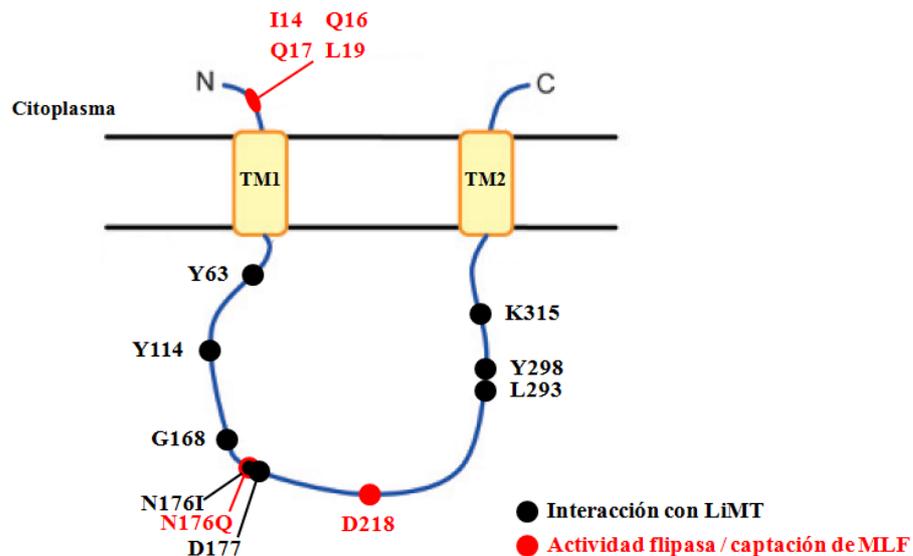


Figura 54. Residuos biológicamente importantes de LiRos3 identificados en esta tesis doctoral.

En negro se indican los residuos cuyas mutaciones no conservativas pueden tener un importante impacto sobre la interacción con LiMT. En rojo se indican los residuos cuyas mutaciones implican un descenso en la actividad flipasa o en la captación de miltefosina (MLF) sin que se vea afectada la expresión del complejo en la membrana plasmática de los promastigotes. En el residuo Asn¹⁷⁶ se observaron efectos diferentes dependiendo de la mutación realizada.

II.2. Efectos de las mutaciones en LiRos3 sobre el tráfico del complejo a la membrana plasmática

Como se ha descrito previamente para *L. donovani* (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a; Sánchez-Cañete *et al.*, 2009), el transporte de MLF en *L. infantum* es dependiente de los niveles de expresión en la membrana plasmática de LiMT y su subunidad beta LiRos3. Para que tenga lugar el transporte, se cree que debe producirse una interacción entre las dos subunidades que permita que se produzca el tráfico de ambas hacia su localización adecuada. Algunos cambios drásticos introducidos en esta tesis doctoral podrían modificar la conformación del ectodominio de LiRos3 y dificultar consecuentemente su interacción con LiMT. Por ello, la pérdida de expresión de LiMT y LiRos3 en la membrana plasmática en determinadas líneas mutantes no conservativas se debería a una interacción fallida entre ambas subunidades. Además de las líneas ya comentadas en las que se reduce drásticamente la expresión de LiMT en la superficie del parásito, se ha comprobado que esto sucede en otras líneas mutantes generadas en este trabajo, como la línea W273R, que presenta un descenso tanto en la expresión de ambas proteínas como en la captación de MLF.

Cuando una de las dos proteínas del complejo LiMT-LiRos3 está ausente, la otra queda retenida en el retículo endoplasmático, por lo que no puede alcanzar la membrana plasmática (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a). Debido a ello y a otras observaciones, se piensa que ambas proteínas viajan juntas durante su tráfico hacia la membrana plasmática (Sánchez-Cañete *et al.*, 2009). Sin embargo, en los resultados mostrados en esta tesis doctoral, se ha observado que LiRos3 puede expresarse independientemente de LiMT en la membrana plasmática, como sucede en las líneas D177V y K315M. Aunque el nivel de expresión fuese muy inferior al obtenido con la proteína LiRos3

nativa, este resultado fue inesperado de acuerdo con el conocimiento que se tenía acerca del complejo. Como ya se ha comentado, los ensayos realizados de co-inmunoprecipitación indicaron que no existe interacción de estas proteínas mutantes con LiMT. Por ello, una posible explicación al hecho de que estas proteínas se expresen en la membrana plasmática es que las mutaciones introducidas podrían alterar su plegamiento, pudiendo verse afectada, por ejemplo, su interacción con la chaperona BiP, una proteína que se ha observado que interacciona con LiRos3 y LiMT (Sánchez-Cañete, 2009, Tesis Doctoral) y que se ha descrito asociada a proteínas que forman complejos en ausencia de alguna de las proteínas (Beggah *et al.*, 1996; Vitale y Ceriotti, 2004). De alguna manera, esto podría conllevar que LiRos3 pudiese alcanzar la membrana plasmática sin ser necesaria su asociación con LiMT. Además de esta hipótesis, tampoco puede descartarse que la interacción entre las dos proteínas del complejo sí tenga lugar, aunque de forma mucho más débil que cuando está presente la proteína LiRos3 nativa. En las condiciones experimentales en las que se realizaron las co-inmunoprecipitaciones, esta débil interacción podría hacer que las proteínas mutantes se separasen de LiMT durante el proceso de aislamiento del complejo pero, *in vivo*, el complejo se podría formar y ser exportado desde el retículo endoplasmático a la membrana plasmática, aunque sin que LiMT se quedase retenida finalmente en la membrana.

Además, se ha observado que las líneas mutantes en las que no se detecta co-inmunoprecipitación de LiMT-GFP y LiRos3 expresan menor cantidad de LiMT y LiMT-GFP, a pesar de que la expresión de la proteína LiRos3 mutante es similar a la que presenta la línea que expresa la proteína nativa. El fenotipo de pérdida de expresión es similar al observado en la línea mutante nula para LiRos3. Esto sugiere que, cuando hay ausencia de interacción entre ambas subunidades y, en consecuencia, no se produce el tráfico del complejo hacia la membrana plasmática, LiMT se expresa en menor cantidad o experimenta una mayor degradación, si bien en los ensayos de Western blot realizados no se lograron detectar bandas de degradación. Relacionado con esta observación, es interesante mencionar que la Na⁺/K⁺-ATPasa es muy sensible a la degradación en ausencia de interacción con su subunidad β (Geering, 2001; Vagin *et al.*, 2007), por lo que no sería de extrañar que esto estuviese sucediendo en las líneas mutantes analizadas. También se ha descrito para las P4-ATPasas Drs2p y ATP8A2 que la ausencia de la subunidad Cdc50 conlleva una reducción en la expresión global de la flipasa, lo cual implicaría que la interacción no solo es importante para la correcta ubicación sino también para la estabilidad de la proteína (Lenoir *et al.*, 2009; Coleman y Molday, 2011).

Por otro lado, se ha observado que el ratio LiRos3/LiMT de expresión en la membrana plasmática es más alto en la línea control que en algunos mutantes. Como no se conoce todavía la estequiometría del complejo, una reducción en el transporte de MLF que no se relacione con menores cantidades de LiMT en la membrana plasmática podría estar relacionado con menores niveles de LiRos3, y por extensión del complejo, y no a un efecto de la propia mutación sobre la actividad de transporte. Sin embargo, existen mutantes que expresaron niveles más bajos de LiRos3 en la membrana plasmática que el control, pero que tuvieron niveles similares de LiMT y de actividad de transporte (por ejemplo, las líneas G137V, P148A, P166A y K284M). En todos estos casos, los resultados sugieren que una reducida cantidad de LiRos3 puede estar relacionada con un menor nivel de retención de la proteína mutada en la membrana plasmática, sin que ello afecte a la actividad translocasa.

II.3. Efectos de las mutaciones en LiRos3 sobre la actividad flipasa

Como se ha descrito para algunos complejos P4-ATPasa/proteína Cdc50 estudiados en otros trabajos (Coleman *et al.*, 2011; Puts *et al.*, 2012), la existencia de interacciones de LiRos3 con LiMT no es suficiente para que esta P4-ATPasa pueda llevar a cabo correctamente su función. Hemos observado que, cuando se reemplazan Ile¹⁴, los residuos invariables localizados en el dominio N-terminal (Gln¹⁶, Gln¹⁷ y Leu¹⁹) o el residuo Asp²¹⁸, localizado en el lazo extracitoplasmático, no hay diferencias importantes en la expresión de LiMT en la membrana plasmática, pero la captación de MLF sí se reduce de manera significativa. Esto sugiere que estos residuos no se requieren para la formación y estabilidad del complejo, pero que sí son importantes para su funcionalidad una vez que éste alcanza la membrana plasmática (Fig. 54). El mismo efecto se observó al realizar una sustitución conservativa en el residuo Asn¹⁷⁶, identificado previamente como importante para la interacción con LiMT.

Para profundizar en este aspecto, se diseñó un ensayo que permitiese determinar la actividad flipasa, similar a otros que se han empleado para estudiar el efecto de las mutaciones en las P4-ATPasas sobre su actividad, consistentes en la medida de la internalización de análogos fluorescentes de fosfolípidos en células vivas (Baldrige y Graham, 2012; Stone *et al.*, 2012). Mediante este tipo de ensayos es posible realizar medidas cinéticas, pudiendo emplearse para determinar la afinidad por el sustrato (Stone *et al.*, 2012).

Se determinó el efecto que tienen las sustituciones no conservativas realizadas en los residuos Ile¹⁴, Gln¹⁶, Gln¹⁷, Leu¹⁹ y Asp²¹⁸, así como la sustitución conservativa en el residuo Asn¹⁷⁶ de LiRos3 sobre la actividad de transporte de LiMT y se calculó la constante de afinidad aparente (K_M) por el sustrato NBD-PC. Como era de esperar, la actividad flipasa de todas estas líneas mostró un importante descenso. En ninguna de ellas se observó un significativo aumento de la K_M para el análogo de fosfatidilcolina NBD-PC, lo que sugiere que el descenso en la internalización no se debe a una pérdida en la afinidad de LiMT por su sustrato. Aunque la línea D218V mostró un aumento de la K_M de 1,5 veces respecto a la línea control Δ LiRos3+LiRos3, resulta insuficiente para poder afirmar que esta mutación pueda afectar a la afinidad por el sustrato empleado. Por otro lado, todas las líneas mutantes simples y múltiples que contienen la mutación Q16L presentaron un descenso en la K_M (entre 1,6 y 2,2 veces respecto a la línea control), lo que sugiere que esta mutación podría favorecer la unión del sustrato, pero al mismo tiempo implicar una reducción en la actividad del transportador. En cualquier caso, serían necesarios más estudios para determinar la relevancia biológica de estas observaciones, ya que los ensayos realizados no se produjeron con enzimas purificadas, sino con células completas.

Los estudios llevados con la P4-ATPasa ATP8A2 purificada han sugerido que el cambio de la afinidad aparente por el fosfolípido parece estar relacionado con una modificación en la unión del fosfolípido con el estado E₂P del enzima y no con una alteración de la cinética de reacción de una etapa alejada de la interacción (Vestergaard *et al.*, 2014). Ahora bien, la sustitución de residuos por otros que incrementen la afinidad puede llevar aparejada cambios en el ciclo de reacción que den lugar a una reducción en la actividad ATPasa estimulada por el fosfolípido y por tanto en el transporte. La disociación del fosfolípido transportado depende de la transformación del estado E₂ a E₁ y por tanto una estabilización de E₂ puede reducir la velocidad de

liberación del fosfolípido a la cara interna de la membrana y afectar la de hidrólisis de ATP. Por ejemplo, este es el caso para diversas mutaciones en el transportador ATP8A2, las cuales incrementan la afinidad por PS y PE pero reducen la actividad de transporte debido posiblemente a un incremento en la estabilidad del estado E₂ o a una desestabilización en la desfosforilación del estado E₂P (Vestergaard *et al.*, 2014). Otros estudios realizados con células intactas han revelado que algunas mutaciones introducidas en la P4-ATPasa Dnf2p pueden incrementar la afinidad por PC y producir a su vez una notoria reducción de la velocidad de transporte del fosfolípido (Stone *et al.*, 2012).

III. Otros aspectos funcionales de LiRos3

III.1. Efecto de la tasa de glicosilación de LiRos3 sobre su función

En un estudio realizado anteriormente en células de mamíferos se demostró que la glicosilación de la proteína CDC50A no parece ser esencial para la funcionalidad del complejo que constituye con la P4-ATPasa ATP8A2, pero sí para la formación de un complejo estable (Coleman y Molday, 2011). Tal y como se ha descrito para la subunidad β de la Na⁺-K⁺-ATPasa (Vagin *et al.*, 2007), la N-glicosilación de LiRos3 podría ser esencial para el anclaje del complejo a la membrana plasmática. En todos los mutantes defectivos de N-glicosilación de LiRos3, tanto simples (N86Q, N176Q, N198Q, N241Q) como múltiples (ΔN3 y ΔN4), la proteína alcanzó la membrana plasmática. Sin embargo, la captación de MLF se relacionó con la presencia o ausencia de LiMT en la membrana plasmática, determinada en los ensayos de biotilación de proteínas de la superficie celular. Se observó que la proteína mutante ΔN4, totalmente N-desglicosilada, no es capaz de formar un complejo estable con LiMT, puesto que no se detectó en los ensayos de co-inmunoprecipitación. Esto explica que LiMT no se detectase en la membrana plasmática en la línea ΔN4, mientras que en las demás líneas defectivas de N-glicosilación, sí se detectaron cantidades óptimas de LiMT en la membrana. Estos descubrimientos sugieren que LiRos3 requiere, al menos, una glicosilación parcial para el mantenimiento de un complejo estable con LiMT.

En otro orden de cosas, el residuo Asn¹⁷⁶, que forma parte de un motivo conservado de N-glicosilación (NXS/T) en la familia de proteínas Cdc50, parece estar implicado en el tráfico y en la actividad de LiMT. Aunque la línea N176Q mostró una captación de MLF del 55% en comparación con la línea salvaje, la expresión de LiMT en la membrana plasmática no se vio afectada de forma significativa. Como se ha comentado, en esta línea se produce un descenso en la actividad flipasa comparable a la que tuvo lugar en el mutante D218V. Por otro lado, la mutación S178A tiene como consecuencia la eliminación de la N-glicosilación en Asn¹⁷⁶ y se ha observado que también supone un descenso en la captación de MLF, aunque menos importante. Estos datos refuerzan la hipótesis de que este residuo tiene un papel importante en la actividad del complejo de transporte.

III.2. Caracterización funcional de los dominios de LiRos3

Otro de los objetivos de esta tesis doctoral ha sido profundizar en el conocimiento de las funciones de los dominios de LiRos3 mediante el empleo de proteínas truncadas

y proteínas Cdc50 quiméricas, de manera similar a como se ha hecho en estudios recientes efectuados en células de mamíferos y en levaduras (Coleman y Molday, 2011; Puts *et al.*, 2012). Conviene recordar en este punto que las proteínas Cdc50 son proteínas de membrana con dos segmentos transmembrana, dos secuencias cortas amino y carboxilo terminales orientadas al citosol y una secuencia larga extracelular o ubicada dentro del lumen de organelos. Para caracterizar estos dominios, la estrategia empleada fue eliminar los extremos terminales o intercambiar cada uno de esos dominios por los de las otras proteínas Cdc50 presentes en *L. infantum* (Fig. 55).

Aunque existe una homología muy baja entre los extremos citosólicos amino y carboxilo terminales de los tres miembros Cdc50 de *Leishmania*, en este trabajo se ha podido comprobar que, cuando estos dominios de LiRos3 se sustituyen por los correspondientes dominios de LiRos1, las proteínas quiméricas obtenidas (N1R3, C1R3 y LM3R1) son funcionales (Fig. 55) y la internalización de MLF llevada a cabo por los promastigotes incluso experimenta un ligero aumento cuando expresan las proteínas que contienen el extremo citosólico N-terminal de LiRos1 (N1R3, LM3R1). En cambio, las proteínas quiméricas con los extremos citosólicos de LiRos2 (N2R3, C2R3 y LM3R2), aunque sean capaces de interactuar con LiMT, no son funcionales, probablemente debido al mayor tamaño que tienen estos dominios en LiRos2, lo que podría modificar su conformación y alterar el tráfico del complejo hacia la membrana plasmática (Fig. 55). Los ensayos de co-inmunoprecipitación, en los que se detectó degradación de las proteínas N2R3 y LM3R2, sugieren además que la presencia del extremo N-terminal de LiRos2 altera la estabilidad de la proteína.

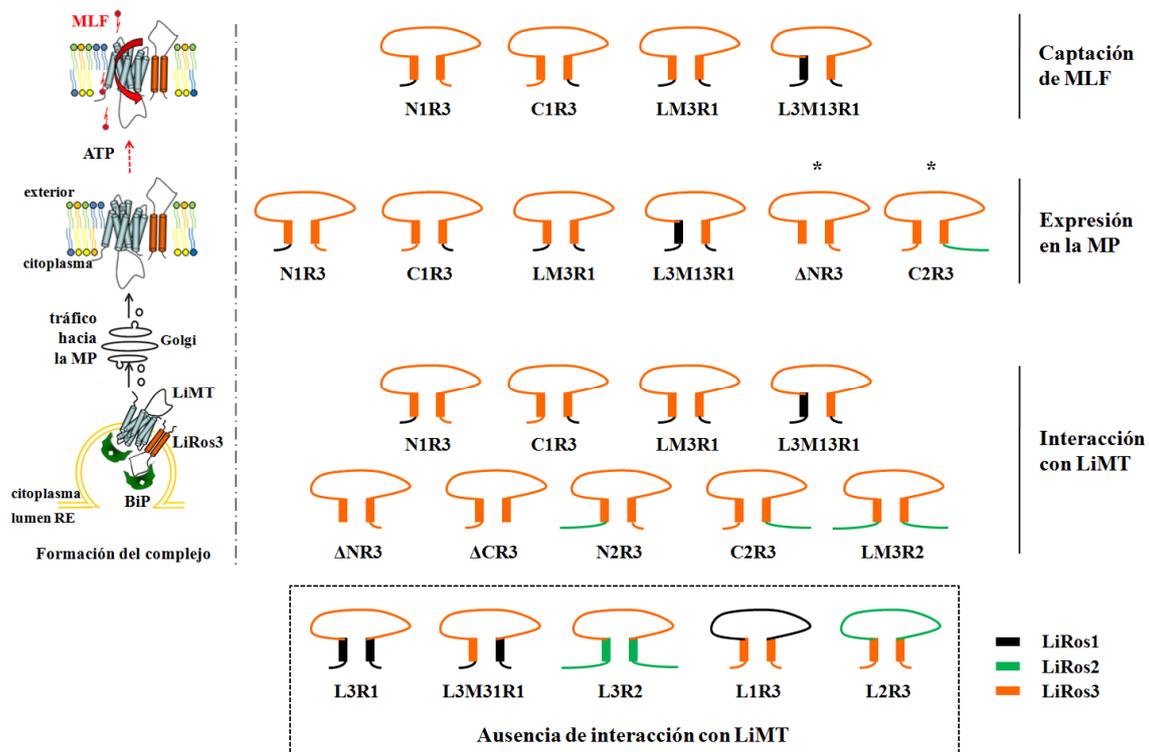


Figura 55. Fenotipos asociados a las proteínas Cdc50 quiméricas y truncadas de *L. infantum* generadas en esta tesis doctoral.

A la izquierda se representan los eventos que tienen lugar cuando los parásitos expresan el complejo nativo LiMT-LiRos3. Los dominios de LiRos3 están representados en color naranja; los de LiRos1, en negro, y los de LiRos2, en verde. Las proteínas señaladas con un asterisco (ΔNR3 y C2R3) se expresan en la membrana plasmática (MP) sin estar asociadas a LiMT. RE, retículo endoplasmático; MLF, miltefosina. Para más detalles, consultar el texto.

Solo unos pocos residuos están conservados en estos dominios citosólicos entre las tres proteínas Cdc50 de *Leishmania*. Algunos de ellos se han mutado en este estudio (Gln¹⁶, Gln¹⁷ y Leu¹⁹) y los resultados obtenidos en los ensayos de actividad flipasa indican que parecen ser importantes para la funcionalidad del complejo. Al margen de ellos, previamente se ha descrito en la proteína Cdc50 de levaduras Lem3p la existencia de un residuo situado en el extremo N-terminal (Ala⁶⁵) que participa en la interacción con las P4-ATPasas Dnf1p y Dnf2p (Puts *et al.*, 2012). Sin embargo, esta alanina no está conservada en LiRos3 (Hys²¹), pero sí en LiRos1, y quizás debido a esto las líneas que contienen el extremo N-terminal de LiRos1 (N1R3 y LM3R1) presenten un aumento en la captación de MLF en relación con LiRos3. Dadas las importantes fluctuaciones que existen en las interacciones entre las P4-ATPasas y las proteínas Cdc50 (Lenoir *et al.*, 2009), es posible que esta alanina (y quizás también los otros residuos del dominio amino terminal que se han identificado en esta tesis) participen en la interacción con LiMT mientras tiene lugar el ciclo de reacción, pero no necesariamente durante el tráfico del complejo hacia la membrana plasmática.

Como LiRos1 no interacciona con LiMT, los resultados anteriores muestran además que los extremos N- y C-terminal de LiRos3 no son críticos para la interacción específica con LiMT, como previamente se había indicado en levaduras (Puts *et al.*, 2012). Esto se confirmó mediante ensayos de co-inmunoprecipitación, comprobando que las proteínas truncadas para estos extremos (Δ NR3 y Δ CR3) son capaces de interactuar con LiMT (Fig. 55). Sin embargo, los promastigotes transfectados con las construcciones Δ NR3 y Δ CR3 no expresan LiMT a nivel de la membrana plasmática, lo que explica que sean resistentes a MLF. Esto indica que, aunque la interacción con LiMT pueda producirse en ausencia de los dominios terminales de LiRos3, éstos sí podrían ser esenciales para que se produzca el tráfico del complejo hacia la membrana plasmática. Los parásitos salvajes transfectados con estas construcciones disminuyen su capacidad para captar MLF, lo cual refuerza esta hipótesis. Esto se debe probablemente a que estas proteínas compiten con la proteína nativa en la interacción con LiMT, disminuyendo la formación de complejos LiRos3-LiMT funcionales.

Teniendo en cuenta lo anterior, un resultado llamativo fue el hecho de que la proteína truncada Δ NR3 y la proteína quimérica C2R3 se detectasen en la membrana plasmática (Fig. 55). La ausencia de expresión de LiMT en estas líneas podría deberse a que los cambios en el plegamiento de estas proteínas conlleven la pérdida de la interacción entre las dos subunidades durante su tráfico hacia la membrana plasmática. Los extremos N- y C-terminal de LiRos3 podrían también ser responsables de la retención de LiMT en la membrana plasmática, al igual que se ha sugerido previamente para su estado glicosilado. Otra explicación para lo observado con Δ NR3 es que el extremo N-terminal podría ser responsable de la retención de LiRos3 en el RE en ausencia de interacción con LiMT. Por su parte, el extremo C-terminal podría ser responsable de la retención de LiRos3 en la membrana plasmática, una función que podría ser reemplazada por la región C-terminal de LiRos2, explicando de este modo el resultado obtenido en la línea C2R3.

En cuanto a los dos segmentos transmembrana, hemos observado en la línea L3M13R1 que al intercambiar el primer segmento transmembrana de LiRos3 por el correspondiente segmento de LiRos1 continúa generándose un complejo funcional, conllevando además un incremento significativo en la captación de MLF. Sin embargo, las proteínas quiméricas que contienen el segundo segmento transmembrana de LiRos1

(L3R1 y L3M31R1) no son capaces de interactuar con LiMT, por lo que las líneas transfectadas con estas construcciones no expresan el complejo en la membrana plasmática y son muy resistentes a MLF (Fig. 55). También hemos podido comprobar que, al introducir los dos segmentos transmembrana de LiRos2 (L3R2), se pierde la interacción que se observa en la línea LM3R2. El análisis de homología sobre los residuos que podrían formar parte de los segmentos transmembrana no predecía qué intercambio podría mantener la interacción y, en todo caso, los dos segmentos transmembrana de LiRos2 guardan mayor nivel de conservación con LiRos3 que los correspondientes de LiRos1 (Tabla 6). Quedaría por determinar si son intercambiables de forma individual los segmentos transmembrana de LiRos3 por los de LiRos2. Aunque estos segmentos no contienen ninguno de los residuos altamente conservados estudiados durante este trabajo, es probable que otros residuos localizados en ellos puedan ser necesarios para la interacción de LiRos3 con LiMT. De hecho, dos residuos de la proteína de levaduras Lem3p, localizados en el primer y segundo segmento transmembrana (Ala⁸³ y Gly³⁷⁵) desempeñan un importante papel en la interacción entre Lem3p y las P4-ATPasas Dnf1p y Dnf2p (Puts *et al.*, 2012). El primero está conservado en LiRos3 (Ala³⁹) y LiRos1 pero no en LiRos2, mientras que el segundo está conservado en LiRos3 (Gly³³³) y LiRos2 pero no en LiRos1. Además, existen varios residuos conservados entre los transmembranas de LiRos2 y LiRos3 que no lo están en LiRos1, por lo que no disponemos de datos suficientes para explicar el patrón de interacción observado. Se requeriría de un análisis más profundo para determinar qué residuos son esenciales para la unión a LiMT.

Por último, el lazo exoplasmático de LiRos3 no es intercambiable por los lazos de LiRos1 o LiRos2, ya que las proteínas quiméricas L1R3 y L2R3 no interactúan con LiMT (Fig. 55). Esto indica que, además de los ocho residuos que se han identificado en esta tesis doctoral, debe haber otros residuos en este dominio que sean críticos para que se produzca una correcta interacción con LiMT y que determinen la especificidad de reconocimiento. Anteriormente se había descrito un residuo de serina que participaba en la interacción de Lem3p con Dnf1p y Dnf2p (Puts *et al.*, 2012), pero en LiRos3 está sustituido por una alanina (Ala¹⁷³).

En su conjunto, estos resultados concuerdan con otros estudios llevados a cabo con otras proteínas Cdc50 (Coleman y Molday, 2011; Takahashi *et al.*, 2011; Puts *et al.*, 2012), que sugieren que existe una amplia superficie de interacción entre las proteínas Cdc50 y las P4-ATPasas, y que muchas de las interacciones que se producen son necesarias para el ensamblaje del complejo y el transporte de fosfolípidos (Coleman *et al.*, 2013).

III.3. Contribución de LiRos3 en el transporte de fosfolípidos

Aunque se haya observado que existen numerosas interacciones entre las P4-ATPasas y las proteínas Cdc50, y que éstas poseen un papel de vital importancia durante el ciclo de reacción de las P4-ATPasas, aún se desconoce cuál es exactamente la función que las proteínas Cdc50 ejercen durante la translocación de fosfolípidos (Coleman *et al.*, 2013). Para ello, será necesaria la realización de mayores investigaciones bioquímicas y estructurales. Hasta la fecha, se ha descrito que las interacciones entre las P4-ATPasas y las proteínas Cdc50 son esenciales para la fosforilación de la flipasa y que la afinidad entre ambas subunidades fluctúa durante el

ciclo catalítico, alcanzando un máximo en el estado E₂P en presencia del fosfolípido (Lenoir *et al* 2009; Puts *et al.*, 2012).

Es posible que las proteínas Cdc50 contribuyan activamente en el transporte catalizado por las flipasas, habiéndose sugerido que podrían ayudar a que se produzca la unión del fosfolípido a la P4-ATPasa o que podrían abrir un camino por el que se produciría la translocación de los fosfolípidos a través de la membrana (Lenoir *et al.*, 2009; van der Mark *et al.*, 2013). La denominada "ruta clásica" propone que los fosfolípidos se transportan a través del interior de las P4-ATPasas, al igual que sucede con los iones transportados por otras ATPasas tipo P. En este contexto, se ha sugerido que las proteínas Cdc50 podrían participar en el estado de oclusión que tiene lugar durante el ciclo de reacción de estas proteínas (van der Mark *et al.*, 2013), en el que la molécula transportada se queda bloqueada de manera transitoria en el interior de la proteína.

Las proteínas Cdc50 aportan dos hélices transmembrana adicionales a las diez que constituyen el dominio M del transportador. Es interesante destacar que la translocación de fosfolípidos solo se ha observado en aquellas P4-ATPasas que interaccionan con proteínas Cdc50 y que los transportadores ABC relacionados con el transporte de fosfolípidos también contienen doce regiones transmembrana (López-Marqués *et al.*, 2015). Serían necesarios más estudios para poder determinar si estas doce hélices constituyen la estructura mínima necesaria para el transporte de fosfolípidos pero, por el momento, se ha sugerido que este aumento en la estructura debido a las proteínas Cdc50 podría modular la afinidad de las P4-ATPasas por su sustrato, de manera análoga a como se ha descrito para las subunidades de las Na⁺/K⁺ y H⁺/K⁺ ATPasas (Jorgensen *et al.*, 2003; Geering, 2005).

Como se ha observado en los ensayos de actividad flipasa descritos en esta tesis doctoral, esto podría estar sucediendo en el complejo LiMT-LiRos3 de *Leishmania infantum*, ya que la mutación Q16L en LiRos3 conlleva un descenso en la K_M aparente para el análogo de fosfatidilcolina NBD-PC. Parece poco probable que las proteínas Cdc50 se unan directamente a la molécula que es transportada, ya que la especificidad de sustrato depende exclusivamente de las P4-ATPasas (López-Marqués *et al.*, 2010; Baldrige y Graham, 2012). Sin embargo, esta mutación en LiRos3 podría alterar la interacción que presenta con LiMT mientras tiene lugar su ciclo de reacción, especialmente durante el estado conformacional E₂P, en el que esta interacción es más intensa (Lenoir *et al.*, 2009). Esto podría implicar una modificación del estado conformacional E₂P de LiMT y alterar de esta manera su afinidad por el sustrato. Es lógico pensar que un descenso en la afinidad conlleve en consecuencia una menor tasa de transporte. Sin embargo, esta menor actividad flipasa puede suceder también cuando aumenta la afinidad, como se observó en todas las líneas que contenían la mutación Q16L, puesto que incrementar la afinidad por el sustrato en la cara exocitoplasmática tiende a que se reduzcan las conformaciones en las que la P4-ATPasa está unida a su sustrato en la cara citoplasmática (Stone *et al.*, 2012).

Por otro lado, se ha sugerido que el dominio N-terminal de las proteínas Cdc50 interviene en el ciclo de reacción de las P4-ATPasas (Coleman y Molday, 2011). El intercambio del dominio N-terminal de la proteína CDC50A por el de CDC50B da lugar a un ligero incremento en la afinidad por PS y a una reducción en la actividad de ATP8A2, disminuyendo la sensibilidad a vanadato, un inhibidor de las ATPasas tipo P

que interacciona con el estado E₂. En esta tesis doctoral se han identificado algunos de los residuos que podrían ser clave para esta función, ya que mutaciones no conservativas en los residuos Ile¹⁴, Gln¹⁶, Gln¹⁷ y Leu¹⁹ de LiRos3 implican un importante descenso en la actividad flipasa de los promastigotes analizados. Estos datos refuerzan la hipótesis de que el dominio N-terminal de las proteínas Cdc50 podría encontrarse en contacto directo con el dominio P de las P4-ATPasas, siendo capaz de influir en la estabilización del estado E₂P de forma similar a lo descrito para la subunidad beta de la H⁺/K⁺ ATPasa, donde el dominio citosólico previene la reversión de E₂P a E₁P (Abe *et al.*, 2009).

A pesar del indudable valor que poseen los estudios funcionales realizados en esta tesis doctoral para caracterizar la proteína LiRos3, no hay que olvidar que se han llevado a cabo utilizando células completas. Para estudiar con detalle la actividad y las propiedades funcionales de una enzima, un requisito necesario es su purificación en su forma activa, por lo que, para una inequívoca demostración de la implicación directa de LiRos3 en el transporte de lípidos, se requeriría la reconstitución de las proteínas LiMT y LiRos3 purificadas activas en proteoliposomas. Esta tarea resultaría de gran complejidad debido a la dificultad que supone purificar proteínas de membrana, la insolubilidad en agua de los sustratos requeridos y la necesidad de purificar dos subunidades a las que cabe la posibilidad de que existan unidas otras proteínas accesorias. En este sentido, solo se han podido purificar y reconstituir de manera funcional las P4-ATPasas ATP8A2 de humanos y Drs2p de levaduras (Coleman *et al.*, 2009; Zhou y Graham, 2009), lo que ha permitido comprobar que en estos dos transportadores no se requieren más proteínas aparte de la P4-ATPasa y su subunidad de la familia Cdc50 para la translocación de fosfolípidos.

IV. Interacción de la miltefosina con su complejo de transporte

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral pueden tener otras potenciales aplicaciones aparte del avance que suponen en la caracterización de las proteínas Cdc50 y el interés que representan por la posibilidad de que puedan ser extensibles a otros miembros de esta familia. Por citar un primer ejemplo relacionado con el organismo modelo utilizado en los ensayos descritos, puede mencionarse que estos resultados podrían servir de punto de partida para realizar otras mutaciones o construcciones quiméricas que ayuden a comprender cómo se produce la interacción de la MLF con su complejo de transporte en *Leishmania*. La conformación tridimensional de la unión de las P4-ATPasas con sus ligandos se podría determinar mediante cristalografía de rayos X, pero esto aún no ha sido posible. A la espera de que esto suceda, estos datos podrían ser complementarios a los que se han obtenido recientemente empleando herramientas de biología estructural computacional (Singh y Mandlik, 2015), que permiten realizar modelización de proteínas, estudiar la dinámica asociada con sus diferentes dominios y usar activadores e inhibidores para alterar su funcionamiento.

Para poder realizar el método computacional conocido como acoplamiento molecular o *docking*, cuyo objetivo es determinar las formas de unión entre ligandos y proteínas, es necesario conocer experimentalmente cuál es su estructura. Por ello, tanto los estudios mutacionales como computacionales podrían ser utilizados para desarrollar

de manera racional nuevos compuestos que sean transportados por este complejo de transporte con el objetivo de mejorar el perfil farmacológico, farmacocinético y de seguridad de la MLF, o para disponer de alternativas terapéuticas en caso de aparición de resistencias. Por ejemplo, se ha investigado recientemente mediante estas técnicas la posibilidad de emplear en un futuro activadores del complejo de *L. major* LmjMT-LmjRos3, con el objeto de mejorar la tasa de captación del fármaco por los parásitos e incrementar así la efectividad del tratamiento (Singh y Mandlik, 2015).

V. Resistencia a miltefosina en *Leishmania*

V.1. Empleo de la miltefosina para la leishmaniasis: necesidad de mecanismos de control

Como ya se ha avanzado en el apartado anterior, los resultados obtenidos pueden encontrar aplicación en el ámbito de la leishmaniasis. Esta enfermedad olvidada afecta principalmente a países en vías de desarrollo, en los que el nivel de pobreza es elevado y la malnutrición incrementa el riesgo de que aparezcan las manifestaciones clínicas. Las políticas sobre el uso de fármacos contra la leishmaniasis deben estar revisándose continuamente para lograr mejores tasas de curación y alargar la vida útil de los pocos fármacos disponibles. Se están llevando a cabo programas que tienen por objetivo eliminar la leishmaniasis visceral (LV) en el subcontinente Indio, pero para ello es necesario mejorar la farmacovigilancia y monitorizar la efectividad de los tratamientos (Joshi *et al.*, 2008; Rijal *et al.*, 2013). Como las alternativas terapéuticas son escasas, comprender las bases del fallo terapéutico y desarrollar métodos para detectar este fenómeno, ayudará a proteger los fármacos existentes y sugerir el tratamiento más adecuado.

La introducción de la MLF representó un importante avance en el tratamiento de la leishmaniasis debido a las ventajas que conlleva su administración oral, pero la posibilidad de aparición de resistencias constituye una seria amenaza para que este fármaco pueda tener una larga vida terapéutica. Por ello, dentro de los mecanismos dirigidos a controlar la leishmaniasis, resulta muy importante introducir medidas para prevenir la generación de parásitos con altos valores de resistencia a MLF, entre los que podrían incluirse aquellos con un defecto en la captación del fármaco debido a la inactivación del complejo de transporte LiMT-LiRos3.

El porcentaje de curación de la leishmaniasis en la India con el empleo de la MLF ha experimentado un descenso desde que se realizaron los ensayos clínicos en fase III (Sundar *et al.*, 2012). Existe preocupación por el empleo de la MLF en este país, donde es un medicamento de venta libre disponible en el sector privado y está poco sujeto a control de uso (Sundar y Murray, 2005; Sundar y Olliaro, 2007). Por ello, dentro del programa de eliminación de la LV se ha recomendado una mayor supervisión por parte de los poderes públicos de la distribución del medicamento y del seguimiento del tratamiento, para poder alargar la vida útil de la MLF (Dorlo *et al.*, 2012a). Esto implicaría llevar a cabo una monitorización que permitiese verificar tras el tratamiento con el fármaco, y en los meses posteriores, si los pacientes realmente se han curado (Malaviya *et al.*, 2011; Ostyn *et al.*, 2014).

El control del cumplimiento de los regímenes de tratamiento frente a la LV, así como de su eficacia clínica, no están tan bien estandarizados como ocurre con los tratamientos frente a otras enfermedades infecciosas como la tuberculosis o la malaria (Rangan, 2003; Price *et al.*, 2007; Rijal *et al.*, 2013). La rápida recuperación que experimentan los pacientes al ser tratados con MLF, unida a su alto coste y sus efectos adversos gastrointestinales, motiva a algunos pacientes a abandonar el tratamiento antes de tiempo o a no cumplir correctamente las pautas de dosificación. Todo esto, unido a que el tratamiento con MLF dura 28 días y la vida media del compuesto en plasma, superior a 150 h, es también muy larga, conlleva una alta probabilidad de aparición de resistencias debido a la persistencia de niveles subterapéuticos del fármaco durante varios meses después de que finalice el tratamiento (Bryceson, 2001; Sundar y Murray, 2005; Dorlo *et al.*, 2008b; Monge-Maillo y López-Vélez, 2015). Esto podría aumentar el número de pacientes que no respondan al tratamiento, especialmente en zonas con transmisión antroponótica.

De hecho, en los últimos años se están registrando numerosos casos de pacientes inmunocompetentes tratados con MLF frente a LV y LC que han sufrido recaídas (Calvopina *et al.*, 2006; Zerpa *et al.*, 2007; Pandey *et al.*, 2009; Rijal *et al.*, 2013; Ostyn *et al.*, 2014). En aislados clínicos obtenidos antes y después del tratamiento con MLF se ha podido comprobar que los parásitos se vuelven más tolerantes al fármaco tras su exposición al mismo, presentando una sensibilidad 2 veces menor al finalizar el tratamiento (Prajapati *et al.*, 2013). Esta mayor tolerancia no se asocia por el momento con fallo terapéutico ni se considera como una verdadera resistencia, pero podría ser la base para la aparición de cepas resistentes si estas cepas tolerantes a MLF se fuesen transmitiendo entre humanos (Rijal *et al.*, 2013; Prajapati *et al.*, 2013; Rai *et al.*, 2013; Monge-Maillo y López-Vélez, 2015).

La aparición de resistencia a MLF puede ser más probable en los casos de coinfección con VIH (Hendrickx *et al.*, 2015b), debido a la dificultad que tienen los pacientes para eliminar a todos los parásitos. Hay que tener en consideración que esto podría ser un problema en el suroeste de Europa, donde hasta un 9% de los pacientes con SIDA adquieren o se les reactiva la LV por fallo terapéutico.

Por otra parte, en países como España se utiliza la MLF para el tratamiento de la leishmaniasis canina, lo que podría incrementar el problema de la aparición de resistencias (Gamarro *et al.*, 2013). Los perros son el principal reservorio de *L. infantum* en Europa. Al ser tratados, incluso en terapia combinada con alopurinol, no terminan de eliminar los parásitos (Manna *et al.*, 2009), razón por la cual se ha propuesto que este fármaco no se debería administrar en perros (Gamarro *et al.*, 2013), para evitar la posible aparición y propagación de resistencias a MLF. Al igual que sucede al administrar MLF en pacientes con VIH, un tratamiento de larga duración implica que existan parásitos sometidos a una continua presión de selección a causa del fármaco.

Por otro lado, también hay que considerar la creciente movilidad de personal occidental a áreas endémicas deprimidas y en conflicto bélico, así como la llegada de inmigrantes procedentes de áreas endémicas (Mansueto *et al.*, 2014b), lo que podría contribuir a la propagación de los posibles casos de resistencia. Por ejemplo, los gobiernos alemán y canadiense aprobaron el empleo de MLF para el tratamiento de la leishmaniasis en soldados destinados a áreas endémicas como Irak y Afganistán (van Thiel *et al.*, 2010).

Por todo lo expuesto anteriormente, se requiere actuar urgentemente para evitar la posible aparición de resistencias a MLF y frenar su propagación (Gamarro *et al.*, 2013; Monge-Maillo y López-Vélez, 2015). Entre las estrategias propuestas, se encuentran las siguientes: el establecimiento de programas de educación para individuos en riesgo, médicos y agencias gubernamentales responsables del control de la leishmaniasis; la observación del cumplimiento del tratamiento; la adecuación de las dosis de MLF al peso y a la edad del paciente; la evaluación de la sensibilidad a MLF en las diferentes áreas endémicas con anterioridad a su empleo masivo, y la administración del fármaco en terapia combinada. Este último punto resulta de especial relevancia, existiendo un amplio consenso respecto a la necesidad de su implantación (van Griensven *et al.*, 2010). Se han obtenido muy buenos resultados en diversos ensayos clínicos en los que se combinó MLF con anfotericina B o paromomicina (Sundar *et al.*, 2008, 2011a y 2011b), lo que ha conducido a que estas asociaciones constituyan en la actualidad uno de los tratamientos de elección para la leishmaniasis en el subcontinente indio (Sundar y Chakravarty, 2015a). Gracias a las mismas, se ha observado que la duración del tratamiento con MLF se puede reducir a 7-14 días, lo que favorece que se produzca un mayor grado de cumplimiento del tratamiento por parte del paciente.

V.2. Importancia del complejo de transporte de miltefosina en la resistencia natural a miltefosina

Se conocen diversas causas por las que *Leishmania* puede generar resistencia a MLF *in vitro*, entre las que pueden destacarse algunas como el eflujo del fármaco, la disminución en la entrada al parásito por defectos en el complejo LiMT-LiRos3 o la capacidad de evitar que se desencadene la muerte celular similar a la apoptosis que origina el fármaco.

Es posible que la MLF tenga múltiples dianas intracelulares, por lo que no cabe esperar altos niveles de resistencia cuando se producen mutaciones o se altera el nivel de expresión de una única diana, tal y como se ha observado en diversos estudios (Vergnes *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2008; Choudhury *et al.*, 2008). Por el contrario, al producirse defectos en el complejo de transporte de MLF sí se producen altos niveles de resistencia, debido a que el fármaco es incapaz de alcanzar sus dianas.

Con frecuencia, en la resistencia a fármacos intervienen varios factores. En un estudio reciente, Mishra y Singh fueron los primeros en observar que el mecanismo de resistencia a MLF podría ser multifactorial (Mishra y Singh, 2013). Analizando el transcriptoma mediante PCR en tiempo real, estos autores observaron niveles de expresión de LdMT y LdRos3 mucho menores en una línea resistente a MLF respecto a una línea sensible (14,2 y 53,4 veces, respectivamente). Por el contrario, la línea resistente expresaba niveles mayores de diversas proteínas implicadas en la respuesta al estrés oxidativo. Aunque estudiar el transcriptoma tiene menos relevancia que estudiar el proteoma, puesto que la regulación de la expresión génica en *Leishmania* es fundamentalmente post-transcripcional (Clayton y Shapira, 2007; revisado por Kramer, 2012), esta observación pone de manifiesto que defectos en el complejo de transporte de MLF podrían ir acompañados de aumentos en otras proteínas que puedan ayudar al parásito a hacer frente a los efectos de la MLF. Se necesitarían más estudios metabólicos y proteómicos para poder confirmar esta resistencia multifactorial.

Se tiene un conocimiento escaso de los mecanismos mediante los que los aislados clínicos pueden adquirir una mayor tolerancia al fármaco, por lo que sería de gran interés conocer las causas moleculares por las que esto sucede. Otro estudio reciente apunta a que efectivamente puede tratarse de un proceso multifactorial (Carnielli *et al.*, 2014). Estos autores analizaron el proteoma de aislados clínicos procedentes de dos pacientes que habían sido tratados con MLF, uno de los cuales se había curado y otro que había experimentado una recaída. Los pacientes padecían LV y procedían de Brasil, donde el agente causal es *L. chagasi* = *L. infantum*. La tasa de curación observada empleando la MLF frente a la LV en Brasil es tan solo del 43% con el régimen estándar de tratamiento, aunque este ensayo clínico no se ha publicado todavía. Los autores asociaron el fallo terapéutico con una resistencia del parásito al fármaco, ya que la cepa aislada del paciente que se había curado era sensible a MLF, mientras que la del paciente que no se había curado era resistente. Al estudiar el proteoma de estas cepas, se observaron en la cepa resistente mayores niveles de expresión de proteínas relacionadas con la homeostasis redox, la respuesta al estrés celular o la protección frente a la apoptosis. Los autores no comunicaron que existiesen diferencias de expresión de las proteínas que constituyen el complejo de transporte de MLF. Sin embargo, no se puede descartar que la resistencia a MLF en el caso de fallo terapéutico se pueda deber a una menor expresión del complejo de transporte a nivel de la membrana plasmática, al igual que se ha descrito para explicar la resistencia intrínseca de *L. braziliensis*, agente causal de la LC en Brasil (Sánchez-Cañete *et al.*, 2009). Los parásitos resistentes de este estudio podrían tener un nivel de expresión global del complejo de transporte de MLF similar al de los parásitos sensibles, pero podrían presentar alguna mutación en cualquiera de las dos proteínas que afectase a su llegada a la membrana plasmática o a su funcionalidad, al igual que se ha observado en muchas de las líneas analizadas a lo largo de esta tesis doctoral.

Las cepas presentes en Brasil podrían presentar de manera intrínseca una resistencia natural a la MLF basada en defectos en el complejo de transporte del fármaco. Pese a ello, los parásitos incorporarían el fármaco, aunque en menor grado respecto a otras especies o cepas más sensibles presentes en otras zonas del planeta. Esto podría hacer que, con el tiempo, los parásitos puedan ir adaptándose al fármaco, expresando una mayor cantidad de diversas proteínas implicadas en su detoxificación y en la protección frente a la apoptosis, lo que explicaría que, en un primer momento, los pacientes presenten una curación aparente, pero experimenten recaídas con el tiempo. En la India, las cepas de *L. donovani* podrían presentar una mejor actividad de incorporación del fármaco, lo que contribuiría a una eliminación más efectiva del parásito. Por eso, las tasas de curación observadas frente a la LV en este país han sido superiores al 90%. Sin embargo, actualmente se podrían haber generado mutaciones en el complejo de transporte del fármaco o se podrían haber producido adaptaciones a sus efectos tóxicos que se estén propagando por la población, debido a la transmisión antroponótica que tiene lugar en la India, lo que explicaría las tasas de recaídas de hasta el 20% que se están produciendo en los últimos años.

Los antecedentes en el estudio del complejo de transporte de MLF realizado en nuestro laboratorio indican que el tratamiento con MLF podría generar la aparición de resistencias. Los defectos en este complejo y la consecuente reducción en la captación del fármaco podrían ser la forma más sencilla de obtener altos niveles de resistencia a MLF. En las líneas resistentes a MLF generadas en nuestro laboratorio tras ser sometidas a la presión selectiva del fármaco siempre se ha desarrollado este mecanismo

de resistencia (Seifert *et al.*, 2003; Pérez-Victoria *et al.*, 2003b y 2006a). Además, en un estudio realizado a partir de un aislado clínico de un paciente inmunodeprimido, coinfectado con VIH y *L. infantum*, se ha encontrado una cepa resistente después del tratamiento con el fármaco que contenía una mutación del transportador de MLF LiMT (L832F) (Cojean *et al.*, 2012). La aparición de mutaciones puntuales inactivantes en un único gen (aunque tenga que suceder en los dos alelos) es mecánicamente más sencilla que la desregulación de la expresión de un gen o la sobreexpresión de una proteína. Además, debe considerarse que, una vez generado, el fenotipo que resulta es estable y se transmite a las generaciones siguientes, a diferencia de lo que ocurre con la regulación de la expresión génica, que se suele perder a lo largo del tiempo. Al ser *Leishmania* un organismo diploide, la pérdida de uno de los alelos de cualquiera de las dos proteínas del complejo de transporte de MLF solo reduce a la mitad la sensibilidad del parásito frente al fármaco. Sin embargo, la pérdida del segundo alelo conlleva la generación de parásitos altamente resistentes, al ser totalmente incapaces de llevar a cabo la translocación de MLF (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a).

V.3. Marcadores de resistencia a miltefosina

Ante la llegada de la medicina personalizada, cada vez resulta de mayor importancia comprender los mecanismos moleculares por los que se producen variaciones en las respuestas a los fármacos. En el caso concreto desarrollado en esta tesis doctoral, comprender con mayor profundidad la estructura y el funcionamiento del complejo de transporte de MLF podría facilitar el desarrollo de estrategias para evitar la resistencia a MLF en *Leishmania*, puesto que la respuesta al fármaco podría variar entre individuos como consecuencia de alteraciones en la expresión del complejo de transporte.

Conocer el mecanismo de resistencia es esencial para poder identificar marcadores de resistencia a un fármaco. Su empleo facilitaría la identificación de parásitos resistentes en aislados clínicos y ayudaría a diseñar estrategias que conduzcan a un uso más racional del fármaco y alargar consecuentemente su vida útil, permitiendo hacer frente a la aparición y propagación de resistencias. Los estudios de resistencia realizados *in vitro*, como los que se presentan en esta tesis doctoral, proporcionan una información adecuada para comprender los mecanismos de resistencia que se podrían presentar en los aislados clínicos resistentes a MLF. Concretamente, en este trabajo se proporciona mucha información que podría servir para el futuro análisis de las mutaciones presentes en el complejo de transporte de MLF procedentes de aislados clínicos de *Leishmania* de pacientes que no respondan al tratamiento con este fármaco. Por tanto, estos datos podrían ser de utilidad para la industria farmacéutica y para la OMS/TDR a la hora de diseñar ensayos moleculares sencillos y de alta sensibilidad que permitan detectar casos de resistencia, con el objetivo de mejorar el abordaje terapéutico de la leishmaniasis.

Todavía no existen marcadores de resistencia a MLF identificados en aislados clínicos de *Leishmania* (Gamarro *et al.*, 2013), pero el transportador de MLF es un firme candidato (Pérez-Victoria *et al.*, 2006b; Coelho *et al.*, 2014), debido a su papel esencial en la sensibilidad *in vivo* a MLF en *Leishmania*. Adicionalmente, los conocimientos sobre la estructura y función de su subunidad asociada LRos3 podrían también resultar de utilidad como marcador en el caso de producirse resistencia a MLF.

Cualquier mutación que sea capaz de inactivar el complejo de transporte de MLF, sea cual sea su efecto (alteraciones en el plegamiento o en el tráfico hacia la membrana plasmática, alteraciones importantes en algún dominio funcional de las proteínas, etc.), tendrá importantes y similares consecuencias en términos de resistencia a MLF.

El análisis llevado a cabo en esta tesis doctoral con una amplia gama de líneas del parásito ha permitido comprobar que existe una clara correlación entre la captación de MLF y la sensibilidad al fármaco, como ya se había observado anteriormente (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a; Sánchez-Cañete *et al.*, 2009) (Fig. 56).

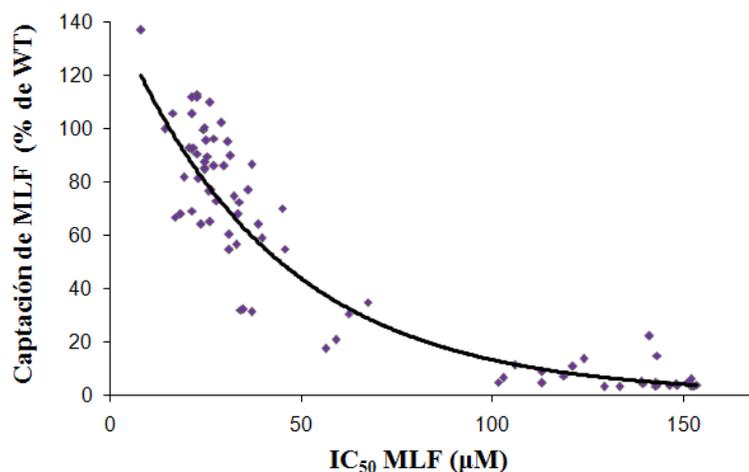


Figura 56. Correlación entre la captación de miltefosina (MLF) y los valores de IC_{50} en *L. infantum*. Cada punto representa una de las diferentes líneas usadas en esta tesis doctoral.

Hemos identificado mutaciones de *LiRos3* que conducen a niveles de resistencia a MLF similares a los que se obtienen al anular la expresión del complejo de transporte de MLF, ya sea por pérdida del transportador o por pérdida de su subunidad asociada. Esta resistencia se ha observado además tanto en promastigotes como en amastigotes intracelulares de *L. infantum*, y muestra cómo determinadas mutaciones de *LiRos3* pueden originar parásitos resistentes a MLF *in vitro*.

Sin embargo, cuando existe presión de MLF, es más probable que tenga lugar la inactivación de LiMT que la de LiRos3, posiblemente debido a que, aparte de que su tamaño es tres veces mayor, es de esperar que LiMT tenga más residuos implicados en la actividad catalítica, en el plegamiento de la proteína y/o en la interacción con LiRos3. De hecho, el número de aminoácidos conservados entre LiMT y otros miembros de las P4-ATPasas es mucho mayor que el que existe entre LiRos3 y otras proteínas Cdc50 (Pérez-Victoria *et al.*, 2006b). Además, de los resultados obtenidos en esta tesis se aprecia que incluso mutaciones en residuos altamente conservados en la familia Cdc50, no tienen por qué llevar aparejadas una pérdida sustancial de la actividad del complejo LiMT-LiRos3. La inactivación de la P4-ATPasa se ha observado en las líneas mutantes resistentes a MLF estudiadas anteriormente en nuestro laboratorio puesto que, de ocho líneas analizadas, solo una contenía mutaciones inactivantes en ambos alelos de *LdRos3*, e incluso esta línea tenía un alelo de *LdMT* inactivo (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a).

En un estudio realizado en los últimos años no se han encontrado mutaciones de *LiRos3* ni de su proteína homóloga de *L. major* al secuenciar el genoma de promastigotes obtenidos *in vitro* con alta resistencia a MLF (Coelho *et al.*, 2012). Tampoco se han encontrado polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) en el gen homólogo de un aislado clínico procedente de un paciente infectado con *L. amazonensis* que no había sido tratado previamente con MLF, pero del que se vio que presentaba menor sensibilidad al fármaco respecto a las líneas salvajes (Coelho *et al.*, 2014). Sin embargo, el número de líneas analizadas en estos dos estudios es muy reducido, por lo que no puede descartarse que puedan detectarse en un futuro mutaciones de *LRos3* en parásitos procedentes de aislados clínicos. De hecho, recientemente se ha demostrado en nuestro laboratorio que un aislado clínico de *L. infantum*, procedente de un paciente coinfectado con HIV con fallo terapéutico a MLF, es altamente resistente al fármaco debido a la delección de un nucleótido que conduce a la pérdida de expresión de *LiRos3* (manuscrito sometido a publicación).

En un reciente estudio proteómico realizado a partir de aislados clínicos sensibles y resistentes a MLF, no se han observado diferencias de expresión de ambas subunidades del complejo (Carnielli *et al.*, 2014). Sin embargo, no se puede descartar que los parásitos resistentes tuviesen alterado el complejo de transporte, puesto que el análisis proteómico no sería de utilidad para detectar las mutaciones estudiadas en esta tesis doctoral, que se ha comprobado que no afectan a la estabilidad y expresión total de *LiRos3*.

Por todo lo expuesto anteriormente, en la búsqueda de marcadores de resistencia, debe tenerse en consideración el análisis de la secuencia completa de los genes *LiMT* y *LiRos3* en aquellos aislados clínicos que presenten baja sensibilidad a MLF, para buscar la presencia de mutaciones en residuos importantes ya identificados o en otros que pudieran identificarse en futuros trabajos. Resulta evidente que no es suficiente buscar las mutaciones descritas hasta la fecha, como se ha hecho en algún trabajo (Bhandari *et al.*, 2012), sino que existen otras mutaciones que podrían producirse y dar como consecuencia la inactivación o la pérdida de función del complejo de transporte de MLF. Estos análisis podrían realizarse sobre las formas promastigotas, mucho más fáciles de cultivar que las amastigotas intracelulares, debido a que existe una clara correlación entre la sensibilidad a MLF de ambas, como se había observado anteriormente (Seifert *et al.*, 2007; Sánchez-Cañete *et al.*, 2009), y como se ha vuelto a confirmar durante esta tesis doctoral. Además, gracias a los anticuerpos específicos existentes frente a *LiMT* y *LiRos3* se podría dilucidar si los niveles de expresión de estas proteínas a nivel total o a nivel de la membrana plasmática están relacionados con la variabilidad en la sensibilidad a MLF y comprobar si el fallo terapéutico se debe a defectos en el sistema de transporte de MLF. No obstante, los anticuerpos disponibles no permiten desarrollar un sistema sencillo de diagnóstico, ya que no reconocen la proteína en condiciones nativas, por lo que sería de utilidad desarrollar anticuerpos monoclonales que sí fuesen capaces de hacerlo y que pudiesen emplearse para cuantificar estas proteínas a nivel de la membrana plasmática mediante citometría de flujo.

En el caso de que estos potenciales marcadores de resistencia permitan detectar la aparición de casos clínicos de verdadera resistencia, será necesario adoptar medidas tales como el empleo de fármacos o formulaciones alternativas, diseñar nuevos fármacos más eficaces (incluyendo aquellos que pudiesen restaurar el fenotipo de

sensibilidad a MLF, como posibles activadores de LiMT) y revisar las pautas de tratamiento con el objetivo de evitar la resistencia.

VI. Consideraciones finales y perspectivas

Los resultados de esta tesis doctoral proporcionan nuevos datos sobre el papel que determinados residuos de las proteínas Cdc50 desempeñan en el tráfico y en la actividad de los complejos que constituyen con las proteínas P4-ATPasas translocadoras de fosfolípidos.

El modelo que se ha empleado cumple con las características que se han descrito como ideales para evaluar el efecto que tienen las mutaciones sobre la actividad de las P4-ATPasas (Stone *et al.*, 2012):

- 1) Actividad y especificidad del transportador bien caracterizadas (Pérez-Victoria *et al.*, 2003b y 2006a).
- 2) Interacción con la subunidad beta bien caracterizada (Pérez-Victoria *et al.*, 2006a; Sánchez-Cañete *et al.*, 2009; Weingärtner *et al.*, 2010).
- 3) Ensayos robustos para medir cambios en estas características.

Por tanto, la caracterización de la subunidad LiRos3 podría ser de gran utilidad para el estudio en otros organismos del mecanismo de transporte mediado por las P4-ATPasas, ya que la mayoría de los residuos estudiados están conservados en todas las proteínas Cdc50 de levaduras y humanos. Entre estas aplicaciones, debido a su relevancia en el ámbito sanitario, podría destacarse el análisis molecular del mecanismo por el que se desarrolla la colestasis intrahepática familiar progresiva (PFIC), una enfermedad que está asociada a mutaciones en la P4-ATPasa humana ATP8B1, y que se ha estudiado recientemente realizando mutaciones en la proteína homóloga Dnf2p de levaduras (Stone *et al.*, 2012).

Por otro lado, debe tenerse en cuenta que las numerosas mutaciones que se han identificado afectan al sistema de transporte de MLF en *Leishmania*, implicando la generación de parásitos resistentes al fármaco. Debido al elevado empleo de este fármaco en el tratamiento de la leishmaniasis y al creciente descenso en su tasa de eficacia, es urgente adoptar medidas para frenar la posible aparición y propagación de resistencias a la MLF. Ante la necesidad de desarrollar marcadores de resistencia para monitorizar estos fenómenos, los resultados de esta tesis doctoral indican que el análisis de la secuencia del gen *LiRos3* podría ser una buena herramienta. Los residuos importantes que se han identificado deberán tenerse en cuenta, ya que la existencia de mutaciones en los mismos podría ser indicativa de resistencia a MLF.



1. Se han generado promastigotes de *Leishmania infantum* mutantes nulos para el gen *LiRos3*, que se caracterizan por poseer una elevada resistencia a miltefosina debido a un importante defecto en la internalización del fármaco.
2. Existen 22 residuos invariables en las proteínas Cdc50 de *L. infantum*, humanos y levaduras. Mutaciones no conservativas en ocho de estos residuos, localizados en el lazo exoplasmático de LiRos3, reducen drásticamente la interacción con LiMT y el tráfico del complejo de transporte de miltefosina hacia la membrana plasmática. La sustitución de otros residuos invariables afecta en menor grado al tráfico del complejo.
3. Se han identificado mutaciones en cuatro residuos localizados en el dominio N-terminal de LiRos3 y dos residuos del lazo exoplasmático que conllevan una reducción en la actividad flipasa llevada a cabo por el complejo de transporte de miltefosina.
4. Una N-glicosilación parcial de LiRos3 supone un descenso en el transporte de miltefosina, mientras que un estado de total N-desglicosilación impide la correcta expresión del complejo LiMT-LiRos3 en la membrana plasmática de *L. infantum*.
5. Los dominios amino y carboxilo terminal de LiRos3 no son esenciales para la interacción con LiMT, pero sí se requieren para que el complejo se pueda expresar en la membrana plasmática del parásito.
6. Se han caracterizado diversas proteínas quiméricas constituidas por dominios de LiRos3 asociados con dominios de las otras proteínas Cdc50 de *L. infantum*: LiRos1 y LiRos2. Solamente la sustitución de los dominios amino terminal, primer transmembrana y carboxilo terminal de LiRos3 por los de LiRos1 genera proteínas funcionales. El intercambio de los dos primeros conlleva además una ganancia de función.
7. El intercambio del segundo dominio transmembrana o del dominio exoplasmático de LiRos3 por los correspondientes dominios de LiRos1 y LiRos2 resulta en una pérdida de la interacción con LiMT. Han de existir otros residuos aún no identificados en los dominios transmembrana y exoplasmático de LiRos3 necesarios para mantener la estabilidad del complejo.
8. La deficiencia en el tráfico de LiMT a la membrana plasmática lleva asociada una reducción en los niveles de expresión de la proteína.
9. El estudio de la sensibilidad a miltefosina en formas amastigotas intracelulares de *L. infantum* sugiere que el efecto de las modificaciones de LiRos3 es independiente de la fase del ciclo de vida del parásito, así como de cambios de temperatura o fisiológicos de su entorno. En su conjunto, estos resultados ponen de manifiesto la utilidad de LiRos3 como marcador de resistencia a miltefosina.



BIBLIOGRAFÍA

- Abe, K., Tani, K., Nishizawa, T. y Fujiyoshi, Y. (2009) Inter-subunit interaction of gastric H⁺,K⁺-ATPase prevents reverse reaction of the transport cycle. *EMBO J.* **28**:1637–1643.
- Alexander, J., Satoskar, A. R. y Russell, D. G. (1999) *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. *J. Cell. Sci.* **112 Pt 18**:2993-3002.
- Alrajhi, A. A., Ibrahim, E. A., De Vol, E. B., Khairat, M., Faris, R. M. y Maguire, J. H. (2002) Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *N. Engl. J. Med.* **346**:891-895.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., y Lipman, D. J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**:3389-3402.
- Alvar, J., Cañavate, C., Molina, R., Moreno, J. y Nieto, J. (2004) Canine leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* **57**:1-88.
- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Cañavate, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Ter Horst, R., López-Vélez, R y Moreno, J. (2008). The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**:334-359.
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M. y el Equipo de Control de la Leishmaniasis de la OMS. (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* **7**:e35671.
- Alzate, J. F., Arias, A., Mollinedo, F., Rico, E., de la Iglesia-Vicente, J. y Jiménez-Ruiz, A. (2008) Edelfosine induces an apoptotic process in *Leishmania infantum* that is regulated by the ectopic expression of Bcl-XL and Hrk. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:3779-3782.
- Anderson, J. B. (2005) Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:547-556.
- Andrade, H. M., Toledo, V. P., Pinheiro, M. B., Guimarães, T. M., Oliveira, N. C., Castro, J. A., Silva, R. N., Amorim, A. C., Brandão, R. M., Yoko, M., Silva, A. S., Dumont, K., Ribeiro, M. L. Jr., Bartchewsky, W. y Monte, S. J. (2011) Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. *Vet. Parasitol.* **181**:83-90.
- Ansari, I. U., Longacre, M. J., Paulusma, C. C., Stoker, S. W., Kendrick, M. A. y MacDonald, M. J. (2015) Characterization of P4 ATPase Phospholipid Translocases (Flippases) in Human and Rat Pancreatic Beta Cells: Their Gene Silencing Inhibits Insulin Secretion. *J. Biol. Chem.* **290**:23110-23123.
- Arango Duque, G. y Descoteaux, A. (2015) *Leishmania* survival in the macrophage: where the ends justify the means. *Curr. Opin. Microbiol.* **26**:32-40.
- Araújo-Santos, J. M., Gamarro, F., Castanys, S., Herrmann, A. y Pomorski, T. (2003) Rapid transport of phospholipids across the plasma membrane of *Leishmania infantum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**:250-255.

- Araújo-Santos, J. M., Parodi-Talice, A., Castanys, S. y Gamarro, F. (2005) The overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in *Leishmania*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **330**:349-355.
- Arce, A., Estirado, A., Ordobas, M., Sevilla, S., García, N., Moratilla, L., de la Fuente, S., Martínez, A. M., Pérez, A. M., Aránguez, E., Iriso, A., Sevillano, O., Bernal, J. y Vilas, F. (2013) Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* **18**:20546.
- Arrebola, R., Olmo, A., Reche, P., Garvey, E. P., Santi, D. V., Ruiz-Pérez, L. M. y González-Pacanowska, D. (1994) Isolation and characterization of a mutant dihydrofolate reductase-thymidylate synthase from methotrexate-resistant *Leishmania* cells. *J. Biol. Chem.* **269**:10590-10596.
- Ashutosh, Sundar, S. y Goyal, N. (2007) Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J. Med. Microbiol.* **56**:143-153.
- Azouaoui, H., Montigny, C., Ash, M. R., Fijalkowski, F., Jacquot, A., Grønberg, C., López-Marqués, R. L., Palmgren, M. G., Garrigos, M., le Maire, M., Decottignies, P., Gourdon, P., Nissen, P., Champeil, P. y Lenoir, G. (2014) A high-yield co-expression system for the purification of an intact Drs2p-Cdc50p lipid flippase complex, critically dependent on and stabilized by phosphatidylinositol-4-phosphate. *PLoS One.* **9**:e112176.
- Baekgaard, L., Fuglsang, A. T. y Palmgren, M. G. (2005) Regulation of plant plasma membrane H⁺- and Ca²⁺-ATPases by terminal domains. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**:369-374.
- Balaña-Fouce, R., Reguera, R. M., Cubría, J. C. y Ordóñez, D. (1998) The pharmacology of leishmaniasis. *Gen. Pharmacol.* **30**:435-443.
- Baldrige, R. D. y Graham, T. R. (2012) Identification of residues defining phospholipid flippase substrate specificity of type IV P-type ATPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**:E290–E298.
- Baldrige, R. D. y Graham, T. R. (2013) Two-gate mechanism for phospholipid selection and transport by type IV P-type ATPases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**:E358-367.
- Baldrige, R. D., Xu, P. y Graham, T. R. (2013) Type IV P-type ATPases distinguish mono- versus diacyl phosphatidylserine using a cytofacial exit gate in the membrane domain. *J. Biol. Chem.* **288**:19516-19527.
- Baneth, G. y Shaw, S. E. (2002) Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet. Parasitol.* **106**:315-324.
- Banjara, M. R., Hirve, S., Siddiqui, N. A., Kumar, N., Kansal, S., Huda, M. M., Das, P., Rijal, S., Gurung, C. K., Malaviya, P., Arana, B., Kroeger, A. y Mondal, D. (2012) Visceral leishmaniasis clinical management in endemic districts of India, Nepal, and Bangladesh. *J. Trop. Med.* **2012**:126093.

-
- Bañuls, A. L., Hide, M. y Prugnolle, F. (2007) *Leishmania* and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv. Parasitol.* **64**:1-109.
- Barr, S. D. y Gedamu, L. (2001) Cloning and characterization of three differentially expressed peroxidoxin genes from *Leishmania chagasi*. Evidence for an enzymatic detoxification of hydroxyl radicals. *J. Biol. Chem.* **276**:34279-34287.
- Barr, S. D. y Gedamu, L. (2003) Role of peroxidoxins in *Leishmania chagasi* survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress. *J. Biol. Chem.* **278**:10816-10823.
- Barratt, G., Saint-Pierre-Chazalet, M. y Loiseau, P.M. (2009) Cellular transport and lipid interactions of miltefosine. *Curr. Drug Metab.* **10**:247-255.
- Basselin, M., Denise, H., Coombs, G. H. y Barrett, M. P. (2002) Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:3731-3738.
- Beere, H. M. (2004) "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J. Cell. Sci.* **117**:2641-2651.
- Beggah, A., Mathews, P., Beguin, P. y Geering, K. (1996) Degradation and endoplasmic reticulum retention of unassembled alpha- and beta-subunits of Na,K-ATPase correlate with interaction of BiP. *J. Biol. Chem.* **271**:20895-20902.
- Béguin, P., Wang, X., Firsov, D., Puoti, A., Claeys, D., Horisberger, J. D. y Geering, K. (1997) The gamma subunit is a specific component of the Na,K-ATPase and modulates its transport function. *EMBO. J.* **16**:4250-4260.
- Berg, M., García-Hernández, R., Cuypers, B., Vanaerschot, M., Manzano, J. I., Poveda, J. A., Ferragut, J. A., Castanys, S., Dujardin, J. C. y Gamarro, F. (2015) Experimental resistance to drug combinations in *Leishmania donovani*: Metabolic and phenotypic adaptations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**:2242-2255.
- Berman, J. J. (2008) Treatment of leishmaniasis with miltefosine: 2008 status. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **4**:1209-1216.
- Beverley, S. M., Coderre, J. A., Santi, D. V. y Schimke, R. T. (1984) Unstable DNA amplifications in methotrexate-resistant *Leishmania* consist of extrachromosomal circles which relocalize during stabilization. *Cell.* **38**:431-439.
- Bevers, E. M. y Williamson, P. L. (2010) Phospholipid scramblase: an update. *FEBS Lett.* **584**:2724-2730.
- Bhandari, V., Kulshrestha, A., Deep, D. K., Stark, O., Prajapati, V. K., Ramesh, V., Sundar, S., Schonian, G., Dujardin, J. C. y Salotra, P. (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.

- Bhandari, V., Sundar, S., Dujardin, J. C. y Salotra, P. (2014) Elucidation of cellular mechanisms involved in experimental paromomycin resistance in *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**:2580-2585.
- Bhardwaj, S., Srivastava, N., Sudan, R. y Saha, B. (2010) *Leishmania* interferes with host cell signaling to devise a survival strategy. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**:109189.
- Bhattacharya, S. K., Jha, T. K., Sundar, S., Thakur, C. P., Engel, J., Sindermann, H., Junge, K., Karbwang, J., Bryceson, A. D. y Berman, J. D. (2004) Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India. *Clin. Infect. Dis.* **38**:217-221.
- Bhattacharya, S. K., Sinha, P. K., Sundar, S., Thakur, C. P., Jha, T. K., Pandey, K., Das, V. R., Kumar, N., Lal, C., Verma, N., Singh, V. P., Ranjan, A., Verma, R. B., Anders, G., Sindermann, H. y Ganguly, N. K. (2007) Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* **196**:591-598.
- Bogdan, C. (2008) Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. *Cell. Microbiol.* **10**:1221-1234.
- Brachwitz, H. y Vollgraf, C. (1995) Analogs of alkyllysophospholipids: chemistry, effects on the molecular level and their consequences for normal and malignant cells. *Pharmacol. Ther.* **66**:39-82.
- Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- Breiser, A., Kim, D. J., Fleer, E. A., Damenz, W., Drube, A., Berger, M., Nagel, G. A., Eibl, H. y Unger, C. (1987) Distribution and metabolism of hexadecylphosphocholine in mice. *Lipids.* **22**:925-926.
- Brittingham, A. y Mosser, D. M. (1996) Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol. Today.* **12**:444-447.
- Brotherton, M. C., Bourassa, S., Légaré, D., Poirier, G. G., Droit, A. y Ouellette, M. (2014) Quantitative proteomic analysis of amphotericin B resistance in *Leishmania infantum*. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* **4**:126-132.
- Bryceson, A. (2001) A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. *Trop. Med. Int. Health.* **6**:928-934.
- Bryde, S., Hennrich, H., Verhulst, P. M., Devaux, P. F., Lenoir, G. y Holthuis, J. C. (2010) CDC50 proteins are critical components of the human class-1 P4-ATPase transport machinery. *J. Biol. Chem.* **285**:40562-40572.
- Bublitz, M., Poulsen, H., Morth, J. P. y Nissen, P. (2010) In and out of the cation pumps: P-type ATPase structure revisited. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**:431-439.
- Bublitz, M., Morth, J. P. y Nissen, P. (2011) P-type ATPases at a glance. *J. Cell. Sci.* **124**:2515-2519.

-
- Bull, L. N., van Eijk, M. J., Pawlikowska, L., DeYoung, J. A., Juijn, J. A., Liao, M., Klomp, L. W., Lomri, N., Berger, R., Scharschmidt, B. F., Knisely, A. S., Houwen, R. H., Freimer, N. B. (1998) A gene encoding a P-type ATPase mutated in two forms of hereditary cholestasis. *Nat Genet.* **18**:219–224.
- Cabrera-Serra, M. G., Lorenzo-Morales, J., Romero, M., Valladares, B. y Piñero, J. E. (2007) In vitro activity of perifosine: a novel alkylphospholipid against the promastigote stage of *Leishmania* species. *Parasitol. Res.* **100**:1155-1157.
- Cabrera-Serra, M. G., Valladares, B. y Piñero, J. E. (2008) In vivo activity of perifosine against *Leishmania amazonensis*. *Acta Trop.* **108**:20-25.
- Calvopina, M., Gómez, E. A., Sindermann, H., Cooper, P. J. y Hashiguchi, Y. (2006) Relapse of new world diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) mexicana* after miltefosine treatment. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**:1074-1077.
- Campbell, D. A., Thomas, S. y Sturm, N. R. (2003) Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect.* **5**:1231-1240.
- Canuto, G. A., Castilho-Martins, E. A., Tavares, M. F., Rivas, L., Barbas, C. y López-González, Á. (2014) Multi-analytical platform metabolomic approach to study miltefosine mechanism of action and resistance in *Leishmania*. *Anal. Bioanal. Chem.* **406**:3459-3476.
- Carnielli, J. B., de Andrade, H. M., Pires, S. F., Chapeaurouge, A. D., Perales, J., Monti-Rocha, R., Carvalho, S. F., Ribeiro, L. P., Dietze, R., Figueiredo, S. G. y Lemos, E. M. (2014) Proteomic analysis of the soluble proteomes of miltefosine-sensitive and -resistant *Leishmania infantum chagasi* isolates obtained from Brazilian patients with different treatment outcomes. *J. Proteomics.* **108**:198-208.
- Carrasco, M. P., Jiménez-López, J. M., Segovia, J. L. y Marco, C. (2008) Hexadecylphosphocholine interferes with the intracellular transport of cholesterol in HepG2 cells. *FEBS J.* **275**:1675-1686.
- Castanys-Muñoz, E., Alder-Baerens, N., Pomorski, T., Gamarro, F. y Castanys, S. (2007) A novel ATP-binding cassette transporter from *Leishmania* is involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids. *Mol. Microbiol.* **64**:1141-1153.
- Castanys-Muñoz, E., Pérez-Victoria, J. M., Gamarro, F. y 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.
- Castillo, E., Dea-Ayuela, M. A., Bolás-Fernández, F., Rangel, M. y González-Rosende, M. E. (2010) The kinetoplastid chemotherapy revisited: current drugs, recent advances and future perspectives. *Curr. Med. Chem.* **17**:4027-4051.
- Castro, H. y Tomás, A. M. (2008) Peroxidases of trypanosomatids. *Antioxid. Redox Signal.* **10**:1593-1606.

- Cecílio, P., Pérez-Cabezas, B., Santarém, N., Maciel, J., Rodrigues, V. y Cordeiro da Silva, A. (2014) Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. *Front. Immunol.* **5**:480.
- Chakrabandhu, K., Huault, S. y Hueber, A. O. (2008) Distinctive molecular signaling in triple-negative breast cancer cell death triggered by hexadecylphosphocholine (miltefosine). *FEBS Lett.* **582**:4176-4184.
- Chantalat, S., Park, S. K., Hua, Z., Liu, K., Gobin, R., Peyroche, A., Rambourg, A., Graham, T. R. y Jackson, C. L. (2004) The Arf activator Gea2p and the P-type ATPase Drs2p interact at the Golgi in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Sci.* **117**:711–722.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J. y Boelaert, M. (2007) Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* **5**:873-882.
- Charmoy, M., Auderset, F., Allenbach, C. y Tacchini-Cottier, F. (2010) The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**:719361.
- Chávez-Fumagalli, M. A., Ribeiro, T. G., Castilho, R. O., Fernandes, S. O., Cardoso, V. N., Coelho, C. S., Mendonça, D. V., Soto, M., Tavares, C. A., Faraco, A. A. y Coelho, E. A. (2015) New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **48**:235-242.
- Chen, C. Y., Ingram, M. F., Rosal, P. H. y Graham, T.R. (1999) Role for Drs2p, a P-type ATPase and potential aminophospholipid translocase, in yeast late Golgi function. *J. Cell Biol.* **147**:1223-1236.
- Chen, S., Wang, J., Muthusamy, B. P., Liu, K., Zare, S., Andersen, R. J. y Graham, T. R. (2006) Roles for the Drs2p–Cdc50p complex in protein transport and phosphatidylserine asymmetry of the yeast plasma membrane. *Traffic* **7**:1503-1517.
- Chen, R., Brady, E. y McIntyre, T. M. (2011) Human TMEM30a promotes uptake of antitumor and bioactive choline phospholipids into mammalian cells. *J. Immunol.* **186**:3215-3225.
- Choudhury, K., Zander, D., Kube, M., Reinhardt, R. y Clos, J. (2008) Identification of a *Leishmania infantum* gene mediating resistance to miltefosine and SbIII. *Int. J. Parasitol.* **38**:1411-1423.
- Clayton, C. y Shapira, M. (2007) Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. *Mol. Biochem. Parasitol.* **156**:93-101.
- ClinicalTrials.gov. (2015) Prophylaxis of visceral leishmaniasis relapses in HIV co-infected patients with pentamidine: a cohort study (NCT01360762). <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01360762> (Último acceso: octubre 2015).
- Coelho, A. C., Messier, N., Ouellette, M. y Cotrim, P. C. (2007) Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania* amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:3030-3032.

-
- Coelho, A. C., Boisvert, S., Mukherjee, A., Leprohon, P., Corbeil, J. y Ouellette, M. (2012) Multiple mutations in heterogeneous miltefosine-resistant *Leishmania major* population as determined by whole genome sequencing. PLoS Negl. Trop. Dis. **6**:e1512.
- Coelho, A. C., Trinconi, C. T., Costa, C. H. y Uliana, S. R. (2014) *In vitro* and *in vivo* miltefosine susceptibility of a *Leishmania amazonensis* isolate from a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis. PLoS Negl. Trop. Dis. **8**:e2999.
- Cojean, S., Houzé, S., Haouchine, D., Huteau, F., Lariven, S., Hubert, V., Michard, F., Bories, C., Pratlong, F., Le Bras, J., Loiseau, P. M. y Matheron, S. (2012) *Leishmania* resistance to miltefosine associated with genetic marker. Emerg. Infect. Dis. **18**:704-706.
- Coleman, J. A., Kwok, M. C. y Molday, R. S. (2009) Localization, purification, and functional reconstitution of the P4-ATPase Atp8a2, a phosphatidylserine flippase in photoreceptor disc membranes. J. Biol. Chem. **284**:32670–32679.
- Coleman, J. A. y Molday, R. S. (2011) Critical role of the β -subunit CDC50A in the stable expression, assembly, subcellular localization, and lipid transport activity of the P4-ATPase ATP8A2. J. Biol. Chem. **286**:17205–17216.
- Coleman, J. A., Vestergaard, A. L., Molday, R. S., Vilsen, B. y Andersen, J. P. (2012) Critical role of a transmembrane lysine in aminophospholipid transport by mammalian photoreceptor P4-ATPase ATP8A2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **109**:1449–1454.
- Coleman, J. A., Quazi, F. y Molday, R. S. (2013) Mammalian P4-ATPases and ABC transporters and their role in phospholipid transport. Biochim. Biophys. Acta. **1831**:555–574.
- Colotti, G. y Ilari, A. (2011) Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. Amino Acids. **40**:269-285.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. y Deléage, G. (2000) NPS@: network protein sequence analysis. Trends Biochem. Sci. **25**:147-150.
- Cortés-Selva, F., Campillo, M., Reyes, C. P., Jiménez, I. A., Castanys, S., Bazzocchi, I. L., Pardo, L., Gamarro, F. y Ravelo, A. G. (2004) 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. **47**:576-587.
- Croft, S. L., Neal, R. A., Pendergast, W. y Chan, J. H (1987). The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. Biochem. Pharmacol. **36**:2633-2636.
- Croft, S. L., Seifert, K. y Duchêne, M. (2003) Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. Mol. Biochem. Parasitol. **126**:165-172.
- Croft, S. L. y Coombs, G. H. (2003) Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. Trends Parasitol. **19**:502-508.

- Croft, S. L. y Engel, J. (2006) Miltefosine--discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100** Suppl 1:S4–8.
- Croft, S. L., Sundar, S. y Fairlamb, A. H. (2006) Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**:111-126.
- Croft, S. L. (2008) Kinetoplastida: new therapeutic strategies. *Parasite.* **15**:522-527.
- Cruz, I., Morales, M. A., Noguera, I., Rodríguez, A. y Alvar, J. (2002) *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet.* **359**:1124-1125.
- Cummings, H. E., Barbi, J., Reville, P., Oghumu, S., Zorko, N., Sarkar, A., Keiser, T. L., Lu, B., Rückle, T., Varikuti, S., Lezama-Davila, C., Wewers, M. D., Whitacre, C., Radzioch, D., Rommel, C., Seveau, S. y Satoskar, A. R. (2012) Critical role for phosphoinositide 3-kinase gamma in parasite invasion and disease progression of cutaneous leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**:1251-1256.
- Cunningham, A. C. (2002) Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp. Mol. Pathol.* **72**:132-141.
- Cupolillo, E., Medina-Acosta, E., Noyes, H., Momen, H. y Grimaldi, G. Jr. (2000) A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol. Today.* **16**:142-144.
- Daleke, D. L. (2007) Phospholipid flippases. *J. Biol. Chem.* **282**:821-825.
- Das, M., Saudagar, P., Sundar, S. y Dubey, V. K. (2013) Miltefosine-unresponsive *Leishmania donovani* has a greater ability than miltefosine-responsive *L. donovani* to resist reactive oxygen species. *FEBS J.* **280**:4807-4815.
- Davies, C. R., Reithinger, R., Campbell-Lendrum, D., Feliciangeli, D., Borges, R. y Rodriguez, N. (2000) The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cad. Saude Publica.* **16**:925-950.
- de Morais, C. G., Castro Lima, A. K., Terra, R., Dos Santos, R. F., Da-Silva, S. A. y Dutra, P. M. (2015) The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. *Biomed. Res. Int.* **2015**:324915.
- Delgado-Méndez, P., Herrera, N., Chávez, H., Estévez-Braun, A., Ravelo, A. G., Cortes, F., Castanys, S. y Gamarro, F. (2008) New terpenoids from *Maytenus apurimacensis* as MDR reversal agents in the parasite *Leishmania*. *Bioorg. Med. Chem.* **16**:1425-1430.
- Dempski, R. E., Friedrich, T. y Bamberg, E. (2005) The beta subunit of the Na⁺/K⁺-ATPase follows the conformational state of the holoenzyme. *J. Gen. Physiol.* **125**:505-520.
- den Boer, M. L., Alvar, J., Davidson, R. N., Ritmeijer, K. y Balasegaram, M. (2009) Developments in the treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Opin. Emerg. Drugs.* **14**:395-410.
- Denmeade, S. R., Mhaka, A. M., Rosen, D. M., Brennen, W. N., Dalrymple, S., Dach, I., Olesen, C., Gurel, B., Demarzo, A. M., Wilding, G., Carducci, M. A., Dionne, C. A.,

Moller, J. V., Nissen, P., Christensen, S. B. y Isaacs, J. T. (2012) Engineering a prostate-specific membrane antigen-activated tumor endothelial cell prodrug for cancer therapy. *Sci. Transl. Med.* **4**:140ra186.

- Devaux, P. F., Herrmann, A., Ohlwein, N. y Kozlov, M. M. (2008) How lipid flippases can modulate membrane structure. *Biochim. Biophys. Acta.* **1778**:1591-1600.

- Dorlo, T. P. y Kager, P. A. (2008a) Pentamidine dosage: a base/salt confusion. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2**:e225.

- Dorlo, T. P., van Thiel, P. P., Huitema, A. D., Keizer, R. J., de Vries, H. J., Beijnen, J. H. y de Vries, P. J. (2008b) Pharmacokinetics of miltefosine in Old World cutaneous leishmaniasis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:2855-2860.

- Dorlo, T. P., van Thiel, P. P., Schoone, G. J., Stienstra, Y., van Vugt, M., Beijnen, J. H. y de Vries, P. J. (2011) Dynamics of parasite clearance in cutaneous leishmaniasis patients treated with miltefosine. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**:e1436.

- Dorlo, T. P., Balasegaram, M., Beijnen, J. H. y de Vries, P. J. (2012a) Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**:2576-2597.

- Dorlo, T. P., Balasegaram, M., Lima, M. A., de Vries, P. J., Beijnen, J. H. y Huitema, A. D. (2012b) Translational pharmacokinetic modelling and simulation for the assessment of duration of contraceptive use after treatment with miltefosine. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**:1996-2004.

- Dorlo, T. P., Huitema, A. D., Beijnen, J. H. y de Vries P. J. (2012c) Optimal dosing of miltefosine in children and adults with visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**:3864-3872.

- Dorlo, T. P., Rijal, S., Ostyn, B., de Vries, P. J., Singh, R., Bhattarai, N., Uranw, S., Dujardin, J. C., Boelaert, M., Beijnen, J. H. y Huitema, A.D. (2014) Failure of miltefosine in visceral leishmaniasis is associated with low drug exposure. *J. Infect. Dis.* **210**:146-153.

- Dürr, K. L., Tavraz, N. N., Dempski, R. E., Bamberg, E. y Friedrich, T. (2009) Functional significance of E2 state stabilization by specific alpha/beta-subunit interactions of Na,K- and H,K-ATPase. *J. Biol. Chem.* **284**:3842-3854.

- Dutta, S., Furuyama, K., Sassa, S. y Chang, K. P. (2008) *Leishmania* spp.: delta-aminolevulinic acid-inducible neogenesis of porphyria by genetic complementation of incomplete heme biosynthesis pathway. *Exp. Parasitol.* **118**:629-636.

- Edwards, T., Omollo, R., Khalil, E. A., Yifru, S., Musa, B., Musa, A., Wasunna, M., Smith, P. G., Royce, C., Ellis, S., Balasegaram, M. y Hailu, A. (2011) Single-dose liposomal amphotericin B (AmBisome[®]) for the treatment of visceral leishmaniasis in East Africa: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* **12**:66.

- Ekberg, K., Palmgren, M. G., Veierskov, B. y Buch-Pedersen, M. J. (2010) A novel mechanism of P-type ATPase autoinhibition involving both termini of the protein. *J. Biol. Chem.* **285**:7344-7350.

- Ellenberger, T. E. y Beverley, S. M. (1989) Multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. J. Biol. Chem. **264**:15094-15103.
- Engel, J. (2002) Miltefosine, the story of a successful partnership: disease endemic country–TDR–pharmaceutical industry (Zentaris). TDR News. **68**:5.
- Eppens, E. F., van Mil, S. W., de Vree, J. M., Mok, K. S., Juijn, J. A., Oude Elferink, R. P., Berger, R., Houwen, R. H. y Klomp, L. W. (2001) FIC1, the protein affected in two forms of hereditary cholestasis, is localized in the cholangiocyte and the canalicular membrane of the hepatocyte. J. Hepatol. **35**:436-443.
- Escobar, P., Yardley, V. y Croft, S. L. (2001) Activities of hexadecylphosphocholine (miltefosine), AmBisome, and sodium stibogluconate (Pentostam) against *Leishmania donovani* in immunodeficient scid mice. Antimicrob. Agents Chemother. **45**:1872-1875.
- Escobar, P., Matu, S., Marques, C. y Croft, S. L. (2002) Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. Acta Trop. **81**:151-157.
- Eue, I. (2002) Hexadecylphosphocholine selectively upregulates expression of intracellular adhesion molecule-1 and class I major histocompatibility complex antigen in human monocytes. J. Exp. Ther. Oncol. **2**:333-336.
- Farca, A. M., Miniscalco, B., Badino, P., Odore, R., Monticelli, P., Trisciuglio, A. y Ferroglio, E. (2012) Canine leishmaniosis: in vitro efficacy of miltefosine and marbofloxacin alone or in combination with allopurinol against clinical strains of *Leishmania infantum*. Parasitol. Res. **110**:2509-2513.
- Faria, M. S., Reis, F. C., Azevedo-Pereira, R. L., Morrison, L. S., Mottram, J. C. y Lima, A. P. (2011) *Leishmania* inhibitor of serine peptidase 2 prevents TLR4 activation by neutrophil elastase promoting parasite survival in murine macrophages. J. Immunol. **186**:411-422.
- Faulde, M., Schrader, J., Heyl, G. y Amirih, M. (2008) Differences in transmission seasons as an epidemiological tool for characterization of anthroponotic and zoonotic cutaneous leishmaniasis in northern Afghanistan. Acta Trop. **105**:131-138.
- Feinberg, A. P. y Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 1983 **132**:6-13.
- Fernández, M. M., Malchiodi, E. L. y Algranati, I. D. (2011) Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells. Antimicrob. Agents Chemother. **55**:86-93.
- Folgueira, C. y Requena, J. M. (2007) A postgenomic view of the heat shock proteins in kinetoplastids. FEMS Microbiol. Rev. **31**:359-377.
- Folmer, D. E., Elferink, R. P. y Paulusma, C. C. (2009) P4 ATPases - lipid flippases and their role in disease. Biochim. Biophys. Acta. **1791**:628-635.

-
- Folmer, D. E., Mok, K. S., de Wee, S. W., Duijst, S., Hiralall, J. K., Seppen, J., Oude Elferink, R. P. y Paulusma, C. C. (2012) Cellular localization and biochemical analysis of mammalian CDC50A, a glycosylated β -subunit for P4 ATPases. *J. Histochem. Cytochem.* **60**:205-218.
- Forestier, C. L., Gao, Q. y Boons, G. J. (2015) *Leishmania* lipophosphoglycan: how to establish structure-activity relationships for this highly complex and multifunctional glycoconjugate? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**:193.
- Fraga, J., Montalvo, A. M., De Doncker, S., Dujardin, J. C. y Van der Auwera, G. (2010) Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect. Genet. Evol.* **10**:238-245.
- Fraga, J., Montalvo, A. M., Van der Auwera, G., Maes, I., Dujardin, J. C. y Requena, J. M. (2013) Evolution and species discrimination according to the *Leishmania* heat-shock protein 20 gene. *Infect. Genet. Evol.* **18**:229-237.
- Furuta, N., Fujimura-Kamada, K., Saito, K., Yamamoto, T. y Tanaka, K. (2007) Endocytic recycling in yeast is regulated by putative phospholipid translocases and the Ypt31p/32p-Rcy1p pathway. *Mol. Biol. Cell.* **18**:295-312.
- Gall, W. E., Geething, N. C., Hua, Z., Ingram, M. F., Liu, K., Chen, S. I. y Graham, T. R. (2002) Drs2p-dependent formation of exocytic clathrin-coated vesicles in vivo. *Curr. Biol.* **12**:1623-1627.
- Gamarro, F., Sánchez-Cañete, M. P. y Castanys, S. (2013). Mechanisms of miltefosine resistance in *Leishmania*. Capítulo del libro "Drug Resistance in *Leishmania* Parasites". Ed. Springer. ISBN 978-3-7091-1125-3.
- Gangalum, P. R., de Castro, W., Vieira, L. Q., Dey, R., Rivas, L., Singh, S., Majumdar, S. y Saha, B. (2015) Platelet-activating factor receptor contributes to antileishmanial function of miltefosine. *J. Immunol.* **194**:5961-5967.
- García-Hernández, R., Manzano, J. I., Castanys, S. y Gamarro, F. (2012) *Leishmania donovani* develops resistance to drug combinations. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**:e1974.
- García-Hernández, R., Gómez-Pérez, V., Castanys, S. y Gamarro, F. (2015) Fitness of *Leishmania donovani* parasites resistant to drug combinations. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**:e0003704.
- Garg, R. y Tremblay, M. J. (2012) Miltefosine represses HIV-1 replication in human dendritic cell/T-cell cocultures partially by inducing secretion of type-I interferon. *Virology.* **432**:271-276.
- Geering, K. (2001) The functional role of beta subunits in oligomeric P-type ATPases. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**:425-438.
- Geering, K. (2005) Function of FXYD proteins, regulators of Na, K-ATPase. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**:387-392.
- Geering, K. (2008) Functional roles of Na,K-ATPase subunits. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **17**: 526-532.

- Getachew, F. y Gedamu, L. (2012) *Leishmania donovani* mitochondrial iron superoxide dismutase A is released into the cytosol during miltefosine induced programmed cell death. *Mol. Biochem. Parasitol.* **183**:42-51.
- Gil-Prieto, R., Walter, S., Alvar, J. y de Miguel, A. G. (2011) Epidemiology of leishmaniasis in Spain based on hospitalization records (1997-2008). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **85**:820-825.
- Gomes, R. A., Sousa Silva, M., Vicente Miranda, H., Ferreira, A. E., Cordeiro, C. A. y Freire, A. P. (2005) Protein glycation in *Saccharomyces cerevisiae*. Argpyrimidine formation and methylglyoxal catabolism. *FEBS J.* **272**:4521-4531.
- Gómez-Pérez, V., Manzano, J. I., García-Hernández, R., Castanys, S., Campos Rosa, J. M. y Gamarro, F. 4-amino bis-pyridinium derivatives as novel antileishmanial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**:4103-4112.
- González, U., Pinart, M., Reveiz, L., Rengifo-Pardo, M., Tweed, J., Macaya, A. y Alvar, J. (2010) Designing and reporting clinical trials on treatments for cutaneous leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* **51**:409-419.
- Goren, M. A., Morizumi, T., Menon, I., Joseph, J. S., Dittman, J. S., Cherezov, V., Stevens, R. C., Ernst, O. P. y Menon, A. K. (2014) Constitutive phospholipid scramblase activity of a G protein-coupled receptor. *Nat. Commun.* **5**:5115.
- Griewank, K., Gazeau, C., Eichhorn, A. y von Stebut, E. (2010) Miltefosine efficiently eliminates *Leishmania major* amastigotes from infected murine dendritic cells without altering their immune functions. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:652-659.
- Gualdrón-López, M., Brennand, A., Hannaert, V., Quiñones, W., Cáceres, A. J., Bringaud, F., Concepción, J. L. y Michels, P. A. (2012) When, how and why glycolysis became compartmentalised in the Kinetoplastea. A new look at an ancient organelle. *Int. J. Parasitol.* **42**:1-20.
- Gueirard, P., Laplante, A., Rondeau, C., Milon, G. y Desjardins, M. (2008) Trafficking of *Leishmania donovani* promastigotes in non-lytic compartments in neutrophils enables the subsequent transfer of parasites to macrophages. *Cell. Microbiol.* **10**:100-111.
- Ha, D. S., Schwarz, J. K., Turco, S. J. y Beverley, S. M. (1996) Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **77**:57-64.
- Haile, S. y Papadopoulou, B. (2007) Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr. Opin. Microbiol.* **10**:569-577.
- Hankins, H. M., Baldridge, R. D., Xu, P. y Graham, T. R. (2015) Role of flippases, scramblases and transfer proteins in phosphatidylserine subcellular distribution. *Traffic.* **16**:35-47.
- Hanson, P. K., Malone, L., Birchmore, J. L. y Nichols, J. W. (2003) Lem3p is essential for the uptake and potency of alkylphosphocholine drugs, edelfosine and miltefosine. *J. Biol. Chem.* **278**:36041-36050.

-
- Harder, S., Bente, M., Isermann, K. y Bruchhaus, I. (2006) Expression of a mitochondrial peroxiredoxin prevents programmed cell death in *Leishmania donovani*. *Eukaryot Cell*. **5**:861-870.
- Hendrickx, S., Boulet, G., Mondelaers, A., Dujardin, J. C., Rijal, S., Lachaud, L., Cos, P., Delputte, P. y Maes, L. (2014) Experimental selection of paromomycin and miltefosine resistance in intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*. *Parasitol. Res.* **113**:1875-1881.
- Hendrickx, S., Eberhardt, E., Mondelaers, A., Rijal, S., Bhattarai, N. R., Dujardin, J. C., Delputte, P., Cos, P. y Maes, L. (2015a) Lack of correlation between the promastigote back-transformation assay and miltefosine treatment outcome. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**:3023-3026.
- Hendrickx, S., Mondelaers, A., Eberhardt, E., Lachaud, L., Delputte, P., Cos, P. y Maes, L. (2015b) Intracellular amastigote replication may not be required for successful in vitro selection of miltefosine resistance in *Leishmania infantum*. *Parasitol. Res.* **114**:2561-2565.
- Herwaldt, B. L. (2001) Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**:659-688.
- Hilgard, P., Klenner, T., Stekar, J., Nössner, G., Kutscher, B. y Engel, J. (1997) D-21266, a new heterocyclic alkylphospholipid with antitumour activity. *Eur. J. Cancer.* **33**:442-446.
- Hochhuth, C. H., Vehmeyer, K., Eibl, H. y Unger, C. (1992) Hexadecylphosphocholine induces interferon-gamma secretion and expression of GM-CSF mRNA in human mononuclear cells. *Cell. Immunol.* **141**:161-168.
- Holthuis, J. C. y Levine, T. P. (2005) Lipid traffic: floppy drives and a superhighway. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**:209-220.
- Hombach, A., Ommen, G., Chrobak, M. y Clos, J. (2013) The Hsp90-Sti1 interaction is critical for *Leishmania donovani* proliferation in both life cycle stages. *Cell. Microbiol.* **15**:585-600.
- Hua, Z., Fatheddin, P. y Graham, T. R. (2002) An essential subfamily of Drs2p-related P-type ATPases is required for protein trafficking between Golgi complex and endosomal/vacuolar system. *Mol. Biol. Cell.* **13**:3162-3177.
- Ilgoutz, S. C., Mullin, K. A., Southwell, B. R. y McConville, M. J. (1999) Glycosylphosphatidylinositol biosynthetic enzymes are localized to a stable tubular subcompartment of the endoplasmic reticulum in *Leishmania mexicana*. *EMBO J.* **18**:3643-3654.
- Ilgoutz, S. C. y McConville, M. J. (2001) Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int. J. Parasitol.* **31**:899-908.
- Imbert, L., Ramos, R. G., Libong, D., Abreu, S., Loiseau, P. M. y Chaminade, P. (2012) Identification of phospholipid species affected by miltefosine action in

Leishmania donovani cultures using LC-ELSD, LC-ESI/MS, and multivariate data analysis. Anal. Bioanal. Chem. **402**:1169-1182.

- Ivens, A. C., Peacock, C. S., Worthey, E. A., Murphy, L., Aggarwal, G., Berriman, M., Sisk, E., Rajandream, M. A., Adlem, E., Aert, R., Anupama, A., Apostolou, Z., Attipoe, P., Bason, N., Bauser, C., Beck, A., Beverley, S. M., Bianchetti, G., Borzym, K., Bothe, G., Bruschi, C. V., Collins, M., Cadag, E., Ciarloni, L., Clayton, C., Coulson, R. M., Cronin, A., Cruz, A. K., Davies, R. M., De Gaudenzi, J., Dobson, D. E., Duesterhoeft, A., Fazelina, G., Fosker, N., Frasch, A. C., Fraser, A., Fuchs, M., Gabel, C., Goble, A., Goffeau, A., Harris, D., Hertz-Fowler, C., Hilbert, H., Horn, D., Huang, Y., Klages, S., Knights, A., Kube, M., Larke, N., Litvin, L., Lord, A., Louie, T., Marra, M., Masuy, D., Matthews, K., Michaeli, S., Mottram, J. C., Müller-Auer, S., Munden, H., Nelson, S., Norbertczak, H., Oliver, K., O'neil, S., Pentony, M., Pohl, T. M., Price, C., Purnelle, B., Quail, M. A., Rabbinowitsch, E., Reinhardt, R., Rieger, M., Rinta, J., Robben, J., Robertson, L., Ruiz, J. C., Rutter, S., Saunders, D., Schäfer, M., Schein, J., Schwartz, D. C., Seeger, K., Seyler, A., Sharp, S., Shin, H., Sivam, D., Squares, R., Squares, S., Tosato, V., Vogt, C., Volckaert, G., Wambutt, R., Warren, T., Wedler, H., Woodward, J., Zhou, S., Zimmermann, W., Smith, D. F., Blackwell, J. M., Stuart, K. D., Barrell, B. y Myler, P. J. (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. Science. **309**:436-442.

- Jackson, P. R., Lawrie, J. M., Stiteler, J. M., Hawkins, D. W., Wohlhieter, J. A. y Rowton, E. D. (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.

- Jacquot, A., Montigny, C., Hennrich, H., Barry, R., le Maire, M., Jaxel, C., Holthuis, J., Champeil, P. y Lenoir, G. (2012) Phosphatidylserine stimulation of Drs2p-Cdc50p lipid translocase dephosphorylation is controlled by phosphatidylinositol-4-phosphate. J. Biol. Chem. **287**:13249-13261.

- Jiménez-Alonso, S., Pérez-Lomas, A. L., Estévez-Braun, A., Muñoz Martínez, F., Chávez Orellana, H., Ravelo, A. G., Gamarro, F., Castanys, S. y López, M. (2008) Bis-pyranobenzoquinones as a new family of reversal agents of the multidrug resistance phenotype mediated by P-glycoprotein in mammalian cells and the protozoan parasite *Leishmania*. J. Med. Chem. **51**:7132-7143.

- Jorgensen, P. L., Hakansson, K. O. y Karlsh, S. J. (2003) Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. Annu. Rev. Physiol. **65**:817-849.

- Joshi, A., Narain, J. P., Prasittisuk, C., Bhatia, R., Hashim, G., Jorge, A., Banjara, M. y Kroeger, A. (2008) Can visceral leishmaniasis be eliminated from Asia? J. Vector Borne Dis. **45**:105-111.

- Kamhawi, S., Ramalho-Ortigao, M., Pham, V. M., Kumar, S., Lawyer, P. G., Turco, S. J., Barillas-Mury, C., Sacks, D. L. y Valenzuela, J. G. (2004) A role for insect galectins in parasite survival. Cell. **119**:329-341.

- Kapler, G. M., Coburn, C. M. y 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.

-
- Kato, U., Emoto, K., Fredriksson, C., Nakamura, H., Ohta, A., Kobayashi, T., Murakami-Murofushi, K., Kobayashi, T. y Umeda, M. (2002) A novel membrane protein, Ros3p, is required for phospholipid translocation across the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **277**:37855-37862.
- Katoh, Y. y Katoh, M. (2004) Identification and characterization of *CDC50A*, *CDC50B* and *CDC50C* genes *in silico*. *Oncol. Rep.* **12**:939-943.
- Kaye, P. y Scott, P. (2011) Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**:604-615.
- Kedzierski, L., Sakthianandeswaren, A., Curtis, J. M., Andrews, P. C., Junk, P. C. y Kedzierska, K. (2009) Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. *Curr. Med. Chem.* **16**:599-614.
- Kennedy, M. L., Cortés-Selva, F., Pérez-Victoria, J. M., Jiménez, I. A., González, A. G., Muñoz, O. M., Gamarro, F., Castanys, S. y Ravelo, A. G. (2001) Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *J. Med. Chem.* **44**:4668-4676.
- Klomp, L. W., Vargas, J. C., van Mil, S. W., Pawlikowska, L., Strautnieks, S. S., van Eijk, M. J., Juijn, J. A., Pabon-Pena, C., Smith, L. B., DeYoung, J. A., Byrne, J. A., Gombert, J., van der Brugge, G., Berger, R., Jankowska, I., Pawlowska, J., Villa, E., Knisely, A. S., Thompson, R. J., Freimer, N. B., Houwen, R. H. y Bull, L. N. (2004) Characterization of mutations in ATP8B1 associated with hereditary cholestasis. *Hepatology.* **40**:27-38.
- Kötting, J., Marschner, N. W., Neumüller, W., Unger, C. y Eibl, H. (1992) Hexadecylphosphocholine and octadecyl-methyl-glycero-3-phosphocholine: a comparison of hemolytic activity, serum binding and tissue distribution. *Prog. Exp. Tumor. Res.* **34**:131-142.
- Kramer, S. (2012) Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. *Mol. Biochem. Parasitol.* **181**:61-72.
- Krauth-Siegel, R. L. y Comini, M. A. (2008) Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* **1780**:1236-1248.
- Kühlbrandt, W. (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **5**:282-295.
- Kuhlencord, A., Maniera, T., Eibl, H. y Unger, C. (1992) Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **36**:1630-1634.
- Kulshrestha, A., Sharma, V., Singh, R. y Salotra, P. (2014) Comparative transcript expression analysis of miltefosine-sensitive and miltefosine-resistant *Leishmania donovani*. *Parasitol. Res.* **113**:1171-1184.

- Kumar, D., Kulshrestha, A., Singh, R. y Salotra, P. (2009) In vitro susceptibility of field isolates of *Leishmania donovani* to miltefosine and amphotericin B: correlation with sodium antimony gluconate susceptibility and implications for treatment in areas of endemicity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:835-838.
- Kumar, A., Sisodia, B., Misra, P., Sundar, S., Shasany, A. K. y Dube, A. (2010) Proteome mapping of overexpressed membrane-enriched and cytosolic proteins in sodium antimony gluconate (SAG) resistant clinical isolate of *Leishmania donovani*. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **70**:609-617.
- Kumar, A., Das, S., Purkait, B., Sardar, A. H., Ghosh, A. K., Dikhit, M. R., Abhishek, K. y Das, P. (2014) Ascorbate peroxidase, a key molecule regulating amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**:6172-6184.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
- Landfear, S. M. y Ignatushchenko, M. (2001) The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* **115**:1-17.
- Landfear, S. M., Ullman, B., Carter, N. S. y Sanchez, M. A. (2004) Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa. *Eukaryot Cell.* **3**:245-254.
- Laskay, T., van Zandbergen, G. y Solbach, W. (2008) Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology.* **213**:183-191.
- Laufs, H., Müller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J. C., Solbach, W. y Laskay, T. (2002) Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect. Immun.* **70**:826-835.
- Leandro, C. y Campino, L. (2003) Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **22**:352-357.
- LeBowitz, J. H., Smith, H. Q., Rusche, L. y Beverley, S. M. (1993) Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev.* **7**:996-1007.
- Lenoir, G., Williamson, P., Puts, C. F. y Holthuis, J. C. (2009) Cdc50p plays a vital role in the ATPase reaction cycle of the putative aminophospholipid transporter Drs2p. *J. Biol. Chem.* **284**:17956-17967.
- Leprohon, P., Légaré, D. y Ouellette, M. (2009) Intracellular localization of the ABCC proteins of *Leishmania* and their role in resistance to antimonials. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**:2646-2649.
- Li, Z., Zou, C. B., Yao, Y., Hoyt, M. A., McDonough, S., Mackey, Z. B., Coffino, P. y Wang, C. C. (2002) An easily dissociated 26 S proteasome catalyzes an essential ubiquitin-mediated protein degradation pathway in *Trypanosoma brucei*. *J. Biol. Chem.* **277**:15486-15498.

-
- Liang, X. H., Haritan, A., Uliel, S. y Michaeli, S. (2003) trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell*. **2**:830-840.
- Liu, K., Hua, Z., Nepute, J. A. y Graham, T. R. (2007) Yeast P4-ATPases Drs2p and Dnf1p are essential cargos of the NPFXD/Sla1p endocytic pathway. *Mol. Biol. Cell*. **18**:487-500.
- Liu, D., Zhang, T., Marshall, A. J., Okkenhaug, K., Vanhaesebroeck, B. y Uzonna, J. E. (2009) The p110delta isoform of phosphatidylinositol 3-kinase controls susceptibility to *Leishmania major* by regulating expansion and tissue homing of regulatory T cells. *J. Immunol*. **183**:1921-1933.
- López-Marqués, R. L., Poulsen, L. R., Hanisch, S., Meffert, K., Buch-Pedersen, M. J., Jakobsen, M. K., Pomorski, T. G. y Palmgren, M. G. (2010) Intracellular targeting signals and lipid specificity determinants of the ALA/ALIS P4-ATPase complex reside in the catalytic ALA α -subunit. *Mol. Biol. Cell*. **21**:791-801.
- López-Marqués, R. L., Holthuis, J. C. y Pomorski, T. G. (2011) Pumping lipids with P4-ATPases. *Biol. Chem*. **392**:67-76.
- López-Marqués, R. L., Poulsen, L. R. y Palmgren, M. G. (2012) A putative plant aminophospholipid flippase, the *Arabidopsis* P4 ATPase ALA1, localizes to the plasma membrane following association with a β -subunit. *PLoS One*. **7**:e33042.
- López-Marqués, R. L., Theorin, L., Palmgren, M. G. y Pomorski, T. G. (2014) P4-ATPases: lipid flippases in cell membranes. *Pflugers Arch*. **466**:1227-1240.
- López-Marqués, R. L., Poulsen, L. R., Bailly, A., Geisler, M., Pomorski, T. G. y Palmgren, M. G. (2015) Structure and mechanism of ATP-dependent phospholipid transporters. *Biochim. Biophys. Acta*. **1850**:461-475.
- Lukes, J., Hashimi, H. y Zíková, A. (2005) Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr. Genet*. **48**:277-299.
- Luque-Ortega, J. R. y Rivas, L. (2007) Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother*. **51**:1327-1332.
- Machado, P. R., Ampuero, J., Guimarães, L. H., Villasboas, L., Rocha, A. T., Schriefer, A., Sousa, R. S., Talhari, A., Penna, G. y Carvalho, E. M. (2010) Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl. Trop. Dis*. **4**(12):e912.
- Maia, C. y Campino, L. (2011) Can domestic cats be considered reservoir hosts of zoonotic leishmaniasis? *Trends Parasitol*. **27**:341-344.
- Malaviya, P., Singh, R. P., Singh, S. P., Hasker, E., Ostyn, B., Shankar, R., Boelaert, M. y Sundar, S. (2011) Monitoring drug effectiveness in kala-azar in Bihar, India: cost and feasibility of periodic random surveys vs. a health service-based reporting system. *Trop. Med. Int. Health*. **16**:1159-1166.

- Mandal, S., Maharjan, M., Singh, S., Chatterjee, M. y Madhubala, R. (2010) Assessing aquaglyceroporin gene status and expression profile in antimony-susceptible and -resistant clinical isolates of *Leishmania donovani* from India. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**:496-507.
- Manna, L., Gravino, A. E., Picillo, E., Decaro, N. y Buonavoglia, C. (2008) *Leishmania* DNA quantification by real-time PCR in naturally infected dogs treated with miltefosine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1149**:358-360.
- Manna, L., Vitale, F., Reale, S., Picillo, E., Neglia, G., Vescio, F. y Gravino, A. E. (2009) Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniasis. *Vet. J.* **182**:441-445.
- Mansueto, P., Seidita, A., Vitale, G. y Cascio, A. (2014a) Transfusion transmitted leishmaniasis. What to do with blood donors from endemic areas? *Travel Med. Infect. Dis.* **12**:617-627.
- Mansueto, P., Seidita, A., Vitale, G. y Cascio, A. (2014b) Leishmaniasis in travelers: a literature review. *Travel Med. Infect. Dis.* **12**:563-581.
- Manzano, J. I., García-Hernández, R., Castanys, S. y Gamarro, F. (2013) A new ABC half-transporter in *Leishmania major* is involved in resistance to antimony. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**:3719-3730.
- Marco, C., Ríos-Marco, P., Jiménez-López, J. M., Segovia, J. L. y Carrasco, M. P. (2014) Antitumoral alkylphospholipids alter cell lipid metabolism. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **14**:545-558.
- Marschner, N., Kötting, J., Eibl, H. y Unger, C. (1992) Distribution of hexadecylphosphocholine and octadecyl-methyl-glycero-3-phosphocholine in rat tissues during steady-state treatment. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **31**:18-22.
- Martín-Sánchez, J., Morales-Yuste, M., Acedo-Sánchez, C., Barón, S., Díaz, V. y Morillas-Márquez, F. (2009) Canine leishmaniasis in Southeastern Spain. *Emerg. Infect. Dis.* **15**:795-798.
- Mateo, M., Maynard, L., Vischer, C., Bianciardi, P. y Miró, G. (2009) Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniasis. *Parasitol Res.* **105**:155-162.
- Matrangolo, F. S., Liarte, D. B., Andrade, L. C., de Melo, M. F., Andrade, J. M., Ferreira, R. F., Santiago, A. S., Pirovani, C. P., Silva-Pereira, R. A. y Murta, S. M. (2013) Comparative proteomic analysis of antimony-resistant and -susceptible *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum chagasi* lines. *Mol. Biochem. Parasitol.* **190**:63-75.
- Maurer, M., Magerl, M., Metz, M., Weller, K. y Siebenhaar, F. (2013) Miltefosine: a novel treatment option for mast cell-mediated diseases. *J. Dermatolog. Treat.* **24**:244-249.
- Mayinger, P. (2012) Phosphoinositides and vesicular membrane traffic. *Biochim. Biophys. Acta.* **1821**:1104-1113.

-
- Mbang-Benet, D. E., Sterkers, Y., Morelle, C., Kebe, N. M., Crobu, L., Portalès, P., Coux, O., Hernandez, J. F., Meghamla, S., Pagès, M. y Bastien, P. (2014) The bacterial-like HslVU protease complex subunits are involved in the control of different cell cycle events in trypanosomatids. *Acta Trop.* **131**:22-131.
- Ménez, C., Buyse, M., Dugave, C., Farinotti, R. y Barratt, G. (2007a) Intestinal absorption of miltefosine: contribution of passive paracellular transport. *Pharm. Res.* **24**:546-554.
- Ménez, C., Buyse, M., Farinotti, R. y Barratt, G. (2007b) Inward translocation of the phospholipid analogue miltefosine across Caco-2 cell membranes exhibits characteristics of a carrier-mediated process. *Lipids.* **42**:229-240.
- Menna-Barreto, R. F. y de Castro, S. L. (2014) The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. *Biomed. Res. Int.* **2014**:614014.
- Michels, P. A., Bringaud, F., Herman, M. y Hannaert, V. (2006) Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim. Biophys. Acta.* **1763**:1463-1477.
- Miró, G., Montoya, A., Mateo, M., Alonso, A., García, S., García, A., Caballero, M. J. y Molina, R. (2007) A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006). *Parasitol. Res.* **101**:253-257.
- Miró, G., Oliva, G., Cruz, I., Cañavate, C., Mortarino, M., Vischer, C. y Bianciardi, P. (2009) Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Vet. Dermatol.* **20**:397-404.
- Miró, G., Rupérez, C., Checa, R., Gálvez, R., Hernández, L., García, M., Canorea, I., Marino, V. y Montoya, A. (2014) Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis? *Parasit. Vectors.* **7**:112.
- Mishra, J. y Singh, S. (2013) Miltefosine resistance in *Leishmania donovani* involves suppression of oxidative stress-induced programmed cell death. *Exp. Parasitol.* **135**:397-406.
- Misu, K., Fujimura-Kamada, K., Ueda, T., Nakano, A., Katoh, H. y Tanaka, K. (2003) Cdc50p, a conserved endosomal membrane protein, controls polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* **14**:730-747.
- Molina, R., Jiménez, M. I., Cruz, I., Iriso, A., Martín-Martín, I., Sevillano, O., Melero, S. y Bernal, J. (2012) The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet. Parasitol.* **190**:268-271.
- Monge-Maillo, B. y López-Vélez, R. (2013a) Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Drugs.* **73**:1889-1920.
- Monge-Maillo, B. y López-Vélez, R. (2013b) Therapeutic options for visceral leishmaniasis. *Drugs.* **73**:1863-1888.

- Monge-Maillo, B., Norman, F. F., Cruz, I., Alvar, J. y López-Vélez, R. (2014) Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in the Mediterranean region. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **8**:e3021.
- Monge-Maillo, B. y López-Vélez, R. (2015) Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: Drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. *Clin. Infect. Dis.* **60**:1398-1404.
- Morales Yuste, M., Acedo Sánchez, C., Barón, S. D., Morillas-Márquez, F., Díaz-Sáez, V., Corpas-López, V. y Martín-Sánchez, J. (2011) Leishmaniosis en la provincia de Cádiz (sur de España): seroprevalencia y factores de riesgo de la leishmaniosis canina e incidencia en humanos. *Revista Ibero-latinoamericana de parasitología.* **70**:138-144.
- Moreira, W., Leprohon, P. y Ouellette, M. (2011) Tolerance to drug-induced cell death favours the acquisition of multidrug resistance in *Leishmania*. *Cell Death Dis.* **2**:e201.
- Moreira, R. A., Mendanha, S. A., Fernandes, K. S., Matos, G. G., Alonso, L., Dorta, M. L. y Alonso, A. (2014) Miltefosine increases lipid and protein dynamics in *Leishmania amazonensis* membranes at concentrations similar to those needed for cytotoxicity activity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **58**:3021-3028.
- Moreno, J. y Alvar, J. (2002) Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model. *Trends Parasitol.* **18**:399-405.
- Moreno, S. N. y Docampo, R. (2009) The role of acidocalcisomes in parasitic protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* **56**:208-213.
- Morillas, F., Sánchez Rabasco, F., Ocaña, J., Martín-Sánchez, J., Ocaña-Wihelmi, J., Acedo, C., Sanchiz-Marín, M. C. (1996) Leishmaniosis in the focus of the Axarquía region, Malaga province, southern Spain: a survey of the human, dog, and vector. *Parasitol. Res.* **82**:569-570.
- Morth, J. P., Pedersen, B. P., Toustrup-Jensen, M. S., Sørensen, T. L., Petersen, J., Andersen, J. P., Vilsen, B. y Nissen, P. (2007) Crystal structure of the sodium-potassium pump. *Nature.* **450**:1043-1049.
- Mukherjee, A., Padmanabhan, P. K., Singh, S., Roy, G., Girard, I., Chatterjee, M., Ouellette, M. y Madhubala, R. (2007) Role of ABC transporter MRPA, gamma-glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**:204-211.
- Mukhopadhyay, D., Das, N. K., Roy, S., Kundu, S., Barbhuiya, J. N. y Chatterjee, M. (2011) Miltefosine effectively modulates the cytokine milieu in Indian post kala-azar dermal leishmaniasis. *J. Infect Dis.* **204**:1427-1436.
- Mullin, K. A., Foth, B. J., Ilgoutz, S. C., Callaghan, J. M., Zawadzki, J. L., McFadden, G. I. y McConville, M. J. (2001) Regulated degradation of an endoplasmic reticulum membrane protein in a tubular lysosome in *Leishmania mexicana*. *Mol. Biol. Cell.* **12**:2364-2377.

- Muñoz-Martínez, F., Torres, C., Castanys, S. y Gamarro, F. (2008) The anti-tumor alkylphospholipid perifosine is internalized by an ATP-dependent translocase activity across the plasma membrane of human KB carcinoma cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1778**:530-540.
- Muñoz-Martínez, F., Torres, C., Castanys, S. y Gamarro, F. (2010) CDC50A plays a keyrole in the uptake of the anticancer drug perifosine in human carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* **80**:793-800.
- Murray, H. W. y Delph-Etienne, S. (2000) Visceral leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) in mice deficient in T cells and activated macrophage microbicidal mechanisms. *J. Infect. Dis.* **181**:795-799.
- Musa, A., Khalil, E., Hailu, A., Olobo, J., Balasegaram, M., Omollo, R., Edwards, T., Rashid, J., Mbui, J., Musa, B., Abuzaid, A. A., Ahmed, O., Fadlalla, A., El-Hassan, A., Mueller, M., Mucee, G., Njoroge, S., Manduku, V., Mutuma, G., Apadet, L., Lodenyo, H., Mutea, D., Kirigi, G., Yifru, S., Mengistu, G., Hurissa, Z., Hailu, W., Weldegebreal, T., Tafes, H., Mekonnen, Y., Makonnen, E., Ndegwa, S., Sagaki, P., Kimutai, R., Kesusu, J., Owiti, R., Ellis, S. y Wasunna, M. (2012) Sodium stibogluconate (SSG) & paromomycin combination compared to SSG for visceral leishmaniasis in East Africa: a randomised controlled trial. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**:e1674.
- Muth, T. R., Gottardi, C. J., Roush, D. L. y Caplan, M. J. (1998) A basolateral sorting signal is encoded in the alpha-subunit of Na-K-ATPase. *Am. J. Physiol.* **274**:C688-696.
- Myler, P. J. y Fasel, N. (2006) *Leishmania: After the genome*. Caister Academic Press.
- Naderer, T. y McConville, M. J. (2008) The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell. Microbiol.* **10**:301-308.
- Naito, T., Takatsu, H., Miyano, R., Takada, N., Nakayama, K. y Shin, H. W. (2015) Phospholipid flippase ATP10A translocates phosphatidylcholine and is involved in plasma membrane dynamics. *J. Biol. Chem.* **290**:15004-15017.
- Nakano, K., Yamamoto, T., Kishimoto, T., Noji, T. y Tanaka, K. (2008) Protein kinases Fpk1p and Fpk2p are novel regulators of phospholipid asymmetry. *Mol. Biol. Cell.* **19**:1783-1797.
- Natarajan, P., Liu, K., Patil, D., Sciorra, V., Jackson, C. y Graham, T. (2009) Regulation of a Golgi flippase by phosphoinositides and an ArfGEF. *Nat. Cell. Biol.* **11**:1421-1426.
- Nathan, C. (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* **6**:173-182.
- Noji, T., Yamamoto, T., Saito, K., Fujimura-Kamada, K., Kondo, S. y Tanaka, K. (2006) Mutational analysis of the Lem3p-Dnf1p putative phospholipid-translocating P-type ATPase reveals novel regulatory roles for Lem3p and a carboxyl-terminal region of Dnf1p independent of the phospholipid-translocating activity of Dnf1p in yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **344**:323-331.

- Noli, C. y Auxilia, S. T. (2005) Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet. Dermatol.* **16**:213-232.
- Noli, C. y Saridomichelakis, M. N. (2014) An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet. J.* **202**:425-435.
- Obara, K., Miyashita, N., Xu, C., Toyoshima, I., Sugita, Y., Inesi, G. y Toyoshima, C. (2005) Structural role of countertransport revealed in Ca(2+) pump crystal structure in the absence of Ca(2+). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:14489-14496.
- Olesen, C., Picard, M., Winther, A. M., Gyruup, C., Morth, J. P., Oxvig, C., Møller, J. V. y Nissen, P. (2007) The structural basis of calcium transport by the calcium pump. *Nature.* **450**:1036-1042.
- Olliaro, P., y Sundar, S. (2009). Anthropometrically derived dosing and drug costing calculations for treating visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Trop. Med. Int. Health.* **14**:88-92.
- OMS (2010). Control de las leishmaniasis. Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 22 a 26 de marzo de 2010. Disponible en: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/82766/1/WHO_TRS_949_spa.pdf. Considerada la revisión más reciente del tratamiento de la leishmaniasis realizada por el Comité de Expertos de la OMS (Sundary Chakravarty, 2015a).
- OMS (2013a) Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Second WHO report on neglected tropical diseases. Pág. 68.
- OMS (2013b). WHO Model List of Essential Medicines. 18th list (April 2013). Disponible en: http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/18th_EML_Final_web_8Jul13.pdf
- OMS (2015a) Leishmaniasis. Página web sobre la enfermedad, disponible en <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> (Último acceso: octubre 2015).
- OMS (2015b). Leishmaniasis. Fact sheet N° 375. Disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> (consultado en febrero de 2015).
- Opperdoes, F. R. y Coombs, G. H. (2007) Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. *Trends Parasitol.* **23**:149-158.
- OPS (Organización Panamericana de la Salud) (2013). Tratamiento de las enfermedades parasitarias. Washington, DC.
- Osada, N., Hashimoto, K., Hirai, M. y Kusuda, J. (2007) Aberrant termination of reproduction-related TMEM30C transcripts in the hominoids. *Gene* **392**:151-156.
- Ostin, B., Hasker, E., Dorlo, T. P., Rijal, S., Sundar, S., Dujardin, J. C. y Boelaert, M. (2014) Failure of miltefosine treatment for visceral leishmaniasis in children and men in South-East Asia. *PLoS One.* **9**:e100220.

-
- Ouellette, M., Drummelsmith, J. y Papadopoulou, B. (2004) Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist. Updat.* **7**:257-266.
 - Ouellette, M., Drummelsmith, J., Leprohon, P., El Fadili, K., Foucher, A., Vergnes, B. y Legare, D. (2013) *Drug Resistance in Leishmania Parasites*. Springer. ISBN 978-3-7091-1125-3.
 - Overath, P., Stierhof, Y. D. y Wiese, M. (1997) Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites - Tumultuous traffic in a pocket. *Trends Cell Biol.* **7**:27-33.
 - Pace, D. (2014) Leishmaniasis. *J. Infect.* **69 Suppl 1**:S10-18.
 - Pal, J. K. y Joshi-Purandare, M. (2001) Dose-dependent differential effect of hemin on protein synthesis and cell proliferation in *Leishmania donovani* promastigotes cultured in vitro. *J. Biosci.* **26**:225-231.
 - Pachioni, J. de A., Magalhães, J. G., Lima, E. J., Bueno, L. de M., Barbosa, J. F., de Sá, M. M. y Rangel-Yagui, C. O. (2013) Alkylphospholipids - a promising class of chemotherapeutic agents with a broad pharmacological spectrum. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **16**:742-759.
 - Palenchar, J. B. y Bellofatto, V. (2006) Gene transcription in trypanosomes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **146**:135-141.
 - Palmgren, M. y Nissen, P. (2011) P-type ATPases. *Annu. Rev. Biophys.* **40**:243-266.
 - Pandey, B. D., Pandey, K., Kaneko, O., Yanagi, T. y Hirayama, K. (2009) Relapse of visceral leishmaniasis after miltefosine treatment in a Nepalese patient. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **80**:580-582.
 - Papadopoulou, B., Roy, G. y Ouellette, M. (1992) A novel antifolate resistance gene on the amplified H circle of *Leishmania*. *EMBO J.* **11**:3601-3608.
 - Paradies, P., Sasanelli, M., de Caprariis, D., Testini, G., Traversa, D., Lia, R. P., Dantas-Torres, F. y Otranto, D. (2010) Clinical and laboratory monitoring of dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet. J.* **186**:370-373.
 - Paris, C., Loiseau, P. M., Bories, C. y Bréard, J. (2004) Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:852-859.
 - Parodi-Talice, A., Araújo, J. M., Torres, C., Pérez-Victoria, J. M., Gamarro, F. y Castanys, S. (2003) The overexpression of a new ABC transporter in *Leishmania* is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity. *Biochim. Biophys. Acta.* **1612**:195-207.
 - Patel, T.A. y Lockwood, D. N. (2009) Pentamidine as secondary prophylaxis for visceral leishmaniasis in the immunocompromised host: report of four cases. *Trop. Med. Int. Health.* **14**:1064-1070.

- Paulusma, C. C. y Oude Elferink, R. P. (2005) The type 4 subfamily of P-type ATPases, putative aminophospholipid translocases with a role in human disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **1741**:11-24.
- Paulusma, C. C., Folmer, D. E., Ho-Mok, K. S., de Waart, D. R., Hilarius, P. M., Verhoeven, A. J. y Oude Elferink, R.P. (2008) ATP8B1 requires an accessory protein for endoplasmic reticulum exit and plasma membrane lipid flippase activity. *Hepatology.* **47**:268-278.
- Paulusma, C. C. y Elferink, R. P. (2010) P4 ATPases - The physiological relevance of lipid flipping transporters. *FEBS Lett.* **584**:2708-2716.
- Peacock, C. S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J. C., Quail, M. A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M. A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Ormond, D., Rutter, S., Squares, R., Whitehead, S., Rabinowitsch, E., Arrowsmith, C., White, B., Thurston, S., Bringaud, F., Baldauf, S. L., Faulconbridge, A., Jeffares, D., Depledge, D. P., Oyola, S. O., Hilley, J. D., Brito, L. O., Tosi, L. R., Barrell, B., Cruz, A. K., Mottram, J. C., Smith, D. F. y Berriman, M. (2007) Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat. Genet.* **39**:839-847.
- Pedersen, B. P., Buch-Pedersen, M. J., Morth, J. P., Palmgren, M. G. y Nissen, P. (2007) Crystal structure of the plasma membrane proton pump. *Nature.* **450**:1111-1114.
- Pediamécum. Comité de Medicamentos de la Asociación Española de Pediatría. (2015) Miltefosina. <http://pediamecum.es/wp-content/farmacos/Miltefosina.pdf> (Último acceso: octubre 2015).
- Pérez-Victoria, J. M., Pérez-Victoria, F. J., Conseil, G., Maitrejean, M., Comte, G., Barron, D., Di Pietro, A., Castanys, S. y Gamarro, F. (2001a) High-affinity binding of silybin derivatives to the nucleotide-binding domain of a *Leishmania tropica* P-glycoprotein-like transporter and chemosensitization of a multidrug-resistant parasite to daunomycin. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:439-446.
- Pérez-Victoria, J. M., Pérez-Victoria, F. J., Parodi-Talice, A., Jiménez, I. A., Ravelo, A. G., Castanys, S. y Gamarro, F. (2001b) Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2468-2474.
- Pérez-Victoria, F. J., Castanys, S. y Gamarro, F. (2003a) *Leishmania donovani* resistanceto miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2397-2403.
- Pérez-Victoria, F. J., Gamarro, F., Ouellette, M. y Castanys, S. (2003b) Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J. Biol. Chem.* **278**:49965-49971.
- Pérez-Victoria, F. J., Sánchez-Cañete, M. P., Castanys, S. y Gamarro, F. (2006a) Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. *J. Biol. Chem.* **281**:23766-23775.

-
- Pérez-Victoria, F. J., Sánchez-Cañete, M. P., Seifert, K., Croft, S. L., Sundar, S., Castanys, S. y Gamarro, F. (2006b) Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resist. Updat.* **9**:26-39.
- Pérez-Victoria, J. M., Cortés-Selva, F., Parodi-Talice, A., Bavchvarov, B. I., Pérez-Victoria, F. J., Muñoz-Martínez, F., Maitrejean, M., Costi, M. P., Barron, D., Di Pietro, A., Castanys, S. y Gamarro, F. (2006c) 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**:3102-3110.
- Peters, N. C., Egen, J. G., Secundino, N., Debrabant, A., Kimblin, N., Kamhawi, S., Lawyer, P., Fay, M. P., Germain, R. N. y Sacks, D. (2008) *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science.* **321**:970-974.
- Polonio, T. y Efferth, T. (2008) Leishmaniasis: drug resistance and natural products (review). *Int. J. Mol. Med.* **22**:277-286.
- Pomorski, T., Lombardi, R., Riezman, H., Devaux, P. F., van Meer, G. y Holthuis, J. C. (2003) Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p are required for phospholipid translocation across the yeast plasma membrane and serve a role in endocytosis. *Mol. Biol. Cell.* **14**:1240-1254.
- Pomorski, T., Holthuis, J. C., Herrmann, A. y van Meer, G. (2004) Tracking down lipid flippases and their biological functions. *J. Cell Sci.* **117**:805-813.
- Pomorski, T. y Menon, A. K. (2006) Lipid flippases and their biological functions. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**:2908-2921.
- Poulsen, L. R., López-Marqués, R. L., McDowell, S. C., Okkeri, J., Licht, D., Schulz, A., Pomorski, T., Harper, J. F. y Palmgren, M. G. (2008a) The *Arabidopsis* P4-ATPase ALA3 localizes to the Golgi and requires a β -subunit to function in lipid translocation and secretory vesicle formation. *Plant Cell.* **20**:658-676.
- Poulsen, L. R., López-Marqués, R. L. y Palmgren, M. G. (2008b) Flippases: still more questions than answers. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**:3119-3125.
- Prajapati, V. K., Sharma, S., Rai, M., Ostin, B., Salotra, P., Vanaerschot, M., Dujardin, J. C. y Sundar, S. (2013) *In vitro* susceptibility of *Leishmania donovani* to miltefosine in Indian visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **89**:750-754.
- Price, R. N., Dorsey, G., Ashley, E. A., Barnes, K. I., Baird, J. K., d'Alessandro, U., Guerin, P. J., Laufer, M. K., Naidoo, I., Nosten, F., Olliaro, P., Plowe, C. V., Ringwald, P., Sibley, C. H., Stepniewska, K. y White, N. J. (2007) World Antimalarial Resistance Network I: clinical efficacy of antimalarial drugs. *Malar. J.* **6**:119.
- Puentes, S. M., Dwyer, D. M., Bates, P. A., Joiner, K. A. (1989) Binding and release of C3 from *Leishmania donovani* promastigotes during incubation in normal human serum. *J. Immunol.* **143**:3743-3749.

- Puentes, S. M., Da Silva, R. P., Sacks, D. L., Hammer, C. H. y Joiner, K. A. (1990) Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9. *J. Immunol.* **145**:4311-4316.
- Purkait, B., Kumar, A., Nandi, N., Sardar, A. H., Das, S., Kumar, S., Pandey, K., Ravidas, V., Kumar, M., De, T., Singh, D. y Das, P. (2012) Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **56**:1031-1041.
- Purkait, B., Singh, R., Wasnik, K., Das, S., Kumar, A., Paine, M., Dikhit, M., Singh, D., Sardar, A. H., Ghosh, A. K. y Das, P. (2015) Up-regulation of silent information regulator 2 (Sir2) is associated with amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**:1343-1356.
- Puts, C. F. y Holthuis, J. C. (2009) Mechanism and significance of P4 ATPase-catalyzed lipid transport: lessons from a Na⁺/K⁺ -pump. *Biochim. Biophys. Acta.* **1791**:603-611.
- Puts, C. F., Lenoir, G., Krijgsveld, J., Williamson, P. y Holthuis, J. C. (2010) A P4-ATPase protein interaction network reveals a link between aminophospholipid transport and phosphoinositide metabolism. *J. Proteome Res.* **9**:833-842.
- Puts, C. F., Panatala, R., Hennrich, H., Tsareva, A., Williamson, P. y Holthuis, J. C. (2012) Mapping functional interactions in a heterodimeric phospholipid pump. *J. Biol. Chem.* **287**:30529-30540.
- Quazi, F. y Molday, R. S. (2011) Lipid transport by mammalian ABC proteins. *Essays Biochem.* **50**:265-290.
- Quazi, F., Lenevich, S. y Molday, R. S. (2012) ABCA4 is an N-retinylidene-phosphatidylethanolamine and phosphatidylethanolamine importer. *Nat. Commun.* **3**:925.
- Quispe-Tintaya, K. W., Laurent, T., Decuypere, S., Hide, M., Bañuls, A. L., De Doncker, S., Rijal, S., Cañavate, C., Campino, L. y Dujardin, J. C. (2005) Fluorogenic assay for molecular typing of the *Leishmania donovani* complex: taxonomic and clinical applications. *J. Infect. Dis.* **192**:685-692.
- Rahman, M., Ahmed, B. N., Faiz, M. A., Chowdhury, M. Z., Islam, Q. T., Sayeedur, R., Rahman, M. R., Hossain, M., Bangali, A. M., Ahmad, Z., Islam, M. N., Mascie-Taylor, C. G., Berman, J. y Arana, B. (2011) Phase IV trial of miltefosine in adults and children for treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Bangladesh. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **85**:66-69.
- Rai, K., Cuypers, B., Bhattarai, N. R., Uranw, S., Berg, M., Ostyn, B., Dujardin, J. C., Rijal, S. y Vanaerschoot, M. (2013) Relapse after treatment with miltefosine for visceral leishmaniasis is associated with increased infectivity of the infecting *Leishmania donovani* strain. *MBio.* **4**:e00611-00613.
- Rajasekaran, R. y Chen, Y. P. (2015) Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. *Drug Discov. Today.* **20**:958-968.

- Rakotomanga, M., Saint-Pierre-Chazalet, M. y Loiseau, P. M. (2005) Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes and consequences for drug-membrane interactions. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**:2677-2686.
- Rakotomanga, M., Blanc, S., Gaudin, K., Chaminade, P. y Loiseau, P. M. (2007) Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1425-1430.
- Rangan. S. (2003) The public-private mix in India's Revised National Tuberculosis Control Programme--an update. *J. Indian Med. Assoc.* **101**:161-163.
- Rao, A. U., Carta, L. K., Lesuisse, E. y Hamza, I. (2005) Lack of heme synthesis in a free-living eukaryote. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:4270-4275.
- Raymond, F., Boisvert, S., Roy, G., Ritt, J. F., Légaré, D., Isnard, A., Stanke, M., Olivier, M., Tremblay, M. J., Papadopoulou, B., Ouellette, M. y Corbeil, J. (2012) Genome sequencing of the lizard parasite *Leishmania tarentolae* reveals loss of genes associated to the intracellular stage of human pathogenic species. *Nucleic Acids Res.* **40**:1131-1147.
- Reid, M. F. y Fewson, C. A. (1994) Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**:13-56.
- Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B. y Brooker, S. (2007) Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* **7**:581-596.
- Richard, J. V. y Werbovetz, K. A. (2010) New antileishmanial candidates and lead compounds. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**:447-455.
- Riekhof, W. R. y Voelker, D. R. (2006) Uptake and utilization of lysophosphatidylethanolamine by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **281**:36588-36596.
- Riekhof, W. R., Wu, J., Gijon, M. A., Zarini, S., Murphy, R. C. y Voelker, D. R. (2007) Lysophosphatidylcholine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of P-type ATPases in transport and a broad specificity acyltransferase in acylation. *J. Biol. Chem.* **282**:36853-36861.
- Riera, C., Fisa, R., López-Chejade, P., Serra, T., Girona, E., Jiménez, M., Muncunill, J., Sedeño, M., Mascaró, M., Udina, M., Gállego, M., Carrió, J., Forteza, A. y Portús, M. (2008) Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). *Transfusion.* **48**:1383-1389.
- Rijal, S., Ostry, B., Uranw, S., Rai, K., Bhattarai, N. R., Dorlo, T. P., Beijnen, J. H., Vanaerschot, M., Decuypere, S., Dhakal, S. S., Das, M. L., Karki, P., Singh, R., Boelaert, M. y Dujardin, J. C. (2013) Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. *Clin. Infect. Dis.* **56**:1530-1538.
- Ritmeijer, K., Dejenie, A., Assefa, Y., Hundie, T. B., Measure, J., Boots, G., den Boer, M. y Davidson, R. N. (2006) A comparison of miltefosine and sodium stibogluconate

for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high prevalence of HIV infection. *Clin. Infect. Dis.* **43**:357-364.

- Robert, X. y Gouet, P. (2014) Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. *Nucleic Acids Res.* **42**:W320-324.

- Robinson, K. A. y Beverley, S. M. (2003) Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **128**:217-228.

- Rochette, A., Raymond, F., Ubeda, J. M., Smith, M., Messier, N., Boisvert, S., Rigault, P., Corbeil, J., Ouellette, M. y Papadopoulou, B. (2008) Genome-wide gene expression profiling analysis of *Leishmania major* and *Leishmania infantum* developmental stages reveals substantial differences between the two species. *BMC Genomics.* **9**:255.

- Roelants, F. M., Baltz, A. G., Trott, A. E., Fereres, S. y Thorner, J. (2010) A protein kinase network regulates the function of aminophospholipid flippases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**:34-39.

- Rogers, M. B., Hilley, J. D., Dickens, N. J., Wilkes, J., Bates, P. A., Depledge, D. P., Harris, D., Her, Y., Herzyk, P., Imamura, H., Otto, T. D., Sanders, M., Seeger, K., Dujardin, J. C., Berriman, M., Smith, D. F., Hertz-Fowler, C. y Mottram, J. C. (2011) Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. *Genome Res.* **21**:2129-2142.

- Ruiter, G. A., Zerp, S. F., Bartelink, H., van Blitterswijk, W. J. y Verheij, M. (2003) Anti-cancer alkyl-lysophospholipids inhibit the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt/PKB survival pathway. *Anticancer. Drugs.* **14**:167-173.

- Sahu, S. K., Gummadi, S. N., Manoj, N. y Aradhyam, G. K. (2007) Phospholipid scramblases: an overview. *Arch. Biochem. Biophys.* **462**:103-114.

- Saito, K., Fujimura-Kamada, K., Furuta, N., Kato, U., Umeda, M. y Tanaka, K. (2004) Cdc50p, a protein required for polarized growth, associates with the Drs2p P-type ATPase implicated in phospholipid translocation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* **15**:3418-3432.

- Sánchez-Cañete, M. P., Carvalho, L., Pérez-Victoria, F. J., Gamarro, F. y 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.

- Sánchez-Cañete, M. P. (2009) Implicación de las aminofosfolípido translocasas en la resistencia a miltefosina en *Leishmania*. Tesis Doctoral. CSIC-Universidad de Granada.

- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **74**:5463-5467.

- Sauvage, V., Aubert, D., Escotte-Binet, S. y Villena, I. (2009) The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. *Mol. Biochem. Parasitol.* **167**:81-94.

-
- Sebastian, T. T., Baldrige, R. D., Xu, P. y Graham, T. R. (2012) Phospholipid flippases: building asymmetric membranes and transport vesicles. *Biochim. Biophys. Acta.* **1821**:1068-1077.
- Seifert, K., Matu, S., Pérez-Victoria, F. J., Castanys, S., Gamarro, F. y Croft, S. L. (2003) Characterization of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int. J. Antimicrob. Agents* **22**:380-387.
- Seifert, K., Pérez-Victoria, F. J., Stettler, M., Sánchez-Cañete, M. P., Castanys, S., Gamarro, F. y Croft, S. L. (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.
- Shettihalli, A. K. y Gummadi, S. N. (2013) Biochemical evidence for lead and mercury induced transbilayer movement of phospholipids mediated by human phospholipid scramblase 1. *Chem. Res. Toxicol.* **26**:918-925.
- Shinoda, T., Ogawa, H., Cornelius, F. y Toyoshima, C. (2009) Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution. *Nature.* **459**:446-450.
- Sindermann, H. y Engel, J. (2006) Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100 Suppl 1**:S17-20.
- Singh, S. y Sivakumar, R. (2004) Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J. Infect. Chemother.* **10**:307-315.
- Singh, R., Kumar, D., Ramesh, V., Negi, N. S., Singh, S. y Salotra, P. (2006) Visceral leishmaniasis, or kala azar (KA): high incidence of refractoriness to antimony is contributed by anthroponotic transmission via post-KA dermal leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* **194**:302-306.
- Singh, G., Chavan, H. D. y Dey, C. S. (2008) Proteomic analysis of miltefosine-resistant *Leishmania* reveals the possible involvement of eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A). *Int. J. Antimicrob. Agents.* **31**:584-586.
- Singh, R., Kumar, D., Duncan, R. C., Nakhasi, H. L. y Salotra, P. (2010) Overexpression of histone H2A modulates drug susceptibility in *Leishmania* parasites. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **36**:50-57.
- Singh, S. y Mandlik, V. (2015) Structure based investigation on the binding interaction of transport proteins in leishmaniasis: insights from molecular simulation. *Mol. Biosyst.* **11**:1251-1259.
- Sinha, P. K., Jha, T. K., Thakur, C. P., Nath, D., Mukherjee, S., Aditya, A. K. y Sundar, S. (2011) Phase 4 pharmacovigilance trial of paromomycin injection for the treatment of visceral leishmaniasis in India. *J. Trop. Med.* **2011**:645203.
- Smorenburg, C. H., Seynaeve, C., Bontenbal, M., Planting, A. S., Sindermann, H. y Verweij, J. (2000) Phase II study of miltefosine 6% solution as topical treatment of skin metastases in breast cancer patients. *Anticancer. Drugs.* **11**:825-828.

- Sohoel, H., Jensen, A. M., Moller, J. V., Nissen, P., Denmeade, S. R., Isaacs, J. T., Olsen, C. E. y Christensen, S. B. (2006) Natural products as starting materials for development of second-generation SERCA inhibitors targeted towards prostate cancer cells. *Bioorg. Med. Chem.* **14**:2810-2815.
- Soto, J., Arana, B. A., Toledo, J., Rizzo, N. Vega, J. C., Díaz, A., Luz, M., Gutiérrez, P., Arboleda, M., Berman, J. D., Junge, K., Engel, J. y Sindermann, H. (2004) Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* **38**:1266-1272.
- Soto, J., Toledo, J., Valda, L., Balderrama, M., Rea, I., Parra, R., Ardiles, J., Soto, P., Gomez, A., Molleda, F., Fuentelsaz, C., Anders, G., Sindermann, H., Engel, J. y Berman, J. (2007) Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine. *Clin. Infect. Dis.* **44**:350-356.
- Soto, J., Rea, J., Balderrama, M., Toledo, J., Soto, P., Valda, L. y Berman, J. D. (2008) Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **78**:210-211.
- Soto, J., Rea, J., Valderrama, M., Toledo, J., Valda, L., Ardiles, J. y Berman, J. (2009) Short report: Efficacy of extended (six weeks) treatment with miltefosine for mucosal leishmaniasis in Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **81**:387-389.
- Southern, E. M. (1974). An improved method for transferring nucleotides from electrophoresis strips to thin layers of ion-exchange cellulose. *Anal. Biochem.* **62**:317-318.
- Stone, A. y Williamson, P. (2012) Outside of the box: recent news about phospholipid translocation by P4 ATPases. *J. Chem. Biol.* **5**:131-136.
- Stone, A., Chau, C., Eaton, C., Foran, E., Kapur, M., Prevatt, E., Belkin, N., Kerr, D., Kohlin, T. y Williamson, P. (2012) Biochemical characterization of P4-ATPase mutations identified in patients with progressive familial intrahepatic cholestasis. *J. Biol. Chem.* **287**:41139-41151.
- Suárez Rodríguez, B., Isidoro Fernández, B., Santos Sanz, S., Sierra Moros, M. J., Molina Moreno, R., Astray Mochales, J. y Amela Heras, C. (2012) Situación epidemiológica y de los factores de riesgo de transmisión de *Leishmania infantum* en España. *Rev. Esp. Salud Pública.* **86**:555-564.
- Sundar, S., Rosenkaimer, F., Makharia, M. K., Goyal, A. K., Mandal, A. K., Voss, A., Hilgard, P. y Murray, H. W. (1998) Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet.* **352**:1821-1823.
- Sundar, S. (2001) Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop. Med. Int. Health.* **6**:849-854.
- Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Engel, J., Sindermann, H., Fischer, C., Junge, K., Bryceson, A. y Berman J. (2002) Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.* **347**:1739-1746.
- Sundar, S. y Murray, H. W. (2005) Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. *Bull. World Health Organ.* **83**:394-395.

-
- Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Bhattacharya, S. K. y Rai, M. (2006) Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100 Suppl 1**:S26-S33.
- Sundar, S. y Olliaro, P. L. (2007) Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: clinical evidence for informed clinical risk management. *Ther. Clin. Risk Manag.* **3**:733-740.
- Sundar, S. y Chakravarty, J. (2008). Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert Opin. Investig. Drugs.* **17**:787-794.
- Sundar, S., Rai, M., Chakravarty, J., Agarwal, D., Agrawal, N., Vaillant, M., Olliaro, P. y Murray, H. W. (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.
- Sundar, S., Chakravarty, J., Agarwal, D., Rai, M. y Murray, H. W. (2010) Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. *N. Engl. J. Med.* **362**:504-512.
- Sundar, S., Sinha, P. K., Rai, M., Verma, D. K., Nawin, K., Alam, S., Chakravarty, J., Vaillant, M., Verma, N., Pandey, K., Kumari, P., Lal, C. S., Arora, R., Sharma, B., Ellis, S., Strub-Wourgaft, N., Balasegaram, M., Olliaro, P., Das, P. y Modabber, F. (2011a) 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.
- Sundar, S., Sinha, P. K., Verma, D. K., Kumar, N., Alam, S., Pandey, K., Kumari, P., Ravidas, V., Chakravarty, J., Verma, N., Berman, J., Ghalib, H. y Arana, B. (2011b) Ambisome plus miltefosine for Indian patients with kala-azar. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **105**:115-117.
- Sundar, S., Singh, A., Rai, M., Prajapati, V. K., Singh, A. K., Ostry, B., Boelaert, M., Dujardin, J. C. y Chakravarty, J. (2012) Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. *Clin. Infect. Dis.* **55**:543-550.
- Sundar, S. y Chakravarty, J. (2015a) An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opin. Pharmacother.* **16**:237-252.
- Sundar, S. y Chakravarty, J. (2015b) Investigational drugs for visceral leishmaniasis. *Expert Opin. Investig. Drugs.* **24**:43-59.
- Sundar, S., Singh, A., Chakravarty, J. y Rai, M. (2015) Efficacy and safety of miltefosine in treatment of post-kala-azar dermal leishmaniasis. *ScientificWorldJournal.* **2015**:414378.
- Suzuki, J., Umeda, M., Sims, P. J. y Nagata, S. (2010) Calcium-dependent phospholipid scrambling by TMEM16F. *Nature.* **468**:834-838.
- Suzuki, J., Fujii, T., Imao, T., Ishihara, K., Kuba, H. y Nagata, S. (2013) Calcium-dependent phospholipid scramblase activity of TMEM16 protein family members. *J. Biol. Chem.* **288**:13305-13316.

- Takahashi, Y., Fujimura-Kamada, K., Kondo, S. y Tanaka, K. (2011) Isolation and characterization of novel mutations in CDC50, the noncatalytic subunit of the Drs2p phospholipid flippase. *J. Biochem.* **149**:423-432.
- Takatsu, H., Baba, K., Shima, T., Umino, H., Kato, U., Umeda, M., Nakayama, K. y Shin, H. W. (2011) ATP9B, a P4-ATPase (a putative aminophospholipid translocase), localizes to the trans-Golgi network in a CDC50 protein-independent manner. *J. Biol. Chem.* **286**:38159-38167.
- Takatsu, H., Tanaka, G., Segawa, K., Suzuki, J., Nagata, S., Nakayama, K. y Shin, H. W. (2014) Phospholipid flippase activities and substrate specificities of human type IV P-type ATPases localized to the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **289**:33543-33556.
- Tanaka, K., Fujimura-Kamada, K. y Yamamoto, T. (2011) Functions of phospholipid flippases. *J. Biochem.* **149**:131-143.
- Tang, X., Halleck, M. S., Schlegel, R. A. y Williamson, P. (1996) A subfamily of P-type ATPases with aminophospholipid transporting activity. *Science.* **272**:1495-1497.
- Teixeira, S. M. (1998) Control of gene expression in Trypanosomatidae. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**:1503-1516.
- Teixeira, D. E., Benchimol, M., Rodrigues, J. C., Crepaldi, P. H., Pimenta, P. F. y de Souza, W. (2013) The cell biology of *Leishmania*: how to teach using animations. *PLoS Pathog.* **9**:e1003594.
- Thakur, C. P., Narayan, S. y Ranjan, A. (2004) Epidemiological, clinical and pharmacological study of antimony-resistant visceral leishmaniasis in Bihar, India. *Indian J. Med. Res.* **120**:166-172.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. y Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**:4673-4680.
- Toyoshima, C., Kanai, R. y Cornelius, F. (2011) First crystal structures of Na⁺,K⁺-ATPase: new light on the oldest ion pump. *Structure.* **19**:1732-1738.
- Tsai, P. C., Hsu, J. W., Liu, Y. W., Chen, K. Y. y Lee, F. J. (2013) Arl1p regulates spatial membrane organization at the trans-Golgi network through interaction with Arf-GEF Gea2p and flippase Drs2p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**:E668-E677.
- Turner, K. G., Vacchina, P., Robles-Murguía, M., Wadsworth, M., McDowell, M. A. y Morales, M. A. (2015) Fitness and Phenotypic Characterization of Miltefosine-Resistant *Leishmania major*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **9**:e0003948.
- Urbina, J. A. (1997) Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. *Parasitology.* **114 Suppl**:S91-99.
- Vagin, O., Turdikulova, S. y Sachs, G. (2004) The H,K-ATPase beta subunit as a model to study the role of N-glycosylation in membrane trafficking and apical sorting. *J. Biol. Chem.* **279**:39026-39034.

- Vagin, O., Sachs, G. y Tokhtaeva, E. (2007) The roles of the Na,K-ATPase β 1 subunit in pump sorting and epithelial integrity. *J. Bioenerg. Biomembr.* **39**:367-372.
- van den Eijnde, S. M., van den Hoff, M. J., Reutelingsperger, C. P., van Heerde, W. L., Henfling, M. E., Vermeij-Keers, C., Schutte, B., Borgers, M. y Ramaekers, F. C. (2001) Transient expression of phosphatidylserine at cell-cell contact areas is required for myotube formation. *J. Cell. Sci.* **114**:3631-3642.
- van der Mark, V. A., Elferink, R. P. y Paulusma, C. C. (2013) P4 ATPases: flippases in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* **14**:7897-7922.
- van der Velden, L. M., van de Graaf, S. F. y Klomp, L. W. (2010a). Biochemical and cellular functions of P4 ATPases. *Biochem. J.* **431**:1-11.
- van der Velden, L. M., Wichers, C. G., van Breevoort, A. E., Coleman, J. A., Molday, R. S., Berger, R., Klomp, L. W. y van de Graaf, S. F. (2010b) Heteromeric interactions required for abundance and subcellular localization of human CDC50 proteins and class 1 P4-ATPases. *J. Biol. Chem.* **285**:40088-40096.
- van Griensven, J., Balasegaram, M., Meheus, F., Alvar, J., Lynen, L. y Boelaert, M. (2010) Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* **10**:184-194.
- van Griensven, J., Carrillo, E., López-Vélez, R., Lynen, L. y Moreno, J. (2014) Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin. Microbiol. Infect.* **20**:286-299.
- van Meer, G., Voelker, D. R. y Feigenson, G. W. (2008) Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **9**:112-124.
- van Meer, G. y de Kroon, A. I. (2011) Lipid map of the mammalian cell. *J. Cell Sci.* **124**:5-8.
- van Thiel, P. P., Leenstra, T., Kager, P. A., de Vries, H. J., van Vugt, M., van der Meide, W. F., Bart, A., Zeegelaar, J. E., van der Sluis, A., Schallig, H. D., van Gool, T., Faber, W. R. y de Vries, P. J. (2010) Miltefosine treatment of *Leishmania major* infection: an observational study involving Dutch military personnel returning from northern Afghanistan. *Clin. Infect. Dis.* **50**:80-83.
- van Zandbergen, G., Bollinger, A., Wenzel, A., Kamhawi, S., Voll, R., Klinger, M., Müller, A., Hölscher, C., Herrmann, M., Sacks, D., Solbach, W. y Laskay, T. (2006) *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**:13837-13842.
- Vanaerschot, M., Dumetz, F., Roy, S., Ponte-Sucre, A., Arevalo, J. y Dujardin, J. C. (2014) Treatment failure in leishmaniasis: drug-resistance or another (epi-) phenotype? *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **12**:937-946.
- VanAken, T., Foxall-VanAken, S., Castleman, S. y Ferguson-Miller, S. (1986) Alkyl glycoside detergents: synthesis and applications to the study of membrane proteins. *Methods Enzymol.* **125**:27-35.
- Varela-M, R. E., Villa-Pulgarin, J. A., Yepes, E., Müller, I., Modolell, M., Muñoz, D. L., Robledo, S. M., Muskus, C. E., López-Abán, J., Muro, A., Vélez, I. D. y Mollinedo,

- F. (2012) *In vitro* and *in vivo* efficacy of ether lipid edelfosine against *Leishmania spp.* and SbV-resistant parasites. PLoS Negl. Trop. Dis. **6**:e1612.
- Vélez, I., López, L., Sánchez, X., Mestra, L., Rojas, C. y Rodríguez, E. (2010) Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. **83**:351-356.
 - Vergnes, B., Gourbal, B., Girard, I., Sundar, S., Drummelsmith, J. y Ouellette, M. (2007) A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid 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.
 - Verhulst, P. M., van der Velden, L. M., Oorschot, V., van Faassen, E. E., Klumperman, J., Houwen, R. H., Pomorski, T. G., Holthuis, J. C. y Klomp, L. W. (2010) A flippase-independent function of ATP8B1, the protein affected in familial intrahepatic cholestasis type 1, is required for apical protein expression and microvillus formation in polarized epithelial cells. Hepatology. **51**:2049-2060.
 - Verma, N. K. y Dey, C. S. (2004) Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. Antimicrob. Agents Chemother. **48**:3010-3015.
 - Vestergaard, A. L., Coleman, J. A., Lemmin, T., Mikkelsen, S. A., Molday, L. L., Vilsen, B., Molday, R. S., Dal Peraro, M. y Andersen, J. P. (2014) Critical roles of isoleucine-364 and adjacent residues in a hydrophobic gate control of phospholipid transport by the mammalian P4-ATPase ATP8A2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **111**:E1334-1343.
 - Vickers, T. J., Wyllie, S. y Fairlamb, A. H. (2004) *Leishmania major* elongation factor 1B complex has trypanothione S-transferase and peroxidase activity. J. Biol. Chem. **279**:49003-49009.
 - Vilsen, B. y Andersen, J. P. (1998) Mutation to the glutamate in the fourth membrane segment of Na⁺,K⁺-ATPase and Ca²⁺-ATPase affects cation binding from both sides of the membrane and destabilizes the occluded enzyme forms. Biochemistry **37**:10961-10971.
 - Vincent, I. M., Weidt, S., Rivas, L., Burgess, K., Smith, T. K. y Ouellette, M. (2013) Untargeted metabolomic analysis of miltefosine action in *Leishmania infantum* reveals changes to the internal lipid metabolism. Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist. **4**:20-27.
 - Vitale, A. y Ceriotti, A. (2004) Protein quality control mechanisms and protein storage in the endoplasmic reticulum. A conflict of interests? Plant Physiol. **136**:3420-3426.
 - Wadhone, P., Maiti, M., Agarwal, R., Kamat, V., Martin, S. y Saha, B. (2009). Miltefosine promotes IFN-gamma-dominated anti-leishmanial immune response. J. Immunol. **182**:7146-7154.
 - Warren, D. T., Andrews, P. D., Gourlay, C. W. y Ayscough, K. R. (2002) Sla1p couples the yeast endocytic machinery to proteins regulating actin dynamics. J. Cell. Sci. **115**:1703-1715.

-
- Weingärtner, A., Drobot, B., Herrmann, A., Sánchez-Cañete, M. P., Gamarro, F., Castanys, S. y Günther Pomorski, T. (2010) Disruption of the lipid-transporting LdMT–LdRos3 complex in *Leishmania donovani* affects membrane lipid asymmetry but not host cell invasion. PLoS One. **5**:e12443.
- Weise, F., Stierhof, Y. D., Kühn, C., Wiese, M. y Overath, P. (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**:4587-4603.
- Weller, K., Artuc, M., Jennings, G., Friedrichson, T., Guhl, S., dos Santos, R. V., Sünder, C., Zuberbier, T. y Maurer, M. (2009) Miltefosine inhibits human mast cell activation and mediator release both in vitro and in vivo. J. Invest. Dermatol. **129**:496-498.
- Wiedmer, T., Zhou, Q., Kwoh, D. Y. y Sims, P. J. (2000) Identification of three new members of the phospholipid scramblase gene family. Biochim. Biophys. Acta. **31**:244-253.
- Wilkinson, S. R., Temperton, N. J., Mondragon, A. y Kelly, J. M. (2000) Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. J. Biol. Chem. **275**:8220-8225.
- Williamson, P. y Schlegel, R. A. (2002) Transbilayer phospholipid movement and the clearance of apoptotic cells. Biochim. Biophys. Acta. **1585**:53-63.
- Williamson, P. (2014) Substrate trajectory through phospholipid-transporting P4-ATPases. Biochem. Soc. Trans. **42**:1367-1371.
- Winther, A. M., Liu, H., Sonntag, Y., Olesen, C., le Maire, M., Soehoel, H., Olsen, C. E., Christensen, S. B., Nissen, P. y Moller, J. V. (2010) Critical roles of hydrophobicity and orientation of side chains for inactivation of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase with thapsigargin and thapsigargin analogs. J. Biol. Chem. **285**:28883-28892.
- Woerly, V., Maynard, L., Sanquer, A. y Eun, H. M. (2009) Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. Parasitol. Res. **105**:463-469.
- Wyllie, S., Cunningham, M. L. y Fairlamb, A. H. (2004) Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. J. Biol. Chem. **279**:39925-39932.
- Wyllie, S., Mandal, G., Singh, N., Sundar, S., Fairlamb, A. H. y Chatterjee, M. (2010) Elevated levels of trypanothione peroxidase in antimony unresponsive *Leishmania donovani* field isolates. Mol. Biochem. Parasitol. **173**:162-164.
- Xu, P., Okkeri, J., Hanisch, S., Hu, R. Y., Xu, Q., Pomorski, T. G. y Ding, X. Y. (2009) Identification of a novel mouse P4-ATPase family member highly expressed during spermatogenesis. J. Cell Sci. **122**:2866-2876.

- Xu, P., Baldrige, R. D., Chi, R. J., Burd, C. G. y Graham, T. R. (2013) Phosphatidylserine flipping enhances membrane curvature and negative charge required for vesicular transport. *J. Cell. Biol.* **202**:875-886.
- Yang, Y. y Walsh, C. E. (2005) Spliceosome-mediated RNA trans-splicing. *Mol. Ther.* **12**:1006-1012.
- Yardley, V., Croft, S. L., de Doncker, S., Dujardin, J. C., Koirala, S., Rijal, S., Miranda, C., Llanos-Cuentas, A. y Chappuis, F. (2005) The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**:272-275.
- Zeisig, R., Rudolf, M., Eue, I. y Arndt, D. (1995) Influence of hexadecylphosphocholine on the release of tumor necrosis factor and nitroxide from peritoneal macrophages in vitro. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **121**:69-75.
- Zerpa, O., Ulrich, M., Blanco, B., Polegre, M., Avila, A., Matos, N., Mendoza, I., Pratlong, F., Ravel, C. y Convit, J. (2007) Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. *Br. J. Dermatol.* **156**:1328-1335.
- Zhang, X. y Moye-Rowley, W. S. (2001) *Saccharomyces cerevisiae* multidrug resistance gene expression inversely correlates with the status of the F(0) component of the mitochondrial ATPase. *J. Biol. Chem.* **276**:47844-47852.
- Zhou, Q., Zhao, J., Stout, J. G., Luhm, R. A., Wiedmer, T. y Sims, P. J. (1997) Molecular cloning of human plasma membrane phospholipidscramblase. A protein mediating transbilayer movement of plasma membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* **272**:18240-18244.
- Zhou, X. y Graham, T. R. (2009) Reconstitution of phospholipid translocase activity with purified Drs2p, a type-IV P-type ATPase from budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**:16586-16591.
- Zhou, X., Sebastian, T. T. y Graham, T. R. (2013) Auto-inhibition of Drs2p, a yeast phospholipid flippase, by its carboxyl-terminal tail. *J. Biol. Chem.* **288**:31807-31815.
- Zhu, X., Libby, R. T., de Vries, W. N., Smith, R. S., Wright, D. L., Bronson, R. T., Seburn, K. L. y John, S. W. (2012) Mutations in a P-type ATPase gene cause axonal degeneration. *PLoS Genet.* **8**:e1002853.
- Zijlstra, E. E., Musa, A. M., Khalil, E. A., el-Hassan, I. M. y el-Hassan A. M. (2003) Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* **3**:87-98.
- Zuo, X., Djordjevic, J. T., Bijosono Oei, J., Desmarini, D., Schibeci, S. D., Jolliffe, K. A. y Sorrell, T. C. (2011) Miltefosine induces apoptosis-like cell death in yeast via Cox9p in cytochrome c oxidase. *Mol. Pharmacol.* **80**:476-485.
- Zwaal, R. F. y Schroit, A. J. (1997) Pathophysiologic implications of membrane phospholipid asymmetry in blood cells. *Blood.* **89**:1121-1132.