



Universidad de Granada



**CSIC**  
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

**ipbln**

Instituto de Parasitología y Biomedicina  
López Neyra - CSIC

**El transportador LABC2 de *Leishmania*:  
avances funcionales asociados con resistencia a fármacos,  
infectividad y metabolismo de tioles**

**Ana Perea Martínez**

**TESIS DOCTORAL**

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

**Granada 2018**





Instituto de Parasitología y Biomedicina  
"López-Neyra"



Universidad de Granada

**“El transportador LABCG2 de *Leishmania*:  
avances funcionales asociados con resistencia a  
fármacos, infectividad y metabolismo de tioles”**

Director de Tesis:

Dr. Francisco Gamarro Conde

Memoria presentada por la Licenciada **Ana Perea Martínez** para  
optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada en el  
Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular.

2018

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autor: Ana Perea Martínez  
ISBN: 978-84-9163-927-5  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/52365>



D. Francisco Gamarro Conde,

Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas,

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “**El transportador LABCG2 de *Leishmania*: avances funcionales asociados con resistencia a fármacos, infectividad y metabolismo de tioles**” 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 **Dña. Ana, Perea Martínez**, Licenciada en Biología por la Universidad de León, para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada. Garantizando, que hasta donde mi 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 17 de Abril de 2018

**Fdo. Dr. Francisco Gamarro Conde**

Investigador Científico del CSIC



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

- Proyecto SAF2012-34267, titulado “*Implicación de los transportadores ABCG y otros transportadores ABC específicos de tripanosomátidos en la infectividad y resistencia a fármacos en Leishmania*”, financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad (01-01-2013 hasta 31-12-2015).

Los resultados de esta Tesis Doctoral han sido publicados en:

**Perea A**, Manzano JI, Castanys S, Gamarro F. The LABCG2 transporter from *Leishmania* Protozoan Parasites Is Involved in Antimony Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016, **60**(6):3489-96.

Manzano JI, **Perea A**, León-Guerrero D, Campos-Salinas J, Piacenza L, Castanys S, Gamarro F. *Leishmania* LABCG1 and LABCG2 transporters are involved in virulence and oxidative stress: functional linkage with autophagy. *Parasites & Vectors*. 2017, **10**(1):267.

**Perea A**, Manzano JI, Kimura Y, Ueda K, Castanys S, Gamarro F. *Leishmania* LABCG2 transporter is involved in ATP-dependent transport of thiols. *Biochemical Journal*. 2018, **475**(1):87-97.





## **AGRADECIMIENTOS**

Como no podría ser de otra forma, quiero dedicar un agradecimiento especial a mi familia. A mis padres, Francisco y María Jesús, que tanto esfuerzo han dedicado durante toda mi vida para que yo pudiera llegar a ser la persona que soy, dándome la oportunidad de aprender cada día un poco más y formar parte de esas personas que se dedican a hacer del mundo un lugar más grande. A mi hermano Javi, que a pesar de ser mayor que yo no ha dudado nunca de mis capacidades enseñándome cosas tan complicadas para un niño pequeño como la teoría del Big Bang o a no tener piedad en el ajedrez. Gracias a mi hermana Carol, siempre orgullosa de mi a pesar de haber sido una hermana pequeña un poco pesada que se aprendía de memoria palabras de sus libros de Biología. Y gracias por quererme y llevarme con ella a todos lados aun habiéndole quitado el puesto de la niña de la casa.

Otro apartado especial en los agradecimientos lo dedico a Nacho, que me ha ayudado tanto a lo largo de esta Tesis, ejerciendo de maestro al principio, y más tarde siendo un compañero de trabajo excepcional y un novio aún mejor si cabe.

Muchas gracias por supuesto a mi jefe Paco, por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por guiarme a lo largo de la Tesis y valorar mi esfuerzo. Gracias por intentar siempre que no me faltara de nada para poder continuar mi trabajo y por ayudarme a mejorar en todo momento mi formación como investigadora. Gracias a mis compañeros de laboratorio con los que he compartido tantas horas, a veces de alegría y a veces de frustración con los experimentos, y por echarme una mano cuando me hacía falta.

Doy las gracias también a Ueda-sensei y Kimura-sensei, mis jefes durante mi estancia en Japón, por aceptarme en su laboratorio y procurarme las herramientas y enseñanzas necesarias para avanzar en mis estudios. Gracias a mis compañeros de laboratorio de Kyoto, por tratar siempre de integrarme y ayudarme con todos esos programas y máquinas en japonés, haciendo mi estancia un poco más sencilla y agradable.

Gracias a Jaime y MariAscen por ser unos grandes amigos y ayudarme tanto con la portada de la Tesis.

Gracias a mis cuñados, mis amigos de Miranda, de la Universidad de León y de Granada por haber estado ahí apoyándome y preocupándose del progreso de mi Tesis.

Y por último, gracias a todos aquellos que me han ayudado a lo largo de mi vida para llegar a este momento.

# ÍNDICE



<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	4
<b>LEISHMANIASIS</b> .....	4
Epidemiología .....	4
Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis .....	11
<i>Leishmania</i> : Agente etiológico .....	12
Bioquímica y Biología del parásito .....	14
Respuesta inmunológica del hospedador .....	37
Diagnóstico de la leishmaniasis .....	39
Prevención y control del vector .....	40
Desarrollo de vacunas .....	41
Tratamiento de la leishmaniasis .....	44
Mecanismos de resistencia a fármacos en <i>Leishmania</i> .....	50
<b>TRANSPORTADORES ABC</b> .....	55
Clasificación de los transportadores ABC .....	60
Mecanismo de acción de los transportadores ABC .....	60
Transportadores ABC en <i>Leishmania</i> .....	62
<b>OBJETIVOS</b> .....	69
<b>MATERIAL</b> .....	71
Líneas celulares .....	71
Animales .....	71
Medios y reactivos empleados en el cultivo de <i>Leishmania</i> .....	71
Medios para el cultivo de bacterias .....	73
Medio para el cultivo de células THP-1 .....	73

## Índice

---

Medio para el cultivo de células Sf9.....	73
Reactivos de Biología Molecular.....	74
Compuestos y reactivos para el estudio funcional de LABCG2.....	75
Reactivos para inmunodetección.....	77
<b>TAMPONES Y SOLUCIONES.....</b>	<b>78</b>
Soluciones generales.....	78
Soluciones y reactivos para la electroforesis de proteínas.....	79
Soluciones para Western blot e inmunodetección.....	80
Soluciones para la actividad ATPasa y transporte en membranas de células Sf9.....	80
<b>VECTORES PLASMÍDICOS.....</b>	<b>81</b>
Vectores de clonaje.....	81
Vectores de expresión.....	81
<b>OLIGONUCLEÓTIDOS.....</b>	<b>81</b>
Clonaje de LABCG2 en vectores de expresión para <i>Leishmania</i> .....	81
Clonaje de LABCG2 en vectores de expresión para Sf9.....	82
Secuenciación de LABCG2.....	82
Análisis de los niveles de expresión de LABCG2.....	82
Mutación del gen LABCG2.....	82
<b>MÉTODOS.....</b>	<b>83</b>
Cultivo de <i>Leishmania</i> .....	83
Cultivo de bacterias.....	83
Cultivo de células THP-1.....	83
Cultivo de células Sf9.....	84
Criopreservación de los parásitos.....	84

---

Preparación de células competentes .....	84
Transformación de células competentes por choque térmico .....	85
Obtención de DNA genómico de parásitos .....	85
Aislamiento del gen LABCG2.....	85
Secuenciación del DNA .....	86
Aislamiento de DNA plasmídico .....	86
Mutagénesis dirigida .....	86
Diseño de las construcciones para sobreexpresar LABCG2 en <i>Leishmania major</i> .....	87
Diseño de las construcciones para sobreexpresar LABCG2 en células Sf9 .....	87
Generación de la línea mutante nulo para los genes LABCG1 y LABCG2 de <i>Leishmania</i> .....	87
Medida de la expresión del transportador LABCG2 mediante RT-PCR.....	88
Transfección de DNA plasmídico por electroporación en <i>Leishmania</i> .....	88
Generación de baculovirus recombinantes y expresión en células de insecto Sf9.....	89
Preparación de membranas procedentes de células Sf9 que sobreexpresan LABCG2.....	89
Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE .....	89
Análisis mediante Western Blot .....	90
Biotinilación de las proteínas de la superficie de la membrana plasmática de <i>Leishmania</i> .....	91
Determinación de la susceptibilidad a fármacos en formas promastigotes y amastigotes intracelulares de <i>Leishmania</i> .....	92
Determinación de la acumulación y eflujo de antimonio en líneas de <i>Leishmania</i> mediante ICP-MS .....	93



## Índice

---

Determinación de tioles no proteicos .....	94
Infección de células THP-1 por líneas de <i>Leishmania</i> .....	95
Infección <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneales de ratón .....	96
Infección <i>in vivo</i> en un modelo murino de leishmaniasis .....	97
Estudio de autofagia en líneas de <i>Leishmania</i> .....	97
Determinación de la actividad ATPasa en membranas que sobreexpresan LABCG2.....	97
Ensayos de transporte de [ <sup>3</sup> H]-GSH en membranas de células Sf9 .....	98
<b>RESULTADOS</b> .....	99
Capítulo 1: Implicación del transportador LABCG2 de <i>Leishmania</i> en la resistencia a antimonio .....	99
Capítulo 2: Implicación de los transportadores LABCG1 y LABCG2 de <i>Leishmania</i> en virulencia y autofagia .....	128
Capítulo 3: Implicación de LABCG2 en el transporte de tioles.....	164
<b>DISCUSIÓN</b> .....	188
<b>CONCLUSIONES</b> .....	204
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	206

**RESUMEN**



---

## RESUMEN

La leishmaniasis es un conjunto de patologías producidas por varias especies del protozoo parásito *Leishmania*. Está considerada como la segunda enfermedad más importante causada por parásitos después de la malaria. Se estima que 350 millones de personas en el mundo se encuentran en riesgo de padecer la enfermedad, con 0,9-1,3 millones de casos nuevos y entre 20.000-30.000 defunciones al año con 12 millones de casos clínicos entre la población mundial, entre los que se distinguen 0,7-1,3 millones de casos de leishmaniasis cutánea y 0,2-0,4 millones de casos de leishmaniasis visceral.

Aunque se han obtenido resultados prometedores para la elaboración de distintas vacunas frente a la leishmaniasis, por ahora no existe ninguna vacuna eficaz y exenta de riesgos, ni métodos eficaces de control del insecto vector.

Por lo tanto, la única herramienta actual de lucha frente a la leishmaniasis es la quimioterapia. Actualmente existe un reducido arsenal de fármacos para el tratamiento de la leishmaniasis, y su eficacia se está viendo comprometida, entre otros factores, por la aparición de resistencias a los fármacos de primera línea de acción como los antimoniales. En la India, el fallo terapéutico alcanza al 60% en pacientes con leishmaniasis visceral, debido a un incremento en la resistencia a fármacos basados en antimonio como los antimoniales pentavalentes.

Un mecanismo crucial de resistencia a antimonio en *Leishmania* implica la disminución de la concentración intracelular del fármaco mediante su eflujo a través de transportadores ABC. Los transportadores ABC representan una de las familias más amplias de proteínas descritas. Están altamente conservadas desde procariotas a humanos y juegan papeles fisiológicos clave transportando diferentes compuestos a través de las membranas biológicas. En *Leishmania major* hay 42 genes que codifican para transportadores ABC. Teniendo en cuenta la homología en las secuencias de los dominios de transmembrana y de unión al ATP, los transportadores ABC en *Leishmania* se agrupan en 9 subfamilias (ABCA-ABCI). Los transportadores ABC de eucariotas pueden codificar para full-transporters o half-

## Resumen

---

transporters, como es el caso de la subfamilia ABCG, que presentan su dominio de unión al ATP en el extremo N-terminal y necesitan homo o heterodimerizar para reconstituir los sitios de unión a ATP y generar una proteína activa.

A lo largo de la presente tesis doctoral se ha estudiado la implicación del transportador LABCG2 en la resistencia a fármacos, infectividad y metabolismo de tioles en *Leishmania*. El transportador LABCG2 pertenece a la subfamilia de transportadores ABCG y tiene dos repeticiones imperfectas adicionales en tándem en el cromosoma 6 de *Leishmania* conocidas como LABCG1 y LABCG3. LABCG1 y LABCG2 presentan un 95% de identidad, pero la proteína LABCG3 está truncada y no es un transportador funcional.

Datos previos demuestran la implicación de otros transportadores ABCG en la resistencia a fármacos, lo que hace interesante conocer la función de LABCG2 en este área. En este trabajo de Tesis Doctoral hemos comprobado que la sobreexpresión de LABCG2 en formas promastigotes de *Leishmania* confiere resistencia a Sb<sup>III</sup> debido a una menor acumulación de este compuesto por un incremento de su eflujo, probablemente como complejos tior-Sb<sup>III</sup>. Además, hemos observado que la resistencia a Sb<sup>III</sup> se mantiene en las formas intracelulares amastigotes, que muestran también resistencia a Sb<sup>V</sup>. Adicionalmente, los parásitos que sobreexpresaban el transportador LABCG2 presentaron un reducido contenido interno de tioles no proteicos, así como un eflujo significativo de los mismos al medio sin la necesidad de conjugarse a Sb<sup>III</sup>. Mediante ensayos de biotilación hemos detectado la presencia del transportador LABCG2 en la membrana plasmática de *Leishmania*. Este resultado, en conjunción con estudios anteriores de localización subcelular, sugiere que este transportador está localizado en vesículas intracelulares que se fusionarían con la membrana plasmática liberando el contenido al medio extracelular.

Además de su papel en la resistencia a fármacos, a lo largo del presente trabajo de Tesis Doctoral hemos demostrado que LABCG2 está también implicado en la infectividad de *Leishmania*, puesto que parásitos mutantes nulos para LABCG1-2 presentan una reducción en el porcentaje de infección y entrada a los macrófagos. Adicionalmente, empleando un modelo murino de leishmaniasis, se ha observado

que estos parásitos generan menos inflamación y lesiones en las patas de los ratones infectados, destacando la importancia del transportador LABCG2 para el desarrollo de la enfermedad.

En este trabajo de Tesis Doctoral demostramos que los parásitos mutantes nulos para LABCG1-2 tienen reducido el porcentaje de células con autofagosomas, el cual aumenta al depletar los niveles de tioles intracelulares. Además, esta línea presenta un contenido interno de tioles no proteicos significativamente mayor que la línea salvaje, siendo GSH y T(SH)<sub>2</sub> las principales moléculas acumuladas. En consonancia con estos resultados, hemos demostrado que tanto los tioles GSH y T(SH)<sub>2</sub> como sus formas oxidadas GSSG y T(S)<sub>2</sub> estimulan la actividad ATPasa basal del transportador LABCG2 expresado en vesículas de membranas de células Sf9, siendo T(SH)<sub>2</sub> y TS<sub>2</sub> los compuestos que generan una mayor estimulación. De hecho, LABCG2 es capaz de transportar <sup>3</sup>H-GSH al interior de dichas vesículas de forma dependiente de ATP. Probablemente LABCG2 también transporta GSH, GSSG, T(SH)<sub>2</sub>, TS<sub>2</sub> y Metil-GS, ya que se ha observado que estos compuestos, especialmente T(SH)<sub>2</sub> y TS<sub>2</sub>, compiten por la acumulación de <sup>3</sup>H-GSH.

En resumen, hemos demostrado que el transportador LABCG2 está implicado en la resistencia a antimonio mediante un incremento de su eflujo al exterior celular, probablemente acompañado con tioles. Adicionalmente, hemos confirmado que la ausencia de este transportador provoca defectos en la infectividad del parásito y también en el proceso de autofagia mediante su implicación en el metabolismo de los tioles. Finalmente, nuestros resultados presentan a LABCG2 como el primer transportador de tioles no conjugados en *Leishmania*.



# INTRODUCCIÓN





## **INTRODUCCIÓN**

### **LEISHMANIASIS**

La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades que abarca desde lesiones cutáneas asintomáticas hasta su forma visceral, la cual es mortal en ausencia de tratamiento. Esta enfermedad está causada por el protozoo parásito *Leishmania*, cuya transmisión principalmente se produce a través de la picadura por insectos dípteros de los géneros *Phlebotomus* y *Lutzomya*.

### **Epidemiología**

La leishmaniasis está especialmente asociada a países en vías de desarrollo, donde obtener datos epidemiológicos exactos es con frecuencia complicado. Se estima que aproximadamente 350 millones de personas en el mundo se encuentran en riesgo de padecer la enfermedad, con 12 millones de casos clínicos entre la población mundial, entre 20.000 y 30.000 defunciones, así como 0,9-1,3 millones de casos nuevos al año, entre los que se distinguen 0,7-1,3 millones de casos de leishmaniasis cutánea (CL) y 0,2-0,4 millones de casos de leishmaniasis visceral (VL) (WHO 2016).

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), la incidencia de la leishmaniasis se ha incrementado 42 veces en las últimas dos décadas, actualmente está considerada como la segunda enfermedad en importancia dentro de las enfermedades parasitarias. La leishmaniasis está asociada a la malnutrición, debilidad del sistema inmunitario, las malas condiciones de vivienda y la falta de recursos económicos.

En 2014, más del 90% de los nuevos casos de VL notificados a la OMS se produjeron en seis países: Brasil, Etiopía, India, Somalia, Sudán y Sudán del Sur. En cuanto a la CL, el 95% de los casos se produce en las Américas, la cuenca del Mediterráneo, Oriente Medio y Asia Central. Específicamente, más de los dos

## Introducción

tercios de los nuevos casos aparecen en Afganistán, Argelia, Brasil, Colombia, Irán y Siria. Además, el 90% de los casos de leishmaniasis mucocutánea se producen en Brasil, Bolivia y Perú (Fig. 1).

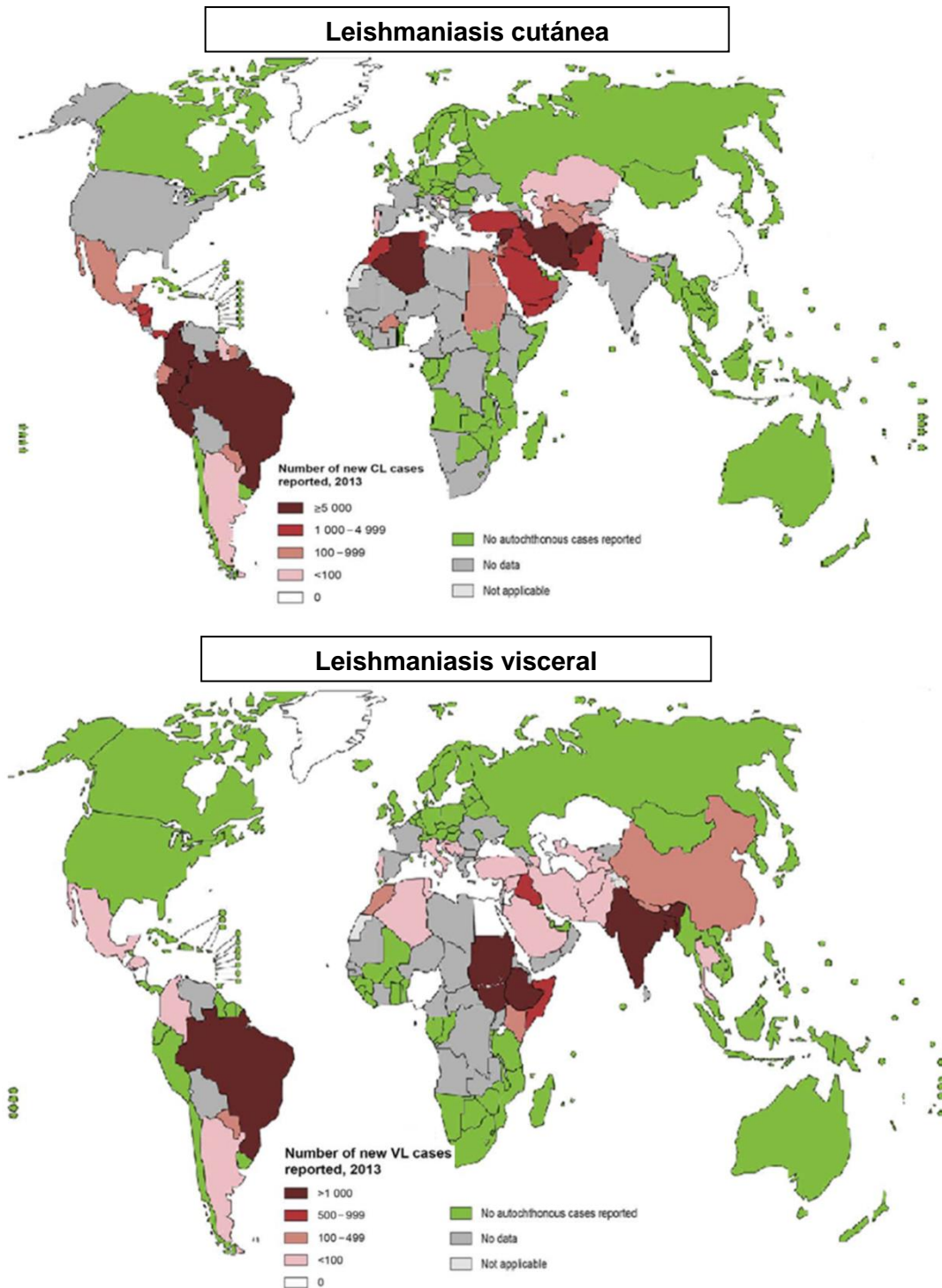


Figura 1. Distribución mundial de la leishmaniasis en 2013. (<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>)

Los cambios ambientales y el impacto del ser humano han generado la aparición de nuevos focos así como un cambio en los patrones de transmisión.

En primer lugar, a consecuencia del calentamiento global, la leishmaniasis se ha diseminado por zonas donde hasta ahora el estado larvario de los vectores se veía comprometido por las bajas temperaturas, además de ampliarse la época de cría (Schonian G et al. 2008). En segundo lugar, el aumento de la movilidad mundial ha permitido a las diferentes especies de parásitos colonizar nuevos lugares. En tercer lugar, el desplazamiento de la población por cuestiones económicas tales como explotaciones agrícolas, ha incrementado el número de huéspedes humanos susceptibles de contraer la enfermedad. Igualmente, debido a la deforestación y urbanización, vectores y reservorios se han adaptado resultando en nuevos modelos de transmisión (Garcia A et al. 2007).

La leishmaniasis puede considerarse como una enfermedad oportunista en individuos inmunodeprimidos como los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), individuos que hayan sufrido un transplante de órganos, o pacientes sometidos a quimioterapia para la eliminación de tumores o que presenten enfermedades del sistema inmunitario (Alvar J et al. 2008).

La infección con VIH es una de las causas mejor documentadas de inmunosupresión que favorecen la coinfección con leishmaniasis (principalmente visceral). En general, los pacientes que sufren de coinfección presentan menores tasas de curación de la leishmaniasis, mayor toxicidad producida por los medicamentos y mayores tasas de defunción en comparación con los pacientes inmunocompetentes. Adicionalmente, los pacientes coinfectados son una fuente de infección para otros humanos y para los vectores de transmisión (Alvar J y Jimenez M. 1994).

Hasta ahora, las mayores tasas de coinfección por *Leishmania* y VIH se han descrito en Brasil, Etiopía y el estado indio de Bihar (WHO, 2017). En Europa, se ha observado un descenso en la incidencia de coinfección atribuida al uso de la terapia antiretroviral HAART (High Active Anti-Retroviral Therapy) (Alvar J et al. 2008).

## Introducción

---

La leishmaniasis en animales domésticos, especialmente la leishmaniasis canina, presenta un alto interés desde una perspectiva veterinaria y epidemiológica. Adicionalmente, los animales infectados constituyen reservorios potenciales para que se produzca la infección en humanos. En concreto, los perros están considerados como el principal reservorio de *Leishmania infantum*, la cual también causa VL en humanos. La leishmaniasis canina se distribuye por todos los continentes excepto en Oceanía (Dantas-Torres F et al. 2012) y se estima que 2,5 millones de perros están infectados por *L. infantum* en el suroeste de Europa (Pennisi MG. 2015).

La leishmaniasis está empezando a aparecer en latitudes del norte donde los vectores están ausentes o en baja densidad como el este de los Estados Unidos y Canadá (Duprey ZH et al. 2006), además de Alemania (Harms G et al. 2003). La mayoría de estas infecciones corresponden a leishmaniasis canina, la cual se explica por el movimiento de perros desde zonas endémicas seguidos de la transmisión vertical entre perra y cachorro (Duprey ZH et al. 2006).

En Europa, el perro doméstico es el principal reservorio de *L. infantum* (Ready PD. 2008; Marty P et al. 2007). El gato doméstico podría ser considerado como el segundo reservorio de este parásito en importancia puesto que para *L. infantum*, existe una seroprevalencia aproximada del 6% en gatos del noroeste de la cuenca mediterránea (Solano-Gallego L et al. 2007).

### Situación epidemiológica de la leishmaniasis en Europa

En la Union Europea, la leishmaniasis está producida especialmente por dos especies endémicas: *L. infantum*, que causa CL y VL de origen zoonótico en humanos y perros domésticos, y *Leishmania tropica*, que causa leishmaniasis cutánea antroponótica.

Actualmente, la aparición de la leishmaniasis en Europa está asociada a tres causas principales:

1. la introducción de especies o cepas de *Leishmania* externas a Europa a través de viajes de personas (Desjeux P. 2001) y perros domésticos (Trotz-Williams LA y Trees AJ. 2003).
2. La dispersion natural de la CL y VL desde la cuenca mediterránea, donde *L. infantum* y *L. tropica* son endémicas, a regiones de Europa templadas donde existe el vector pero no la enfermedad (Ready PD. 2008).
3. La re-emergencia en la cuenca mediterránea de Europa debido al aumento de personas inmunodeprimidas.

Existe una elevada prevalencia de personas en el sur de Europa que no presentan síntomas como portadores de *L. infantum* (Moral L et al. 2002; Martín-Sánchez J et al. 2004), por lo cual se especula que podría encontrarse de forma latente entre la población. Esta hipótesis está apoyada por el alto número de coinfecciones entre el VIH y *Leishmania* observada desde 1980 (Alvar J et al. 1997).

En cuanto a la distribución geográfica, la CL y VL causada por *L. infantum* está distribuida a través de la cuenca mediterránea, mientras que la CL causada por *L. tropica* tiene lugar en Grecia de forma esporádica y probablemente en países vecinos (Fig. 2), presentando un gran riesgo de propagación de la enfermedad al resto del continente por el movimiento de viajeros y emigrantes (Ready PD. 2008; Desjeux P. 2001).

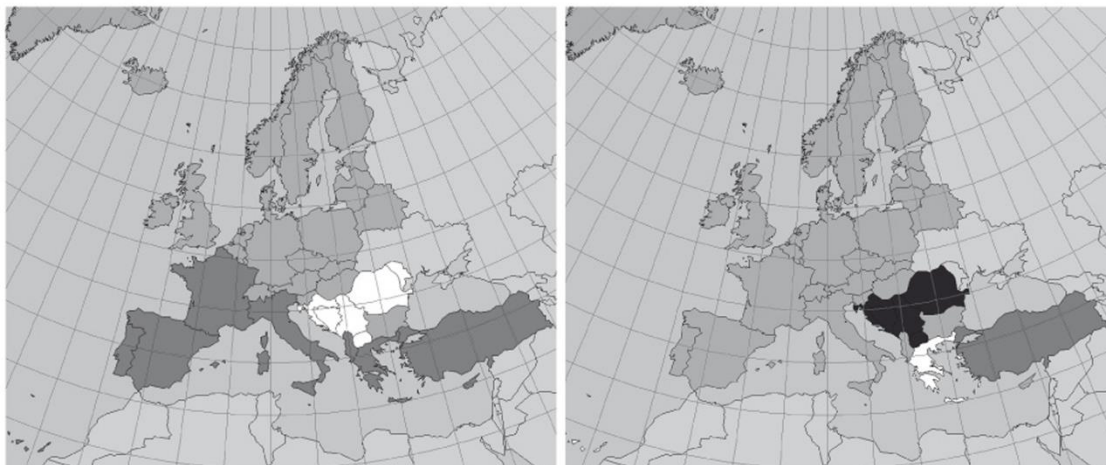


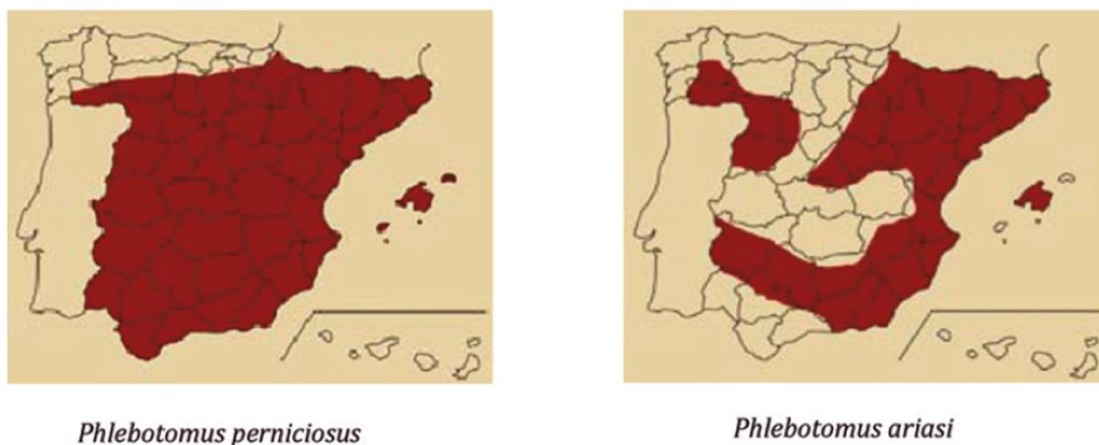
Figura 2. Distribución por países de las especies de *Leishmania* transmitidas por flebotomos hasta 2009. Panel izquierdo: *L. infantum*. Panel derecho: *L. tropica*. Gris: ausente, gris oscuro: presente, blanco: esporádico, negro: infección sin tipificar. (Ready PD. 2010).

Sin embargo, la dispersión inter-continental de los vectores es improbable puesto que los flebotomos no son tan resistentes como otros mosquitos. Además, se cree que los vectores americanos son inapropiados para portar las especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo y que las especies de *Leishmania* nativas de América tienen huéspedes que no hay en Europa (Ready PD. 2010).

### Situación epidemiológica de la leishmaniasis en España

En España, la leishmaniasis es una zoonosis endémica presente en la mayor parte del territorio peninsular e Islas Baleares. El parásito que se detecta es *L. infantum* y su reservorio principal es el perro doméstico que actúa como amplificador del ciclo de transmisión, ya que más del 50% de los perros infectados son portadores asintomáticos y mantienen la misma capacidad de transmitir el parásito que los sintomáticos. Los vectores que la transmiten son los flebotomos, con dos especies reconocidas: *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi*. Estos se encuentran distribuidos por todo el territorio peninsular, por lo que el riesgo de transmisión de *L. infantum* existe en todo aquel lugar en el que se den las condiciones apropiadas para que circule el parásito (Fig. 3) (Suarez-Rodriguez B et al. 2012).





**Figura 3. Distribución geográfica de *Phlebotomus perniciosus* y *Phlebotomus ariasi* en España (Suarez-Rodriguez B et al. 2012).**

En España la enfermedad se presenta de distintas formas: endémica, en el que los casos se presentan de forma esporádica; asociada a coinfección con VIH, la cual se observó por primera vez en los años 80; y en situaciones de inmunodepresión (Suarez-Rodriguez B et al. 2012).

Desde 1996 hasta 2011, la RENAVE detectó 1.755 casos con una incidencia anual de 0,45 casos/100.000 habitantes (Suárez Rodríguez B et al. 2012). Las mayores cifras de incidencia se registraron en Baleares, Valencia, Madrid, Andalucía y Cataluña. Desde 2009 está teniendo lugar un brote en el suroeste de la comunidad de Madrid, con cerca de 400 casos detectados y la presencia de la lebre como nuevo reservorio (Molina R et al. 2012). El 36,6% de los casos presentaron VL y el 63,4% restante, CL, residiendo la mayoría de las personas afectadas en Fuenlabrada (Suarez-Rodriguez B et al. 2012).

Según los datos recopilados de 1997 a 2008, las mayores tasas de hospitalización por leishmaniasis en pacientes sin coinfección con VIH, se dieron en niños menores de 5 años, mientras que la coinfección con este virus estaba asociada con un aumento de los casos de leishmaniasis en el rango de 17-65 años edad, especialmente entre los 25-49 años (Gil-Prieto R et al. 2011).



### **Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis**

La leishmaniasis presenta una amplia variedad de síntomas que abarcan desde lesiones cutáneas o la más severa forma mucocutánea, hasta la forma visceral, que es fatal si no se trata.

La **leishmaniasis cutánea** se encuentra presente tanto en el Viejo Mundo, donde está causada principalmente por *L. tropica*, *Leishmania major* y *Leishmania aethiopica*, aunque *L. infantum* y *Leishmania donovani* pueden estar implicadas como en el Nuevo Mundo (donde clásicamente está provocada por *Leishmania mexicana*, *L. major* y *Leishmania chagasi*). Esta forma se reconoce por lesiones ulcerativas con una depresión central y borde endurecido que con el tiempo dan lugar a cicatrices (Fig. 4-A). Otra variación de la enfermedad incluye la **leishmaniasis mucocutánea**, causada especialmente por *Leishmania braziliensis*. Su origen se explica por la diseminación de los amastigotes desde la piel hasta la mucosa nasofaríngea, culminando en la destrucción de los tejidos de la boca, nariz y garganta (Fig. 4-B). Una forma clínica de la CL es la leishmaniasis recidivante, que se caracteriza por una lesión facial solitaria que se cura en el centro pero se amplía gradualmente a lo largo del tiempo. La leishmaniasis cutánea difusa es una forma rara de la CL que se produce en casos de inmunidad celular deficiente. Está causada por *Leishmania aethiopica* en el Viejo Mundo y *Leishmania mexicana* en el Nuevo Mundo, y presenta nódulos diseminados no ulcerativos que contienen el parásito (Fitzpatrick TB et al. 2009). La **leishmaniasis visceral**, también llamada Kala-azar, está causada principalmente por *L. donovani* y *L. infantum* en el Viejo Mundo y *L. chagasi* en el nuevo mundo. La VL es la forma de leishmaniasis más agresiva, y presenta una serie de manifestaciones clínicas entre las que podemos encontrar brotes de fiebre, pérdida de peso, hepatosplenomegalia, pancitopenia (que incluye anemia, trombocitopenia, leucopenia, neutropenia, linfocitosis y monocitosis) (Fig. 4-C). Es importante señalar que la VL es una infección sistémica generalmente fatal sin tratamiento (Herwaldt BL. 1999). Una variación de esta enfermedad es la denominada leishmaniasis dérmica post-kala-azar (PKDL), una manifestación que se caracteriza por la presencia de nódulos endurecidos o máculas

despigmentadas y que se desarrolla a veces en pacientes que han superado la VL. PKDL es muy común en Sudán, ocurriendo en más del 50% de los pacientes que sufren VL (Zijlstra EE et al. 2003). Sin embargo, en el subcontinente Indio, solo el 10% de los casos de VL tornan en PKDL (Ramesh V y Mukherjee A. 1995). Los individuos con PKDL constituyen un importante reservorio de infección, ya que son más accesibles a los vectores al presentar una localización dérmica.



Figura 4. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis cutánea (A), mucocutánea (B) y visceral (C).

### **Leishmania: Agente etiológico**

*Leishmania* es un protozoo parásito intracelular monoflagelado. Fue descubierto simultáneamente por Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg y Vianna a finales del siglo XIX. Pertenece a la familia *Trypanosomatidae*, orden *Kinetoplastida*, clase *Zoomastigophorea*, filum *Sarcomastigophora*. Su clasificación taxonómica aceptada actualmente en base a la unificación de hallazgos clínicos, serológicos, inmunopatológicos, epidemiológicos y geográficos, incluye el complejo *L. mexicana* que comprende tres especies (*L. mexicana*, *Leishmania enriettii* y *Leishmania amazonensis*), un complejo *L. donovani* con tres especies (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. chagasi*), las

## Introducción

especies *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, y un grupo del subgénero *Viannia* con otras cuatro especies (*L. (V) braziliensis*, *Leishmania (V) guyanensis*, *Leishmania (V) panamensis* y *Leishmania (V) peruviana*) (Fig. 5). Las diferentes especies son muy similares morfológicamente, aunque se diferencian por su composición en isoenzimas, antígenos, patología y sensibilidad a fármacos (Mimori T et al. 1989; Walton BC. 1989).

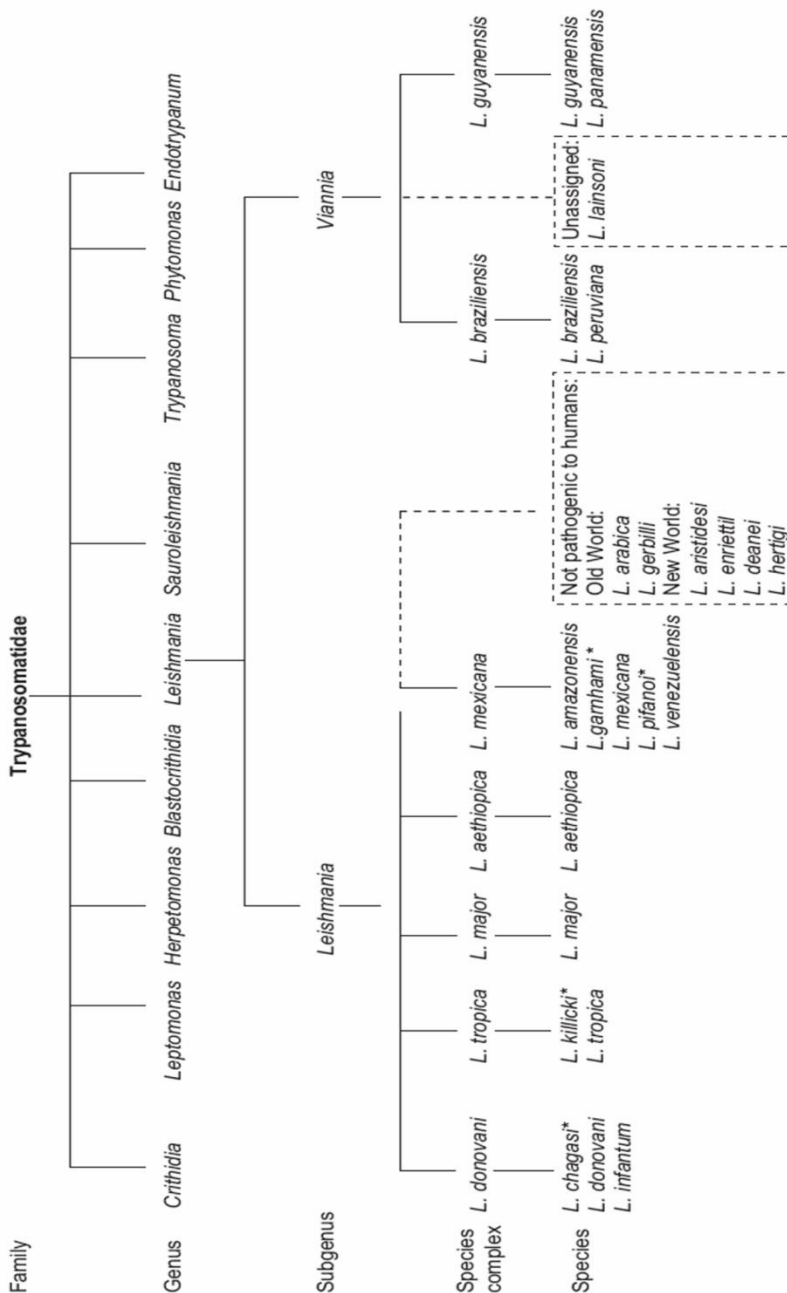


Figura 5. Taxonomía de *Leishmania* (Bañuls AL et al. 2007).

## **Bioquímica y Biología del parásito**

La leishmaniasis está causada por diferentes especies de protozoos parásitos unicelulares del género *Leishmania* (orden kinetoplastida). Durante su ciclo de vida digenético, *Leishmania* alterna entre dos ambientes extremos a los que el parásito debe adaptarse: el huésped mamífero y el insecto vector.

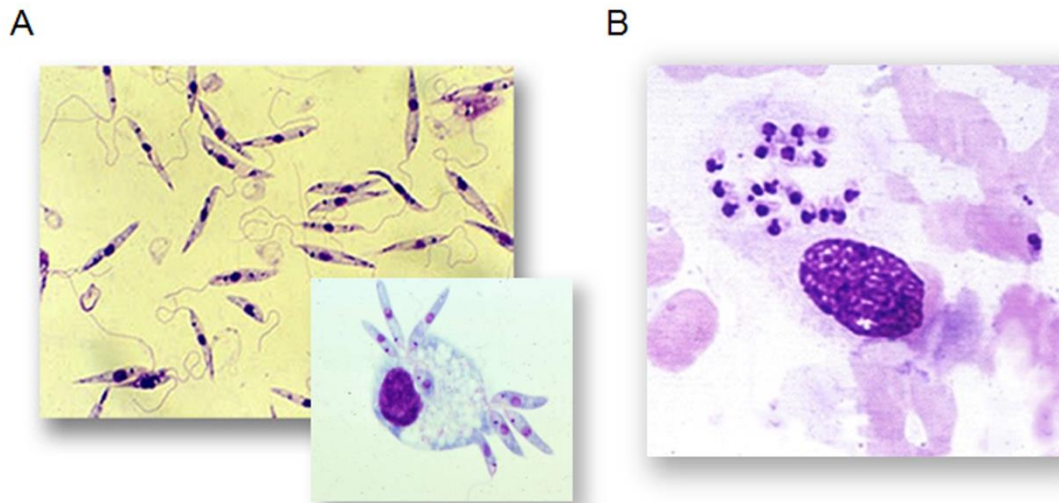
Las moscas de la arena relacionadas con la transmisión de la enfermedad pertenecen a la familia *Psychodidae*, al menos 70 especies son capaces de transmitir la enfermedad. En el Viejo Mundo, los transmisores de la enfermedad pertenecen al género *Phlebotomus*, mientras que en América, son representantes del género *Lutzomyia* (Fig. 6). Poseen un pecho arqueado, alas lanceoladas, cuerpo veloso y amarillento, y miden entre 1,5 y 3 mm (Feliciangeli MD y Rabinovich JE. 1998). Viven en ambientes oscuros y húmedos a temperaturas por encima de 18°C y tienen actividad crepuscular (Cattland P et al. 2006). Las hembras son hematófagas ya que necesitan la sangre para la maduración de su descendencia, por lo que son las que transmiten el parásito.



**Figura 6. Insectos vector hembras pertenecientes a las especies *Phlebotomus perniciosus* (Izquierda) y *Lutzomyia longipalpis* (derecha).**

### **El ciclo de vida de *Leishmania***

Durante su ciclo de vida, *Leishmania* pasa por dos huéspedes. Por un lado, vive como parásito intracelular (amastigote) en los macrófagos de vertebrados mamíferos, y por otro lado, como parásito extracelular (promastigote) en el aparato digestivo del insecto vector (Bates PA y Rogers ME. 2004) (Fig. 7).



**Figura 7. (A) Formas promastigotes y (B) formas amastigotes intracelulares de *Leishmania*.**

Los insectos ingieren sangre del hospedador infectado y regurgitan promastigotes a un nuevo hospedador al perforar la piel para volverse a alimentar. Entonces, los parásitos son reconocidos por receptores de superficie de macrófagos y células dendríticas y son fagocitados. Es interesante el hecho de que los parásitos sobreviven con mayor dificultad en ratones que carecen de neutrófilos. Este resultado apoya la hipótesis de que los parásitos utilizan a los leucocitos polimorfonucleares como primeras células fagocíticas encontradas en el huésped a modo de “caballo de troya”, para entrar en los macrófagos (Peters NC et al. 2008). Se ha sugerido un segundo modelo denominado “conejo de troya” en el que los parásitos “escaparían” de los neutrófilos y serían fagocitados por los macrófagos al mismo tiempo que los neutrófilos apoptóticos (Ritter U et al. 2009). Una vez dentro de la célula, los promastigotes migrarían a los fagolisosomas y se diferenciarían en amastigotes, los cuales se dividirían por división binaria. La ruptura de los macrófagos infectados liberaría a los amastigotes que serían fagocitados por nuevos macrófagos expandiendo la infección. Los amastigotes serían ingeridos por el insecto vector durante la ingesta de sangre y se transformarían en promastigotes en su aparato digestivo, donde permanecerían 4-7 días diferenciándose en promastigotes infectivos. A continuación migrarían a



la probóscide del insecto y serían liberados en el sistema sanguíneo del huésped durante la alimentación, cerrando así el ciclo (Fig. 8).

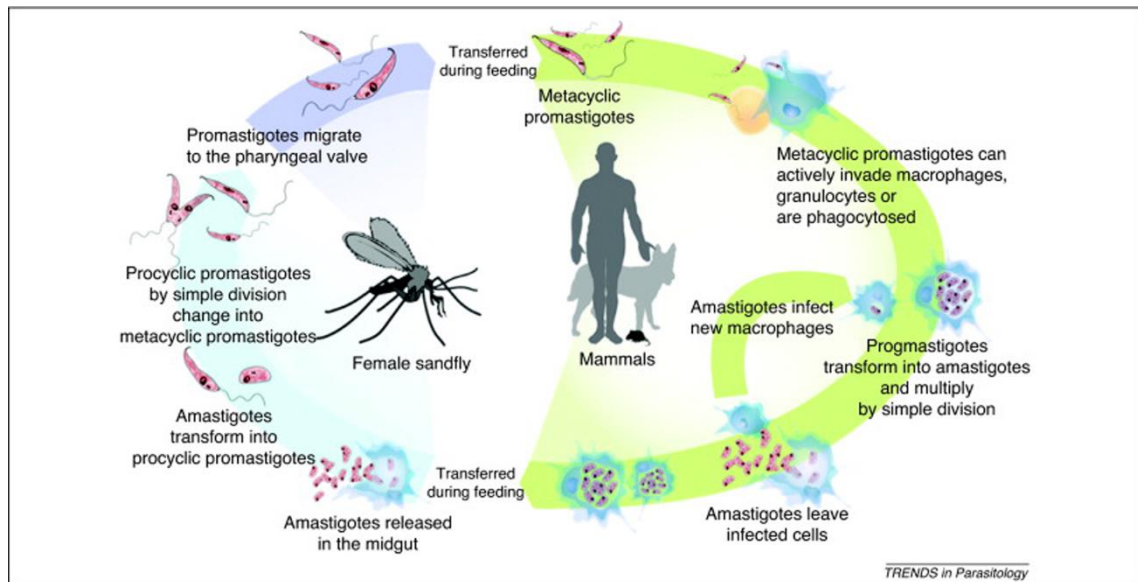


Figura 8. Ciclo de vida de *Leishmania*. (<http://es.wikipedia.org/wiki/Leishmaniasis>)

Como se ha citado, los promastigotes fagocitados por los macrófagos se diferencian en los fagolisosomas (Chang KP y Dwyer DM. 1976), que poseen un pH muy ácido (4,5-5,5) y a una temperatura de 37°C, a diferencia de los 26 °C que existen en el vector. Se ha observado que el lipofosfoglicano (LPG), uno de los componentes principales de la superficie de los promastigotes, juega un papel importante durante este proceso. Al parecer, el LPG es capaz de bloquear la maduración del fagosoma que contiene los promastigotes, restringiendo temporalmente la fusión de los fagosomas con compartimentos endocíticos tardíos como el lisosoma, generando una pausa que permitiría a los amastigotes prepararse para el brusco cambio ambiental (Moradin N y Descoteaux A. 2012; Späth GF et al. 2003; Holm A et al. 2001).

A mediados de los 80, David Sacks y colaboradores demostraron que el nivel de virulencia de *L. major* dependía de su estado de crecimiento. Los parásitos en fase logarítmica no eran virulentos mientras que en fase estacionaria eran muy infectivos (Sacks DL et al. 1985). Una caracterización bioquímica reveló que este fenómeno está relacionado con la longitud y complejidad de los LPG en la cara

## Introducción

---

externa de la membrana plasmática del parásito. El mismo estudio mostró que los amastigotes no sintetizan LPG y pierden esta molécula durante la diferenciación (Sacks DL. 1992).

Durante la diferenciación de *Leishmania* a formas amastigotes, los promastigotes pierden el flagelo, reducen su tamaño, cambian su forma alargada a una redondeada y alteran su metabolismo (Fig. 9). Por ejemplo, la glicolisis es más activa en los promastigotes mientras que la oxidación de los ácidos grasos es más activa en amastigotes (Opperdoes FR y Coombs GH. 2007). Además, la gluconeogénesis es esencial para la virulencia de los amastigotes y su diferenciación, mientras que los promastigotes pueden sobrevivir sin este proceso (Naderer T et al. 2006).

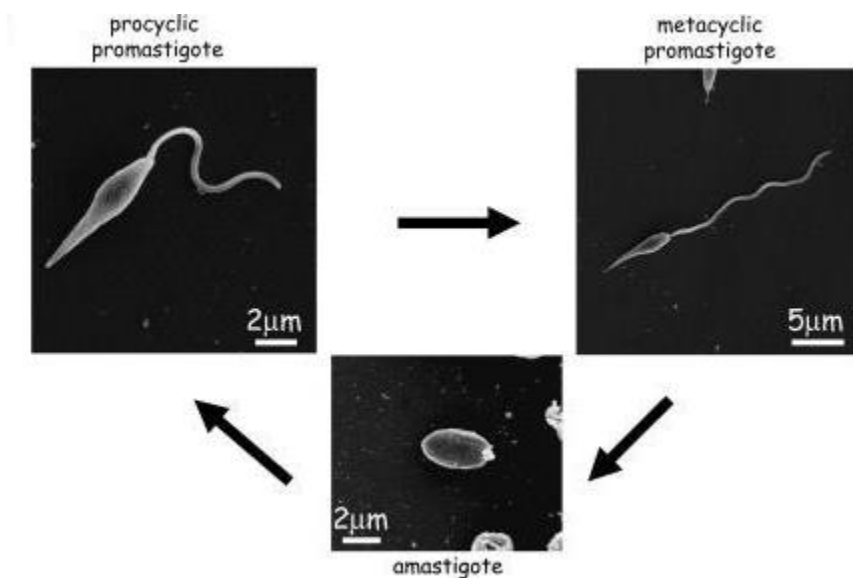


Figura 9. Cambios en la morfología celular durante el ciclo de vida de *Leishmania* (Besteiro S et al. 2007).

### Orgánulos y estructuras celulares de *Leishmania*

**Kinetoplasto:** El DNA mitocondrial de los tripanosomátidos se encuentra ubicado en una estructura cercana al bolsillo flagelar denominada kinetoplasto. (Fig. 10). El kinetoplasto alberga el 30% del DNA total de la célula y se compone de dos tipos de estructuras en forma de anillo denominadas minicírculos y maxicírculos. Existen en el kinetoplasto aproximadamente 20.000 minicírculos, que tienen un

tamaño entre 0,5 y 2,5 kb. Sin embargo, sólo de 20 a 50 maxicírculos presentan un tamaño que oscila entre 20 y 40 kb. Los maxicírculos son estructural y funcionalmente análogos al DNA mitocondrial de eucariotas superiores, codificando para rRNAs y subunidades de los complejos de la cadena respiratoria. Por otro lado, los minicírculos codifican para RNAs guías que modifican los transcritos de los maxicírculos mediante la inserción o delección de residuos de uridilato durante el proceso de edición del RNA (de Souza et al W. 2009).

Mitocondria: Los organismos del orden Kinetoplastida se caracterizan por la presencia de una única mitocondria ramificada (Fig. 10) a lo largo del parásito. En este orgánulo tienen lugar numerosas rutas del metabolismo energético, además de una cadena de transporte de electrones (CTE) muy activa, principal fuente de energía del parásito. Los promastigotes de *Leishmania* pueden entrar en una parada metabólica reversible al inhibir la CTE, hecho que no sucede por ejemplo, en *Trypanosoma*, que muere rápidamente al inhibir dicha actividad. Se ha sugerido que esto es debido a una adaptación a la ausencia de oxígeno en el interior del insecto vector (Opperdoes FR et al. 2007). También se ha descrito que las formas amastigotes dependen en menor medida de la cadena respiratoria que otros grupos de la familia (Fidalgo LM et al. 2011).

Acidocalcisosomas: Los acidocalcisosomas son organelos acídicos electrodensos que acumulan calcio y otros cationes además de altas concentraciones de fósforo en forma de pirofosfato y polifosfato (Docampo R et al. 2011). Se encuentran en un grupo variado de organismos, aunque fueron inicialmente definidos como tal en los tripanosomátidos (Vercesi AE et al. 1994; Docampo R et al. 1995). Son orgánulos esféricos con un diámetro de 0,2-0,6  $\mu\text{m}$ , cuyo número varía de una especie a otra de tripanosomátidos e incluso entre diferentes estadios de desarrollo dentro de la misma especie (Docampo R et al. 2005). Los acidocalcisosomas participan en una variedad de funciones, como el almacenaje de cationes, metabolismo del fosfato y calcio, autofagia, osmorregulación, virulencia, etc. (Docampo R y Huang G. 2016).



## Introducción

---

Glicosomas: Los glicosomas son unos orgánulos de origen peroxisomal característicos del orden *Kinetoplastida* que presentan una única bicapa fosfolipídica que encierra una matriz proteica densa. En *Leishmania*, la mayor parte de la glucólisis (vía metabólica de eucariotas mediante la cual se obtiene ATP), se desarrolla en los glicosomas (Fig. 10). A diferencia de la mayoría de los organismos, en los cuales la glucólisis es un proceso únicamente citosólico, en *Leishmania* solo tres de las enzimas que participan en esta vía se encuentran en el citosol. La compartimentalización de la glucólisis en los glicosomas permite a los parásitos sobrevivir a cortos periodos de anaerobiosis. Se ha observado que el contenido enzimático de los glicosomas varía a lo largo de los diferentes estadios de crecimiento de los tripanosomátidos. Existe una menor cantidad de enzimas glucolíticas en la fase procíclica (insecto vector), ya que se genera ATP mediante la respiración mediada por citocromo (Furuya T et al. 2002). Por otro lado, las enzimas glucolíticas son muy abundantes en los parásitos cuando crecen en ambientes en los que la glucosa es la fuente obligada de energía, como es el torrente circulatorio del hospedador mamífero (Gualdron-Lopez M et al. 2012; Furuya T et al. 2002). Además, se ha hipotetizado que el secuestro de las vías metabólicas para el metabolismo de los carbohidratos en los glicosomas permitiría al parásito adaptarse rápidamente a las nuevas condiciones nutricionales durante la diferenciación (Michels PA et al. 2006).

Además de la glucólisis, parte de otros sistemas metabólicos tienen lugar en los glicosomas, como son la ruta de las pentosas fosfato, la ruta gluconeogénica, biosíntesis de purinas y pirimidinas,  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos, biosíntesis de esteres lipídicos, biosíntesis de isoprenoides y mecanismos de defensa frente a agentes oxidativos (Michels PA et al. 2006).

Lisosoma o MVT (Multivesicular tubule) (Fig. 10): En *Leishmania*, existe una estructura tubulovesicular de naturaleza lisosomal que está considerada como el compartimento terminal de la ruta endocítica de los promastigotes (Waller RF y McConville MJ. 2002). Este orgánulo se encuentra estrechamente asociado con microtúbulos cuya función parece ser la de mantener su morfología y situación espacial en la célula. Existen evidencias de que el lisosoma sufre un proceso de

maduración cuando los promastigotes de *Leishmania* se diferencian desde su forma procíclica a parásitos metacíclicos. Por ejemplo, se produce un incremento de los niveles de cisteín proteasas del lisosoma así como una acidificación del mismo en los promastigotes metacíclicos (Waller RF y McConville MJ. 2002).

El lisosoma está implicado en procesos tales como defensa frente a la respuesta inmune del hospedador, adquisición de nutrientes, recambio proteico durante la diferenciación y resistencia a fármacos (Waller RF y McConville. MJ 2002).

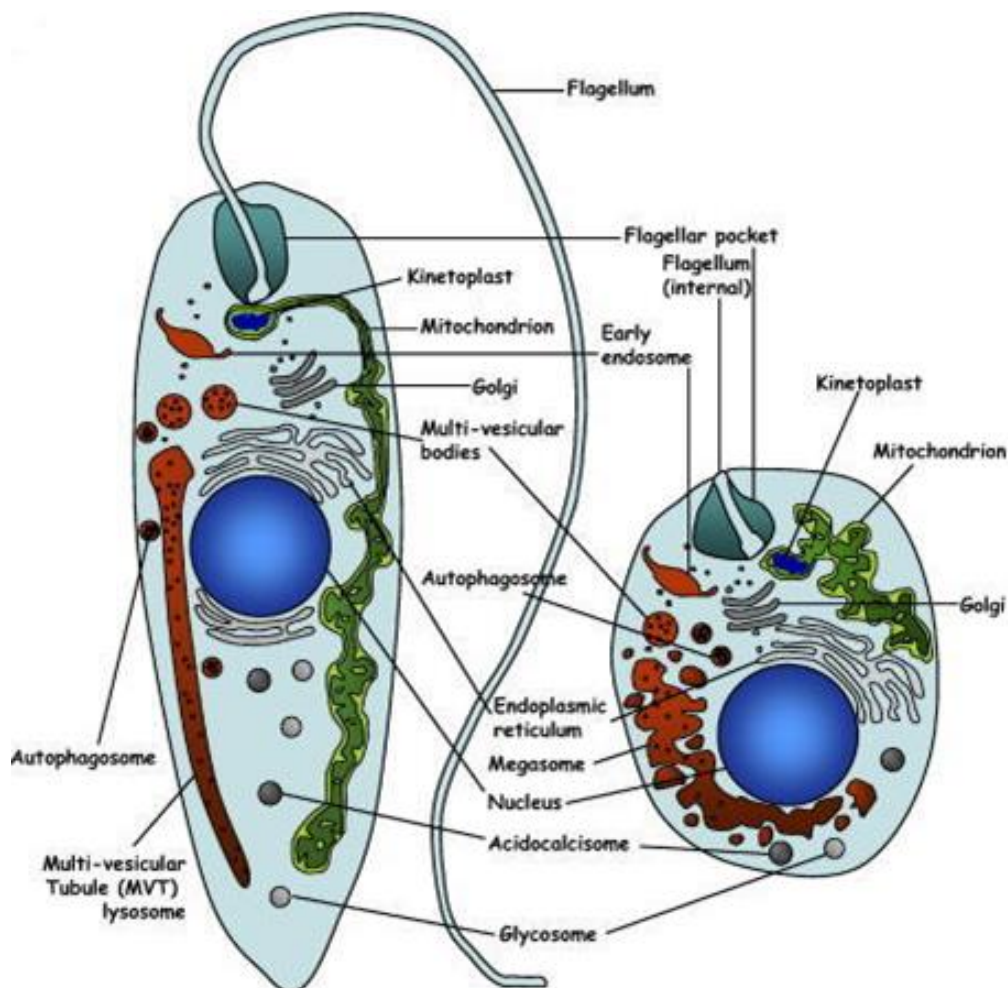


Figura 10. Representación esquemática de los orgánulos intracelulares principales de las formas promastigote (Izquierda) y amastigote (derecha) de *Leishmania* (Besteiro S et al. 2007).

## Introducción

---

Autofagosomas: La autofagia se define como el proceso por el cual la célula puede degradar sus propias proteínas. Uno de los objetivos más importantes de este recurso celular es el de eliminar orgánulos dañados o redundantes, aunque muchas otras funciones pueden ser atribuidas a la autofagia: supervivencia bajo condiciones de estrés nutricional mediante el reciclaje de componentes citoplásmicos, supervivencia en condiciones de estrés oxidativo como hipoxia y altas temperaturas, remodelación de la morfología celular y maquinaria metabólica durante cambios nutricionales o diferenciación, etc. (Brennan A et al. 2012). Además, al contrario de lo que ocurre en la mayoría de los organismos eucariotas, los tripanosomátidos exhiben un control mínimo sobre los niveles de proteínas durante la transcripción. En la mayoría de los casos, los cambios en la expresión de proteínas parecen estar controlados a nivel de estabilidad del mRNA o durante la traducción (Clayton CE. 2002). Sin embargo, estos mecanismos no pueden llevar a cabo ciertos cambios en muchas proteínas, sugiriendo que la degradación y recambio proteico juegan un papel importante a la hora de regular el nivel de las proteínas en *Leishmania*.

Existen diferentes formas de autofagia, incluyendo la macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. En contraste con los otros dos tipos de autofagia, la macroautofagia implica la formación de vesículas de novo de forma independiente al lisosoma. Durante este proceso, los componentes celulares son secuestrados en una vesícula de doble membrana conocida como autofagosoma que se fusiona con el lisosoma (o previamente al endosoma) (Fig. 11) permitiendo la degradación de los mismos.

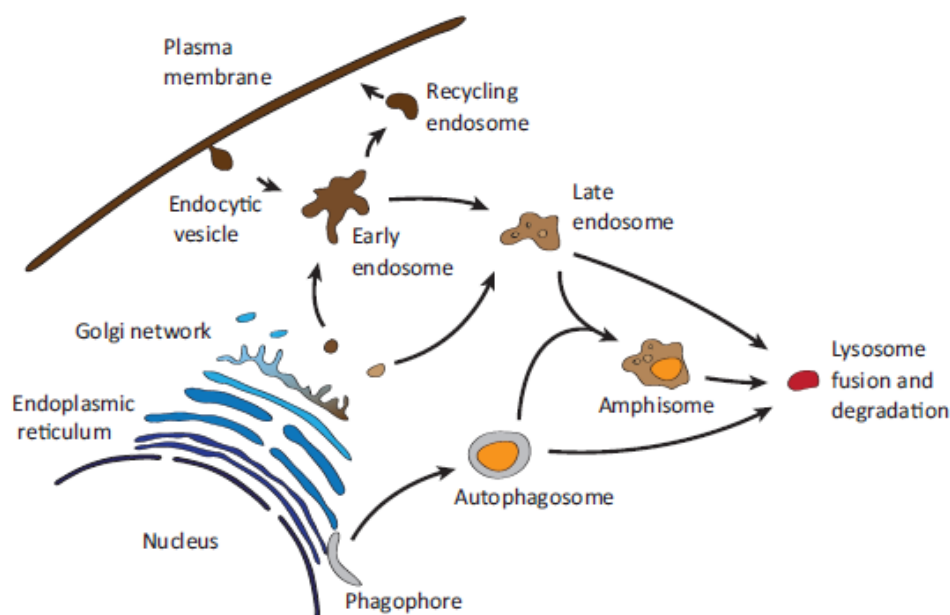


Figura 11. Tráfico endolisosomal (Shatz et al. 2016).

La formación del autofosoma en *Leishmania* incluye tres fases básicas: nucleación, expansión y cierre. Ciertos trabajos en células de mamífero y levaduras sugieren que el fagoforo (membrana pre-autofososomal) se forma inicialmente por la invaginación de la membrana del centro de una zona rica en fosfatidil inositol 3-fosfato (PI3P), llamada omegasoma. El origen de las membranas implicadas en este proceso es diverso, pero el retículo endoplasmático, la mitocondria, la membrana plasmática y el aparato de Golgi parecen estar implicados (Williams RA et al. 2012). A continuación, el complejo ATG12-ATG5-ATG16 se une al fagoforo. Posiblemente, este complejo promueve el anclaje de distintos precursores vesiculares, así como la lipidación de ATG8 con fosfatidiletanolamina (PE) (Hanada T et al. 2007; Romanov J et al. 2012) impulsando la acción catalítica de ATG3. El anclaje de ATG8-PE es clave para la formación y expansión del fagoforo. ATG4 corta el extremo C-terminal de ATG8 para exponer una glicina que se conjugará a PE a través de las acciones catalíticas de ATG7 y ATG3. La incorporación de ATG8-PE marca el comienzo de la adquisición de la carga, así como la expansión del fagoforo. Una vez completado el autofosoma, el complejo ATG12-ATG5-ATG16 se disocia de la vesícula y ATG4 libera proteolíticamente el ATG8 presente en la membrana

## Introducción

externa permitiendo el procesamiento del autofagosoma por el lisosoma (Williams RA et al. 2012) (Fig. 12).

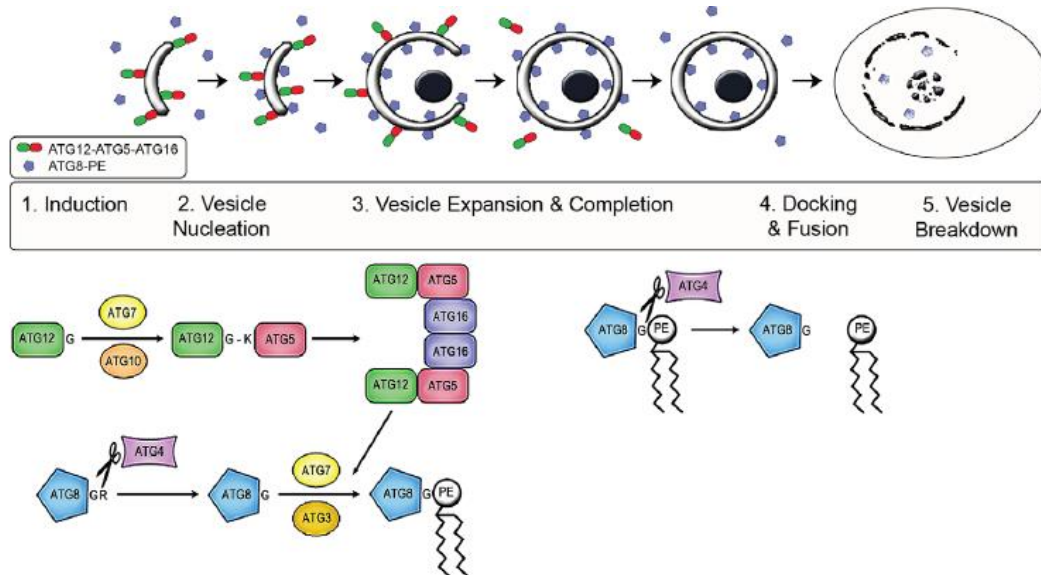


Figura 12. Fases de la macroautofagia (Williams RA et al. 2012).

En *Leishmania* se ha observado que el intercambio proteico originado por la macroautofagia es esencial para que se lleve a cabo la metaciclogénesis (proceso de diferenciación de promastigotes procíclicos a promastigotes metacíclicos altamente infectivos) y también para la diferenciación de los promastigotes a amastigotes (Besteiro S et al. 2007).

*Leishmania* presenta dos tipos de ATG4s, que presumiblemente actúan en las distintas fases de formación del autofagosoma. De hecho, se ha observado que la mutación del ATG4.2 de *Leishmania* afecta a la liberación de ATG8 en la fase final de la formación del autofagosoma, provocando fallos en la diferenciación del parásito (Besteiro S et al. 2006). Curiosamente, hay estudios que defienden que el bloqueo de la ATPasa VPS4, que está relacionada con la formación de endosomas tardíos, provoca un aumento del número de autofagosomas que no pueden ser procesados por el lisosoma, afectando al proceso de metaciclogénesis y consecuentemente a la supervivencia del parásito (Besteiro S et al. 2006).

Flagelo: el flagelo y zonas asociadas a él cumplen un abanico de funciones. Por un lado, impulsa al parásito hacia adelante, pero está también implicado en el anclaje del parásito al aparato digestivo del insecto vector. Además, se ha observado en tripanosomas que el cuerpo flagelar basal, el cual está conectado a la mitocondria, juega un papel importante durante la división celular (Lacomble S et al. 2010; Ogbadoyi E et al. 2003).

Bolsillo flagelar: el bolsillo flagelar es una invaginación en la base del flagelo y es responsable de la endocitosis/exocitosis mediada por receptor y la integración de proteínas de membrana en la superficie, además de la secreción de proteínas (Overath P et al. 1997). De hecho, se ha sugerido que estos procesos están restringidos a este área (Landfear SM et al. 2001). El bolsillo flagelar carece de microtúbulos, pero hay evidencias de que los microtúbulos se encargan de dirigir el tráfico vesicular hasta esta región (McConville MJ et al. 2002). En el tráfico vesicular intervienen varios orgánulos. El retículo endoplasmático, que tiene un gran tamaño en relación al parásito, el aparato de Golgi, vesículas situadas entre el retículo endoplasmático y la cara *cis* del aparato de Golgi, así como elementos tubulovesiculares y las vesículas ubicados entre la cara *trans* del aparato de Golgi y el bolsillo flagelar. Este conjunto forma la llamada red de vesículas *trans*-Golgi (TGN) (Landfear SM et al. 2001). A su vez, el lisosoma o MVT está implicado en el tráfico vesicular de *Leishmania*, destacando el transporte desde el aparato de Golgi y endosomas (Besteiro S et al. 2007; Waller RF y McConville MJ. 2002).

### **Genoma de *Leishmania***

Hasta ahora se han secuenciado con éxito los genomas de 5 especies de *Leishmania* (*L. major*, *L. infantum*, *L. donovani*, *L. braziliensis* y *L. mexicana*), revelando la existencia de más de 8.300 genes que codifican para proteínas y 900 genes para RNA (Downing T et al. 2011; Myler PJ. 2008 en *Leishmania: After the Genome*). El genoma de *Leishmania* comparte aproximadamente 6.200 genes con los tripanosomatidos *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*,



## Introducción

---

aunque alrededor de 1.000 genes son específicos del género *Leishmania*, y 200 de estos son diferentes entre las distintas especies secuenciadas, indicando una evolución marcada por diferentes presiones selectivas que pueden estar relacionadas con la patología de la enfermedad (Myler PJ. 2008 en *Leishmania: After the Genome*). Los datos de las secuencias del genoma se pueden visitar en la página web de GeneDB (<http://www.genedb.org/Homepage>) o TriTrypDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). Las diferentes especies de *Leishmania* tienen un genoma constituido por un número de cromosomas variable entre 34 y 36 pares, numerados en orden ascendente de tamaño, con tamaños comprendidos entre 250 kb y 4 Mb. De esta manera, *L. major* y *L. donovani* tienen 36 pares de cromosomas, *L. mexicana* y *L. amazonensis* tienen 34 y el grupo de *L. braziliensis* tienen 35. La mayoría de los genomas son diploides de forma general, aunque se pueden dar distintos grados de aneuploidias. En *L. major* el cromosoma 1 es triploide (Sunkin SM et al. 2000), mientras que el 20 y el 31 parecen ser tetraploides (Myler PJ. 2008 en *Leishmania: After the Genome*). Un poco menos de la mitad del genoma codifica para proteínas, con un contenido en G + C de las regiones codificantes del 62,5% y en las no codificantes del 57,3 %. La mayoría de los genes de *Leishmania* no contienen intrones. Hasta la fecha, sólo dos genes que codifican para una RNA helicasa y una PoliA polimerasa presentan intrones (Myler PJ. 2008 en *Leishmania: After the Genome*). La regulación de la expresión génica en *Leishmania* es predominantemente post-transcripcional. A diferencia de la mayoría de los eucariotas, los genes que codifican para proteínas en tripanosomas son transcritos en largas cadenas de RNA policistrónico. La maduración del mRNA incluye un proceso de *trans-splicing*, que consiste en la adición de una secuencia de 39 nucleótidos (mini-exón) en el extremo 5' del RNA y posterior poliadenilación en el extremo 3', produciendo mRNA monocistrónico (Kazemi B. 2011) (Fig. 13). *Leishmania* contiene RNAs no codificantes de 300-600 nucleótidos que se expresan únicamente en amastigotes. Tanto los transcritos sentido como antisentido son procesados por trans-splicing y poliadenilación. Se ha sugerido que los transcritos antisentido juegan un papel en la estabilidad del RNA (Kazemi B. 2011).

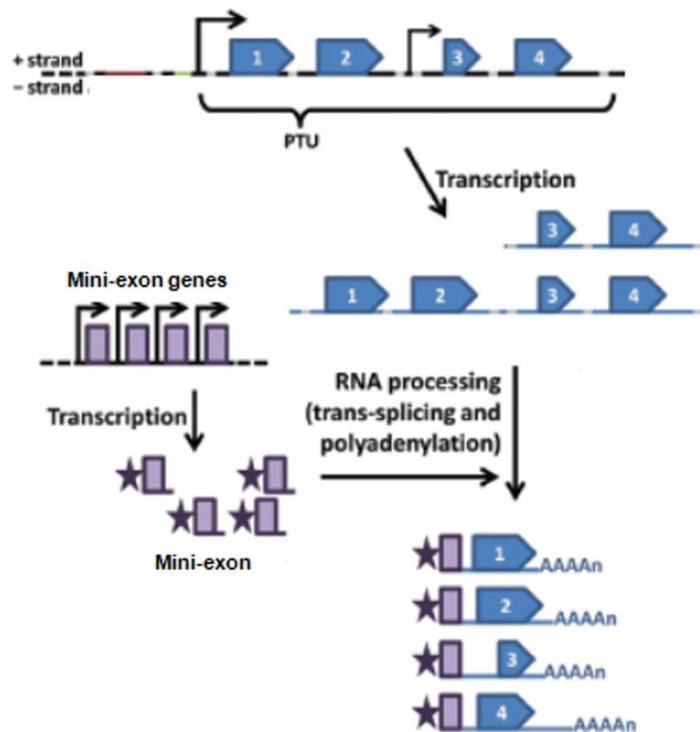


Figura 13. Transcripción en *Leishmania*. PTU: Unidad de transcripción policistrónica. Adaptado de (Teixeira SM et al. 2012).

Además de la regulación post-transcripcional, existe también una regulación post-traducciona que está asociada con la expresión diferencial de genes entre las diferentes formas de vida del parásito (Papadopoulo B. 2008 en *Leishmania: After the Genome*).

Una característica reseñable de *Leishmania* es su gran plasticidad génica, que les permite alterar el número de genes concretos, grupos de genes e incluso cromosomas, confiriéndoles una ventaja adaptativa (Toledo JS et al. 2010).



### Proteínas de la superficie de *Leishmania*

El parásito *Leishmania* es una célula flagelada polarizada con membranas de superficie de distinta composición y función. Hay proteínas específicas para el flagelo, cuerpo celular y bolsillo flagelar que contribuyen a la especialización funcional de dichas zonas. Asimismo, la estructura y composición de la membrana del parásito juega un papel importante en la adaptación a los diferentes ambientes en los que debe subsistir.

Cuerpo celular: La membrana plasmática está conectada en su cara interna a una red de microtúbulos que dan forma al parásito. Esta formación está compuesta por más de 100 microtúbulos alineados a lo largo del eje antero-posterior y se encuentran anclados a la membrana plasmática por proteínas de unión a microtúbulos o proteínas integrales de membrana (Handman E et al. 2008 en *Leishmania: After the Genome*).

En el promastigote, la membrana plasmática está decorada con un glicocalix de 20-40 nm (Pimenta PF et al. 1991). El glicocalix contiene gran cantidad de transportadores de iones y nutrientes, además de ligandos para los receptores de la célula huésped, tanto del insecto vector como del macrófago. Igualmente, el glicocalix tiene la función de proteger al promastigote en el ambiente hidrolítico del aparato digestivo del insecto. Sin embargo, no está claro este efecto protector en los amastigotes puesto que prácticamente carecen de glicocálix (Ilgoutz SC y McConville MJ. 2001). Por otro lado, se ha observado que el amastigote puede compensar la pérdida de este componente de la superficie celular mediante la adquisición y remodelaje de glicolípidos adquiridos del huésped (Zhang K et al. 2005).

Todos los ligandos conocidos de la superficie del parásito que se unen a los macrófagos son proteínas y glicolípidos anclados a glicosilfosfatidilinositol (GPI). **Gp63** o leishmanolisina fue la primera proteína de *Leishmania* anclada a GPI estudiada en detalle (Fig. 14). Es una metaloproteasa y está considerada como un factor de virulencia del promastigote debido a su capacidad de unión a diversos receptores del macrófago como los receptores del complemento 1 (CR1)

y 3 (CR3), tras la opsonización con los componentes del complemento C3b y C3bi protegiendo al parásito de la acción del complemento (Handman E et al. 2008 en *Leishmania: After the Genome*). Gp63 se expresa en la superficie de los promastigotes de *Leishmania* así como en los amastigotes, donde se especula que podría ayudar en la adquisición de nutrientes en el fagolisosoma. Sin embargo, Gp63 puede ser también secretada (Naderer T et al. 2004). Se cree que la forma secretada de Gp63 podría ser necesaria para la hidrólisis de proteínas en el aparato digestivo del insecto vector o el huésped mamífero. También podría estar implicada en la degradación de componentes del complemento en la sangre del hospedador mamífero.

Los **LPG** son polisacáridos anclados a GPI y constituyen el componente más abundante del glicocalix del parásito (Fig. 14). Juegan un papel indispensable a la hora de anclar el parásito al aparato digestivo del insecto vector. Además, se ha demostrado que es crítico para la supervivencia, transmisión del parásito (Stierhof YD et al. 1999) y virulencia en el caso de *L. major* (Naderer T et al. 2004). Otras funciones destacadas de los LPG son: inhibición de la lisis mediada por complemento, protección frente a la respuesta humoral del hospedador, participación en la unión al macrófago, bloqueo del proceso de maduración del fagosoma e inhibición de la respuesta oxidativa (Lodge R y Descoteaux A. 2005). La estructura y organización del LPG se encuentra regulado desde la fase de división activa del promastigote procíclico hasta la forma metacíclica madura e infectiva, presentando una mayor longitud en esta última. En los amastigotes de *L. major* está presente en baja cantidad y con ciertos cambios estructurales (Moody SF et al. 1993), mientras que no existe en el caso de *L. donovani*.

Los **PPGs** o proteofosfoglicanos constituyen una familia de mucinas altamente glicosiladas que existen tanto en forma anclada a GPI como en forma secretada, cumpliendo en cada caso funciones distintas (Fig. 14). Los PPG secretados por los promastigotes son largos filamentos que cubren a los parásitos formando una aglomeración que bloquea el aparato digestivo del insecto vector generando una alimentación defectuosa y la necesidad de ingerir varias veces favoreciendo la transmisión del parásito (Stierhof YD et al. 1999). Los PPGs anclados a

## Introducción

membrana están presentes tanto en promastigotes como en amastigotes, en la superficie del parásito, además del bolsillo flagelar, Golgi y lisosoma (Foth B et al. 2002). Hay estudios que indican que los PPG juegan un papel importante en el establecimiento de la infección mediante la unión a los macrófagos por glicanos compartidos con los LPG (Piani A et al. 1999) y por una serie de repeticiones ricas en leucina (LRR) presentes en los PPG. Se ha observado también que las repeticiones LRR son capaces de unirse al receptor del complemento 3 del macrófago (Kedzierski L et al. 2004).

Los glicoinositol fosfolípidos (**GIPLs**) son glicolípidos de bajo peso molecular que cubren la superficie del parásito (Fig. 14). Son similares a los LPG en cuanto a que comparten un esqueleto lipídico y un motivo glicano que contiene hasta siete monosacáridos. Se han obtenido resultados contradictorios acerca de su papel biológico, pero parece que los GIPLs presentan una influencia variable en la supervivencia de *Leishmania* dependiendo de la especie y estadio del parásito (Cabezas Y et al. 2015).

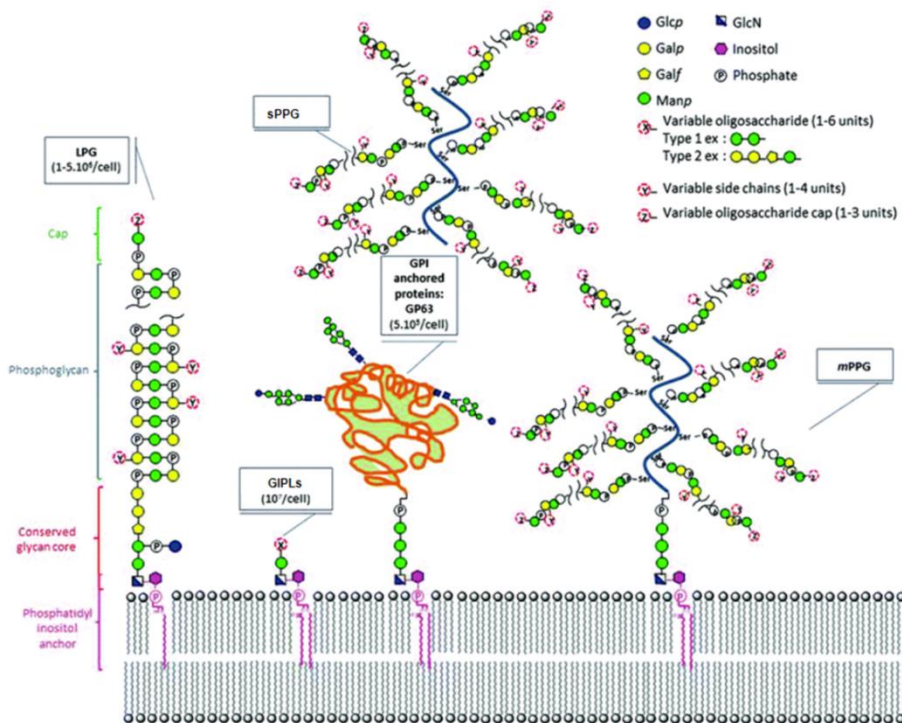


Figura 14: Principales moléculas de la superficie de promastigotes de *Leishmania*. LPG: Lipofosfoglicano, GPI: glicofosfatidilinositol, sPPG: proteofosfoglicanos secretados, mPPG: proteofosfoglicanos anclados a GPI, GIPLs: glicoinositol fosfolípidos. Adaptado de (Cabezas Y et al. 2015).

La membrana plasmática de *Leishmania* también contiene otros componentes proteicos que se encuentran anclados a la superficie mediante secuencias transmembrana hidrofóbicas, tales como proteínas relacionadas con transporte de iones y nutrientes, hexosas, biopterina, folato o transferrina así como transportadores de la familia ABC.

### **Metabolismo de *Leishmania***

Se han identificado aproximadamente 400 genes en *L. major* que codifican para enzimas implicadas en las principales rutas metabólicas. Entre las distintas especies de *Leishmania*, *L. major* posee la más extensa maquinaria metabólica. Un aspecto determinante para el metabolismo de *Leishmania* es la necesidad del parásito de adaptarse a distintos ambientes a lo largo de sus diferentes fases. Por ejemplo, ya que *Leishmania* se ha adaptado a la supervivencia en el interior del macrófago huésped, se cree que las capacidades metabólicas del amastigote están dirigidas a garantizar la existencia del parásito en este ambiente. Adicionalmente, tanto el pH como la disponibilidad de oxígeno y dióxido de carbono son dos características que implican cambios importantes a nivel de metabolismo (Burchmore RJ y Barret MP. 2001; Hart DT y Combs GH. 1981).

Metabolismo energético: diversos estudios indican que los aminoácidos, especialmente prolina, y glucosa u otros azúcares pueden ser usados por los promastigotes de *Leishmania* como fuentes de energía. Además, la generación de energía parece implicar tanto a la glicólisis como al metabolismo mitocondrial, lo que comprende una cadena de transporte de electrones activa (Opperdoes FR y Combs GH. 2007). Por otro lado, en comparación con los promastigotes, los amastigotes presentan mayor  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos y menor consumo de prolina y glucosa (Opperdoes FR y Combs GH. 2007). Se ha observado que *Leishmania* tiene genes que codifican para amilasa y sucrasa, lo cual indica la posibilidad de que los promastigotes usen estas enzimas para degradar el almidón y los polisacáridos ingeridos por el insecto vector al alimentarse de

## Introducción

---

néctar. Además, se han encontrado quinasas como ribuloquinasa y xiluloquinasa con señales de importación al glicosoma, lo que apoya la hipótesis de que en los glicosomas se metabolizan otros azúcares además de glucosa (Opperdoes FR y Combs GH. 2007).

Asimismo, se ha descrito que *Leishmania* sintetiza manano, el cual es considerado como una reserva de energía (Opperdoes FR y Combs GH. 2007).

Metabolismo del ascorbato: *L. major* y *T. cruzi* poseen una peroxidasa dependiente de ascorbato, mientras que *T. brucei* tiene varias copias de la hierro-ascorbato oxidorreductasa. Esto indica la posibilidad de que los tripanosomátidos estén usando el ácido ascórbico como defensa frente al estrés oxidativo, como por ejemplo *Leishmania* en el macrófago huésped. Sin embargo, aunque la ruta biosintética del ascorbato existe en *T. cruzi*, parece encontrarse ausente en *Leishmania* (Opperdoes FR y Combs GH. 2007).

Ruta de las pentosas fosfato: la mayoría de las enzimas implicadas en esta vía incluyen una señal de transporte al lisosoma, lo que indica que la ruta de las pentosas fosfato se desarrolla en este orgánulo. Sin embargo, algunas de las enzimas son citosólicas en promastigotes, lo que indica que esta ruta se desarrolla en ambos compartimentos (Opperdoes FR y Combs GH. 2007).

Cabe señalar que *Leishmania* carece de la enzima sedoheptulosa bifosfatasa, la cual está presente en *T. brucei* y *T. cruzi*, aunque se desconoce la importancia de este hecho (Opperdoes FR y Combs GH. 2007).

Síntesis del hemo: el hemo es un grupo prostético que forma parte de diversas proteínas que contienen hierro, como los citocromos. Normalmente es sintetizado por la succinil-coenzima A (SucCoA), la cual se genera durante el ciclo de Krebs. Sin embargo, los genes que codifican para las primeras dos enzimas implicadas en la biosíntesis del hemo no se han encontrado en tripanosomátidos, lo que parece indicar un requerimiento exógeno de este componente. Sin embargo, se han encontrado otras enzimas de la ruta biosintética del hemo en *L. major*, lo que da lugar a la hipótesis de que *Leishmania* podría haber adquirido la capacidad de

sintetizar hemo a partir de precursores presentes en el aparato digestivo del insecto vector (Oppenheimer FR y Combs GH. 2007).

Metabolismo del folato: al contrario que otros microorganismos, *Leishmania* no es capaz de sintetizar folato, por lo que debe adquirirlo exógenamente. Sin embargo, aunque el genoma de *L. major* no contiene genes que codifiquen para la biosíntesis del folato, existen 12 genes que codifican para transportadores de membrana encargados de transportar este compuesto (Oppenheimer FR y Combs GH. 2007).

Síntesis y oxidación de aminoácidos: *Leishmania* únicamente es capaz de sintetizar aminoácidos no esenciales además de treonina y metionina, lo cual está demostrado por la presencia de genes que codifican para enzimas necesarias para la síntesis de estos aminoácidos. Un ejemplo sería la D-3-fosfoglicerato dehidrogenasa, la primera enzima en la síntesis de serina, que se encuentra presente en *L. major* pero no existe en *T. cruzi* ni en *T. brucei* (Oppenheimer FR y Combs GH. 2007).

Metabolismo redox: durante su ciclo de vida, el parásito *Leishmania* está expuesto a distintos niveles de estrés oxidativo. Existe un balance estricto de las defensas oxidativas del parásito, en el que el fallo de alguno de estos sistemas provoca una disminución de la virulencia y supervivencia del mismo. Los tripanosomátidos presentan un metabolismo redox característico basado en el tior N1,N8 bis(glutathionil)espermidina o tripanotión [T(SH)<sub>2</sub>], un conjugado de dos moléculas de glutatión (GSH) unidas por la poliamina espermidina (Spd) (Fig. 15).

## Introducción

---

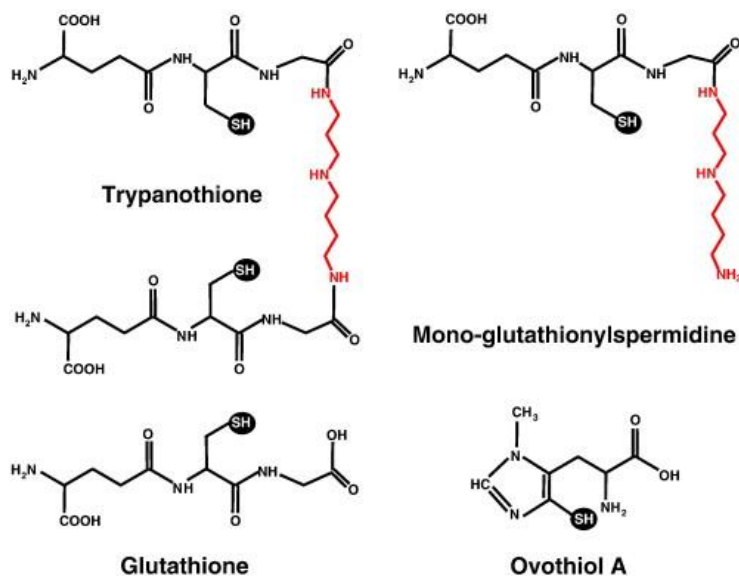


Figura 15. Tioles de bajo peso molecular en tripanosomátidos (Krauth-Siegel RL y Comini MA. 2008).

En *Leishmania*, la vía para la síntesis de espermidina comienza con la transformación de L-arginina (Arg) en ornitina (Orn) catalizada por la arginasa (ARG) (Fig. 16). La ornitina se convierte en putrescina (Put) a través de la ornitina descarboxilasa (ODC). Además de putrescina, la formación de espermidina requiere de S-adenosilmetionina (SAM) que se obtiene a partir de metionina por acción de la metionina adenosil transferasa (MAT) (Fig. 16). A continuación, SAM es descarboxilada por la enzima S-adenosilmetionina descarboxilasa (SAMDC) produciendo dSAM. El paso final de la síntesis de espermidina consiste en la transferencia de un grupo aminopropilo de dSAM a la putrescina, catalizada por la espermidina sintasa (SpdS). Además de a través de estas vías, la obtención de espermidina y putrescina puede realizarse de forma directa desde el medio extracelular, aunque por si sola esta forma de adquisición no es suficiente para el correcto funcionamiento del parásito *in vivo* (Krauth-Siegel RL y Leroux AE. 2012).

En cuanto al GSH, tanto en *Trypanosoma* como en *Leishmania*, es sintetizado por dos enzimas que se encuentran también en mamíferos. En primer lugar, la  $\gamma$ -glutamylcisteína sintetasa (GSH1) liga cisteína y glutamina para formar  $\gamma$ -glutamylcisteína ( $\gamma$ GC). A continuación, la enzima glutatión sintetasa (GSH2)



cataliza la unión de glicina (Gly) con  $\gamma$ GC para formar GSH (Fig. 16). El último paso en la síntesis del T(SH)<sub>2</sub> consiste en la conjugación de dos moléculas de GSH con los grupos amino N<sup>1</sup> y N<sup>8</sup> de la espermidina mediante la acción de la tripanotión sintetasa (TryS) (Fig. 16) (Krauth-Siegel RL y Leroux AE. 2012).

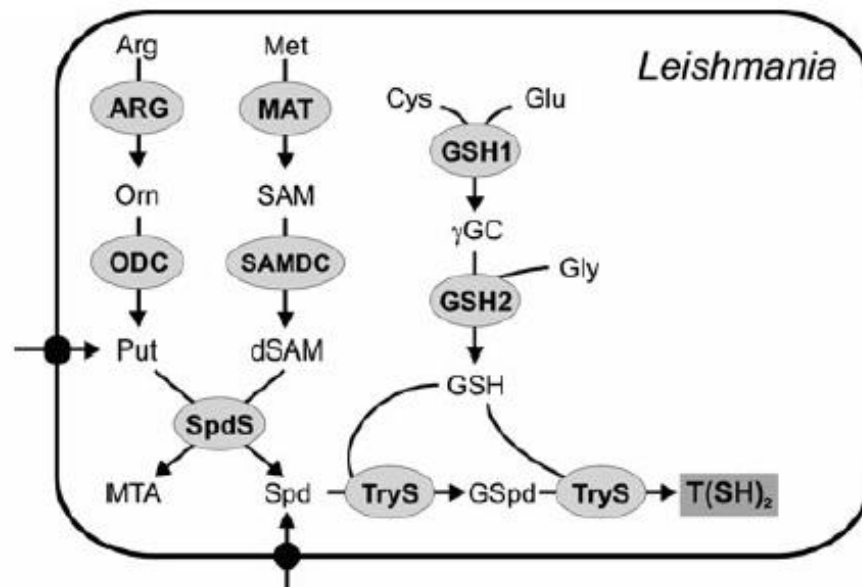


Figura 16. Biosíntesis del tripanotión en *Leishmania*. ARG: Arginasa, ODC: Ornitina descarboxilasa, MAT: Adenosil transferasa, SAMDC: S-adenosilmetionina descarboxilasa, SpdS: Espermidina sintetasa, GSH1:  $\gamma$ -glutamilcisteína sintetasa, GSH2: Glutatión sintetasa, TryS: Tripanotión sintetasa, T(SH)<sub>2</sub>: Tripanotión (Krauth-Siegel RL y Leroux AE. 2012).

Por sí solo, el tripanotión es capaz de reducir de forma directa grupos disulfuro en proteínas (RS<sub>2</sub>) como la triparedoxina (TXN) y compuestos de bajo peso molecular como GSSH, dehidroascorbato u ovothioliol A disulfuro. Además, puede interceptar el óxido nítrico en un complejo dinitrosil-tripantionil-hierro inocuo para el parásito, con mayor eficacia que el GSH (Krauth-Siegel RL y Leroux AE. 2012). Ya que los tripanosomátidos carecen de glutatión reductasa y tioredoxina reductasa, la única enzima que conecta el metabolismo redox basado en tioles y el NADPH es la tripanotión reductasa (TR). Esta enzima esencial se encarga de mantener al tripanotión en su forma reducida y se considera una diana terapéutica de interés.



## Introducción

---

Aunque el TSH<sub>2</sub> pueda actuar de forma espontánea, muchas reacciones de óxido-reducción se llevan a cabo a través de la TXN, una oxidorreductasa que transfiere equivalentes reducidos desde el TSH<sub>2</sub> a diversas proteínas. En mamíferos, este papel lo desempeñan el glutatión y la tioredoxina, pero los niveles de esta enzima en tripanosomátidos son muy bajos (Krauth-Siegel RL y Comini MA. 2008). Algunos de los procesos biológicos en los que están implicados T(SH)<sub>2</sub> y TXN son los siguientes:

- Regulación redox de la replicación del DNA: la reducción de los precursores nucleósido difosfato a los deoxiribonucleótidos para replicación y reparación del DNA se lleva a cabo mediante la acción de la ribonucleótido reductasa (RR) (Fig. 17). Ciertos estudios han revelado que el T(SH)<sub>2</sub> puede reducir espontáneamente esta enzima, pero esta reacción es catalizada principalmente por la TXN (Krauth-Siegel RL y Comini MA. 2008). Por otro lado, la proteína UMSBP está relacionada con la iniciación de la replicación del ADN en los minicírculos del kinetoplasto (Fig. 17). En *C. fasciculata*, se ha observado que el sistema T(SH)<sub>2</sub>/TXN puede reactivar la UMSBP oxidada permitiendo su unión a la secuencia origen de los minicírculos, sugiriendo que la replicación del DNA del kinetoplasto depende de una regulación redox (Krauth-Siegel RL y Comini MA. 2008).
- Detoxificación celular: en tripanosomátidos, la detoxificación de hidroperóxidos (ROOH) recae en el tripanotión y la TXN. Por esta vía se produce una desviación de electrones a las 2-Cys-peroxiredoxinas (Prx) y a las enzimas tipo glutatión peroxidasa (Px) que detoxifican los hidroperóxidos convirtiéndolos en su respectivo alcohol (ROH) (Fig. 17) (Krauth-Siegel RL y Comini MA. 2008). Adicionalmente, las peroxiredoxinas pueden ser oxidadas por el peroxinitrito, molécula oxidante producida por los macrófagos (Trujillo M et al. 2004). La TXN y el T(SH)<sub>2</sub> pueden reducir las peroxiredoxinas para devolverlas a su estado nativo, otorgando al T(SH)<sub>2</sub> un papel secundario de detoxificación del peroxinitrito que facilita la supervivencia de los parásitos en el ambiente oxidativo de los macrófagos (Trujillo M et al. 2004).

- Monotiol glutaredoxinas: el genoma de los kinetoplastos codifica para la monotiol glutaredoxina 1-C-Grx1, que está relacionada con la formación de clusters hierro sulfuro y la homeostasis del hierro. 1-C-Grx1 es reducida por el sistema T(SH)<sub>2</sub>/TXN en la mitocondria (Fig. 17) (Krauth-Siegel RL y Comini MA. 2008).

Además de estos procesos biológicos, el tripanotión está relacionado con la resistencia a fármacos como los antimoniales, provocando un secuestro y/o eflujo de conjugados tiol-metal fuera de la célula y reduciendo así la acción reguladora de los tioles en *Leishmania*.

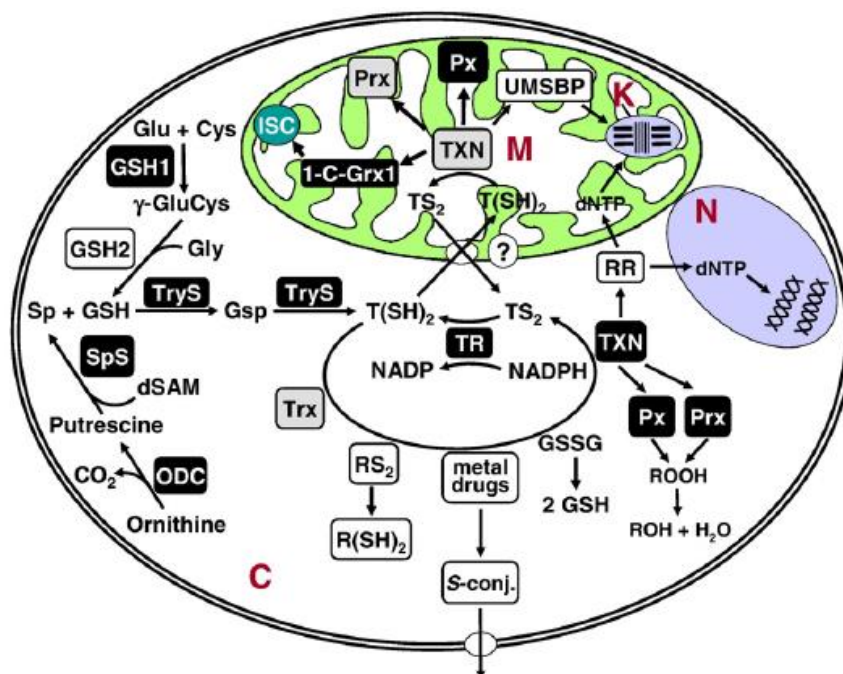


Figura 17: Metabolismo redox de tripanosomátidos basado en tripanotión. C: citosol, K: kinetoplasto, M: Mitocondria, N: Núcleo (Krauth-Siegel RL y Comini MA. 2008).

Los estadios de *Leishmania* en el interior del insecto vector también acumulan ovotiol A (N1-metil-4-mercaptohistidina) (Fig. 15), un tiol de bajo peso molecular que se sintetiza a partir de histidina y actúa como antioxidante. Curiosamente, la cantidad de este compuesto baja en los estadios del parásito que se desarrollan en el mamífero, encontrándose ausente en las formas amastigotes (Luise Krauth-Siegel RL y Leroux AE. 2012).

### **Respuesta inmunológica del hospedador**

Una vez entran en el interior del huésped mamífero a través de la ingesta de sangre del flebótomo, los promastigotes de *Leishmania* deben evadir la lisis mediada por complemento hasta ser fagocitados por el macrófago. Los promastigotes procíclicos no pueden resistir la acción del complemento, mientras las formas metacíclicas si pueden evadir esta respuesta ya que están especializadas en la infección. Una de las diferencias más reseñables en la resistencia al complemento radica en los LPG de la superficie del parásito, siendo más largos en las formas metacíclicas, y previniendo la unión de las subunidades C5b-C9 del complemento. Se ha observado que Gp63 también protege a los parásitos de la lisis, ya que promueve la conversión de C3b del complemento en C3bi, permitiendo la opsonización del promastigote para su consecuente fagocitosis, sin desencadenar una explosión oxidativa por parte del macrófago (Olivier M y Gregory DJ. 2008 en *Leishmania: After the Genome*). Además, los residuos manano del LPG del parásito pueden unirse al macrófago a través del receptor manosa-fructosa (Blackwell JM. 1985). Los LPG también pueden interaccionar con un producto inflamatorio temprano conocido como proteína C reactiva (CRP), que desencadena la fagocitosis via receptor de CRP sin activar al macrófago (Culley FJ et al. 1996). Sin embargo, existen otras moléculas de la superficie de *Leishmania* implicadas en el establecimiento de la infección. Hay estudios que demuestran que parte de la infectividad de los promastigotes metacíclicos se debe a la elevada cantidad de fosfatidilserina en su superficie (Tripathi A y Gupta CM. 2003; Olivier M y Gregory DJ. 2008 en *Leishmania: After the Genome*).

Después de la internalización de los promastigotes en el macrófago, éstos comienzan a diferenciarse a amastigotes. Sin embargo, ya que los promastigotes son vulnerables al ambiente hidrolítico y ácido del macrófago, retrasan la maduración del fagosoma en un proceso dependiente de LPG, que les da el tiempo suficiente para diferenciarse a su forma más resistente de amastigotes.

Se ha observado que *Leishmania* es capaz de manipular las defensas del macrófago para garantizar su propia supervivencia. Por ejemplo, dos moléculas reconocidas por su gran eficacia contra este parásito son el óxido nítrico (NO) y las especies reactivas de oxígeno (ROS). Se ha demostrado que macrófagos infectados con *Leishmania* o cultivados en presencia de sus moléculas de superficie, pierden la habilidad de inducir la actividad de la óxido nítrico sintasa, así como la capacidad de generar NO en respuesta a interferón gamma (IFN $\gamma$ ) (Proudfoot L et al. 1996). Este hecho sugiere que el contacto entre parásito y macrófago impide a este último responder al IFN $\gamma$  producido por las células del sistema inmunitario. Adicionalmente, la generación de ROS es inhibida por *L. donovani* de forma dependiente de LPG y gp63 (Descoteaux A y Turco SJ. 1999).

En un modelo murino de leishmaniasis se ha demostrado que la resistencia a la enfermedad está proporcionada por las células T-helper tipo 1 (Th1), mientras que la susceptibilidad es generada por las células Th2 (Fig. 18). En concreto, las células Th1 secretan principalmente IFN $\gamma$ , que juega un papel indispensable en la activación de los macrófagos aumentando su actividad leishmanicida a través de la producción de óxido nítrico (Awasthi A et al. 2004). Por otro lado, las células Th2 secretan IL-4 y IL-10 que inactivan los macrófagos promoviendo el desarrollo del parásito y por lo tanto de la enfermedad (Awasthi A et al. 2004).

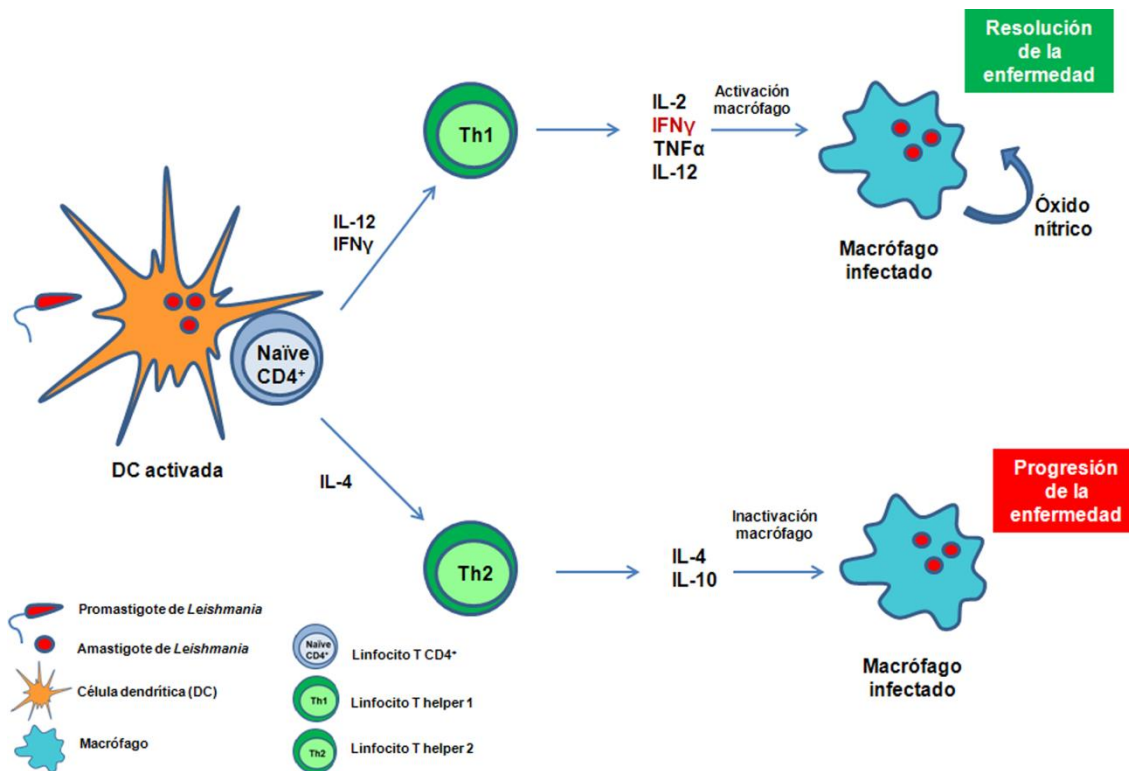


Figura 18. Respuestas inmunitarias frente a *Leishmania* tipo Th1 y Th2.

## Diagnóstico de la leishmaniasis

Dado que la leishmaniasis es una enfermedad generalmente asociada a países en vías de desarrollo, su diagnóstico es en muchas ocasiones erróneo. Por lo tanto, un buen diagnóstico no solo ayuda a la elección de una terapia adecuada sino que acorta el tiempo de tratamiento (Jhingran A et al. 2008 en *Leishmania: After the genome*).

Uno de los métodos de diagnóstico iniciales es un método de detección directa, que incluye la detección de amastigotes en distintos tejidos, siendo los aspirados de bazo los más indicados. Sin embargo, éste método está contraindicado en pacientes con anemia. Por lo tanto, aunque la detección directa de los amastigotes en los tejidos es altamente específica, está limitada ya que contempla técnicas muy invasivas y requieren de una gran experiencia (Jhingran A et al. 2008 en *Leishmania: After the genome*).

Por otro lado, los test serológicos están basados frecuentemente en el uso de anticuerpos para detectar proteínas de *Leishmania* en la sangre de los pacientes. Estos métodos son más sencillos y menos invasivos, pero presentan las desventajas de reactividad cruzada con otros patógenos, y la imposibilidad de discriminar entre infecciones pasadas y presentes. Además, se ha demostrado que no son fiables en pacientes inmunocomprometidos (Gradoni L et al. 1993). Los test como ELISA (método de inmunoabsorción ligado a enzimas) e IFAT (Test de inmunofluorescencia) son muy sensibles pero requieren de instrumentos sofisticados.

Otros métodos emplean la inmunidad celular específica, incluyendo el test de piel intradérmico, que consiste en evaluar la reacción de la piel a inyecciones de antígenos de *Leishmania*. Sin embargo, estos métodos al igual que los métodos serológicos no distinguen entre infecciones pasadas y actuales.

Los métodos de diagnóstico más recientes incluyen el uso de PCR para la detección parasitaria y normalmente están dirigidos a amplificar el DNA presente en los minicírculos del kinetoplasto (Aviles H et al. 1999; Singh S et al. 2005). La sensibilidad de esta técnica es elevada, pudiendo llegar a detectar la presencia de parásitos incluso antes de la aparición de síntomas clínicos (Lachaud L et al. 2000). Una ventaja adicional de este método es la identificación de la especie implicada en la infección, basándose en el diseño de oligonucleótidos frente a las secuencias conservadas.

### **Prevención y control del vector**

Desde hace años, el uso del insecticida DDT en recintos cerrados se ha considerado un método simple y efectivo contra el insecto vector portador de la leishmaniasis. Sin embargo, en las zonas donde se ha empleado este insecticida durante años, hay informes que defienden la aparición de resistencias a este compuesto (Bora D. 1999). La aletrina y praletrina son dos compuestos piretroides que han demostrado ser repelentes efectivos contra *Phlebotomus*

## Introducción

---

*argentipes*, vector del kala-azar en la India, y que podrían sustituir al DDT (Kishore K et al. 2006).

En países como Palestina, China o la Unión Soviética, usualmente se opta por el sacrificio de los animales infectados como método de control de la leishmaniasis canina y consecuentemente de la humana. Sin embargo, en otros países que sufren de leishmaniasis endémica, el sacrificio de animales sin un criterio razonable, especialmente de animales domésticos como el perro, generan importantes problemas éticos. Por lo tanto, para controlar la infección en perros se suele optar por el empleo de collares impregnados con deltametrina, demostrando ser efectivos frente a una amplia variedad de especies del insecto vector en diferentes lugares de Europa, Asia y Sudamérica (Killick-Kendrick R. 1999).

## Desarrollo de vacunas

Pese a que no existen vacunas autorizadas contra la leishmaniasis, los estudios de diversos candidatos a vacuna se han incrementado debido a la evidencia de los mecanismos inmunológicos que controlan la infección. Sin embargo, la mayoría de los estudios están basados en modelos animales que no han sido extrapolados a humanos o perros (Srivastava S et al. 2016).

En general, las vacunas contra la leishmaniasis que se encuentran en desarrollo se pueden dividir en tres categorías (Fig. 19):

1. Vacunas basadas en parásitos vivos atenuados, incluyendo nuevas cepas genéticamente modificadas.
2. Vacunas basadas en parásitos muertos o fracciones del parásito muerto.
3. Vacunas basadas en DNA, proteínas recombinantes de *Leishmania* o combinaciones de los mismos.

**Vacunas vivas atenuadas:** Se han empleado diversos procesos para conseguir la atenuación de los parásitos vivos, incluyendo cultivo *in vitro* durante largo

tiempo para disminuir su virulencia, selección por sensibilidad de temperatura, mutagénesis química y radiación. Este enfoque se ha llevado a la práctica únicamente en poblaciones de alto riesgo de Uzbekistán (Palatnik-de-Sousa CB. 2008). Aunque este tipo de vacunas ha proporcionado una protección importante en modelos animales, la posibilidad de mutaciones genéticas, así como de reversión potencial a la virulencia, hace que estas vacunas no sean apropiadas para su utilización en humanos.

**Vacunas de parásitos muertos:** Pese a su carácter prometedor dado por su bioquímica estable, bajo coste y seguridad, la vacunación con parásitos muertos no imita la infección natural y es menos inmunogénica, por lo que no confiere un nivel de protección significativa contra la leishmaniasis humana (Noazin S et al. 2008).

**Vacuna de fracciones de *Leishmania*:** Leishmune®, la primera vacuna para la leishmaniasis visceral canina consiste en fracciones de *L. donovani*, más en concreto del ligando de fructosa manosa (FML) incluyendo especialmente la hidrolasa de nucleósidos NH36 y saponina como adyuvante. Leishmune® está considerada una herramienta prometedora para la prevención de la leishmaniasis canina, ya que presenta una eficacia del 80% en perros (Dantas-Torres F. 2006). Sin embargo, aún existen dificultades en la producción a gran escala y estandarización de las condiciones de cultivo *in vitro* y los métodos de purificación.

**Vacunas recombinantes:** Se producen a partir de células genéticamente modificadas que generan proteínas antigénicas. Hasta la fecha, solo una vacuna de este tipo, Leish-111F, se ha utilizado en pruebas clínicas. Leish-111F es una poliproteína compuesta por tres moléculas fusionadas en tándem: Proteína antioxidante específica de tiol de *L. major*, proteína 1 de estrés inducible de *L. major* y el factor de elongación e iniciación de *L. braziliensis*. En emulsión con monofosforil lípido A, Leish-111F induce una protección significativa contra *L. infantum* en ratones, siendo la primera vacuna recombinante que ha avanzado hasta fase II en humanos (Srivastava S et al. 2016).



## Introducción

**Vacunas de coctel de antígenos:** Un gran número de antígenos de *Leishmania* se han probado para la generación de posibles vacunas. Recientemente, se ha observado que un coctel de los antígenos LACK, TSA, o LmSTI1 confiere una protección importante en perros (Miura R et al. 2015).

**Vacunas de DNA:** LEISHDNAVAX es una vacuna de DNA rico en un epítipo de las células T que expresa al mismo tiempo diferentes antígenos de *Leishmania*. Esta vacuna ha demostrado conferir protección contra *L. donovani* en modelos animales, además de presentar un perfil de seguridad aceptable (Riede O et al. 2015).

**Vacunas quiméricas:** Un ejemplo de vacuna quimérica novedosa incluye el gen *esat-6* de *M. tuberculosis* y el gen para el dominio motor de kinesina de *L. donovani* (Dey A et al. 2009). En la India, aproximadamente el 20% de pacientes con VL presentan también tuberculosis, por lo que una vacuna que incluyera a ambos genes proporcionaría una estrategia interesante para evitar la co-infección de ambas enfermedades. Se ha observado que la construcción quimérica de estos genes proporciona un aumento de la respuesta inmunológica Th1, lo que la señala como posible vacuna de interés para el futuro (Srivastava S et al. 2016).

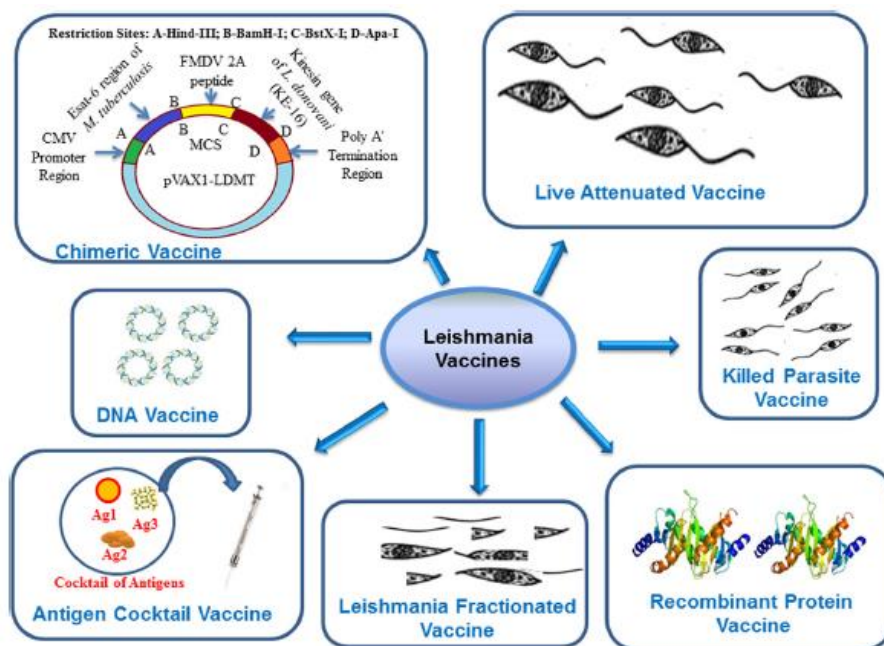


Figura 19. Tipos de vacunas existentes contra la leishmaniasis (Srivastava S et al. 2016).

### Tratamiento de la leishmaniasis

Aunque se han obtenido resultados prometedores para la elaboración de distintas vacunas frente a la leishmaniasis, por ahora no existe ninguna vacuna eficaz y exenta de riesgos, ni métodos eficaces de control del insecto vector. Por lo tanto, la única herramienta actual de lucha frente a la leishmaniasis es la quimioterapia.

Desde 1940 se usan fármacos tales como antimoniales pentavalentes (Glucantime® y Pentostam®) y diamidinas (Pentamidina) para combatir la enfermedad. Posteriormente, se han introducido: los antifúngicos como anfotericina B (tanto en forma de desoxicolato como en forma liposomal) y ketoconazol; antibacterianos como paromomicina y dapsona, y más recientemente el antitumoral miltefosina, el primer fármaco oral aprobado frente a la leishmaniasis (Croft SL et al. 2006). Sin embargo, todos estos compuestos actualmente en uso presentan una serie de inconvenientes como: (i) toxicidad elevada, (ii) variabilidad de acción en diferentes especies de *Leishmania*, (iii) aparición de resistencias a algunos de estos fármacos (antimoniales) y (iv) precio elevado (Croft SL y Coombs GH. 2003; Croft SL et al. 2006). Por lo tanto, muchas vías de investigación actuales se centran en la búsqueda de nuevos fármacos y estrategias terapéuticas frente a la leishmaniasis.

**Antimoniales pentavalentes:** Estibogluconato de sodio (Pentostam®) (100 mg  $Sb^{V+}$ /ml) (Fig 20) y antimoniato de meglumina (Glucantime®) (85 mg  $Sb^{V+}$ /ml) son las dos formulaciones disponibles que contienen antimoniales pentavalentes. Actualmente están considerados fármacos de primera línea in diferentes partes del mundo excepto en aquellas en las que se ha desarrollado resistencias, como el estado de Bihar en la India, donde el porcentaje de resistencia alcanza el 60%. (Sundar S y Rai M. 2002). En los países de la cuenca Mediterránea y Brasil, los porcentajes de curación tras el tratamiento con estos fármacos alcanzan el 95%. Estudios realizados en Uganda y el sur de Etiopía afirman que la tasa de curación es del 95 y 100% respectivamente (Monge-Maillo B y López-Vélez R. 2013).

El mecanismo de acción de los antimoniales se basa en provocar el eflujo de tiones e inhibir la tripanotión reductasa, produciendo una acumulación de las

## Introducción

---

formas disulfuro tanto de tripanotión como de glutatión (Wyllie S et al. 2004). Además, estos fármacos producen depleción de los niveles de ATP, despolarización de la membrana mitocondrial, producción de ROS y fragmentación del DNA, originando la muerte del parásito (Ouellette M et al. 2004). Se ha observado que  $Sb^V$  (pero no  $Sb^{III}$ ) es un potente inhibidor de la proteína tirosina fosfatasa del huésped, que lleva a un incremento de la respuesta inmunológica basadas en citoquinas (Pathak MK y Yi T. 2001). Este hecho sugiere que el  $Sb^V$  podría estar eliminando a los parásitos de forma directa e indirecta.

Las dosis y duración de los tratamientos con antimoniales han sufrido cambios a lo largo de los años. Finalmente, teniendo en cuenta diversos estudios, en 1992 se recomendó una administración parenteral de 20 mg  $Sb^{V+}/Kg$  con un límite de 850 mg/día durante 28-30 días (Monge-Maillo B y López-Vélez R. 2013).

El tratamiento prolongado con antimoniales puede generar arritmias cardíacas, dolor en el lugar de la infección, erupciones, problemas gastrointestinales y locomotores. A menudo, debido a los efectos secundarios, los pacientes abandonan el tratamiento aumentando la aparición de resistencias (Croft SL et al. 2006).

**Anfotericina B** (Fig. 20): Es un antibiótico fungicida de la familia de los macrólidos poliénicos obtenido de la fermentación de *Streptomyces nodosus*.

La anfotericina B se une a los esteroides, especialmente al ergosterol de la membrana plasmática generando poros acuosos y provocando la muerte del parásito debido a la pérdida de iones (Leandro C y Campino L. 2003). La anfotericina B se suministra de forma intravenosa como anfotericina B deoxicolato o bien en su forma liposomal (AmBisome®).

La toxicidad de este compuesto limita su actuación principalmente en países con elevada resistencia a antimoniales, donde se emplea en su forma liposomal. Otras desventajas derivadas del uso de la anfotericina B es su elevado coste, y efectos secundarios como fiebre, tromboflebitis, nefrotoxicidad y miocarditis.

La anfotericina B deoxicolato ha demostrado una tasa de curación del 98-100% para VL en la India como tratamiento de primera línea, y del 92% en pacientes en los que el uso de antimoniales había fallado (Jha TK et al. 1995). El 99% de estos pacientes respondieron a tratamientos de 1mg/Kg/día hasta 20 dosis (Monge-Maillo B y López-Vélez R. 2013).

Por otro lado, la anfotericina B liposomal es igual de efectiva que en su forma de deoxicolato, pero presenta menor nefrotoxicidad, así como menores reacciones infusionales (producción de anticuerpos contra el fármaco) (Botero Aguirre JP y Restrepo Hamid AM. 2015). Además, reduce el tiempo de hospitalización en comparación con los antimoniales (Kafetzis DA et al. 2005). En la India, se ha determinado un porcentaje de curación para la leishmaniasis del 100% empleando una dosis de este compuesto de 2 mg/Kg/día durante 3 días. Por otro lado, estudios realizados en Sudán y Kenia afirman que dosis más altas de anfotericina B liposomal son necesarias para curar a la totalidad de los pacientes. En concreto, las dosis ascienden a 15-49 mg/Kg para los pacientes de Sudán y 14 mg/Kg para los pacientes de Kenia. En cuanto al sur de Europa, dosis de 3-5 mg/Kg/día hasta un total de 20 mg/Kg han demostrado una efectividad del 100% (Monge-Maillo B y López-Vélez R. 2013).

**Miltefosina** (Fig. 20): Fue el primer fármaco oral aprobado para el tratamiento de la VL en la India. También conocido como hexadecilfosfolina, es un alquilfosfolípido que se desarrolló inicialmente como antineoplásico por su capacidad para inducir apoptosis en células tumorales. El mecanismo de acción de este compuesto no está completamente claro, aunque se ha descrito que tiene un efecto directo en los parásitos interfiriendo en la biosíntesis de fosfolípidos y en el metabolismo de los alquilfosfolípidos (Barrat G et al. 2009; Lux H et al. 2000), afectando a las citocromo c oxidasa e induciendo la despolarización mitocondrial y la disminución de los niveles de ATP intracelulares (Luque-Ortega JR et al. 2007) así como la muerte por un proceso similar a la apoptosis (Paris et al. 2004; Dorlo TP et al. 2012, Verma NK y Dey CS. 2004). Hace 9-14 años el porcentaje de curación en adultos y niños tratados con miltefosina (2,5 mg/Kg/día durante 28 días) en la India era del 94-97%. Así, este compuesto fue propuesto

## Introducción

---

como fármaco de primera línea en India, Nepal y Bangladesh. Sin embargo, en 2011 el porcentaje de curación fue del 90,3% en India y del 85% en Bangladesh (Monge-Maillo B y López-Vélez R. 2013). La causa del fallo terapéutico no parecía estar asociada a la resistencia al fármaco sino a otros factores relacionados con la virulencia del parásito (Rai K et al. 2013) o del huésped (Ostyn B et al. 2014). Recientemente, se han encontrado en la India los dos primeros casos clínicos de resistencia a miltefosina confirmados en el laboratorio (Srivastava S et al. 2017).

Entre las contraindicaciones de la miltefosina, destacamos su efecto teratogénico, vómitos y diarrea en el 60% de los pacientes, incremento de las transaminasas y creatinina en sangre y posible desarrollo de resistencias (Gamarro F et al. 2013 en Drug resistance in *Leishmania* parasites).

**Paromomicina** (Fig. 20): Es un antibiotico aminoglicósido producido por *Streptomyces spp* que muestra actividad bactericida y leishmanicida. Se administra por vía parenteral en pacientes con VL y tópica o parenteral en pacientes con CL. Su modo de acción consiste en la inhibición de la traducción de las proteínas mediante la unión al sitio A del ribosoma (Fernández MM et al. 2011).

En el estado de Bihar (India), se han alcanzado tasas de curación del 77-94% (11 mg/Kg/día durante 21 días) en pacientes tratados con paromomicina en comparación con el 66% de curación de los antimoniales (Monge-Maillo B y López-Vélez R. 2013). Además, los niveles de toxicidad renal fueron bajos, lo que sitúa a este compuesto como un tratamiento de segunda línea adecuado en casos de resistencia a los antimoniales (Monge-Maillo B y López-Vélez R. 2013). En África, los porcentajes de curación de leishmaniasis empleando paromomicina fueron significativamente más bajos, llegando a disminuir hasta el 54% en Sudán (Monge-Maillo B y López-Vélez R. 2013). Los problemas del tratamiento con paromomicina son las inyecciones intramusculares durante los 21 días de tratamiento, la monitorización de los niveles de transaminasas en el suero y la falta de datos en mujeres embarazadas.

**Pentamidina** (Fig. 20): Es una diamidina aromática utilizada para tratar la neumonía causada por *Pneumocystis carinii*, que posee también propiedades leishmanicidas. Este medicamento se encuentra disponible para administración por vía parenteral (Pentacarinat®). El mecanismo de acción de la pentamidina no está totalmente definido, pero incluye posiblemente inhibición de la síntesis de poliaminas, unión al DNA y cambios conformacionales, y efectos sobre el potencial de membrana mitocondrial (Croft SL et al. 2006). La elevada toxicidad de la pentamidina desencadena distintos efectos adversos, como diabetes mellitus, hipoglucemia, hipertensión, miocarditis, toxicidad renal e incluso la muerte. Este fármaco se usa de forma infrecuente o en terapia combinada debido a su toxicidad y baja eficacia (de Menezes JP et al. 2015).

**Alopurinol y azoles:** Los datos sobre el tratamiento con alopurinol (análogo tóxico de hipoxantina, que interfiere en la síntesis del RNA del parásito) son escasos y dispares. Principalmente se ha usado como tratamiento de rescate en combinación con azoles y antimoniales (Monge-Maillo B y López-Vélez R. 2013).

La eficacia del tratamiento con azoles (antifúngicos que inhiben la síntesis de esteroides) como fluconazol (Fig. 20), ketoconazol e itraconazol está basada en estudios poco organizados y resultados discordantes que hace su uso poco recomendable (Monge-Maillo B y López-Vélez R. 2013).

## Introducción

---

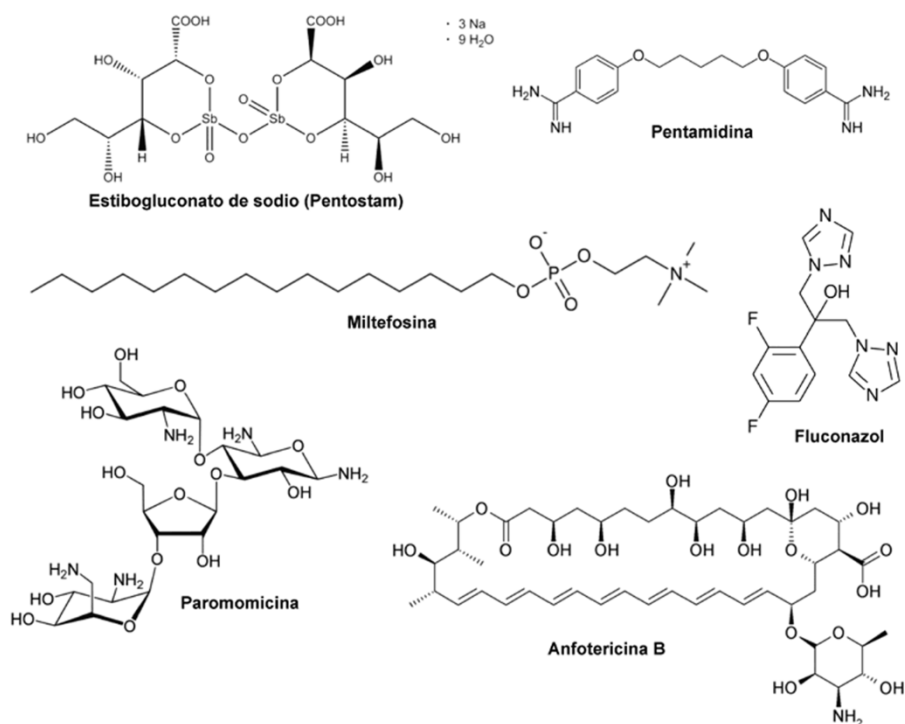


Figura 20. Fármacos leishmanicidas.

**Terapia combinada:** La terapia combinada persigue los siguientes objetivos: (i) acortar el tiempo de tratamiento, lo que lleva a una disminución de los efectos secundarios; (ii) disminuir el coste del tratamiento y (iii) minimizar la aparición de resistencias a fármacos. En pacientes que no respondían a tratamientos con antimoniales en la India, se han demostrado resultados de curación favorables para la combinación de pentamidina y antimoniales (Monge-Maillo B y López-Vélez R. 2013) Resultados similares se han obtenido para terapias de combinación con pentamidina y alopurinol. En África, especialmente Sudán, hay estudios que afirman que la asociación de paromomicina y estibogluconato sódico incrementa las tasas de curación en comparación con la monoterapia de ambos compuestos (Monge-Maillo B y López-Vélez R. 2013). Sin embargo, a pesar de su eficacia, estudios experimentales han demostrado que *Leishmania* puede desarrollar resistencia a la combinación de fármacos como paromomicina/miltefosina o paromomicina/antimonio, lo cual debe tenerse en cuenta a la hora de elaborar un plan de tratamiento adecuado (García-Hernández R et al. 2012).

**Terapia de mantenimiento:** Ensayos realizados en España han demostrado que el uso de antofericina B liposomal como terapia de mantenimiento (única dosis de 3-5 mg/Kg/día cada 3 semanas durante 12 meses) evita la recaída en la enfermedad del 50% (sin terapia de mantenimiento) al 22%. También en España se han administrado los antimoniales como terapia de mantenimiento, con menor tasa de recaída que en pacientes que no recibieron tratamiento. Por otro lado, la pentamidina se ha utilizado en pacientes que presentaban co-infección de VIH y *Leishmania*, sin evidencia de recaídas (Monge-Maillo B y López-Vélez R. 2013).

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

Existen varios mecanismos por los que los parásitos son capaces de adaptarse y contrarrestar los efectos de la quimioterapia (Fig. 21):

- Disminución intracelular del fármaco mediante un incremento en el eflujo del mismo al medio extracelular o reducción de su entrada.
- Modificación de las dianas del fármaco mediante mutaciones que producen una alteración por la cual el fármaco ya no reconoce su proteína blanco de acción.
- Expresión de enzimas capaces de inactivar el fármaco.
- Disminución de la activación del fármaco.
- Reparación o reversión de los efectos del fármaco.



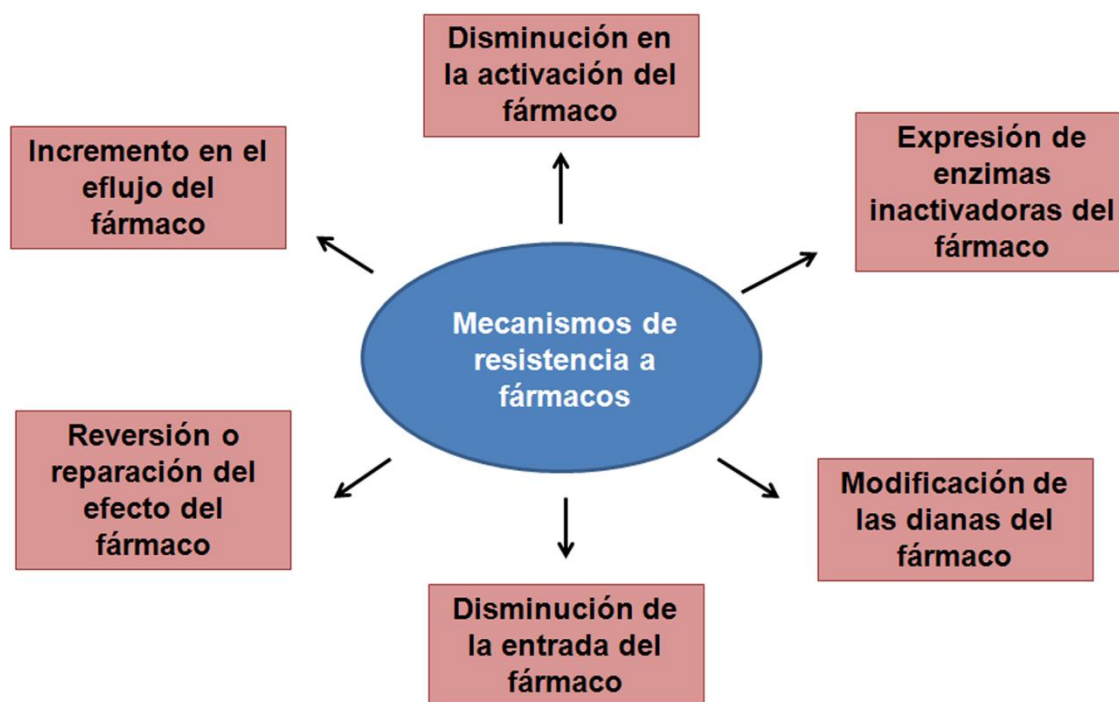


Figura 21. Mecanismos generales de resistencia a fármacos. Adaptado de (El-Awady R et al. 2017).

Uno de los mecanismos más comunes de resistencia a los **antimoniales** es la disminución de la concentración de fármaco en el interior del parásito debido a un incremento en el eflujo del mismo, disminución de la entrada, secuestro del fármaco en vesículas e inactivación del fármaco (Fig. 22). Los antimoniales pentavalentes ( $Sb^V$ ) son en realidad profármacos que deben ser reducidos biológicamente a su forma trivalente ( $Sb^{III}$ ) para ejercer su actividad leishmanicida. El mecanismo por el cual tiene lugar este proceso no está completamente claro pero, aparentemente, existe más de una ruta de conversión de  $Sb^V$  a  $Sb^{III}$ . Se ha observado que el GSH promueve la reducción de  $Sb^V$  a  $Sb^{III}$  en el fagolisosoma de los macrófagos (Frezard F et al. 2001) (Fig. 22). Adicionalmente, se ha demostrado que el  $Sb^V$  puede ser reducido por  $T(SH)_2$  mediante la unión de los dos tiolatos de los residuos cisteína del  $T(SH)_2$ , y a su vez el  $T(SH)_2$  puede unirse rápidamente al  $Sb^{III}$  formando un complejo  $SbT(S)_2$  (Yan S et al. 2003; Yan S et al. 2000) (Fig. 22). Por otro lado, la reductasa dependiente de tiol (TDR1) y la arsenato reductasa (ACR2) de *Leishmania* son también capaces de reducir  $Sb^V$  a  $Sb^{III}$  (Denton H et al. 2004) (Zhou Y et al.

2004), lo que apoya la idea de que el proceso de reducción se realiza tanto en el macrófago como en el parásito.

La ruta de entrada del  $\text{Sb}^{\text{V}}$  no se conoce todavía pero se piensa que entran en la célula por una proteína transportadora de gluconato, ya que se ha observado una inhibición competitiva entre ambos sustratos (Brochu C et al. 2003). En cuanto al  $\text{Sb}^{\text{III}}$ , se sabe que entra al parásito por medio de la aquagliceroporina AQP1 (Gourbal B et al. 2004) (Fig. 22). Las aquagliceroporinas son proteínas de membrana de la familia de las aquaporinas que transportan agua, glicerol y otros solutos de tamaño pequeño a través de la membrana celular. En varias cepas de *Leishmania*, una menor acumulación de antimonio se ha relacionado con una menor expresión de AQP1 (Marquis N et al. 2005).

Además de la disminución de la entrada del fármaco, otro mecanismo de resistencia a antimonio en *Leishmania* implica el secuestro del fármaco o su eflujo al exterior celular. La primera proteína relacionada con la resistencia a antimoniales fue el transportador ABC MRPA, que conferiría dicha resistencia mediante el secuestro de conjugados metal-tiol en vesículas próximas al bolsillo flagelar (Legare D et al. 2001). Adicionalmente, se ha observado que el transportador ABCI4, que se localiza en las membranas mitocondrial y plasmática de *Leishmania*, confiere resistencia a antimoniales mediante un incremento en su eflujo al exterior celular, probablemente en forma de conjugados con tioles (Manzano JI et al. 2013) (Fig. 22).

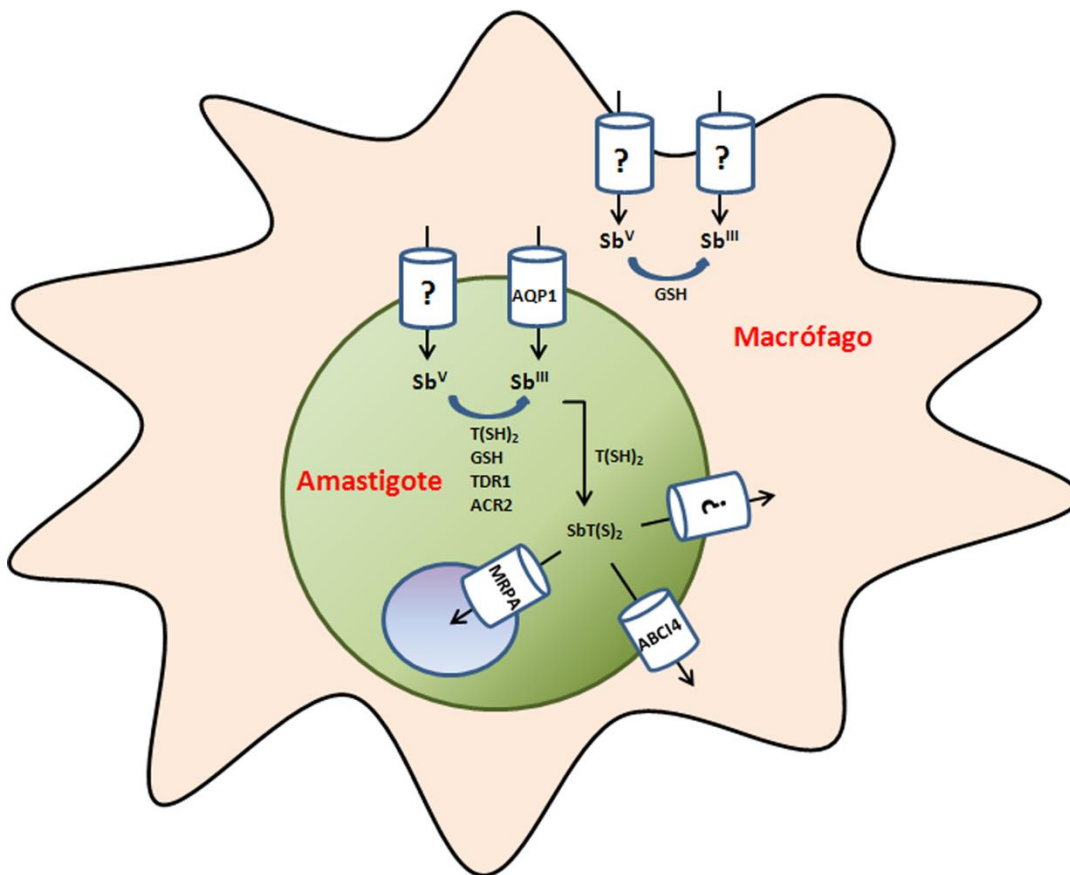


Figura 22. Representación esquemática de los mecanismos de resistencia frente a fármacos antimoniales.  $T(SH)_2$ : Tripanotión reducido;  $SbT(S)_2$ : Conjugado de  $Sb^{III}$  con tripanotión; MRPA: Transportador ABC (ABCC3); AQP1: Aquogliceroporina-1; GSH: Glutatión; ACR2: Arsenato reductasa-2; TDR1: Reductasa dependiente de tioles.

Dado que parte del modo de acción de los antimoniales consiste en depletar los niveles de tioles reducidos (Wyllie S et al. 2004), no es extraño que líneas celulares de *Leishmania* resistentes a los antimoniales tengan incrementados los niveles de  $T(SH)_2$  (Croft SL et al. 2006). Se ha observado que los genes que codifican para enzimas necesarias para la formación de los precursores del  $T(SH)_2$  como la  $\gamma$ -glutamilcistein sintetasa y la ornitina descarboxilasa están amplificadas en líneas resistentes (Ashutosh et al. 2007). Además, inhibidores de la ruta de la síntesis de tioles como BSO (L-butionina-(SR)-sulfoximina) y DMFO (DL- $\alpha$ -difluorometilornitina) son capaces de revertir la resistencia.

En cuanto a la **pentamidina**, se desconoce su diana terapéutica, pero se ha sugerido que está relacionada con la mitocondria (Mukherjee A et al. 2006). Aunque no se han detectado eventos de amplificación génica en aislados clínicos

resistentes a pentamidina, se cree que el transportador ABCC7 podría estar implicado en la resistencia a pentamidina mediante su expulsión fuera del parásito mediante vesículas (Coelho AC et al. 2003).

Como se ha citado con anterioridad, la **anfotericina B** realiza su actividad leishmanicida interaccionando principalmente con el ergosterol. Existen estudios que correlacionan la emergencia de resistencia a anfotericina B con cambios en la fluidez de la membrana. En uno de los estudios, el principal esteroide de la línea resistente resultó ser un precursor del ergosterol y no el ergosterol mismo como se había observado en pacientes sensibles (Mbongo N et al. 1998). También se ha descrito una línea clínica aislada resistente a anfotericina B que presentaba mayor fluidez de la membrana plasmática en comparación con la línea sensible (Purkait B et al. 2012). La línea resistente presentaba una expresión alterada de los dos transcritos de la enzima C-24- $\Delta$ -esteroide metiltransferasa además de la sustitución del ergosterol por colestano-5,7,24-trieno-3 $\beta$ -ol en la membrana plasmática, generando así una menor afinidad por la anfotericina B y la consecuente disminución en su acumulación (Purkait B et al. 2012). Adicionalmente, la expresión de MDR1 y los niveles de tioles intracelulares estaban incrementados en dicha línea resistente, lo cual sugiere que podría estar implicada en la translocación de anfotericina B (Purkait B et al. 2012).

Mediante el estudio de líneas mutantes de *Leishmania* obtenidas *in vitro* se han definido diferentes mecanismos de resistencia a **miltefosina**, incluyendo entre otros: disminución de la entrada del fármaco, cambios en la permeabilidad de la membrana, incremento del eflujo del fármaco, cambios en el metabolismo del parásito (Perez-Victoria FJ et al. 2003; Seifert K et al. 2003; Castanys-Muñoz E et al. 2007; 2008; Rakotomanga M et al. 2005; Kulshrestha A et al. 2014). Se ha observado que líneas de *Leishmania* resistentes a daunomicina tenían sobreexpresado el gen MDR1 y presentaban resistencia cruzada a miltefosina, siendo revertida al utilizar inhibidores específicos del transportador MDR1 (Perez-Victoria JM et al. 2001). Estos datos sugieren que el transportador MDR1 podría estar implicado en la resistencia a miltefosina. Adicionalmente, se ha observado una correlación entre resistencia y menor acumulación del fármaco provocado

por un defecto en la translocación del mismo (Perez-Victoria FJ et al. 2003). Igualmente, se ha demostrado que la sobreexpresión de los transportadores ABCG4 y ABCG6 de *L. infantum* conlleva a una menor acumulación de miltefosina (Castanys-Muñoz E et al. 2007; 2008). Sin embargo, la disminución en la entrada del fármaco al parásito por inactivación de los transportadores de miltefosina (LMT y LROs3) constituye actualmente el único mecanismo de resistencia a fármacos que se ha validado en aislados clínicos procedentes de pacientes con resistencia a miltefosina (Mondelaers A et al. 2016; Srivastava S et al. 2017). Se ha demostrado que la inactivación de cualquiera de las dos proteínas implicadas en la translocación del fármaco de la cara externa a la interna de la membrana plasmática, conocidas como el transportador de miltefosina LMT y su subunidad beta LROS3, provoca resistencia a miltefosina en *L. donovani* tanto *in vitro* como *in vivo* (Perez-Victoria et al. 2003; 2006; Seifert K et al. 2007). De hecho, el transportador LMT ha sido validado como marcador de resistencia a miltefosina en aislados clínicos de *Leishmania* (Srivastava S et al. 2017).

## TRANSPORTADORES ABC

Los transportadores ABC (ATP-binding cassette) constituyen una de las familias de proteínas más amplias que existen. Están implicados en distintas funciones biológicas como traducción del mRNA, replicación y reparación del DNA o regulación diversos procesos celulares. Sin embargo, son considerados especialmente como proteínas de membrana que transportan compuestos (alócritos) a través de las bicapas lipídicas utilizando la energía proveniente de la hidrólisis del ATP. Muchas proteínas ABC son de relevancia médica debido a su relación con enfermedades de origen genético como la fibrosis quística, diabetes e hipercolesterolemia, bien a través de mutaciones o por una expresión alterada de estas proteínas. Los transportadores ABC juegan papeles clave en detoxificación celular de endo y xenobióticos y su sobreexpresión está frecuentemente asociada con el fenotipo MDR (multidrug resistance), descrito en células tumorales y en

numerosos microorganismos patógenos (Higgins. CF 1992; Choi YH y Yu AM. 2013).

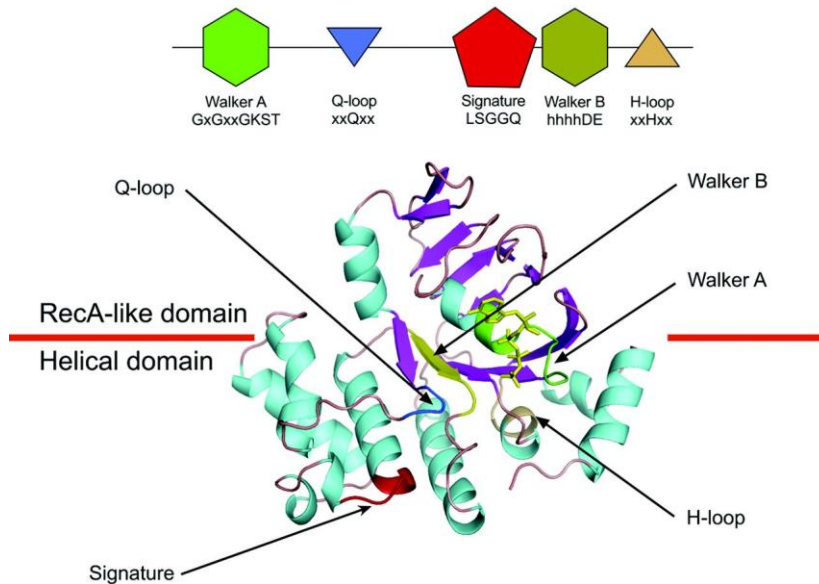
Los miembros de la familia de transportadores ABC tienen un carácter ubicuo, estando presentes en organismos de todos los reinos de la vida. Los ABC exportadores se encuentran tanto en eucariotas como procariotas, mientras que los importadores parecen estar presente exclusivamente en estos últimos. En general, un transportador ABC generalmente consta de cuatro dominios: dos dominios citoplásmicos de unión a ATP (NBDs, nucleotide-binding domain) y dos transmembrana (TMDs, transmembrane domains) (Fig. 24). Los NBDs, cuya secuencia primaria está altamente conservada entre los miembros esta familia, se unen al ATP y lo hidrolizan. Por otro lado, los TMDs poseen una secuencia primaria y plegamiento relativamente variables, y forman la vía de translocación a través de la membrana determinando generalmente la especificidad por el sustrato.

El dominio NBD está caracterizado por cinco motivos aminoacídicos conservados que se presentan en el siguiente orden (Fig. 23): El Motivo **Walker A** (GXXGXGKS/TS/T, donde X es cualquier aminoácido), un residuo de glutamina presente en el **loop Q**, el motivo **sello** (motivo C, LSGGQ), el motivo **Walker B** (h4DE/D, donde h corresponde a un residuo hidrofóbico) y un residuo de histidina altamente conservado presente en el **loop H**. Otros motivos conservados son el **loop A** (que ayuda a posicionar la molécula de ATP mediante su unión al anillo de adenina) y el **loop D** (implicado en mantener la geometría del sitio catalítico) (ter Beek J et al. 2014). La estructura cristalina de muchos transportadores ABC se ha obtenido proporcionándonos información sobre la localización espacial de sus diferentes partes. Un dominio NBD consta a su vez de dos dominios estructurales (Fig. 23): un dominio RecA-like que contiene los motivos Walker A y Walker B, y un dominio helicoidal que contiene el motivo sello (Ye J et al. 2004). Los motivos Walker A y Walker B participan en la hidrólisis del ATP, uniéndose a los grupos fosfato de los nucleótidos y al  $Mg^{2+}$  necesario para la hidrólisis respectivamente (Rees DC et al. 2009). A su vez, el loop H ayuda al posicionamiento del ion magnesio mientras que el loop Q constituye el principal

## Introducción

---

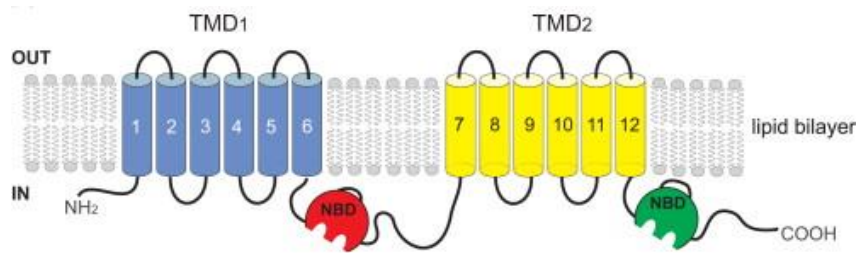
sitio de interacción con el dominio TMD y forma el sitio activo del NBD cuando el ATP-Mg se une (ter Beek J et al. 2014).



**Figura 23: Estructura del dominio NBD de un transportador ABC (Dassa E. 2011).**

Los dominios TMD están compuestos por varios segmentos  $\alpha$ -helice (MSH) que atraviesan la membrana. El transportador ABC prototípico contiene 6 segmentos por dominio (12 segmentos en total), aunque el número y longitud de los mismos es variable (Fig 24). La especificidad por el sustrato es un factor que depende en gran medida de los dominios TMD. De hecho, existen transportadores muy especializados que translocan un número reducido de sustratos, mientras que otros reconocen una amplia variedad de sustratos. El transportador ABCB1 es capaz de interactuar con compuestos endógenos como péptidos, hormonas y colesterol, además de xenobióticos u otros compuestos que pueden modular su actividad (Hodge LM et al. 2011).





**Figura 24. Estructura de un transportador ABC con dos NBDs (rojo y verde) y dos TMDs (azul y amarillo) cada uno conteniendo 6 segmentos transmembrana (Dermauw W y Leeuwen T. 2013).**

Los cuatro dominios que componen un ABC típico pueden expresarse de forma independiente, como pares de dominios o como una única proteína. Por ejemplo, los importadores ABC de procariontes se caracterizan por expresar los dominios NBD y TMD en polipéptidos independientes. Además, requieren de un dominio SBP (solute-binding protein) que se une al sustrato con gran afinidad y lo lleva al TMD para su translocación (Holland IB. 2011). En organismos eucariotas los transportadores ABC pueden estar codificados como full-transporters (TMD-NBD-TMD-NBD o NBD-TMD-NBD-TMD) o como half-transporters (TMD-NBD o NBD-TMD) que deberán homo- o heterodimerizar para formar una unidad funcional (Fig. 25). Como ejemplo de full-transporters tenemos las proteínas ABCB1, ABCB11 o ABCC4 (Fig. 25-A), mientras que las proteínas de ABCB6 a ABCB10 pertenecerían a la categoría de half-transporters con su NBD en el extremo C-terminal (Fig. 25-C). Por otro lado, la subfamilia ABCG se caracteriza por ser half-transporters que presentan el NBD en el extremo N-terminal (Fig. 25-D).

Para que la proteína funcione, ambos dominios NBD son necesarios debido al papel que desarrollan en la hidrólisis del ATP. Sin embargo, algunas proteínas ABC eucariotas no poseen dominios TMD en su estructura, estando relacionadas con funciones reguladoras no asociadas al transporte. Por ejemplo, la familia UVR (proteína Uvra) son transportadores ABC de bacterias implicados en la reparación del DNA, que están constituidos únicamente por dos dominios NBD unidos en tándem (Dassa E. 2011). Por otro lado, en otros transportadores ABC existen dominios adicionales que añaden funciones complementarias y frecuentemente reguladoras al transportador. La proteína humana CFTR (cystic



## Introducción

---

fibrosis transmembrane conductance regulador), también conocida como ABCC7, posee un dominio extra (dominio R) entre el NBD1 y el TMD2 que regula la actividad del canal de cloro de la CFTR (Zolnerciks M et al., 2011). Sin embargo, una de las configuraciones más comunes es que el dominio extra se encuentre en el extremo N-terminal del transportador, como es el caso de ABCC1, ABCC2 y ABCC3 (Gillet JP et al. 2007) (Fig 25-B).

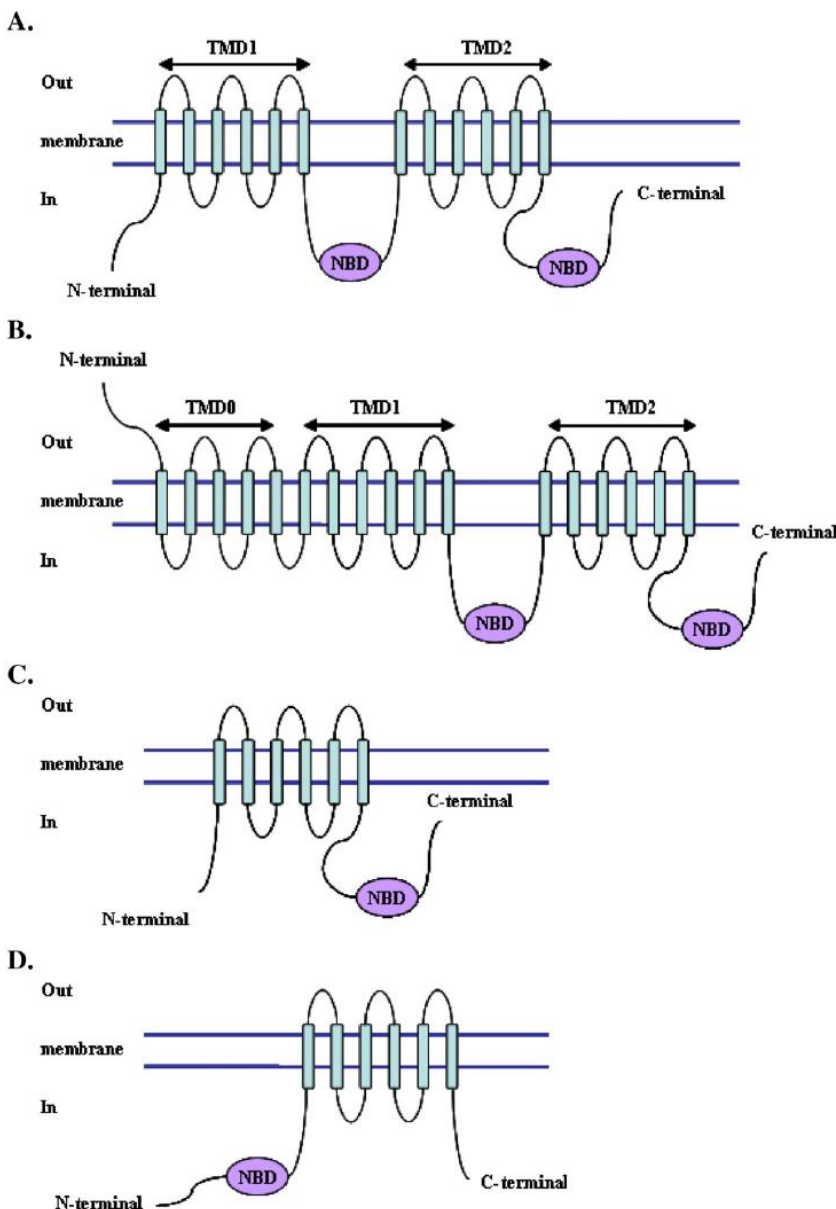


Figura 25: Estructuras de los transportadores ABC. A) Full-transporter típico con 12 segmentos transmembrana. B) Full-transporter con un dominio TMD adicional de 5 segmentos transmembrana en el extremo amino terminal. C) Half-transporter con el NBD en el extremo C-terminal del dominio transmembrana. D) Half-transporter con el NBD en el extremo N-terminal del dominio transmembrana (Gillet M et al. 2007).

## **Clasificación de los transportadores ABC**

Los transportadores ABC pueden clasificarse en tres categorías funcionales principales: (1) Los importadores median el uptake de nutrientes en procariontes; la naturaleza de los sustratos transportados es muy amplia, incluyendo mono- y oligosacáridos, iones orgánicos e inorgánicos, aminoácidos y péptidos. (2) Los exportadores existen tanto en procariontes como eucariotes y están relacionados con la secreción de distintas moléculas tales como péptidos, lípidos, esteroides, polisacáridos, nucleótidos, fármacos, metales pesados y toxinas como la hemolisina. (3) La tercera categoría de transportadores no median transporte, estando algunos de sus miembros relacionados con la traducción del mRNA y la reparación del DNA (Davidson AL et al. 2008).

El genoma humano codifica para 48 transportadores ABC divididos en 7 subfamilias, de la A a la G, basándose en su configuración estructural y análisis filogenético (Moitra K y Dean M. 2011). La subfamilia ABCH se identificó por primera vez en *Drosophila melanogaster* y se ha descrito en artrópodos, erizos de mar y teleósteos (Jeong CB et al. 2015). Además, existe una familia adicional denominada ABCI tanto en plantas (Kang J et al. 2011) como en *Leishmania* (Manzano JI et al. 2013).

## **Mecanismo de acción de los transportadores ABC**

En cada ciclo de translocación, los transportadores ABC alternan entre estados de baja y alta afinidad por el sustrato que dependen del ciclo catalítico del ATP. El modelo de transporte sigue esencialmente cuatro pasos (Fig. 26) (Linton KJ. 2007).

**Paso 1: el ligando se une a los TMDs con el dímero NBD en una conformación abierta, incrementando la afinidad por el ATP.** En su forma libre de nucleótidos, los transportadores ABC presentan una gran afinidad por el

alócrita. La unión del ligando a los TMDs causa un cambio conformacional en los NBDs que resulta en una mayor afinidad por el ATP.

**Paso 2: la unión del ATP induce la formación del dímero NBD cerrado, que lleva a un gran cambio conformacional en los TMDs suficiente para translocar el ligando.** Hay datos estructurales que afirman que las dos moléculas de ATP son necesarias para el cambio conformacional, actuando de forma coordinada en un único paso. Además, es posible que la reorganización de los TMDs altere la posición y la afinidad del sitio de unión al ligando. En la glicoproteína-P, la unión de análogos de ATP no hidrolizables es suficiente para reducir la afinidad por el fármaco vinblastina (Martin C et al. 2000). En el transportador CFRT, la unión del ATP en ausencia de hidrólisis, es capaz de abrir el canal de cloruro (Vergani P et al. 2005).

**Paso 3: la hidrólisis del ATP inicia la apertura del dímero NBD.** Aunque el mecanismo por el cual sucede no está claro, la hidrólisis del ATP desestabiliza el cierre del dímero NBD. Para algunos transportadores ABC como la glicoproteína-P, la hidrólisis de ambos ATPs es necesaria para completar el ciclo de transporte, aunque no se hidrolizan al mismo tiempo (Hrycyna CA et al. 1998; Tomblin et al. 2005). En otros transportadores ABC como MRP1 y CFRT, se ha sugerido que la hidrólisis de una sola molécula de ATP es suficiente para producir el cambio conformacional (Aleksandrov AA et al. 2000; Yang R et al. 2003).

**Paso 4: los grupos fosfato y seguidamente el ADP, se liberan para completar el ciclo de transporte y devolver a la proteína a un estado de alta afinidad por el ligando.** La afinidad de los transportadores ABC por el ADP es baja, por lo que esta molécula es incapaz de mantener el estado dimérico de los NBDs. Para la proteína MutS, implicada en la reparación del DNA, el ADP permanece unido hasta que la unión del ADN induce un intercambio por el ATP (Gradia S et al. 1999).

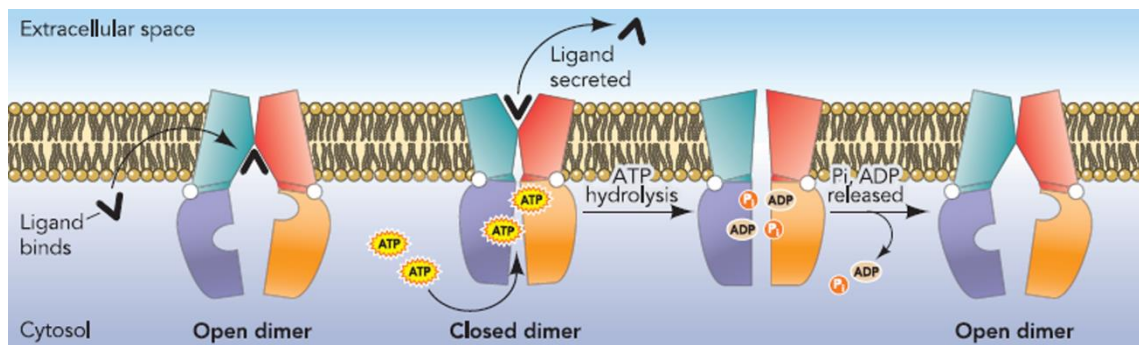


Figura 26: Modo de acción de un transportador ABC (Linton KJ. 2007).

### Transportadores ABC en *Leishmania*

De acuerdo con los proyectos de secuenciación de los genomas de *L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis*, estas especies contienen alrededor de 8.000 genes con 42, 43 y 39 genes codificantes para transportadores ABC, respectivamente (Leprohon P et al. 2006; Leprohon P et al. 2009). Análisis in silico han demostrado que al menos 3 genes están ausentes en *L. braziliensis* (ABCB4, ABCC1 y ABCG3) así como un gen extra (ABCC9) presente en *L. infantum* (Leprohon P et al. 2009). Otros dos tripanosomátidos relacionados con *Leishmania*, *Trypanosoma brucei* y *Trypanosoma cruzi*, tienen un número menor de proteínas ABC (28 y 22, respectivamente), indicando que la familia de genes ABC en *Leishmania* está expandida (Sauvage V et al. 2009). Un número reducido de transportadores ABC están regulados a través de los diferentes estadios del parásito. Los genes ABCA3 y ABCG3 se expresan preferencialmente en las formas amastigotes, mientras que la expresión de ABCF3 se encuentra incrementada en las formas promastigotes (Leprohon P et al. 2006).

Teniendo en cuenta la homología en las secuencias de los dominios TMD y NBD, los transportadores ABC en *Leishmania* se agrupan en 9 subfamilias (ABCA-ABCI). La subfamilia ABCI está compuesta por 4 genes sin homología entre sí (Leprohon P et al. 2006; Manzano JI et al. 2013). Hasta la fecha, en *Leishmania* se han estudiado transportadores ABC de las subfamilias ABCA, ABCB, ABCC, ABCG y ABCI (Fig. 27).

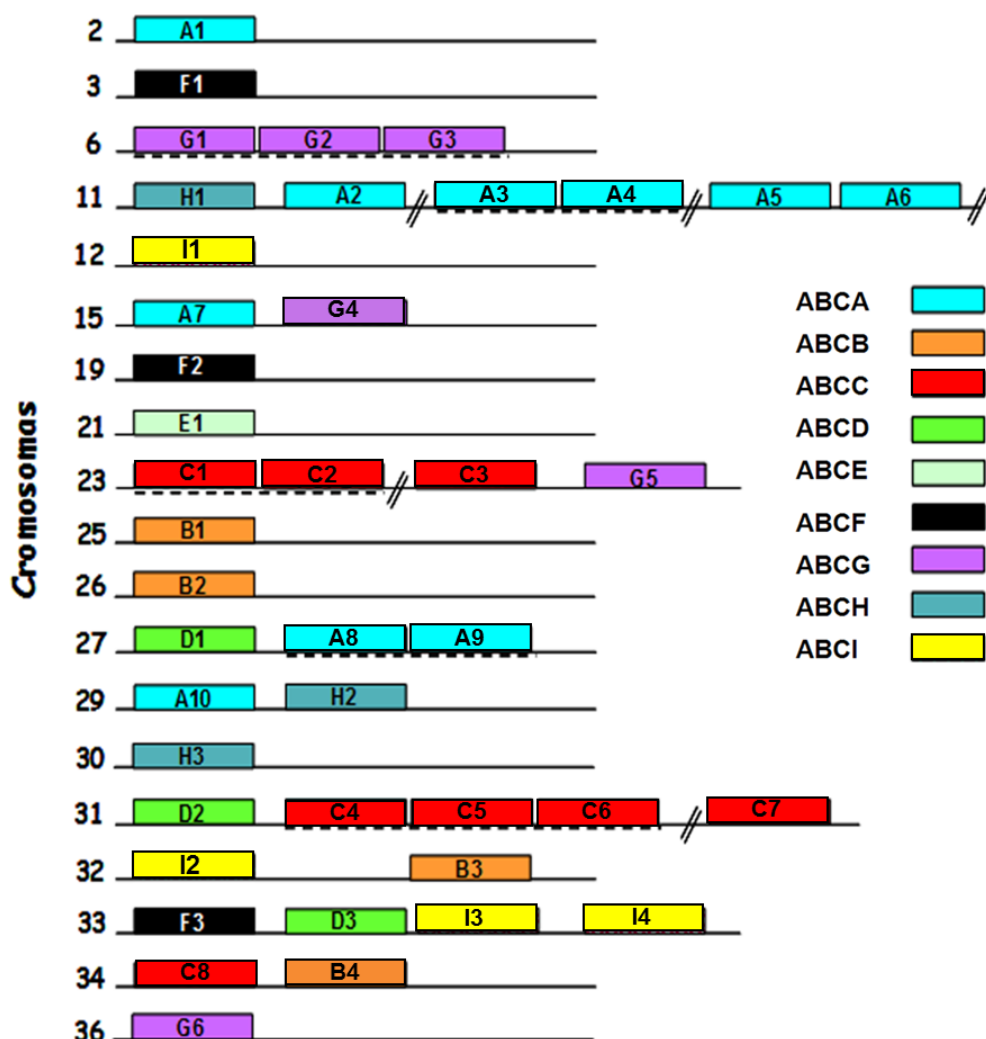


Figura 27: Localización cromosómica de los genes que codifican proteínas ABC en *Leishmania*. Los cromosomas aparecen representados por líneas horizontales, y los genes ABC, como rectángulos coloreados. Una línea discontinua debajo de los genes, representa genes agrupados en tándem. Las líneas inclinadas en los cromosomas separan miembros de una misma familia que no están en el mismo locus. Adaptado de (Leprohon P et al. 2006).

### Subfamilia ABCA

Esta subfamilia contiene algunos de los miembros más extensos de la familia ABC, con más de 200 KDa de peso molecular y estructura típica TMD-NBD-TMD-NBD. En *Leishmania*, la subfamilia ABCA contiene 10 miembros (ABCA1-ABCA10) presentes en el genoma de todas las especies (Leprohon P et al. 2006). Únicamente dos proteínas de la subfamilia ABCA se han caracterizado en

*L. tropica*: ABCA4 y ABCA8, inicialmente llamadas LtrABCA2 y LtrABCA1.1. ABCA8 fue el primer miembro de esta subfamilia descrito en eucariotas unicelulares, y está localizado en el bolsillo flagelar y membrana plasmática (Parodi-Talice et al. 2003), mientras que ABCA4 se localiza también en vesículas internas (Araujo-Santos et al. 2005). Se ha observado que ambas proteínas están implicadas en la translocación de fosfolípidos en la membrana plasmática y su sobreexpresión reduce la infectividad de los parásitos *in vitro* (Parodi-Talice A et al. 2003; Araujo-Santos. 2005), no estando implicadas en la resistencia a fármacos en *Leishmania* (Araujo-Santos JM et al. 2005).

### **Subfamilia ABCB**

En *Leishmania*, la subfamilia ABCB consta de cuatro miembros, dos de ellos con estructura de full-transporters y los otros dos de half-transporters (Leprohon et al. 2006). Las funciones principales que se les atribuye a estas proteínas son: resistencia a fármacos, transporte de péptidos y biogénesis de clusters hierro/azufre (Coelho AC y Cotrim PC. 2013 en Drug resistance in *Leishmania* parasites).

ABCB4 (LdMDR1, MDR1) fue el primer transportador ABCB descrito en *L. donovani*. En conjunto con ABCB2 (MDR2) estos full-transporters se han descrito en distintas especies de *Leishmania* como proteínas implicadas en resistencia a varios fármacos. El transportador ABCB4 está asociado con la resistencia a vinblastina y daunomicina además de otros fármacos hidrofóbicos como puromicina, adriamicina y doxorubicina, ninguna de ellas empleada en el tratamiento frente a la leishmaniasis (Coelho AC y Cotrim PC. 2013 en Drug resistance in *Leishmania* parasites). Curiosamente, se ha demostrado que la sobreexpresión de ABCB4 puede llevar a resistencia cruzada para miltefosina/edelfosina en parásitos de la especie *L. tropica* seleccionados para resistencia a daunomicina, lo que otorga relevancia clínica a este transportador (Perez-Victoria JM et al. 2001). La localización de ABCB4 en *L. enrietti* y *L. mexicana* es intracelular, en compartimentos endocíticos y secretorios incluyendo

## Introducción

---

el aparato de Golgi, retículo endoplasmático y MVT (Dodge MA et al. 2004) (Tabla I).

ABCB2 se caracterizó inicialmente en *L. amazonensis*. Está sobreexpresado en parásitos resistentes a 5-fluorouracilo y se localiza en el bolsillo flagelar y MVT (Coelho AC y Cotrim PC. 2013 en Drug resistance in *Leishmania* parasites) (Tabla I).

En cuanto a los otros dos miembros half-transporters de la familia, se denominan ABCB1 y ABCB3, pero por ahora se desconoce su papel biológico en *Leishmania*.

### Subfamilia ABCC

Esta familia incluye a un grupo de proteínas implicadas en el transporte de conjugados con tioles. El primer transportador ABC de *Leishmania* implicado en resistencia a fármacos fue ABCC3 (también conocido como PGPA o MRPA). Más en concreto, esta proteína está relacionada con la resistencia a antimoniales y arsenito, y se detectó originalmente en un amplicón de DNA extracromosómico de una línea de *L. tarentolae* resistente a metotrexato (Ouellette M et al. 1990). ABCC3 se localiza en vesículas intracelulares cercanas al bolsillo flagelar, por lo que se cree que confiere resistencia a fármacos mediante el secuestro de conjugados metal-tiol en dichas vesículas y posterior efflujo al exterior celular (Legare D et al. 2001) (Tabla I). Se ha descrito una sobreexpresión del transportador ABCC3 en amastigotes de *L. infantum* resistentes a antimonio, como ya se había detectado en promastigotes de diferentes especies de *Leishmania* (El Fadili K et al. 2005).

En *Leishmania*, se han descrito otros seis miembros de la subfamilia ABCC: ABCC2 (PgpB), ABCC1 (PgpC), ABCC5 (PgpD), ABCC4 (PgpE) y ABCC7 (PRP1). Se ha demostrado que los transportadores ABCC4, ABCC5 y ABCC7 están sobreexpresados en líneas de *Leishmania* con alto contenido en T(SH)<sub>2</sub>, sugiriendo que podrían estar implicados en el transporte de conjugados antimonio-tiol y por lo tanto en la resistencia a antimoniales (Leprohon et al. 2009)

(Tabla I). Además, la sobreexpresión de ABCC7 también confiere resistencia a pentamidina mediante su secuestro en vesículas y exocitosis por el bolsillo flagelar (Coelho et al. 2006). La sobreexpresión de este transportador también confiere resistencia a Sb<sup>III</sup> (Leprohon P et al. 2009) (Tabla I). Sin embargo, con la excepción de ABCC3, ningún ABCC se ha descrito estar amplificado en líneas resistentes a antimonio.

### Subfamilia ABCG

Esta subfamilia está compuesta por 6 miembros que presentan una estructura de half-transporter con disposición topológica inversa (NBD-TMD). Los transportadores ABCG han sido extensamente estudiados y caracterizados por nuestro grupo. ABCG4, se encuentra localizado en la membrana plasmática y está implicado en la translocación de análogos de fosfatidilcolina, confiriendo también resistencia a sitamaquina y a los alquilfosfolípidos miltefosina, edelfosina y perifosina en *L. infantum* (Castanys-Muñoz E et al. 2007) (Tabla I). El transportador ABCG5 se localiza en vesículas cercanas al núcleo y al bolsillo flagelar estando implicado en el transporte intracelular de hemo (Campos-Salinas J et al. 2011). ABCG6 se encuentra localizado en la membrana plasmática, y se ha sugerido que juega un papel importante en el tráfico de fosfolípidos ya que su sobreexpresión reduce los niveles intracelulares de fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina, confiriendo además resistencia a sitamaquina, miltefosina y camptotecina (Castanys-Muñoz E et al. 2008) (Tabla I). ABCG2, se localiza en vesículas intracelulares y parece estar implicado en el transporte de fosfolípidos, ya que se ha observado que un mutante inactivo de esta proteína presenta una reducción en la exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática, disminuyendo a su vez la virulencia de los parásitos (Campos-Salinas J et al. 2013). Adicionalmente, se ha demostrado que parásitos mutantes nulos para LABCG2 presentan un defecto en la metacicloogénesis y son más susceptibles a la lisis mediada por complemento (Manzano JI et al. 2017. Resultados defendidos en la tesis doctoral de David León Guerrero, 2016, Universidad de Granada). Sin embargo, aun quedan por



## Introducción

---

esclarecer varios aspectos relacionados con la virulencia e infectividad del parásito, así como otros procesos biológicos asociados a este transportador. Además, se desconoce si LABC2 tiene algún papel en resistencia a fármacos.

### Subfamilia ABCI

Además de las ocho subfamilias (ABCA-ABCH) presentes en *Leishmania*, hay cuatro miembros de la familia ABC que no comparten similitud entre sí ni con los miembros de las otras subfamilias. Por lo tanto, se ha agrupado a estas proteínas dentro de la denominada subfamilia ABCI. Hasta la fecha, se han caracterizado los transportadores ABCI3 y ABCI4. ABCI4 es un half-transporter localizado en la membrana plasmática y en la membrana mitocondrial del parásito, que confiere resistencia a antimoniales y otros metales pesados (arsenito, cadmio y plomo) debido a un incremento en el eflujo de los mismos al exterior celular, probablemente acomplejados con tioles (Manzano JI et al. 2013) (Tabla I). En cuanto a ABCI3, también se localiza en la membrana plasmática y mitocondrial del parásito. Se ha observado que una línea de *Leishmania* a la que se ha eliminado uno de los alelos de este gen, presentaba una reducción en la acumulación de antimonio debido a una disminución de su transporte al interior del parásito. Adicionalmente, esta línea era significativamente más resistente a  $Sb^{III}$ , mientras que la sobreexpresión de ABCI3 no mostraba este fenotipo (Arcari T et al. 2017).

### Otras subfamilias ABC

Hasta la fecha, muchos miembros de otras subfamilias (ABCD, ABCE, ABCF y ABCH) no se han caracterizado en *Leishmania*. La subfamilia ABCD contiene tres miembros con estructura de half-transporter (TM-NBD). En otros organismos se localizan en peroxisomas, pero los tripanosomátidos carecen de ellos. Las subfamilias ABCE y ABCF están compuestas por dos NBDs fusionados y no están relacionados con transporte, ya que carecen de dominios TMD. El ortólogo del ABCE1 humano en *T. brucei* está relacionado con la síntesis de proteínas y parece ser esencial para el crecimiento y supervivencia del parásito (Estevez AM

et al. 2004). La subfamilia ABCF incluye proteínas compuestas por dos NBDs que están implicadas en el control de la traducción del mRNA (Coelho AC y Cotrim PC. 2013 en Drug resistance in *Leishmania* parasites). Finalmente, la subfamilia ABCH únicamente contiene un dominio NBD (Leprohon P et al. 2006) y sus funciones no se han descrito.

ABC (Alias)	Leishmania sp.	Fármacos	Localización celular
ABCB2 (MDR2)	<i>L. amazonensis</i>	5-fluorouracilo	Bolsillo flagelar y túbulos multivesiculares asociados a lisosoma
ABCB4 (MDR1)	<i>L. amazonensis</i> , <i>L. enrieti</i> , <i>L. donovani</i> , <i>L. tropica</i>	Vinblastina, puromicina, daunomicina, miltefosina, edelfosina	Aparato de Golgi, Retículo endoplasmático, túbulos multivesiculares asociados a lisosoma y mitocondria
ABCC3 (PGPA/MRPA)	<i>L. major</i> , <i>L. tarentolae</i> , <i>L. infantum</i>	<i>L.</i> Antimonio trivalente y <i>L.</i> pentavalente, arsenito	Vesículas entre el núcleo y el bolsillo flagelar
ABCC4	<i>L. infantum</i>	Antimonio trivalente	Compartimento tubular orientado a lo largo del eje longitudinal del parásito
ABCC5	<i>L. infantum</i>	Antimonio trivalente	Compartimento tubular orientado a lo largo del eje longitudinal del parásito
ABCC7 (PRP1)	<i>L. major</i>	Pentamidina, antimonio trivalente	Vesículas intracelulares
ABCG4	<i>L. infantum</i>	Miltefosina, edelfosina, sitamaquina	Membrana plasmática y bolsillo flagelar
ABCG6	<i>L. donovani</i> , <i>L. infantum</i>	Camptotecina, miltefosina, cloroquina, sitamaquina	Membrana plasmática y bolsillo flagelar
ABCI4	<i>L. major</i>	Antimonio trivalente y pentavalente, arsenito, cadmio, plomo	Membranas plasmática y mitocondrial
ABCI3	<i>L. major</i>	Antimonio trivalente y pentavalente	Mitocondria

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



## **OBJETIVOS**



### OBJETIVOS

La leishmaniasis es una enfermedad ampliamente extendida que representa un grave problema de salud pública. Existen más de 12 millones de casos clínicos en todo el mundo y su incidencia se encuentra en continuo crecimiento. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados para encontrar una vacuna segura y eficaz frente a esta enfermedad, la única herramienta de lucha actualmente disponible es la quimioterapia. Desafortunadamente, el arsenal de fármacos existente es limitado. Adicionalmente, está aumentando el número de pacientes que no responden al tratamiento debido a la aparición de resistencias frente a estos fármacos.

Uno de los mecanismos de resistencia a fármacos en *Leishmania* se basa en una reducción en la acumulación del fármaco debido a un incremento en el eflujo del mismo, mediado por los transportadores ABC. Estos transportadores constituyen una de las familias de proteínas más amplias que existen, estando presentes a lo largo de toda la escala evolutiva desde procariotas a humanos. Están implicados en diversos procesos biológicos de relevancia clínica, siendo su función más destacable el transporte de sustancias a través de las membranas biológicas en un proceso dependiente de ATP.

El genoma de *L. major* contiene 42 genes que codifican para proteínas ABC, distribuidos en 9 subfamilias desde ABCA hasta ABCI. Los miembros de la subfamilia ABCG son half-transporters que tienen su NBD en el extremo amino y que necesitan dimerizar para generar una proteína activa. Nuestro grupo de investigación ha estudiado extensamente varios miembros de esta subfamilia. Por su parte, los transportadores ABCG4 y ABCG6 han demostrado tener un papel en la resistencia a fármacos en *Leishmania*. En cuanto al transportador LABCG2, parece estar implicado en la virulencia e infectividad del parásito.

Teniendo en cuenta estos antecedentes de la subfamilia ABCG, en la presente Tesis Doctoral establecemos como **objetivo general** profundizar en la caracterización funcional del transportador LABCG2 de *L. major* estudiando su implicación en la resistencia a fármacos, infectividad y en otros procesos asociados como autofagia y

## Objetivos

---

el metabolismo de tioles. Para ello, hemos planteado los siguientes **objetivos específicos**:

1. Determinar la implicación de LABCG2 en la resistencia a fármacos leishmanicidas.
2. Conocer la participación de LABCG2 en la infectividad de *Leishmania*, autofagia y metabolismo de tioles.
3. Estudiar la capacidad de LABCG2 para transportar tioles no conjugados.

# **MATERIAL Y MÉTODOS**





## MATERIAL

### Líneas celulares

**Parásitos:** la línea utilizada ha sido *Leishmania major* (MHOM/JL/80/Friedlin).

**Células de insecto Sf9:** línea celular derivada de *Spodoptera frugiperda*.

**Bacterias:** todas las cepas corresponden a la especie *Escherichia coli*.

- **DH5 $\alpha$ :** *supE44  $\Delta$ lacU169 ( $\phi$ 80lacZ  $\Delta$ M15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1* (GibcoBRL).
- **TOP10:** Invitrogen. (Carlsbad, USA) F- *mcrA  $\Delta$  (mrr-hsdRMS-mcrBC )  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ lacX74recA1 deoR araD139  $\Delta$  (ara-leu) 7697 galU galK rpsL* (StrR) *endA1nupG*.
- **XL10-GOLD $\text{\textcircled{R}}$ :** TetR  $\Delta$ (*mcrA*)183  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA-1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIq  $\Delta$ M15 Tn10 (TetR) Amy CamR]a* (Stratagene).

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

### Animales

Ratones de la cepa BALB/c (hembras de seis semanas) provenientes de Charles River Breeding Laboratories, se mantuvieron en condiciones libres de patógenos en el animalario del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, IPBLN-CSIC.

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

**Solución de aminoácidos, azúcares y ácidos orgánicos (SAA 10X):** esta solución se adiciona al medio de cultivo y se compone de arginina 4,4 mg/ml, cistina 0,8

## Material y métodos

---

mg/ml, glutamato 2,5 mg/ml, glutamina 16,4 mg/ml, prolina 69 mg/ml, L-ornitina 1 mg/ml, glucosa 7 mg/ml, fructosa 4 mg/ml, malato 6,7 mg/ml,  $\alpha$ -cetoglutarato 3,7 mg/ml, fumarato 0,6 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 1mg/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.

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

**Medio M-199:** el medio M-199 (Gibco, Carlsbad, USA) se suplementa con 10% de hiFBS.

**Geneticina (G-418):** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Antibiótico producido por la bacteria *Micromonospora rhodorangea*. Se trata de un aminoglicósido que bloquea la síntesis proteica inhibiendo el paso en el que se produce la elongación polipeptídica. Se utilizó como antibiótico de selección de los parásitos transfectados con los vectores que contenían el gen de la neomicina fosfotransferasa. Se utilizó en un rango de concentraciones comprendidas entre 5 y 50  $\mu$ g/ml para la selección de los parásitos transfectados, mientras que para el mantenimiento de las líneas transfectadas se empleó una concentración de 50  $\mu$ g/ml.

**Blasticidina:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Antibiótico nucleósido producido por *Streptomyces griseochromogenes* que inhibe la síntesis proteica en bacterias y eucariotas. Inhibe la hidrólisis del peptidil-tRNA, y consecuentemente la liberación del polipéptido del ribosoma. Se utilizó como antibiótico de selección de los parásitos transfectados con el vector pNUS ATG8-RFP. Se utilizó en un rango de concentraciones comprendidas entre 5 y 50  $\mu$ g/ml para la selección de los parásitos

transfectados, mientras que para el mantenimiento de las líneas transfectadas se empleó una concentración de 50 µg/ml.

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

**Dimetilsulfóxido (DMSO):** VWR (Radnor, USA).

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

**LB líquido:** este medio contiene 10 g de bacto-triptona, 10 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura llevado hasta 1 L con agua bidestilada, pH 7,5, siendo necesario autoclavar el medio.

**LB-Agar:** bacto-agar al 1,5% en LB líquido. La esterilización se realiza mediante autoclave.

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

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

Esta línea se mantiene en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de hiFBS, 2 mM glutamato, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina.

### **Medio para el cultivo de células Sf9**

Esta línea celular se mantiene en medio TNM-FH (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) suplementado con 10% de hiFBS, penicilina (100 U/ml)-estreptomina (100 µg/ml) y 0,005% de Poloxamer 188 (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA).

## Material y métodos

---

### Reactivos de Biología Molecular

**5-bromo-4-cloro-3-indol- $\beta$ -galactopiranosido (X-Gal):** Roche (Basilea, Suiza).

Solución 20 mg/ml en dimetilformamida.

**Agarosa:** iNtRON Biotechnology (Seongnam, Corea del Sur).

**Ampicilina:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Solución 100 mg/ml en agua.

**Bromuro de etidio:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Desoxinucleótidos:** Roche (Basilea, Suiza).

**Enzimas de restricción:** Roche (Basilea, Suiza), Thermo Fisher (Waltham, USA), New England BioLabs (Ipswich, USA).

**Fenol:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Glicerol:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

**Ácido tricloroacético:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Isopropil- $\beta$ -D-tiogalacto-piranosido (IPTG):** Roche (Basilea, Suiza). Solución 0,5 M en agua.

**Igepal:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Marcadores de peso molecular: lambda DNA/HindIII, phi174 DNA/HaeIII:** Promega (Madison, USA).

**MEGAquick-spin™ Total Fragment DNA purification:** iNtRON Biotechnology (Seongnam, Corea del Sur) Kit de limpieza de DNA.

**DNA-Spin™ Plasmid DNA purification Kit:** iNtRON Biotechnology (Seongnam, Corea del Sur). Kit de extracción de DNA plasmídico a pequeña escala.

**PureGene™:** Qiagen (Hilden, Alemania). Kit de aislamiento de DNA genómico.

**High Pure RNA Isolation Kit®:** Roche (Basilea, Suiza). Kit de extracción de RNA total.

**qScript cDNA Synthesis Kit®:** Quanta Biosciences (Beverly, USA). Kit para obtener cDNA a partir de RNA.

**T4 DNA ligasa:** Invitrogen (Carlsbad, USA).

**iTaq™ DNA polimerasa PCR:** iNtRON Biotechnology (Seongnam, Corea del Sur). Kit para amplificar fragmentos de DNA por la reacción en cadena de la polimerasa.

**Amaxa™ HumanT Cell Nucleofector™ Kit:** Lonza (Basilea, Suiza). Utilizado para realizar las transfecciones de los parásitos con los distintos plásmidos generados.

**Penicilina:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Estreptomicina:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**In-Fusion® HD Cloning Kit:** Takara Bio Inc (Kusatsu, Japón). Empleado para realizar mutagénesis basada en PCR inversa.

### **Compuestos y reactivos para el estudio funcional de LABCG2**

**Acido 2,2'-dinitro-5,5'-ditiodibenzoico (DTNB).** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Ácido metanosulfónico (CH<sub>4</sub>SO<sub>3</sub>):** Merck Millipore (Billerica, USA)

**Antimonio trivalente (Sb<sup>III</sup>):** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

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

**Arsenito trivalente (As<sup>III</sup>):** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Pentamidina:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Paromomicina:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Anfotericina B:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Ketoconazol:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Cloroquina:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Quinina:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

## Material y métodos

---

**Mefloquina:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Primaquina:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Vinblastina:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

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

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

**Miltefosina (hexadecilfosfocolina):** Aeterna Zentaris (Charleston, USA).

**Daunomicina:** Pfizer (Nueva York, USA).

**Cloruro de Cadmio (CdCl<sub>2</sub>):** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Cloruro de Cobalto (CoCl<sub>2</sub>):** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Sulfato de Cobre (CuSO<sub>4</sub>):** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Borohidruro de Sodio (NaBH<sub>4</sub>):** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Bromuro de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolium] (MTT):** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Stock 5 mg/ml en PBS y filtrado. Se almacena a 4°C.

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

**Coctel de inhibidor de proteasas:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF):** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Se disolvió en isopropanol a una concentración de 100  $\mu$ g/ml.

**Azida:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Triton X-100:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dilactate):** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). En su forma Prolong- Gold antifade agent with DAPI para marcaje en muestras fijadas para microscopia.

**ThioStar®:** Luminos (Ann Arbor, USA). Sonda empleada para medir los niveles de tioles no proteicos.

**CellTracker:** Thermo Fisher (Waltham, USA). Sonda fluorescente utilizada para medir los niveles de tioles.

**Acetato de forbolmiristato (PMA):** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Monobromobimano:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**ATP (Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate):** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Glutación (GSH):** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Glutación disulfuro (GSSG):** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**S-Metil-glutación (Metil-GS):** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Cloruro de magnesio hexahidrato (MgCl<sub>2</sub>):** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Tripanotión (TSH<sub>2</sub>):** cedido por la Dra. L. Krauth-Siegel (Heidelberg, Germany)

**Tripanotión disulfuro (TS<sub>2</sub>):** obtenido a partir del tripanotión como se describe en (Comini et al. 2009).

**[<sup>3</sup>H]-GSH:** [glycine-2-<sup>3</sup>H] GSH (45 Ci mmol<sup>-1</sup>). PerkinElmer (Waltham, USA).

### **Reactivos para inmunodetección**

**Albúmina de suero bovino (BSA):** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Anticuerpo policlonal anti-GFP de conejo:** Rockland Immunochemicals (Pottstown, USA).

**Anticuerpo policlonal anti-RFP de conejo:** Invitrogen (Carlsbad, USA).

**Anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa:** Dako (Glostrup, Denmark).



## Material y métodos

---

**Anticuerpo monoclonal WIC 73.9:** cedido por el Dr. G. Spaeth (Instituto Pasteur, Paris).

**Anticuerpo monoclonal 3F12:** cedido por el Dr. S. Smith (Universidad de York, UK).

**Anticuerpo anti- $\alpha$ -tubulina:** Thermo Scientific (Waltham, USA).

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

**Anticuerpo monoclonal anti-triparredoxina peroxidasa citosólica:** cedido por la Dra. AM. Tomás (IBMC, Portugal).

**Membranas de transferencia (PVDF):** Immobilon®-P, Merck Millipore (Billerica, USA). Membranas de fluoruro de polivinilideno hidrofílico.

**Paraformaldehído:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**Reactivos ECL™ plus Western blotting detection system:** Pierce, Thermo Fisher (Waltham, USA). Para la detección en *Western blot*.

**Tween-20:** Merck Millipore (Billerica, USA).

**Reactivo de transfección FuGeneHD:** Promega (Madison, USA). Empleado para la transfección de los baculovirus.

**tDNA linear de baculovirus:** Oxford Expression Technologies (Oxford, UK).

## TAMPONES Y SOLUCIONES

### Soluciones generales

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

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

**Tampón HBS:** NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 7 mM, glucosa 6 mM y Hepes 21 mM a pH 7,4.

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

### **Soluciones y reactivos para la electroforesis de proteínas**

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

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

**Acrilamida-bisacrilamida:** Bio-Rad (Hércules, USA).

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

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

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

**Persulfato de amonio:** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). 100 mg/ml en agua destilada. Filtrar antes de usar.

**Tetrametiletilenediamina (TEMED):** Bio-Rad (Hércules, USA).

**n-dodecil-β-D-maltopiranosido (DDM):** Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

**β-mercaptoetanol.** Merck Millipore (Billerica, USA).

## Material y métodos

---

**Bio-Rad Protein Assay:** para medir la concentración de proteínas. Bio-Rad (Hércules, USA).

**PageRuler Prestained Protein Ladder:** Thermo Fisher (Waltham, USA).

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

**Buffer de corrida:** 25mM Tris, 250 mM glicina, 0,1% SDS.

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

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

**Buffer de transferencia:** Tris base 25 mM, glicina 192 mM, 20% metanol.

**Solución de revelado:** ECL-Plus®. Pierce, Thermo Fisher (Waltham, USA).

### **Soluciones para la actividad ATPasa y transporte en membranas de células Sf9**

**Buffer TMEP:** 50 mM Tris-HCl, 50 mM manitol, 2 mM EGTA-Tris pH 7,0, PMSF e inhibidores de proteasas.

**Buffer de reacción:** 50 mM MOPS-Tris pH 7, 0,50 mM KCl, 0,5 mM EGTA-Tris pH 7,0.

**Mix de transporte:** 0,1 M MOPS pH 7, 0, 1 M KCl and 0,1 M MgCl<sub>2</sub>.

**Buffer de lavado:** 0,1 M MOPS-Tris pH 7,0 and 1 M KCl.

## VECTORES PLASMÍDICOS

### Vectores de clonaje

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

### Vectores de expresión

**pUCNEOPLUS:** vector de expresión para *Leishmania* derivado del vector pX al que se le modificó la región de clonación múltiple (polylinker) (Parodi-Talice et al 2003); el vector contiene el gen neo que codifica para la neomicina fosfotransferasa que confiere resistencia a geneticina (LeBowitz et al 1990)

**pVL1392:** Invitrogen (Carlsbad, USA). Vector de expresión para baculovirus.

**pCDNA3.1:** vector de expresión para células HEK293. Cedido por el Dr. K. Ueda (Universidad de Kyoto, Japón).

**pNUS ATG8-RFP:** cedido por el Dr. J. Mottram (Universidad de York, UK).

## OLIGONUCLEÓTIDOS

### Clonaje de LABCG2 en vectores de expresión para *Leishmania*

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'
LABCG2 Xba I FW	ATTCTAGACCGTGACACTCTGCCTTCG
LABCG2 Kpn I RV	ATGGTACCCTCGAAGCTTCGCCACAGTC

### Clonaje de LABCG2 en vectores de expresión para Sf9

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'
PCG2 Not I FW	ATGCGGCCGCATGCCCCCTCCCGCAGCAACAC
PCG2H10 Xba I RV	ATTCTAGATCAATGGTGATGGTGATGGTGATGGTG

### Secuenciación de LABCG2

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'
LABCG2 1	GCACTTTCGCAAGGCGATGG
LABCG2 2	GAGTCCATCGGGTTCTCGTG
LABCG2 3	GCAAGCTGGTGCCTACTCG
LABCG2 4	GCAAGCTGGTGCCTACTCG

### Análisis de los niveles de expresión de LABCG2

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'
LABCG2-RT FW	CCTACAGAGGACACCTACA
LABCG2-RT RV	GAAGGGATTCTGGCAAG
GAPDH FW	GAAGTACACGGTGGAGGCTG
GAPDH RV	CGCTGATCACGACCTTCTTC

### Mutación del gen LABCG2

NOMBRE	SECUENCIA 5'-3'
LABCG2 K/M FW	GCCGGCA <sup>t</sup> GACAACGTTCTGAACGCGATCTGCGACCG
LABCG2 K/M RV	CGTTGTCa <sup>t</sup> GCCGGCACCGGACGACCCGAGGATCG

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

Granada, excepto los destinados a obtener la mutación en el gen LABCG2, que se obtuvieron a través de Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

## **MÉTODOS**

### **Cultivo de *Leishmania***

Los promastigotes de *Leishmania major* (MHOM/JL/80/Friedlin) así como las líneas derivadas de la cepa salvaje se cultivaron *in vitro* a 28°C en medio RPMI 1640 modificado y suplementado con 20% de hiFBS. El mantenimiento de los parásitos se realizó mediante la siembra de 4 millones de parásitos en fase logarítmica tardía cada 24-72 h en medio fresco.

### **Cultivo de bacterias**

Los cultivos de bacterias en líquido se realizaron en medio LB conteniendo el antibiótico de selección a 37°C en agitación durante 16 h. Para el cultivo de las bacterias en medio semisólido se emplearon placas de Petri con LB agar y se incubaron a 37°C. Los stocks de bacterias se almacenaron a -80°C en presencia de 15% de glicerol.

### **Cultivo de células THP-1**

Esta línea se mantiene a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de hiFBS, 2 mM glutamato, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina. El mantenimiento de las células se realizó mediante la siembra de  $6 \times 10^5$  células cada 48 h en medio fresco. Las células se diferencian a macrófagos con 20 ng de acetato de forbol miristato (PMA) durante 48 h, permitiéndoles así adquirir la capacidad de adherencia.

## **Material y métodos**

---

### **Cultivo de células Sf9**

Esta línea celular se mantiene a 27°C en agitación en medio TNM-FH (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) suplementado con 10% de hiFBS, penicilina (100 U/ml)-estreptomocina (100 µg/ml) y 0,005% de Poloxamer 188. El mantenimiento de las células se realizó mediante la siembra de  $0,5 \times 10^6$  células cada 48 h en medio fresco.

### **Criopreservación de los parásitos**

Para la congelación de los parásitos se tomaron 900 µl de cultivo de los mismos en fase de crecimiento logarítmica y se adicionaron 100 µl de DMSO. A continuación se depositaron en viales de congelación que se almacenaron a -80°C o en nitrógeno líquido.

La descongelación de los parásitos se llevó a cabo mediante la inclusión de los viales de congelación en un baño a 37°C y posterior resuspensión de los parásitos en 5 ml de medio de cultivo.

### **Preparación de células competentes**

El inóculo de bacterias se sembró en 5 ml de medio líquido sin antibióticos a 37°C durante 16 h. Para continuar con su crecimiento, 1 ml de este cultivo se sembró en 200 ml de LB y se mantuvo en agitación a 37°C hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0,375. Se enfriaron en hielo durante 15 min y se centrifugaron a  $3000 \times g$  durante 15 min a 4°C. Tras eliminar el sobrenadante, se resuspendieron las células en  $\frac{1}{2}$  del volumen inicial de  $Cl_2Mg$  frío y se incubaron en hielo durante 15-20 min. Una vez más, la suspensión se centrifugó a  $3000 \times g$  durante 15 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. Las células se resuspendieron en  $\frac{1}{50}$  del volumen de 0,1 M  $Cl_2Ca$  frío y se incubaron en hielo durante 1 h. Se le añadió glicerol a la suspensión hasta tener una concentración final del 15% y se alicuotearon en 200 µl en tubos preenfriados de 1,5 ml. Los stocks de bacterias se almacenaron a -80°C hasta su uso.

### **Transformación de células competentes por choque térmico**

Para la transformación por choque térmico, la mezcla de ligación de DNA se añadió a 100 µl de células competentes. A continuación, las bacterias se incubaron en hielo durante 30 min, 45 seg a 37°C y 2 min en hielo nuevamente. Rápidamente se añadieron 300 µl de LB y la suspensión se incubó a 37°C durante 1 h. La mezcla se plaqueó en el medio de selección adecuado y se incubó a 37°C durante 16 h.

### **Obtención de DNA genómico de parásitos**

El DNA genómico se aisló siguiendo el protocolo descrito para el Kit PureGene™ (Qiagen, Hilden, Alemania) partiendo de 40 millones de parásitos. Seguidamente, se resuspendió en agua bidestilada y se determinó su concentración mediante el uso de un espectrofotómetro ( $1\text{DO}_{260}$  DNA doble hebra= 47 µg/ml).

### **Aislamiento del gen LABCG2**

Para aislar el gen LABCG2 se utilizó la base de datos del genoma de *L. major* (GeneDB, código de acceso LmjF06.0090). Utilizando DNA genómico de *L. major* como molde, oligos aguas arriba y abajo del marco abierto de lectura del gen, añadiendo las dianas XbaI y KpnI, en 5' y 3' de la secuencia, y mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se consiguió amplificar un fragmento de 2052 pb del cromosoma 6 que se clonó en pGEM-T y posteriormente se secuenció.

Para los ensayos en células de insecto Sf9, se clonó en pGEM-T: el gen LABCG2 fusionado en su extremo carboxilo con una secuencia de corte TEV, 8 repeticiones en tandem de glicina-treonina-serina, la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), un epítipo FLAG y 10 histidinas procedentes de un clonaje anterior en el plásmido pcDNA 3.1, añadiendo las dianas NotI y XbaI.



### **Secuenciación del DNA**

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

### **Aislamiento de DNA plasmídico**

El DNA plasmídico se obtuvo a partir de 1,5-3 ml de cultivo bacteriano mediante el uso del DNA-spin™ Plasmid DNA Purification (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Corea del Sur). Este método se basa en la purificación de DNA plasmídico a pequeña escala a través de la lisis alcalina de las células y centrifugación por columnas que contienen una membrana de sílica gel. En presencia de altas concentraciones de sal caotrópica, la membrana retiene el DNA, el cual puede ser lavado y eluido en un buffer bajo en sales.

### **Mutagénesis dirigida**

Para obtener una mutación puntual en el plásmido se siguió el protocolo de PCR inversa descrito en el In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara Bio Inc, Kusatsu, Japón), reemplazando la lisina 108 por metionina (K10M). Se diseñaron un par de oligonucleótidos inversos y complementarios en 15 nucleótidos entre sí que contenían la mutación. Se amplificó y linearizó el plásmido por PCR utilizando los nuevos oligonucleótidos. Mediante la reacción In-Fusion descrita en el kit, se recircularizó el plásmido y se transformó en células competentes. La existencia de la mutación en el plásmido transformado se comprobó por secuenciación.

### **Diseño de las construcciones para sobreexpresar LABCG2 en *Leishmania major***

La construcción pUCNEO-LABCG2 utilizada para los estudios funcionales se encuentra descrita en (Campos-Salinas et al. 2013).

Para la obtención de un segundo evento de transfección, la construcción anteriormente obtenida de LABCG2 en pGEM-T se digirió con las enzimas Xba I y KpnI. De esta forma se liberó el fragmento que contenía el gen, el cual se clonó en el vector pUCNEO que había sido digerido previamente con las enzimas XbaI y KpnI. El plásmido resultante contenía el gen LABCG2 completo flanqueado por 21 nucleótidos de la región 5' no codificante y 39 nucleótidos de la región 3' no codificante.

La construcción GFP-LABCG2 obtenida mediante la fusión de la proteína GFP en el extremo N-terminal de LABCG2, se encuentra descrita en (Campos-Salinas et al. 2013).

### **Diseño de las construcciones para sobreexpresar LABCG2 en células Sf9**

Se realizó la digestión de la construcción anteriormente obtenida en pGEM-T para su sobreexpresión en células Sf9 con las enzimas NotI y XbaI. Se liberó el fragmento que contenía LABCG2 y las secuencias de reconocimiento descritas, el cual se clonó en un vector pVL1392.

### **Generación de la línea mutante nulo para los genes LABCG1 y LABCG2 de *Leishmania***

La línea de *Leishmania major* mutante nulo para los genes LABCG1 y LABCG2 utilizada para los estudios funcionales fue obtenida previamente en nuestro laboratorio y se encuentra descrita en (Manzano et al 2017). Brevemente, los parásitos se transfectaron con un fragmento de DNA lineal que confería resistencia a higromicina B, flanqueado por el codón stop de LABCG2 y el codón de iniciación de

## Material y métodos

---

LABCG1. Tras sucesivas rondas de selección utilizando higromicina B (hasta 500  $\mu\text{g/ml}$ ), los genes LABCG1 y LABCG2 se sustituyeron por el cassette de resistencia a este antibiótico.

### **Medida de la expresión del transportador LABCG2 mediante RT-PCR**

El RNA total se extrajo de las diferentes líneas de *Leishmania* empleando el kit High Pure RNA Isolation (Roche Diagnostics GmbH, Basilea, Suiza) y transcrito en cDNA empleando el kit qScript cDNA Synthesis (Quanta Biosciences, Beverly, USA), siguiendo el protocolo proporcionado por el fabricante. El cDNA obtenido se diluyó en relación 1:10 y 1:50 y se amplificó con los oligos diseñados específicamente para LABCG2 y para GAPDH (como control de carga) por 25 ciclos de amplificación a una temperatura de alineamiento de 54°C. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 4%.

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

Para las transfecciones realizadas en este trabajo se ha utilizado el Amaxa™ HumanT Cell Nucleofector™ Kit (Lonza, Basilea, Suiza), que permite alcanzar una mayor eficiencia de transfección que la electroporación standard. Para ello, 40 millones de promastigotes de *L. major* en fase logarítmica tardía se resuspendieron en 100  $\mu\text{l}$  de buffer Human T Cell nucleofector. Seguidamente, se añadieron 5  $\mu\text{g}$  de DNA a los parásitos y se incubaron en hielo durante 10 min en las cubetas de electroporación proporcionadas por el fabricante. La transfección se realizó con el Amaxa™ Nucleofector™ (Lonza, Basilea, Suiza), programa U-033. Tras la electroporación, los parásitos se transfirieron a frascos con 5 ml de medio RPMI modificado con 20% hiFBS y se incubaron a 28°C. A las 24 h se les añadió el antibiótico de selección adecuado. Una semana después se procedió a incrementar la concentración de antibiótico. Tras sucesivos pases se alcanzó la concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$ , a la cual se mantuvieron y almacenaron las líneas de parásitos.

## **Generación de baculovirus recombinantes y expresión en células de insecto Sf9**

La generación de baculovirus recombinantes que contenían LABCG2 o LABCG2<sup>K/M</sup> se realizó mediante la co-transfección de células Sf9 con el plásmido pVL1392-LABCG2 o pVL1392-LABCG2<sup>K/M</sup> y tDNA lineal de baculovirus (Oxford Expression Technologies, Oxford, UK) utilizando el reactivo de transfección FuGeneHD (Promega, Madison, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los virus generados se amplificaron a través de la infección de células Sf9 y se almacenaron a 4°C en oscuridad.

## **Preparación de membranas procedentes de células Sf9 que sobreexpresan LABCG2**

Células Sf9 ( $1 \times 10^8$ ) en una densidad de crecimiento de  $2 \times 10^6$  células/ml se infectaron con baculovirus recombinantes que contenían DNA de LABCG2 o LABCG2<sup>K/M</sup> siguiendo un ratio de 1:3 (célula/virus). Después de 48 h, las células se recogieron y la preparación de las membranas se realizó siguiendo el protocolo descrito en (Gauthier et al. 2013). En concreto, las células que expresaban la proteína se centrifugaron, lavaron y homogeneizaron dos veces en buffer TMEP en hielo, utilizando un homogeneizador de cristal. Tras cada homogeneización, la muestra se centrifugó a  $450 \times g$  durante 10 min y el sobrenadante obtenido se centrifugó a  $40000 \times g$  durante 60 min. El pellet resultante se homogenizó una vez más y se almacenó en alícuotas individuales a -80°C.

## **Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE**

Aproximadamente 20 millones de parásitos en la fase de crecimiento requerida se lavaron con PBS y se resuspendieron en buffer de lisis con inhibidores de proteasas durante 15 min en hielo. Posteriormente, se adicionó DDM a una concentración final del 6% y se incubó 30 min en hielo. Pasado este tiempo, se añadió un tampón adecuado para cargar geles de poliacrilamida.

## Material y métodos

---

La separación de proteínas en función de su tamaño se realizó mediante la técnica de electroforesis en geles desnaturalizantes 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 10% y pH 8,9. La electroforesis se llevó a cabo en minigeles empleando la cubeta del sistema mini-PROTEAN de Bio-Rad (Hércules, USA), a 20-25 mA/gel. Como marcador de peso molecular se utilizaron los standards preteñidos o no teñidos de Bio-Rad, según el objetivo de la técnica.

Para el análisis de los LPGs, se emplearon parásitos en fase estacionaria tardía (8 días de crecimiento). Los lisados se obtuvieron de la forma descrita y la separación por electroforesis se llevó a cabo utilizando un gel separador al 12% de acrilamida/bisacrilamida.

La detección de la proteína RFP-ATG8 se realizó utilizando parásitos al día 8 de crecimiento, en el caso de la línea mutante nulo LABCG1/LABCG2, y 7 días para la línea que sobreexpresaba el transportador LABCG2, coincidiendo con los mayores niveles de autofagia para cada línea. Los extractos celulares se trataron como se ha descrito y se separaron por SDS-PAGE (10%) en presencia de 6 M de urea.

### **Análisis mediante Western Blot**

Después de separar las proteínas por electroforesis, éstas fueron transferidas a membranas de PVDF Immobilion-P de Millipore. Para ello se impregnaron las membranas, geles y papel de filtro absorbente en buffer de transferencia. La transferencia se realizó en un aparato Trans-Blot SD Semi-Dry Cell (Bio-Rad, Hércules, USA) a 23 voltios durante 45 min. Una vez finalizada la transferencia, la membrana se bloqueó en una solución de leche en polvo 5% en PBS durante 16 h a 4°C para evitar uniones inespecíficas del anticuerpo de detección. Una vez bloqueada, la membrana se incubó a temperatura ambiente con el anticuerpo primario correspondiente a la dilución requerida en buffer de inmunodetección durante 1 h. Se realizaron 3 lavados de 5 min con el mismo buffer y se incubó con el

anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o ratón conjugado a peroxidasa (1:5000) durante 45 min. Después de 3 lavados de 10 min cada uno, la membrana se reveló incubándola durante 1 min con los agentes de detección ECL Plus™ (Pierce, Thermo Fisher, Waltham, USA).

Para el análisis de los LPGs se utilizaron los anticuerpos primarios de ratón: (i) WIC 73.9 (1:250), específico de las cadenas laterales de la Gal(β1-3) terminal de los LPGs de la membrana plasmática (Kelleher et al 1992) y (ii) 3F12 (1:500), el cual reconoce residuos arabinosa específicos de las formas metacíclicas.

Para la detección del marcador autofagosomal RFP-ATG8, se empleó el anticuerpo primario anti-RFP a una dilución 1:5000.

Para el análisis de la expresión de LABCG2 en células de insecto Sf9, se empleó el anticuerpo de conejo anti-GFP a una dilución 1:5000.

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

Durante el proceso de biotinilación, la biotina, al ser impermeable se une específicamente a las aminos de la superficie celular. Para llevar a cabo esta técnica, 100 millones de parásitos en fase logarítmica tardía se lavaron dos veces con PBS y se incubaron en hielo en presencia de 1 mM EZ-Link Sulfo-NHS-SS-biotin (Pierce, Thermo Fisher, Waltham, USA) en 1 ml de PBS durante 2 h a 4°C. Para parar la reacción de biotinilación, se adicionó Tris a una concentración final de 50 mM. Tras incubar 4 min a 4°C, se realizaron tres lavados con PBS suplementado con Tris 50 mM para eliminar la biotina que no haya reaccionado. Seguidamente se resuspendió el pellet en buffer de lisis e inhibidor de proteasas durante 1 h para provocar la lisis celular. El lisado se centrifugó a 22000 x g durante 20 min a 4°C. El sobrenadante resultante se incubó con 100 µl de resina streptavidina agarosa (Pierce, Thermo Fisher, Waltham, USA), previamente equilibrada con PBS + 3% DDM durante 1 h en rotación a 4°C. Posteriormente, la resina se lavó 4 veces con buffer de lisis suplementado con 2% Igepal y 3% DDM. Las proteínas se eluyeron con 30 µl de tampón Laemmli y 25 µl del sobrenadante se cargaron en un gel de

## Material y métodos

---

poliacrilamida. La inmunodetección se llevó a cabo utilizando una dilución 1:5000 del anticuerpo policlonal anti-GFP o 1:3000 del anticuerpo policlonal anti-LRos3, como control de proteína integral de membrana plasmática (Sánchez-Cañete et al. 2009). La integridad de la membrana plasmática se determinó mediante la inmunodetección con el anticuerpo monoclonal anti-triparredoxina peroxidasa citosólica a una dilución 1:6000.

### **Determinación de la susceptibilidad a fármacos en formas promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania***

Para determinar la susceptibilidad de los promastigotes a los distintos compuestos se utiliza como referencia la  $EC_{50}$ . Este valor se define como la concentración necesaria de un compuesto para reducir al 50% la población viable de parásitos *in vitro*. La  $EC_{50}$  se calcula mediante el ensayo colorimétrico de MTT [Bromuro de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-Difeniltetrazolio], que se basa en la reducción de este compuesto por las enzimas deshidrogenasas de los parásitos para dar lugar al producto formazán, insoluble y de color azul. La cantidad de producto formado es dependiente del número de células vivas en el cultivo.

Para realizar los ensayos de susceptibilidad a fármacos, se sembraron 300.000 parásitos en fase logarítmica tardía/pocillo en una placa de microtitulación de 96 pocillos. Se mantuvieron en un volumen final de 100  $\mu$ l de medio de cultivo y se incubaron durante 72 h a 28°C en presencia de concentraciones crecientes de cada compuesto, por duplicado. Tras la incubación, se añadieron 10  $\mu$ l de MTT (5 mg/ml), y la placa se mantuvo 4 h a 28°C para permitir la formación de los cristales de formazán. Finalmente, dichos cristales se disolvieron añadiendo 50  $\mu$ l de SDS 20% e incubando en oscuridad a 37°C durante 4-6 h. Para determinar la viabilidad de los parásitos, la placa se analizó en un lector de placas VersaMax (bioNova científica s.l., Madrid, España) determinando la  $DO_{540}$ .

Para determinar la relación entre los niveles de tioles y la susceptibilidad a  $Sb^{III}$ , los parásitos se cultivaron previamente en medio M199 suplementado con 10% hiFBS y 3 mM BSO (un inhibidor de la  $\gamma$ -glutamilcisteina sintetasa) durante 48 h a 28°C, antes de llevar a cabo los ensayos de sensibilidad por MTT.

Para determinar la susceptibilidad de las formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* a antimoniales [(Sb<sup>III</sup> y Sb<sup>V</sup> (Pentostam®)], los macrófagos THP-1 se infectaron en una relación macrófago/parásito de 1:10 durante 16 h. Tras retirar los parásitos extracelulares, los macrófagos infectados se incubaron con distintas concentraciones de los compuestos durante 72 y 120 h respectivamente. Para calcular la susceptibilidad a Sb<sup>III</sup> y Sb<sup>V</sup> se determinó la EC<sub>50</sub>, empleando para ello el factor de infectividad (porcentaje de infección x número de amastigotes por macrófago) obtenido a partir de cultivos tratados con concentraciones crecientes de Sb<sup>III</sup> o Sb<sup>V</sup>. El porcentaje de infección y el número de formas amastigotas por macrófago infectado se determinó a partir del conteo de 300 macrófagos por pocillo.

### **Determinación de la acumulación y eflujo de antimonio en líneas de *Leishmania* mediante ICP-MS**

Los promastigotes ( $1 \times 10^8$ ) se incubaron en presencia de 100  $\mu$ M de Sb<sup>III</sup> a 28 °C en medio de cultivo RPMI durante distintos tiempos. A continuación, los parásitos se centrifugaron y el pellet resultante se conservó a -80°C hasta la posterior medida de acumulación de antimonio (Brochu et al. 2003). El eflujo de antimonio se determinó mediante la incubación de las diferentes líneas de *Leishmania* con concentraciones compensadas de antimonio (100  $\mu$ M para las líneas de pUCNEO y 200  $\mu$ M para la línea LABCG2) en medio de cultivo durante 1 h a 28°C, para proporcionar unos niveles de antimonio inicial similar entre las diferentes líneas. Los parásitos se lavaron después con PBS, y se resuspendieron en medio de cultivo a 28°C. A continuación se recogió un pellet de parásitos a diferentes tiempos. El pellet de parásitos para la determinación de la acumulación o eflujo de antimonio mediante ICP-MS (Espectrometría de Masas con fuente de Plasma de Acoplamiento Inductivo) se disolvió en 200  $\mu$ l de ácido nítrico concentrado durante 24 h a temperatura ambiente. La muestra se diluyó hasta 3 ml con agua destilada y después se inyectó en un ICP-MS (PerkinElmer, Waltham, USA) para su cuantificación en los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada. El antimonio se midió empleándose las relaciones masa/carga (m/z) 121 y 123, y rodio como control interno.



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

Los niveles de tioles se determinaron mediante citometría de flujo empleando la sonda fluorescente CellTracker. Para la medida de tioles no proteicos, previamente los parásitos ( $1 \times 10^7$  promastigotes/ml) se cultivaron en medio M199 suplementado con 10% hiFBS. Una vez alcanzada la fase logarítmica tardía, se lavaron con PBS y se incubaron con  $2 \mu\text{M}$  CellTracker, una sonda fluorescente empleada para el marcaje de tioles, durante 15 min a  $37^\circ\text{C}$ . Posteriormente, se lavaron con PBS y la presencia de tioles intracelulares se analizó mediante citometría de flujo en un citómetro FACScan (Becton- Dickinson, San Jose, USA). La emisión de la fluorescencia se cuantificó entre 515 y 545 nm.

Para examinar el eflujo de tioles al medio, se empleó el reactivo fluorescente ThioStar (Luminos, Ann Arbor, USA) que marca los tioles no proteicos libres. Los parásitos ( $1 \times 10^8$ ) en fase logarítmica tardía se incubaron en presencia o ausencia de  $100 \mu\text{M}$  de  $\text{Sb}^{\text{III}}$  durante 1 h en 1 ml de tampón HBS. Después se lavaron con PBS y se resuspendieron de nuevo en HBS. Para procesar las muestras, los sobrenadantes se recogieron a diferentes intervalos de tiempo y se trataron con ácido tricloroacético al 12% durante 30 min a  $4^\circ\text{C}$  para desproteínizar las muestras. Seguidamente se centrifugaron a  $13,000 \times g$  y los sobrenadantes se diluyeron con HBS para reducir la concentración de ácido tricloroacético hasta el 2%. Después, se transfirieron a una microplaca de 96 pocillos y se incubaron con  $3 \mu\text{g/ml}$  de ThioStar durante 1 h a temperatura ambiente. La fluorescencia, con excitación a 370 nm y emisión a 492 nm, se midió utilizando un lector de placas Infinite F200 Luminescence System (Tecan Austria GmbH, Grödig, Austria). Diferentes concentraciones de GSH se utilizaron como control de la dependencia de señal de ThioStar y concentración de tioles.

Para determinar los niveles de tioles no proteicos reducidos,  $1 \times 10^9$  promastigotes se centrifugaron ( $1000 \times g$ , 10 min) y se lavaron tres veces con PBS. Las proteínas se precipitaron con 2% de ácido tricloroacético durante 30 min y los sobrenadantes obtenidos se neutralizaron con Tris-HCl 1 M a pH 8,0. Se empleó 1 mM DTNB durante 10 min para medir los niveles de tioles no proteicos reducidos. La absorbancia obtenida a 412 nm se interpoló a una curva estándar de GSH obtenida

utilizando diferentes concentraciones de este tiol. Para discriminar y cuantificar entre los diferentes tipos de tioles en la muestra, el pellet se liofilizó y resuspendió en 100  $\mu$ l HEPES (40 mM, pH 8,0) que contenía una solución acuosa de  $\text{NaBH}_4$  a una concentración final de 100 mM. Las muestras se dejaron a temperatura ambiente durante 30 min y los tioles se derivatizaron con monobromobimano (concentración final de 2 mM) durante 5 min a 70°C para su detección. Tras la derivatización, las proteínas se precipitaron y cualquier exceso de  $\text{NaBH}_4$  se eliminó mediante incubación con 100  $\mu$ l de ácido metanosulfónico 4 M durante 2 h en hielo. Los tioles solubles en ácido se separaron mediante HPLC en fase reversa en una columna Agilent C18 y analizada mediante detección fluorométrica (Krauth Siegel et al. 1995). La cuantificación y validación se realizó utilizando estándares de  $\text{T}[\text{SH}]_2$  y GSH.

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

En primer lugar se indujo la diferenciación de células THP-1 a macrófagos. Para ello, se depositaron 300.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos con cristales estériles en el fondo para su visualización en el microscopio. Se añadieron 500  $\mu$ l de medio RPMI suplementado con 10% hiFBS, penicilina/estreptomicina y glutamina además del inductor PMA a una concentración final de 20 ng/ml. Las células se incubaron 45 h a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$ . Una vez pasado ese tiempo, se eliminó el medio y se añadieron 500  $\mu$ l de RPMI fresco sin inductor y se incubó la placa 24 h más en las condiciones citadas. Los macrófagos se infectaron con parásitos en fase estacionaria tardía en una relación 1:10 macrófago/parásito en medio RPMI suplementado con penicilina/estreptomicina, glutamina y 5% hiFBS, durante 4 h a 35°C y 5%  $\text{CO}_2$ . Una vez retirados los parásitos, las células infectadas se mantuvieron en cultivo durante 24 y 96 h a 37°C y 5%  $\text{CO}_2$ . A continuación, los macrófagos se fijaron con 2,5% paraformaldehído en PBS durante 30 min a 4°C y se permeabilizaron con 0,1% Triton X-100 en PBS durante otros 30 min a temperatura ambiente. Las formas amastigotes intracelulares se visualizaron tiñendo el núcleo con DAPI (Invitrogen, Carlsbad, USA). Se determinó el porcentaje de infección y el número de formas amastigotes intracelulares por macrófago infectado contando 300

## Material y métodos

---

macrófagos por pocillo, mediante la adquisición de imágenes con un microscopio Olympus IX81.

### **Infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón**

Los macrófagos peritoneales de ratones BALB/c (Charles River Ltd.) se obtuvieron mediante la inoculación de medio de cultivo RPMI 1640 sin suero en la cavidad peritoneal. Posteriormente, se realizó un masaje peritoneal manualmente durante 2 min y se extrajo el medio de cultivo. A continuación, las células obtenidas se lavaron con medio RPMI 1640 frío, y se sembraron a una densidad de  $5 \times 10^5$  macrófagos/pocillo en medio RPMI-1640 suplementado con 10% hiFBS y 2 mM glutamato, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomicina en placas de 24 pocillos con cristales estériles en el fondo. Las células se incubaron durante 4 h a 37°C en presencia de 5% CO<sub>2</sub> para permitir su adherencia a la superficie del cristal. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron para eliminar los macrófagos no adheridos y se infectaron con promastigotes en fase estacionaria tardía en una relación parásito-célula de 2:1 en medio RPMI suplementado con 5% hiFBS. Después de incubar la placa durante 4 h, los parásitos no fagocitados se eliminaron mediante lavados con medio sin suero y se mantuvo los macrófagos infectados en medio RPMI suplementado con 10 % hiFBS durante 24, 72 y 120 h a 37°C en una atmósfera al 5% de CO<sub>2</sub>. Una vez pasado cada tiempo de incubación, las células se fijaron con 2,5% paraformaldehído en PBS durante 30 min a 4°C y se permeabilizaron con 0,1% Triton X-100 en PBS durante otros 30 min a temperatura ambiente. Las formas amastigotes intracelulares se visualizaron tiñendo el núcleo con DAPI (Invitrogen, Carlsbad, USA). Se determinó el porcentaje de infección y el número de formas amastigotes intracelulares por macrófago infectado contando 300 macrófagos por pocillo, mediante la adquisición de imágenes con un microscopio Olympus IX81.

### **Infección *in vivo* en un modelo murino de leishmaniasis**

Los animales (6 hembras de seis semanas de edad/grupo) recibieron una inyección subcutánea en su almohadilla plantar izquierda con  $10^5$  parásitos en fase estacionaria resuspendidos en PBS. Se examinó semanalmente la progresión de la enfermedad mediante la medición del edema inflamatorio, así como la lesión o lesiones cutáneas generadas en la pata infectada, empleando para ello un calibrador digital (Mitutoyo, Japón) como se ha descrito con anterioridad (Lira et al. 2000). A las cinco semanas de la infección, los animales se sacrificaron.

### **Estudio de autofagia en líneas de *Leishmania***

Para realizar el seguimiento de la autofagia a lo largo del tiempo, promastigotes de *L. major* se transfectaron con la construcción pNUS ATG8-RFP y posteriormente se seleccionaron a una concentración de 50  $\mu\text{g/ml}$  de blasticidina.

Una vez seleccionados, los parásitos que expresaban el marcador autofagosomal RFP-ATG8 se examinaron diariamente mediante microscopía de fluorescencia. Se determinó el porcentaje de parásitos que contenían autofagosomas así como el número de los mismos por parásito, a través del conteo de tres series de 200 parásitos para cada intervalo de tiempo. Para esclarecer la relación entre autofagia y los niveles de tioles, se adicionó 3 mM BSO a cada cultivo 48 h antes de los estudios de autofagia.

### **Determinación de la actividad ATPasa en membranas que sobreexpresan LABCG2**

La actividad ATPasa de LABCG2 se determinó como se describe en (Telbisz et al. 2013). Las membranas purificadas que sobreexpresaban LABCG2 (50  $\mu\text{g}$ ) se incubaron en 160  $\mu\text{l}$  de buffer de reacción suplementado con 12,5 mM Mg-ATP durante 30 min a 37°C; la reacción se paró mediante la adición de 100  $\mu\text{l}$  SDS al 5%. El fosfato inorgánico derivado de la hidrólisis del ATP se determinó mediante una reacción colorimétrica utilizando un espectrofotómetro Cary 100 UV-Visible (Varian, Palo Alto, USA). Para analizar la estimulación de la actividad ATPasa de LABCG2

## Material y métodos

---

por GSH, GSSG, T(SH)<sub>2</sub> y TS<sub>2</sub> se emplearon distintas concentraciones de dichos compuestos (0,5, 1 y 5 mM). Los datos finales se obtuvieron al restar la actividad ATPasa basal de la estimulada.

### **Ensayos de transporte de [<sup>3</sup>H]-GSH en membranas de células Sf9**

Los ensayos de transporte de [<sup>3</sup>H]-GSH se realizaron como se describe en (Gauthier et al. 2013) incluyendo ciertas modificaciones. Antes de los ensayos de transporte, la actividad ATPasa de las membranas obtenidas de diferentes extracciones se analizó, estableciendo una estimulación mínima de 20 nmol Pi/min/mg de proteína de membrana. Las vesículas de membrana provenientes de las células Sf9 (70 µg) se incubaron en presencia de 4 mM ATP y [<sup>3</sup>H]-GSH a diferentes concentraciones (0,1, 0,2, 0,5 y 1 mM) en 30 µl de mix de transporte a 37°C durante 30 min (tiempo de acumulación no saturado). Para los estudios de cinética, las vesículas de membrana se incubaron en presencia de 0,5 mM [<sup>3</sup>H]-GSH durante diferentes intervalos de tiempo (1, 5, 10, 30 y 60 min) en las mismas condiciones descritas anteriormente. Para los ensayos de competición, se añadió un exceso de 10 veces de GSH, GSSG, T(SH)<sub>2</sub>, TS<sub>2</sub> y Metil-GS al comienzo de la incubación con 0,5 mM [<sup>3</sup>H]-GSH durante 30 min. Para la generación de TS<sub>2</sub> se empleó el protocolo descrito en (Comini et al. 2009). Brevemente, para la obtención del disulfuro, una solución de 35 mM T(SH)<sub>2</sub> se ajustó a pH 7.0 con 2M NaOH. Seguidamente, se añadió una concentración equimolar de peróxido de hidrógeno y se incubó la reacción durante 10 min a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió T(SH)<sub>2</sub> a las concentraciones indicadas para determinar la IC<sub>50</sub> de la acumulación de [<sup>3</sup>H]-GSH. Para parar la reacción, se añadieron 25 µl de buffer de lavado a la muestra y se filtró rápidamente a través de membranas de fluoruro de polivinilideno hidrofílico (PVDF) con un tamaño de poro de 0,45 µm (Merck Millipore, Billerica, USA). Los filtros se lavaron tres veces y se recogieron. Posteriormente, la radioactividad se midió en un contador de centelleo líquido LS 6500 (Beckman Coulter, Brea, USA).

**RESULTADOS**



## RESULTADOS

### **Capítulo 1: Implicación del transportador LABC2 de *Leishmania* en la resistencia a antimonio**

Los resultados relativos a este apartado están incluidos en la siguiente publicación:

**The LABC2 transporter from *Leishmania* protozoan parasites is involved in antimony resistance.** Perea A, Manzano JI, Castanys S, Gamarro F. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2016, 60(6):3489-96. doi: 10.1128/AAC.02813-15.  
<http://aac.asm.org/content/60/6/3489>

Actualmente, el control de la leishmaniasis depende únicamente de la quimioterapia. Sin embargo, la aparición de resistencias, entre otros factores, dificulta la eficacia de la quimioterapia. Algunos miembros de la subfamilia de transportadores ABCG están implicados en la resistencia a fármacos, por lo que decidimos determinar si el transportador LABC2 ejercía también un papel en la resistencia a fármacos en *Leishmania*. En este artículo, hemos comprobado que la sobreexpresión de LABC2 en promastigotes de *Leishmania* confiere resistencia a Sb<sup>III</sup> debido a una menor acumulación de este compuesto por un incremento de su eflujo. Los datos obtenidos demuestran que la resistencia a Sb<sup>III</sup> se mantiene en las formas amastigotes intracelulares, las cuales presentan también resistencia a Sb<sup>V</sup>. Adicionalmente, hemos observado que los niveles de expresión del transportador LABC2 están correlacionados con la susceptibilidad a Sb<sup>III</sup>, de manera que una mayor expresión de LABC2 genera unos niveles más elevados de resistencia a este compuesto. A lo largo de este trabajo, exponemos que en presencia de Sb<sup>III</sup>, los parásitos que sobreexpresan LABC2 presentan un eflujo de tiores al medio mayor que la línea control pUC-NEO, siendo capaz de exportar tiores en ausencia de este compuesto. En consonancia con este último resultado, mostramos que los parásitos que sobreexpresan LABC2 presentan un contenido interno de tiores menor que la línea control pUC-NEO. Por otro lado, los ensayos de biotinilación realizados en este trabajo indican que parte de la proteína LABC2 se encuentra localizada en la membrana plasmática de *Leishmania*, apoyando estudios anteriores que sugieren



## Resultados

---

que este transportador está localizado en vesículas intracelulares de las vías endocíticas y exocíticas.

En conclusión, el transportador LABCG2 de *Leishmania* probablemente confiere resistencia a Sb<sup>III</sup> mediante el secuestro en vesículas de complejos metal-tiol y posterior exocitosis a través del bolsillo flagelar del parásito.

## **LABCG2 transporter from the protozoan parasite *Leishmania* is involved in antimony resistance**

Ana Perea, José Ignacio Manzano, Santiago Castanys and Francisco Gamarro\*

Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, IPBLN-CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avda. del Conocimiento s/n, 18016 Granada, Spain.

\* **Corresponding author.** Phone: +34 958 181667; Fax: +34 958 181632; E-mail: [gamarro@ipb.csic.es](mailto:gamarro@ipb.csic.es).

Dr. Francisco Gamarro and Dr. Santiago Castanys have contributed equally to this work.

**Running title:** Antimony transport by ABCG2 in *Leishmania*

**Keywords:** *Leishmania*, antimony resistance, ABC transporter, antimony uptake, efflux antimony-conjugated thiols.

### **ABSTRACT**

Treatment for Leishmaniasis, which is caused by the protozoan parasite *Leishmania*, currently relies on a reduced arsenal of drugs. However, the significant increase of drug therapeutic failure and the growing resistance to first-line drugs like antimonials in some areas of Northern India and Nepal, limit the control of this parasitic disease. Understanding the molecular mechanisms of resistance in *Leishmania* is now a

## Resultados

---

matter of urgency to optimize drugs used and to identify novel drug targets to block or reverse resistant mechanisms. Some members of the family of ABC (ATP-binding cassette) transporters in *Leishmania* have been associated with drug resistance. In this study, we have focused our interest to characterize LABCG2's involvement in drug resistance in *Leishmania*. *L. major* parasites overexpressing the ABC protein transporter LABCG2 were generated in order to assess how LABCG2 is involved in drug resistance. Susceptibility assays to different leishmanicidal agents were carried out. Analysis of the drug resistance profile revealed that *Leishmania* parasites overexpressing LABCG2 were resistant to antimony as they demonstrated a reduced accumulation of Sb<sup>III</sup> due to an increased in drug efflux. Additionally, LABCG2 was able to transport thiols in the presence of Sb<sup>III</sup>. Biotinylation assays using parasites expressing LABCG2 fused with an N-terminal green fluorescent protein tag revealed that LABCG2 is partially localized in the plasma membrane; this supports previous studies which suggested that LABCG2 is localized in intracellular vesicles that fuse with the plasma membrane during exocytosis. In conclusion, *Leishmania* LABCG2 probably confers antimony resistance by sequestering metal-thiol conjugates within vesicles and through further exocytosis by means of the parasite's flagellar pocket.

## INTRODUCTION

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by the protozoan parasite *Leishmania* and spread by the bite of infected phlebotomine sand flies. Currently, 1.3 million new cases of leishmaniasis and 20,000 to 30,000 deaths occur annually through a variety of clinical presentations (1).

Although chemotherapy is the only current treatment option for leishmaniasis, its efficacy is increasingly limited by growing resistance to first-line drugs, especially antimonials, the frequent side-effects associated with their use, and the high cost of

treatment. There is a limited number of drugs available for treatment, including amphotericin B, especially as liposomal formulation, paromomycin, miltefosine or pentavalent antimonials. The World Health Organization recently recommended the use of a combination of leishmanicidal drugs in order to decrease the concentration and toxicity of the dosages required, as well as to delay the development of resistance. Even so, emerging drug resistance constitutes one of the main problems facing current leishmaniasis chemotherapies. In India, 60% of patients suffering from visceral leishmaniasis do not respond to treatment with antimonials; due to the parasite's increased resistance to these drugs (2).

One of the most characteristic mechanisms of antimony resistance in *Leishmania* is drug efflux mediated by ABC (ATP-binding cassette) transporters such as MRPA (formerly known as PGPA)/ABCC3 (3, 4) or ABCI4 (5) which results in a reduced degree of antimony accumulation in parasites. ABC transporters are one of the largest protein families known; they are highly evolutionarily conserved from bacteria to humans and involved in the transport of different compounds through biological membranes. *Leishmania* has 42 ABC genes distributed across nine subfamilies (from ABCA to ABCI) yet, to date, only some transporters found in the ABCA, ABCB, ABCC, ABCG and ABCI subfamilies have been characterized.

MRPA and ABCI4 overexpression in *Leishmania* confers Sb<sup>III</sup> resistance to the promastigote forms and Sb<sup>III</sup> or Sb<sup>V</sup> resistance to the intracellular amastigote forms (5, 6). Leishmaniasis is treated with antimonials using pentavalent antimony based drugs. Sb<sup>V</sup> can be taken up by the amastigotes and reduced to Sb<sup>III</sup> inside the macrophage so that it may become active against *Leishmania* parasites. This mechanism has not been fully elucidated, and there is apparently more than one Sb<sup>V</sup> to Sb<sup>III</sup> conversion route. Reduced glutathione (GSH) has been observed to promote the reduction of Sb<sup>V</sup> to Sb<sup>III</sup> in the phagolysosome of macrophages (7). Alternatively, parasite-specific thiol-dependent reductase 1 (TDR1) and arsenate reductase (ACR2) found in *Leishmania* are also able to reduce Sb<sup>V</sup> to Sb<sup>III</sup> (8, 9). As described for MRPA, the resulting Sb<sup>III</sup> can combine with thiols to form conjugates inside intracellular organelles which are then effluxed from the parasite (3).

LABCG2 transporter's involvement in the phosphatidylserine (PS) externalization required for host macrophage infection has been reported previously (10). Although

## Resultados

---

the PS synthesis in *Leishmania* has been a matter of intense debate, it could be concluded that parasites in late logarithmic phase contain PS (11, 12).

In *Leishmania*, LABC4 and LABC6 transporters have been involved in phosphatidylcholine transport and also confer resistance to different drugs including miltefosine (13, 14). Considering that some ABC transporters present pleiotropic activity in response to therapeutic xenobiotics, we have focused on the role of *Leishmania* LABC2 transporter in drug resistance.

## MATERIALS AND METHODS

### Chemical compounds.

Trivalent antimony ( $\text{Sb}^{\text{III}}$ ; potassium antimony tartrate), trivalent arsenite ( $\text{As}^{\text{III}}$ ; sodium meta-arsenite), amphotericin B, pentamidine, chloroquine, quinine, mefloquine, primaquine, vinblastine, G-418 (geneticin), buthionine-[S,R]-sulfoximine (BSO), 4',6'-diamidino-2-phenylindole dilactate (DAPI), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside (DDM),  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CoCl}_2$ ,  $\text{CuSO}_4$  and glutathione (GSH) were purchased from Sigma-Aldrich. Miltefosine and perifosine were purchased from AeternaZentaris. Pentavalent antimony ( $\text{Sb}^{\text{V}}$ ; sodium stibogluconate), tafenoquine and sitamaquine dihydrochloride were provided by GlaxoSmithKline. Daunomycin was purchased from Pfizer.

### *Leishmania* culture conditions.

Promastigotes of *Leishmania major* (MHOM/JL/80/Friedlin) and derivative lines used in this study were cultured at 28°C in RPMI 1640-modified medium (Invitrogen) supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (hiFBS, Invitrogen).

### Gene expression.

Total RNA from different *L. major* lines was extracted using the High Pure RNA Isolation Kit (Roche Diagnostics GmbH). RNA was transcribed into cDNA employing the qScriptcDNA Synthesis Kit (Quanta Biosciences, Inc) according to the manufacturer's instructions. The cDNA obtained was diluted (1:10 and 1:50) and amplified with sense (5'-CCTACAGAGGACACCTACA) and antisense (5'-GAAGGGATTCTGGCAAG) primers for LABC2, and with sense (5'-

GAAGTACACGGTGGAGGCTG) and antisense (5'- CGCTGATCACGACCTTCTTC) primers for *GADPH* (as internal control) and electrophoresed on 4% agarose gel.

### **Cell transfection and susceptibility analysis.**

Promastigotes of *L. major* were transfected with the previously described pUCNEO (empty vector), pUCNEO-*LABCG2* and pXG-*GFP::LABCG2* constructs (10) and selected for G-418 resistance, as described previously (15). The susceptibility of the respective pUCNEO (control), *LABCG2* and *GFP-LABCG2* promastigote lines to different compounds was determined using the MTT colorimetric assay, as described (16). To analyze the relationship between thiol levels and susceptibility to  $\text{Sb}^{\text{III}}$ , parasites were previously grown in M199 culture medium supplemented with 10% hiFBS, plus 3 mM BSO (a  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase inhibitor) for 48 h at 28 °C. For the intracellular *Leishmania* amastigotes' susceptibility to  $\text{Sb}^{\text{III}}$  and  $\text{Sb}^{\text{V}}$ , stationary-phase promastigotes were used to infect macrophage-differentiated THP-1 cells at a macrophage/parasite ratio of 1:10, as described previously (17). After overnight infection at 35 °C with 5%  $\text{CO}_2$  in RPMI 1640 medium plus 5% hiFBS, extracellular parasites were removed by washing with serum-free medium. Infected macrophages were incubated at 37 °C in different concentrations of  $\text{Sb}^{\text{III}}$  and  $\text{Sb}^{\text{V}}$  with 5%  $\text{CO}_2$  in RPMI 1640 medium plus 10% hiFBS, for 72 and 120 h, respectively. Following incubation, the cultures were fixed and analyzed as described previously (17).

### **Cell surface biotinylation.**

Parasite ( $1 \times 10^8$  promastigotes) surfaces were labelled as described previously (18), but using 3% DDM instead of 1% Nonidet-P40 to cause parasite lysis and with 60 min instead of 30 min incubation in lysis buffer coupled with a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Protein samples were fractionated by SDS-PAGE under standard conditions and electrotransferred onto Immobilon-P membranes (Millipore). Immunodetection was performed using 1:5,000 polyclonal anti-GFP (Rockland Immunochemicals) or 1:3,000 polyclonal anti-plasma membrane protein-LRos3 (18) in PBS plus 0.01% Tween 20 and 0.1% BSA. Control over plasma membrane (PM)

## Resultados

---

integrity was determined through immunodetection using monoclonal anti-cytosolic tryparedoxin peroxidase antibody at 1:6,000 (a gift from Dr Ana M. Tomás, IBMC, Porto, Portugal). After washing, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary goat anti-rabbit (1:5,000) immunoglobulin G (Dako) for GFP, LRos3 and tryparedoxin peroxidase. Signals were detected using the ECL chemiluminescent substrate (Pierce).

### **Antimony accumulation and efflux.**

Promastigotes ( $10^8$ /mL) were incubated at 28 °C with 100  $\mu$ M Sb<sup>III</sup> in RPMI 1640 culture medium at 28°C for different time-points. The parasites were centrifuged and pelleted to measure antimony accumulation after each time period (19). Antimony efflux was determined by incubating the different promastigote lines with compensated Sb<sup>III</sup> concentrations (100  $\mu$ M for pUCNEO and 200  $\mu$ M for the LABCG2 line) for 1 h at 28 °C in culture medium in order to attain a similar labelling in *Leishmania* lines. The parasites were then washed with PBS, resuspended in culture medium at 28°C, and the pellet collected after different time-points. The samples for uptake and efflux determination were measured using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS; PerkinElmer) as described previously (5).

### **Determination of non-protein thiols.**

Log phase parasites ( $10^7$ /mL) were grown in M-199 medium plus 10% hiFBS in order to measure thiol levels. They were then washed with PBS and incubated at 37 °C with 2  $\mu$ M CellTracker™ for 15 min. After incubation the parasites were again washed with PBS and analyzed by flow cytometry using a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson). Fluorescence emission was quantified between 515 and 545 nm using Cell Quest™ software. Non-protein thiols' efflux to the culture medium was determined using the thiol fluorescent detection reagent ThioStar® (Luminos) as described previously (5).

## RESULTS AND DISCUSSION

### Overexpression of LABCG2 confers resistance to antimony and other compounds.

The role of ABC transporters in resistance to different compounds has been studied previously (5, 19-21). As mentioned above, *Leishmania* LABCG2 transporter is involved in the PS externalization required for macrophage infection (10). We have determined that the overexpression of LABCG2 in *Leishmania* parasites did not show differences in the PS exposition (10) or cell growth.

LABCG2 belongs to the same subfamily as mammalian ABCG2, a well-characterized PS transporter (22) that also pumps drugs conferring a multidrug-resistant (MDR) phenotype in cancer cells (23, 24). Others *Leishmania* ABCG proteins, such as LABCG4 and LABCG6 have been described to be involved in phospholipid transport (phosphatidylcholine analogues) and drug resistance (alkyl-phospholipids) (13, 14). However, the role of LABCG2 transporter in drug resistance has not yet been elucidated. Modulation of gene expression through gene amplification and gene deletion by homologous recombination is a common mechanism of drug resistance in *Leishmania* strains derived from both the laboratory and the field thanks to the plasticity of the *Leishmania* genome (25-27). We are therefore interested in determining whether the overexpression of LABCG2 in a *L. major* line (data not shown) could confer drug resistance. We analyzed the resistance profile to different leishmanicidal drugs, including Sb<sup>III</sup>, amphotericin B, miltefosine, pentamidine and sitamaquine, and other compounds such as As<sup>III</sup>, tafenoquine, primaquine, chloroquine, daunomycin, mefloquine, quinine, perifosine and vinblastine (Table 1). As described, many of them are probably transported by other *Leishmania* ABCs (5, 13, 14, 28, 29). The results showed that promastigotes overexpressing LABCG2 were about six and seven times fold more resistant to As<sup>III</sup> and Sb<sup>III</sup>, respectively, than the control line (pUCNEO) (Table 1), suggesting that these metal ions could be substrates for the LABCG2 transporter as previously described for MRPA and ABCI4 (3, 5). We also observed that overexpression of LABCG2 did not affect the susceptibility to other metal ions such as Cd<sup>II</sup>, Co<sup>II</sup> and Cu<sup>II</sup> (Table 2). Contrary to other members of the *Leishmania* ABCG subfamily such as LABCG4 and LABCG6, LABCG2 does not confer resistance to the alkylphospholipids miltefosine and



## Resultados

---

perifosine or the aminoquinolines sitamaquine and chloroquine (13, 14). Furthermore, the LABCG2 line “cured” for the plasmid pUCNEO-LABCG2 by maintaining the parasites in culture without drug selection for three months, showed a similar susceptibility phenotype to that of the control line (Table 1).

To analyse whether the expression levels of LABCG2 correlated with the susceptibility to Sb<sup>III</sup>, the LABCG2 lines were cultured in the absence of G-418 for 15, 30, 60 and 90 days to reduce plasmid copy number and LABCG2 expression (Figure 1a). The results showed a direct relationship between LABCG2 expression levels and Sb<sup>III</sup> resistance (Figure 1b). Consequently, a greater degree of LABCG2 expression generates a higher resistance to Sb<sup>III</sup>.

Further validation analysis showed that a second transfection event which facilitates LABCG2 overexpression in *Leishmania* (2-LABCG2) also conferred significant resistance to Sb<sup>III</sup> and As<sup>III</sup> (Table 2). The above experiments help to discard the possibility that the resistant phenotype observed was due to an intrinsic characteristic of the clone rather than a phenotypic characteristic of the overexpression of this transporter (Table 2). The differences observed in susceptibility to Sb<sup>III</sup> and As<sup>III</sup> between the two transfection events involving LABCG2 were due to variations in the parasites' degree of LABCG2 expression (data not shown). Furthermore, parasites overexpressing LABCG2 fused to GFP presented a similar susceptibility pattern to 2-LABCG2 parasites (Table 2), demonstrating that N-terminal fusion of GFP tag does not interfere with the functionality of LABCG2 transporter.

The resistance to Sb<sup>III</sup> observed in the promastigote forms of *L. major* was retained in the intracellular amastigotes obtained after THP-1 cell infection (Table 3). Intracellular amastigotes overexpressing LABCG2 also presented significant resistance to sodium stibogluconate, a leishmanicidal drug containing Sb<sup>V</sup> which is reduced to Sb<sup>III</sup> inside the macrophages (Table 3). LABCG2 has not been described as an antimony resistance marker in previous studies based on *omics* techniques, similarly as described for *Leishmania* ABCI4 (5), considering that not every change in expression levels of proteins involved in antimony resistance are detected by these techniques. Our findings lend weight to the idea that the overexpression of LABCG2 confers antimony resistance in *Leishmania* parasites.

### Reduction in the accumulation of Sb<sup>III</sup> due to an increased efflux in *L. major* lines overexpressing LABCG2.

In order to uphold the suggestion that Sb<sup>III</sup> is a potential substrate for LABCG2, the intracellular accumulation of antimony metal ions in *L. major* lines was measured after different durations (10, 20, 30 and 60 min) by ICP-MS (Figure 2a).

Sixty minutes after Sb<sup>III</sup> incubation (Figure 2a), parasites overexpressing LABCG2 accumulated 76% of the total amount of Sb<sup>III</sup> accumulated by the control parasites. To assess whether the lower accumulation of this metal ion compound was due to an increased efflux to extracellular media, *Leishmania* lines were loaded under conditions that generated similar amounts of intracellular Sb<sup>III</sup>. The amount of metal ion retained inside the parasites was then measured after different periods (Figure 2b) and so we determined that Sb<sup>III</sup> efflux is faster in parasites overexpressing LABCG2 (Figure 2b), leading to the conclusion that this transporter mediates Sb<sup>III</sup> elimination. As reported, the primary mechanism of resistance consists of decreasing the amount of active drug within the cell by a variety of routes (30). Parasites can decrease the uptake, increase the efflux or inactivate the drug by sequestration, among other possible mechanisms. LmAQP1 aquaglyceroporin is the only protein known to transport antimony inside *L. major* (31, 32) and its downregulation subsequently leads to increased drug resistance (33). Concerning the efflux, members of the eukaryotic ABCC subfamily are involved in Sb<sup>III</sup> and As<sup>III</sup> resistance by exporting these metals ions outside the cells or by sequestering them within intracellular vesicles (34). MRPA from *Leishmania* is one of the best-known ABC transporters implicated in antimony resistance through sequestration of Sb<sup>III</sup>-thiol complexes within an intracellular organelle near the flagellar pocket and then expelled from the parasite by exocytosis (3). The results of antimony efflux obtained for LABCG2 are slightly higher than the ones observed for MRPA (35), but lower in comparison with other MDR pumps (36, 37), suggesting a similar mechanism of action between MRPA and LABCG2. To the best of our knowledge, there have been no reports to suggest that ABCG transporter is involved in Sb<sup>III</sup> or As<sup>III</sup> tolerance. Regarding other heavy metals, some plant full-size ABCG (PDR) transporters confer cadmium and lead tolerance (38-40). Therefore, this work presents the first description of an ABCG transporter's role in *Leishmania's* resistance to Sb<sup>III</sup> and As<sup>III</sup>.

### **Role of thiols in *Leishmania* ABCG2-mediated antimony resistance.**

As described above, thiols conjugate with heavy metals and export them to extracellular media, which represents an antimony resistance mechanism in *Leishmania* (41). We therefore analyzed the non-protein thiol efflux in parasites overexpressing LABCG2 using ThioStar<sup>®</sup> (Figure 3). In the presence of Sb<sup>III</sup> (Figure 3), the LABCG2 line showed a significantly higher thiol efflux than the control parasites. This implies that LABCG2 transporter confers resistance to Sb<sup>III</sup> by efflux of Sb<sup>III</sup>-thiol complexes; however, we can not discard the possibility of a co-transport activity of antimony and thiols. In the absence of Sb<sup>III</sup> (Figure 3), we also observed a significant increase in thiol efflux for parasites overexpressing LABCG2 transporter in comparison with the control line, although the increase was not as pronounced as in the presence of Sb<sup>III</sup>. These results suggest that LABCG2 transporter could export thiols without being conjugated to antimony.

Since conjugation of thiol adducts of Sb<sup>III</sup> seems to be required for resistance to antimony, we determined the drug resistance profiles for *L. major* lines overexpressing LABCG2 after treatment with BSO, a  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase inhibitor. For these experiments, parasites were previously maintained in M199 culture medium supplemented with 10% hiFBS for 48 h at 28°C, a medium with lower content of serum and thiols than the RPMI 1640 medium with 20% hiFBS. We observed a significant decrease in Sb<sup>III</sup> EC<sub>50</sub> values for parasites overexpressing LABCG2 after incubation with BSO compared to those incubated without BSO (Table 4). The different EC<sub>50</sub> values to Sb<sup>III</sup> observed for pUCNeo and LABCG2 lines without BSO (Table 4) with respect to values in Table 1, was due to differences in the content of serum and thiols in the medium used in both experiments. Hence, the Sb<sup>III</sup> resistance of *L. major* lines overexpressing LABCG2 is linked to thiol levels inside the parasites, probably due to LABCG2's ability to export thiol-conjugated adducts, as described for ABCI4 (5) and MRPA (3) in *Leishmania*. ABC transporters' implication in detoxification by the efflux of metal-thiol complexes has already been described in other organisms, such as vacuolar transporter YCF1 in *Saccharomyces cerevisiae* which detoxifies bis-glutathione-cadmium complexes (42), or HTM1, an ABC

transporter localized in fission yeast vacuolar vesicles that confers tolerance to cadmium by taking up glutathione-derived phytochelatin conjugated to Cd<sup>II</sup> (43). Considering that LABCG2 transporter revealed an apparent capacity to export thiols in the absence of Sb<sup>III</sup>, we measured internal thiol levels in *L. major* lines by flow cytometry analysis using CellTracker™. LABCG2 parasites presented lower thiols levels than the control parasites (Figure 4). Consequently, these results support the hypothesis that LABCG2 exports thiols to extracellular media without the need to conjugate to antimony. Decreased levels of GSH have been observed in MDCKII cells overexpressing human ABCG2/BCRP (44). Additionally, BCRP overexpression in HN4 cells was seen to increase extracellular GSH levels (45). However, measurement of GSH transport in membrane vesicles indicated that BCRP does not catalyze any significant GSH transport (46). In contrast, ABCC1/MRP1 mediated an active GSH transport in cancer cells (47). Future studies using membrane reconstitution of purified LABCG2 in proteoliposomes will further our understanding of LABCG2-mediated thiol transport in the absence of Sb<sup>III</sup>.

#### **Plasma membrane localization of LABCG2 in *Leishmania* parasites using biotinylation assay.**

We have previously used fluorescence microscopy assays to determine that LABCG2 partially colocalizes with the endosomal marker FM4-64 in *L. major*, suggesting that LABCG2 is located in the intracellular vesicles of the endocytic pathway of *Leishmania* parasites (10). However, we have not determined whether LABCG2 could be localized in the parasites' plasma membrane, where the transporter could be involved in the mechanism of drug efflux. We have previously described how *Leishmania* ABCI4 overexpression is localized in mitochondria, where it decreases the toxicity and accumulation of antimony, probably through efflux of the metal ion to the cytosol (5). Furthermore, ABCI4 localized in the parasitic plasma membrane may help to protect cells against the toxic effects of antimony and other compounds by effluxing them as conjugated thiol complexes (5).

To corroborate the possible localization of LABCG2 in the parasitic plasma membrane, we performed biotinylation assays using parasites expressing LABCG2 fused with an N-terminal GFP tag. Expression of the GFP-LABCG2 protein was determined by Western blot analysis of whole parasite lysates. As expected, a band

## Resultados

---

corresponding to GFP-LABCG2 was detected at about 100 KDa (Figure 5). We also observed part of the protein localized in the PM extract, supporting the hypothesis that the transporter would be localized in intracellular vesicles which would in turn fuse with the PM to release their content to the extracellular media. MRPA transporter has a similar subcellular localization, since it is found in intracellular membranes believed to correspond to vesicles that could be exocytosed via the flagellar pocket (3). Besides, we did not observe cytosolic trypanothione peroxidase among the biotinylated surface protein fraction, confirming that the labeling reagent did not penetrate the PM and consequently validating the specificity of the biotinylation procedure.

In conclusion, overexpression of LABCG2 in the plasma membrane of *Leishmania* may help to protect cells against the toxic effects of antimony and other compounds by effluxing them as conjugated thiol complexes. Future work should endeavour to obtain null mutants for LABCG2 that could potentially be used to understand the role of LABCG2 in *Leishmania* as a thiol-X pump and to validate it as a marker of clinical antimony resistance.

## FUNDING INFORMATION

This work was supported by the Spanish Grants SAF2012-34267 (to F.G.) and by the Proyecto de Excelencia, Junta de Andalucía, Ref. CTS-7282(to F.G.). A. Perea was supported by a fellowship for predoctoral contracts for PhD training from the Ministerio de Economía y Competitividad (in charge of Project SAF2012-34267).

## ACKNOWLEDGEMENTS

A. Perea was a student of the PhD program “Biochemistry and Molecular Biology” of the University of Granada (Spain). We thank Stephen M. Beverley (Washington University, School of Medicine, USA) for providing the vectors pXG-GFP+2' used throughout this research work and Ana Maria Tomás (Institute for Molecular and Cell Biology, Porto, Portugal), for providing the monoclonal anti-cytosolic trypanothione peroxidase antibody.

## REFERENCES

1. **Leishmaniasis, World Health Organization.** Updated February 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
2. **Sundar S.** 2001. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health.* **6**:849-854).
3. **Legare D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof YD, Rosen BP, Haimeur A, Papadopoulou B, Ouellette M.** 2001. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem* **276**:26301-26307.
4. **Moreira DS, Monte Neto RL, Andrade JM, Santi AM, Reis PG, Frézard F, Murta SM.** 2013. Molecular characterization of the MRPA transporter and antimony uptake in four New World *Leishmania* spp. susceptible and resistant to antimony. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **3**:143-153.
5. **Manzano JI, García-Hernandez R, Castanys S, Gamarro F.** 2013. A new ABC half-transporter in *Leishmania major* is involved in resistance to antimony. *Antimicrob Agents Chemother* **57**:3719-3730.
6. **Leprohon P, Legare D, Ouellette M.** 2009. Intracellular localization of the ABCC proteins of *Leishmania* and their role in resistance to antimonials. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:2646-2649.
7. **Frézard F, Demicheli C, Ferreira CS, Costa MA.** 2001. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:913-916.
8. **Denton H, McGregor JC, Coombs GH.** 2004. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochem J* **381**:405-412.
9. **Zhou Y, Messier N, Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R.** 2004. *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. *J Biol Chem* **279**:37445-37451.
10. **Campos-Salinas J, León-Guerrero D, González-Rey E, Delgado M, Castanys S, Pérez-Victoria JM, Gamarro F.** 2013. LABCG2, a new ABC transporter implicated in phosphatidylserine exposure, is involved in the infectivity and pathogenicity of *Leishmania*. *PLoS Negl Trop Dis* **7**:e2179.

## Resultados

---

11. **Imbert L, Ramos RG, Libong D, Abreu S, Loiseau PM, 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.
12. **Weingärtner A, Kemmer G, Müller FD, Zampieri RA, Gonzaga dos Santos M, Schiller J, Pomorski TG.** 2012. *Leishmania* promastigotes lack phosphatidylserine but bind annexin V upon permeabilization or miltefosine treatment. *PLoS One* **7**:e42070.
13. **Castanys-Muñoz E, Pérez-Victoria JM, Gamarro F, Castanys S.** 2008. Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite *Leishmania* with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:3573-3579.
14. **Castanys-Muñoz E, Alder-Baerens N, Pomorski T, Gamarro F, 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.
15. **Pérez-Victoria FJ, Gamarro F, Ouellette M, Castanys S.** 2003. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J Biol Chem* **278**:49965-49971.
16. **Kennedy ML, Cortes-Selva F, Pérez-Victoria JM, Jiménez IA, González AG, Muñoz OM, Gamarro F, Castanys S, Ravelo AG.** 2001. Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *J Med Chem* **44**:4668-4676.
17. **Manzano JI, Lecerf-Schmidt F, Lespinasse MA, Di Pietro A, Castanys S, Boumendjel A, Gamarro F.** 2014. Identification of specific reversal agents for *Leishmania* ABCI4-mediated antimony resistance by flavonoid and trolox derivative screening. *J Antimicrob Chemother* **69**:664-672.
18. **Sánchez-Cañete MP, Carvalho L, Pérez-Victoria FJ, Gamarro F, Castanys S.** 2009. Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:1305-1313.



19. **Brochu C, Wang J, Roy G, Messier N, Wang XY, Saravia NG, Ouellette M.** 2003. Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3073-3079.
20. **Bhandari V, Sundar S, Dujardin JC, Salotra P.** 2014. Elucidation of cellular mechanisms involved in experimental paromomycin resistance in *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:2580-2585.
21. **Sauvage V, Aubert D, Escotte-Binet S, Villena I.** 2009. The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. *Mol Biochem Parasitol* **167**:81-94.
22. **Woehlecke H, Pohl A, Alder-Baerens N, Lage H, Herrmann A.** 2003. Enhanced exposure of phosphatidylserine in human gastric carcinoma cells overexpressing the half-size ABC transporter BCRP (ABCG2). *Biochem J* **376**: 489-495.
23. **Polgar O, Robey RW, Bates SE.** 2008. ABCG2: structure, function and role in drug response. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**:1-15.
24. **Leslie EM, Deeley RG, Cole SP.** 2005. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol Appl Pharmacol* **204**:216-237.
25. **Ubeda JM, Legare D, Raymond F, Ouameur AA, Boisvert S, Rigault P, Corbeil J, Tremblay MJ, Olivier M, Papadopoulou B, Ouellette M.** 2008. Modulation of gene expression in drug resistant *Leishmania* is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy. *Genome Biol* **9**:R115.
26. **Leprohon P, Legare D, Raymond F, Madore E, Hardiman G, Corbeil J, Ouellette M.** 2009. Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant *Leishmania infantum*. *Nucleic Acids Res* **37**:1387-1399.
27. **Leprohon P, Fernandez-Prada C, Gazanion E, Monte-Neto R, Ouellette M.** 2015. Drug resistance analysis by next generation sequencing in *Leishmania*. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* **5**:26-35.
28. **Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B.** 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* **7**: 257-266.



## Resultados

---

29. **Coelho AC, Beverly SM, Cotrim PC.** 2003. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol* **130**:83-90.
30. **Ashutosh S, Sundar S, Goyal N.** 2007. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J Med Microbiol* **56**:143-153.
31. **Uzcategui NL, Zhou Y, Figarella K, Ye J, Mukhopadhyay R, Bhattacharjee H.** 2008. Alteration in glycerol and metalloid permeability by a single mutation in the extracellular C-loop of *Leishmania major* aquaglyceroporin LmAQP1. *Mol Microbiol* **70**:1477-1486.
32. **Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee H, Legare D, Sundar S, Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R.** 2004. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem* **279**:31010-31017.
33. **Marquis N, Gourbal B, Rosen BP, Mukhopadhyay R, Ouellette M.** 2005. Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol* **57**:1690-1699.
34. **Maciaszczyk-Dziubinska E, Wawrzycka D, Wysocki R.** 2012. Arsenic and antimony transporters in eukaryotes. *Int J Mol Sci* **13**:3527-3548.
35. **Callahan HL, Roberts WL, Rainey PM, Beverley SM.** 1994. The PGPA gene of *Leishmania major* mediates antimony (SbIII) resistance by decreasing influx and not by increasing efflux. *Mol Biochem Parasitol* **68**:145-149.
36. **Messaritakis I, Christodoulou V, Mazeris A, Koutala E, Vlahou A, Papadogiorgaki S, Antoniou M.** 2013. Drug resistance in natural isolates of *Leishmania donovani* s.l. promastigotes is dependent of Pgp170 expression. *PLoS One* **8**:e65467.
37. **Rai S, Bhaskar, Goel SK, Nath Dwivedi U, Sundar S, Goyal N.** 2013. Role of efflux pumps and intracellular thiols in natural antimony resistant isolates of *Leishmania donovani*. *PLoS One* **8**:e74862.
38. **Kim DY, Bovet L, Maeshima M, Martinoia E, Lee Y.** 2007. The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant J* **50**:207-218.

39. **Nuruzzaman M, Zhang R, Cao HZ, Luo ZY.** 2014. Plant pleiotropic drug resistance transporters: transport mechanism, gene expression, and function. *J Integr Plant Biol* **56**:729-740.
40. **Oda K, Otani M, Uruguchi S, Akihiro T, Fujiwara T.** 2011. Rice ABCG43 is Cd inducible and confers Cd tolerance on yeast. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**:1211-1213.
41. **Mukhopadhyay R, Dey S, Xu N, Gage D, Lightbody J, Ouellette M, Rosen BP.** 1996. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:10383-10387.
42. **Li ZS, Lu YP, Zhen RG, Szczypka M, Thiele DJ, Rea PA.** 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:42-47.
43. **Ortiz DF, Ruscitti T, McCue KF, Ow DW.** 1995. Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *J Biol Chem* **270**:4721-4728.
44. **Krzyzanowski D, Bartosz G, Grzelak A.** 2014. Collateral sensitivity: ABCG2-overexpressing cells are more vulnerable to oxidative stress. *Free Radic Biol Med* **76**:47-52.
45. **Brechbuhl HM, Gould N, Kachadourian R, Riekhof WR, Voelker DR, Day BJ.** 2010. Glutathione transport is a unique function of the ATP-binding cassette protein ABCG2. *J Biol Chem* **285**:16582-16587.
46. **Gauthier C, Ozvegy-Laczka C, Szakacs G, Sarkadi B, Di Pietro A.** 2013. ABCG2 is not able to catalyze glutathione efflux and does not contribute to GSH-dependent collateral sensitivity. *Front Pharmacol* **4**:138.
47. **Trompier D, Chang XB, Barattin R, du Moulinet D'Hardemare A, Di Pietro A, Baubichon-Cortay H.** 2004. Verapamil and its derivative trigger apoptosis through glutathione extrusion by multidrug resistance protein MRP1. *Cancer Res* **64**:4950-4956.

## Resultados

### Tables

Drug	EC <sub>50</sub> (μM) ± SD [RI] <sup>a</sup>		
	pUCNEO	LABCG2	LABCG2rev 90D
<b>Sb<sup>III</sup></b>	<b>16.02 ± 2.63</b>	<b>118.84 ± 11.50 [7.4]*</b>	<b>11.53 ± 0.69 [0.7]</b>
<b>As<sup>III</sup></b>	<b>0.99 ± 0.30</b>	<b>6.02 ± 1.50 [6.0]*</b>	<b>1.32 ± 0.02 [1.3]</b>
Amphotericin B	2.27 ± 0.73	2.33 ± 0.45 [1.0]	-
Miltefosine	18.25 ± 0.22	17.64 ± 1.70 [0.9]	-
<b>Pentamidine</b>	<b>0.66 ± 0.11</b>	<b>1.03 ± 0.11 [1.6]*</b>	<b>0.83 ± 0.03 [1.3]</b>
Tafenoquine	12.87 ± 3.16	15.92 ± 7.50 [1.2]	-
Sitamaquine	21.88 ± 5.43	18.02 ± 0.82 [0.8]	-
Primaquine	5.43 ± 0.32	6.11 ± 0.05 [1.1]	-
Chloroquine	10.99 ± 0.53	9.37 ± 1.67 [0.8]	-
<b>Daunomycin</b>	<b>0.56 ± 0.09</b>	<b>1.06 ± 0.16 [1.9]*</b>	<b>0.67 ± 0.06 [1.2]</b>
Mefloquine	2.02 ± 0.19	3.04 ± 0.34 [1.5]	-
Quinine	23.62 ± 2.84	29.69 ± 0.26 [1.3]	-
Perifosine	20.99 ± 1.95	20.96 ± 1.27 [1.0]	-
Vinblastine	10.31 ± 2.16	13.25 ± 2.65 [1.3]	-

**Table 1. Drug resistance profile in promastigote *L. major* lines**

Promastigotes of *Leishmania* lines were grown for 72 h at 28°C in the presence of increasing concentrations of drugs. Cell viability was determined by using an MTT-based assay as described in Materials and Methods section.

<sup>a</sup>Resistance indexes [RI] were calculated by dividing the EC<sub>50</sub> for *Leishmania* line overexpressing LABCG2 and LABCG2rev by that for *Leishmania* control line (pUCNEO). Data are the means ± standard deviations (SD) of three independent experiments. Significant differences were determined by using the Student's *t* test (\*, *p* < 0.01). -, not determined.

Metal	EC <sub>50</sub> (μM) ± SD[RI] <sup>a</sup>			
	pUCNEO	LABCG2	2-LABCG2	GFP- LABCG2
Sb <sup>III</sup>	16.02 ± 2.63	118.84 ± 11.50 [7.4]*	42.92 ± 7.75 [2.7]*	34.93 ± 1.00 [2.2]*
As <sup>III</sup>	0.99 ± 0.30	6.02 ± 1.50 [6.0]*	2.72 ± 0.78 [2.7]*	3.20 ± 0.18 [3.2]*
Cd <sup>II</sup>	58.77 ± 0.82	52.79 ± 4.21 [0.9]	-	-
Co <sup>II</sup>	28.46 ± 4.05	36.57 ± 5.27 [1.3]	-	-
Cu <sup>II</sup>	43.52 ± 7.02	60.68 ± 4.99 [1.4]	-	-

**Table 2. Heavy metal resistance profile in promastigote *L. major* lines**

Promastigotes of Leishmania lines were grown for 72 h at 28°C in the presence of increasing concentrations of metals. Cell viability was determined by using an MTT-based assay as described in Materials and Methods section.

<sup>a</sup>Resistance indexes [RI] were calculated by dividing the EC<sub>50</sub> for Leishmania line overexpressing LABCG2, LABCG2rev 90 days (90D), 2nd event LABCG2 and GFP-LABCG2 by that for Leishmania control line (pUCNEO). Data are the means ± SD of three independent experiments. Significant differences were determined by using the Student's t test (\*, p < 0.01). -, not determined.

## Resultados

---

Metal	EC <sub>50</sub> (µM) ± SD [RI] <sup>a</sup>		
	pUCNEO	LABCG2	LABCG2rev 90D
Sb <sup>III</sup>	6.16 ± 0.07	21.30 ± 0.81 [3.4] *	5.90 ± 0.11 [0.9]
Sb <sup>V</sup>	76.14 ± 2.88	>200 [> 2.6] *	87.73 ± 9.71 [1.1]

**Table 3. Susceptibility to antimony in intracellular amastigotes of *L. major* lines.**

Macrophage-differentiated-THP-1 cells infected with *L. major* lines using a macrophage/parasite ratio of 1:10, were incubated for 3 days in presence of Sb<sup>III</sup> or 5 days in presence of Sb<sup>V</sup> at different concentrations, as described in Materials and Methods section. Antimony susceptibility was determined from the percentage of infected cells and the number of intracellular amastigotes by cell in antimony-treated cultures versus non-treated cultures. The infection was determined by DAPI staining in 300 macrophages/well.

<sup>a</sup> Resistance indexes [RI] were calculated by dividing the EC<sub>50</sub> for *Leishmania* line overexpressing LABCG2 and LABCG2rev 90D by that for *Leishmania* control line (pUCNEO).

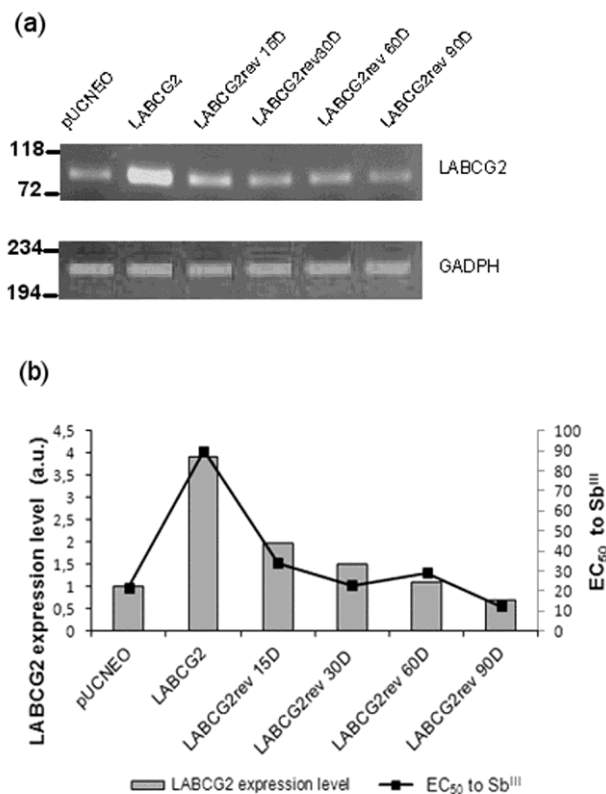
Data are the means ± SD of two independent experiments. Significant differences were determined by using the Student's *t* test (\*, *p* < 0.01).

**Table 4. Susceptibility of *L. major* lines to antimony in the presence of BSO.**

Compound	EC <sub>50</sub> (μM) ± SD (RI) [EC <sub>50</sub> decrease]	
	pUCNEO	LABCG2
Sb <sup>III</sup>	6.50 ± 1.01	37.45 ± 1.50 (5.8) <sup>†</sup>
Sb <sup>III</sup> + BSO	4.96 ± 1.23 [1.3]	8.23 ± 0.91(1.7) [4.5]*

Parasites were grown in M199 culture medium supplemented with 10% hiFBS for 72 h at 28°C in the presence of increasing concentrations of Sb<sup>III</sup>. Cell viability was determined by using an MTT-based assay as described in Material and Methods section. Resistance indexes (RI), indicated between brackets, was calculated by dividing the EC<sub>50</sub> for *Leishmania* line overexpressing LABCG2 by that for *Leishmania* control line (pUCNEO) of the same treatment. The EC<sub>50</sub> decrease, indicated between square brackets, was calculated by dividing the EC<sub>50</sub> after Sb<sup>III</sup> treatment by that for Sb<sup>III</sup> plus BSO in each *Leishmania* line. 3mM BSO (a γ-glutamylcysteine synthetase inhibitor) was added to the culture medium 48 h before the susceptibility experiment. The data are the means ± SD of three independent experiments. Significant differences were determined by the Student's *t* test (<sup>†</sup>, *p* < 0.01, pUCNEO vs. LABCG2; \*, *p* < 0.01, LABCG2 treated with vs. without BSO).

Figures with legends



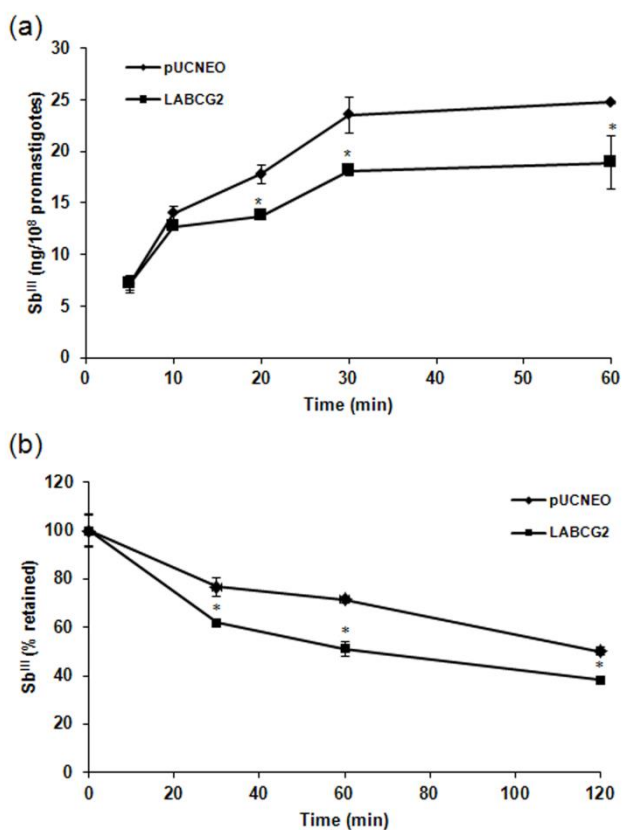
**Figure 1. RNA-expression analysis of LABCG2 in *L. major* lines.**

(a) Upper panel: LABCG2 gene expression by RT-PCR, as indicated by the amplified 82-bp ABCG2 fragment. Lower panel: GADPH gene expression as the internal loading control, showing the amplified 227-bp GADPH fragment. Total RNA was extracted from the pUCNEO line (control), LABCG2 lines and LABCG2 parasites growing for 15, 30, 60 and 90 days in the absence of G-418 pressure (LABCG2rev 15D, LABCG2rev 30D, LABCG2rev 60D, and LABCG2rev 90D lines, respectively) and then reverse transcribed to single-stranded cDNA by specific priming as described in the Materials and Methods section. PCR products were electrophoresed on a 4% agarose gel, stained with ethidium bromide, viewed under a UV illuminator and the relative intensity was measured against GADPH using a densitometer. The positions of molecular markers (bp) are indicated on the left. (b) Relationship between LABCG2 expression (arbitrary units, a.u.) and  $Sb^{III}$  susceptibility ( $EC_{50} \pm SD$

values of three independent experiments) in *L. major* promastigote lines. RT-PCR assay representative of at least three independent experiments are shown.

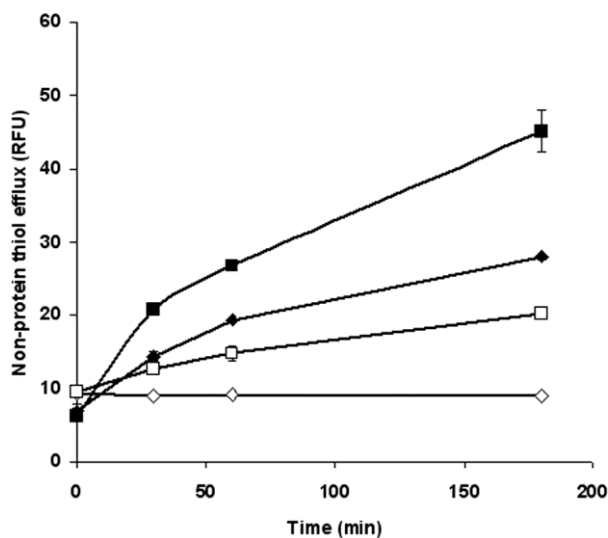


## Resultados



**Figure 2. Time-dependent accumulation and efflux of Sb<sup>III</sup> in *Leishmania* lines.**

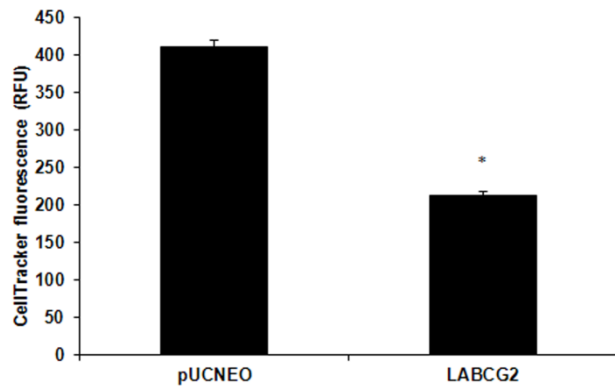
(a) *L. major* lines ( $1 \times 10^8$  /mL promastigotes), pUCNEO (control) and overexpressing LABCG2 were incubated with  $100 \mu\text{M}$  Sb<sup>III</sup> and samples taken after different time-points. Antimony accumulation was measured by ICP-MS. (b) The efflux assay was performed after incubation for 1 h of *Leishmania* lines with compensated concentrations of Sb<sup>III</sup> to ensure similar labeling in the different lines. The parasites were then washed and resuspended in PBS buffer without Sb<sup>III</sup> and pelleted after different time-points. The data are the means  $\pm$  SD of three independent experiments in duplicate. Significant differences versus the control line were determined using the Student's *t* test (\*,  $p < 0.01$ ).



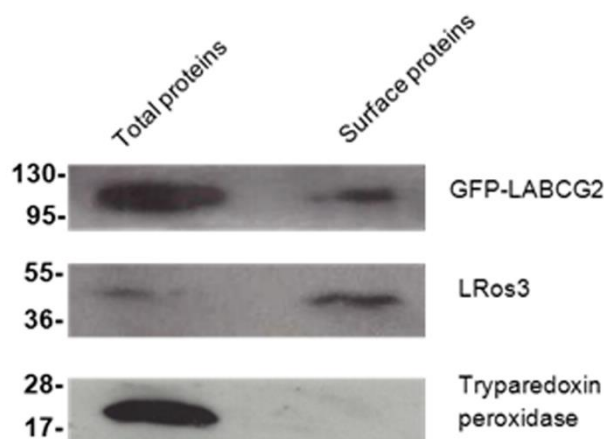
**Figure 3. Non-protein thiol efflux in *Leishmania* lines.** *L. major* lines ( $1 \times 10^8$  /mL promastigotes), pUCNEO (control; diamonds) and overexpressing LABCG2 (squares) were incubated for 1 h either (closed symbols) with or (open symbols) without  $100 \mu\text{M Sb}^{\text{III}}$  for 1h. The promastigotes were then washed with PBS and the supernatants processed after different periods. Sample fluorescence (excitation, 380 nm; emission, 510 nm) was determined using an Infinite<sup>®</sup> F200 luminescence system (Tecan Austria GmbH) and expressed in relative fluorescence units (RFU). The data are the means  $\pm$  SD of three independent experiments.

## Resultados

---



**Figure 4. Determination of thiol levels in *Leishmania* lines.** Promastigotes ( $10^7$ /mL) of *L. major* lines, pUCNEO (control) and overexpressing LABCG2 were incubated for 15 min at 37 °C with 2  $\mu$ M CellTracker™ and quantified by flow cytometry. The data are the means  $\pm$  SD of three independent experiments. Significant differences versus the control line were determined using the Student's *t* test (\*,  $p < 0.01$ ).



**Figure 5. LABC2 expression levels in the plasma membrane of *L. major* parasites.** Biotinylated proteins from the surface of promastigotes of *Leishmania* lines expressing GFP-LABC2 were analyzed by immunoblotting with the antibodies anti-GFP, anti-LRos3 (positive control) and anti-cytosolic tryparedoxin peroxidase (negative control). A Western blot assay representative of at least three independent experiments is shown. The positions of molecular markers (kDa) are indicated on the left.

### Capítulo 2: Implicación de los transportadores LABC1 y LABC2 de *Leishmania* en virulencia y autofagia

Los resultados relativos a este apartado están incluidos en la siguiente publicación:

***Leishmania* LABC1 and LABC2 transporters are involved in virulence and oxidative stress: functional linkage with autophagy.** Manzano JI, Perea A, León-Guerrero D, Campos-Salinas J, Piacenza L, Castanys S, Gamarro F.

Parasites & Vectors. 2017, 10(1):267. doi: 10.1186/s13071-017-2198-1.

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2198-1>

Los resultados relacionados con la caracterización molecular del mutante nulo para LABC1 y LABC2, la acumulación de fosfatidilserina, los niveles de ROS, el proceso de metacicloogénesis y análisis de la proteína HASPB en parásitos mutantes nulos para LABC1-2, han sido defendidos en la Tesis Doctoral de David León-Guerrero, (Universidad de Granada, 2016).

Todos estos resultados confirman la implicación del transportador LABC2 en la exposición de fosfatidilserina y en la virulencia de *Leishmania*. Adicionalmente, los datos obtenidos sugerían la posibilidad de que LABC2 estuviera asociado con el transporte de tioles. Por lo tanto, nos dispusimos a profundizar en estos aspectos así como a analizar el papel de LABC2 en otros procesos asociados tanto con la infectividad como con la autofagia.

En este artículo mostramos que los parásitos mutantes nulos para LABC1 y LABC2 ( $\Delta$ LABC1-2) presentan una reducción en la infectividad y virulencia así como un defecto en la metacicloogénesis y modificaciones en la composición de los LPG de la membrana plasmática. Considerando que la autofagia es un proceso imprescindible para el desarrollo de la metacicloogénesis, en este trabajo mostramos que los parásitos  $\Delta$ LABC1-2 tienen alterado el proceso de autofagia. La reducción en el número de autofagosomas observada para estos parásitos, está relacionada con un contenido elevado de los niveles internos de tioles no proteicos, siendo GSH y T(SH)<sub>2</sub> las principales moléculas acumuladas. De hecho, al depletar los niveles de tioles de la línea  $\Delta$ LABC1-2, se produce un aumento significativo del porcentaje de células con autofagosomas, estableciendo una relación entre autofagia y tioles.

En este artículo sugerimos que los transportadores ABCG1-2 de *Leishmania* podrían ser transportadores de tioles al mismo tiempo que juegan un papel clave en la supervivencia e infectividad de *Leishmania* a través de procesos relacionados como la autofagia.

### ***Leishmania* LABCG1 and LABCG2 transporters are involved in virulence and oxidative stress: functional linkage with autophagy**

José Ignacio Manzano<sup>1</sup>, Ana Perea<sup>1</sup>, David León-Guerrero<sup>1</sup>, Jenny Campos-Salinas<sup>1</sup>, Lucia Piacenza<sup>2</sup>, Santiago Castanys<sup>1\*</sup>, Francisco Gamarro<sup>1\*</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, IPBLN-CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avda. del Conocimiento s/n, 18016 Granada, Spain.

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo (Uruguay).

José Ignacio Manzano. E-mail: nacho.manzano@ipb.csic.es

Ana Perea Martínez. E-mail: anapereama@ipb.csic.es

David León Guerrero. Email: cuzko@hotmail.com

Jenny Campos Salinas. E-mail: jennycampos@ipb.csic.es

Lucia Piacenza. E-mail: dr.lpiacenza@gmail.com

Santiago Castanys. Email: castanys@ipb.csic.es

Francisco Gamarro. E-mail: gamarro@ipb.csic.es

\* **Corresponding author.** Phone: +34 958 181667; Fax: +34 958 181632; E-mail: gamarro@ipb.csic.es.

Dr. Francisco Gamarro and Dr. Santiago Castanys are equal senior authors.

### **Abstract**

**Background:** The G subfamily of ABC (ATP-binding cassette) transporters of *Leishmania* include 6 genes (*ABCG1-G6*), some with relevant biological functions associated with drug resistance and phospholipid transport. Several studies have shown that *Leishmania* LABCG2 transporter plays a role in the exposure of phosphatidylserine (PS), in virulence and in resistance to antimonials. However, the

involvement of this transporter in other key biological processes has not been studied.

**Methods:** To better understand the biological function of LABCG2 and its nearly identical tandem-repeated transporter LABCG1, we have generated *Leishmania major* null mutant parasites for both genes ( $\Delta$ LABCG1-2). NBD-PS uptake, infectivity, metacyclogenesis, autophagy and thiols were measured.

**Results:** *L. major*  $\Delta$ LABCG1-2 parasites present a reduction in NBD-PS uptake, infectivity and virulence. In addition, we have shown that  $\Delta$ LABCG1-2 parasites in stationary phase growth underwent less metacyclogenesis and presented differences in the plasma membrane's lipophosphoglycan composition. Considering that autophagy is an important process in terms of parasite virulence and cell differentiation, we have shown an autophagy defect in  $\Delta$ LABCG1-2 parasites, detected by monitoring expression of the autophagosome marker RFP-ATG8. This defect correlates with increased levels of reactive oxygen species and higher non-protein thiol content in  $\Delta$ LABCG1-2 parasites. HPLC analysis revealed that trypanothione and glutathione were the main molecules accumulated in these  $\Delta$ LABCG1-2 parasites. The decrease in non-protein thiol levels due to preincubation with buthionine sulphoximide (a  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase inhibitor) restored the autophagy process in  $\Delta$ LABCG1-2 parasites, indicating a relationship between autophagy and thiol content.

**Conclusions:** LABCG1-2 transporters from *Leishmania* could be considered as phosphatidylserine and non-protein thiol transporters. They probably accomplish transportation in conjunction with other molecules that are involved in oxidative stress, autophagy, metacyclogenesis and infectivity processes. The overall conclusion is that LABCG1-2 transporters could play a key role in *Leishmania* cell survival and infectivity.

**Keywords:** *Leishmania*, ABC transporters, virulence, metacyclogenesis, autophagy, oxidative stress.



### Background

Leishmaniasis is considered a neglected tropical disease caused by protozoan parasites of the genus *Leishmania* [1]. It is prevalent in 98 countries around the world and the current incidence is estimated about 0.2–0.4 million cases of visceral leishmaniasis and 0.7–1.2 million cases of the cutaneous form [1].

ABC (ATP-binding cassette) transporters are constituted by two homologous halves to be functional. The binding of substrates occurs in the transmembrane domain while the hydrolysis of ATP needed for the transport occurs in a cytosolic nucleotide binding domain [2]. The *Leishmania* genome contains 42 ABC genes classified in 9 subfamilies (from ABCA to ABCI) [3, 4]. The ABCG subfamily includes half-transporters that require homo/heterodimerisation to become functional [5]. LABCG2 has two additional imperfect tandem repeats in chromosome 6 of *Leishmania* (LABCG1 and LABCG3) [6]. LABCG1 and LABCG2 are almost identical (93% amino acid identity); however, the LABCG3 protein is truncated at the nucleotide binding and transmembrane domains. Expression of a dominant-negative version of the half-transporter LABCG2 produces a defect in the external surface exposure of endogenous phosphatidylserine (PS), which is normally asymmetrically confined on the inner leaflet of eukaryotic cells' plasma membranes. Additionally, these parasites present a decrease in the infection of mouse peritoneal macrophages and reduced virulence in a mouse model of cutaneous leishmaniasis [6].

The process by which trypanosomatids metabolically differentiate from procyclic promastigotes (non-infective) into metacyclic promastigotes (infective) is the metacyclogenesis [7]. In *Leishmania* species, the place where metacyclogenesis occurs is in the insect vector; *in vitro*, this process can be induced by acidification of the medium after the growth of parasites from logarithmic to stationary phase [8]. Stage-specific variations are observed throughout the parasite life cycle, such as the considerable structural modifications to lipophosphoglycan (LPG) composition and structure during parasite metacyclogenesis. LPG plays an important role in establishing *Leishmania* infection by conferring resistance to lysis mediated by complement and protecting from oxidative injury, by facilitating the binding to other receptors of macrophages and by remodeling the initial phagolysosome [9-11]. There

have not been any reports to date of a *Leishmania* ABC transporter involved in metacyclogenesis or modification of LPG composition.

In *Leishmania*, autophagy is a well-conserved process required for degradation of proteins and organelles during cellular differentiation and metacyclogenesis [12]; the ATG8-lipidation pathway plays an important role for autophagosome synthesis during autophagy. Moreover, the relationships between oxidative stress, caused by high levels of reactive oxygen species (ROS), and autophagy in *Leishmania* have been clearly established. Also, glutathione (GSH) is known to be involved in mitochondrial autophagy regulation in yeast [13]. Evidence that thiol pools have a modulatory function in autophagy progression due to an ABCC1-dependent extrusion has also been published [14]. The intracellular redox state of thiol pools, which markedly depends on GSH levels, could drive autophagy processes in carcinoma cells [14].

Recent studies indicate that human ABCG2 is involved in autophagy regulation and strongly suggest that ABCG2 plays a key role in cell survival [15]. Tumour cells overexpressing ABCG2 enhance both autophagy and cell survival suggesting that this transporter assumes a previously unknown role beyond its conventional drug-efflux function, probably associated with the transport of a specific cellular substance (or substances) involved in autophagy regulation [15].

On the other hand, some ABC transporters are able to transport thiols while conjugated with other substances. In this manner, several members of the ABCC subfamily (MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, MRP5 and CFTR) and ABCB7/ATM1 have been described as GSH transporters involved in cellular detoxification in mammalian cells [16, 17]. Indeed, overexpression of ABCG2 in mammalian cells altered intracellular GSH levels [18], although the role this transporter plays in that modulation process is still unclear. In *Leishmania*, LABCG2 overexpression is involved in antimony resistance; this is mediated by a lower accumulation due to intracellular sequestration and increased antimony and thiol efflux through the parasites' flagellar pocket [19].

In order to better understand the role of LABCG1-2 transporters in *Leishmania* cell survival and infectivity, we have obtained null mutant parasites for both genes. Here, we report that LABCG1 and 2 not only influence infectivity, virulence and metacyclogenesis but they also regulate the rate of autophagy and redox

## Resultados

---

metabolism. Taken as a whole, the data presented here suggest that *Leishmania* LABCG1-2 transporters have a previously unknown biological role associated with autophagy, establishing a relationship between thiol pool levels and autophagy.

## Methods

### Animals

BALB/c mice (six-week-old, female) from Charles River Breeding Laboratories were maintained and fed under pathogen-free conditions in the Animal Facility Service of the Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”.

### Strain and culture conditions

*L. major* (MHOM/JL/80/Friedlin) was the chosen strain. This line and derivative lines used in this study were maintained in RPMI 1640 medium (Invitrogen) supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (hiFBS, Invitrogen) at 28 °C.

### Generation of *L. major* LABCG1 and LABCG2 null mutants

To achieve targeted gene replacement of the *L. major* LABCG1 and LABCG2 genes (GeneDB-*L. major*, Accession Codes LmjF06.0080 and LmjF06.0090, respectively), we constructed a targeting DNA fragment in which the *hyg* gene, which confers resistance to hygromycin B, was flanked at the 5' end by a 1.5-kb region containing the LABCG2 stop codon and at the 3' end by a 1.5-kb region containing the LABCG1 initiation codon. The different fragments were amplified by PCR from genomic DNA using the following pairs of complementary primers: P1 forward (5'-atgcggccgcccgcTGTTTATCTGTGTTATCG-3') and P2 reverse (5'-atggatcctctagaatttaaGTAGACAGGCGGAGAAGGCAG-3') for the 5' region; P3 forward (5'-attctagaGTTGTAAGCTGCTGTGCGGCGTAAC-3') and P4 reverse (5'-atggatccGCACACGCGCGTAGGAAAGCAG-3') for the 3' region; or from the cLHYG vector: P5 (5'-GTAGATCTACCACTTTCTGCCTTCTG-3') and P6 (5'-GGAAGCTTCTATTCTTTGCCCTCGGACG-3') for the resistance cassettes. All fragments were subcloned into the pGEM<sup>®</sup>-T vector (Promega).

*L. major* promastigotes in logarithmic phase of growth were transfected with 2 µg of linearized DNA targeting constructions by electroporation (Nucleofector™). In the first

round of selection, the electroporated promastigotes were incubated in drug-free culture medium for 24 h, and plated in 96-well microplates in the presence of 10 µg/mL hygromycin B. By this method, several single knock-out clones were obtained. In a second round of gene targeting, loss of heterozygosity was promoted by increasing the hygromycin B concentration up to 500 µg/mL and plating into agar plates as previously described [20]. The clones obtained were analysed by Southern blot.

### **Southern blot analysis**

Genomic DNA was purified from WT (wild-type) and *LABCG1-2* null mutant ( $\Delta$ *LABCG1-2*) parasites and then digested with *AgeI*. Digested DNA was then separated using agarose gel electrophoresis, transferred on to a nylon membrane and hybridised to digoxigenin-labelled (DIG) DNA probes from an intergenic region between *LABCG1* and *LABCG2* (probe 1) or the 5'-UTR of *LABCG2* (probe 2), as described by [21]. Templates for synthesis of both probes were obtained by PCR from genomic DNA of *L. major* using the pairs of primers S1 forward (5'-ATCCACCCGTCGACACATGC-3') and S2 reverse (5'-CGCTGTCCTTCCGTTTGTGG-3'), and S3 forward (5'-TGTTTATCTGTGTTATCG-3') and S4 reverse (5'-GTAGACAGGCGGAGAAGGCAG-3'), respectively. All procedures for the DIG application system (Roche) were carried out according to the manufacturer's instructions.

### **Transfection of *Leishmania* lines**

$\Delta$ *LABCG1-2* parasites were transfected and selected for resistance to 50 µg/mL of G418, when restituting *LABCG2* ( $\Delta$ *LABCG1-2* + *LABCG2*), or to nourseothricin, in the case of *LABCG1* ( $\Delta$ *LABCG1-2* + *LABCG1*), as previously described [6]. Double transfection techniques with the plasmids previously used for single gene reconstitution were performed to generate the add-back line  $\Delta$ *LABCG1-2* + *LABCG1-2*. To monitor autophagy, parasites were transfected with the plasmid pNUS RFP-ATG8 and selected at a concentration of 50 µg/mL of blasticidin.

## Resultados

---

### **Analysis of fluorescent PS uptake in *Leishmania* lines**

Accumulation of the fluorescent lipid analogue of PS (NBD-PS, palmitoyl-2-[6-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]hexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphoserine, from Avanti Polar Lipids (Birmingham, AL, USA) was determined by flow cytometry, as described previously [6]. Briefly, stationary-phase promastigotes ( $10^7$ /mL) were incubated in HPMI buffer (20 mM HEPES, 132 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 0.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM glucose, 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) supplemented with 0.3% (w/v) BSA (Bovine serum albumin) for 30 min at 28 °C and then labelled with 30 µM NBD-PS for 30 min at 28 °C. HPMI was supplemented with either 500 µM PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), or 5 mM DFP (diisopropylfluorophosphate) to block the catabolism of NBD-lipids. NBD-PS remaining on the cell surface was extracted twice by washing with 0.3% (w/v) BSA in PBS buffer. Parasites were resuspended in PBS for flow cytometry analysis performed with a Beckton Dickinson FACScan (San José, USA) equipped with an argon laser operating at 488 nm.

### ***In vitro* infection of mouse peritoneal macrophages**

The infection assays of peritoneal macrophages from BALB/c mice (Charles River Ltd.) were performed as described previously [4] with some modifications. Briefly, the adherent macrophages placed in 24-wells plate with coverslips, were infected for 4 h at 35 °C with stationary-phase promastigotes at a parasite-to-cell ratio of 2:1. The infection was stopped by washing with serum free medium and the infected macrophages were incubated for 24, 72 and 120 h. After incubation, the cultures were processed and stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dilactate) for the calculation of the percentage of infection and the mean number of amastigotes by fluorescence microscopy.

### **Analysis of *in vivo* infection**

Animals (6 mice/group) were injected subcutaneously in their left hind footpads with  $10^5$  stationary-phase *L. major* promastigotes resuspended in PBS. Progression of the disease was monitored with weekly measurements of the footpad swelling, assessed

by measuring the width of infected footpad, and extent of the cutaneous lesion on the infected footpad using a digital calliper (Mitutoyo, Japan), as described previously [22].

### **Lectin-mediated agglutination of *Leishmania* lines**

Promastigotes were agglutinated using lectin PNA (Peanut agglutinin) in order to purify metacyclic promastigotes, as described previously [23]. Parasites ( $1 \times 10^8$ ) were collected in stationary-phase growth, washed twice with PBS and incubated with 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of PNA for 10 min at room temperature. The parasites were then centrifuged for 10 min at 500 x *g*. Finally, non-agglutinated parasites remaining in the supernatant were centrifuged, resuspended in PBS and counted with a haemocytometer to determine the total cell number.

### **Western blot analysis**

Parasites expressing RFP-ATG8 (autophagosomal marker) were harvested at 1,000 x *g* for 10 min and washed twice in PBS; the pellets were either used immediately or stored at -20 °C. The parasite lysates were obtained by resuspending parasite pellets in lysis buffer, containing 150 mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, 2% DDM (n-dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranoside) and a mixture of peptidase inhibitors (Thermo Scientific).

Promastigote cell extracts were separated by SDS-PAGE (10%) in the presence of 6 M urea and analysed by Western blotting using an anti-RFP antibody (1:5,000; Invitrogen) as described [12]. An enhanced chemiluminescence reaction with an ECL kit (Amersham) was used for detection.

For LPG analysis, stationary-phase promastigotes (8 days of their growth cycle) were harvested at 1,000 x *g* for 10 min and washed twice in PBS. Parasite lysates used for this analysis were obtained as described above. Promastigote cell extracts were separated by SDS-PAGE (12%) and further analysed by Western blotting with the monoclonal antibodies: WIC 73.9 (1:250), specific for terminal Gal( $\beta$ 1-3) side-chains of LPG in plasma membrane [24]; and with 3F12 (1:500), which recognises specific arabinose residues of metacyclic forms [25].

For evaluation of metacyclogenesis, the metacyclic specific protein HASPB was analysed using rabbit anti-HASPB antibody at a 1:5,000 dilution [26]. The protein 3-

## Resultados

---

hydroxy-3-methyl-glutaryl Coenzyme A synthase (LmHMGS), used as an internal loading control, was recognised using rabbit anti-LmHMGS antibody at a 1:100,000 dilution [27].

### **Measurement of ROS levels in *Leishmania* lines**

The levels of intracellular ROS were measured as described [12]. Briefly, promastigotes ( $1 \times 10^7$ ) were collected at early logarithmic (EL), mid logarithmic (ML), early stationary (ES) and stationary (S) phases of growth. Cells ( $2 \times 10^6$ ) were incubated with 0.1 mM H<sub>2</sub>DCF-DA for 2 h at 28 °C. Fluorescence was then measured through flow cytometry (excitation 380–420 nm, barrier filter 520 nm) using a FACSCalibur™ (Becton-Dickinson).

### **Complement-mediated lysis in *Leishmania* lines**

The susceptibility of promastigotes to complement-mediated lysis was assessed following the protocol previously described [28] but with some modifications. Briefly, promastigotes ( $1 \times 10^7$ /mL) in a logarithmic or stationary phase of growth were exposed to increasing concentrations of fresh human serum for 30 min at 37 °C. After exposure, resazurin was added and incubated at 28 °C for 24 h in order to discover the cell viability. Sample fluorescence (excitation: 540 nm; emission: 580 nm) was measured in an Infinite F200 Luminescence System (Tecan Austria GmbH).

### **Monitoring autophagy in *Leishmania* lines**

Promastigotes expressing the autophagosomal marker RFP-ATG8 were examined daily under a fluorescence microscope in order to assess the proportion of parasites containing autophagosomes and the number of these structures per parasite. Three series of 200 parasites were counted for each time-point in each experiment. To determine the relationship between thiol levels and autophagy in *Leishmania* lines, 3 mM BSO (buthionine-[S,R]-sulfoximine, a  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase inhibitor) was added for 48 h before the autophagy experiments.



### **Determination of intracellular non-protein thiol levels**

To determine intracellular thiol levels, we used the fluorimetric probe CellTracker™ as described previously [19]. Log phase parasites ( $10^7$ /mL) were grown in M-199 medium plus 10% hiFBS. They were then washed with PBS and incubated with 2  $\mu$ M CellTracker™ for 15 min at 37 °C. After incubation, parasites were washed with PBS again and analysed by flow cytometry using a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson). Fluorescence emission between 515 and 545 nm was quantified using CellQuest™ software.

To determine non-protein thiol levels, mid-log phase promastigotes ( $1 \times 10^9$  cells) were collected by centrifugation (1,000  $\times$  *g*, 10 min) and washed three times with PBS. Proteins were precipitated with 2% trichloroacetic acid for 30 min and the supernatants obtained were neutralised with Tris-HCl 1 M at pH 8. We used 1 mM of DTNB (5,5-dithiobis-2-nitrobenzoic acid) for 10 min to measure the reduced non-protein thiol levels. The absorbance obtained at 412 nm was interpolated on a GSH standard curve generated using different concentrations of reduced GSH.

To quantify and discriminate between the different thiol molecules in the sample, the cell pellet was lyophilised and resuspended in 100  $\mu$ L of HEPES (40 mM, pH 8.0) containing a freshly prepared aqueous solution of NaBH<sub>4</sub> (sodium borohydride, 100 mM final concentration). Samples were allowed to set for 30 min at room temperature and thiols were then derivatized with monobromobimane (mBBr, 2 mM final concentration) for 5 min at 70 °C for detection. Following derivatisation, proteins were precipitated and any excess NaBH<sub>4</sub> removed by acid incubation with methanesulphonic acid (4 M, 100  $\mu$ L) for 2 h on ice. Acid soluble thiols were separated by reverse phase ion-pairing HPLC on an Agilent C18 column and analysed through fluorometric detection [29]. Quantitation and validation were accomplished using T[SH]<sub>2</sub> and GSH standards.

### **Statistical analysis**

Statistical treatment of data obtained between groups were performed using the Student's *t*-test. Differences were considered significant at a level of  $p < 0.05$ .



### Results and Discussion

#### Molecular characterisation of *L. major* LABCG1 and LABCG2 null mutants

Genes encoding LABCG1 and LABCG2 are tandemly linked with each other on chromosome 6 of *Leishmania* (LABCG1-2) (Fig. 1A) [6]. A *L. major* mutant lacking both LABCG1 and LABCG2 genes ( $\Delta$ LABCG1-2) was generated so we could further investigate the biological function of these proteins. The chromosomal loci containing the genes encoding LABCG1-2 were substituted with antibiotic cassettes that confer resistance to hygromycin B after applying a high selection pressure (up to 500  $\mu$ g/mL) with hygromycin B on the parasite population (Fig. 1A). In order to verify that both LABCG1-2 alleles were deleted, a Southern blot analysis was carried out on genomic DNA using different probes: the intergenic region of LABCG1-2 (probe 1, Fig. 1A, 1Ba), and the 5' UTR LABCG2 (probe 2, Fig. 1A, 1Bb).

#### Loss of LABCG1-2 results in an increase in NBD-PS uptake in *Leishmania* lines

After confirming the null mutant genotypes,  $\Delta$ LABCG1-2 parasites were tested for their capacity to transport NBD-PS. As previously described, the expression of a dominant-negative mutant version of LABCG2 results in a significantly higher accumulation of NBD-PS [6]. As expected,  $\Delta$ LABCG1-2 parasites showed a higher accumulation of NBD-PS compared to WT and add-back parasites (Fig. 1C). Additionally, parasites  $\Delta$ LABCG1-2 + LABCG1,  $\Delta$ LABCG1-2 + LABCG2 and  $\Delta$ LABCG1-2 + LABCG1-2 have similar NBD-PS accumulation values (Fig. 1C), supporting the suggestion that the function of LABCG1 and LABCG2 transporters is similar to the one previously considered when taking into account their high % of amino acid identity (93%). Thus, our results support that *Leishmania* LABCG1 and LABCG2 transporters have PS floppase activity. We decided to continue the functional studies using add-back parasites  $\Delta$ LABCG1-2 + LABCG1-2 to achieve the highest possible level of similarity with the WT line, avoiding potential functional differences between LABCG1 and LABCG2 transporters.

### Decreased infectivity and virulence in $\Delta$ LABCG1-2 parasites

To determine the biological effects of the genetic deficiencies in LABCG1-2 transporters on *Leishmania*, the infectivity and survival of WT,  $\Delta$ LABCG1-2 or add-back parasites in mouse peritoneal macrophages were determined at 24, 72 and 120 h post-infection. The results show that  $\Delta$ LABCG1-2 parasites have a lower percentage of infection (20–35%) compared with WT and add-back lines (65–75%) (Fig. 2A). Additionally, the mean number of parasites per infected macrophage in  $\Delta$ LABCG1-2 parasites was significantly lower compared to the other lines, indicating a significantly lower parasite entry into macrophages at 24 h post-infection; these parasites were viable and replicate inside the macrophages at 72 and 120 h (Fig. 2B).

We then analysed whether these results were linked to a lower *in vivo* virulence of the parasites using a mouse model of cutaneous leishmaniasis. Mice infected with WT and add-back parasites showed progressive swelling and lesions after five weeks (Fig. 3A, 3B, 3C), whereas mice infected with  $\Delta$ LABCG1-2 parasites presented minimal lesion pathology and significantly lower footpad swelling (Fig. 3A, 3B, 3C). Thus, we confirmed that LABCG1-2 are relevant transporters involved in infectivity and are essential for disease development.

### Defect in metacyclogenesis and changes in LPG composition in $\Delta$ LABCG1-2 parasites

Based on the above results, we assessed whether metacyclogenesis was impaired in  $\Delta$ LABCG1-2 parasites by studying several properties that distinguish metacyclic promastigotes from procyclic ones; among others, agglutination to PNA, susceptibility to human serum and expression of stage-specific protein HASPB.  $\Delta$ LABCG1-2 parasites displayed a growth phenotype similar to the WT and add-back parasites in the usual culture medium (data not shown). Metacyclic parasites were purified on day five of the growth curve (stationary phase) by binding to the lectin PNA [30]. We observed that the percentage of non-agglutinated parasites (PNA<sup>-</sup>) was significantly lower in  $\Delta$ LABCG1-2 parasites (1.3%) compared with WT (17%) and add-back parasites (16%) (Fig. 4A). This phenotype was not observed in the *L. major* line expressing a mutant version of LABCG2, probably because the wild-type version of

## Resultados

---

LABCG2 in these parasites was not completely inactivated whereas the LABCG2 expression in  $\Delta$ LABCG1-2 parasites was entirely suppressed.

Additionally, we analysed the susceptibility of the different *Leishmania* lines to lysis by human serum. As shown in Fig. 4Ba, the different *Leishmania* lines in the logarithmic phase of growth presented a similar susceptibility to lysis by human serum; however, in the stationary growth phase,  $\Delta$ LABCG1-2 parasites showed an increase in susceptibility to complement-mediated lysis at 10% human serum of around 2.5-fold relative to the controls (Fig. 4Bb). Serum concentrations higher than 10% were needed for a complete lysis of  $\Delta$ LABCG1-2 parasites (Fig. 4Bb); in contrast, only 50% of WT and add-back metacyclic parasites were lysed at the same serum concentration.

The only criterion supporting that  $\Delta$ LABCG1-2 parasites had displayed metacyclogenesis was a similar expression of metacyclic specific protein HASPB in the different stationary-phase promastigotes (Fig. 4C). A similar situation has been described in a *L. major* mutant VPS4 line involved in endosome sorting and autophagy [28]. In this case, the mutant parasites failed to differentiate into metacyclic forms as determined by the absence of HASPB and SHERP metacyclic specific proteins and a higher susceptibility to lysis by human serum [28]. However, the study did not observe any changes in the percentage of PNA<sup>-</sup> parasites. Our results concerning the unmodified expression of the HASPB protein in  $\Delta$ LABCG1-2 parasites established markers (although they lacked others) for metacyclic promastigotes indicating that the presence of the specific metacyclic protein HASPB was not enough to confer an infective phenotype. Probably, as suggested for the *L. major* mutant VPS4 line, the biosynthetic pathway of LPG assembly is induced independently of metacyclic specific proteins such as HASPB.

Thus, the reduced number of purified metacyclics, the higher susceptibility to complement-mediated lysis and the significant decrease in the infectivity of  $\Delta$ LABCG1-2 parasites could be due to the influence of LABCG1-2 transporters in the appropriate expression of surface molecules (e.g., LPG) [31]. As previously shown, the complement resistance of *L. major* promastigotes strongly depends on LPG chain length and the formation of a thick protective glycocalyx surface [9].

In all *Leishmania* species, LPG is composed by an GPI anchor of a 1-O-alkyl-2-lysophosphatidylinositol lipid and a heptasaccharide core, to which is attached a long phosphoglycan (PG) polymer composed of 15–30 [Gal $\beta$ 1,4Man $\alpha$ 1-PO $_4$ ] repeat units, playing a relevant role in parasite survival [9]. Some evidence suggests that LPG could decrease phagosome fusion properties at the first stages of infection in macrophages [32]. In this way, an attenuation of the virulence in promastigotes that lack LPG has previously been described using a *L. major lpg1*<sup>-</sup> mutant; and modifications in the LPG structures modulated phagosome-endosome fusion.

Using two different monoclonal antibodies against *Leishmania* LPG: (i) WIC79.3 (specific for terminal Gal( $\beta$ 1-3) side-chains), and (ii) 3F12 (specific for terminal arabinose in side chains of metacyclic promastigotes), we have observed differences in LPG composition in  $\Delta$ LABCG1-2 parasites since none of the antibodies employed recognised its LPG during the stationary growth phase compared with the WT and add-back lines (Fig. 4D). In previous experiments, we have shown that  $\Delta$ LABCG1-2 parasites were agglutinated with PNA, hence discarding the possibility of a lack of LPG. We hypothesise that LABCG1-2 could be involved in the intravesicular transport of oligosaccharides and the loss of LABCG1-2 could affect the LPG composition and the associated phenotypes. Future studies will aim to identify the type of oligosaccharide transported by LABCG1-2.

#### **$\Delta$ LABCG1-2 parasites are defective in autophagy**

Autophagy has been considered as a survival stress response to starvation conditions [28, 33]. Considering that  $\Delta$ LABCG1-2 parasites had altered the metacyclogenesis, we decided to determine whether these parasites would modify the autophagy as an important process for protein and organelle degradation during cellular differentiation and metacyclogenesis. *L. major* ATG8 has been identified as an useful marker for observing autophagosomes in *Leishmania* [28]. Thus, to follow the formation of autophagosomes, we expressed ATG8 fused with RFP at its N-terminus in WT,  $\Delta$ LABCG1-2 and add-back parasites. Afterwards, the formation of autophagosomes was analyzed through the 10-day growth cycle of *Leishmania* lines (Fig. 5A). RFP-ATG8 was distributed throughout the cytoplasm in logarithmic-phase promastigotes; however, during the early stationary-phase, autophagosomes could

## Resultados

---

be identified in some of the parasites as punctate structures in the cytoplasm [28]. The results show that the number of parasites containing autophagosomes increased from early log to early stationary-phase in WT and add-back promastigotes, with a maximum at day 8 (Fig. 5A). However, in  $\Delta$ LABCG1-2 parasites, the percentage of cells with autophagosomes was significantly lower at the different time-points (Fig. 5A). When parasites progressed to stationary phase and differentiate into metacyclic forms, the percentage of cells with autophagosomes rapidly decreased at days 9–10 (Fig. 5A). These results were validated by a well established Western blot assay using anti-RFP antibody on cell extracts from WT,  $\Delta$ LABCG1-2 and add-back lines expressing RFP-ATG8, in order to ascertain the proportion of cytosolic and lipid-associated forms of ATG8-PE (Fig. 5B) [12, 28]. The lipidated bands (RFP-ATG8-PE) associated with the autophagosomal membrane migrate faster than the unlipidated bands (RFP-ATG8). In WT and add-back lines at a stationary phase of growth, the proportion of RFP-ATG8-PE increased significantly versus the unlipidated form (Fig. 5B). In contrast,  $\Delta$ LABCG1-2 parasites had a higher proportion of non-lipidated ATG8 versus WT and add-back lines (Fig. 5B), which is consistent with a decrease in autophagosome biogenesis. These data clearly suggest that  $\Delta$ LABCG1-2 parasites have an autophagy defect in which autophagosome formation is inhibited, increasing the susceptibility to nutrient starvation and consequently impairing the metacyclogenesis.

A defect in autophagy progress has been described in *L. major* VPS4 and ATG4.2 mutant lines involved in endosome sorting and autophagy [28]; the authors concluded that differentiation to metacyclic forms in *Leishmania* is dependent on endosome function and autophagy.

### **Increased ROS levels in LABCG1-2 null mutant parasites**

The relationships between ROS levels and autophagy induction previously described in mammalian cells and *Leishmania* [12, 34], prompted us to study whether  $\Delta$ LABCG1-2 parasites present a modification in ROS levels during the parasite's different growth cycle phases. ROS levels in WT and add-back *Leishmania* lines increased through the growth phases from early log phase to mid log and early stationary phases, but subsequently diminished when the cells entered the stationary

phase (Fig. 6, time-points equivalent to 2, 4, 6 and 9 days, respectively). However, in  $\Delta$ LABCG1-2 parasites, ROS levels were 2-fold higher than their control parasites (WT) at the early stationary and stationary phases of growth (Fig. 6); this phenotype was re-established to WT levels in the add-back parasites (Fig. 6). Thus, the period at which ROS levels were highest agrees with the moment when autophagy was significantly reduced (Fig. 5A). Similar findings have been reported in *L. major* null mutant for ATG4.2 cysteine peptidase, which, although it presents a significant increase in ROS levels at different growth phases (mainly at the stationary phase), was unable to form autophagosomes under starvation conditions [12]. These results support previous findings [12] suggesting that autophagy is important for the protection of parasites against ROS-mediated protein damage and its absence results in elevated ROS levels.

#### **An increase in thiols influences autophagy response in $\Delta$ LABCG1-2 parasites**

Redox imbalance has a key role in driving autophagy [35]. In eukaryotic cells, a decrease in the GSH/GSSG ratio due to a release of GSH to the extracellular milieu mediated by ABCC1 and the concomitant increase of oxidized thiols, induces autophagy [14]. Evidence linking thiol redox state with autophagy has been reported previously [35]. The hypothesis does not exclude the possibility that redox imbalance might regulate autophagy at multiple levels. It has recently been demonstrated that nutrient deprivation in carcinoma cells led to a significant decrease of intracellular GSH levels and an activation of autophagy [14]. In *Leishmania* parasites, the LABCG2 transporter has been described as a non-protein thiol transporter [19]. In fact, we have found evidence that  $\Delta$ LABCG1-2 parasites have modified intracellular thiols. No differences in the parasite size that could explain the intracellular thiol variance was observed between the different lines (data not shown). As depicted in Fig. 7A, a significant increase in thiol levels was observed in  $\Delta$ LABCG1-2 parasites versus the control (WT) and add-back parasites; this increase in thiols correlates with a low proportion of cells containing autophagosomes (Fig. 7B), supporting the idea that *Leishmania* LABCG1-2 transporters are involved in autophagy and influence intracellular thiol levels. To assess the specificity of these results we measured intracellular thiol levels in the presence of GSH synthesis inhibitor BSO [36]. As

## Resultados

---

shown in Fig. 7A, treatment with BSO produces a decrease of GSH levels in WT and  $\Delta$ LABCG1-2 lines. However, we did not observe a significant decrease in the add-back line, probably due to a slight overexpression of LABCG1-2 that could transport the CellTracker™ probe, which was previously shown to be transported by human ABCG2 [37]. To evaluate whether the decrease in thiols was associated with autophagosome generation, we determined autophagosome formation in the presence or absence of BSO. Fig 7B shows that BSO preincubation for 48 h caused a decrease of intracellular GSH levels, while significantly increasing the percentage of cells containing autophagosomes in all *Leishmania* lines. These results provide evidence that autophagosome formation in *Leishmania* is directly linked to intracellular thiol levels and that a decrease in thiols stimulates the autophagy. Collectively, this suggests that a decrease in thiols is a specific feature of autophagy and that LABCG1-2 transporters are involved in this process. The relationship between autophagy regulation and GSH transport has been suggested previously for human ABCG2 transporter [15].

We have quantified the levels of thiols in the different *Leishmania* lines using DTNB probe, and the results show that  $\Delta$ LABCG1-2 parasites present significantly higher levels of non-protein thiols (2.2-fold increase) versus those observed in WT and add-back parasites (Fig. 8A). Additionally, we have determined by HPLC (Fig. 8B) that GSH and T[SH]<sub>2</sub> were the main molecules that differentially accumulated into  $\Delta$ LABCG1-2 parasites, around 2-fold for GSH and 1.5-fold for T[SH]<sub>2</sub> compared with WT and add-back parasites (Fig. 8B).

Future studies using membranes from baculovirus-insect cell heterologous expression of LABCG1-2 will confirm their involvement in non-protein thiols transport.

## Conclusions

In conclusion, the *Leishmania* LABCG1-2 transporters could be considered as GSH and T[SH]<sub>2</sub> thiol transporters, as they can modulate the levels of these molecules into the parasites influencing the autophagy process. Our finding that LABCG1-2 expression is associated with stress-induced autophagy indicates that these transporters have a novel role beyond drug-resistance, PS transport and virulence.



LABC1-2 transporters could interact with other protein(s) and the consequently alteration of these interactions may account for some of the observed phenotypes.

### Abbreviations

ABC: ATP-binding cassette; DIG: digoxigenin; HASPB: hydrophilic acylated surface protein B; HMGS: 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl Coenzyme A synthase; HPLC: high performance liquid chromatography; kb: kilobase; Kbp: kilobase pair; kDa: kiloDalton; LPG: Lipophosphoglycan; PBS: Phosphate buffered saline; PCR: Polymerase chain reaction; PS: Phosphatidylserine; RFP: Red fluorescent protein; ROS: reactive oxygen species; WT: Wild-type.

### Acknowledgements

We thanks M. Delgado and E. González-Rey for help with in vivo animal experiments, J. Mottram (University of Glasgow, UK) for the plasmid pNUS ATG8-RFP used in this research work and S.M. Beverley (Washington University, USA) for providing the pIRSAT vector used throughout this research work. Also, we thank G. Spaeth (Institute Pasteur, Paris) for the antibody WIC 73.9, D. Sacks (NIH/NIAID) for the antibody 3F12, D. Smith (University of York, UK) for the anti-HASPB antibody and D. Gonzalez-Pacanowska and L.M. Ruiz-Perez (IPBLN-CSIC, Granada, Spain) for the LmHMGS antibody.

### Funding

This work was supported by the Spanish Grants SAF2015-68042-R (to S.C. and F.G.), SAF2012-34267 (to F.G.), by the Proyecto de Excelencia, Junta de Andalucía, Ref. CTS-7282 (to F.G.) and by FEDER funds from the EU to S.C. and F.G. A. Perea was a student of the PhD program “Biochemistry and Molecular Biology” of the University of Granada (Spain) and was supported by a fellowship for predoctoral contracts for PhD training from the Ministerio de Economía y Competitividad (in charge of Project SAF2012-34267).

### Availability of data and material

Not applicable



## Resultados

---

### Authors' contributions

FG and SC designed the study and analyzed the results. JIM and AP developed the virulence, autophagy and oxidative stress related experiments. DL generated the null mutant  $\Delta$ LABCG1-2 parasites. JC was involved in infectivity and metacyclogenesis assays. LP determined the non-protein thiols by HPLC. JIM and FG wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

### Consent for publication

Not applicable.

### Ethics approval and consent to participate

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

### References

1. Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Boer M. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS One. 2012;7(5):e35671.
2. Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. Annu Rev Cell Biol. 1992;8:67-113.
3. Leprohon P, Legare D, Girard I, Papadopoulou B, Ouellette M. Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. Eukaryot Cell. 2006;5(10):1713-25.
4. Manzano JI, Garcia-Hernandez R, Castanys S, Gamarro F. A new ABC half-transporter in *Leishmania major* is involved in resistance to antimony. Antimicrob Agents Chemother. 2013;57(8):3719-30.

5. Bates SE, Robey R, Miyake K, Rao K, Ross DD, Litman T. The role of half-transporters in multidrug resistance. *J Bioenerg Biomembr.* 2001;33(6):503-11.
6. Campos-Salinas J, Leon-Guerrero D, Gonzalez-Rey E, Delgado M, Castanys S, Perez-Victoria JM, Gamarro F. LABC2, a new ABC transporter implicated in phosphatidylserine exposure, is involved in the infectivity and pathogenicity of *Leishmania*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(4):e2179.
7. Ouakad M, Vanaerschot M, Rijal S, Sundar S, Speybroeck N, Kestens L, Boel L, De Doncker S, Maes I, Decuypere S, Dujardin JC. Increased metacyclogenesis of antimony-resistant *Leishmania donovani* clinical lines. *Parasitology.* 2011;138(11):1392-99.
8. Saraiva EM, Pinto-da-Silva LH, Wanderley JL, Bonomo AC, Barcinski MA, Moreira ME. Flow cytometric assessment of *Leishmania spp* metacyclic differentiation: validation by morphological features and specific markers. *Exp Parasitol.* 2005;110(1):39-47.
9. Spath GF, Garraway LA, Turco SJ, Beverley SM. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania major* infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100(16):9536-41.
10. Lodge R, Diallo TO, Descoteaux A. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. *Cell Microbiol.* 2006;8(12):1922-31.
11. Franco LH, Beverley SM, Zamboni DS. Innate immune activation and subversion of Mammalian functions by *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Parasitol Res.* 2012;2012:165126.
12. Williams RA, Mottram JC, Coombs GH. Distinct roles in autophagy and importance in infectivity of the two ATG4 cysteine peptidases of *Leishmania major*. *J Biol Chem.* 2013;288(5):3678-90.
13. Deffieu M, Bhatia-Kissova I, Salin B, Galinier A, Manon S, Camougrand N. Glutathione participates in the regulation of mitophagy in yeast. *J Biol Chem.* 2009;284(22):14828-37.
14. Desideri E, Filomeni G, Ciriolo MR. Glutathione participates in the modulation of starvation-induced autophagy in carcinoma cells. *Autophagy.* 2012;8(12):1769-81.

## Resultados

---

15. Ding R, Jin S, Pabon K, Scotto KW. A role for ABCG2 beyond drug transport: Regulation of autophagy. *Autophagy*. 2016;12(5):737-51.
16. Ballatori, N., Krance, S.M., Marchan, R., Hammond, C.L. Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol Aspects Med*. 2009;30(1-2):13-28.
17. Lee JY, Yang JG, Zhitnitsky D, Lewinson O, Rees DC. Structural basis for heavy metal detoxification by an Atm1-type ABC exporter. *Science*. 2014;343(6175):1133-6.
18. Gauthier C, Ozvegy-Laczka C, Szakacs G, Sarkadi B, Di Pietro A. ABCG2 is not able to catalyze glutathione efflux and does not contribute to GSH-dependent collateral sensitivity. *Front Pharmacol*. 2013;4:138.
19. Perea A, Manzano JI, Castanys S, Gamarro F. The LABCG2 Transporter from the Protozoan Parasite *Leishmania* Is Involved in Antimony Resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(6):3489-96.
20. Perez-Victoria FJ, Sanchez-Cañete MP, Castanys S, Gamarro F. Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. *J Biol Chem*. 2006;281(33):23766-75.
21. Garcia-Sanchez S, Sanchez-Cañete MP, Gamarro F, Castanys S. Functional role of evolutionarily highly conserved residues, N-glycosylation level and domains of the *Leishmania* miltefosine transporter-Cdc50 subunit. *Biochem J*. 2014;459(1):83-94.
22. Lira R, Doherty M, Modi G, Sacks D. Evolution of lesion formation, parasitic load, Immune response and reservoir potential in C57BL/6 mice following high- and low-dose challenge with *Leishmania major*. *Infect. Immun*. 2000;68(9):5176-82.
23. Sacks DL, Hieny S, Sher A. Identification of cell surface carbohydrate and antigenic changes between noninfective and infective developmental stages of *Leishmania major* promastigotes. *J Immunol*. 1985;135(1):564-9.
24. Kelleher M, Bacic A, Handman E. Identification of a macrophage-binding determinant on lipophosphoglycan from *Leishmania major* promastigotes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(1):6-10.

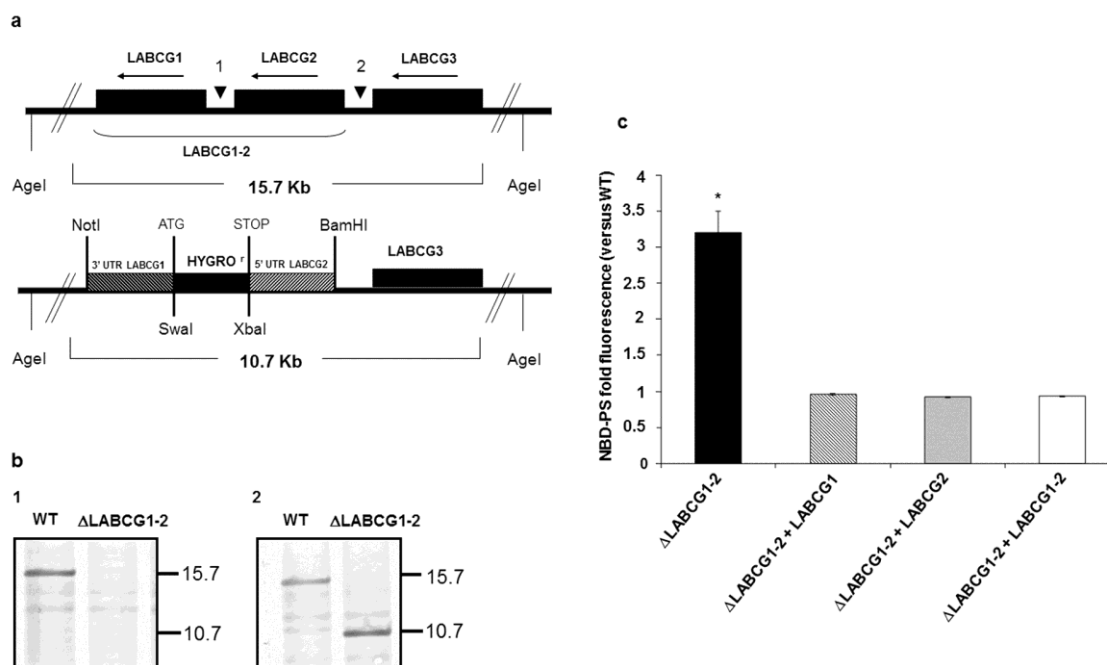
25. Kelleher M, Curtis JM, Sacks DL, Handman E, Bacic A. Epitope mapping of monoclonal antibodies directed against lipophosphoglycan of *Leishmania major* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 1994;66(2):187-200.
26. Flinn HM, Rangarajan D, Smith DF. Expression of a hydrophilic surface protein in infective stages of *Leishmania major*. *Mol Biochem Parasitol*. 1994;65(2):259-70.
27. Carrero-Lerida J, Perez-Moreno G, Castillo-Acosta VM, Ruiz-Perez LM, Gonzalez-Pacanowska D. Intracellular location of the early steps of the isoprenoid biosynthetic pathway in the trypanosomatids *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Int J Parasitol*. 2009;39(3):307-14.
28. Besteiro S, Williams RA, Morrison LS, Coombs GH, Mottram JC. Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. *J Biol Chem*. 2006;281(16):11384-96.
29. Krauth-Siegel RL, Jacoby EM, Schirmer RH. Trypanothione and N1-glutathionylspermidine: isolation and determination. *Methods Enzymol*. 1995;251:287-94.
30. Spath GF, Beverley SM. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective *Leishmania* metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. *Exp Parasitol*. 2001;99(2):97-103.
31. Turco SJ, Descoteaux A. The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol*. 1992;46:65-94.
32. Dermine JF, Scianimanico S, Prive C, Descoteaux A, Desjardins M. *Leishmania* promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol*. 2000;2(2):115-26.
33. Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*. 2004;6(4):463-77.
34. Wong CH, Iskandar KB, Yadav SK, Hirpara JL, Loh T, Pervaiz S. Simultaneous induction of non-canonical autophagy and apoptosis in cancer cells by ROS-dependent ERK and JNK activation. *PLoS One*. 2010;5(4):e9996.

## Resultados

---

35. Filomeni G, Desideri E, Cardaci S, Rotilio G, Ciriolo MR. Under the ROS...thiol network is the principal suspect for autophagy commitment. *Autophagy*. 2010;6(7):999-1005.
36. El Fadili K, Messier N, Leprohon P, Roy G, Guimond C, Trudel N, Saravia NG, Papadopoulou B, Legare D, Ouellette M. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(5):1988-93.
37. Strouse JJ, Ivnitski-Steele I, Waller A, Young SM, Perez D, Evangelisti AM, Ursu O, Bologna CG, Carter MB, Salas VM, Tegos G, Larson RS, Oprea TI, Edwards BS, Sklar LA. Fluorescent substrates for flow cytometric evaluation of efflux inhibition in ABCB1, ABCC1, and ABCG2 transporters. *Anal Biochem*. 2013;437(1):77-87.

## Figures with legends

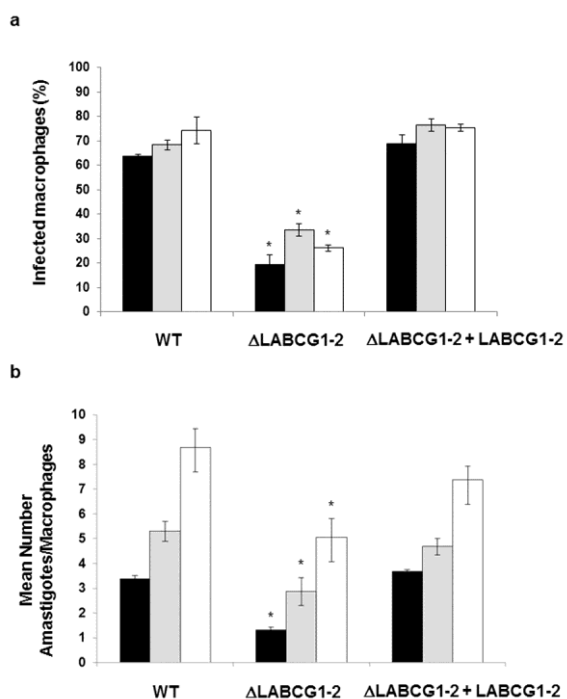


**Figure 1.** Generation of *L. major*  $\Delta$ *LABCG1-2* parasites and accumulation of NBD-PS. (a) Restriction map of the native *LABCG1-2* locus. Hybridisation probes are shown by arrowheads and codon regions by black boxes. Black arrows indicate the direction of the transcription. Single allele *LABCG1-2* mutant parasites were generated using hygromycin replacement construct and the remaining single allele was replaced by homologous recombination. (b) Southern blot analysis of wild-type (WT) and  $\Delta$ *LABCG1-2* lines. DNA was digested with *AgeI* and subjected to Southern blot analysis using radiolabelled probes that recognise the intergenic region of *LABCG1* and *LABCG2* (probe 1, b1) and the 5' UTR region of *LABCG2* (probe 2, b2). The positions of molecular markers (Kbp) are indicated on the right. (c) Promastigotes of *L. major* lines: control (WT),  $\Delta$ *LABCG1-2*, and add-back parasites with *LABCG1*, *LABCG2* and *LABCG1-2* ( $\Delta$ *LABCG1-2* + *LABCG1*,  $\Delta$ *LABCG1-2* + *LABCG2* and  $\Delta$ *LABCG1-2* + *LABCG1-2*) were incubated with NBD-PS for 30 min at 28 °C. After extraction with BSA and washing with PBS, the intracellular fluorescence was determined by flow cytometry. Data are the mean  $\pm$  S.D. of three independent

## Resultados

---

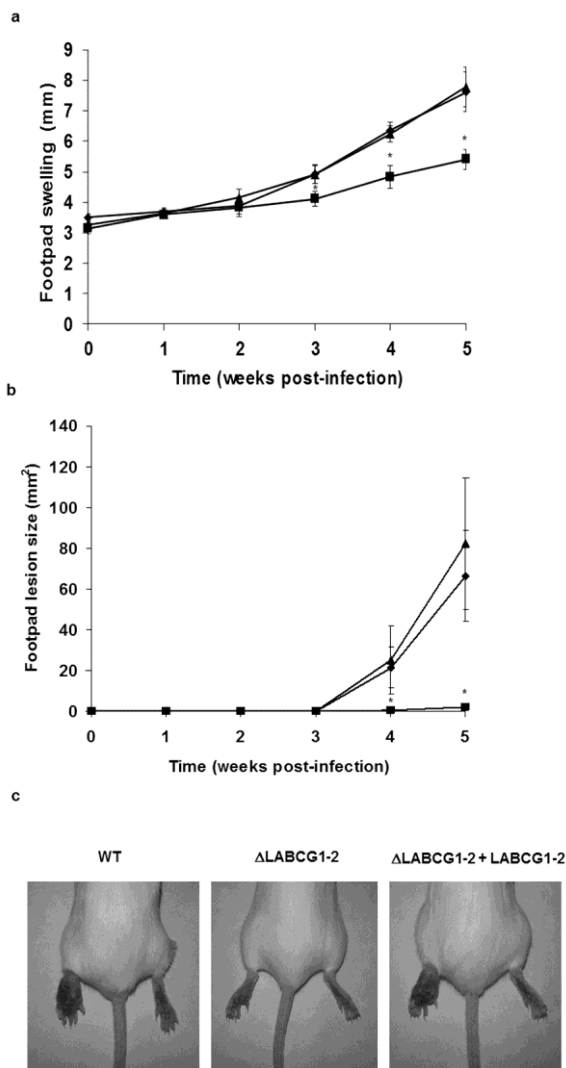
experiments. Statistical differences relative to the control values were calculated using Student's *t*-test (\*,  $p < 0.05$ ).



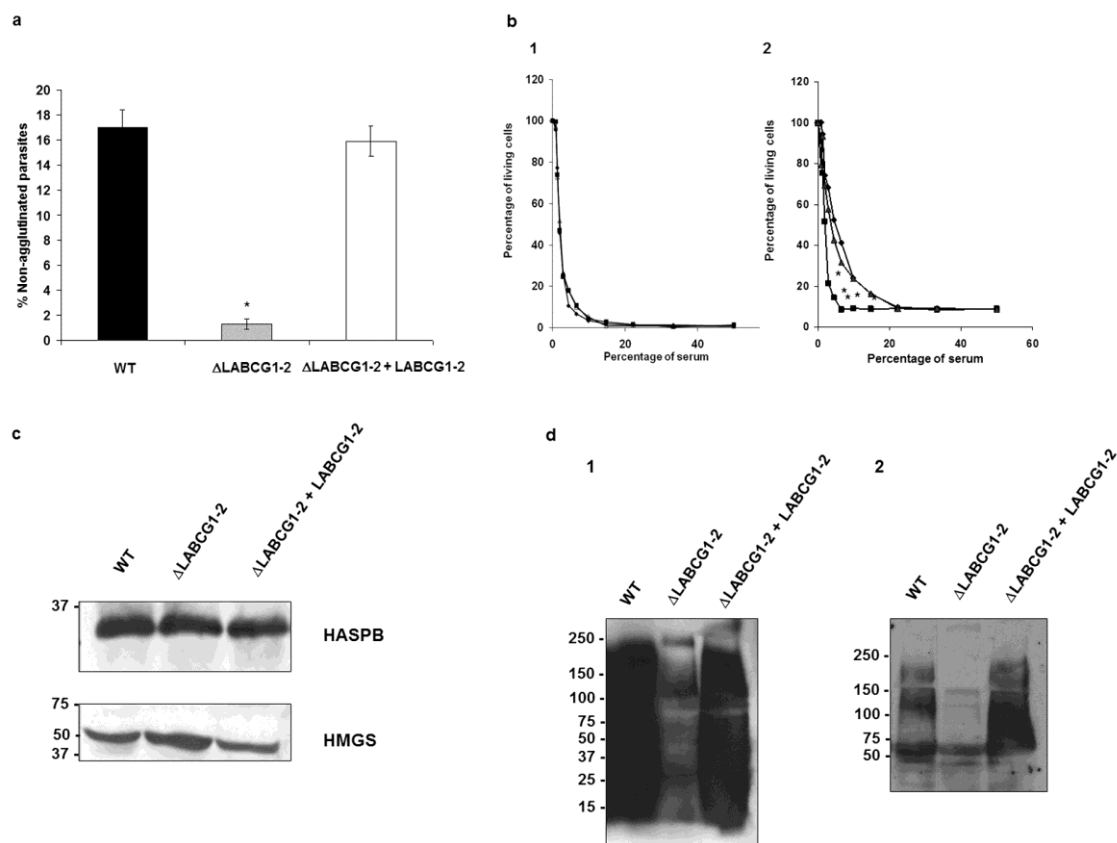
**Figure 2.** Infectivity and survival of *Leishmania* lines in mouse peritoneal macrophages. Mouse peritoneal macrophages were infected with different *L. major* lines for 4 h at 35 °C. At 24 (black histograms), 72 (grey histograms) and 120 h (white histograms) post-infection, the infectivity % (a) and the mean number of amastigotes/macrophages (b) were determined. Data are the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. Significant differences versus the respective control line were determined using the Student's *t*-test (\*:  $p < 0.05$ ).



## Resultados



**Figure 3.**  $\Delta$ LABCG1-2 parasites are less infective in a mouse model of cutaneous leishmaniasis. Susceptible BALB/c mice were infected with  $10^5$  WT (diamonds, black histograms),  $\Delta$ LABCG1-2 (squares, grey histograms) and add-back ( $\Delta$ LABCG1-2 + LABCG1-2; triangles, white histograms) *L. major* parasites in the stationary growth phase. Disease development was monitored weekly by measuring the footpad swelling (a) and lesion size (b). The pictures in C show the lesion at week 5 post-infection. The results represent the mean  $\pm$  SD of two independent experiments, with 6 mice per group. Mice were euthanized when the lesion size in controls reached a value of 60–80 mm<sup>2</sup>. \*  $p < 0.05$  vs. WT parasites.

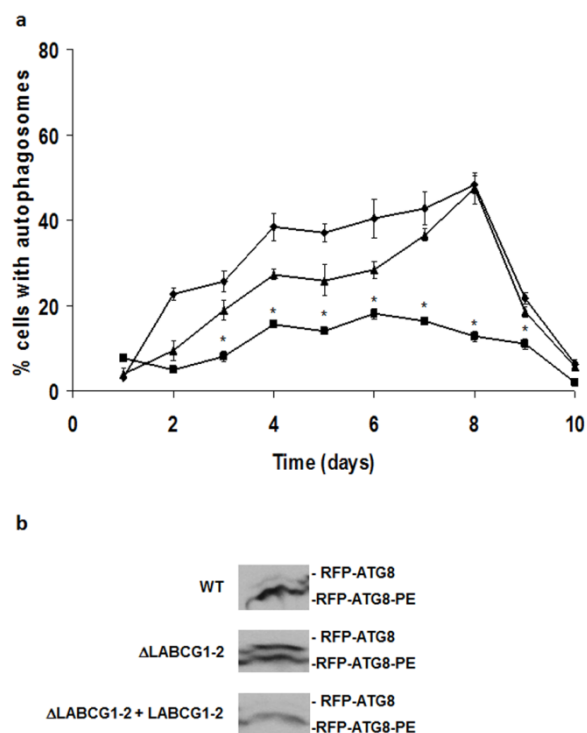


**Figure 4.** Metacyclogenesis and Western blot analysis of LPG from different *L. major* lines. Proportion of metacyclic promastigotes of different *L. major* lines including: control (WT, black histograms, diamonds),  $\Delta$ LABCG1-2 (grey histograms, squares) and add-back parasites ( $\Delta$ LABCG1-2 + LABCG1-2, white histograms, triangles), in stationary phase of culture (day 5), assessed using the PNA assay (a). (b) Promastigotes ( $1 \times 10^7$ /mL) in the logarithmic (b1) or stationary phase (b2) of the growth curve were exposed to increasing concentrations of fresh human serum for 30 min at 37 °C. Resazurin was then added and the promastigotes incubated at 28 °C for 24 h in order to determine cell viability. Data are the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. Significant differences versus the respective control line were determined using the Student's *t*-test (\*:  $p < 0.05$ ). (c) Promastigotes ( $1 \times 10^7$ ) of WT,  $\Delta$ LABCG1-2 and  $\Delta$ LABCG1-2 + LABCG1-2 were lysed and collected in the stationary growth phase and Western blot analysis with the antibodies HASPB and HMGS was performed as described in Materials and Methods. A Western blot assay representative of at least three independent experiments is shown. The positions of

## Resultados

---

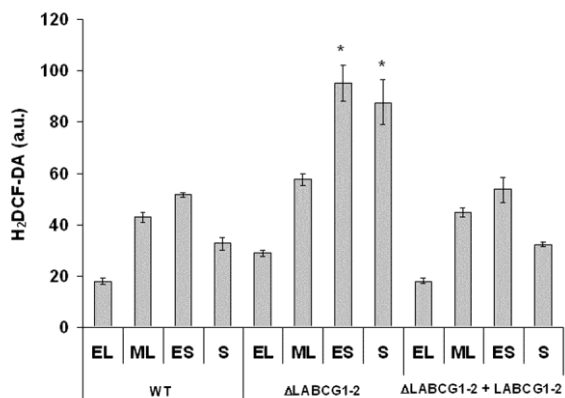
molecular markers (kDa) are indicated on the left. (d) Promastigotes ( $1 \times 10^7$ ) of WT,  $\Delta$ LABCG1-2 and  $\Delta$ LABCG1-2 + LABCG1-2 were collected at stationary phase of growth (8 days) and lysed as described in Materials and Methods. Western blot analysis of total proteins from parasites incubated with the antibodies WIC79.3 (d1) or 3F12 (d2) were performed at 1:250 and 1:500 dilutions, respectively. A Western blot assay representative of at least three independent experiments is shown. The positions of molecular markers (kDa) are indicated on the left.



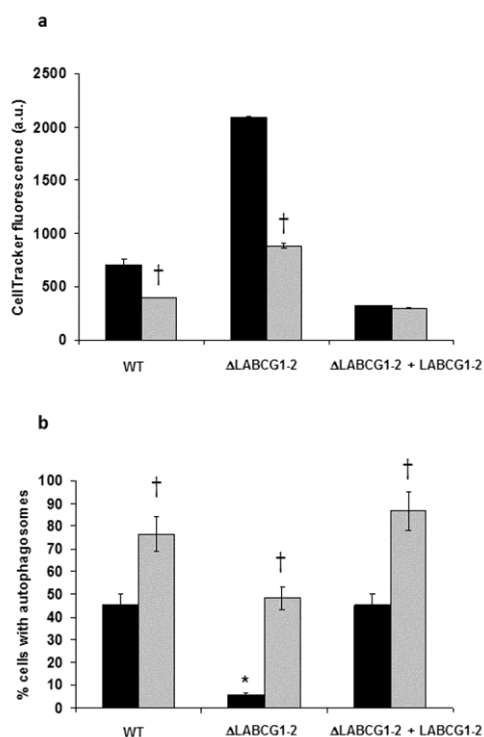
**Figure 5.** Autophagosome formation in promastigotes of *L. major* lines. (a) The proportion of promastigotes from different lines including: control (WT) (diamonds),  $\Delta$ LABCG1-2 (squares), and  $\Delta$ LABCG1-2 + LABCG1-2 (triangles) expressing RFP-ATG8 was assessed during the growth curve *in vitro*. Data are the mean  $\pm$  S.D. from three independent experiments. Statistical differences relative to the WT values were determined using the Student's *t* test (\*,  $p < 0.05$ ). (b) Western blot analysis of RFP-ATG8 in different *Leishmania* lines. Promastigote cell extracts from different lines (WT,  $\Delta$ LABCG1-2 and  $\Delta$ LABCG1-2 + LABCG1-2) transfected with RFP-ATG8 were collected during the stationary growth phase, separated by SDS-PAGE in the presence of 6 M urea and analysed by Western blot, as described in Materials and Methods. A Western blot assay representative of at least three independent experiments is shown.

## Resultados

---

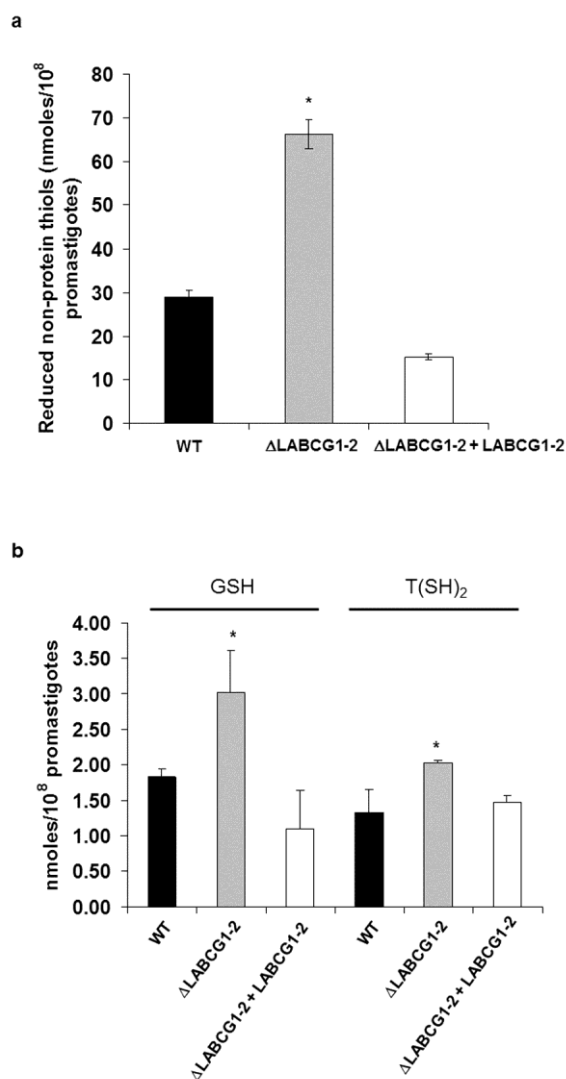


**Figure 6.** ROS levels along the growth cycle of *Leishmania* lines. Promastigotes ( $1 \times 10^7$ ) were collected at early logarithmic (EL), mid logarithmic (ML), early stationary (ES) and stationary (S) phases of growth (2, 4, 6 and 10 days, respectively) and basal ROS levels were measured by means of an H<sub>2</sub>DCFDA assay, as described in Materials and Methods. Data are the mean  $\pm$  S.D. of three independent experiments. Significant differences versus the respective control line were determined using Student's *t*-test (\*:  $p < 0.05$ ).



**Figure 7.** Relationship between thiol levels and autophagosome formation in *L. major* lines. (a) Parasites (WT,  $\Delta$ LABCG1-2 and  $\Delta$ LABCG1-2 + LABCG1-2) transfected with pNUS RFP-ATG8 were pre-incubated for 48 h in M-199 without (black histograms) or with (grey histograms) 3 mM BSO in order to deplete thiol levels. After 8 days in culture, promastigotes ( $4 \times 10^6$ ) were collected and incubated with 2  $\mu$ M CellTracker™ for 15 min. Fluorescence intensities were measured by flow cytometry as described in Materials and Methods. (b) In parallel, we measured the proportion of promastigotes expressing RFP-ATG8 with (grey histograms) or without (black histograms) the BSO treatment by counting autophagosomes using a fluorescence microscope. Data are the mean  $\pm$  S.D. from three independent experiments. Significant differences were determined by the Student's *t*-test (\*  $p < 0.01$  versus WT; †  $p < 0.01$  versus non-treated parasites).

## Resultados



**Figure 8.** Reduced non-protein thiol levels in *L. major* lines. (a) Parasites ( $3 \times 10^8$ ) were collected from different lines: WT (black histograms),  $\Delta$ LABCG1-2 (grey histograms), and  $\Delta$ LABCG1-2 + LABCG1-2 (white histograms) at stationary-phase growth. After three washes with PBS, the cell pellet was resuspended in Tris-HCl 10 mM-EDTA supplemented with 2% Triton X-100 and thiol levels quantified by flow cytometry. (b) Promastigotes ( $1 \times 10^9$ ) from different lines were collected, lyophilised and stored at 4 °C until used. The cell pellet was treated as described in Materials and Methods. Proteins were precipitated and acid soluble thiols were separated by reversed-phase ion-pairing HPLC on an Agilent C18 column and analysed with fluorescence detection. Quantitation and validation were accomplished using T[SH]<sub>2</sub> and GSH standards. Data are the mean  $\pm$  S.D. from three independent experiments.

Significant differences versus WT parasites were determined with the Student's *t*-test (\*  $p < 0.01$ ).



### Capítulo 3: Implicación de LABC2 en el transporte de tioles

Los resultados relativos a este apartado están incluidos en la siguiente publicación:

***Leishmania* LABC2 transporter is involved in ATP-dependent transport of thiols.** Perea A, Manzano JI, Kimura Y, Ueda K, Castanys S, Gamarro F.

Biochemical Journal. 2018, 475(1):87-97. doi: 10.1042/BCJ20170685.

<http://www.biochemj.org/content/475/1/87>

A lo largo de los dos artículos anteriormente citados hemos demostrado que los parásitos mutantes nulos para LABC2 presentan un incremento en los niveles intracelulares de GSH y T(SH)<sub>2</sub>. Adicionalmente, hemos observado que los parásitos que sobreexpresan LABC2 exportan tioles al medio extracelular sin la necesidad de conjugarse con Sb<sup>III</sup>. La conjunción de estos resultados nos incitó a esclarecer si LABC2 era capaz de transportar tioles no conjugados. En el presente artículo demostramos que tanto los tioles GSH y T(SH)<sub>2</sub> como sus formas oxidadas GSSG y TS<sub>2</sub> estimulan la actividad ATPasa basal del transportador LABC2 expresado en células de insecto Sf9, siendo T(SH)<sub>2</sub> y TS<sub>2</sub> los compuestos que mayor estimulación provocan. Adicionalmente, nuestros resultados indican que LABC2 es capaz de mediar la acumulación de <sup>3</sup>H-GSH en vesículas de forma dependiente de ATP. Finalmente, nuestros resultados demuestran que todos los tioles y disulfuros testados (GSH, GSSG, T(SH)<sub>2</sub>, TS<sub>2</sub> y Metil-GS) compiten por la acumulación de <sup>3</sup>H-GSH, siendo los mejores competidores T(SH)<sub>2</sub> y TS<sub>2</sub>. El valor de IC<sub>50</sub> para la acumulación de <sup>3</sup>H-GSH en presencia de T(SH)<sub>2</sub> es menor de 100 μM, corroborando la elevada afinidad de LABC2 por T(SH)<sub>2</sub>.

En conjunto, podemos concluir que LABC2 es el primer transportador de tioles no conjugados descrito en *Leishmania*, desarrollando probablemente una función relevante en el metabolismo redox del parásito y otros procesos relacionados.

## ***Leishmania* LABCG2 transporter is involved in ATP-dependent transport of thiols**

Ana Perea<sup>1#</sup>, José Ignacio Manzano<sup>1#</sup>, Yasuhisa Kimura<sup>2</sup>, Kazumitsu Ueda<sup>2,3</sup>, Santiago Castanys<sup>1</sup>, Francisco Gamarro<sup>1\*</sup>.

# Both authors contributed equally to this work.

<sup>1</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra”, IPBLN-CSIC, Granada (Spain).

<sup>2</sup>Division of Applied Life Sciences, Graduate School of Agriculture, Kyoto University, Kyoto (Japan).

<sup>3</sup>Institute for Integrated Cell-Material Sciences, Kyoto University, Kyoto (Japan).

\* **Corresponding author.** Phone: +34 958 181667; Fax: +34 958 181632; E-mail: gamarro@ipb.csic.es.

**Short title:** *Leishmania* LABCG2 transports thiols.

**Keywords:** *Leishmania*, ABC transporters, glutathione, trypanothione, thiols, oxidative stress.

### **Abstract**

The *Leishmania* LABCG2 transporter has a key role in the redox metabolism of these protozoan parasites. Recently, it has been described the involvement of LABCG2 in virulence, autophagy and oxidative stress. Null mutant parasites for LABCG2 present an increase in the intracellular levels of glutathione (GSH) and trypanothione [T(SH)<sub>2</sub>]. On the other hand, parasites overexpressing LABCG2 transporter export non-protein thiols to the extracellular medium. In order to explore if LABCG2 may mediate an active transport of non-protein thiols, the effect of these molecules on ATPase activity of LABCG2 as well as the ability of LABCG2 to transport them was determined using a baculovirus-Sf9 insect cell system. Our results indicate that all

## Resultados

---

thiols tested [GSH, T(SH)<sub>2</sub>] as well as their oxidized forms GSSG and TS<sub>2</sub> stimulate LABCG2-ATPase basal activity. We have measured the transport of [<sup>3</sup>H]-GSH in inside-out Sf9 cells membrane vesicles expressing LABCG2-GFP finding that LABCG2 was able to mediate a rapid and concentration dependent uptake of [<sup>3</sup>H]-GSH in presence of ATP. Finally, we have analyzed the ability of different thiol species to compete for this uptake, being the best competitors T(SH)<sub>2</sub> and TS<sub>2</sub>. IC<sub>50</sub> value for [<sup>3</sup>H]-GSH uptake in presence of increasing concentrations of T(SH)<sub>2</sub> was less than 100 μM, highlighting the affinity of this thiol for LABCG2. These results provide the first direct evidence that LABCG2 is an ABC transporter of reduced and oxidized non-protein thiols in *Leishmania*, suggesting that this transporter can play a role in the redox metabolism and related processes in this protozoan parasite.

## Abbreviations

ABC: ATP-binding cassette; GFP: Green fluorescence protein; GSH: glutathione; GSSG: L-glutathione disulfide; methyl-GS: S-methyl-glutathione; PBS: Phosphate buffered saline; ROS: reactive oxygen species; [T(SH)<sub>2</sub>]: trypanothione; TS<sub>2</sub>: trypanothione disulfide; TMD: transmembrane domain; NBD: nucleotide-binding domain.

## Introduction

Leishmaniasis, one of the most neglected tropical diseases, is caused by various species of the trypanosomatid protozoan *Leishmania*. According to World Health Organization, 310 million people have a risk of infection worldwide and over 20,000 deaths occur annually through a variety of clinical presentations, ranging from cutaneous lesions to fatal visceral leishmaniasis.

One of the most peculiar characteristic of trypanosomatids is their unique redox metabolism based on trypanothione [T(SH)<sub>2</sub>], a thiol synthesized from two molecules of glutathione (GSH) that are covalently bridged by a spermidine (Spd) in two ATP-dependent reactions. In the first step, glutathionylspermidine (Gsp) is formed, which is then combined with the second GSH to yield T(SH)<sub>2</sub>. T(SH)<sub>2</sub> is involved in a variety

of functions in cell metabolism like detoxification of ketoaldehydes and xenobiotics, reduction of ribonucleotides, regulation of DNA replication in kinetoplastids and detoxification of heavy-metals. T(SH)<sub>2</sub> can be considered the principal molecule for detoxification pathways in *Leishmania* and other trypanosomatids, as it participates in several spontaneous or tryparedoxin-mediated reactions of the redox metabolism [1,2].

In mammals, redox reactions relay on GSH and thioredoxin [3] instead of T(SH)<sub>2</sub>. Currently, only some proteins have been described to transport GSH or GSH conjugates through biological membranes, including some ABC (ATP-binding cassette) transporters. ABC transporters represent one of the largest family of proteins present in prokaryotic and eukaryotic organisms [4]. They are highly conserved from prokaryotic to humans and play a critical physiological role in transport of different compounds across cellular membranes [5]. General structure of ABC transporters consists of four domains. Two of them, the transmembrane domains (TMDs), are hydrophobic, containing multiple  $\alpha$ -helices and are involved in substrate recognition. The other two domains are the nucleotide-binding domains (NBDs), which include the high conserved motifs Walker A and B, responsible for the ATP-binding and hydrolysis necessary to get the energy required for transport [6]. Eukaryotic ABC transporters can codify for a full-transporters or half-transporters, as in *Leishmania* LABCG2 that needs to homo-/heterodimerize to reconstitute ATP-binding sites and generate an active protein [7].

In mammals, some members of the ABCC subfamily like MRP1 to MRP5 and CFTR are involved in GSH/oxidized GSH (GSSG) efflux and co-transport with other compounds [8]. Additionally, the Atm1-family ABC exporter from *Novosphingobium aromaticivorans* directly transports GSSG and plays a role in heavy metal detoxification probably by export of metal-GSH complexes [9]. Furthermore, GSSG stimulates ATP hydrolysis of ABCB10 whereas GSH inhibits ATP binding and hydrolysis [10]. In addition, Atm3 (ABCB25) from *Arabidopsis thaliana* and its orthologue Atm1 from *Saccharomyces cerevisiae* transport GSSG but not GSH [11]. In contrast, CydDC ABC transporter from *E. coli* transports GSH but not GSSG [12]. Human ABCG2 has also been proposed as a GSH transporter, although this point remains controversial [13,14].

## Resultados

---

Previously, we have reported that *Leishmania major* parasites overexpressing LABCG2 present a reduction in the accumulation of Sb<sup>III</sup> due to an increased drug efflux, most likely, as Sb<sup>III</sup>-thiol complexes [15]. ABCI4 and MRPA (PGPA) of *Leishmania* has been proposed to carry out an active efflux or sequestration into vesicles of thiol-metal conjugates respectively [16,17]. Also, internal thiol levels in *L. major* lines overexpressing LABCG2 are lower than control line, probably because LABCG2 is able to export thiols to the extracellular medium [15]. Additionally, null mutant parasites for LABCG2 present a significantly high accumulation of GSH and T(SH)<sub>2</sub>, supporting the hypothesis that LABCG2 is able to export GSH and T(SH)<sub>2</sub> to the extracellular medium [18]. Thus, in order to understand the involvement of this transporter in redox metabolism of *Leishmania*, we have determined the ability of LABCG2 to transport GSH using Sf9 cells membrane vesicles expressing LABCG2. Additionally, we have analyzed by competition assays the affinity of LABCG2 transporter for different thiols including T(SH)<sub>2</sub>. To our knowledge, the present study shows LABCG2 as the first ABC transporter able to transport non-conjugated thiols in *Leishmania*.

## Experimental

### Chemical compounds

Adenosine 5'-triphosphate (ATP) disodium salt hydrate, GSH, GSSG, S-methylglutathione (methyl-GS), Phenylmethylsulfonyl Fluoride (PMSF) and magnesium chloride hexahydrate (MgCl<sub>2</sub>) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). T(SH)<sub>2</sub> was kindly provided by Prof. Luise Krauth-Siegel (Heidelberg, Germany). [glycine-2-<sup>3</sup>H] GSH (45 Ci mmol<sup>-1</sup>) was purchased from PerkinElmer (Waltham, USA). Anti-green fluorescence protein (GFP) polyclonal antibody and polyclonal goat anti-rabbit immunoglobulins antibody were provided by Rockland Immunochemicals (Pottstown, USA). Protease inhibitors were provided by Thermo Scientific (Waltham, USA). All chemicals were of the highest quality available.

### Cell culture

Sf9 insect cells were cultured at 27°C in TNM-FH insect medium supplemented with 10% fetal bovine serum (hiFBS) and penicillin (100 U/ml, Sigma Aldrich, St. Louis, USA)–streptomycin (100 µg/ml; Sigma Aldrich, St. Louis, USA).

### Generation of recombinant baculovirus and expression in Sf9 insect cells

*L. major* (MHOM/JL/80/Friedlin) *LABCG2* (GeneDB-*L.major*, Accession Code LmjF06.0090) was cloned in pVL1392 vector containing TEV cleavage sequence, eight times tandemly repeated glycine-threonine-serine sequence, GFP, Flag and His10 from the C-terminus of *LABCG2*; this construction was named as *LABCG2-GFP*. To obtain Sf9 cells expressing non-functional *LABCG2* (*LABCG2<sup>K/M</sup>*), a mutation was introduced in Walker A motif of NBDs using inverse PCR based mutagenesis with the In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara Bio Inc, Kusatsu, Japan), replacing lysine 108 for methionine (K108M) [7]; this construction was named as *LABCG2<sup>K/M</sup>-GFP*.

Recombinant baculovirus containing *LABCG2-GFP* or *LABCG2<sup>K/M</sup>-GFP*, were generated by co-transfection of Sf9 cells with the mentioned constructions and the linear baculovirus tDNA (Oxford Expression Technologies, Oxford, UK) using the FuGeneHD Transfection Reagent (Promega, Madison, USA), according to the manufacturer`s instructions. The generated virus were amplified and stored at 4°C in dark.

### Baculovirus infection and preparation of Sf9 membranes expressing *LABCG2*

Sf9 cells ( $1 \times 10^8$ ) at a cell growth density of  $2 \times 10^6$  cells/mL were infected with recombinant baculovirus containing DNA of *LABCG2-GFP* or *LABCG2<sup>K/M</sup>-GFP* at a multiplicity of infection of 3. After 48h post-infection, cells were harvested and membrane preparation was performed as described previously [19]. Briefly, cells expressing the protein were centrifuged, washed and disrupted twice in a glass homogenizer in TMEP buffer (50 mM Tris-HCl, 50 mM mannitol, 2 mM EGTA-Tris pH 7.0, PMSF and protease inhibitors). Supernatant was collected and centrifuged at 40000 g for 60 min. The resulting pellet was once more homogenized and stored in individual aliquots at -80°C.

## Resultados

---

### Western blot analysis

Protein samples were fractionated by SDS-PAGE under standard conditions and electrotransferred onto Immobilon-P membranes (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). Immunodetection was performed by using a 1:5,000 dilution of rabbit anti-GFP polyclonal antibody in phosphate-buffered saline (PBS) plus 0.01% Tween 20 and 0.1% bovine serum albumin (BSA). After washing, membranes were incubated with horseradish peroxidase conjugated secondary goat anti-rabbit immunoglobulin G (DAKO, Glostrup, Denmark) using a 1:5,000 dilution. Signal was detected employing the ECL chemiluminescent substrate (Pierce Biotechnology, Waltham, USA).

### ATPase activity measurement by colorimetric assay

The ATP hydrolytic activity of LABCG2-GFP and LABCG2<sup>KM</sup>-GFP has been determined as described in [20]. Briefly, purified membranes (50 µg) were incubated in 160 µl of reaction buffer (50 mM MOPS-Tris pH 7.0, 50 mM KCl, 0.5 mM EGTA-Tris pH 7.0) supplemented with 12.5 mM Mg-ATP for 30 min at 37°C. The reaction was stopped by adding 100 µl 5% SDS. Inorganic phosphate derived from ATP hydrolysis was determined by colorimetric reaction using a Cary 100 UV-Visible Spectrophotometer (Varian, Palo Alto, USA). The stimulation of ATPase activity for GSH, GSSG, T(SH)<sub>2</sub> and TS<sub>2</sub> was studied at different concentrations (0.5, 1 and 5 mM).

### [<sup>3</sup>H]-GSH transport assays in Sf9 membrane vesicles expressing LABCG2

The transport assays were performed as previously described with minor modifications [19]. Before uptake assays, ATPase activity of membranes obtained from different extractions was tested, establishing a minimal stimulation by 0.5 mM GSH of 20 nmol Pi/min/mg membrane protein. Isolated Sf9 membrane vesicles (70 µg protein) were incubated in presence of 4 mM ATP and [<sup>3</sup>H]-GSH at different concentrations (0.1, 0.2, 0.5 and 1 mM), in 30 µl transport mix (0.1 M MOPS pH 7.0, 1 M KCl and 0.1 M MgCl<sub>2</sub>) at 37°C for 30 min (non-saturated uptake time-point). For the time course assay, purified Sf9 membrane vesicles were incubated with 0.5 mM

[<sup>3</sup>H]-GSH at different time- points (1, 5, 10, 30 and 60 min) in the same conditions described above. For competition assays, 10-fold excess concentrations (5 mM) of GSH, GSSG, methyl-GS, T(SH)<sub>2</sub> and trypanothione disulfide (TS<sub>2</sub>) were added at the beginning of the incubation with 0.5 mM [<sup>3</sup>H]-GSH for 30 min. Finally, T(SH)<sub>2</sub> was added to the reaction at the indicated concentrations to determine the IC<sub>50</sub> of [<sup>3</sup>H]-GSH uptake. To stop the reaction, 25 µl of washing buffer (0.1 M MOPS-Tris pH 7.0 and 1 M KCl) were added, and quickly filtered through Hydrophilic Polyvinylidene Fluoride (PVDF) membranes of 0.45 µm pore size (Merck Millipore, Darmstadt, Germany). The filters were washed three times and collected. Radioactivity was subsequently measured in scintillation fluid LS 6500 (Beckman Coulter, Brea, USA). TS<sub>2</sub> was obtained by oxidation of T(SH)<sub>2</sub> with hydrogen peroxide as described [21].

### Statistical analysis

Experiments were performed in triplicate in three independent experiments, and the data are presented as means ± SD. Statistical comparisons between groups were performed using Student's *t* test. Differences were considered significant at a level of  $p < 0.05$ .

## Results and discussion

### Expression of *L. major* LABCG2 in Sf9 insect cells

Sf9 cells infected with recombinant baculovirus have been previously used to express different human ABC transporters, including Pgp [22], ABCG2 [20], ABCA1 [23] and ABCA4 [24]. Additionally, we have previously described the use of baculovirus-Sf9 insect cell system for expression of *Leishmania tropica* P-glycoprotein (Pgp) transporter [25].

For the following experiments, Sf9 membrane vesicles expressing LABCG2-GFP or the mutant LABCG2<sup>K/M</sup>-GFP were analyzed by Western Blot. Uninfected Sf9 cells membrane samples were used as control. Western blot assay using an anti-GFP antibody showed a unique band at ~100 kDa that matched the predicted molecular weight for LABCG2-GFP and LABCG2<sup>K/M</sup>-GFP. The protein was absent in uninfected Sf9 membranes preparation and no significant degradation of LABCG2-GFP and LABCG2<sup>K/M</sup>-GFP was detected (Fig. 1).



### **Stimulation of ATPase activity by non-protein thiols in Sf9 membrane vesicles expressing LABCG2**

We have previously described that *L. major* parasites overexpressing LABCG2 present lower internal thiol levels, as well as a significant increase of non-protein thiols efflux, in comparison with a control line with basal levels of transporter [15]. Additionally, null mutant parasites for LABCG2 present higher levels of GSH and T(SH)<sub>2</sub> than the control line [18]. However, we cannot discard the possibility that these null mutant parasites present also higher levels of GSSG and TS<sub>2</sub>, because the employed methodology involves the chemical reduction of all thiols [18]. Therefore, we support the hypothesis that LABCG2 is able to export thiols to extracellular medium. To validate this proposal, Sf9 membrane vesicles expressing LABCG2-GFP and LABCG2<sup>K/M</sup>-GFP were obtained and ATPase activity was measured in absence (basal ATPase activity) and presence of increasing GSH and T(SH)<sub>2</sub> concentrations (0.5, 1 and 5 mM). Additionally, we decided to include in ATPase activity studies the oxidized forms GSSG and TS<sub>2</sub>. The results showed a significant stimulation of LABCG2-GFP basal ATPase activity for all thiols assayed in a concentration dependent manner (Fig. 2). As a result, GSSG produced a higher stimulation than GSH. It has been reported that MRP1 presents higher affinity for GSSG than for GSH [26]. In addition, ATPase activity of Atm1 from yeast and Atm3 from plants was stimulated by GSSG but not by GSH [11]. However, the greatest ATPase activity stimulation was generated by T(SH)<sub>2</sub> and TS<sub>2</sub> at 5.0 mM concentration, reaching 281 and 344 nmol Pi/min/mg membrane protein respectively (Fig. 2). Interestingly, the differences in ATPase activity stimulation between the oxidized thiols and their reduced forms were not as high as described for other ABC transporters [11]. Taking into account that T(SH)<sub>2</sub> is the equivalent of GSH in the redox metabolism of trypanosomatids, these results are consistent with the supposition that a transporter of thiols could be specially stimulated by T(SH)<sub>2</sub> and TS<sub>2</sub> in *Leishmania*. As expected, membrane vesicles expressing LABCG2<sup>K/M</sup>-GFP did not show ATPase activity stimulation (Fig. 2), supporting the specificity of LABCG2 transporter for these substrates.

### ***L. major* ABCG2 is able to transport GSH**

As ATPase activity assays proved the interaction of ABCG2 with different thiols and disulfides, we examined the ability of ABCG2-GFP to transport [<sup>3</sup>H]-GSH into Sf9 cells membrane vesicles. As shown in Fig. 3, time course of [<sup>3</sup>H]-GSH uptake in Sf9 membrane vesicles expressing ABCG2-GFP was examined demonstrating a rapid ATP-dependent uptake of [<sup>3</sup>H]-GSH that reaches steady-state levels (~10500 pmol/mg) in about 30 min.

As mentioned, GSH is a tripeptide involved in many signaling pathways; it acts as a cellular antioxidant that plays a critical role in protecting cells from oxidative damage and toxicity of xenobiotic electrophiles or heavy metals, as well as in maintaining redox homeostasis [27,28]. Currently, there are only few proteins characterized for the ability to transport GSH across membranes. As previously reported, cells overexpressing human ABCC1 are able to export GSH/GSSG and X-thiol conjugates with a depletion of levels of these molecules due to stimulation of the transporter by verapamil [29]. Human ABCG2 has also been proposed as a GSH transporter [13,14]. However, these results remain controversial due to recent studies suggesting that human ABCG2 is unable to transport GSH [19]. To date, no ABC transporters with the ability to transport non-conjugated thiols have been described in trypanosomatids. In this manner, ABCG2 can be considered the first ABC transporter of GSH in *Leishmania* and in other trypanosomatids, being most probably involved in maintaining the redox balance in these parasites, what is critical for proper function of cellular processes and in the protection from oxidative damage.

Additionally, ABCG2-GFP mediated ATP-dependent uptake of [<sup>3</sup>H]-GSH in a concentration-dependent manner reaching a biochemical plateau from concentrations higher than 0.5 mM, while membrane vesicles expressing the mutant version of the transporter did not accumulate [<sup>3</sup>H]-GSH (Fig. 4). This uptake suffered a deviation from the Michaelis-Menten kinetic and appeared to follow a sigmoidal curve, suggesting that this transporter could present two substrate-binding sites that interact in a cooperative manner for GSH transport. Other ABC transporters present sigmoidal kinetics in the presence of different compounds. Among others, ABCC2 (MRP2) that mediated transport of the probe substrate estradiol-17 $\beta$ -glucuronide,

## Resultados

---

also exhibits a sigmoidal curve that suggests multiple substrate binding sites with cooperative interactions [30].

### **Substrate affinity of *Leishmania* LABCG2**

In order to investigate the affinity of LABCG2-GFP for different thiols, [<sup>3</sup>H]-GSH uptake into Sf9 cells membrane vesicles containing this transporter was analyzed in presence of 10-fold excess (5 mM) of GSH, GSSG, T(SH)<sub>2</sub>, TS<sub>2</sub> and methyl-GS. The uptake of [<sup>3</sup>H]-GSH was notably decreased by all thiol derivatives tested (Fig. 5). As expected on the basis of ATPase results obtained, T(SH)<sub>2</sub> and TS<sub>2</sub> produced the strongest competition, with 95 % of the uptake abolished, indicating a significantly high affinity of LABCG2-GFP for these substrates. In addition, GSSG and methyl-GS inhibited more than 80% of [<sup>3</sup>H]-GSH uptake (Fig. 5). On the other hand, Gsp (compound not included in the study) constituted by one molecule of GSH and one molecule of Spd could be transported or interact with LABCG2.

In view of the noticeable affinity of LABCG2-GFP transporter for T(SH)<sub>2</sub>, IC<sub>50</sub> value for [<sup>3</sup>H]-GSH uptake was obtained in presence of increasing concentrations of T(SH)<sub>2</sub> (Fig. 6). The uptake of [<sup>3</sup>H]-GSH was reduced dramatically at low concentrations of T(SH)<sub>2</sub>, showing an IC<sub>50</sub> less than 100 μM (Fig. 6) and thus, supporting that LABCG2 preferentially binds this substrate with a high degree of affinity.

Previously, we have reported that null mutant parasites for LABCG2 accumulate T(SH)<sub>2</sub> and GSH [18]. In accordance with these results, transport studies have demonstrated that *Leishmania* LABCG2 is able to interact and mediate ATP-dependent transport of GSH, and probably T(SH)<sub>2</sub> and their oxidized forms. As mentioned, redox metabolism is involved in several biological processes as protection of cells from oxidative damage. Additionally, a reduction on intracellular thiol levels mediated by ABCC1 dependent GSH efflux, leads to a more oxidizing environment inside cells that triggers autophagy [31]. It is well known that autophagy is an essential process involved in cellular differentiation and virulence in *Leishmania* [32]. Besides, null mutant parasites for LABCG2 are defective in autophagy and metacyclogenesis [18]. Therefore, taken together, these data suggest that LABCG2 could be involved in generating the oxidative conditions needed to prompt autophagy and the consequent cellular differentiation from non-infective to infective

promastigotes, by extruding T(SH)<sub>2</sub> and GSH to the extracellular medium depending on the intracellular balance between oxidized and reduced thiols. Additionally, the efflux of reduced thiols could help to maintain a reducing niche to counteract the oxidative stress inside macrophages. In fact, T(SH)<sub>2</sub> is able to intercept nitric oxide and form a dinitrosyl-trypanothionyl iron complex harmless for parasites [2]. As described, *L. guyanensis* amastigotes die inside BALB/c macrophages through apoptosis mediated by an increase in ROS levels due to infection [33]. Thus, a decrease in ROS levels inside macrophages due to the action of parasite thiols could help to prevent the ROS-mediated apoptosis of host cells, protecting the niche of *Leishmania* intracellular forms. At the same time, thiols conjugated to nitric oxide inside parasites could be exported to the extracellular medium in order to help parasites to survive to oxidative stress. A similar idea has been suggested for human ABCG2 and its ability to efflux GSH in stem cells, for which redox environment is decisive to trigger differentiation [14]. Additionally, peroxynitrite produced into the macrophage's phagosome is a powerful oxidant and cytotoxic effector molecule that can oxidize lipids, proteins and DNA [34]. Peroxynitrite can readily oxidize molecules such as thiols and metal centres [34]. Kinetics studies of reactivity of different components of trypanothione peroxidase antioxidant system in trypanosomes (trypanothione, cytosolic trypanothione peroxidases) with peroxynitrite show that the reaction rate of peroxynitrite with cytosolic peroxiredoxins is several orders of magnitude higher than with dihydrotrypanothione or reduced trypanothione [35]. Afterwards, the oxidized peroxiredoxin is readily reduced by the trypanothione and trypanothione-coupled systems that restore the peroxiredoxin to the reduced thiol native state, with the consequent oxidation of T(SH)<sub>2</sub> [35]. The dynamic balance between intraphagosomal oxidant production and the activity of key antioxidant enzymes in the parasite at the onset of the infection critically determines parasite infectivity [36]. In this way, T(SH)<sub>2</sub> has a secondary protective key role against detoxification of peroxynitrite that facilitates the survival of parasites in the oxidative environment produced by activated macrophages in the first hours after infection [37]. The ability of ABCG2 to transport T(SH)<sub>2</sub> and TS<sub>2</sub> could regulate the infection protecting *Leishmania* parasites from the toxic effects of peroxynitrite and its secondary species.

## Resultados

---

In trypanosomatids, one of the most important mechanisms for detoxification of heavy metals involves the formation of thiol-metal complexes and subsequent extrusion outside cells by ABC transporters. For example, it has been shown that MRPA is able to export  $\text{Sb}^{\text{III}}$  conjugated to trypanothione [38]. For that purpose,  $\text{T(SH)}_2$  donates two hydrogen molecules in order to be conjugated with heavy metals in an oxidized and stable complex  $[\text{SbT(S)}_2]$  [39]. Thus, we have established that *L. major* parasites overexpressing LABCG2 present a lower accumulation of  $\text{Sb}^{\text{III}}$  probably due to the efflux of metal-thiol complexes [15]. Additionally, competition assays in this work have revealed that LABCG2 also interacts specifically with GSSG and  $\text{TS}_2$ , as well as the conjugate methyl-GS. These results support the idea that LABCG2 is able to extrude X-thiol conjugates in order to protect parasites from the harmful action of xenobiotics.

In conclusion, the present work confirms the hypothesis that LABCG2 is an active thiols transporter and, consequently, the first ABC transporter of non-conjugated thiols found in *Leishmania*. These data provide new insights into the biological function of *Leishmania* LABCG2 transporter, revealing a determinant role in the redox metabolism of this parasite and related processes.

## Acknowledgements

We thank Luise Krauth-Siegel (Heidelberg, Germany) for providing  $\text{T(SH)}_2$  used throughout this research work and Ms. Naoko Shiranaga for constructing pVL1392 vectors used in this work. Also, we thank András Váradi (Budapest, Hungary) for helpful advice concerning the heterologous expression in Sf9 cells, ATPase activity and transport in Sf9 vesicles.

## Funding

This work was supported by the Spanish Grants SAF2015-68042-R (to S.C. and F.G.), SAF2012-34267 (to F.G.), by the Proyecto de Excelencia, Junta de Andalucía, Ref. CTS-7282 (to F.G.) and by FEDER funds from the EU to S.C. and F.G. A. Perea was a student of the PhD program “Biochemistry and Molecular Biology” of the University of Granada (Spain) and was supported by a fellowship for predoctoral

contracts for PhD training from the Ministerio de Economía y Competitividad (in charge of Project SAF2012-34267).

### Authors' contributions

FG and SC designed the study and analyzed the results. AP and JIM developed the experiments. YK and KU participated in the generation of plasmid constructions, baculovirus generation and preliminary experiments. AP, JIM and FG wrote the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

### Declaration of interests

The authors declare that they have no competing interests.

### References

1. Flohé, L. (2012) The trypanothione system and its implications in the therapy of trypanosomatid diseases. *Int. J. Med. Microbiol.* **302**(4-5), 216-220
2. Krauth-Siegel, R.L., Leroux, A.E. (2012) Low-molecular-mass antioxidants in parasites. *Antioxid. Redox Signal.* **17**(4), 583-607
3. Brigelius-Flohé, R., Flohé, L. (2011) Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 2335-2381
4. Dassa, E. (2011) Natural history of ABC systems: not only transporters. *Essays in biochemistry.* **50**(1), 19-42
5. Linton, K.J. (2007) Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda).* **22**, 122-130
6. Hopfner, K.P. (2016) Invited review: Architectures and mechanisms of ATP binding cassette proteins. *Biopolymers.* **105**(8), 492-504
7. Campos-Salinas, J., Leon-Guerrero, D., Gonzalez-Rey, E., Delgado, M., Castanys, S., Pérez-Victoria, J.M., Gamarro, F. (2013) LABCG2, a new ABC transporter implicated in phosphatidylserine exposure, is involved in the infectivity and pathogenicity of *Leishmania*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **7**, e2179

## Resultados

---

8. Ballatori, N., Krance, S.M., Marchan, R., Hammond, C.L. (2009) Plasma membrane glutathione transporters and their roles in cell physiology and pathophysiology. *Mol. Aspects Med.* **30**(1-2), 13-28
9. Lee, J.Y., Yang, J.G., Zhitnitsky, D., Lewinson, O., Rees, D.C. (2014) Structural basis for heavy metal detoxification by an Atm1-type ABC exporter. *Science.* **343**(6175), 1133-1136
10. Qiu, W., Liesa, M., Carpenter, E.P., Shirihai, O.S. (2015) ATP Binding and Hydrolysis Properties of ABCB10 and Their Regulation by Glutathione. *PLoS One.* **10**(6), e0129772
11. Schaedler, T.A., Thornton, J.D., Kruse, I., Schwarzländer, M., Meyer, A.J., van Veen, H.W., Balk, J. (2014) A conserved mitochondrial ATP-binding cassette transporter exports glutathione polysulfide for cytosolic metal cofactor assembly. *J. Biol. Chem.* **289**(34), 23264-23274
12. Pittman, M.S., Robinson, H.C., Poole, R.K. (2005) A bacterial glutathione transporter (*Escherichia coli* CydDC) exports reductant to the periplasm. *J. Biol. Chem.* **280**(37), 32254-32261
13. Krzyżanowski, D., Bartosz, G., Grzelak, A. (2014) Collateral sensitivity: ABCG2-overexpressing cells are more vulnerable to oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* **76**, 47-52
14. Brechbul, H.M., Gould, N., Kachadourian, R., Riekhof, W.R., Voelker, D.R., Day, B.J. (2010) Glutathione transport is a unique function of the ATP-binding cassette protein ABCG2. *J. Biol. Chem.* **285**, 16582-16587
15. Perea, A., Manzano, J.I., Castanys, S., Gamarro, F. (2016) The LABCG2 Transporter from the Protozoan Parasite *Leishmania* Is Involved in Antimony Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **60**(6), 3489-3496
16. Manzano, J.I., Garcia-Hernandez, R., Castanys, S., Gamarro, F. (2013) A new ABC half-transporter in *Leishmania major* is involved in resistance to antimony. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**(8), 3719-3730
17. Légaré, D., Richard, D., Mukhopadhyay, R., Stierhof, Y.D., Rosen, B.P., Haimeur, A., Papadopoulou, B., Ouellette, M. (2001). The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J. Biol. Chem.* **276**, 26301-26307



18. Manzano, J.I., Perea, A., León-Guerrero, D., Campos-Salinas, J., Piacenza, L., Castanys, S., Gamarro, F. (2017) *Leishmania* ABCG1 and ABCG2 transporters are involved in virulence and oxidative stress: functional linkage with autophagy. *Parasit. Vectors.* **10**(1), 267
19. Gauthier, C., Ozvegy-Laczka, C., Szakacs, G., Sarkadi, B., Di Pietro, A. (2013) ABCG2 is not able to catalyze glutathione efflux and does not contribute to GSH-dependent collateral sensitivity. *Front. Pharmacol.* **4**, 138
20. Telbisz, A., Özvegy-Laczka, C., Hegedűs, T., Váradi, A., Sarkadi, B. (2013) Effects of the lipid environment, cholesterol and bile acids on the function of the purified and reconstituted human ABCG2 protein. *Biochem. J.* **450**(2), 387-395
21. Comini, M.A., Dirdjaja, N., Kaschel, M., Krauth-Siegel L. R. (2009) Preparative enzymatic synthesis of trypanothione and trypanothione analogues. *Int. J. Parasitol.* **39**(10), 1059-1062
22. Kimura, Y., Kioka, N., Kato, H., Matsuo, M., Ueda, K. (2007) Modulation of drug-stimulated ATPase activity of human MDR1/P-glycoprotein by cholesterol. *Biochem. J.* **401**(2), 597-605
23. Takahashi, K., Kimura, Y., Kioka, N., Matsuo, M., Ueda, K. (2006) Purification and ATPase activity of human ABCA1. *J. Biol. Chem.* **281**(16), 10760-10768
24. Pollock, N.L., McDevitt, C.A., Collins, R., Niesten, P.H., Prince, S., Kerr, I.D., Ford, R.C., Callaghan, R. (2014) Improving the stability and function of purified ABCB1 and ABCA4: the influence of membrane lipids. *Biochim. Biophys. Acta.* **1838**(1 Pt B), 134-147
25. Cortés-Selva, F., Muñoz-Martínez, F., Iliás, A., Jiménez, A.I., Váradi, A., Gamarro, F., Castanys, S. (2005) Functional expression of a multidrug P-glycoprotein transporter of *Leishmania*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **329**(2), 502-507
26. He, S.M., Li, R., Kanwar, J.R., Zhou, S.F. (2011) Structural and functional properties of human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Curr. Med. Chem.* **18**(3), 439-81
27. Forman, H.J., Zhang, H., Rinna, A. (2009) Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.* **30**(1-2), 1-12



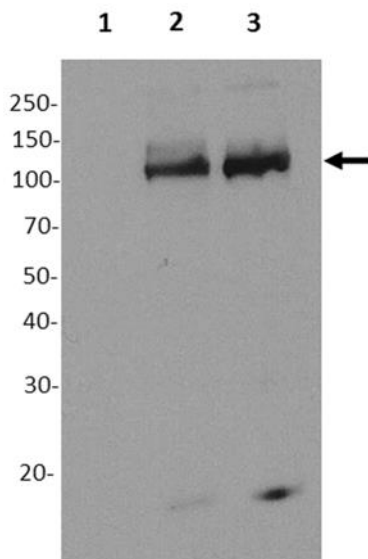
## Resultados

---

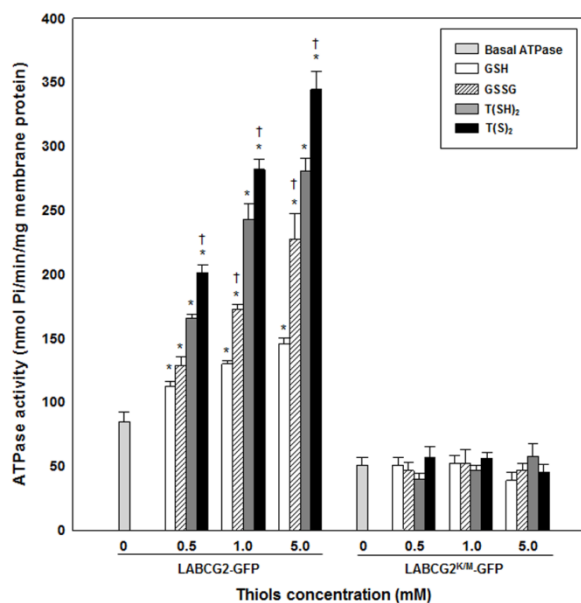
28. Jozefczak, M., Remans, T., Vangronsveld, J., Cuypers, A. (2012) Glutathione is a key player in metal-induced oxidative stress defenses. *Int. J. Mol. Sci.* **13**(3), 3145-3175
29. Trompier, D., Chang, X.B., Barattin, R., du Moulinet D'Hardemare, A., Di Pietro, A., Baubichon-Cortay, H. (2004) Verapamil and its derivative trigger apoptosis through glutathione extrusion by multidrug resistance protein MRP1. *Cancer Res.* **64**(14), 4950-4956
30. Gilibili, R.R., Chatterjee, S., Bagul, P., Mosure, K.W., Murali, B.V., Mariappan, T.T., Mandlekar, S., Lai, Y. (2017) Coproporphyrin-I: A Fluorescent, Endogenous Optimal Probe Substrate for ABCC2 (MRP2) Suitable for Vesicle-Based MRP2 Inhibition Assay. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals.* **45**(6), 604-611
31. Desideri, E., Filomeni, G., Ciriolo, M.R. (2012) Glutathione participates in the modulation of starvation-induced autophagy in carcinoma cells. *Autophagy.* **8**(12), 1769-1781
32. Besteiro, S., Williams, R.A., Morrison, L.S., Coombs, G.H., Mottram, J.C. (2006) Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* **281**(16), 11384-11396
33. Sousa-Franco, J., Araujo-Mendes, E., Silva-Jardim, I., L-Santos, J., Faria, D.R., Dutra, W.O., Horta, M.F. (2006) Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis: possible involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect.* **8**(2), 390-400
34. Piacenza, L., Alvarez, M.N., Peluffo, G., Radi, R. (2009) Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. *Current opinion in microbiology.* **12**(4), 415-421
35. Trujillo, M., Budde, H., Pineyro, M.D., Stehr, M., Robello, C., Flohe, L., Radi, R. (2004) *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* trypanothione peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *J. Biol. Chem.* **279**(33), 34175-34182
36. Alvarez, M.N., Peluffo, G., Piacenza, L., Radi, R. (2011) Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized

- Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *J. Biol. Chem.* **286**(8), 6627-6640
37. Krauth-Siegel, R.L., Bauer, H., Schirmer, R.H. (2005) Dithiol proteins as guardians of the intracellular redox milieu in parasites: old and new drug targets in trypanosomes and malaria-causing plasmodia. *Angewandte Chemie.* **44**(5), 690-715
38. Leprohon, P., Legare, D., Ouellette, M. (2009) Intracellular localization of the ABCC proteins of *Leishmania* and their role in resistance to antimonials. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 2646-2649
39. Yan, S., Ding, K., Zhang, L., Sun, H. (2000) Complexation of Antimony(III) by Trypanothione. *Angew Chem Int.* **39**(23), 4260–4262

### Figures with legends



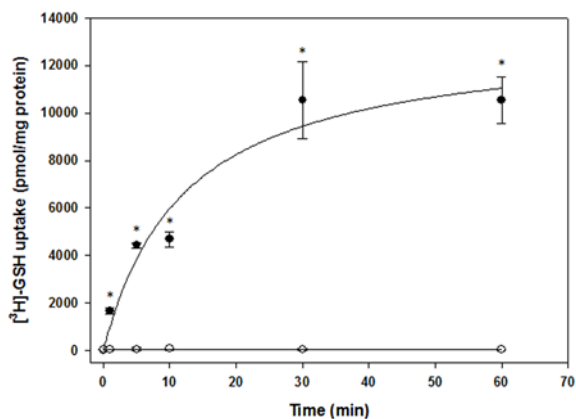
**Figure 1.** Expression of LABCG2-GFP in Sf9 insect cells. Western Blot analysis of isolated Sf9 membrane vesicles expressing LABCG2-GFP and LABCG2<sup>KM</sup>-GFP of *L. major*. Sf9 cells membranes purification and immunodetection with anti-GFP antibody was performed as described in Experimental. Lane 1, uninfected Sf9 cells membranes; lane 2, Sf9 cells membranes expressing LABCG2-GFP; lane 3, Sf9 cells membranes expressing LABCG2<sup>KM</sup>-GFP. Ten  $\mu\text{g}$  of membrane proteins were loaded in each lane. The position of GFP-tagged proteins is marked by an arrow. Western blot assay representative of at least three independent experiments is shown. The positions of molecular markers (kDa) are indicated on the left.



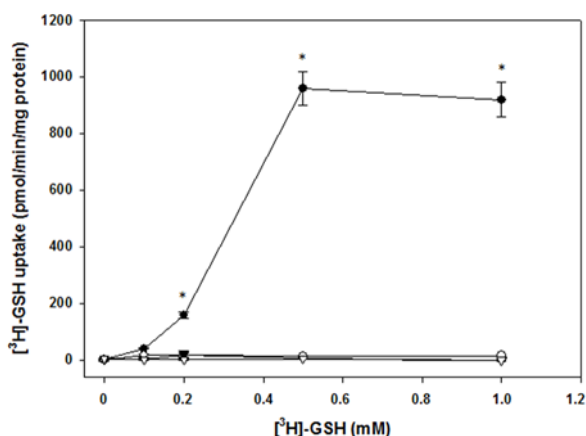
**Figure 2.** Effect of different thiols and disulfides on ATPase activity of LABC2-GFP and LABC2<sup>K/M</sup>-GFP. ATP hydrolysis by Sf9 membrane vesicles expressing LABC2-GFP and LABC2<sup>K/M</sup>-GFP was determined in absence (basal ATPase activity, light grey columns) and presence of 0.5, 1, 5 mM of GSH (white columns), GSSG (striped columns), T(SH)<sub>2</sub> (dark grey columns) and TS<sub>2</sub> (black columns) as previously described in Experimental. Data are the means ± SD of three independent experiments. Statistical differences were determined using the Student's *t* test (\*,  $p < 0.05$  vs basal ATPase activity; †,  $p < 0.05$  vs reduced thiol form).

## Resultados

---



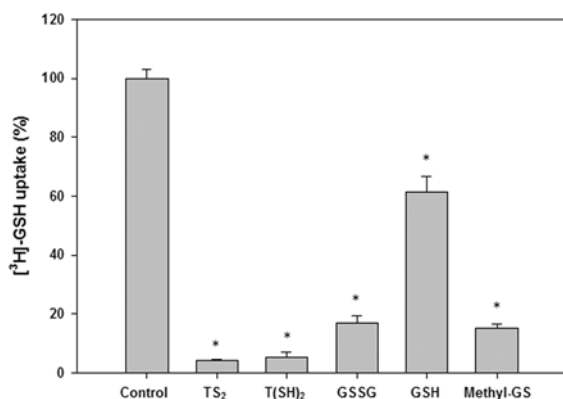
**Figure 3.** Time course of [<sup>3</sup>H]-GSH uptake by membrane vesicles from Sf9 cells expressing LABCG2-GFP. ATP-dependent uptake of 0.5 mM [<sup>3</sup>H]-GSH in Sf9 membrane vesicles expressing LABCG2-GFP was measured in absence (opened circles) or presence (closed circles) of ATP at different time-points as described in Experimental. The first time-point was taken at 1 min. Curve fitting was performed using the Michaelis-Menten equation for the description of a kinetic reaction catalyzed by an enzyme with SigmaPlot program. Data are the means  $\pm$  SD of three independent experiments. Statistical differences relative to the values in absence of ATP were determined using the Student's *t* test (\*,  $p < 0.05$ ).



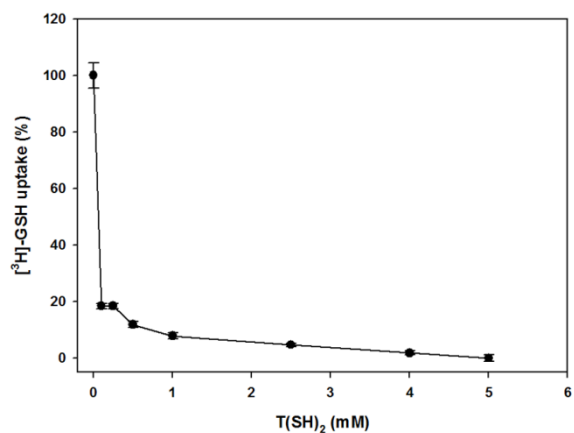
**Figure 4.** Transport of [<sup>3</sup>H]-GSH into Sf9 cells membrane vesicles expressing LABC2-GFP. Uptake of different concentrations of [<sup>3</sup>H]-GSH was measured in Sf9 membrane vesicles expressing LABC2-GFP (circles) or inactive mutant LABC2<sup>K/M</sup>-GFP (triangles) for 30 min in presence (closed) or absence (opened) of ATP as described in Experimental. Data are the means ± SD of three independent experiments. Statistical differences relative to the values in absence of ATP were determined using the Student's *t* test (\*, *p* < 0.05).

## Resultados

---



**Figure 5.** Effect of different thiol derivatives in the uptake of [<sup>3</sup>H]-GSH into Sf9 cells membrane vesicles expressing LABC2-GFP. ATP-dependent uptake of 0.5 mM [<sup>3</sup>H]-GSH for 30 min in Sf9 membrane vesicles expressing LABC2-GFP was measured in presence of 10x the concentration (5 mM) of [<sup>3</sup>H]-GSH of various thiols derivatives [TS<sub>2</sub>, T(SH)<sub>2</sub>, GSSG, GSH or methyl-GS]. Uptake of [<sup>3</sup>H]-GSH in absence of competitors is shown as control. Data are the means ± SD of three independent experiments. Statistical differences relative to the control values were determined using the Student's *t* test (\*, *p* < 0.05).



**Figure 6.** Determination of  $\text{IC}_{50}$  of  $\text{T(SH)}_2$  against GSH uptake. Uptake of 0.5 mM  $[^3\text{H}]\text{-GSH}$  in Sf9 membrane vesicles expressing LABCG2-GFP was measured in presence of different concentrations of  $\text{T(SH)}_2$  for 30 min. Initial concentration of  $\text{T(SH)}_2$  was 0.1 mM. Data are the means  $\pm$  SD of three independent experiments.





**DISCUSIÓN**



---

## DISCUSIÓN

Los transportadores ABC representan una de familias más amplias que existen con representantes en todos los organismos desde procariotas a humanos. La familia de transportadores ABC en *Leishmania* incluye 42 genes distribuidos en 9 subfamilias, de la A a la I, algunos de ellos con funciones biológicas relevantes.

En esta tesis hemos enfocado nuestro interés en la subfamilia ABCG, half-transporters que necesitan homo o heterodimerizar para generar una proteína activa. Diversos estudios han profundizado en la funcionalidad de la subfamilia ABCG en *Leishmania*, la cual contiene miembros relacionados con la resistencia a fármacos y la translocación de fosfolípidos e infectividad (Campos-Salinas J et al. 2013; Castanys-Muñoz E et al. 2007; Castanys-Muñoz E et al. 2008).

Trabajos anteriores de nuestro grupo han demostrado que el transportador LABCG2 está implicado en la exposición de fosfatidilserina (PS) en la cara externa de la membrana plasmática de *Leishmania*, factor requerido para la infección del macrófago (Campos-Salinas J et al. 2013; Wanderley JL et al. 2006). Existen otros transportadores de la familia ABCG de *Leishmania*, como ABCG4 y ABCG6 que están implicados en el transporte de fosfolípidos (en concreto análogos de fosfatidilcolina) (Castanys-Muñoz E et al. 2007; 2008). Por otro lado, se ha observado que la sobreexpresión de ABCG4 en *Leishmania* confiere resistencia a sitamaquina y a los alquilfosfolípidos miltefosina, edelfosina y perifosina (Castanys-Muñoz E et al. 2007). La sobreexpresión de ABCG6 en *Leishmania* también confiere resistencia a los alquilfosfolípidos citados, además de a sitamaquina, cloroquina, camptotecina y mefloquina (Castanys-Muñoz E et al. 2008).

Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos comprobar si el transportador **LABCG2 tenía también implicación en la resistencia a fármacos en *Leishmania***. Los estudios experimentales realizados han demostrado, que la sobreexpresión de LABCG2 en los promastigotes de *Leishmania* generaba resistencia al antimonio ( $Sb^{III}$ ) y en menor medida al arsenito ( $As^{III}$ ). Las formas amastigotes también

## Discusión

---

presentaron resistencia a  $Sb^{III}$  y a estibogluconato sódico ( $Sb^V$ ), uno de los fármacos leishmanicidas más empleados.

Estos datos sugieren que dichos iones metálicos podrían ser sustratos del transportador LABCG2 de *Leishmania*. Hasta la fecha, no se han descrito otros transportadores ABCG que confieran resistencia a  $Sb^{III}$  o  $As^{III}$ , aunque si a otros metales como es el caso de los transportadores AtPDR8 de *Arabidopsis thaliana* o ABCG43 de *Oryza sativa*, que confieren resistencia a cadmio (Kim DY et al. 2007; Oda K et al. 2011). En *Leishmania*, existen otros transportadores ABC relacionados con la resistencia a antimonio; entre ellos MRPA (ABCC3/PGPA) y ABCI4 confieren resistencia tanto a  $Sb^{III}$  como a  $Sb^V$  (El Fadili K et al. 2005; Manzano JI et al. 2013), y se ha demostrado que la sobreexpresión del transportador ABCC7 de *Leishmania* genera también resistencia a  $Sb^{III}$  (Leprohon P et al. 2009). Los niveles de resistencia alcanzados por los parásitos que sobreexpresaban LABCG2 (7,4 veces más que la línea control) fueron mayores que los obtenidos con los transportadores anteriormente citados. En concreto, está descrito que los promastigotes de *Leishmania* transfectados con ABCI4 y MRPA son aproximadamente 2,5 veces más resistentes a  $Sb^{III}$ , y 1,7 veces en el caso de ABCC7 (Leprohon P et al. 2009). Sin embargo, un segundo evento de transfección en *Leishmania* con el transportador LABCG2 mostró unos niveles de resistencia a  $Sb^{III}$  menores (2,7 veces) debido a variaciones en los niveles de expresión de la proteína, dado que hemos observado que existe una correlación entre el nivel de expresión de LABCG2 y la resistencia al antimonio. Por otro lado, la sobreexpresión de LABCG2 no afectó a la sensibilidad a otros metales pesados como  $Cd^{II}$ ,  $Co^{II}$  y  $Cu^{II}$ . Contrariamente a lo observado para otros miembros de la subfamilia ABCG de *Leishmania* como ABCG4 y ABCG6, la sobreexpresión de LABCG2 no generó resistencia a miltefosina, perofosina ni a las aminoquinolinas sitamaquina y cloroquina (Castanys-Muñoz E et al. 2007; Castanys-Muñoz E et al. 2008).

Como se ha mencionado con anterioridad, uno de los mecanismos más frecuentes de resistencia a fármacos en *Leishmania* consiste en la disminución intracelular del fármaco mediante (i) un incremento en el eflujo del mismo al medio extracelular o (ii) una reducción de su entrada. En cuanto a la entrada, la única proteína conocida que

transporta  $\text{Sb}^{\text{III}}$  al interior de *L. major* es la aquagliceroporina (AQP1) (Gourbal B et al, 2004; Uzcategui NL et al. 2008). De hecho, en varias cepas de *Leishmania*, una disminución en su expresión está relacionada con una menor acumulación de antimonio y consecuente una resistencia a este fármaco (Marquis N et al. 2005). Para el tratamiento de la leishmaniasis se emplean fármacos basados en  $\text{Sb}^{\text{V}}$ . Este compuesto debe reducirse a  $\text{Sb}^{\text{III}}$  para ser activo contra los parásitos. Sin embargo, el mecanismo por el cual ocurre esta reacción no está completamente claro. Por un lado, se ha observado que el GSH provoca la conversión de  $\text{Sb}^{\text{V}}$  a  $\text{Sb}^{\text{III}}$  en el fagolisosoma de los macrófagos (Frezard F et al. 2001). Al parecer, esta reacción también puede darse en el interior del parásito, ya que se ha descrito que la reductasa dependiente de tiol (TDR1) y la arsenato reductasa (ACR2) de *Leishmania* son capaces de reducir  $\text{Sb}^{\text{V}}$  a  $\text{Sb}^{\text{III}}$  (Denton H et al. 2004; Zhou Y et al. 2004), aunque se desconoce la ruta de entrada al parásito del  $\text{Sb}^{\text{V}}$ . Según los resultados expuestos en esta tesis doctoral, la resistencia a  $\text{Sb}^{\text{III}}$  en *Leishmania* se debe a una menor acumulación de este compuesto provocada por un mayor eflujo del mismo al exterior celular mediado por LABCG2. Existen miembros de la subfamilia ABCC de eucariotas que están implicados en la resistencia a  $\text{Sb}^{\text{III}}$  y  $\text{As}^{\text{III}}$  mediante el secuestro de estos iones metálicos en el interior de vesículas o bien mediante su eflujo al exterior celular (Maciaszczyk-Dziubinska E et al. 2012). Por ejemplo, se ha descrito que los transportadores ABCC1 y ABCC2 de *A. thaliana* median la translocación de complejos  $\text{As}(\text{III})$ -Fitoquelatinas del citosol a la vacuola (Maciaszczyk-Dziubinska E et al. 2012). MRPA es uno de los transportadores ABC de *Leishmania* más conocidos por su implicación en la resistencia al antimonio mediante el secuestro de conjugados tiol- $\text{Sb}^{\text{III}}$  o tiol- $\text{As}^{\text{III}}$  en el interior de vesículas cercanas al bolsillo flagelar (Légaré D et al. 2001).

Estudios previos de microscopía de fluorescencia realizados por nuestro grupo han demostrado que LABCG2 colocaliza parcialmente con el marcador endosomal FM4-64 en *L. major*, sugiriendo que dicho transportador está localizado principalmente en vesículas de la ruta endocítica de *Leishmania* (Campos-Salinas J et al. 2013). En este trabajo de tesis se han llevado a cabo ensayos de biotilación que han permitido demostrar la presencia de parte de la proteína LABCG2 en la membrana plasmática del parásito. Estos resultados apoyan la hipótesis de que LABCG2 está

## Discusión

---

localizado en vesículas intracelulares que se fusionarían con la membrana plásmática del parásito para liberar su contenido al medio extracelular (Fig. D-1). De forma similar, se ha descrito la presencia del transportador ABCI4 en la membrana plasmática de *Leishmania* mediante ensayos de biotinylación, pero al contrario que LABCG2, ABCI4 no parece encontrarse en vesículas, sino que presenta una localización dual en mitocondria y membrana plasmática (Manzano JI et al. 2013).

El nivel de eflujo de  $Sb^{III}$  obtenido para los parásitos que sobreexpresaban LABCG2 resultó ser más bajo que el observado para otros transportadores de tipo MDR (Messaritakis I et al. 2013; Rai S et al. 2013), pero ligeramente mayor que el observado con MRPA (Callahan HL et al. 1994). Este hecho sugiere un mecanismo de acción similar entre MRPA y LABCG2, en el que el  $Sb^{III}$  sería secuestrado en vesículas y posteriormente eliminado fuera de la célula. Teniendo en cuenta que el eflujo de complejos metal-tiol al exterior celular es uno de los mecanismos de resistencia a  $Sb^{III}$  en *Leishmania* (Leprohon P et al. 2009; Manzano JI et al. 2013), quisimos comprobar si los tioles estaban implicados en el eflujo de  $Sb^{III}$  mediado por LABCG2.

Efectivamente, la presencia de  $Sb^{III}$  demostró un incremento del eflujo de tioles al medio por parte de parásitos que sobreexpresaban LABCG2, lo cual apoya la hipótesis de que este transportador podría exportar complejos  $Sb^{III}$ -tiol. Sin embargo, no podemos descartar que se produzca un cotransporte de ambos en lugar de un transporte de conjugados. Por otro lado, comprobamos que la inhibición de la síntesis de tioles mediante BSO (butionina sulfoximida) revirtió la resistencia a  $Sb^{III}$ , lo que nos indicaba la existencia de una dependencia directa entre tioles y  $Sb^{III}$  para que se produzca resistencia al fármaco. Por lo tanto, podemos afirmar que la presencia de tioles en el interior del parásito es determinante en la resistencia a  $Sb^{III}$  en parásitos que sobreexpresan LABCG2, probablemente debido al eflujo de aductos metal-tiol a través de este transportador, al igual que se ha descrito para MRPA (Légaré D et al. 2001) y se ha sugerido para ABCI4 (Manzano JI et al. 2013) en *Leishmania*.

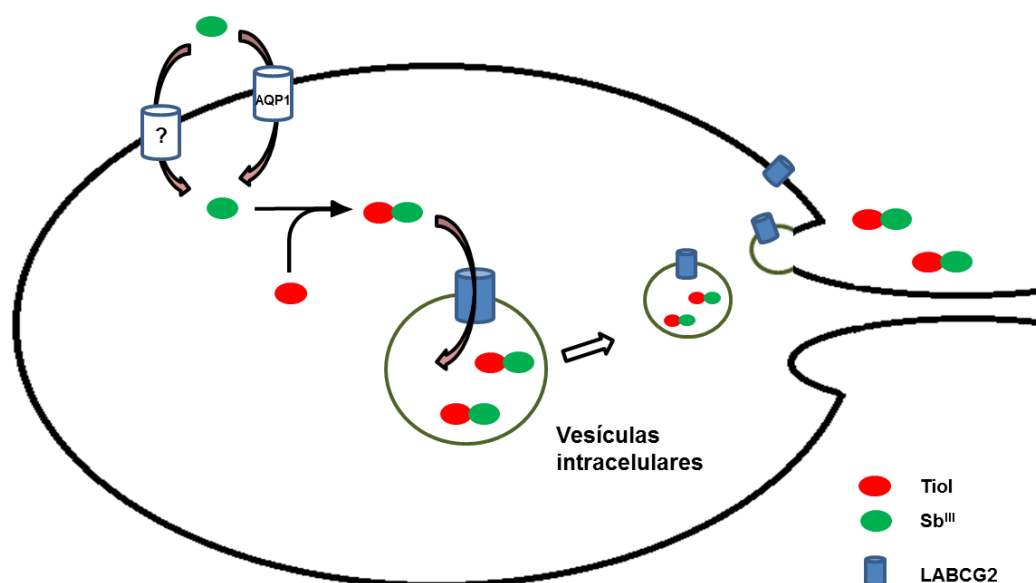


Figura D-1: Implicación de LABC2 en la resistencia a Sb<sup>III</sup>.

MRPA es un transportador que está reconocido como un marcador de resistencia a antimonio en *Leishmania*, puesto que se ha detectado su amplificación en aislados derivados de pacientes resistentes a antimoniales (Mukherjee A et al. 2007). Sin embargo, como se ha descrito para ABCI4 (Manzano JI et al. 2013), el transportador LABC2 no se ha detectado como marcador de resistencia a antimonio en estudios basados en técnicas “ómicas” a nivel de genoma y transcriptoma. Es importante señalar que los mecanismos de resistencia en parásitos son de carácter heterogéneo, incluyendo variaciones en los niveles de expresión de las diferentes proteínas implicadas según la línea de *Leishmania* estudiada. De hecho, por ahora no se ha definido un patrón consenso para la identificación de marcadores de resistencia a antimonio en *Leishmania* (Decuypere S et al. 2012). La resistencia a antimonio se considera como un proceso multifactorial (Frézard F et al. 2014). Como se ha mencionado con anterioridad, varios transportadores ABC, así como sus niveles de expresión parecen estar implicados en el desarrollo de resistencia al antimonio (Leprohon P et al. 2009; Manzano JI et al. 2013). Adicionalmente, la implicación del metabolismo de los tioles en la eliminación del fármaco añade otro factor importante, que a su vez participa en diversos procesos biológicos del parásito. Por ejemplo, los niveles intracelulares de tioles determinan la capacidad del



## Discusión

---

parásito para defenderse frente al estrés oxidativo (Krauth-Siegel RL y Leroux EA. 2012) originado durante la infección del huésped y son decisivos a la hora de desencadenar procesos como la autofagia (Filomeni G et al. 2010).

Curiosamente, los parásitos que sobreexpresaban LABCG2 presentaron un eflujo de tioles significativo en ausencia de Sb<sup>III</sup>, sugiriendo que existe cierto transporte de tioles no conjugados. El hecho de que estos parásitos tengan unos niveles de tioles totales menores que la línea control apoya esta hipótesis.

Como se ha descrito a lo largo de la presente tesis doctoral, LABCG2 parece jugar un papel importante en la infectividad de *Leishmania* debido a su capacidad de exponer PS en la cara externa de la membrana plasmática. Parásitos que expresan una versión mutada no funcional de LABCG2 (Campos-Salinas J et al. 2013), así como parásitos mutantes nulos para LABCG1 y LABCG2 ( $\Delta$ LABCG1-2) presentan una acumulación de PS significativamente mayor que los controles. Por un lado, este resultado apoya que LABCG1 y LABCG2 tienen una función similar en *Leishmania* debido a su elevado porcentaje de similitud aminoacídica (93%) y por otro, confirma su actividad flopasa para el fosfolípido PS (Manzano JI et al. 2017- Resultados defendidos en la Tesis Doctoral de David León, 2016, Universidad de Granada).

En base a estos resultados, decidimos analizar en profundidad la **implicación del transportador LABCG2 en la infectividad y virulencia** de *Leishmania* utilizando para ello la línea de parásitos mutantes nulos para LABCG1 y LABCG2. Tanto el porcentaje de infección como el número de amastigotes intracelulares por macrófago infectado fue menor que en los controles utilizados, aunque estos fueron viables y capaces de replicarse a lo largo del tiempo. Además, un modelo murino de leishmaniasis cutánea demostró que la carencia de LABCG1 y LABCG2 en los parásitos provocaba una menor inflamación y desarrollo de lesiones, confirmando que estos transportadores juegan un papel importante en el desarrollo de la enfermedad (Fig. D-2).

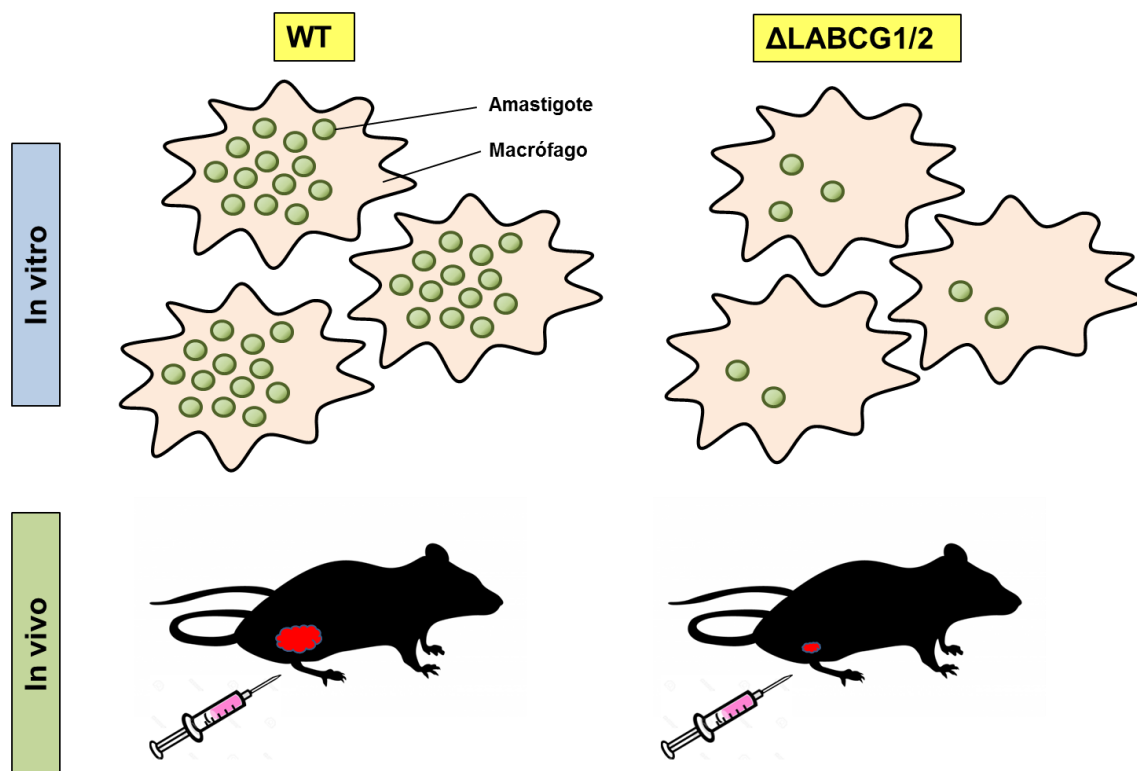


Figura D-2: Representación esquemática de la infectividad y virulencia de los parásitos  $\Delta$ LABCG1-2.

Como se ha citado en el apartado de Introducción, para adquirir la infectividad, los promastigotes de *Leishmania* deben desarrollar una serie de cambios morfológicos y metabólicos conocidos como metaciclogénesis (Sacks DL et al. 1989; Ouakad M et al. 2011). Se ha descrito que promastigotes mutantes nulos para LABCG1 y LABCG2 carecen de algunas de las características que implican haber sufrido el proceso de metaciclogénesis (Manzano JI et al. 2017-Resultados defendidos en la Tesis Doctoral de David León, 2016, Universidad de Granada). En concreto, sólo un bajo porcentaje de parásitos no terminaron aglutinados en presencia de PNA (Lectina que se une a los LPG de las formas promastigotas no metacíclicas de *Leishmania*). Adicionalmente, el mismo trabajo defiende que estos parásitos son más sensibles a la lisis mediada por complemento en fase estacionaria, aunque por el contrario sí expresan la proteína específica de metacíclicos HASPB (Manzano JI et al. 2017-Resultados defendidos en la Tesis Doctoral de David León, 2016, Universidad de Granada). La proteína HASPB se considera un marcador del estadio infectivo de *Leishmania*, puesto que se ha demostrado que se expresa únicamente

## Discusión

---

en parásitos metacíclicos (Sadlova J et al. 2010). Otra de las transformaciones que sufre *Leishmania* durante la metacicloogénesis incluye variaciones estructurales en la composición, estructura y longitud de los LPG, puesto que estos polisacáridos están íntimamente relacionados con la virulencia del parásito (Sacks DL. 1992; Naderer T et al. 2004). Los LPG confieren resistencia al complemento, protegen al parásito frente al estrés oxidativo e inhiben temporalmente la fusión de los fagosomas con el lisosoma dando tiempo a los amastigotes intracelulares a adaptarse al cambio ambiental (Moradin N y Descoteaux A. 2012; Späth GF et al. 2003; Holm A et al. 2001). Teniendo en cuenta la baja virulencia en los parásitos  $\Delta$ LABCG1-2, su sensibilidad a la lisis mediada por complemento y el reducido número de formas metacíclicas purificadas, decidimos analizar la expresión de los LPG en estos parásitos. Ninguno de los anticuerpos empleados para el reconocimiento de distintas zonas de los LPG detectó la presencia de los mismos. Sin embargo, dado que los parásitos  $\Delta$ LABCG1-2 se aglutinaban en presencia de PNA, no puede ser debido a la falta de LPG. Es posible que LABCG2 esté implicado en el transporte intravesicular de oligosacáridos, y que su falta afecte a la composición de los LPG y a procesos asociados a los mismos. Hasta la fecha, no se han descrito otros transportadores ABC de *Leishmania* implicados en metacicloogénesis o modificación de la composición de los LPG. Curiosamente, a pesar de los fenotipos observados en los parásitos  $\Delta$ LABCG1-2 que apuntan a un defecto en la metacicloogénesis, se ha observado que dichos parásitos expresan correctamente la proteína específica de metacíclicos HASPB (Manzano JI et al. 2017-Resultados defendidos en la Tesis Doctoral de David León, 2016, Universidad de Granada), sugiriendo que la expresión de esta proteína no es suficiente para conferir un carácter infectivo. Al igual que se ha descrito para la línea mutante de *L. major* VPS4, es probable que el ensamblaje de los LPG se produzca por una ruta independiente a otras proteínas específicas de metacíclicos como HASPB (Besteiro S et al. 2006).

La metacicloogénesis es un proceso de diferenciación celular que requiere de la implicación del mecanismo de autofagia para reciclar componentes citoplásmicos con el objetivo de remodelar la morfología celular y la maquinaria metabólica (Brennan A et al. 2012; Besteiro S et al. 2007).

Considerando que los parásitos  $\Delta$ LABCG1-2 tienen alterada la metacicloogénesis, quisimos comprobar si existía alguna modificación en el proceso de autofagia. Los resultados obtenidos desvelaron que el porcentaje de parásitos  $\Delta$ LABCG1-2 con autofagosomas era significativamente más bajo en comparación con la línea control. En *Leishmania*, el anclaje de ATG8 lipidado con fosfatidiletanolamina (ATG8-PE) es clave para la formación y expansión del fagóforo (Williams RA et al. 2012). Sin embargo, se ha observado que la línea  $\Delta$ LABCG1-2 presentaba una proporción elevada de ATG8 no lipidado, indicativo de una disminución en la biogénesis de los autofagosomas. Se ha descrito previamente que la mutación del ATG4.2 de *Leishmania*, implicado en la liberación de ATG8 del autofagosoma para que pueda llevarse a cabo el procesamiento del mismo por el lisosoma, afecta a la diferenciación del parásito (Besteiro S et al. 2006). El mismo trabajo afirma que el bloqueo de la ATPasa VPS4 que está relacionada con la formación de endosomas tardíos, impide el procesamiento de los autofagosomas y altera la metacicloogénesis (Besteiro S et al. 2006). Estos resultados corroboran que el proceso de autofagia es clave para la diferenciación celular en *Leishmania*.

De esta forma, nuestros datos sugieren que los parásitos que carecen de LABCG1-2 presentan un defecto en la autofagia, inhabilitando el mecanismo de metacicloogénesis y consecuentemente disminuyendo la virulencia del parásito (Fig. D-3).

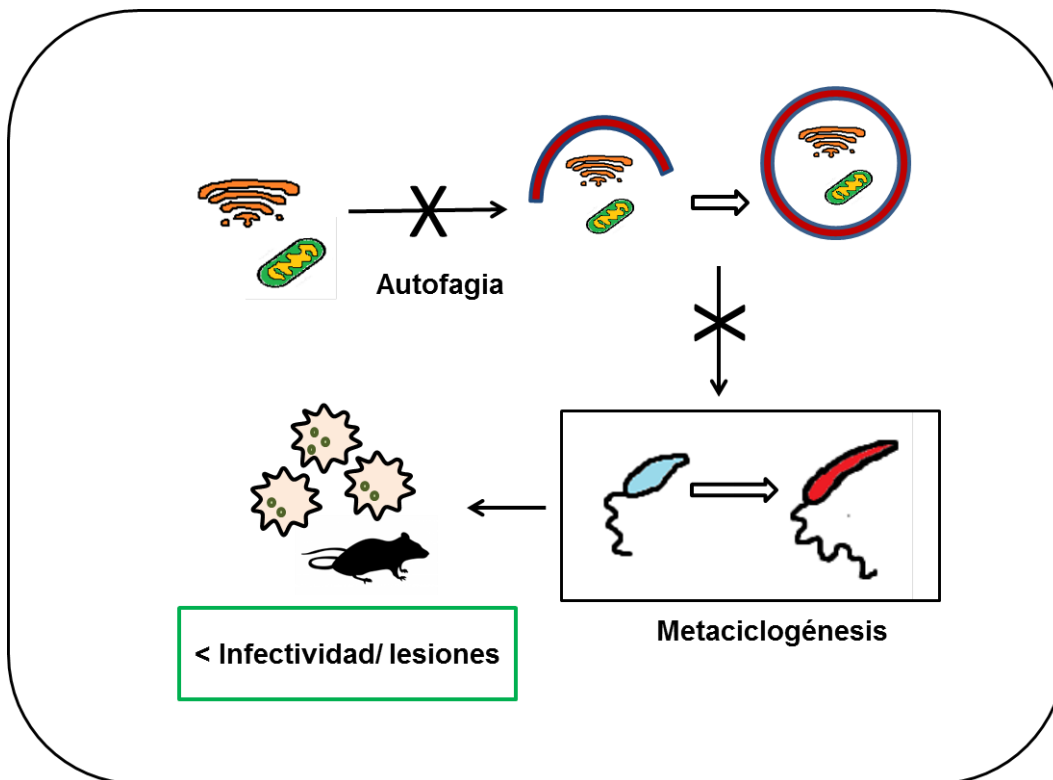


Figura D-3: Autofagia e infectividad en los parásitos  $\Delta$ LABC $G1-2$ .

En *Leishmania*, existe un estricto equilibrio de las reacciones de óxido reducción basado en el metabolismo de los tioles, cuya alteración puede afectar gravemente a la supervivencia del parásito. Uno de los factores capaces de desencadenar el proceso de autofagia es precisamente el desbalance redox (Filomeni G et al. 2010). Por ejemplo, se ha descrito que la alteración del ratio GSH/GSSH provocado por el eflujo de GSH al medio extracelular mediado por ABCC1 induce autofagia en células tumorales (Desideri E et al. 2012).

A lo largo de esta tesis, hemos observado que los parásitos que sobreexpresan LABC $G2$  presentaban un menor contenido intracelular de tioles que la línea control. Consecuentemente, se detectó un incremento significativo de los niveles de tioles en los parásitos  $\Delta$ LABC $G1-2$  que coincidía con una baja formación de autofagosomas. La disminución de los niveles de tioles mediante el tratamiento con BSO (inhibidor de la  $\gamma$ -GCS) incrementó el número de células con autofagosomas, demostrando que existe una relación directa entre autofagia y tioles. En conjunto, todos estos

resultados sugieren que la disminución de los niveles de tioles en *Leishmania* induce autofagia, y que el transportador ABCG2 está implicado en este proceso mediante el eflujo de los mismos al medio extracelular (Fig. D-4). De forma similar, se ha sugerido que el transportador ABCG2 humano está relacionado con el desarrollo de autofagia a través del transporte de GSH (Ding R et al. 2016).

Considerando que los parásitos  $\Delta$ LABCG1-2 presentaban más del doble de contenido intracelular de tioles que el resto de las líneas estudiadas, siendo GSH y T(SH)<sub>2</sub> las principales moléculas acumuladas, nos dispusimos a purificar la proteína ABCG2 para su reconstitución en proteolipasomas con el objetivo de esclarecer su papel en el transporte de tioles no proteicos.

Tras sucesivos intentos, realizamos la purificación de la proteína ABCG2 mediante su expresión en células Sf9 y posterior solubilización con distintos detergentes (CHAPS, CYMAL6, octilglucósido, tritón X-100, entre otros). Pese a que el mejor resultado de solubilización se obtenía mediante el uso de Foscolina 14 (70% de proteína solubilizada), la proteína mantenía su estado dimérico pero se inactivaba completamente probablemente debido a su similitud con la PS, componente de la membrana plasmática translocado por ABCG2 (Campos-Salinas J et al. 2013) (resultados no presentados). Por lo tanto, decidimos solubilizar ABCG2 con DDM. Observamos que la adición de L-Arginina mejoraba significativamente la cantidad de proteína solubilizada (resultados no presentados). De hecho, se ha descrito con anterioridad que la adición de L- Arginina mejora la recuperación de la proteína interferón- $\gamma$  solubilizada con urea (Tsumoto K et al. 2004).

Sin embargo, los eluidos que contenían la proteína ABCG2 purificada no fueron completamente puros (resultados no presentados), por lo que decidimos emplear alternativamente vesículas de membranas de células de insecto Sf9 como sistema de expresión heterólogo de ABCG2. Este sistema se ha utilizado de forma satisfactoria para el estudio de la actividad de otros transportadores ABC de humanos (Sarkadi B et al. 1992; Ozvegy C et al. 2001; Ishikawa T et al. 2003) y *Leishmania* (Cortés-Selva F et al. 2005). Las membranas de células Sf9 que expresaban ABCG2 presentaron una mayor actividad ATPasa basal que las membranas que expresaban la versión mutada de la proteína, validando la correcta

## Discusión

---

expresión y funcionalidad del transportador. Adicionalmente, todos los tioles y disulfuros testados [GSH, GSSG, T(SH)<sub>2</sub> y TS<sub>2</sub>] estimularon la actividad ATPasa basal de LABCG2. Sin embargo, las formas oxidadas GSSG y TS<sub>2</sub> produjeron una estimulación mayor que sus formas reducidas GSH y T(SH)<sub>2</sub>. Este fenómeno no es un caso aislado. Se ha observado que en células de mamífero, MRP1 presenta una mayor afinidad por GSSG que por GSH (He SM et al. 2011). Adicionalmente, está descrito que GSH pero no GSSG estimula la actividad ATPasa de los transportadores ABC Atm1 y Atm3 de levaduras y plantas respectivamente (Schaedler TA et al. 2014). Sin embargo, en este último caso, las diferencias observadas entre la estimulación generada por la forma oxidada y la reducida fueron mayores que las obtenidas para el transportador LABCG2 (Schaedler TA et al. 2014). Es importante señalar que la actividad ATPasa de LABCG2 era estimulada específicamente por TS<sub>2</sub> y T(SH)<sub>2</sub>, lo cual es consecuente con el hecho de que el metabolismo redox de los tripanosomátidos está basado en el TSH<sub>2</sub> en vez del GSH (Krauth-Siegel RL y Leroux AE. 2012 ).

En mamíferos, las reacciones del metabolismo redox dependen principalmente del GSH y la tioredoxina (Brigelius-Flohé R y Flohé L. 2011). El tripéptido GSH participa en numerosas vías de señalización como por ejemplo en la regulación de la división celular y la apoptosis (Forman HJ et al. 2009). Además, juega un papel crítico protegiendo a las células del estrés oxidativo, la toxicidad de xenobióticos y metales pesados además de mantener el equilibrio redox (Forman HJ et al. 2009). Hasta la fecha, solo unas pocas proteínas, incluyendo los transportadores ABC, han demostrado su habilidad para transportar GSH o conjugados con GSH a través de las membranas biológicas. Una de esas proteínas es el transportador MRP1 el cual en células de mamíferos transporta GSH al ser estimulado por verapamil (Loe DW et al. 2000). También hay estudios que señalan al transportador ABCG2 humano como un transportador de GSH (Krzyzanowski D et al 2014; Brechbuhl HM et al. 2010). Sin embargo, hay discrepancias en relación con este resultado, ya que otros autores afirman que ABCG2 no es capaz de transportar GSH (Gauthier C et al. 2013).

En este trabajo de tesis hemos observado que LABCG2 promueve la acumulación de GSH en vesículas de membranas de forma dependiente de ATP. Hasta ahora, no

se han descrito otros transportadores ABC en tripanosomátidos con la capacidad de transportar tioles no conjugados, por lo que **LABCG2 puede ser considerado como el primer transportador de GSH en *Leishmania* y otros tripanosomátidos**. Es probable que este transportador esté implicado en mantener la homeostasis redox del parásito, la cual, como ya se ha mencionado, es un factor clave para el funcionamiento de procesos celulares esenciales y para la protección frente al estrés oxidativo. Adicionalmente, es posible que la función de LABCG2 en la resistencia a  $Sb^{III}$  en *Leishmania* sea un efecto secundario de su papel biológico como transportador de tioles, confiriendo así una ventaja adicional al parásito.

En esta tesis se ha demostrado que parásitos mutantes nulos para LABCG2 acumulaban  $T(SH)_2$  y GSH, aunque, debido a que la metodología empleada incluye la reducción de todos los tioles presentes, no podemos descartar que dichos parásitos también acumulen GSSG y  $TS_2$ . En consonancia, los experimentos de competición con  $[^3H]$ -GSH demostraron que LABCG2 presentaba una mayor afinidad por  $T(SH)_2$  y  $TS_2$  que por el resto de tioles testados. A su vez, LABCG2 se unió preferencialmente a GSSG y al conjugado Metil-GS frente a GSH, confirmando los resultados obtenidos para la estimulación de la actividad ATPasa.

El eflujo de tioles reducidos a través de LABCG2 podría estar ayudando a mantener un nicho reducido para contrarrestar el estrés oxidativo existente en el interior del macrófago. De hecho, el  $T(SH)_2$  es capaz de neutralizar el óxido nítrico de manera más eficiente que el GSH, formando complejos con hierro inocuos para el parásito (Krauth-Siegel RL y Leroux AE. 2012). De la misma forma, los tioles conjugados con óxido nítrico del interior del parásito podrían ser exportados al exterior para defender al parásito frente al estrés oxidativo. Un comportamiento similar se ha sugerido para el transportador ABCG2 humano (Brechbuhl HM et al. 2010). En células madre, el ambiente redox es decisivo a la hora de diferenciarse a un tipo celular o mantenerse en un estado de autorenovación, por lo que el eflujo de GSH por medio de ABCG2 podría definir el nicho y por lo tanto el desarrollo de la célula (Brechbuhl HM et al. 2010). Hay estudios que defienden que los amastigotes intracelulares de *L. guyanensis* mueren en el interior de macrófagos de ratón, debido a un proceso de apoptosis mediada por un incremento en los niveles de ROS durante la infección



## Discusión

---

(Sousa-Franco J et al. 2006). De esta forma, la disminución de los niveles de ROS producida por la acción de los tioles del parásito podría dificultar la apoptosis mediada por ROS en los macrófagos huésped, protegiendo el habitat de los amastigotes intracelulares.

Se ha demostrado en células de mamíferos que la disminución de los niveles de tioles debido al eflujo de GSH por MRP1 conduce a un ambiente celular oxidativo que desencadena la autofagia (Desideri E et al. 2012). En conjunto, los resultados presentados sugieren que en *Leishmania*, el transportador LABCG2 podría estar implicado en la generación de las condiciones de oxidación necesarias para llevar a cabo el proceso de autofagia mediante el eflujo de GSH y T(SH)<sub>2</sub> al exterior celular, provocando la diferenciación de los parásitos a formas promastigotes infectivos. Adicionalmente, LABCG2 parece estar implicado en la detoxificación de metales pesados mediante la expulsión de complejos tiol-Sb<sup>III</sup>. Se ha observado que en *Leishmania* MRPA es capaz de transportar Sb<sup>III</sup> conjugado con tripanotión (Leprohon P et al. 2009), el cual cede dos moléculas de hidrógeno para dar lugar a un complejo oxidado y estable [SbT(S)<sub>2</sub>] (Yan S et al. 2000). Hemos demostrado que LABCG2 interacciona y probablemente transporta las formas oxidadas GSSG y TS<sub>2</sub>, además del complejo Metil-GS, lo cual apoya la idea de que el transportador LABCG2 actúa como una bomba tiol-x protegiendo al parásito de la acción de sustancias exógenas dañinas (Fig. D-4). Sin embargo, es cierto que no tenemos evidencias experimentales directas sobre la capacidad de LABCG2 para transportar complejos Sb<sup>III</sup>-tiol. Se ha descrito con anterioridad la obtención de este tipo de conjugados *in vitro* mediante la mezcla equimolar de tripanotión con As<sup>III</sup> (Mukhopadhyay R et al. 1996). Dado que la totalidad del Sb<sup>III</sup> no reacciona con todos los tioles presentes, sería necesario analizar de forma precisa el porcentaje de complejos formados así como de tioles y Sb<sup>III</sup> libres. Adicionalmente, sabemos que LABCG2 es capaz de transportar tioles libres además de posiblemente el complejo Sb<sup>III</sup>-tiol, lo que dificultaría la interpretación de los resultados. No obstante, los resultados presentados en esta tesis doctoral, en conjunción con los datos previos observados en otros transportadores ABC, apoyan la idea de que LABCG2 sería capaz de transportar conjugados Sb<sup>III</sup>-tiol.

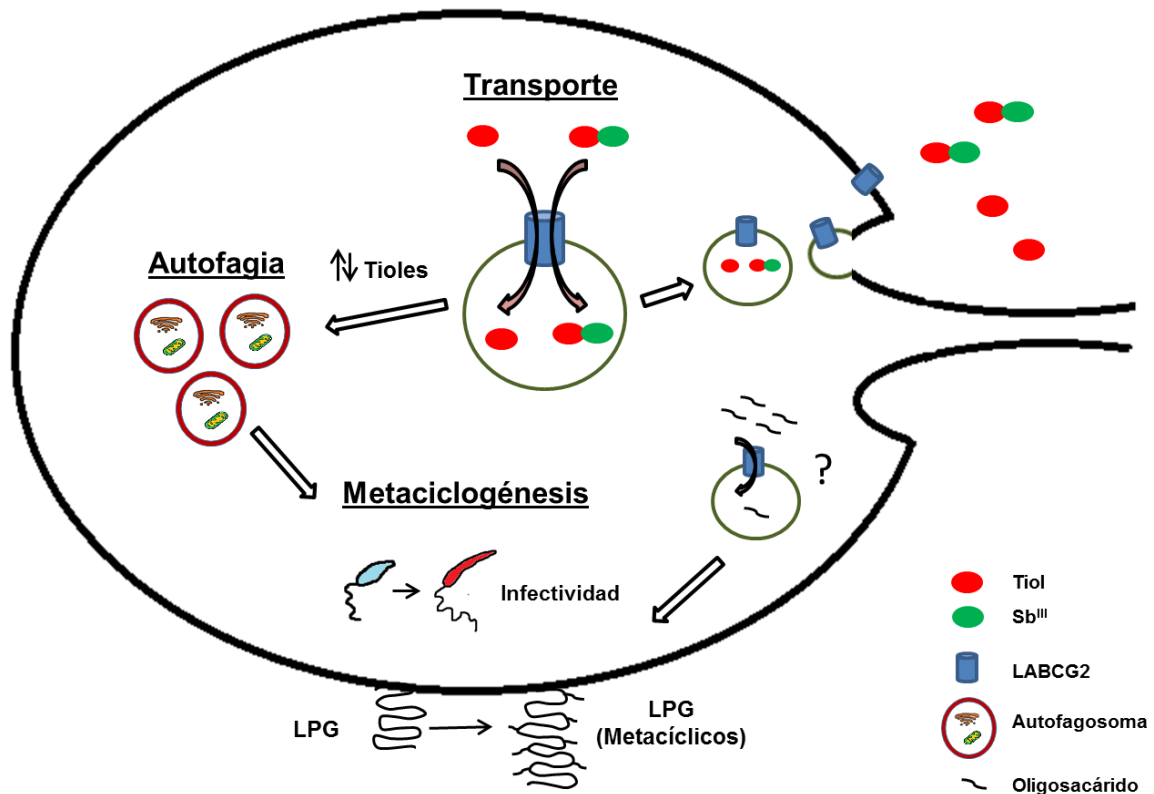


Figura D-4: Representación esquemática de las funciones de LABC2 en *Leishmania*.

## PERSPECTIVAS

Los datos presentados en este trabajo de Tesis Doctoral sugieren que el transportador LABC2 de *Leishmania* se encuentra implicado tanto en la sensibilidad a  $Sb^{III}$ , mediante el transporte de complejos metal-tiol, como en la virulencia del parásito. Por lo tanto, la búsqueda de inhibidores específicos para este transportador podría aportar una herramienta útil para el control de la enfermedad mediante la disminución de la infectividad, virulencia y capacidad del parásito de resistir a fármacos antimoniales. Adicionalmente, el defecto en la composición de los LPG observado en los parásitos mutantes nulos, indica que LABC2 podría estar relacionado con el transporte de oligosacáridos a la membrana plasmática. Futuros estudios estarían enfocados en determinar el tipo de oligosacárido transportado por LABC2.

## Discusión

---

En conjunto, la implicación de este transportador en la resistencia a fármacos, infectividad y supervivencia del parásito convierten a LABCG2 en una posible diana terapéutica de interés para el tratamiento de la leishmaniasis.

**CONCLUSIONES**



## **CONCLUSIONES**

- 1- La sobreexpresión del transportador LABC2 en promastigotes de *Leishmania* confiere resistencia a Sb<sup>III</sup>, existiendo una correlación entre los niveles de expresión de LABC2 y la susceptibilidad a Sb<sup>III</sup>. La resistencia a Sb<sup>III</sup> se observa también en los amastigotes intracelulares que presentan además resistencia a Sb<sup>V</sup>.
- 2- La resistencia a antimonio mediada por LABC2 se debe a una reducción en la acumulación de este compuesto como consecuencia de un incremento en su eflujo al medio, probablemente como complejos tiol-Sb<sup>III</sup>.
- 3- En ausencia de Sb<sup>III</sup>, los parásitos que sobreexpresan LABC2 presentan un eflujo significativo de tioles al medio. A su vez, estos parásitos poseen menor contenido de tioles no proteicos.
- 4- El transportador LABC2 se localiza no solo en vesículas intracelulares sino también en la membrana plasmática de *Leishmania*, lo cual sugiere que estas vesículas se fusionarían con la membrana plasmática para liberar su contenido al medio extracelular.
- 5- Parásitos mutantes nulos para los transportadores LABC1 y LABC2 muestran una reducción en el porcentaje de infección y entrada al macrófago, siendo estos parásitos viables y capaces de replicarse. Adicionalmente, los estudios en un modelo murino de leishmaniasis han demostrado que los animales infectados con estos parásitos muestran menor inflamación y una reducción en el número y tamaño de las lesiones, lo que indica que LABC2 está implicado en el desarrollo de la enfermedad.
- 6- Los parásitos mutantes nulos para LABC1 y LABC2 presentan una reducción en el porcentaje de células con autofagosomas y una mayor proporción de ATG8 no lipídado, lo que sugiere un defecto en la biogénesis de los autofagosomas.

## Conclusiones

---

**7-** Los parásitos mutantes nulos para LABCG1 y LABCG2, presentan un mayor contenido intracelular de tioles, siendo GSH y T(SH)<sub>2</sub> las principales moléculas acumuladas. Al depletar los niveles de tioles de estos parásitos, se produce un aumento significativo en el porcentaje de células con autofagosomas, confirmando la existencia de una relación directa entre tioles y autofagia.

**8-** Tanto los tioles GSH y TSH<sub>2</sub> como sus formas oxidadas GSSG y TS<sub>2</sub> estimulan la actividad ATPasa basal del transportador LABCG2, de forma dependiente de la concentración. La mayor estimulación está causada por el TS<sub>2</sub> seguido por el T(SH)<sub>2</sub>.

**9-** LABCG2 es capaz de mediar la acumulación de <sup>3</sup>H-GSH en vesículas de forma dependiente de ATP, indicando que tiene la habilidad de transportar tioles no conjugados. Además, es capaz de interaccionar y probablemente transportar GSSG, T(SH)<sub>2</sub>, TS<sub>2</sub> y el conjugado metil-GS, lo cual indica que LABCG2 es capaz de transportar compuestos conjugados con tioles.

# **BIBLIOGRAFÍA**





---

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. **Aleksandrov AA, Chang X, Aleksandrov L, Riordan JR.** 2000. The non-hydrolytic pathway of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator ion channel gating. *J Physiol* **528 Pt 2**:259-265.
2. **Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, Lopez-Velez R, Moreno J.** 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* **21**:334-359, table of contents.
3. **Alvar J, Cañavate C, Gutierrez-Solar B, Jimenez M, Laguna F, Lopez-Velez R, Molina R, Moreno J.** 1997. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev* **10**:298-319.
4. **Alvar J, Jimenez M.** 1994. Could infected drug-users be potential *Leishmania infantum* reservoirs? *AIDS* **8**:854.
5. **Araujo-Santos JM, Parodi-Talice A, Castanys S, Gamarro F.** 2005. The overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in *Leishmania*. *Biochem Biophys Res Commun* **330**:349-355.
6. **Arcari T, Manzano JI, Gamarro F.** 2017. ABCI3, a new mitochondrial ABC transporter from *Leishmania major* involved in susceptibility to antimonials and infectivity. *Antimicrob Agents Chemother* **61**:e01115-01117.
7. **Ashutosh, Sundar S, Goyal N.** 2007. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J Med Microbiol* **56**:143-153.
8. **Aviles H, Belli A, Armijos R, Monroy FP, Harris E.** 1999. PCR detection and identification of *Leishmania* parasites in clinical specimens in Ecuador: a comparison with classical diagnostic methods. *J Parasitol* **85**:181-187.
9. **Awasthi A, Mathur RK, Saha B.** 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res* **119**:238-258.
10. **Baneth G, Shaw SE.** 2002. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* **106**:315-324.
11. **Banuls AL, Hide M, 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.
12. **Barratt G, Saint-Pierre-Chazalet M, Loiseau PM.** 2009. Cellular transport and lipid interactions of miltefosine. *Current drug metabolism* **10**:247-255.
13. **Bates PA, Rogers ME.** 2004. New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med* **4**:601-609.

14. **Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC.** 2007. Protein turnover and differentiation in Leishmania. *Int J Parasitol* **37**:1063-1075.
15. **Besteiro S, Williams RA, Morrison LS, Coombs GH, Mottram JC.** 2006. Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. *J Biol Chem* **281**:11384-11396.
16. **Blackwell JM.** 1985. Receptors and recognition mechanisms of *Leishmania* species. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **79**:606-612.
17. **Bogdan C.** 2012. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol* **2**:69.
18. **Bora D.** 1999. Epidemiology of visceral leishmaniasis in India. *Natl Med J India* **12**:62-68.
19. **Botero Aguirre JP, Restrepo Hamid AM.** 2015. Amphotericin B deoxycholate versus liposomal amphotericin B: effects on kidney function. *Cochrane Database Syst Rev* (11):CD010481.
20. **Brechbuhl HM, Gould N, Kachadourian R, Riekhof WR, Voelker DR, Day BJ.** 2010. Glutathione transport is a unique function of the ATP-binding cassette protein ABCG2. *J Biol Chem* **285**:16582-16587.
21. **Brennand A, Rico E, Michels PA.** 2012. Autophagy in trypanosomatids. *Cells* **1**:346-371.
22. **Brigelius-Flohe R, Flohe L.** 2011. Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxid Redox Signal* **15**:2335-2381.
23. **Brochu C, Wang J, Roy G, Messier N, Wang XY, Saravia NG, Ouellette M.** 2003. Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:3073-3079.
24. **Burchmore RJ, Barrett MP.** 2001. Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *Int J Parasitol* **31**:1311-1320.
25. **Cabezas Y, Legentil L, Robert-Gangneux F, Daligault F, Belaz S, Nugier-Chauvin C, Tranchimand S, Tellier C, Gangneux JP, Ferrieres V.** 2015. *Leishmania* cell wall as a potent target for antiparasitic drugs. A focus on the glycoconjugates. *Org Biomol Chem* **13**:8393-8404.
26. **Callahan HL, Roberts WL, Rainey PM, Beverley SM.** 1994. The PGPA gene of *Leishmania major* mediates antimony (SbIII) resistance by decreasing influx and not by increasing efflux. *Mol Biochem Parasitol* **68**:145-149.
27. **Campos-Salinas J, Cabello-Donayre M, Garcia-Hernandez R, Pérez-Victoria I, Castanys S, Gamarro F, Perez-Victoria JM.** 2011. A new ATP-binding cassette protein is involved in intracellular haem trafficking in *Leishmania*. *Mol Microbiol* **79**:1430-1444.

28. **Campos-Salinas J, Leon-Guerrero D, Gonzalez-Rey E, Delgado M, Castanys S, Pérez-Victoria JM, Gamarro F.** 2013. LABCG2, a new ABC transporter implicated in phosphatidylserine exposure, is involved in the infectivity and pathogenicity of Leishmania. *PLoS Negl Trop Dis* **7**:e2179.
29. **Castanys-Munoz E, Alder-Baerens N, Pomorski T, Gamarro F, 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.
30. **Castanys-Munoz E, Pérez-Victoria JM, Gamarro F, Castanys S.** 2008. Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite Leishmania with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:3573-3579.
31. **Cattand P, Desjeux P, Guzman MG, Jannin J, Kroeger A, Medici A, Musgrove P, Nathan MB, Shaw A, Schofield CJ.** 2006. Tropical Diseases Lacking Adequate Control Measures: Dengue, Leishmaniasis, and African Trypanosomiasis. *In* Jamison DT, Breman JG, Measham AR, Alleyne G, Claeson M, Evans DB, Jha P, Mills A, Musgrove P (ed.), *Disease Control Priorities in Developing Countries*, 2nd ed, Washington (DC).
32. **Chang KP, Dwyer DM.** 1976. Multiplication of a human parasite (Leishmania donovani) in phagolysosomes of hamster macrophages in vitro. *Science* **193**:678-680.
33. **Choi YH, Yu AM.** 2014. ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. *Curr Pharm Des* **20**:793-807.
34. **Clayton CE.** 2002. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *The EMBO Journal* **21**:1881-1888.
35. **Coelho AC, Beverley SM, Cotrim PC.** 2003. Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in Leishmania major. *Mol Biochem Parasitol* **130**:83-90.
36. **Coelho AC, Cotrim PC.** 2013. The Role of ABC Transporters in Drug-Resistant Leishmania, p. 237-258. *In* Ponte-Sucre A, Díaz A, Padrón-Nieves M (ed.), *Drug Resistance in Leishmania Parasites* Springer-Verlag Wien.
37. **Coelho AC, Yamashiro-Kanashiro EH, Bastos SF, Mortara RA, Cotrim PC.** 2006. Intracellular location of the ABC transporter PRP1 related to pentamidine resistance in Leishmania major. *Mol Biochem Parasitol* **150**:378-383.
38. **Comini MA, Dirdjaja N, Kaschel M, Krauth-Siegel RL.** 2009. Preparative enzymatic synthesis of trypanothione and trypanothione analogues. *Int J Parasitol* **39**:1059-1062.

39. **Cortes-Selva F, Munoz-Martinez F, Ilias A, Jimenez AI, Varadi A, Gamarro F, Castanys S.** 2005. Functional expression of a multidrug P-glycoprotein transporter of *Leishmania*. *Biochem Biophys Res Commun* **329**:502-507.
40. **Croft SL, Coombs GH.** 2003. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* **19**:502-508.
41. **Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH.** 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* **19**:111-126.
42. **Culley FJ, Harris RA, Kaye PM, McAdam KP, Raynes JG.** 1996. C-reactive protein binds to a novel ligand on *Leishmania donovani* and increases uptake into human macrophages. *J Immunol* **156**:4691-4696.
43. **Dantas-Torres F.** 2006. Leishmune vaccine: the newest tool for prevention and control of canine visceral leishmaniosis and its potential as a transmission-blocking vaccine. *Vet Parasitol* **141**:1-8.
44. **Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M, Otranto D.** 2012. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol* **28**:531-538.
45. **Dassa E.** 2011. Natural history of ABC systems: not only transporters. *Essays Biochem* **50**:19-42.
46. **Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J.** 2008. Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**:317-364.
47. **de Menezes JP, Guedes CE, Petersen AL, Fraga DB, Veras PS.** 2015. Advances in Development of New Treatment for Leishmaniasis. *Biomed Res Int* **2015**:815023.
48. **de Souza W, Attias M, Rodrigues JC.** 2009. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Int J Biochem Cell Biol* **41**:2069-2080.
49. **Decuypere S, Vanaerschot M, Bruncker K, Imamura H, Muller S, Khanal B, Rijal S, Dujardin JC, Coombs GH.** 2012. Molecular mechanisms of drug resistance in natural *Leishmania* populations vary with genetic background. *PLoS Negl Trop Dis* **6**:e1514.
50. **Denton H, McGregor JC, Coombs GH.** 2004. Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochem J* **381**:405-412.
51. **Dermauw W, Van Leeuwen T.** 2014. The ABC gene family in arthropods: comparative genomics and role in insecticide transport and resistance. *Insect Biochem Mol Biol* **45**:89-110.
52. **Descoteaux A, Turco SJ.** 1999. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochim Biophys Acta* **1455**:341-352.

- 
53. **Desideri E, Filomeni G, Ciriolo MR.** 2012. Glutathione participates in the modulation of starvation-induced autophagy in carcinoma cells. *Autophagy* **8**:1769-1781.
  54. **Desjeux P.** 2001. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **95**:239-243.
  55. **Dey A, Kumar U, Sharma P, Singh S.** 2009. Immunogenicity of candidate chimeric DNA vaccine against tuberculosis and leishmaniasis. *Vaccine* **27**:5152-5160.
  56. **Ding R, Jin S, Pabon K, Scotto KW.** 2016. A role for ABCG2 beyond drug transport: Regulation of autophagy. *Autophagy* **12**:737-751.
  57. **Docampo R, Huang G.** 2016. Acidocalcisomes of eukaryotes. *Curr Opin Cell Biol* **41**:66-72.
  58. **Docampo R, Moreno SN.** 2011. Acidocalcisomes. *Cell Calcium* **50**:113-119.
  59. **Docampo R, Scott DA, Vercesi AE, Moreno SN.** 1995. Intracellular Ca<sup>2+</sup> storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* **310 (Pt 3)**:1005-1012.
  60. **Dodge MA, Waller RF, Chow LM, Zaman MM, Cotton LM, McConville MJ, Wirth DF.** 2004. Localization and activity of multidrug resistance protein 1 in the secretory pathway of *Leishmania* parasites. *Mol Microbiol* **51**:1563-1575.
  61. **Dorlo TP, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ.** 2012. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* **67**:2576-2597.
  62. **Downing T, Imamura H, Decuypere S, Clark TG, Coombs GH, Cotton JA, Hilley JD, de Doncker S, Maes I, Mottram JC, Quail MA, Rijal S, Sanders M, Schonian G, Stark O, Sundar S, Vanaerschot M, Hertz-Fowler C, Dujardin JC, Berriman M.** 2011. Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. *Genome Res* **21**:2143-2156.
  63. **Duprey ZH, Steurer FJ, Rooney JA, Kirchhoff LV, Jackson JE, Rowton ED, Schantz PM.** 2006. Canine visceral leishmaniasis, United States and Canada, 2000-2003. *Emerg Infect Dis* **12**:440-446.
  64. **El Fadili K, Messier N, Leprohon P, Roy G, Guimond C, Trudel N, Saravia NG, Papadopoulou B, Legare D, Ouellette M.** 2005. Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **49**:1988-1993.
  65. **El-Awady R, Saleh E, Hashim A, Soliman N, Dallah A, Elrasheed A, Elakraa G.** 2016. The Role of Eukaryotic and Prokaryotic ABC Transporter Family in Failure of Chemotherapy. *Front Pharmacol* **7**:535.

66. **Estevez AM, Haile S, Steinbuchel M, Quijada L, Clayton C.** 2004. Effects of depletion and overexpression of the *Trypanosoma brucei* ribonuclease L inhibitor homologue. *Mol Biochem Parasitol* **133**:137-141.
67. **Felinciageli MD, Rabinovich JE.** 1998. Abundance of *Lutzomyia ovallesi* but not *Lu. gomezi* (Diptera: Psychodidae) correlated with cutaneous leishmaniasis incidence in north-central Venezuela. *Medical and Veterinary Entomology* **12**:121-131.
68. **Fernandez MM, Malchiodi EL, Algranati ID.** 2011. Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:86-93.
69. **Fidalgo LM, Gille L.** 2011. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. *Pharm Res* **28**:2758-2770.
70. **Filomeni G, Desideri E, Cardaci S, Rotilio G, Ciriolo MR.** 2010. Under the ROS...thiol network is the principal suspect for autophagy commitment. *Autophagy* **6**:999-1005.
71. **Fitzpatrick TB, Goldsmith LA, Katz SI, Gilchrest BA, Paller AS, Leffell DJ, Wolff K.** 2009. *Dermatología en medicina general*, vol. 3, p. 2003. Editorial Médica Panamericana.
72. **Forman HJ, Zhang H, Rinna A.** 2009. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol Aspects Med* **30**:1-12.
73. **Foth B, Piani A, Curtis JM, Ilg T, McConville M, Handman E.** 2002. *Leishmania major* proteophosphoglycans exist as membrane-bound and soluble forms and localise to the cell membrane, the flagellar pocket and the lysosome. *Int J Parasitol* **32**:1701-1708.
74. **Frezard F, Demicheli C, Ferreira CS, Costa MA.** 2001. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:913-916.
75. **Frezard F, Monte-Neto R, Reis PG.** 2014. Antimony transport mechanisms in resistant leishmania parasites. *Biophysical Reviews* **6**:119-132.
76. **Furuya T, Kessler P, Jardim A, Schnauffer A, Crudder C, Parsons M.** 2002. Glucose is toxic to glycosome-deficient trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:14177-14182.
77. **Gamarro F, Sánchez-Cañete MP, Castanys S.** 2013. Mechanisms of Miltefosine Resistance in *Leishmania*, p. 351-379. *In* Ponte-Sucre A, Diaz E, Padrón-Nieves M (ed.), *Drug Resistance in Leishmania Parasites*. Springer-Verlag Wien.
78. **Garcia AL, Tellez T, Parrado R, Rojas E, Bermudez H, Dujardin JC.** 2007. Epidemiological monitoring of American tegumentary leishmaniasis: molecular

- characterization of a peridomestic transmission cycle in the Amazonian lowlands of Bolivia. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **101**:1208-1213.
79. **Garcia-Hernandez R, Manzano JI, Castanys S, Gamarro F.** 2012. *Leishmania donovani* develops resistance to drug combinations. *PLoS Negl Trop Dis* **6**:e1974.
80. **Gauthier C, Ozvegy-Laczka C, Szakacs G, Sarkadi B, Di Pietro A.** 2013. ABCG2 is not able to catalyze glutathione efflux and does not contribute to GSH-dependent collateral sensitivity. *Front Pharmacol* **4**:138.
81. **Gillet JP, Efferth T, Remacle J.** 2007. Chemotherapy-induced resistance by ATP-binding cassette transporter genes. *Biochim Biophys Acta* **1775**:237-262.
82. **Gil-Prieto R, Walter S, Alvar J, de Miguel AG.** 2011. Epidemiology of leishmaniasis in Spain based on hospitalization records (1997-2008). *Am J Trop Med Hyg* **85**:820-825.
83. **Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee H, Legare D, Sundar S, Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R.** 2004. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem* **279**:31010-31017.
84. **Gradia S, Subramanian D, Wilson T, Acharya S, Makhov A, Griffith J, Fishel R.** 1999. hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA. *Mol Cell* **3**:255-261.
85. **Gradoni L, Scalone A, Gramiccia M.** 1993. HIV-*Leishmania* co-infections in Italy: serological data as an indication of the sequence of acquisition of the two infections. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **87**:94-96.
86. **Gualdron-Lopez M, Brennand A, Hannaert V, Quinones W, Caceres AJ, Bringaud F, Concepcion JL, Michels PA.** 2012. When, how and why glycolysis became compartmentalised in the Kinetoplastea. A new look at an ancient organelle. *Int J Parasitol* **42**:1-20.
87. **Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F, Ohsumi Y.** 2007. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem* **282**:37298-37302.
88. **Handman E, Papenfuss AT, P. T, Speed TP, W. GJ.** 2008. *Leishmania* Surface Proteins, p. 177-204. *In* Myler PJ, Fasel N (ed.), *Leishmania: After the Genome*. Caister Academic Press.
89. **Harms G, Schonian G, Feldmeier H.** 2003. Leishmaniasis in Germany. *Emerg Infect Dis* **9**:872-875.
90. **Hart DT, Coombs GH.** 1981. The effects of carbon dioxide and oxygen upon the growth and in vitro transformation of *Leishmania mexicana mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* **4**:117-127.



91. **He SM, Li R, Kanwar JR, Zhou SF.** 2011. Structural and functional properties of human multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1). *Current medicinal chemistry* **18**:439-481.
92. **Herwaldt BL.** 1999. Leishmaniasis. *Lancet* **354**:1191-1199.
93. **Higgins CF.** 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. *Annu Rev Cell Biol* **8**:67-113.
94. **Hodges LM, Markova SM, Chinn LW, Gow JM, Kroetz DL, Klein TE, Altman RB.** 2011. Very important pharmacogene summary: ABCB1 (MDR1, P-glycoprotein). *Pharmacogenet Genomics* **21**:152-161.
95. **Holland IB.** 2011. ABC transporters, mechanisms and biology: an overview. *Essays Biochem* **50**:1-17.
96. **Holm A, Tejle K, Magnusson KE, Descoteaux A, Rasmusson B.** 2001. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation with impaired translocation of PKC $\alpha$  and defective phagosome maturation. *Cell Microbiol* **3**:439-447.
97. **Hrycyna CA, Ramachandra M, Ambudkar SV, Ko YH, Pedersen PL, Pastan I, Gottesman MM.** 1998. Mechanism of action of human P-glycoprotein ATPase activity. Photochemical cleavage during a catalytic transition state using orthovanadate reveals cross-talk between the two ATP sites. *J Biol Chem* **273**:16631-16634.
98. **Ilgoutz SC, McConville MJ.** 2001. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int J Parasitol* **31**:899-908.
99. **Ishikawa T, Kasamatsu S, Hagiwara Y, Mitomo H, Kato R, Sumino Y.** 2003. Expression and functional characterization of human ABC transporter ABCG2 variants in insect cells. *Drug Metab Pharmacokinet.* **18**:194-202.
100. **Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R, Anupama A, Apostolou Z, Attipoe P, Bason N, Bauser C, Beck A, Beverley SM, Bianchetti G, Borzym K, Bothe G, Bruschi CV, Collins M, Cadag E, Ciarloni L, Clayton C, Coulson RM, Cronin A, Cruz AK, Davies RM, De Gaudenzi J, Dobson DE, Duesterhoeft A, Fazelina G, Fosker N, Frasch AC, 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 JC, Muller-Auer S, Munden H, Nelson S, Norbertczak H, Oliver K, O'Neil S, Pentony M, Pohl TM, Price C, Purnelle B, Quail MA, Rabbinowitsch E, Reinhardt R, Rieger M, Rinta J, Robben J, Robertson L, Ruiz JC, Rutter S, Saunders D, Schafer M, Schein J, Schwartz DC, 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 DF, Blackwell JM, Stuart KD, Barrell B, Myler PJ.** 2005. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* **309**:436-442.

101. **Jeong CB, Kim BM, Kang HM, Choi IY, Rhee JS, Lee JS.** 2015. Marine medaka ATP-binding cassette (ABC) superfamily and new insight into teleost Abch nomenclature. *Sci Rep* **5**:15409.
102. **Jha TK, Giri YN, Singh TK, Jha S.** 1995. Use of amphotericin B in drug-resistant cases of visceral leishmaniasis in north Bihar, India. *Am J Trop Med Hyg* **52**:536-538.
103. **Jhingran A, Chatterjee M, Madhubala R.** 2008. Leishmaniasis: Epidemiological Trends and Diagnosis, p. 1-14. *In Myler PJ, Fasel N (ed.), Leishmania: After the Genome.* Caister Academic Press.
104. **Kafetzis DA, Velissariou IM, Stabouli S, Mavrikou M, Delis D, Liapi G.** 2005. Treatment of paediatric visceral leishmaniasis: amphotericin B or pentavalent antimony compounds? *Int J Antimicrob Agents* **25**:26-30.
105. **Kang J, J. Park H, Choi B, Burla T, Kretzschmar Y, Lee E, Martinoia E.** 2011. Plant ABC transporters. *Arabidopsis Book.* American Society of Plant Biologists.
106. **Kazemi B.** 2011. Genomic organization of leishmania species. *Iran J Parasitol* **6**:1-18.
107. **Kedzierski L, Montgomery J, Bullen D, Curtis J, Gardiner E, Jimenez-Ruiz A, Handman E.** 2004. A leucine-rich repeat motif of Leishmania parasite surface antigen 2 binds to macrophages through the complement receptor 3. *J Immunol* **172**:4902-4906.
108. **Kelleher M, Bacic A, Handman E.** 1992. Identification of a macrophage-binding determinant on lipophosphoglycan from Leishmania major promastigotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:6-10.
109. **Killick-Kendrick R.** 1999. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol* **17**:279-289.
110. **Kim DY, Bove L, Maeshima M, Martinoia E, Lee Y.** 2007. The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **50**:207-218.
111. **Kishore K, Kumar V, Kesari S, Dinesh DS, Kumar AJ, Das P, Bhattacharya SK.** 2006. Vector control in leishmaniasis. *Indian J Med Res* **123**:467-472.
112. **Krauth-Siegel RL, Comini MA.** 2008. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1780**:1236-1248.
113. **Krauth-Siegel RL, Jacoby EM, Schirmer RH.** 1995. Trypanothione and N1-glutathionylspermidine: isolation and determination. *Methods in enzymology* **251**:287-294.

114. **Krauth-Siegel RL, Leroux AE.** 2012. Low-molecular-mass antioxidants in parasites. *Antioxid Redox Signal* **17**:583-607.
115. **Krzyzanowski D, Bartosz G, Grzelak A.** 2014. Collateral sensitivity: ABCG2-overexpressing cells are more vulnerable to oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* **76**:47-52.
116. **Kulshrestha A, Sharma V, Singh R, Salotra P.** 2014. Comparative transcript expression analysis of miltefosine-sensitive and miltefosine-resistant *Leishmania donovani*. *Parasitology Research* **113**:1171-1184.
117. **Lachaud L, Dereure J, Chabbert E, Reynes J, Mauboussin JM, Oziol E, Dedet JP, Bastien P.** 2000. Optimized PCR using patient blood samples for diagnosis and follow-up of visceral Leishmaniasis, with special reference to AIDS patients. *J Clin Microbiol* **38**:236-240.
118. **Lacomble S, Vaughan S, Gadelha C, Morphey MK, Shaw MK, McIntosh JR, Gull K.** 2010. Basal body movements orchestrate membrane organelle division and cell morphogenesis in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* **123**:2884-2891.
119. **Landfear SM, Ignatushchenko M.** 2001. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* **115**:1-17.
120. **Lario A, Gonzalez A, Dorado G.** 1997. Automated laser-induced fluorescence DNA sequencing: equalizing signal-to-noise ratios significantly enhances overall performance. *Analytical Biochemistry* **247**:30-33.
121. **Leandro C, Campino L.** 2003. Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. *Int J Antimicrob Agents* **22**:352-357.
122. **LeBowitz JH, Coburn CM, McMahon-Pratt D, Beverley SM.** 1990. Development of a stable *Leishmania* expression vector and application to the study of parasite surface antigen genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:9736-9740.
123. **Legare D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof YD, Rosen BP, Haimeur A, Papadopoulou B, Ouellette M.** 2001. The *Leishmania* ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase. *J Biol Chem* **276**:26301-26307.
124. **Leprohon P, Legare D, Girard I, Papadopoulou B, Ouellette M.** 2006. Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. *Eukaryot Cell* **5**:1713-1725.
125. **Leprohon P, Legare D, Ouellette M.** 2009. Intracellular localization of the ABC proteins of *Leishmania* and their role in resistance to antimonials. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:2646-2649.
126. **Linton KJ.** 2007. Structure and function of ABC transporters. *Physiology (Bethesda)* **22**:122-130.

127. **Lira R, Doherty M, Modi G, Sacks D.** 2000. Evolution of lesion formation, parasitic load, immune response, and reservoir potential in C57BL/6 mice following high- and low-dose challenge with *Leishmania major*. *Infection and immunity* **68**:5176-5182.
128. **Lodge R, Descoteaux A.** 2005. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. *Clin Immunol* **114**:256-265.
129. **Loe DW, Deeley RG, Cole SP.** 2000. Verapamil stimulates glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1). *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* **293**:530-538.
130. **Luque-Ortega JR, Rivas L.** 2007. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **51**:1327-1332.
131. **Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D, Opperdoes FR.** 2000. Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* **111**:1-14.
132. **Maciaszczyk-Dziubinska E, Wawrzycka D, Wysocki R.** 2012. Arsenic and antimony transporters in eukaryotes. *International journal of molecular sciences* **13**:3527-3548.
133. **Manzano JI, Garcia-Hernandez R, Castanys S, Gamarro F.** 2013. A new ABC half-transporter in *Leishmania major* is involved in resistance to antimony. *Antimicrob Agents Chemother* **57**:3719-3730.
134. **Manzano JI, Perea A, Leon-Guerrero D, Campos-Salinas J, Piacenza L, Castanys S, Gamarro F.** 2017. *Leishmania* LABC1 and LABC2 transporters are involved in virulence and oxidative stress: functional linkage with autophagy. *Parasit Vectors* **10**:267.
135. **Marquis N, Gourbal B, Rosen BP, Mukhopadhyay R, Ouellette M.** 2005. Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol* **57**:1690-1699.
136. **Martin C, Berridge G, Mistry P, Higgins C, Charlton P, Callaghan R.** 2000. Drug binding sites on P-glycoprotein are altered by ATP binding prior to nucleotide hydrolysis. *Biochemistry* **39**:11901-11906.
137. **Martín-Sánchez J, Pineda J, Morillas-Márquez F, García-García J, Acedo C, Macías J.** 2004. Detection of *Leishmania Infantum* Kinetoplast DNA in Peripheral Blood From Asymptomatic Individuals at Risk for Parenterally Transmitted Infections: Relationship Between Polymerase Chain Reaction Results and Other *Leishmania* Infection Markers. *Am J Trop Med Hyg* **70**:545-548.
138. **Marty P, Izri A, Ozon C, Haas P, Rosenthal E, Del Giudice P, Godenir J, Coulibaly E, Gari-Toussaint M, Delaunay P, Ferrua B, Haas H, Pratlong F,**

- Le Fichoux Y.** 2007. A century of leishmaniasis in Alpes-Maritimes, France. *Ann Trop Med Parasitol* **101**:563-574.
139. **Mbongo N, Loiseau PM, Billion MA, Robert-Gero M.** 1998. Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **42**:352-357.
140. **McConville MJ, Mullin KA, Ilgoutz SC, Teasdale RD.** 2002. Secretory pathway of trypanosomatid parasites. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**:122-154; table of contents.
141. **Messaritakis I, Christodoulou V, Mazeris A, Koutala E, Vlahou A, Papadogiorgaki S, Antoniou M.** 2013. Drug resistance in natural isolates of *Leishmania donovani* s.l. promastigotes is dependent of Pgp170 expression. *PLoS One* **8**:e65467.
142. **Michels PA, Bringaud F, Herman M, Hannaert V.** 2006. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta* **1763**:1463-1477.
143. **Mimori T, Grimaldi G, Jr., Kreutzer RD, Gomez EA, McMahon-Pratt D, Tesh RB, Hashiguchi Y.** 1989. Identification, using isoenzyme electrophoresis and monoclonal antibodies, of *Leishmania* isolated from humans and wild animals of Ecuador. *Am J Trop Med Hyg* **40**:154-158.
144. **Miura R, Kooriyama T, Yoneda M, Takenaka A, Doki M, Goto Y, Sanjoba C, Endo Y, Fujiyuki T, Sugai A, Tsukiyama-Kohara K, Matsumoto Y, Sato H, Kai C.** 2015. Efficacy of Recombinant Canine Distemper Virus Expressing *Leishmania* Antigen against *Leishmania* Challenge in Dogs. *PLoS Negl Trop Dis* **9**:e0003914.
145. **Moitra K, Dean M.** 2011. Evolution of ABC transporters by gene duplication and their role in human disease. *Biol Chem* **392**:29-37.
146. **Molina R, Jimenez MI, Cruz I, Iriso A, Martin-Martin I, Sevillano O, Melero S, Bernal J.** 2012. The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol* **190**:268-271.
147. **Mondelaers A, Sanchez-Canete MP, Hendrickx S, Eberhardt E, Garcia-Hernandez R, Lachaud L, Cotton J, Sanders M, Cuypers B, Imamura H, Dujardin JC, Delputte P, Cos P, Caljon G, Gamarro F, Castanys S, Maes L.** 2016. Genomic and Molecular Characterization of Miltefosine Resistance in *Leishmania infantum* Strains with Either Natural or Acquired Resistance through Experimental Selection of Intracellular Amastigotes. *PLoS One* **11**:e0154101.
148. **Monge-Maillo B, Lopez-Velez R.** 2013. Therapeutic options for visceral leishmaniasis. *Drugs* **73**:1863-1888.
149. **Moody SF, Handman E, McConville MJ, Bacic A.** 1993. The structure of *Leishmania major* amastigote lipophosphoglycan. *J Biol Chem* **268**:18457-18466.

- 
150. **Moradin N, Descoteaux A.** 2012. Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Front Cell Infect Microbiol* **2**:121.
  151. **Moral L, Rubio EM, Moya M.** 2002. A leishmanin skin test survey in the human population of l'Alacanti region (Spain): implications for the epidemiology of Leishmania infantum infection in southern Europe. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **96**:129-132.
  152. **Mukherjee A, Padmanabhan PK, Sahani MH, Barrett MP, Madhubala R.** 2006. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in Leishmania donovani. *Mol Biochem Parasitol* **145**:1-10.
  153. **Mukherjee A, Padmanabhan PK, Singh S, Roy G, Girard I, Chatterjee M, Ouellette M, 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.
  154. **Mukhopadhyay R, Dey S, Xu N, Gage D, Lightbody J, Ouellette M, Rosen BP.** 1996. Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in Leishmania. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:10383-10387.
  155. **Myler PJ.** 2008. Genome structure and content, p. 15-27. *In* Myler PJ, Fasel N (ed.), *Leishmania: After the Genome*. Caister Academic Press.
  156. **Naderer T, Ellis MA, Sernee MF, De Souza DP, Curtis J, Handman E, McConville MJ.** 2006. Virulence of Leishmania major in macrophages and mice requires the gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:5502-5507.
  157. **Naderer T, Vince JE, McConville MJ.** 2004. Surface determinants of Leishmania parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Curr Mol Med* **4**:649-665.
  158. **Noazin S, Modabber F, Khamesipour A, Smith PG, Moulton LH, Nasseri K, Sharifi I, Khalil EA, Bernal ID, Antunes CM, Kienny MP, Tanner M.** 2008. First generation leishmaniasis vaccines: a review of field efficacy trials. *Vaccine* **26**:6759-6767.
  159. **Oda K, Otani M, Uruguchi S, Akihiro T, Fujiwara T.** 2011. Rice ABCG43 is Cd inducible and confers Cd tolerance on yeast. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* **75**:1211-1213.
  160. **Ogbadoyi EO, Robinson DR, Gull K.** 2003. A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes. *Mol Biol Cell* **14**:1769-1779.
  161. **Olivier M, Gregory DJ.** 2008. Interactions Between Leishmania and the Host Macrophage, p. 239-262. *In* Myler PJ, Fasel N (ed.), *Leishmania: After the Genome*. Caister Academic Press.

162. **Opperdoes FR, Coombs GH.** 2007. Metabolism of Leishmania: proven and predicted. *Trends Parasitol* **23**:149-158.
163. **Ostyn B, Hasker E, Dorlo TP, Rijal S, Sundar S, Dujardin JC, Boelaert M.** 2014. Failure of miltefosine treatment for visceral leishmaniasis in children and men in South-East Asia. *PloS One* **9**:e100220.
164. **Ouakad M, Vanaerschot M, Rijal S, Sundar S, Speybroeck N, Kestens L, Boel L, De Doncker S, Maes I, Decuypere S, Dujardin JC.** 2011. Increased metacyclogenesis of antimony-resistant *Leishmania donovani* clinical lines. *Parasitology* **138**:1392-1399.
165. **Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B.** 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* **7**:257-266.
166. **Ouellette M, Fase-Fowler F, Borst P.** 1990. The amplified H circle of methotrexate-resistant leishmania tarentolae contains a novel P-glycoprotein gene. *EMBO J* **9**:1027-1033.
167. **Overath P, Stierhof YD, Wiese M.** 1997. Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites - Tumultuous traffic in a pocket. *Trends Cell Biol* **7**:27-33.
168. **Ozvegy C, Litman T, Szakacs G, Nagy Z, Bates S, Varadi A, Sarkadi B.** 2001. Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells. *Biochem Biophys Res Commun* **285**:111-117.
169. **Palatnik-de-Sousa CB.** 2008. Vaccines for leishmaniasis in the fore coming 25 years. *Vaccine* **26**:1709-1724.
170. **Papadopoulou B, Müller M, Rochette A, McNicoll F, Dumas C, Chow C.** 2008. Regulation of Gene Expression in *Leishmania* Throughout a Complex Digenetic Life Cycle, p. 29-54. *In* Myler PJ, Fasel N (ed.), *Leishmania: After the Genome*. Caister Academic Press.
171. **Paris C, Loiseau PM, Bories C, Breard J.** 2004. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:852-859.
172. **Parodi-Talice A, Araujo JM, Torres C, Pérez-Victoria JM, Gamarro F, 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.
173. **Pathak MK, Yi T.** 2001. Sodium stibogluconate is a potent inhibitor of protein tyrosine phosphatases and augments cytokine responses in hemopoietic cell lines. *J Immunol* **167**:3391-3397.
174. **Pennisi MG.** 2015. Leishmaniosis of companion animals in Europe: an update. *Vet Parasitol* **208**:35-47.

175. **Pérez-Victoria FJ, Gamarro F, Ouellette M, Castanys S.** 2003. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J Biol Chem* **278**:49965-49971.
176. **Pérez-Victoria FJ, Sanchez-Canete MP, Castanys S, Gamarro F.** 2006. Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. *J Biol Chem* **281**:23766-23775.
177. **Pérez-Victoria JM, Parodi-Talice A, Torres C, Gamarro F, Castanys S.** 2001. ABC transporters in the protozoan parasite *Leishmania*. *Int Microbiol* **4**:159-166.
178. **Pérez-Victoria JM, Pérez-Victoria FJ, Parodi-Talice A, Jimenez IA, Ravelo AG, Castanys S, Gamarro F.** 2001. Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrob Agents Chemother* **45**:2468-2474.
179. **Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D.** 2008. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* **321**:970-974.
180. **Piani A, Ilg T, Elefanty AG, Curtis J, Handman E.** 1999. *Leishmania* major proteophosphoglycan is expressed by amastigotes and has an immunomodulatory effect on macrophage function. *Microbes Infect* **1**:589-599.
181. **Pimenta PF, Saraiva EM, Sacks DL.** 1991. The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania* major. *Exp Parasitol* **72**:191-204.
182. **Proudfoot L, Nikolaev AV, Feng GJ, Wei WQ, Ferguson MA, Brimacombe JS, Liew FY.** 1996. Regulation of the expression of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity by glycoconjugates of *Leishmania* lipophosphoglycan in murine macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:10984-10989.
183. **Purkait B, Kumar A, Nandi N, Sardar AH, Das S, Kumar S, Pandey K, Ravidas V, Kumar M, De T, Singh D, Das P.** 2012. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* **56**:1031-1041.
184. **Rai K, Cuypers B, Bhattarai NR, Uranw S, Berg M, Ostyn B, Dujardin JC, Rijal S, Vanaerschot 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.
185. **Rai S, Bhaskar, Goel SK, Nath Dwivedi U, Sundar S, Goyal N.** 2013. Role of efflux pumps and intracellular thiols in natural antimony resistant isolates of *Leishmania donovani*. *PLoS One* **8**:e74862.



186. **Rakotomanga M, Saint-Pierre-Chazalet M, Loiseau PM.** 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.
187. **Ramesh V, Mukherjee A.** 1995. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Int J Dermatol* **34**:85-91.
188. **Ready PD.** 2008. Leishmaniasis emergence and climate change. *Rev Sci Tech* **27**:399-412.
189. **Ready PD.** 2010. Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill* **15**:19505.
190. **Rees DC, Johnson E, Lewinson O.** 2009. ABC transporters: the power to change. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**:218-227.
191. **Reiner NE, Ng W, McMaster WR.** 1987. Parasite-accessory cell interactions in murine leishmaniasis. II. *Leishmania donovani* suppresses macrophage expression of class I and class II major histocompatibility complex gene products. *J Immunol* **138**:1926-1932.
192. **Riede O, Seifert K, Oswald D, Endmann A, Hock C, Winkler A, Salguero FJ, Schroff M, Croft SL, Juhls C.** 2015. Preclinical safety and tolerability of a repeatedly administered human leishmaniasis DNA vaccine. *Gene Ther* **22**:628-635.
193. **Ritter U, Frischknecht F, van Zandbergen G.** 2009. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? *Trends Parasitol* **25**:505-510.
194. **Romanov J, Walczak M, Ibiricu I, Schuchner S, Ogris E, Kraft C, Martens S.** 2012. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *EMBO J* **31**:4304-4317.
195. **Sacks DL.** 1989. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol* **69**:100-103.
196. **Sacks DL.** 1992. The structure and function of the surface lipophosphoglycan on different developmental stages of *Leishmania* promastigotes. *Infect Agents Dis* **1**:200-206.
197. **Sacks DL, Perkins PV.** 1985. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. *Am J Trop Med Hyg* **34**:456-459.
198. **Sadlova J, Price HP, Smith BA, Votypka J, Volf P, Smith DF.** 2010. The stage-regulated HASPB and SHERP proteins are essential for differentiation of the protozoan parasite *Leishmania major* in its sand fly vector, *Phlebotomus papatasi*. *Cell Microbiol* **12**:1765-1779.

- 
199. **Sanchez-Canete MP, Carvalho L, Pérez-Victoria FJ, Gamarro F, Castanys S.** 2009. Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:1305-1313.
  200. **Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**:5463-5467.
  201. **Sarkadi B, Price EM, Boucher RC, Germann UA, Scarborough GA.** 1992. Expression of the human multidrug resistance cDNA in insect cells generates a high activity drug-stimulated membrane ATPase. *J Biol Chem* **267**:4854-4858.
  202. **Sauvage V, Aubert D, Escotte-Binet S, Villena I.** 2009. The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. *Mol Biochem Parasitol* **167**:81-94.
  203. **Schaedler TA, Thornton JD, Kruse I, Schwarzlander M, Meyer AJ, van Veen HW, Balk J.** 2014. A conserved mitochondrial ATP-binding cassette transporter exports glutathione polysulfide for cytosolic metal cofactor assembly. *J Biol Chem* **289**:23264-23274.
  204. **Schonian G, Mauricio I, Gramiccia M, Canavate C, Boelaert M, Dujardin JC.** 2008. Leishmaniasis in the Mediterranean in the era of molecular epidemiology. *Trends Parasitol* **24**:135-142.
  205. **Seifert K, Matu S, Javier Pérez-Victoria F, Castanys S, Gamarro F, Croft SL.** 2003. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int J Antimicrob Agents* **22**:380-387.
  206. **Seifert K, Pérez-Victoria FJ, Stettler M, Sanchez-Canete MP, Castanys S, Gamarro F, Croft SL.** 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.
  207. **Shatz O, Holland P, Elazar Z, Simonsen A.** 2016. Complex Relations Between Phospholipids, Autophagy, and Neutral Lipids. *Trends Biochem Sci* **41**:907-923.
  208. **Singh S, Dey A, Sivakumar R.** 2005. Applications of molecular methods for *Leishmania* control. *Expert Rev Mol Diagn* **5**:251-265.
  209. **Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Iniesta L, Quintana J, Pastor J, Espada Y, Portus M, Alberola J.** 2007. Cross-sectional serosurvey of feline leishmaniasis in ecoregions around the Northwestern Mediterranean. *Am J Trop Med Hyg* **76**:676-680.
  210. **Sousa-Franco J, Araujo-Mendes E, Silva-Jardim I, J LS, Faria DR, Dutra WO, Horta MF.** 2006. Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis:

- possible involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect* **8**:390-400.
211. **Spath GF, Garraway LA, Turco SJ, Beverley SM.** 2003. The role(s) of lipophosphoglycan (LPG) in the establishment of *Leishmania* major infections in mammalian hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:9536-9541.
212. **Srivastava S, Mishra J, Gupta AK, Singh A, Shankar P, Singh S.** 2017. Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India. *Parasit Vectors* **10**:49.
213. **Srivastava S, Shankar P, Mishra J, Singh S.** 2016. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. *Parasit Vectors* **9**:277.
214. **Stierhof YD, Bates PA, Jacobson RL, Rogers ME, Schlein Y, Handman E, Ilg T.** 1999. Filamentous proteophosphoglycan secreted by *Leishmania* promastigotes forms gel-like three-dimensional networks that obstruct the digestive tract of infected sandfly vectors. *Eur J Cell Biol* **78**:675-689.
215. **Suarez Rodriguez B, Isidoro Fernandez B, Santos Sanz S, Sierra Moros MJ, Molina Moreno R, Astray Mochales J, Amela Heras C.** 2012. [Review of the current situation and the risk factors of *Leishmania infantum* in Spain]. *Rev Esp Salud Publica* **86**:555-564.
216. **Sundar S, Olliaro PL.** 2007. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: Clinical evidence for informed clinical risk management. *Ther Clin Risk Manag* **3**:733-740.
217. **Sundar S, Rai M.** 2002. Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* **15**:593-598.
218. **Sunkin SM, Kiser P, Myler PJ, Stuart K.** 2000. The size difference between leishmania major friedlin chromosome one homologues is localized to sub-telomeric repeats at one chromosomal end. *Mol Biochem Parasitol* **109**:1-15.
219. **Takken W, Knols B.** 2007. Emerging pests and vector-borne diseases in Europe: ecology and control of vector-borne diseases.
220. **Teixeira SM, de Paiva RM, Kangussu-Marcolino MM, Darocha WD.** 2012. Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. *Genet Mol Biol* **35**:1-17.
221. **Telbisz A, Ozvegy-Laczka C, Hegedus T, Varadi A, Sarkadi B.** 2013. Effects of the lipid environment, cholesterol and bile acids on the function of the purified and reconstituted human ABCG2 protein. *Biochem J* **450**:387-395.
222. **ter Beek J, Guskov A, Slotboom DJ.** 2014. Structural diversity of ABC transporters. *J Gen Physiol* **143**:419-435.
223. **Toledo JS, Ferreira TR, Defina TP, Dossin Fde M, Beattie KA, Lamont DJ, Cloutier S, Papadopoulou B, Schenkman S, Cruz AK.** 2010. Cell

- homeostasis in a *Leishmania major* mutant overexpressing the spliced leader RNA is maintained by an increased proteolytic activity. *Int J Biochem Cell Biol* **42**:1661-1671.
224. **Tomblin G, Muharemagic A, White LB, Senior AE.** 2005. Involvement of the "occluded nucleotide conformation" of P-glycoprotein in the catalytic pathway. *Biochemistry* **44**:12879-12886.
225. **Tripathi A, Gupta CM.** 2003. Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophage invasion in *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* **128**:1-9.
226. **Trotz-Williams LA, Trees AJ.** 2003. Systematic review of the distribution of the major vector-borne parasitic infections in dogs and cats in Europe. *Vet Rec* **152**:97-105.
227. **Trujillo M, Budde H, Pineyro MD, Stehr M, Robello C, Flohe L, Radi R.** 2004. *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* trypanothione peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *J Biol Chem* **279**:34175-34182.
228. **Tsumoto K, Umetsu M, Kumagai I, Ejima D, Philo JS, Arakawa T.** 2004. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnology progress* **20**:1301-1308.
229. **Uzcategui NL, Zhou Y, Figarella K, Ye J, Mukhopadhyay R, Bhattacharjee H.** 2008. Alteration in glycerol and metalloid permeability by a single mutation in the extracellular C-loop of *Leishmania major* aquaglyceroporin LmAQP1. *Mol Microbiol* **70**:1477-1486.
230. **Vercesi AE, Moreno SN, Docampo R.** 1994. Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. *Biochem J* **304 ( Pt 1)**:227-233.
231. **Vergani P, Lockless SW, Nairn AC, Gadsby DC.** 2005. CFTR channel opening by ATP-driven tight dimerization of its nucleotide-binding domains. *Nature* **433**:876-880.
232. **Verma NK, Dey CS.** 2004. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3010-3015.
233. **Waller RF, McConville MJ.** 2002. Developmental changes in lysosome morphology and function *Leishmania* parasites. *Int J Parasitol* **32**:1435-1445.
234. **Walton BC.** 1989. Leishmaniasis. A worldwide problem. *Int J Dermatol* **28**:305-307.
235. **Wanderley JL, Moreira ME, Benjamin A, Bonomo AC, Barcinski MA.** 2006. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *J Immunol* **176**:1834-1839.

236. **Williams RA, Smith TK, Cull B, Mottram JC, Coombs GH.** 2012. ATG5 is essential for ATG8-dependent autophagy and mitochondrial homeostasis in *Leishmania major*. *PLoS Pathog* **8**:e1002695.
237. **Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH.** 2004. Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* **279**:39925-39932.
238. **Yan S, Ding K, Zhang L, Sun H.** 2000. Complexation of Antimony(III) by Trypanothione. *Angew Chem Int* **39**:4260-4262.
239. **Yan S, Li F, Ding K, Sun H.** 2003. Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony(III) and trypanothione. *J Biol Inorg Chem* **8**:689-697.
240. **Yang R, Cui L, Hou YX, Riordan JR, Chang XB.** 2003. ATP binding to the first nucleotide binding domain of multidrug resistance-associated protein plays a regulatory role at low nucleotide concentration, whereas ATP hydrolysis at the second plays a dominant role in ATP-dependent leukotriene C4 transport. *J Biol Chem* **278**:30764-30771.
241. **Ye J, Osborne AR, Groll M, Rapoport TA.** 2004. RecA-like motor ATPases--lessons from structures. *Biochim Biophys Acta* **1659**:1-18.
242. **Zhang K, Hsu FF, Scott DA, Docampo R, Turk J, Beverley SM.** 2005. *Leishmania* salvage and remodelling of host sphingolipids in amastigote survival and acidocalcisome biogenesis. *Mol Microbiol* **55**:1566-1578.
243. **Zhou Y, Messier N, Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R.** 2004. *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. *J Biol Chem* **279**:37445-37451.
244. **Zijlstra EE, Musa AM, Khalil EA, el-Hassan IM, el-Hassan AM.** 2003. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* **3**:87-98.
245. **Zolnerciks JK, Andress EJ, Nicolaou M, Linton KJ.** 2011. Structure of ABC transporters. *Essays Biochem* **50**:43-61.