



Instituto de Parasitología y
Biomedicina “López-Neyra”



UNIVERSIDAD
DE GRANADA

Caracterización funcional del transportador ABCI3 de *Leishmania* *major*

Director de Tesis:

Dr. Francisco Gamarro Conde.

Memoria presentada por la Licenciada **Talia Arcari Rocca** para optar al grado de doctor por la Universidad de Granada.

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Talia Arcari Rocca
ISBN: 978-84-1306-008-8
URI: <http://hdl.handle.net/10481/53828>

D. FRANCISCO GAMARRO CONDE, Investigador Científico del Consejo Superior
de Investigaciones Científicas,

CERTIFICA:

Que el trabajo titulado “**Caracterización funcional del transportador ABCI3 de *Leishmania major***” ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (C.S.I.C.) de Granada, por **Talia Arcari Rocca**, licenciada en Bioquímica por la Universidad de República (Uruguay), para optar al grado de doctor por la Universidad de Granada.

Fdo. Dr. Francisco Gamarro Conde

Investigador Científico del C.S.I.C.

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" (C.S.I.C.), en Granada, y ha sido financiada con una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad (2010-2014), dentro del Proyecto Ref. SAF2012-34267 financiado por el Ministerio de Economía y Competitividad, Programa Nacional de Biomedicina, Subprograma SAF, titulado: "Implicación de los transportadores ABCG y otros transportadores ABC específicos de tripanosomátidos en la infectividad y resistencia a fármacos en *Leishmania*".

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

Arcari, T., Manzano, J.I., Gamarro, F. (2017) *ABCI3 Is a New Mitochondrial ABC transporter from Leishmania major Involved in Susceptibility to Antimonials and Infectivity*. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Dec; 61(12): e01115-17. doi: 10.1128/AAC.01115-17.

Índice

Resumen.....	15
Introducción.....	19
1. Leishmaniasis.....	21
1.1. Leishmaniasis canina.....	22
1.2. Coinfección con VIH.....	24
1.3. Manifestaciones clínicas de la enfermedad en humanos	24
1.4. Diagnóstico	26
1.5. Agente etiológico: <i>Leishmania spp.</i>	27
1.6. Ciclo de vida del parásito.....	29
1.7. Bioquímica y biología celular de tripanosomátidos.....	32
1.7.1. Organización genómica y regulación de la expresión génica en tripanosomátidos	32
1.7.2. Kinetoplasto.....	35
1.7.3. Glicosoma.....	35
1.7.4. Acidocalcisomas	36
1.7.5. Metabolismo redox	37
1.8. Tratamiento de la leishmaniasis	38
1.8.1. Antimoniales	38
1.8.2. Anfotericina B	41
1.8.3. Miltefosina.....	42
1.8.4. Paromomicina	43
1.8.5. Pentamidina.....	44
1.8.6. Otros fármacos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis.	44
1.8.7. Terapias combinadas.....	45
1.8.8. Nuevos fármacos, inmunoterapia y desarrollo de vacunas.....	46
2. Transportadores ABC	48
2.1. Generalidades	48
2.2. Estructura	48
2.3. Mecanismo de acción	51
2.4. Transportadores ABC en <i>Leishmania</i>	54
2.4.1. Subfamilia ABCA.....	54
2.4.2. Subfamilia ABCB.....	54
2.4.3. Subfamilia ABCC.....	55
2.4.4. Subfamilia ABCG	55

2.4.5. Subfamilia ABCI	57
Objetivos	59
Materiales y Métodos	63
1. Materiales	65
1.1. Soluciones de uso general	65
1.2. Reactivos para biología molecular	65
1.3. Soluciones para electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)	65
1.4. Soluciones para Western Blot	66
1.5. Soluciones para Southern Blot	66
1.6. Fármacos y reactivos para estudios funcionales	67
1.7. Líneas celulares y animales de experimentación	67
1.7.1. Bacterias	67
1.7.2. Parásitos	68
1.7.3. Ratones	68
1.8. Medios de cultivo	68
1.8.1. Medios de cultivo para bacterias	68
1.8.2. Medios de cultivo para parásitos	69
1.9. Plásmidos	69
1.9.1. Plásmidos de clonaje	69
1.9.2. Plásmidos de expresión en <i>Leishmania</i>	69
1.10. Antibióticos de selección para parásitos transfectantes	70
1.11. Anticuerpos	71
1.12. Oligonucleótidos	72
1.12.1. Oligonucleótidos utilizados para secuenciación	72
1.12.2. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen <i>ABCI3</i>	72
1.12.3. Oligonucleótidos utilizados en mutagénesis dirigida	73
1.12.4. Oligonucleótidos utilizados en qPCR	73
1.12.5. Oligonucleótidos utilizados para la generación de mutantes nulos de <i>ABCI3</i>	73
1.12.6. Oligonucleótidos utilizados para la obtención de sondas para Southern blot	73
1.12.7. Otros oligonucleótidos	74
1.13. Sondas empleadas para el marcaje de orgánulos celulares de <i>Leishmania</i> ..	74

1.14. Sondas empleadas para el estudio de alteraciones en la función mitocondrial	75
2. Métodos	75
2.1. Metodologías básicas de biología molecular	75
2.2. Cultivo de <i>Leishmania</i>	76
2.3. Transfección de <i>Leishmania</i>	76
2.4. Obtención de parásitos mutantes nulos para <i>ABCI3</i>	77
2.5. Obtención de parásitos mutantes nulos parciales complementados con una copia episomal de <i>ABCI3</i>	79
2.6. Análisis de la secuencia del gen <i>ABCI3</i> y predicción de la estructura del transportador <i>ABCI3</i> de <i>L. major</i>	79
2.7. Extracción de ácidos nucleicos.....	79
2.7.1. Aislamiento de ADN plasmídico de bacterias	79
2.7.2. Aislamiento de ADN genómico de <i>L. major</i>	80
2.7.3. Aislamiento de ARN total de <i>L. major</i>	80
2.8. Southern Blot	80
2.8.1. Separación de fragmentos de ADN genómico en geles de agarosa y transferencia a membranas de nylon.....	80
2.8.2. Marcaje de sondas de ADN con digoxigenina	81
2.8.3. Hibridación y revelado	81
2.9. Síntesis de ADNc.....	82
2.10. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).....	82
2.10.1. Determinación del número de copias de <i>ABCI3</i>	82
2.10.2. Determinación de los niveles de expresión de <i>ABCI3</i> en <i>L. major</i>	83
2.11. Mutagénesis dirigida.....	83
2.12. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE).....	83
2.13. Western Blot.....	84
2.14. Determinación de la localización celular de <i>ABCI3</i> en <i>L. major</i>	84
2.14.1. Microscopía de fluorescencia	84
2.14.2. Permeabilización de los parásitos con digitonina y digestión con tripsina	85
2.14.3. Biotinilación de proteínas de superficie de <i>Leishmania</i>	85
2.15. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC ₅₀) de fármacos en <i>Leishmania</i>	86
2.15. Determinación de la acumulación y eflujo de antimonio en <i>Leishmania</i> mediante ICP-MS.....	86

2.16. Acumulación de Zinc ^{II} -Mesoporfirina en líneas celulares de <i>Leishmania</i>	87
2.17. Determinación de los niveles de ATP en <i>Leishmania</i>	87
2.18. Determinación de alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial de <i>Leishmania</i>	87
2.19. Determinación de los niveles de ROS mitocondriales en <i>Leishmania</i>	88
2.20. Purificación de parásitos metacíclicos de <i>Leishmania</i>	88
2.21. Infección <i>in vitro</i> de macrófagos peritoneales de ratón con líneas de <i>L. major</i>	89

Resultados..... 91

1. Análisis predictivo de la estructura del transportador ABCI3 de <i>L. major</i>	93
2. Localización celular del transportador ABCI3 en <i>L. major</i>.	97
2.1. Determinación de la localización celular de ABCI3 mediante microscopía de fluorescencia	97
2.2. Determinación de la localización celular de ABCI3 mediante ensayos con digitonina y tripsina.	99
2.3. Determinación de la localización celular de ABCI3 mediante ensayos de biotinilación.....	100
3. Obtención de parásitos mutantes nulos parciales para <i>ABCI3</i>.....	101
4. Determinación del número de copias génicas de <i>ABCI3</i> de <i>L. major</i> ..	103
5. Determinación de los niveles de expresión de <i>ABCI3</i> en los parásitos <i>ABCI3</i>^{+/-} de <i>L. major</i>	104
6. Complementación de los parásitos <i>ABCI3</i>^{+/-} de <i>L. major</i>.....	105
7. Resistencia a fármacos y moléculas relacionadas.....	107
8. Acumulación y eflujo de Sb^{III} en líneas de <i>L. major</i>	110
9. Acumulación y toxicidad de porfirinas de Zn^{II} en líneas de <i>L. major</i>...	112
10. Análisis de la funcionalidad mitocondrial en líneas de <i>L. major</i>.....	113
10.1. Análisis de los niveles intracelulares de ATP.....	113
10.2. Determinación de alteraciones en el $\Delta\psi_m$ en líneas de <i>L. major</i>	114
10.3. Determinación de los niveles de ROS mitocondriales en líneas de <i>L. major</i>	115
11. Purificación de parásitos metacíclicos de líneas de <i>L. major</i>.....	116
12. Infectividad y supervivencia de las líneas de <i>L. major</i> en macrófagos peritoneales de ratón	117

Discusión	119
1. Situación actual de la Leishmaniasis	121
2. Transportadores ABC	122
3. Análisis de secuencia y predicción de topología del transportador ABCI3	123
4. Localización celular del transportador ABCI3	125
5. Caracterización funcional del transportador ABCI3	127
5.1. Caracterización de parásitos <i>L. major</i> que sobreexpresan ABCI3 y ABCI3 ^{K/M}	127
5.2. Obtención de parásitos <i>L. major</i> mutantes nulos parciales, ABCI3 ^{+/-}	128
5.2.1. Complementación de los parásitos ABCI3 ^{+/-}	130
6. Resistencia a antimonio en las líneas de <i>L. major</i>	132
7. Análisis de la funcionalidad mitocondrial en líneas de <i>L. major</i>	134
8. Metaciclogénesis, infectividad y supervivencia de los parásitos ABCI3^{+/-} en macrófagos peritoneales de ratón	135
Conclusiones	139
Bibliografía	143
Anexo.....	161

Resumen

La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades producidas por parásitos del género *Leishmania*. Posee una distribución mundial y se estima que 350 millones de personas estarían en peligro de contraer la enfermedad. En 2015 se identificaron casi 200.000 nuevos casos de leishmaniasis cutánea, y casi 24.000 casos de leishmaniasis visceral, la forma más grave de la enfermedad. La leishmaniasis representa un grave problema sanitario a nivel mundial. No se dispone de vacunas eficaces frente a la enfermedad y el arsenal de fármacos disponibles para su tratamiento es muy limitado. Además, los fármacos leishmanicidas poseen una elevada toxicidad y la emergencia de resistencias frente a los mismos hacen que la identificación de nuevas dianas terapéuticas específicas de *Leishmania spp.* sea una cuestión prioritaria para poder combatir la enfermedad.

Los transportadores ABC son una de las familias de proteínas más ampliamente distribuidas, encontrándose en organismos pertenecientes a todos los reinos y desempeñando una gran variedad de funciones. Con 42 ORFs, *Leishmania* es el parásito protozoario con el mayor número de genes que codifican para transportadores ABC. Estos se clasifican en 8 subfamilias, denominadas ABCA-ABCH y una nueva subfamilia exclusiva de tripanosomátidos, que poseen una baja identidad de secuencia con transportadores ABC de otros organismos, que hemos denominado ABCI. Los transportadores ABC de *Leishmania* que han sido caracterizados hasta la fecha han demostrado estar implicados en numerosos procesos biológicos, tales como el transporte de fosfolípidos, el tráfico de grupo hemo y la resistencia a fármacos.

En el presente trabajo hemos realizado la caracterización funcional de ABCI3, un transportador ABC de *Leishmania major* que pertenece a la subfamilia ABCI. Para intentar determinar la relevancia de este transportador en procesos biológicos esenciales para el parásito *L. major*, decidimos determinar su localización celular, además de estudiar su implicación en la resistencia a fármacos leishmanicidas y en la infectividad en macrófagos peritoneales de ratón.

Al igual que el resto de los integrantes de la subfamilia ABCI, el transportador ABCI3 es un hemitransportador, constituido por un dominio transmembrana y un dominio de unión a nucleótidos que posee los motivos conservados característicos de esta familia de proteínas. Los resultados de los distintos ensayos de localización celular mostraron que el transportador se localiza mayoritariamente en la membrana

mitocondrial externa, además de ubicarse parcialmente en la membrana plasmática del parásito. Para realizar la caracterización funcional del transportador utilizamos líneas de *L. major* que sobreexpresaban la proteína ABCI3 wild-type, o una versión mutante inactiva, ABCI3^{K/M}. Además, obtuvimos una línea mutante nula parcial, en la que se sustituyó una copia del gen ABI3 por un cassette de resistencia a higromicina (ABCI3^{+/-}), y una línea complementada con una copia episomal de ABCI3, para compensar por la pérdida de función (ABCI3^{+/-}::3xFABCI3pIR1SAT).

Los ensayos de resistencia a fármacos mostraron que los parásitos ABCI3^{+/-} eran casi cinco veces más resistentes a Sb^{III} y este fenotipo de resistencia se revirtió parcialmente en los parásitos complementados ABCI3^{+/-}::3xFABCI3pIR1SAT, lo que estaría indicándonos que el fenotipo observado es consecuencia directa de la delección parcial de ABCI3. Además, el fenotipo de resistencia está asociado a una menor acumulación del metal en los promastigotes ABCI3^{+/-}. Los estudios realizados para determinar la presencia de alteraciones en el funcionamiento mitocondrial de los parásitos ABCI3^{+/-} no mostraron diferencias en los niveles de ATP basales y en el potencial de membrana mitocondrial. Sin embargo, los parásitos ABCI3^{+/-} presentaban unos niveles basales de ROS mitocondriales más bajos que los parásitos wild-type. En los ensayos de infectividad realizados en macrófagos peritoneales de ratón, observamos que los amastigotes ABCI3^{+/-} eran capaces de soportar mejor el ambiente intracelular hostil del macrófago que los parásitos controles, siendo además más resistentes al fármaco Pentostam[®] que los parásitos wild-type.

Nuestros resultados muestran que el transportador ABCI3 estaría directamente implicado en el transporte de Sb^{III} al interior de la mitocondria, y por lo tanto contribuye a la susceptibilidad de *L. major* al Sb^{III}. Aunque desconocemos su sustrato biológico, el transportador ABCI3 es el único transportador ABC descrito hasta la fecha involucrado en la susceptibilidad a antimonio en *Leishmania*, confiriéndole a los parásitos resistencia a dicho metal cuando se deleciona parcialmente el gen.

Introducción

1. Leishmaniasis

Los parásitos protozoos pertenecientes al género *Leishmania* son los agentes causantes de un grupo de enfermedades zoonóticas y antroponóticas conocido en su conjunto como leishmaniasis. Se han descrito más de 50 especies de *Leishmania* de las cuales por lo menos 20 provocan la enfermedad en humanos, siendo transmitida por la picadura de insectos hematófagos de la subfamilia de los flebotomos [1]. La mortalidad debida a la leishmaniasis es la tercera causa de muerte entre las enfermedades parasitarias, superada únicamente por la malaria y la esquistosomiasis [2].

Se pueden distinguir 3 tipos principales de la enfermedad: leishmaniasis visceral (LV, también conocida como kala-azar); la leishmaniasis cutánea (LC), y la leishmaniasis mucocutánea (LMC) [3], que difieren en la inmunopatología, grado de morbilidad y mortalidad de la enfermedad [4].

En términos absolutos, la leishmaniasis posee una distribución mundial. En 2015 se identificaron casi 200.000 nuevos casos de LC y 24.000 de LV, además la LC es endémica en 87 países y la LV en 75. La LC representa más del 90% de los casos y está distribuida principalmente en la región del Mediterráneo oriental (70%) y en las Américas (23%) (Figura 1A), mientras que la LV, la forma más grave de la enfermedad, se encuentra distribuida principalmente en tres regiones: el este de África (40%), el subcontinente Indio (39%) y Brasil (14%) (Figura 1B) [5]. Junto con la tripanosomiasis africana o enfermedad del sueño (producida por *Trypanosoma brucei*), y la enfermedad de Chagas (producida por *Trypanosoma cruzi*), la leishmaniasis es una de las enfermedades tropicales “olvidadas”, producidas por parásitos pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*. Estas enfermedades representan un serio problema de salud pública global, especialmente en países empobrecidos o en vías de desarrollo.

El aumento del número de personas inmunodeprimidas debido al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), trasplantes y tratamientos quimioterapéuticos, y las terapias biológicas recientemente introducidas para tratar enfermedades inflamatorias crónicas, ha provocado un aumento de la leishmaniasis en Europa [6]. Igualmente, el aumento de los viajes internacionales ha contribuido a la aparición de casos de leishmaniasis en países no endémicos [7].

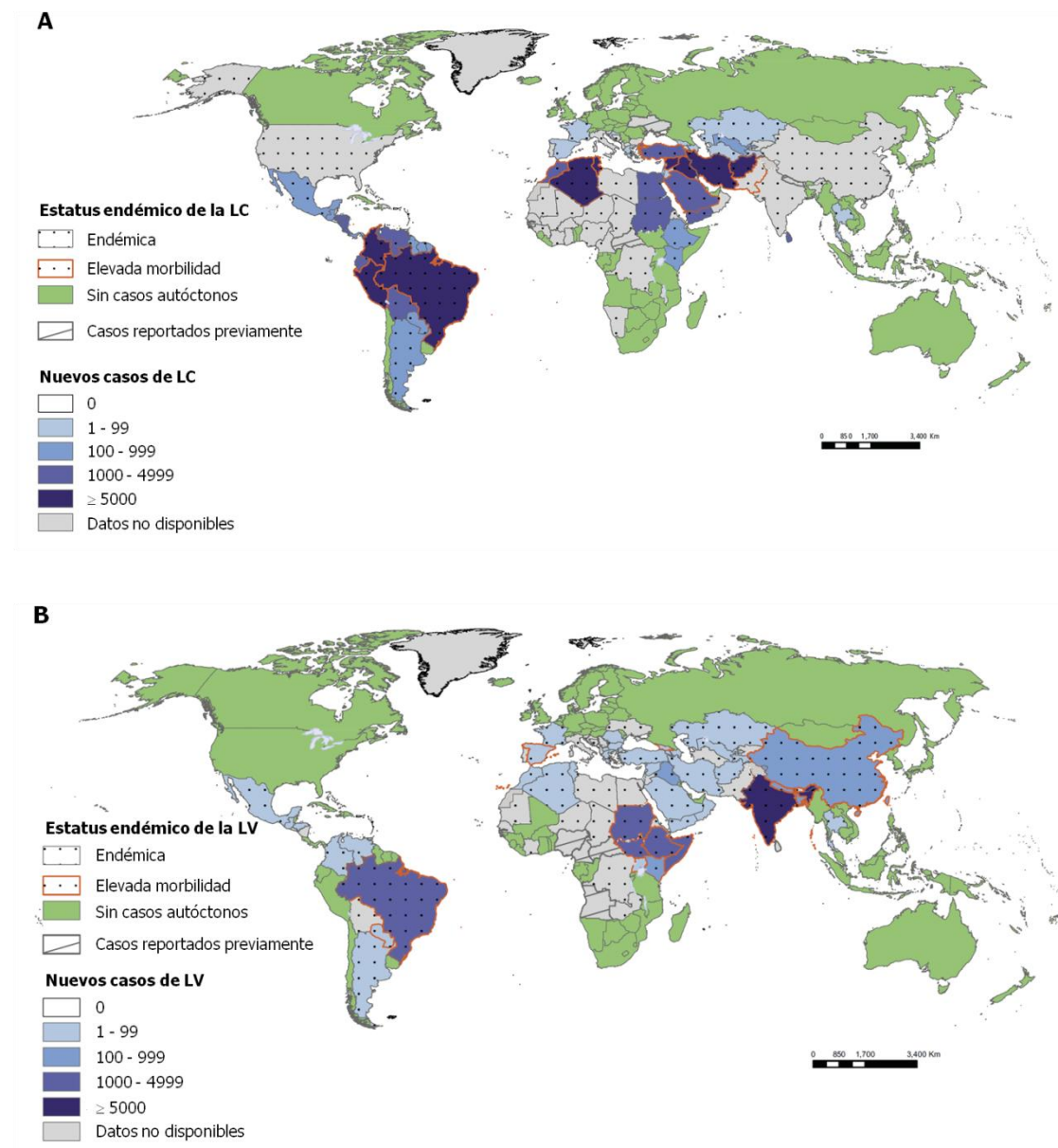


Figura 1. Distribución geográfica de nuevos casos de leishmaniasis en 2015. A. Leishmaniasis cutánea y **B.** Leishmaniasis visceral. Adaptado de [5].

1.1. Leishmaniasis canina

La leishmaniasis canina (LCan) es endémica en el sur de Europa, el norte de África, América del Sur, Centroamérica y Asia, y se está extendiendo a otras regiones, constituyendo el principal reservorio para la LV humana. Afecta cada año a aproximadamente 2,5 millones de perros domésticos en la Europa Mediterránea y peri-Mediterránea [8], siendo la prevalencia promedio de la enfermedad de aproximadamente el 10% en áreas endémicas de Europa [9]. En Sudamérica la seroprevalencia es mayor, alcanzando valores superiores al 30% en regiones de

Venezuela y Brasil [8]. Recientemente se han registrado también casos en varios países del norte de Europa [10]. El calentamiento global probablemente favorezca la emergencia de LCan en áreas donde hasta ahora no estaba presente el vector [11]. *Leishmania infantum* es el principal agente etiológico de la LCan en el viejo Mundo, mientras que varias especies de *Leishmania* serían las responsables de la enfermedad en el nuevo Mundo, siendo la principal *Leishmania chagasi* [9].

El diagnóstico es complejo debido a que la enfermedad presenta un espectro muy amplio de manifestaciones clínicas y muchas veces los perros infectados no desarrollan síntomas (Figura 2) [9].



Figura 2. Distintas manifestaciones clínicas de la leishmaniasis canina. a) queratoconjuntivitis con dermatitis periocular, **b)** lesiones dérmicas faciales, **c)** epistaxis (hemorragia nasal), **d)** onicogripos (hipertrofia y curvatura anormal de las uñas) y **e)** lesión ulcerosa en la oreja. Adaptado de [12].

Actualmente, el tratamiento de la LCan está basado en monoterapia con fármacos que contienen Sb^V o en terapia combinatorial, administrándose junto con el compuesto leishmanioestático alopurinol [9]. Para evitar la propagación de la enfermedad la investigación en LCan deberá centrarse en la evaluación y desarrollo de insecticidas, vacunas y métodos de diagnóstico más efectivos que permitan reducir la transmisión de la enfermedad entre perros y humanos [9]. Igualmente, la búsqueda de fármacos específicos para la LCan es una prioridad para evitar la aparición de resistencias a los fármacos en uso frente a la leishmaniasis en humanos.

1.2. Coinfección con VIH

La LV se ha convertido en una infección oportunista importante en pacientes infectados con el VIH. La interacción con VIH aumenta el riesgo de desarrollar LV más de 100 veces, aumenta el fallo terapéutico y la probabilidad de recidivas es alta [13]. Las dos enfermedades se refuerzan mutuamente: los pacientes con VIH son particularmente vulnerables a la LV, mientras que la LV acelera la replicación del virus y la progresión del SIDA [14]. Hasta la fecha, 35 países han informado de casos de coinfección LV/VIH a la Organización Mundial de la Salud [15]. Desde la introducción de la terapia antirretroviral contra el VIH se ha observado una marcada disminución de los casos de coinfección. Sin embargo, en la India la prevalencia de la coinfección LV/VIH ha aumentado del 0,88% en el año 2000 al 2,18% en 2006 [15]. En Latinoamérica, más precisamente en Brasil, la incidencia de la coinfección ha aumentado del 0,7% en 2001 al 8,5% in 2012 [16]. La eficacia de los fármacos disponibles para el tratamiento de la leishmaniasis es menor en pacientes que presentan coinfección LV/VIH comparado con pacientes inmunocompetentes [17, 18].

1.3. Manifestaciones clínicas de la enfermedad en humanos

Las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis pueden ser muy diversas y dependen de varios factores intrínsecos relacionados con las especies de *Leishmania* y con el sistema inmunitario del hospedador.

Conocida también como “kala-azar” o fiebre dum dum, la LV representa la forma más grave de la enfermedad y en la mayoría de los casos puede provocar la muerte del paciente si este no recibe el tratamiento adecuado (Figura 3A). En Latinoamérica y el norte de África, *Leishmania infantum* (*L. infantum*) es la especie responsable de los casos de LV, mientras que en el subcontinente Indio y el este de África, es *Leishmania donovani* (*L. donovani*) el agente etiológico de esta variante de la enfermedad. La LV es una infección crónica; el período de incubación puede durar entre 10 días y 1 año [19], y la diseminación de los parásitos afecta a numerosos órganos internos, tales como el hígado, el bazo y la médula ósea [20]. Los signos clínicos característicos son fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y pancitopenia [19].

La LC es la forma más común de la enfermedad y representa el 90% de los casos. Varias especies de *Leishmania* pueden provocarla en humanos, entre las que se

encuentran *Leishmania major* (*L. major*) y *Leishmania tropica* (*L. tropica*) en el Viejo Mundo y *Leishmania braziliensis* (*L. braziliensis*), *Leishmania amazonensis* (*L. amazonensis*) y *Leishmania mexicana* (*L. mexicana*) en el Nuevo Mundo [21]. Durante la LC una pápula eritematosa aparece en el sitio de la picadura. Después de unos días, esta se convierte en una vesícula, posteriormente en una pústula, y finalmente en una úlcera, que puede autocicatrizarse sin tratamiento, aunque puede tardar meses y dejar cicatrices considerables (Figura 3C) [22]. La terminología de las diferentes formas clínicas que se observan para la LC suele ser extensa y a menudo confusa. Se denomina también leishmaniasis tegumentaria a todas las manifestaciones de la enfermedad que involucran lesiones en la piel del paciente [22]. Estas incluyen la leishmaniasis dérmica post-kala-azar (LDPK), la leishmaniasis cutánea difusa (LCD), la leishmaniasis diseminada (LD) y la leishmaniasis mucocutánea (LMC).

La variante LDPK de la enfermedad es una complicación de la LV, provocada por *L. donovani* [23]. Las lesiones que se observan en la piel generalmente no forman úlceras y persisten durante varios meses (Figura 3B). Los pacientes con LDPK poseen una baja carga parasitaria en las lesiones por lo que podrían ser reservorio del parásito, manteniendo la transmisión continua de la enfermedad en algunas regiones [22].



Figura 3. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis en humanos. A. Leishmaniasis visceral (LV); B. Leishmaniasis dérmica post-kala azar (LDPK), C. Leishmaniasis cutánea, D. Leishmaniasis mucocutánea (LMC) y E. Leishmaniasis cutánea difusa (LCD).

La LD se caracteriza por la aparición de múltiples lesiones pleomórficas en 2 o más áreas del cuerpo no contiguas, pudiendo ocurrir también lesiones en mucosas [24]. Los pacientes con LD han demostrado una mayor tendencia a desarrollar una

enfermedad crónica, además de mayores tasas de recidivas y resistencia a los tratamientos utilizados habitualmente para la leishmaniasis cutánea [25]. La LCD se diferencia de la LD por la presencia de múltiples lesiones nodulares no ulcerosas (Figura 3E), con una carga alta de parásitos en macrófagos y la ausencia de reacción de hipersensibilidad retardada al antígeno de *Leishmania* en el test de piel [22]. Por último, la variante LMC se caracteriza por la habilidad del parásito para diseminarse por vía linfática o sanguínea al tejido mucoso (Figura 3D). Típicamente comienza con la inflamación de la mucosa nasal, seguida de ulceraciones y perforación del tabique nasal [21]. Existe evidencia de la asociación entre la LMC y una infección por *Leishmania* primaria que no fue tratada adecuadamente [20].

1.4. Diagnóstico

Actualmente, la mayoría de los métodos disponibles para el diagnóstico de la leishmaniasis están restringidos a centros de investigación o centros de salud de referencia. Existen diferentes metodologías con distintas capacidades para detectar, identificar y cuantificar distintas especies de *Leishmania*.

La detección del parásito al microscopio utilizando biopsias de lesiones dérmicas para la LC o aspirados de bazo, médula ósea y nodos linfáticos, en el caso de la LV, es un método bastante sencillo, barato y rápido para la detección de la enfermedad. Sin embargo, es un método invasivo, que sólo aporta información cuantitativa parcial y no permite la discriminación entre especies de *Leishmania* [3]. El cultivo *in vitro* de promastigotes obtenidos a partir de biopsias y muestras de tejido es una técnica importante para el diagnóstico de la enfermedad. Desafortunadamente, la eficiencia de la recuperación de parásitos en cultivo rara vez supera el 70% [3], es un método costoso, que requiere mucho tiempo y es necesario equipamiento de laboratorio específico para dicha tarea.

El test de Montenegro o intradermorreacción (LST) mide la reacción de hipersensibilidad retardada al inyectar, a nivel subdérmico, una suspensión de antígenos del parásito preparada a partir de parásitos muertos. La reacción tarda entre 48 y 72 h y se considera positiva si el diámetro del nódulo generado en la piel es mayor a 5 mm [26]. El test es útil en el diagnóstico de infecciones que llevan mucho tiempo, cuando el número de parásitos es muy bajo y son difíciles de detectar. Sin embargo no permite discriminar entre infecciones pasadas y en curso [27].

Una serie de métodos serológicos basados en ensayos de inmunodetección y aglutinación son fáciles de realizar y poseen una elevada sensibilidad, pero no son capaces de distinguir entre infecciones pasadas y actuales y no son concluyentes en el diagnóstico de algunas variantes de la LC [28, 29].

Ensayos de biología molecular como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR), han demostrado poseer una alta sensibilidad y especificidad en el diagnóstico y seguimiento del tratamiento de la LV [30, 31]. Al igual que con otros métodos de diagnóstico, se necesita equipamiento específico y personal entrenado para realizar este tipo de ensayos. Recientemente se ha comenzado a utilizar un método de amplificación de ADN a temperatura constante denominado LAMP (del inglés "*Loop-mediated isothermal amplification*"), que es más rápido, barato y sencillo que una PCR convencional, lo que permite su utilización para diagnóstico de rutina [32]. Además, ha demostrado ser más sensible que una PCR convencional y se ha utilizado para distinguir entre distintas especies de *Leishmania* [33].

A pesar de los avances significativos en el diagnóstico de la leishmaniasis, no existe todavía un método de diagnóstico estándar que pueda utilizarse en la detección y diagnóstico de la enfermedad. Por lo tanto sigue siendo necesario mejorar los métodos moleculares de diagnóstico para que sean más precisos, rápidos, baratos, sensibles y específicos, y puedan ser utilizados en centros de salud y en regiones endémicas por igual.

1.5. Agente etiológico: *Leishmania* spp.

Los protozoos parásitos flagelados del género *Leishmania* pertenecen a la clase *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*. Desde el descubrimiento de la leishmaniasis y su agente etiológico en 1898 y 1901 por P. Borovsky, W.B. Leishman y C. Donovan [34], las metodologías utilizadas para distinguir diferentes especies de *Leishmania* han evolucionado considerablemente. Recientemente se ha propuesto una nueva clasificación, basada en la combinación de datos moleculares, que divide a las especies de *Leishmania* en dos linajes filogenéticos distintos denominados secciones: *Euleishmania* y *Paraleishmania* [1].

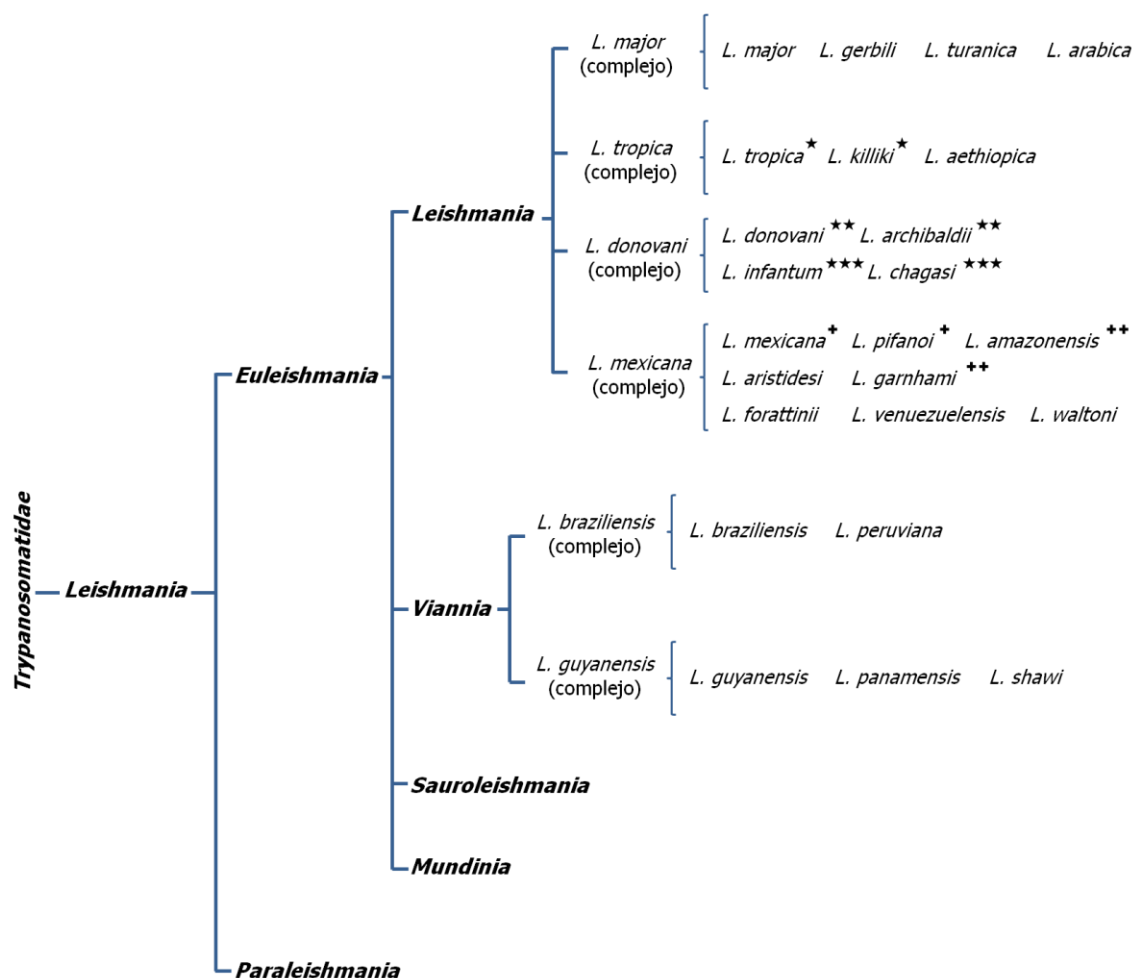


Figura 4. Clasificación de las especies de *Leishmania*. Se incluyen todas las especies pertenecientes a los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*. Los símbolos indican nombres de especies que son sinónimos de otra descrita anteriormente. No se han incluido las especies pertenecientes a los géneros *Sauroleishmania* y *Mundinia*, y tampoco a las de la sección *Paraleishmania*. Adaptado de [3].

Hasta la fecha se han descrito 54 especies de *Leishmania*. La sección *Euleishmania* incluye 4 subgéneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* y *Mundinia*; 31 de estas especies son parásitos de mamíferos y 20 son patógenos humanos [3]. Los subgéneros *Leishmania* y *Viannia* incluyen a la mayoría de las especies que son patógenos humanos, entre las que se encuentran *L. major*, *L. tropica*, *L. donovani*, *L. mexicana* y *L. braziliensis* (*Viannia*) (Figura 4).

El vector biológico de *Leishmania spp.* son las hembras de la mosca de la arena, insectos flebotomos del orden *Diptera*, familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae* (Figura 5). Aunque se han descrito aproximadamente 800 especies de flebotomos, solamente 30 han demostrado ser capaces de actuar como vectores en la transmisión de

la leishmaniasis [35]. Estas pertenecen a los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo (Europa, Asia y África) y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo.



Figura 5. Díptero hembra del género *Phlebotomus*.

1.6. Ciclo de vida del parásito

Leishmania posee un ciclo de vida digenético que incluye un hospedador mamífero y un insecto vector. La supervivencia del parásito depende de que ocurra la transmisión zoonótica o antroponótica exitosa entre el hospedador reservorio y el vector. En el ciclo antroponótico de transmisión de la enfermedad, el hombre actúa como hospedador y reservorio al mismo tiempo, mientras que en el ciclo zoonótico, el reservorio principal de la enfermedad son los perros y algunos mamíferos salvajes [36].

Durante su ciclo de vida, el parásito debe adaptarse sucesivamente a diferentes entornos en los que estará expuesto a condiciones ambientales muy diferentes de pH, temperatura, disponibilidad de nutrientes y oxígeno. Para adaptarse y sobrevivir a estos cambios, el parásito alterna entre distintas formas altamente especializadas y adaptadas a cada uno de estos entornos. Estos estadios se pueden distinguir por sus requerimientos nutricionales, su capacidad y tasa de replicación, la expresión de moléculas de superficie y también su morfología [37].

Podemos identificar al menos 3 formas morfológicamente distintas del parásito. La forma promastigote extracelular y alargada (15-20 μ M), se desarrolla en el tracto digestivo medio de las hembras de los flebotomos (Figura 6). Durante un proceso de diferenciación denominado metaciclologénesis, el parásito experimenta una serie de cambios moleculares y bioquímicos transformándose en la forma infectiva de mamíferos, los promastigotes metacíclicos. Esta forma se caracteriza por poseer una gran movilidad debido a su largo flagelo (hasta el doble del tamaño del cuerpo celular), pero a

diferencia de las otras 2 formas, los promastigotes metacíclicos son una forma quiescente no replicativa [38]. Una vez establecida la infección, el parásito se diferencia a la forma amastigote, que está presente en las células del sistema retículo endotelial del hospedador mamífero (Figura 6). Su tamaño es menor (2-5 μm), posee una forma redondeada y un flagelo muy corto e inmóvil que apenas emerge del bolsillo flagelar [39].

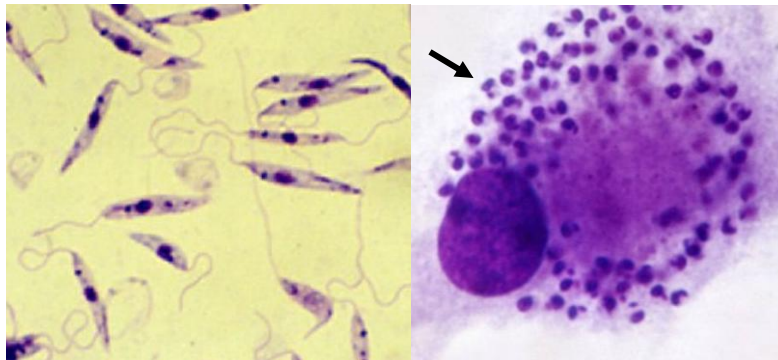


Figura 6. Formas promastigotes extracelulares (izquierda) y amastigotes intracelulares (flecha) de *Leishmania* en el interior de un macrófago (derecha).

El ciclo se inicia cuando hembras del insecto vector inoculan parásitos de la forma promastigota metacíclica al picar al hospedador vertebrado y estos son fagocitados por células del sistema mononuclear del mamífero. Una vez dentro de la célula hospedadora, el parásito sufre una profunda transformación convirtiéndose a la forma amastigote, la cual se divide por fisión binaria dentro de la vacuola parasitófora hasta producir la lisis de la célula hospedadora; dicho proceso favorece la infección de otros macrófagos próximos, así como de células fagocíticas ubicadas en otros tejidos tras diseminarse la infección. El ciclo se completa cuando otro flebotomo ingiere amastigotes al picar a un hospedador infectado. Finalmente estos se transforman nuevamente en promastigotes en el tracto digestivo del insecto (Figura 7).

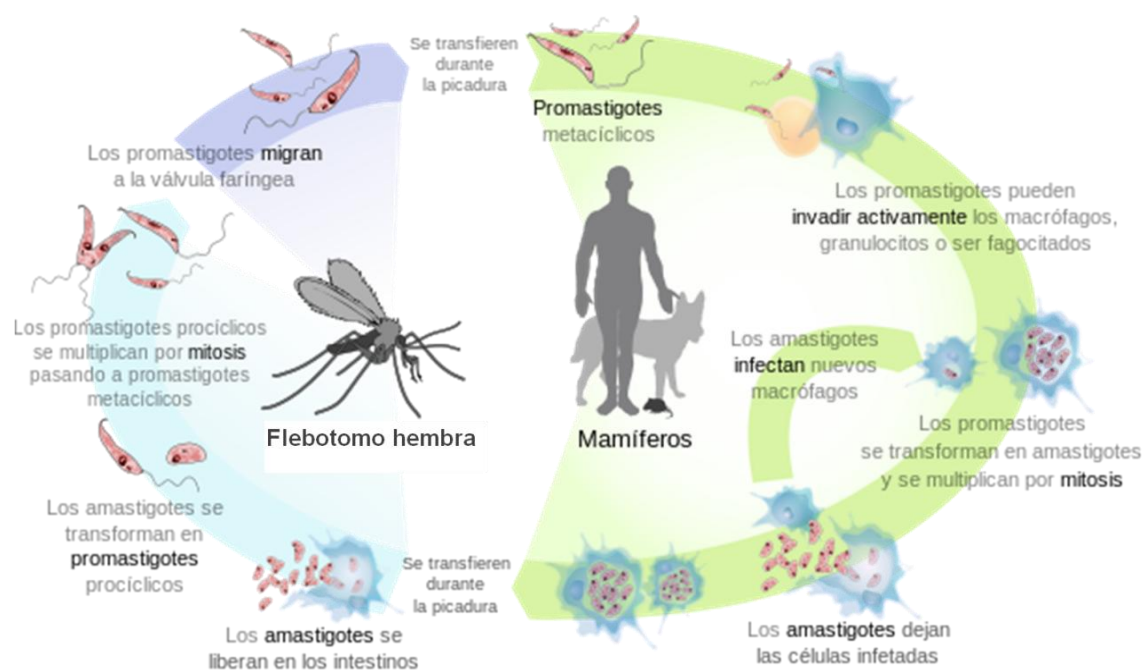


Figura 7. Ciclo biológico de *Leishmania* spp. Adaptado de:

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leishmaniasis_life_cycle_diagram-es.svg

Uno de los principales desafíos a los que se enfrentan los promastigotes metacíclicos después de la transmisión al hospedador mamífero, es conseguir establecerse y replicarse en el interior de macrófagos, sin activar los mecanismos de la respuesta inmunitaria innata del hospedador. Una cubierta de lipofosfoglicano (LPG) protege al parásito frente a la lisis mediada por el complemento, al mismo tiempo que induce la activación del complemento, promoviendo la fagocitosis del parásito [40]. Además el LPG retrasa la formación de fagolisosomas, permitiéndole al parásito diferenciarse a su forma amastigote intracelular [41]. La metaloproteasa dependiente de zinc, gp63, juega un papel fundamental en la evasión de la respuesta inmunológica del parásito. Al igual que los LPGs, protege al parásito de la lisis mediada por complemento y se une a receptores del macrófago, actuando como opsonina y favoreciendo la fagocitosis del mismo [42]. Otro mecanismo que utiliza el parásito para inhibir la actividad microbicida del macrófago es la exposición de moléculas de fosfatidilserina en su superficie, que son reconocidas por receptores implicados en la eliminación de células apoptóticas [43].

En 2003, Laskay *et al.* sugirieron que los neutrófilos podrían actuar como “caballos de Troya” en la primera fase de la infección [44]. Los neutrófilos infectados morirían por apoptosis, liberando interleuquinas que favorecen la atracción por quimiotaxis de otros neutrófilos y macrófagos [45]. Además, los neutrófilos son capaces de producir unas redes extracelulares (NETs, del inglés, “neutrophil extracellular traps”)

compuestas por ADN y proteínas con propiedades antimicrobianas tales como la elastasa, histonas o gránulos tóxicos [46]. Sin embargo, el papel de los neutrófilos en el desarrollo de la enfermedad parece ser específico de cada especie de *Leishmania*. Mientras que en *L. amazonensis* los parásitos son eliminados por los NETs, *L. donovani* y *L. infantum* son resistentes a las mismas e incluso podrían beneficiarse de la formación de dichas estructuras [47, 48].

Una serie de factores, como el aumento de la temperatura y la disminución del pH, son esenciales para iniciar el proceso de diferenciación del parásito a amastigotes intracelulares. Además, la adquisición de hierro mediada por el transportador LIT1 y la consiguiente generación de peróxido de hidrógeno, contribuyen a desencadenar la diferenciación de *L. amazonensis* [49]. Los amastigotes son capaces de replicarse y sobrevivir en la vacuola parasitófora, desencadenando infecciones latentes prolongadas que pueden llevar a la reactivación de la enfermedad años o incluso décadas después de la infección primaria. El parásito reprograma los mecanismos de defensa del macrófago, tales como el daño mediado por estrés oxidativo, la presentación de antígeno, la activación de la respuesta inmunológica o la apoptosis [50, 51]. Además, los mecanismos de supervivencia del parásito modifican al fagosoma, mejorando la disponibilidad de fuentes de carbono y nutrientes esenciales [52].

1.7. Bioquímica y biología celular de tripanosomátidos.

1.7.1. Organización genómica y regulación de la expresión génica en tripanosomátidos

Desde la secuenciación del genoma completo de *L. major* en 2005 [53], se han secuenciado los genomas de numerosas especies de *Leishmania*. Los genomas de las diferentes especies varían en tamaño desde 29 Mb (*L. amazonensis*) a 33 Mb (*L. major* y otras especies) y poseen un número de cromosomas variable (entre 34 y 36). El genoma haploide de *L. major* posee 32,8 Mb organizado en 36 cromosomas. El análisis de la secuencia completa ha permitido identificar 911 genes que codifican ARN, 97 pseudogenes y 8298 genes que codifican proteínas [54]. A pesar de la gran variabilidad de patogenicidad y tropismo de las diferentes especies, sus genomas poseen un elevado grado de conservación, tanto a nivel de secuencia génica, como en la sinténia (mayor del 99% de los genes para *L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis*) [55]. Además, los genomas de *Leishmania spp.* se caracterizan por poseer una elevada densidad génica y un elevado contenido en pares GC (aproximadamente el 60%) [54].

Si tenemos en cuenta la ploidía de estos parásitos, diferentes estudios han demostrado que *Leishmania* no es un organismo estrictamente diploide, sino aneuploide. El genoma de *L. major* posee una característica particular que se ha denominado aneuploidía mosaico [56]. En una población celular se observa un patrón heterogéneo de ploidías a nivel de células individuales, lo que constituye un mosaico genético, donde diferentes individuos poseen distinto número de copias de uno o más cromosomas. Aunque se describió originalmente en *L. major*, este fenómeno se ha observado en varios subgéneros de *Leishmania* y en otros tripanosomátidos [57], pudiendo tener consecuencias relevantes para comprender facetas de la biología del parásito que permanecen todavía inexploradas. En el caso de *Leishmania* se ha relacionado la presencia de cromosomas supernumerarios o la pérdida de cromosomas con la resistencia a fármacos leishmanicidas [58, 59].

A diferencia de la mayoría de los organismos eucariotas, los tripanosomátidos no regulan la expresión génica de genes individuales utilizando promotores específicos para la ARN polimerasa II. Además, sus genes carecen de intrones (salvo contadas excepciones), por lo que tampoco regulan su expresión génica mediante cis-splicing. En su lugar, decenas o cientos de genes no relacionados se encuentran formando grupos (clusters) en una misma cadena de ADN y en una misma orientación. Estos grupos de genes dan lugar a largos transcritos policistrónicos que son procesados posteriormente dando lugar a los ARNm maduros. Este procesamiento del transcrito primario para dar ARNm maduros se denomina trans-splicing y consiste en la adición de una estructura de 39 nucleótidos denominada spliced leader (SL) o mini exón al extremo 5' de cada ARNm y una cola de poliadeninas al extremo 3' de cada ARNm maduro (Figura 8).

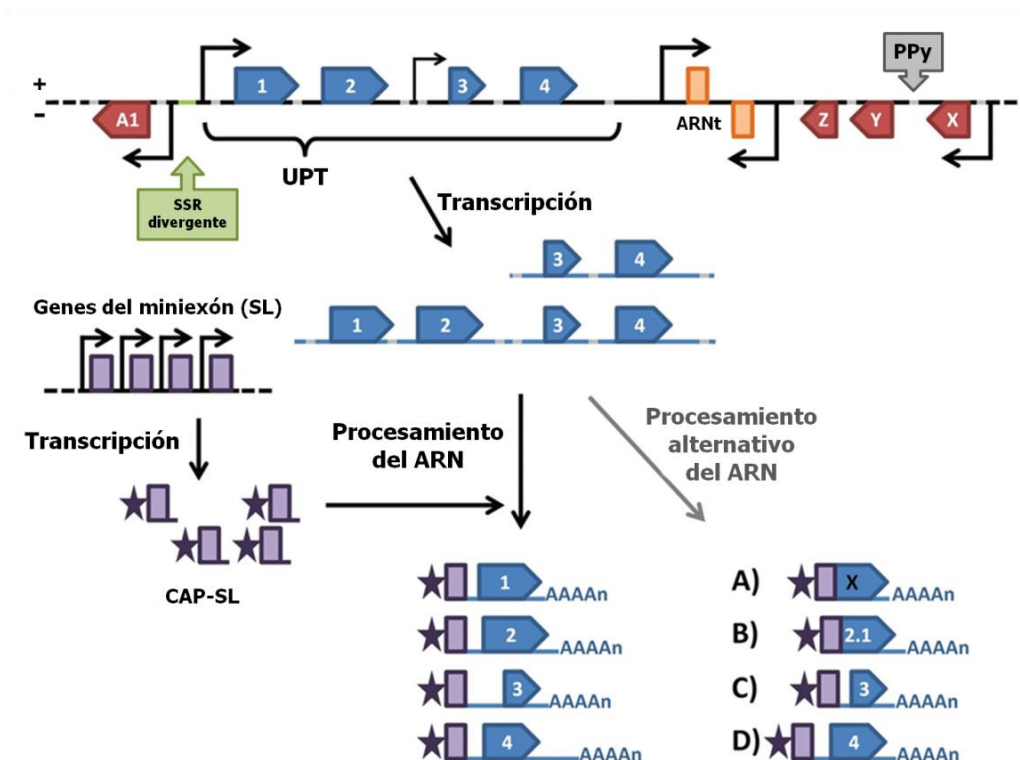


Figura 8. Expresión génica en tripanosomátidos. Grupos de genes no relacionados forman unidades policistrónicas de transcripción (UPT) separadas por regiones de cambio de hebra (SSR, del inglés "*strand switch region*") que pueden ser convergentes o divergentes. Los sitios de inicio de la transcripción se ubican generalmente al inicio de una UPT (flechas). El procesamiento de los ARNm policistrónicos involucra la reacción de trans-splicing (adición de CAP-SL) acoplada a la poliadenilación. Estas reacciones están guiadas por trectos de polipirimidinas (PPy) presentes en las regiones intergénicas. Los ARNm policistrónicos pueden sufrir procesamiento alternativo, cambiándose el codón de inicio y alterándose la traducción de la proteína. Adaptado de [60].

Este mecanismo no es exclusivo de tripanosomátidos y se ha observado también en otros organismos, desde dinoflagelados a nemátodos [61]. El sitio de adición del SL contiene un dinucleótido consenso AG que está precedido por una secuencia rica en polipirimidinas y una G en la posición -3 [62]. El sitio de adición del SL del gen corriente abajo determina el sitio de poliadenilación para el gen corriente arriba [63].

Los niveles de ARNm de genes individuales dependen en gran medida del número de copias del gen y de la tasa de degradación del ARNm. Secuencias conservadas en las regiones 3'UTR determinan la estabilidad del ARNm, participan en el reclutamiento de la maquinaria de degradación celular y en la traducción [64, 65]. Por lo tanto, la expresión génica está regulada principalmente por el número de copias génicas, el procesamiento post-transcripcional del ARNm, la tasa de degradación de los ARNm y la eficiencia de la traducción [66].

1.7.2. Kinetoplasto

Los organismos del orden *Kinetoplastida* deben su nombre a la estructura particular que posee su ADN mitocondrial, denominado kinetoplastido (kADN). Topológicamente, el kADN está constituido por miles de estructuras circulares concatenadas denominadas maxicírculos y minicírculos (Figura 9B). Cada kADN está compuesto por un par de docenas de maxicírculos, que poseen un tamaño de entre 20 y 40 Kb, y varios miles de minicírculos de entre 0,5 y 10 Kb [67]. Los maxicírculos son análogos a los ADN mitocondriales de otros organismos eucariotas, codifican ARNr y proteínas de la cadena respiratoria mitocondrial.

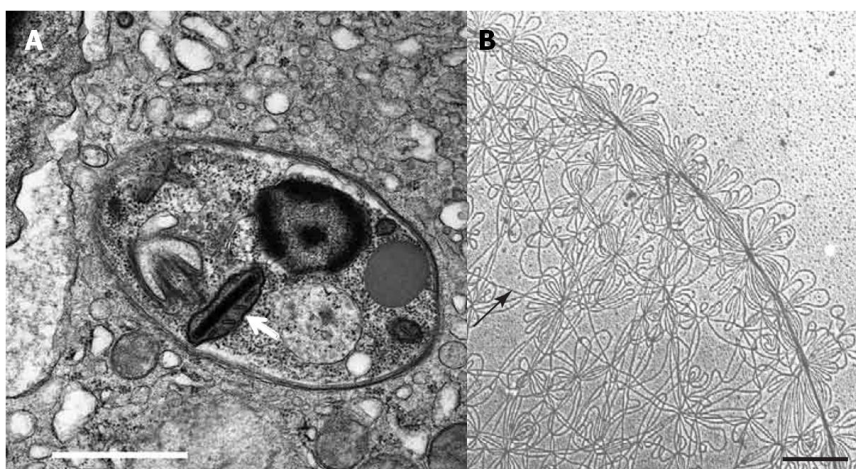


Figura 9. Estructura del kADN de tripanosomátidos. A. Microscopía electrónica de transmisión donde se observa un amastigote de *Leishmania spp.* y el kinetoplasto (flecha) (escala=1 μ m). **B.** Microscopía electrónica de transmisión de kADN de *Crithidia fasciculata*. Se observa parte de la red del kADN. Los lazos pequeños son minicírculos y las hebras largas (flecha) son parte de los maxicírculos (escala=0,3 μ m). Adaptado de [68].

La mayoría de estos transcritos son modificados post-transcripcionalmente en un proceso denominado "RNA editing" que consiste en la adición o delección de nucleótidos de uridina en sitios específicos del precursor de ARN para generar ORFs funcionales. El proceso de edición está dirigido por diferentes ARN guías (ARNg), codificados por los minicírculos, y un complejo multiprotéico denominado editosoma, compuesto por al menos 20 proteínas con actividades endo y exonucleasa, helicasa y de unión a ARN [69].

1.7.3. Glicosoma

Los kinetoplástidos poseen también un orgánulo denominado glicosoma, un peroxisoma modificado donde tienen lugar la mayor parte de las reacciones de las rutas glicolítica y gluconeogénica (Figura 10) [70]. Dependiendo del estadio del parásito y de

sus demandas energéticas, cada célula puede contener entre 10 y 100 glicosomas [71]. A medida que la disponibilidad de nutrientes cambia durante su ciclo de vida, el metabolismo del parásito y el contenido enzimático del glicosoma pueden variar drásticamente. Por ejemplo, las enzimas glucolíticas pueden constituir más del 90% del contenido proteico del glicosoma en la forma sanguínea de *T. brucei*. Sin embargo, en el estadio promastigote, que se desarrolla en un entorno donde la glucosa es mucho más escasa, estas enzimas representan menos del 50% de las proteínas glicosomales [71].

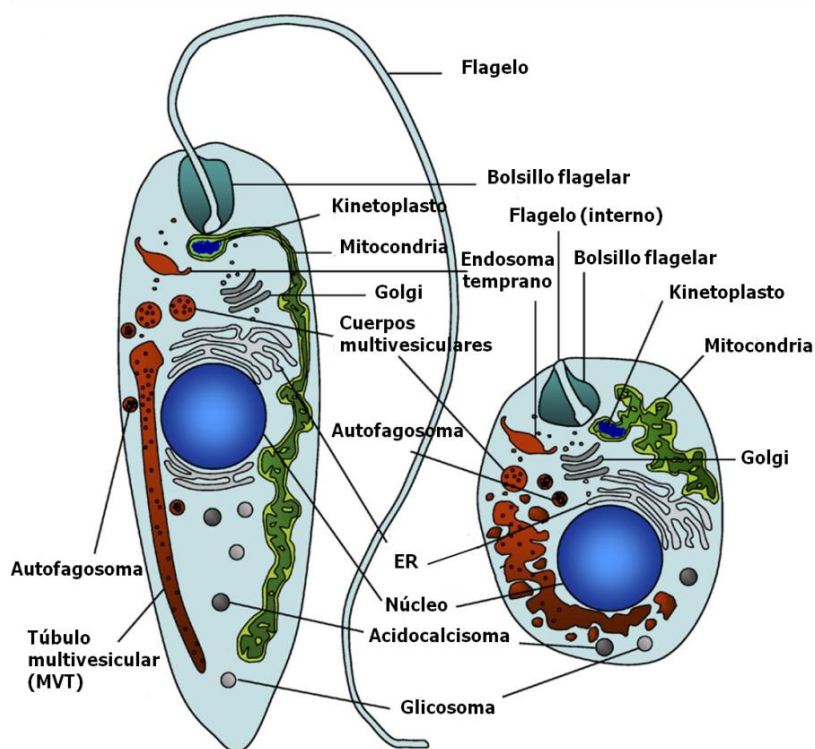


Figura 10. Representación esquemática de los orgánulos presentes en las formas promastigote (izquierda) y amastigote (derecha) de *Leishmania*. Adaptado de [37].

1.7.4. Acidocalcisomas

Aunque los acidocalcisomas se describieron inicialmente en tripanosomátidos [72], se han descrito en organismos de toda la escala evolutiva, incluyendo bacterias, archeas y mamíferos. Estos orgánulos electrodensos se caracterizan por su pH ácido y por contener altas concentraciones de fósforo en forma de pirofosfatos (PPi) y polifosfatos formando complejos con cationes inorgánicos como el Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^{+} y K^{+} [73]. Además de poseer una función de almacenamiento, juegan un papel fundamental en diversos procesos metabólicos tales como la autofagia, la regulación osmótica y la homeostasis del calcio en tripanosomátidos [74].

1.7.5. Metabolismo redox

Mientras que en la mayoría de los organismos los sistemas glutatión/glutatión reductasa (GSH/GR) y tioredoxina/tiorredoxina reductasa (TRX/TXR) son los encargados de mantener la homeostasis intracelular de tioles, los tripanosomátidos poseen en cambio un metabolismo redox único dependiente de un ditiol de bajo peso molecular denominado tripanotión (N^1, N^8 -bis(glutathionil)espermidina). El tripanotión es sintetizado por la conjugación de dos moléculas de glutatión con una de espermidina en una serie de dos reacciones catalizadas por la glutathionilespermidina sintetasa y la tripanotión sintetasa en algunas especies de tripanosomátidos, y en otras, únicamente por la tripanotión sintetasa [75]. El tripanotión participa de diversos procesos celulares, es un potente eliminador de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés "*reactive oxygen species*") y metabolitos de bajo peso molecular, además de proveer equivalentes de reducción a enzimas tales como la ribonucleótido reductasa, tiol transferasas, peroxirredoxinas y otras peroxidasas (Figura 11) [76].

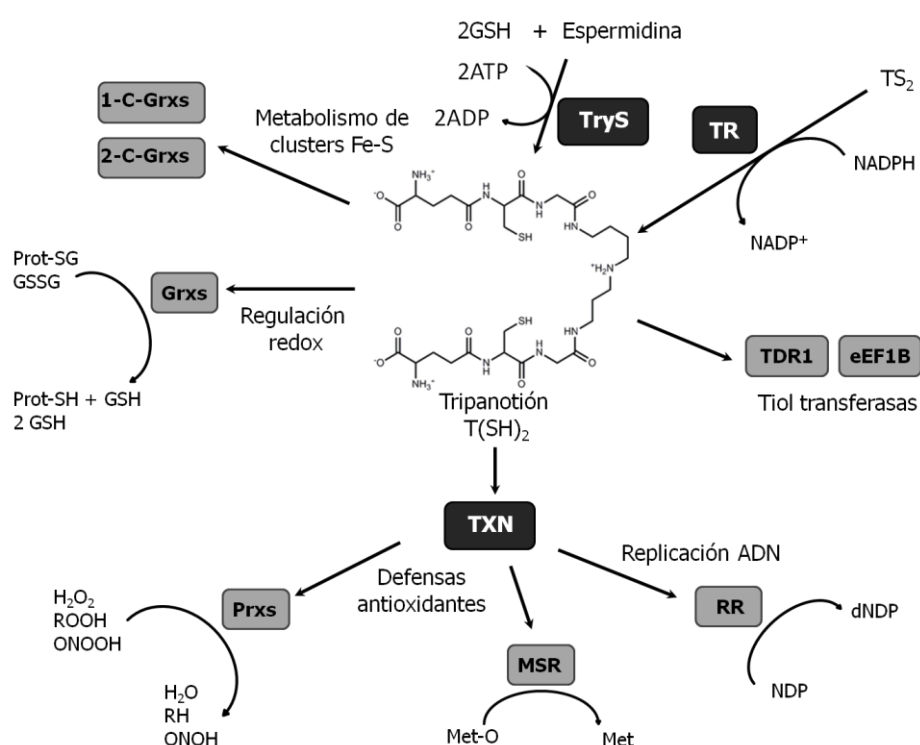


Figura 11. Metabolismo dependiente de tripanotión en tripanosomátidos. La síntesis de tripanotión está catalizada por la enzima tripanotión sintetasa (TryS) y el tripanotión oxidado (TS_2) es reducido por la tripanotión reductasa (TR) dependiente de NADPH. El tripanotión provee de equivalentes de reducción a tiol transferasas (TDR1 y eEF1B), triarredoxina (TXN), peroxirredoxinas (Prx), metionina sulfóxido reductasa (Msr), ribonucleótido reductasa (RR) y glutarredoxinas de 1 y 2 cisteínas (Grx).

1.8. Tratamiento de la leishmaniasis

Debido a la ausencia de vacunas efectivas contra la leishmaniasis, el tratamiento de las diferentes formas de la enfermedad está limitado a unos pocos fármacos (Figura 12), algunos de ellos utilizados desde hace ya muchas décadas, que presentan una serie de problemas tales como baja eficacia, alta toxicidad, efectos secundarios graves, alto coste, administración parenteral y tratamiento prolongado. Además, la emergencia de parásitos resistentes a varios de estos fármacos contribuye a que rápidamente queden obsoletos y deban desarrollarse nuevas estrategias para tratar la enfermedad.

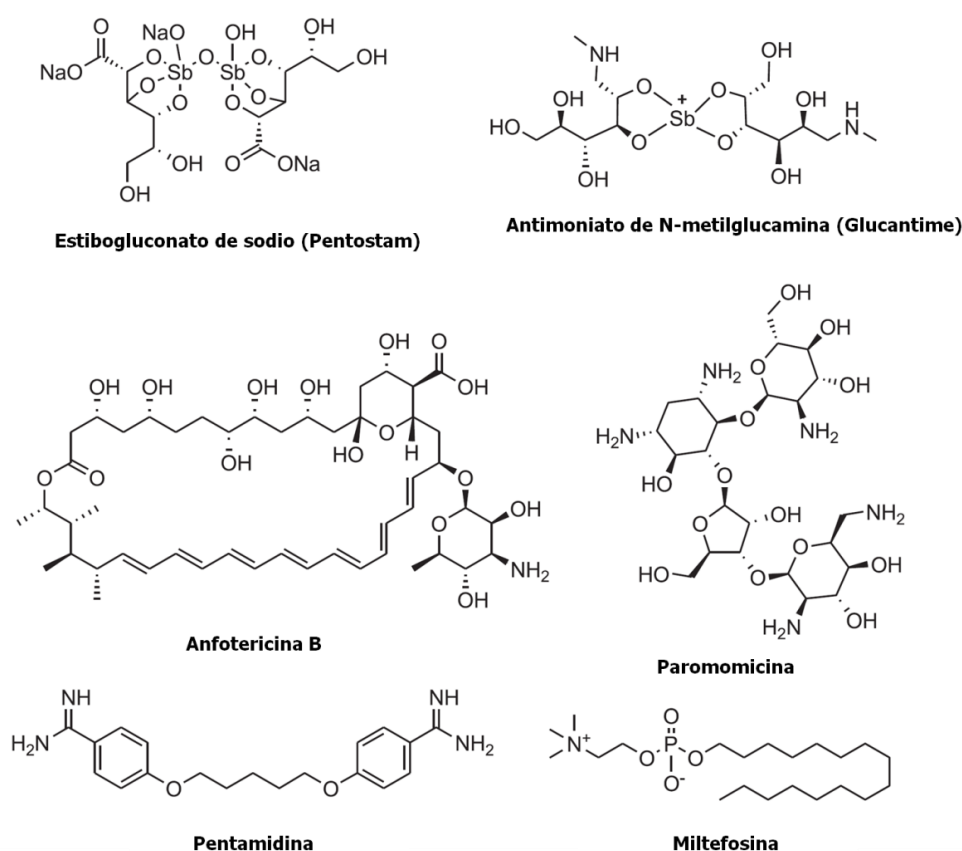


Figura 12. Principales fármacos leishmanicidas.

1.8.1. Antimoniales

Las sales de antimonio pentavalente (Sb^{V}) se utilizan como fármacos de primera línea en el tratamiento de la leishmaniasis desde hace más de 70 años. Actualmente se encuentran disponibles en dos formulaciones químicas: el estibogluconato de sodio (SSG) (Pentostam[®]) y el antimoniato de N-metilglucamina (MA) (Glucantime[®]). El tratamiento debe administrarse vía subcutánea durante 28-30 días y posee una elevada

toxicidad provocando desde dolor abdominal, náuseas, vómitos, hasta problemas cardíacos o pancreatitis [77, 78]. En algunas regiones, la emergencia de resistencia ha provocado la búsqueda de otras alternativas farmacológicas para el tratamiento de la enfermedad. En la región de Bihar, en el norte de la India, el fallo terapéutico alcanzó un 65% y un 24% en Nepal [79], por lo que se dejaron de utilizar los antimoniales para el tratamiento de la LV. Sin embargo los antimoniales siguen utilizándose en América Latina y en el este de África [77], aunque a veces es necesario utilizar una terapia combinada de fármacos, tal como describiremos más adelante.

El Sb^{V} es una pro-droga, siendo necesaria la bioconversión reductiva a Sb^{III} para que posea actividad leishmanicida [80]. Aunque el sitio de reducción ha sido tema de debate, probablemente la reducción ocurra tanto en el parásito como en la célula hospedadora. Los amastigotes axénicos son capaces de reducir Sb^{V} a Sb^{III} [81] y un estudio realizado en una línea celular de macrófagos humanos demostró que la reducción del Sb^{V} ocurre también en estas células [82]. Los mecanismos de acción del Sb^{III} son complejos y diversos. El antimonio afecta el metabolismo de la glucosa, la β -oxidación de los ácidos grasos y la formación de ATP [83, 84], aunque no se han identificado dianas específicas. Provoca además fragmentación del ADN [85] y la externalización de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática, provocando la muerte del parásito por apoptosis [86]. El Sb^{III} inhibe a la tripanotión reductasa (TR) [87], enzima clave para la regeneración de tripanotión oxidado y el mantenimiento del poder reductor en el interior del parásito. Tanto en amastigotes como en promastigotes, el Sb^{III} provoca la extrusión rápida de tripanotión y glutatión *in vitro* [88]. Estos dos mecanismos combinados provocan la pérdida de tioles de bajo peso molecular, alterando el potencial redox del parásito y afectando en última instancia a sus defensas antioxidantes. El Sb^{III} también es capaz de competir con el Zn^{II} por la unión a dominios de dedos de zinc, lo que sugiere que las proteínas con dichos dominios podrían ser también dianas del antimonio [89].

El estudio de los mecanismos de resistencia a antimonio en *Leishmania* ha demostrado que múltiples mecanismos podrían estar actuando simultáneamente y que los mecanismos observados pueden diferir entre los aislados clínicos y los parásitos resistentes obtenidos por selección en el laboratorio [90]. Generalmente, la acumulación de antimonio es menor en parásitos más resistentes, aunque en algunos casos no está clara la correlación entre acumulación y sensibilidad. [91]. La acuagliceroporina 1 (AQP1) es un transportador de membrana bidireccional, involucrado en la osmoregulación y el

metabolismo del glicerol, encargado del transporte del Sb^{III} al interior del parásito [92]. Se ha observado una correlación entre los niveles de expresión de AQP1 y la sensibilidad al Sb^{III} . El transportador se encuentra sobreexpresado en parásitos hipersensibles al Sb^{III} [93], y la delección del mismo en *L. major* genera parásitos resistentes al Sb^{III} [94, 95]. Por otra parte, se ha observado una disminución en la reducción de Sb^{V} a Sb^{III} en amastigotes de *L. donovani* resistentes a SSG [81]. La sobreexpresión de numerosas enzimas pertenecientes a diversas rutas que forman parte del metabolismo de tioles en *Leishmania*, provoca un aumento en los niveles intracelulares de tripanotión, induciendo la resistencia a Sb^{III} en el parásito [96-98]. El antimonio induce estrés oxidativo en las células mediante la formación de ROS, por lo tanto un aumento en la capacidad del parásito para lidiar con dicho estrés oxidativo contribuye a aumentar su resistencia al antimonio [99].

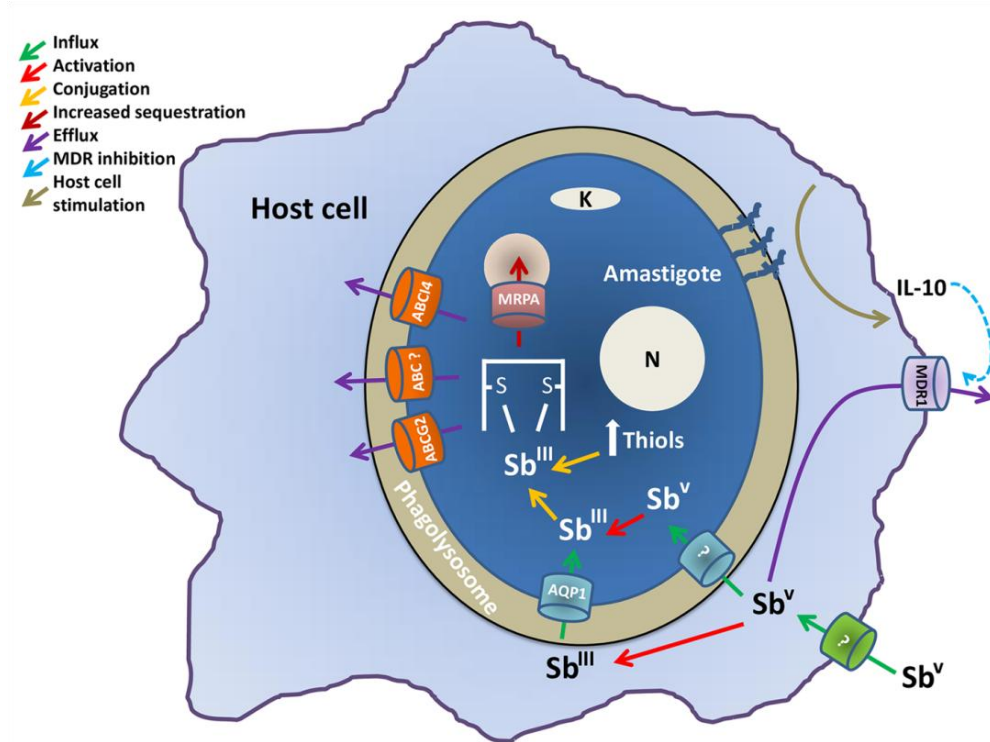


Figura 13. Mecanismos moleculares de resistencia a antimonio en *Leishmania*. En el esquema se observa un amastigote dentro del fagolisosoma de un macrófago. Se indican las vías de activación (rojo) y entrada de antimonio (verde), así como mecanismos intracelulares de resistencia: conjugación del metal con tioles (amarillo), secuestro en vesículas intracelulares (rojo oscuro) y eflujo (morado). Se indican también la estimulación del macrófago (gris) y la inhibición del transportador MDR1 (azul). Adaptado de [99].

Varios transportadores ABC (del inglés, "ATP-binding cassette") están implicados en la resistencia a antimonio en *Leishmania*. El transportador PgpA (MRPA) de *L. tarentolae*, miembro de la subfamilia ABCC de transportadores, transporta tioles conjugados a metales a vesículas intracelulares [100]. Al menos otros dos

transportadores ABC juegan un papel fundamental en la resistencia a Sb^{III} en *Leishmania*: ABCI4 y ABCG2 [101, 102]. Discutiremos más detalles de su mecanismo de acción en el apartado de transportadores ABC de esta tesis. Por último, los parásitos resistentes a antimonio son capaces de modificar la respuesta inmunitaria de los macrófagos, promoviendo cambios en la bioquímica de la célula, tales como el aumento en la expresión del transportador MDR1, implicado en el eflujo de complejos Sb^{V} -SSG fuera del macrófago [103] (Figura 13).

1.8.2. Anfotericina B

La Anfotericina B (AmB) es un antibiótico macrólido poliénico aislado originalmente de *Streptomyces noculosus*, que posee actividad antifúngica y antiparasitaria. Originalmente, el uso de la AmB estaba limitado debido a que provocaba graves efectos secundarios como nefrotoxicidad y hematotoxicidad [104]. La formulación liposomal (AmBisome®) ha aumentado su eficacia y posee una toxicidad reducida, pudiéndose utilizar dosis más altas del fármaco y disminuir el tiempo del tratamiento [105]. Por ello se considera actualmente como el mejor fármaco disponible para tratar la LV y se utiliza como fármaco de primera línea en Europa y Estados Unidos. Sin embargo, su elevado coste sigue limitando su utilización en muchos países endémicos. La Organización Mundial de la Salud (OMS) logró negociar con la empresa Gilead Sciences, que produce la AmB liposomal, una reducción gradual del precio del fármaco para conseguir un mayor acceso al tratamiento [106].

Se han propuesto varios mecanismos de acción que podrían explicar la actividad antifúngica y antiparasitaria de la AmB. El modelo más antiguo y uno de los más estudiados involucra la unión de la AmB al ergosterol presente en la membrana del parásito y la formación de poros que permiten el flujo de iones y metabolitos a través de la membrana. Esto provocaría el colapso energético y la muerte del parásito [107].

Aunque la aparición de parásitos resistentes a la AmB ha sido muy poco frecuente, se han obtenido tanto amastigotes como promastigotes de *L. mexicana* resistentes a AmB en el laboratorio [108], además de aislados clínicos de *L. donovani* obtenidos en la región de Bihar, India [109]. Los mecanismos de resistencia a AmB son diversos y todavía no se han dilucidado completamente. En parásitos de *L. mexicana* resistentes a AmB se identificaron cambios en el metabolismo de esteroides, observándose una mayor acumulación de intermediarios de la síntesis del ergosterol, asociados a una mutación puntual en la enzima esteroide 14 α -desmetilasa (CYP51)[110].

Un fenotipo similar se había observado anteriormente en una línea celular resistente de *L. donovani* obtenida en el laboratorio [111]. Los aislados clínicos de *L. donovani* también presentaban una composición alterada de los esteroides de membrana plasmática, niveles elevados de tioles reducidos, además de la sobreexpresión de la cisteína sintasa, tripanotión sintetasa, y del transportador ABC MDR1 [109, 112, 113].

1.8.3. Miltefosina

La miltefosina (MLF) (hexadecilfosfolina) es un alquilfosfolípido sintético que se desarrolló en la década de los 80 como tratamiento antitumoral. En 2002, la MLF se convirtió en el primer fármaco de administración oral, sustituyendo al SSG como primera línea de tratamiento en la LV [104]. Presenta efectos secundarios moderados en algunos pacientes, pero es teratogénico, lo que impide su uso en mujeres embarazadas [114]. Debido a su elevada eficacia y fácil administración fue adoptada por el Programa de eliminación de la leishmaniasis visceral de la India, Nepal y Bangladesh [115]. Lamentablemente, después de una década de uso, la eficiencia de la MLF ha disminuido y ha aumentado la tasa de recidivas [116]. Inicialmente, la disminución en la eficacia de la MLF no se relacionó con la aparición de parásitos resistentes, pero posteriormente se han descrito aislados clínicos resistentes en varios pacientes [99].

Aunque no se conoce exactamente su mecanismo de acción, se ha identificado un transportador específico en *L. donovani*, que forma un complejo translocasa de fosfolípidos en la membrana del parásito. Este complejo está compuesto por una ATPasa tipo P denominada LMT (del inglés, "*Leishmania miltefosine transporter*"), responsable de la translocación de fosfolípidos de la cara externa a la cara interna de la membrana plasmática [117] y una subunidad B específica denominada LdRos3, perteneciente a la familia de la proteína CDC50 [118]. Ambas proteínas son necesarias para la función del transportador y su localización en la membrana plasmática. La MLF afecta diversos procesos celulares en el metabolismo del parásito: interfiere con la biosíntesis de fosfolípidos [119], afecta a la citocromo c oxidasa e induce la despolarización de la membrana mitocondrial, disminuyendo los niveles de ATP [120], provocando la muerte del parásito por un mecanismo apoptótico [121].

Los principales mecanismos de resistencia a la MLF están asociados con una menor acumulación del fármaco, debido a una internalización reducida o a una mayor extrusión del mismo. Se han observado mutaciones y deleciones en el complejo transportador de MLF, tanto en LMT como en LdRos3 en parásitos resistentes, tanto en

ensayos *in vitro* como *in vivo* [122, 123]. Además la sobreexpresión de varios transportadores ABC está asociada con la resistencia a alquilfosfolípidos [124, 125]. Se han descrito otras modificaciones metabólicas en *Leishmania* que contribuyen a la resistencia a MLF: cambios en la longitud y el grado de saturación de ácidos grasos y reducción en los niveles de ergosterol [126]; modificación del metabolismo de tioles, y de la traducción y plegamiento de proteínas, además de una mayor tolerancia al estrés oxidativo producido por ROS [99].

1.8.4. Paromomicina

La paromomicina (PMM) es un antibiótico aminoglucósido que posee actividad de amplio espectro frente a organismos procariotas y eucariotas. Su actividad leishmanicida se describió por primera vez en la década de los 60. Debido a su escasa absorción vía oral, la PMM se administra por vía parenteral para tratar la LV y por vía tópica para la LC. Un ensayo clínico de fase IV en la India, donde se administró PMM a los pacientes con LV durante 21 días, mostró una tasa de cura del 95% [127]. Sin embargo, su eficacia para el tratamiento de PKDL demostró ser mucho más limitada, alcanzando sólo el 37,5% [128].

Su mecanismo de acción se ha estudiado principalmente en bacterias, donde se ha observado que se une al ribosoma, estabilizando el complejo y provocando errores en la lectura de codones del ARNm, además de impedir el reciclado de los complejos ribosomales, inhibiendo la síntesis de proteínas [129]. Estudios proteómicos realizados en *L. donovani* mostraron un aumento en los niveles de expresión de proteínas ribosomales en parásitos resistentes, sugiriendo que el mecanismo de acción es análogo al observado en bacterias [130]. Por otra parte, en estudios realizados en líneas celulares de *L. donovani* resistentes a Sb^{III} en la que se indujo resistencia a PMM en el laboratorio, se observó un aumento de la fluidez de membrana, asociada a alteraciones en la composición lipídica de la misma, además de una menor acumulación de PMM ([131, 132]. Estos parásitos presentaban una mayor tolerancia al estrés nitrosativo y oxidativo y por lo tanto eran más tolerantes a los mecanismos de defensa del hospedador [132]. Además, presentaban una sobreexpresión de los transportadores ABC MDR1 (ABCB1) y PgPA (ABCC3), que están también asociados a la resistencia a Sb^{III} [132]. En estudios de transcriptómica comparativa realizados en *L. donovani* se encontraron 500 genes que se hallaban modulados positiva o negativamente en los parásitos resistentes generados en el laboratorio [133]. Esto indicaría que la resistencia

a PMM es multifactorial y numerosos genes y rutas metabólicas están implicadas en procesos relacionados con la resistencia a dicho fármaco.

1.8.5. Pentamidina

La pentamidina es una diamidina aromática que se administra vía intravenosa o intramuscular para el tratamiento de la tripanosomiasis humana africana provocada por *T. brucei gambiense* [134]. Su mecanismo de acción involucra la inhibición de la topoisomerasa II desencadenando una serie de alteraciones que provocan la muerte del parásito por mecanismos apoptóticos [135]. Se utiliza como fármaco de segunda línea en el tratamiento de la LV y en pacientes refractarios después del tratamiento con antimoniales [104]. El aumento del fallo terapéutico y su elevada toxicidad han llevado a que su uso disminuya gradualmente [136].

1.8.6. Otros fármacos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis.

Los azoles son una familia de compuestos con actividad antifúngica que inhiben la biosíntesis del ergosterol bloqueando la enzima esterol 14 α -desmetilasa (CYP51) [137] (Figura 14). Decenas de derivados de azoles se han probado en ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* frente a diferentes especies de *Leishmania* con resultados dispares. Se han realizado también numerosos ensayos clínicos, pero los resultados obtenidos no han sido concluyentes [138].

El alopurinol es un análogo de la hipoxantina que inhibe enzimas del metabolismo de las purinas, afectando la síntesis de ARN en el parásito (Figura 14). Se utiliza en combinación con otros fármacos, generalmente antimoniales, en el tratamiento de la leishmaniasis canina [9].

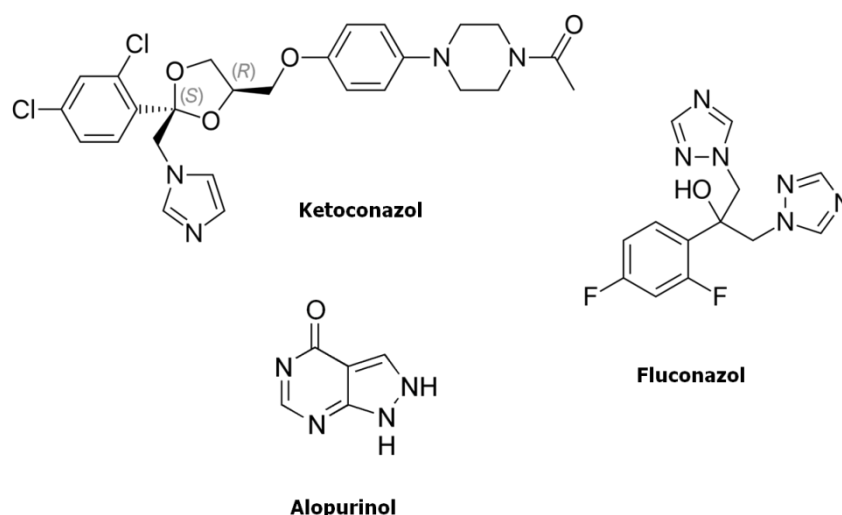


Figura 14. Estructuras de otros fármacos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis.

1.8.7. Terapias combinadas

Actualmente la estrategia más recomendada por la OMS para el tratamiento de la leishmaniasis son las terapias combinadas. Esta se basa en el uso de fármacos con actividad sinérgica o aditiva, lo que permite una reducción en la duración del tratamiento, una disminución de la dosis, minimizando los efectos adversos al mismo tiempo que reduce el costo del mismo [77]. En principio existe una menor probabilidad de que se generen parásitos resistentes que cuando se utiliza una monoterapia, pero estudios experimentales realizados en *L. donovani*, en los que se ha sometido al parásito a un aumento gradual en las concentraciones de dos fármacos durante 10 semanas, han demostrado que el parásito puede también generar resistencia a distintas combinaciones de fármacos. Las combinaciones de fármacos a las que *L. donovani* desarrolló resistencia más fácilmente y con mayores índices de resistencia fueron MLF/PMM y Sb^{III} /PMM [139]. Aunque la inducción de resistencia se realizó en cultivos de promastigotes, se obtuvieron posteriormente amastigotes intracelulares resistentes a las mismas combinaciones de fármacos [139].

Un factor importante a tener en cuenta son las vidas medias de los fármacos utilizados. Lo ideal sería utilizar un fármaco muy potente con una vida media corta en combinación con un segundo fármaco que posea una vida media prolongada que sea capaz de eliminar los parásitos restantes [140].

La OMS ha implementado el uso de SSG combinado con PMM como tratamiento estándar en el este de África después de un estudio randomizado en 4 países de esta

región [141]. En dicho estudio se obtuvieron tasas de cura del 97% después de 17 días de tratamiento, comparado con el 92,4% del tratamiento únicamente con SSG durante un mes. En otro ensayo, la terapia secuencial con MLF tras una dosis única de AmB demostró ser efectiva para el tratamiento de la LV en la región de Bihar, en India. Aunque se alcanzaron tasas de cura del 98%, las diferencias en la efectividad del tratamiento comparadas con la monoterapia con AmB no fueron estadísticamente significativas, por lo que se concluyó que en este caso, la combinación de fármacos no mejoraba la eficacia del tratamiento [142]. En Europa, se recomienda la utilización de AmB combinada con MLF para casos de LV que no responden a otros tratamientos [143]. En otro ensayo clínico de fase III que se llevó a cabo también en la India se utilizaron tres combinaciones distintas de AmB, MLF y PMM. En todos los casos la eficacia de los tratamientos combinados fue mayor que la del tratamiento estándar con AmB [144]. Además los pacientes que recibieron la terapia combinada presentaron menos efectos adversos que los que recibieron el tratamiento estándar. Los autores de este trabajo concluyen que el uso de terapias combinadas reduce la duración de los tratamientos lo que contribuye a extender la vida útil de los fármacos, disminuyendo la probabilidad de emergencia de parásitos resistentes [144].

1.8.8. Nuevos fármacos, inmunoterapia y desarrollo de vacunas

La fundación DNDi (Drugs for Neglected Diseases initiative) tiene como objetivo para 2020 la obtención de nuevos tratamientos más efectivos, seguros y de bajo coste para la LV y la LC. Recientemente se han seleccionado tres series químicas nuevas por su potencial para el desarrollo de nuevos fármacos leishmanicidas: los nitroimidazoles bicíclicos, aminopirazoles y oxaboroles. Todos los compuestos cabezas de serie mostraron una potente actividad *in vitro* frente a *L. infantum* y *L. donovani* y no se observaron resistencias cruzadas con los fármacos leishmanicidas utilizados actualmente [145].

La inmunoterapia comprende el uso de sustancias biológicas o sintéticas con el fin de modular la respuesta inmunitaria del hospedador. Las estrategias utilizadas incluyen el tratamiento con citoquinas [146], anticuerpos [147] y la modulación de la respuesta inmunitaria mediada por antígenos (vacunas) o adyuvantes en combinación con quimioterapia [148].

La vacunación, profiláctica o terapéutica, puede considerarse como la estrategia más eficiente en el control de una enfermedad infecciosa. Actualmente no existen

vacunas efectivas para el tratamiento de la leishmaniasis, pero en los últimos años se han desarrollado numerosas vacunas utilizando diferentes estrategias. La delección de genes esenciales para la virulencia del parásito ha permitido la obtención de una gran variedad de parásitos vivos atenuados [149, 150]. Sin embargo, aunque las vacunas de parásitos vivos atenuados han mostrado una protección substancial frente a la infección con *Leishmania* en modelos animales, la potencial reversión de la virulencia debida a mutaciones al azar hace que no sean lo suficientemente seguras para su utilización en humanos [151]. Por otra parte, ninguna vacuna de primera generación compuesta por parásitos muertos ha demostrado conferir una protección significativa contra la leishmaniasis hasta la fecha [152]. Actualmente se encuentran en el mercado tres vacunas contra la LCan: Leish-Tec[®] (antígeno A2 de amastigotes recombinante), CaniLeish[®] (antígeno secretado de *L. infantum* – LiESAp) y Letifend[®] (proteína Q recombinante) [153]. Hay todavía pocos datos publicados a cerca de la eficacia de estas vacunas y los perfiles de seguridad indican efectos adversos de distintos grados de gravedad, debidos principalmente a la saponina utilizada como adyuvante [153]. Un gran número de proteínas recombinantes de *Leishmania* se están estudiando para evaluar su potencial en la producción de proteínas antigénicas. La primera vacuna en alcanzar ensayos clínicos de fase I y II fue LEISH-F1 compuesta por tres proteínas que se hallan conservadas en varias especies de *Leishmania* [154]. Por último, las vacunas de ADN representan una de las innovaciones más recientes en el área de la inmunización. La vacunación con ADN plasmídico que codifica antígenos de *Leishmania* posee propiedades adyuvantes intrínsecas, induce respuestas inmunitarias tanto humoral como celular y provoca inmunidad de larga duración [140]. Aunque se han obtenido resultados prometedores en modelos animales [155, 156], su uso en humanos está todavía restringido y serán necesarios más estudios para evaluar su seguridad y evitar la aparición de posibles efectos adversos [157].

2. Transportadores ABC

2.1. Generalidades

Los transportadores ABC (ATP-binding cassette) son una familia de proteínas de membrana ubicuas que acoplan la hidrólisis de ATP a la translocación de sustratos a través de membranas celulares. Mientras que los transportadores involucrados en la importación de moléculas al citosol (importadores) son casi exclusivos de los organismos procariotas, los transportadores ABC que transportan activamente sus sustratos al exterior celular (exportadores) se encuentran ampliamente distribuidos en organismos de todos los reinos [158]. Estas proteínas integrales de membrana transportan una gran variedad de sustratos, desde iones, compuestos polares, compuestos orgánicos hidrofóbicos, péptidos, lípidos complejos y pequeñas proteínas [159]. En bacterias, los importadores son esenciales para la obtención de nutrientes y los exportadores son los responsables de transportar compuestos citotóxicos o fármacos al exterior, generando muchas veces resistencia a dichos fármacos. En eucariotas los transportadores ABC poseen diferentes localizaciones celulares y participan de diversos procesos fisiológicos. Miembros de las diferentes subfamilias de transportadores ABC en humanos participan en el transporte de lípidos y colesterol, son responsables de la resistencia a fármacos, presentación de antígenos, homeostasis del hierro en mitocondrias y regulación de canales iónicos dependientes de ATP. Se han asociado mutaciones presentes en muchos de los transportadores ABC en humanos con diversas patologías, incluyendo fibrosis quística, hipercolesterolemia y diabetes [160].

2.2. Estructura

La estructura esencial de un transportador ABC consiste de dos dominios de unión a nucleótidos (NBD, del inglés "*nucleotide binding domain*") muy conservados, y dos dominios transmembrana (TMD, del inglés "*transmembrane domain*") que contienen en la mayoría de los casos 6 hélices alfa integrales de membrana cada uno [161]. Los transportadores ABC eucarióticos se subdividen en transportadores completos (full-transporters), si contienen los 2 dominios NBD y TMD en la misma cadena polipeptídica, o en hemitransportadores (half-transporters), si contienen únicamente un dominio NBD y TMD por cadena polipeptídica (Figura 15). Estos últimos requieren de la homo o heterodimerización para ensamblarse en una proteína funcional [162]. Mientras

que los dominios NBD son los responsables de la unión y posterior hidrólisis de ATP, generando la fuerza motriz esencial para la función de translocación, los dominios TMD forman el canal transmembrana a través del cual será translocado el sustrato. El nivel de identidad de secuencia para los NBD entre bacterias y eucariotas es alto, con valores entre el 30 y 50%, lo que indica que probablemente poseen un plegamiento y un mecanismo similar [163]. Además, en los NBD podemos identificar una serie de motivos conservados, mientras que la secuencia y la arquitectura de los TMD son muy variables, reflejando la diversidad de los sustratos translocados.

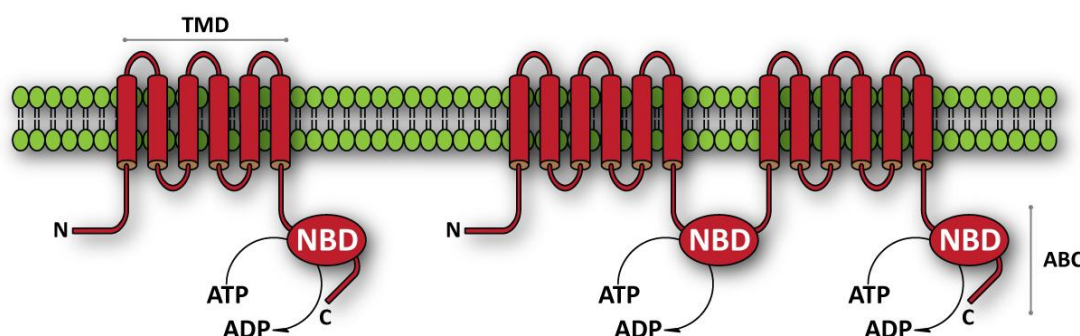


Figura 15. Representación esquemática de la organización estructural de los transportadores ABC. Se muestra un hemitransportador (izq.) y un transportador completo (der.). Se indican los TMD y NBD.

Los NBD son dominios hidrofílicos que contienen aproximadamente 200 aminoácidos, y poseen 3 motivos muy conservados que son indispensables para el ciclo catalítico de unión de ATP, hidrólisis y liberación de ADP/P_i. El motivo Walker A o P-loop (GXXGXXGK(S/T, donde X es cualquier residuo), posee un residuo de lisina conservado que forma puentes de hidrógeno con los oxígenos de los β- y γ-fosfatos del ATP. El motivo Walker B (φφφφDE, donde φ es un residuo hidrofóbico), posee dos residuos ácidos conservados, el aspartato que forma un enlace coordinado con el ion Mg²⁺, contribuyendo a mantener la geometría del sitio activo, y el glutamato, que actuaría como la base catalítica para la hidrólisis de ATP. El motivo LSGGQ o C-loop (denominado también "motivo sello" de la superfamilia) forma el sitio catalítico de la proteína y es exclusivo de los transportadores ABC. Además, otra serie de residuos y motivos conservados están involucrados en el proceso de unión del ATP y su posterior hidrólisis. El A-loop, el D-loop y el Q-loop están involucrados en el mantenimiento de la geometría del sitio catalítico y el posicionamiento del ATP en el mismo [161] (Figura 16).

En todos los transportadores ABC, los dos dominios NBD se asocian formando un dímero simétrico invertido, con 2 moléculas de ATP ubicadas en la interfaz,

interaccionando con el motivo Walker A de un monómero y con el motivo LSGGQ del otro. Esta conformación se ha observado en las estructuras cristalinas de dímeros de NBD aislados [164-166] y los datos estructurales indican que la unión del ATP desencadenaría la dimerización de los NBD [167]. Sin embargo, en algunas de las estructuras de transportadores completos se observa una mayor separación entre los NBD, e incluso cada NBD interactúa con un único nucleótido, por lo que no está claro si ambos nucleótidos se hidrolizan simultáneamente o secuencialmente [163].

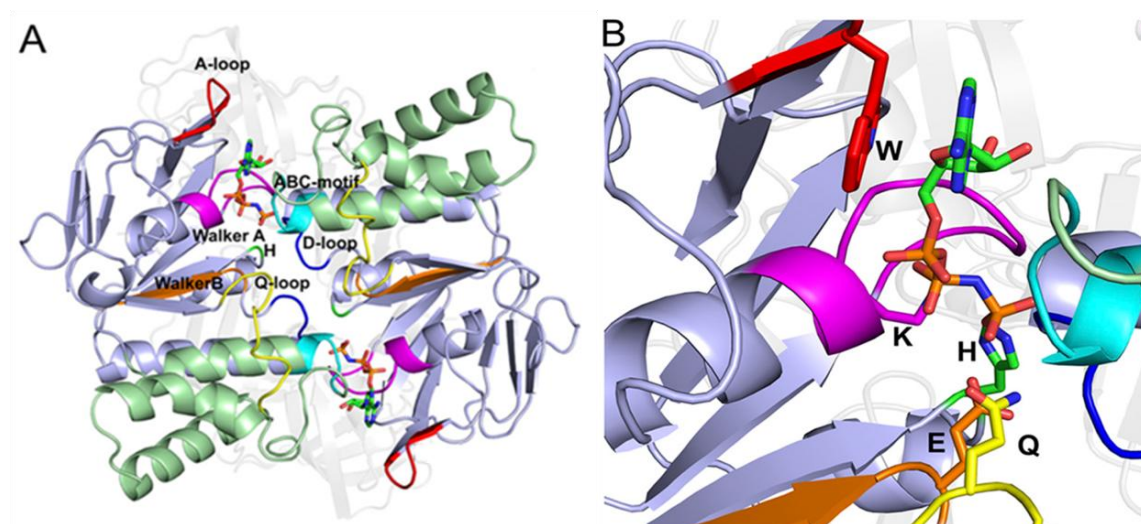


Figura 16. Estructura de los NBD del dímero MalK del transportador de maltosa MalEFGK2. A. Vista perpendicular al plano de la membrana. Se indican las secuencias conservadas Walker A, Walker B, A-loop, D-loop, Q-loop y el motivo sello (ABC motif) de la familia. **B.** Detalle del sitio de unión a nucleótidos. Se indican aminoácidos relevantes para la catálisis. Adaptado de [161].

Los TMD son dominios hidrofóbicos integrales de membrana y constituyen la vía de translocación del sustrato de un lado a otro de la misma. Dependiendo de la clase de transportador, cada TMD posee entre 6 y 10 α -hélices transmembrana (los exportadores poseen 6), y entre 12 y 20 segmentos transmembrana, en un transportador completo. Las α -hélices de dos TMD están empaquetadas de modo que forman un poro transmembrana que será accesible desde el citoplasma (inward facing) o desde el exterior celular (outward facing). A diferencia de los NBD, las secuencias y arquitecturas de los TMD son muy variables, pero generalmente los transportadores pertenecientes a una misma clase poseen una topología similar. Esto se explica debido a la gran diversidad química de sustratos que transportan. De acuerdo con la estructura de los TMD, los transportadores pueden clasificarse en 4 tipos diferentes. Los tipos I, II y III están asociados exclusivamente con la importación de sustratos y se encuentran únicamente en procariotas. El cuarto tipo de plegamiento es característico de los

exportadores y está presente tanto en procariotas como en eucariotas (Figura 17). El acoplamiento entre los cambios conformacionales que ocurren en los NBD y los TMD se logra debido a la presencia de una α -hélice corta, denominado "lazo de acoplamiento" (ICL, del inglés, "intracellular coupling loop"), en una región citoplasmática del TMD. La interacción entre la ICL y la región que contiene el Q-loop en el NBD es la responsable de la transducción de los cambios conformacionales durante el ciclo catalítico de los transportadores ABC.

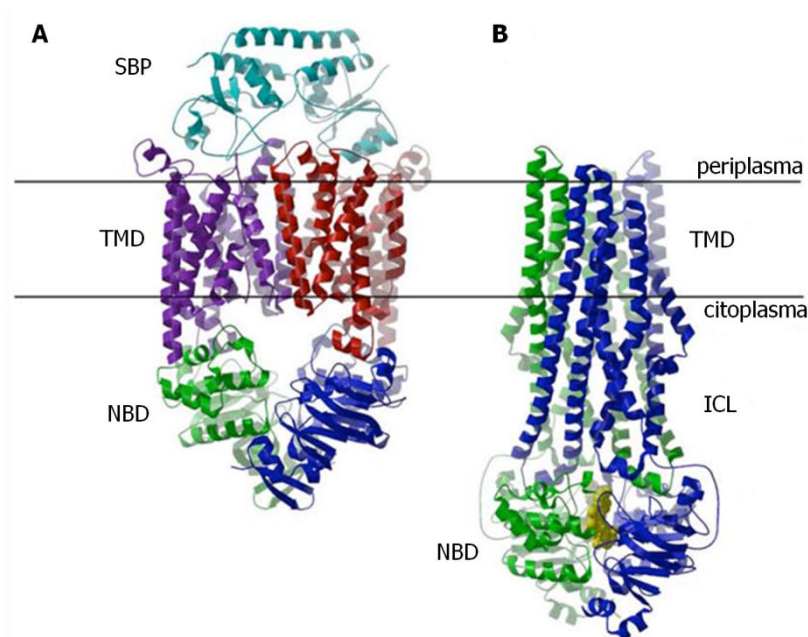


Figura 17. Estructura de los transportadores ABC. **A.** El importador BtuCDF de *E. coli*, está compuesto por 4 subunidades proteicas independientes además de una proteína periplásmica de unión a sustrato (SBP). **B.** El exportador Sav1866 de *S. aureus* consiste en dos subunidades proteicas, cada una de ellas con un TMD y un NBD. Se indica también el "lazo de acoplamiento" (ICL). El nucleótido unido a los NBD se representa en amarillo. Adaptado de [160].

2.3. Mecanismo de acción

Salvo algunas excepciones, los transportadores ABC transportan sustratos contra un gradiente de concentración, utilizando la hidrólisis de ATP como fuerza motriz para realizar dicho proceso. El ciclo catalítico comienza con la proteína en estado basal y consiste en una serie de pasos: i) la unión del sustrato a proteínas de unión a sustrato (en importadores bacterianos) o directamente a los TMD del transportador; ii) la unión de dos moléculas de Mg^{2+} -ATP a los NBD; iii) la dimerización de los NBD; iv) el cambio conformacional de los TMD entre dos tipos de conformaciones: hacia afuera o hacia adentro (el orden depende del tipo de transportador); v) la hidrólisis de ATP y vi) el

transporte del sustrato, la liberación de ADP y Pi, junto con la disociación del dímero de NBD, volviendo la proteína al estado basal para comenzar un nuevo ciclo.

Debido a que existen discrepancias entre los datos obtenidos en algunas estructuras cristalográficas, con datos bioquímicos, biofísicos y simulaciones moleculares, se han formulado una serie de modelos que explican el mecanismo de hidrólisis del ATP. Los dos principales son el denominado modelo dímero/monómero (denominado en inglés "switch model") y el modelo de contacto constante.

En el modelo dímero/monómero la unión del ATP a los NBD provoca la formación de un dímero con 2 moléculas de ATP ubicadas en la interfaz del mismo. La translocación del sustrato está dirigida por el cambio conformacional entre dos estados de los NBD, uno cerrado donde las 2 moléculas de ATP están unidas al dímero, y otro abierto, después de la hidrólisis del ATP y liberación de ADP/Pi [168] (Figura 18A). El cambio conformacional de los NBD induce los cambios conformacionales correspondientes en los TMD, facilitando la translocación del sustrato. Diversos estudios bioquímicos, cristalográficos y simulaciones de dinámica molecular respaldan este modelo [164, 169-172]. Sin embargo, en algunos estudios cristalográficos se han obtenido estructuras con los NBD en la conformación cerrada, en ausencia de nucleótidos, lo que sugiere que el "sandwich" ATP-dímero podría ser un artefacto y no existir en condiciones fisiológicas [173].

El modelo de contacto constante surge a partir de datos experimentales que establecen que la hidrólisis de ATP no ocurre simultáneamente en los dos NBD [174]. En su lugar, ocurriría alternativamente en uno y otro NBD. Mientras en uno de los sitios una molécula de ATP es hidrolizada, la otra molécula de ATP permanece unida y ocluída, generándose un dímero asimétrico, con una única molécula de ATP unida al transportador (Figura 18B). Los datos obtenidos a partir de numerosos estudios estructurales, bioquímicos y biofísicos concuerdan con la hipótesis del modelo de contacto constante [175-178].

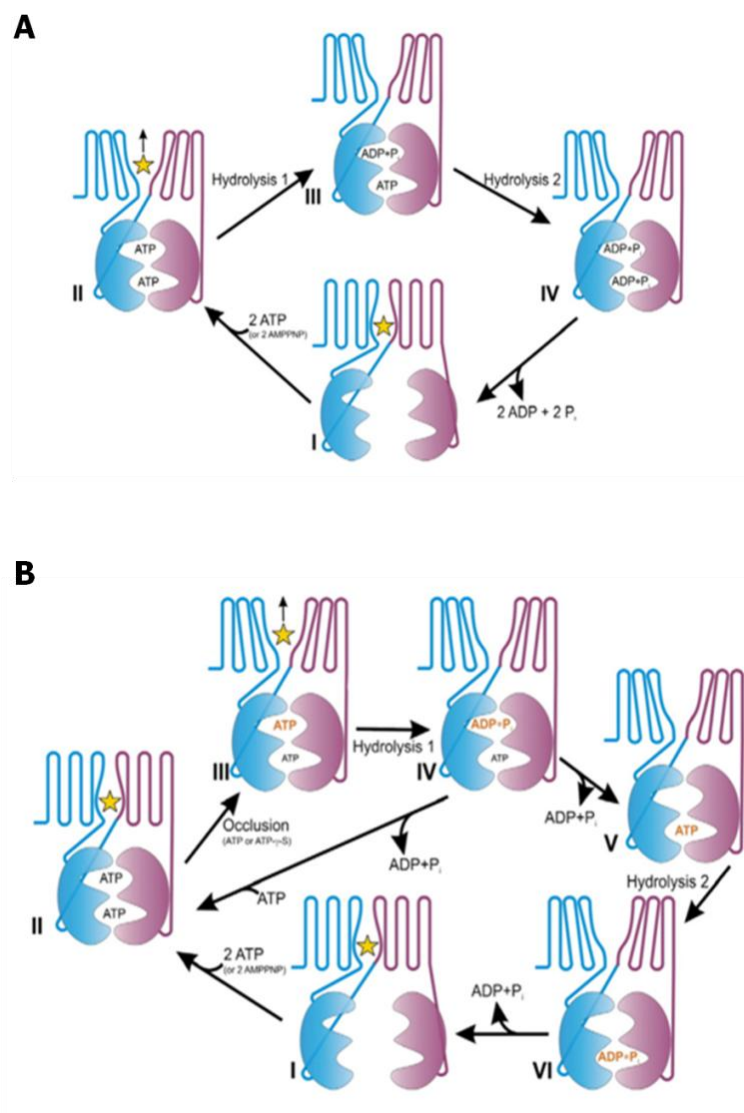


Figura 18. Mecanismo de acción de los transportadores ABC. Se indican los pasos del ciclo catalítico para cada uno de los modelos después de la unión del sustrato (estrella amarilla). **A.** Modelo del dímero-monómero y **B.** Modelo de contacto constante. Adaptado de [158].

Aunque se ha avanzado mucho en la comprensión del mecanismo de acción de los transportadores ABC, todavía quedan muchos detalles por descubrir del ciclo catalítico de estas proteínas. Además, dada las diferencias estructurales y propiedades bioquímicas observadas, es probable que no todos los transportadores ABC funcionen utilizando el mismo mecanismo molecular. Esta última observación parece especialmente relevante si tenemos en cuenta que no todos los transportadores ABC comparten el mismo origen filogenético [179].

2.4. Transportadores ABC en *Leishmania*

Leishmania es el parásito protozoario con el mayor número de ORFs que codifican para proteínas de la superfamilia de los transportadores ABC. Los 42 ORFs identificados representan el 0,5% del número total de genes de *L. major* y se hallan distribuidos por todo el genoma del parásito, en 19 cromosomas diferentes [180] (Figura 19). Al igual que en otros organismos eucariotas, los transportadores se han clasificado en 8 subfamilias denominadas ABCA hasta ABCH, y se ha descrito una nueva subfamilia exclusiva de tripanosomátidos denominada ABCI [101]. La diferencia en el número de genes comparado con otros protozoarios tripanosomátidos como *T. cruzi* y *T. brucei* se debe principalmente a la expansión de las subfamilias ABCA, ABCC y ABCG [180].

2.4.1. Subfamilia ABCA

La subfamilia ABCA de transportadores ha sido extensamente estudiada en mamíferos y la mayoría de sus miembros están implicados en el transporte de lípidos y colesterol [181]. En *Leishmania* se han identificado 10 transportadores ABC pertenecientes a esta subfamilia (ABCA1-ABCA10). La proteína *Ltr*ABC1.1 (ABCB8) de *L. tropica* está localizada en el bolsillo flagelar y la membrana plasmática del parásito [182], mientras que *Ltr*ABCA2 (ABCB4) está localizada en el bolsillo flagelar y vesículas internas [183]. Ambos genes estarían implicados en el transporte de fosfolípidos, pero su sobreexpresión no se ha asociado con la resistencia a fármacos lipídicos, como la MLF, en ninguno de los 2 casos [182, 183].

2.4.2. Subfamilia ABCB

En el genoma de *Leishmania* se han identificado cuatro genes pertenecientes a la subfamilia ABCB. Dos de ellos, ABCB2 y ABCB4, corresponden a transportadores completos y son homólogos del ABCB1 (MDR1) de mamíferos, proteína implicada en la generación de multirresistencia a fármacos en células tumorales [184]. Los otros dos son hemitransportadores, denominados ABCB1 y ABCB3. La sobreexpresión de *Ltr*ABCB4 (*Lt*MDR1) le confiere a *L. tropica* resistencia a MLF y edelfosina [185]. Además, ABCB4 podría estar implicado en el transporte de pentamidina a compartimentos intracelulares y a la mitocondria del parásito, y el número de copias del gen está correlacionado con la acumulación de pentamidina en *L. enrietti* [186]. El segundo gen homólogo de ABCB1, *La*ABCB2, se identificó en *L. amazonensis* y posee una identidad de secuencia del 47% con *La*ABCB4. La sobreexpresión de *La*ABCB2 en promastigotes está asociada a la

resistencia al 5-fluoracilo, lo que sugiere que la proteína podría estar involucrada en el eflujo de xenobióticos [187]. Recientemente se ha caracterizado *LmABCB3*, un transportador mitocondrial que está implicado en la síntesis y el transporte de porfirinas y del grupo hemo, y en la biogénesis de los clusters de Fe-S en el citosol del parásito [188].

2.4.3. Subfamilia ABCC

La mayoría de los miembros de esta subfamilia están implicados en el transporte de una gran variedad de sustratos endógenos y xenobióticos [189]. La subfamilia de transportadores ABCC en *Leishmania* posee 8 miembros, de los cuales 6 han sido descritos y asociados a fenotipos de resistencia, al igual que sus homólogos en humanos. El primer gen identificado de esta subfamilia fue ABCC3, que se hallaba presente en un ADN extracromosómico amplificado en promastigotes de *L. tarentolae* resistentes a metotrexato [190]. ABCC3 está localizado en vesículas intracelulares adyacentes al bolsillo flagelar y está implicado en el transporte de metales conjugados a tioles. Tanto el antimonio como el arsenito son conjugados a tripanotión y secuestrados en el interior de vesículas confiriéndoles a los parásitos resistencia a dichos metales [100]. Además, ABCC3 se halla sobreexpresado en aislados clínicos de *L. donovani* resistentes a SAG [191]. Otro miembro de esta subfamilia, ABCC7, también denominado proteína de resistencia a pentamidina (PRP1), le confiere al parásito resistencia a este fármaco cuando la proteína se sobreexpresa en promastigotes y amastigotes de *L. major* y *L. infantum* [192, 193]. ABCC7 es también una proteína intracelular, asociada al elemento tubovesicular que está ubicada en vesículas asociadas a las rutas endocíticas y exocíticas del parásito [194].

2.4.4. Subfamilia ABCG

La subfamilia ABCG de *Leishmania* se encuentra constituida por 6 hemitransportadores, varios de los cuales han sido caracterizados por nuestro grupo. Dos de ellos, ABCG4 y ABCG6, están involucrados en el tráfico de fosfolípidos. Tanto ABCG4 como ABCG6 están localizados en la membrana plasmática y el bolsillo flagelar del parásito. La sobreexpresión de ABCG4 está asociada a una mayor resistencia a análogos de alquilfosfolípidos como la MLF, edelfosina, y perifosina [124]. La sobreexpresión de ABCG6 le confiere a *L. infantum* resistencia a sitamaquina y MLF, mientras que en *L. donovani* se observó resistencia a camptotecina asociada a un eflujo rápido del fármaco [125, 195]. El transportador ABCG2 está también localizado en

vesículas adyacentes al bolsillo flagelar y está implicado en la translocación de fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmática del parásito [196]. Recientemente se ha demostrado que ABCG2 está parcialmente localizado en la membrana del parásito y está implicado en la resistencia a Sb^{III} mediante un aumento en el eflujo de este metal [102]. Además, ABCG1 y ABCG2 están implicados en el transporte de tioles no proteicos y podrían ser claves para la infectividad y supervivencia del parásito [197, 198]. Por último, ABCG5 no está vinculado a la resistencia a fármacos ni al tráfico de fosfolípidos. Este transportador está localizado en vesículas próximas al bolsillo flagelar y al núcleo del parásito y está implicado en el transporte del grupo hemo obtenido a partir de la hemoglobina del hospedador internalizada por el parásito [199].

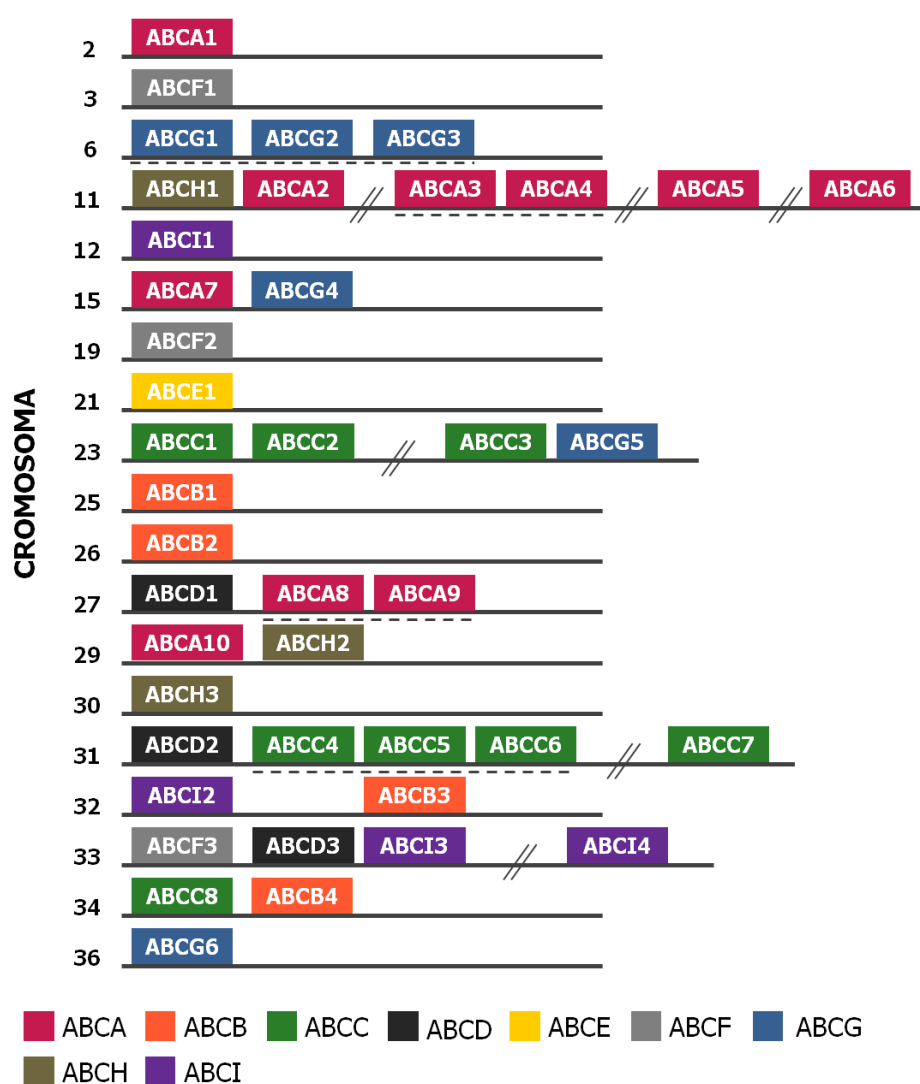


Figura 19. Localización cromosómica de genes que codifican para transportadores ABC en *Leishmania*. Se indican los 36 cromosomas y las distintas subfamilias de transportadores ABC con diferentes colores. Las agrupaciones de varios genes pertenecientes a la misma subfamilia ubicados en tándem se indican con líneas discontinuas. Las líneas oblicuas indican genes de la misma subfamilia que no están ubicados en loci adyacentes. Adaptado de [180].

2.4.5. Subfamilia ABCI

La subfamilia ABCI, fue inicialmente clasificada como “otros transportadores” [180], y está integrada por cuatro genes (ABCI1-ABCI4) que codifican para hemitransportadores únicos de tripanosomátidos. Además, ABCI2 es un gen exclusivo del género *Leishmania*, ya que no se hallaron genes homólogos en otros organismos tripanosomátidos. ABCI4, fue el primer miembro de la familia caracterizado por nuestro grupo y demostró estar implicado en la resistencia a porfirinas tóxicas y Sb^{III} , probablemente mediando el transporte de este metal conjugado a tioles de bajo peso molecular [101]. Al igual que varios miembros de la subfamilia ABCG, ABCI4 posee una localización celular dual, la proteína se encuentra tanto en mitocondria como en la membrana plasmática de *L. major* [101].

Aunque existen genes que codificarían para miembros de las restantes subfamilias de transportadores ABC en *Leishmania* (ABCD-ABCH), dichas proteínas no se han caracterizado aún en *Leishmania spp.*

Objetivos

La leishmaniasis representa un grave problema sanitario a nivel mundial. Los fármacos disponibles para tratar la enfermedad poseen una elevada toxicidad y la emergencia de resistencias frente a los mismos hacen que la identificación de nuevas dianas terapéuticas específicas de *Leishmania spp.* sea una cuestión prioritaria y urgente para poder combatir la enfermedad.

Aunque han pasado más de 10 años desde la publicación de los primeros genomas de tripanosomátidos, la mayor parte de las proteínas de estos organismos todavía están anotadas como proteínas hipotéticas conservadas (~65%) por lo que se desconoce su función y su relevancia biológica.

Los transportadores ABC son una familia de transportadores ubicuos, que están implicados en una gran variedad de procesos biológicos. Varios de ellos están directamente implicados en la resistencia a fármacos, lo que los convierte en potenciales dianas terapéuticas y en candidatos interesantes para el desarrollo racional de fármacos. En *Leishmania* y otros organismos tripanosomátidos se han identificado y estudiado en profundidad diversos transportadores ABC y se ha establecido su relevancia en la resistencia a fármacos. La subfamilia ABCI se comenzó a estudiar en nuestro laboratorio hace algunos años debido a que se trataba de un grupo de transportadores únicos de tripanosomátidos que podrían jugar un papel fundamental en la resistencia a fármacos además de ser relevantes para la infectividad del parásito.

En el presente trabajo nos planteamos como objetivo general la caracterización funcional del transportador ABCI3 de *L. major*, poniendo especial énfasis en su implicación en la resistencia a fármacos y en el papel que juega en la infectividad y supervivencia intracelular del parásito. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

1. Análisis de la secuencia y predicción de la estructura de ABCI3.
2. Localización celular del transportador ABCI3.
3. Implicación del transportador ABCI3 en la resistencia a fármacos.
4. Implicación del transportador ABCI3 en los procesos de metacicloogénesis, infectividad y supervivencia del parásito en macrófagos peritoneales de ratón.

Materiales y Métodos

1. Materiales

1.1. Soluciones de uso general

Tampón fosfato salino (PBS 1X): NaCl 130 mM, KCl 2,6 mM, KH_2PO_4 1,2 mM, Na_2HPO_4 8,1 mM y pH 7.

Tampón HBS: NaCl 137 mM, KCl 5 mM, Na_2HPO_4 7 mM, HEPES 21 mM y pH 7,4.

Tampón de lisis: Tris-HCl 50 mM y NaCl 150 mM y pH 7.5.

Tampón Urea : NaH_2PO_4 10 mM, β -mercaptoetanol 1%, SDS 1%, urea 5 M y pH 7,4.

Tampón HPMI-Glucosa: NaCl 120 mM, KCl 5 mM, MgCl_2 400 μM , CaCl_2 40 μM , NaHCO_3 10 mM, Na_2HPO_4 5 mM, HEPES 10 mM, glucosa 10 mM y pH 7,2. Se prepara 10X, se filtra y se agrega la glucosa y el CaCl_2 al tampón 1X, inmediatamente antes de usarlo.

Tampón TE: Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM y pH 7,4.

TAE 10X: Tris 0,4 M, EDTA 10 mM, ácido acético glacial 0,2 M.

Tampón de carga para ADN (6X): azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%.

1.2. Reactivos para biología molecular

Agarosa: Pronadisa.

Ampicilina: Sigma. Solución 100 mg/mL en agua milliQ.

Bromuro de etidio: Sigma.

Desoxinucleótidos: Roche.

Enzimas de restricción: Roche y Thermo Fisher.

Fenol. Sigma.

Fosfatasa alcalina: Roche.

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

5-bromo-4-cloro-3-indol- β -galactopiranósido (X-Gal): Roche. Solución 20 mg/mL en dimetilformamida.

T4 DNA ligasa: Invitrogen.

1.3. Soluciones para electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

Tampón de electroforesis de proteínas (10X): Tris-HCl 0,25 M, glicina 1,92 M y SDS 1%. El pH se ajusta a 8,3 y se filtra.

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

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

Acrilamida-bisacrilamida: 29:1 al 8-10% concentración final.

Persulfato de amonio (PSA): Sigma. Se prepara a una concentración de 100 mg/mL en agua milliQ y se filtra.

N, N, N', N'-tetrametiletilenediamina (TEMED): Bio-Rad

Tampón de muestra para geles de proteínas 4X: Tris-HCl 200 mM, SDS 8%, glicerol 40%, azul de bromofenol 0,04% m/v. Ajustar a pH 6,8. Se preparan alícuotas y se congela. Al tampón 1X se le agrega DTT 1M preparado en el momento para una concentración final de 100mM.

1.4. Soluciones para Western Blot

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

Solución de transferencia: Tris base 25 mM y glicina 192 mM se prepara en el momento en agua MilliQ.

Rojo de Ponceau: Solución de Rojo de Ponceau-S al 0,5% y ácido acético al 1%.

1.5. Soluciones para Southern Blot

Solución de despurinización: HCl 0,25 M.

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

Solución de neutralización: Acetato de sodio 3 M pH 5,5.

Solución de transferencia (SSC 20X): NaCl 3 M y citrato de sodio 0,3 M. Ajustar a pH 7.

Solución de ácido maléico: NaCl 150 mM y ácido maléico 100 mM, pH 7,5.

Tampón de lavado: Solución de ácido maléico y Tween-20 al 3%.

Se utilizaron reactivos DIG Easy Hyb™ de Roche para el marcado no-radiactivo, bloqueo de membranas y detección de ácidos nucleicos en los ensayos de Southern Blot:

Solución de bloqueo: 10 mL Reactivo de bloqueo en 90 mL de solución de ácido maléico.

DIG DNA Labeling Kit: Mix 10X de hexanucleótidos, DIG-11-dUTP (dUTPs marcados con digoxigenina), y Enzima Klenow (2U/μl).

Solución de hibridación DIG Easy Hyb Granules

Anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina

Tampón de detección: Tris-HCl 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 50 mM. Ajustar a pH 9,5.

Solución de revelado: 200 µl de NBT/BCIP (Nitroazul de tetrazolio (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3'-indolfosfato (BCIP)) en 10 mL de tampón de detección.

1.6. Fármacos y reactivos para estudios funcionales

Digitonina: Sigma.

Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF): Sigma.

Inhibidor de proteasas: Thermo Scientific. Tabletas para preparar 50 mL de solución 1X. Contiene los inhibidores AEBSF, E64, Leupeptina, Aprotinina, Pepstatina A, Bestatina y EDTA.

Biotina: EZ-Link Sulfo-NHS-SS-biotin, Thermo Fisher Scientific.

Estreptavidina: Resina de estreptavidina-agarosa, Pierce™-Thermo Scientific.

Igepal CA-630: Sigma.

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

Aglutinina de cacahuete (PNA): Vector Laboratories.

Anfotericina B: Sigma.

Miltefosina (hexadecilfosfocolina): Zentaris.

Paromomicina: Sigma.

Pentostam® (Sb^V): GlaxoSmithKline.

Pentamidina: Sigma.

Peróxido de hidrógeno (H₂O₂): Sigma.

Tafenoquina: GlaxoSmithKline.

Tartrato de potasio y antimonio (Sb^{III}): Sigma.

Zn^{II}-Mesoporfirina: Frontier Scientific.

Zn^{II}-Protoporfirina: Frontier Scientific.

1.7. Líneas celulares y animales de experimentación**1.7.1. Bacterias**

Para la propagación de insertos clonados y construcciones utilizadas posteriormente para transfectar parásitos, se han utilizado las siguientes cepas de *Escherichia coli*:

DH5α: *supE44 ΔlacU169 (φ80/acZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1* (GIBCO).

TOP10: F⁻ mcrA Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ /*lacX74* *recA1* *deoR* *araD139* Δ (*ara leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* (Str^R) *endA1* *nupG* (Invitrogen).

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

1.7.2. Parásitos

Todos los ensayos descritos en el presente trabajo se realizaron con parásitos promastigotes de *Leishmania major* (MHOM/IL/80/Friedlin).

1.7.3. Ratones

Se utilizaron ratones machos BALB/c (Charles River Breeding Laboratories) de 6 semanas de edad para la obtención de macrófagos peritoneales. Se mantuvieron en las instalaciones del Animalario del IPBLN en condiciones libres de patógenos (entre 1 y 2 semanas).

1.8. Medios de cultivo

1.8.1. Medios de cultivo para bacterias

Medio LB líquido

Bacto-Tryptona 1 % (p/v), NaCl 1 % (p/v), extracto de levadura 0,5 % p/v y ajustar a pH 7 con NaOH.

Medio LB agar

Bacto Agar al 1,5 % en LB líquido.

Medio NZY⁺

Contiene 10 g/L de NZ amina (caseína hidrolizada), 5 g/L de extracto de levadura, 5 g/L de NaCl y pH 7,5. Previo a su utilización, se agregan 12,5 mL de MgCl₂ 1 M, 12,5 mL de MgSO₄ 1 M y 20 mL de una solución de glucosa al 20%. Este medio se utilizó únicamente para los ensayos de mutagénesis dirigida.

Medio de congelación

Medio LB líquido con 10% glicerol.

1.8.2. Medios de cultivo para parásitos

Medio RPMI 1640 modificado

Para el cultivo de promastigotes de *Leishmania* se utiliza medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO) con HEPES 20 mM y NaHCO_3 20 mM suplementado con:

SAA 10X - solución de azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos compuesta por: arginina 4,4 mg/mL, cistina 0,8 mg/mL, glutamato 2,5 mg/mL, glutamina 16,4 mg/mL, prolina 69 mg/mL, L-ornitina 1 mg/mL, glucosa 7 mg/mL, fructosa 4 mg/mL, malato 6,7 mg/mL, α -cetoglutarato 3,7 mg/mL, fumarato 0,55 mg/mL y succinato 0,6 mg/mL.

Vitaminas (1000X) – pantotenato cálcico 1 mg/mL, cloruro de colina 1 mg/mL, ácido fólico 1 mg/mL, clorhidrato de piridoxal 1 mg/mL, clorhidrato de tiamina 1 mg/mL, I-inositol 20 mg/mL, nicotinamida 1 mg/mL y riboflavina 0,1 mg/mL.

Se ajusta el pH a 7,2 y se esteriliza por filtración. Se suplementa con 10 % de suero fetal bovino (GIBCO) inactivado por calor a 56°C durante 45 minutos (hiFBS).

Medio M-199

El medio de cultivo M-199 (GIBCO) se suplementa con 10 % hiFBS .

Medio de congelación

Se utiliza RPMI modificado con 10% hiFBS y 10% Dimetilsulfóxido (DMSO).

1.9. Plásmidos

1.9.1. Plásmidos de clonaje

pGEM-T

Vector de clonaje utilizado para el subclonado de fragmentos de ADN amplificados por PCR y construcciones para la obtención de parásitos mutantes nulos por recombinación homóloga (Promega).

1.9.2. Plásmidos de expresión en *Leishmania*

Los plásmidos de expresión en *L. major* fueron cedidos por el Dr. Stephen M. Beverley (Washington University, St Louis, MO, USA).

pXG

Vector para la expresión constitutiva de proteínas en *Leishmania spp.* Contiene el gen que codifica la neomicina fosfotransferasa II (pXG-NEO) que les confiere a los parásitos transfectados resistencia a la geneticina (G418) [200]. Se ha utilizado también una variante de este plásmido (pXG-HYGRO) en la que se sustituyó el cassette de resistencia a geneticina por el de la higromicina fosfotransferasa, confiriéndole a los parásitos resistencia a higromicina.

pXG-/GFP+ y pXG-GFP+2/

Vectores que permiten clonar genes para la expresión constitutiva de proteínas fusionadas a la proteína verde fluorescente (GFP) en *Leishmania spp.* [200]. En el caso de pXG-/GFP+ obtenemos una proteína de fusión que contiene a la GFP en el extremo carboxilo terminal, mientras que al utilizar pXG-GFP+2/ obtenemos una proteína de fusión con la GFP en el extremo amino terminal.

pIR1SAT

EL vector de expresión pIR1SAT contiene el gen de la estreptotricina acetiltransferasa (SAT) que le confiere a los parásitos resistencia a la nourseotricina. Este vector puede utilizarse como vector episomal o integrativo. Para la integración del cassette de expresión, el vector debe digerirse con la enzima *Swa*I. El vector linearizado está diseñado para integrarse en el genoma de *Leishmania spp.* reemplazando una copia del gen SSU del ARNr por recombinación homóloga.

3XFLAGpIR1SAT

La versión 3XFLAGpIR1SAT fue una construcción que se llevó a cabo durante el desarrollo de esta tesis. Al vector pIR1SAT se le añadieron 3 copias en tándem del octapéptido FLAG de tal forma que se obtienen proteínas fusionadas a 3XFLAG (3XFLAG-tag: MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKPG) en el extremo N-terminal.

1.10. Antibióticos de selección para parásitos transfectantes

Geneticina (GIBCO)

Se utilizó para seleccionar parásitos transfectantes con los vectores pXG-NEO, pXG-/GFP+ y pXG-GFP+2/ así como para la obtención de parásitos mutantes nulos. La selección de los parásitos transfectantes se inicia con 5 µg/mL de G418 y se va

aumentando gradualmente hasta alcanzar 500 µg/mL en pases sucesivos. Una vez seleccionados los transfectantes los cultivos se mantienen en 50-100 µg/mL de G418.

Higromicina (Invitrogen)

La higromicina (HYGRO) se utilizó para seleccionar parásitos transfectados con pXG-HYGRO y para la obtención de parásitos mutantes nulos. La selección se realiza de forma similar a la G418 pero utilizando 10 µg/mL de higromicina como concentración inicial de selección, aumentándola en los pases sucesivos hasta 500 µg/mL. Los cultivos se mantuvieron después a 50-100 µg/mL de HYGRO.

Nourseotricina (Werner BioAgents)

Se utilizó para la selección de parásitos transfectados con los vectores pIR1SAT y 3XFLAGpIR1SAT. La concentración inicial utilizada para la selección de parásitos fue de 10 µg/mL, aumentándose en pases sucesivos hasta 200 µg/mL. Los cultivos se mantuvieron posteriormente a 50-100 µg/mL.

1.11. Anticuerpos

Nombre	Tipo	Dilución	Proveedor
anti-GFP	policlonal	1/5.000	Rockland Company
anti-α-tubulina	monoclonal	1/10.000	Sigma
anti-gp63	monoclonal	1/10.000	Life Span BioSciences
anti-HMGS	policlonal	1/100.000	-
anti-cTXNPx	monoclonal	1/6.000	-
anti-FLAG	policlonal	1/2.000	Thermo
anti-IgG	policlonal	1/5.000	Dako
anti-DIG	policlonal	1/5.000	Roche

El anticuerpo anti-HMGS (3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A sintasa) fue cedido por los Dres. D. González-Pacanowska y L.M. Ruiz-Pérez (Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, IPBLN-CSIC, Granada) y el anticuerpo anti-cTXNPx (triparredoxina peroxidasa citosólica) fue cedido por la Dra. Ana M. Tomas (Instituto de Biología Molecular y Celular, Porto, Portugal).

1.12. Oligonucleótidos

Los siguientes oligonucleótidos se diseñaron durante el desarrollo de esta tesis para ser utilizados principalmente en reacciones de PCR, secuenciación, y análisis de expresión por Real-Time.

1.12.1. Oligonucleótidos utilizados para secuenciación

Nombre	Secuencia 5'→3'
sABC13Fw1	CTA CGT CGC GTG CGA GAC
sABC13Rv1	CGA AGT AGT CCA CAT GCG C
sABC13Fw2	GCA GAC AGT GTG GAA GC
sABC13Fw3	CAG CGT CTA CC AGAT GGA GC
sABC13Fw4	GAC GAT CCT CCA ATA CGT G
sABC13Fw5	GAC AAC GCT GCT TCG AG
sABC13mutFw	GTA CTT CAC TTA CCC TCA ACT G
s5UTRFw	TAG AGT GTA TTG TGA TCG CT
s5UTRRv	GAT CAC AAT ACA CTC TAC GC
s3UTRFw	GTA TGC CGT GCT ACC TTA TC
s3UTRRv	ATA AGG TAG CAC GGC ATA CA

1.12.2. Oligonucleótidos utilizados para amplificar el gen *ABC13*

Nombre	Secuencia 5'→3'
ABC13Fw6	GTc ccg ggA TGC AAG CAC TGA CTA GGC G
ABC13Rv6	GAc ccg ggT CTG AAG CAG CAA CGG AGT
ABC13Fw7	ATg ccg ccg cTG TAT GAC GTG TGA ACC GCT G
ABC13Rv7	CAC aat tgG TGA CAC GCC ACG CCA TCG TCG TGC
ABC13Rv8	CTa ata tta GAA GCC GCG TTG GCG CCC GCC
ABC13Fw10	TAC CCG GGA TGA CGT GTG AAC CGC TG
ABC13Fw11	GCT ATA TCG CCC TTG ACG GCA TTC CG
3UTRRv3	ccc ggg TGT TTG TGG CTG TTC TGT C

1.12.3. Oligonucleótidos utilizados en mutagénesis dirigida

La sustitución de un codón AAG por un codón ATG reemplaza un residuo de lisina (K) en la posición 1088 por uno de metionina (M) en el motivo Walker A del dominio NBD del transportador.

Nombre	Secuencia 5'→3'
ABCI3mutFw1	CCA AGT GGG GCA GGA ATG AGT TCG CTC AAT CT
ABCI3mutRv1	AGA TTG AGC GAA CTC ATT CCT GCC CCA CTT GG

1.12.4. Oligonucleótidos utilizados en qPCR

Nombre	Secuencia 5'→3'
RTiABCI3Fw1	AGC GCT CTT CAG TGT TGC TG
RTiABCI3Rv1	GCA CTC GTT GGC GAA GGT AA
LmTRFw1	CGG CTG CGT CCC TAA GAA AC
LmTRRv1	GGC CCT CCG TAT CAG CAA AC

1.12.5. Oligonucleótidos utilizados para la generación de mutantes nulos de *ABCI3*

Nombre	Secuencia 5'→3'
5UTRFw	aga tct AGC CGG TGT AAC TCA CAG CA
5UTRRv	att taa atG CCG CAA CCC TGT AAC GAC G
3UTRFw	att taa att cta gaG TGC ATG CTC AAC ACC TCG C
3UTRRv	gat atc GAT ATC TCA CCC GGT CCA TCA GTG GT

1.12.6. Oligonucleótidos utilizados para la obtención de sondas para Southern blot

Nombre	Secuencia 5'→3'
HYGROFw2	CAG CGA GAG CCT GAC CTA TTG C
HYGRORv2	ATG CGA CGC AAT CGT CCG ATC
NEOFw2	TGG ATT GCA CGC AGG TTC TC
NEORv2	GGA GCG GCG ATA CCG TAA AG
3UTRFw2	TCT ACC GTG TCG GGC TTT GT

3UTRRv2	GAA CCG TGC TGG TTC ACC TT
----------------	----------------------------

1.12.7. Otros oligonucleótidos

Nombre	Secuencia 5'→3'
LmSL	AAC GCT ATA TAA GTA TCAG
ABCI3Rv3	CTA TAT CGT TTG AGA AGG
SSUFw	GAT CTG GTT GAT TCT GCC AGT AG
SSURv	CTG CAG GTT CAC CTA CAG CTA C
pIR1SATFw	CGT GTG TTG AGC CGT CC
pIR1SATRv	ACC TCC GAT CCT CTA GAA CTA GTG
SATFw1	TAA GCA GAC AGC TCC TTG GC
HYGROFw1	CCG CAA GGA ATC GGT CAA TA
HYGRORv1	AAT ACG AGG TCG CCA ACA TC
NEOFw3	AAT GGG CTG ACC GCT TC
NEORv3	GCC CAG TCA TAG CCG AAT AG
ABCI3KOFw1	GTC GCC TCT GCA ATC AGT AG
ABCI3KORv1	GTC CTG CTC GAC AAG GTT AG

Todos los oligonucleótidos utilizados en esta tesis se sintetizaron en el Servicio de Síntesis de Oligonucleótidos del Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra (IPBLN-CSIC), Granada. Las secuencias correspondientes a los sitios de restricción, incluidas en algunos oligonucleótidos, se indican en letras minúsculas. En los oligonucleótidos utilizados en la mutagénesis dirigida se indica en rojo la mutación.

1.13. Sondas empleadas para el marcaje de orgánulos celulares de *Leishmania*

MitoTracker Deep Red 633: Marcador específico de la mitocondria de células vivas. (Thermo Fisher).

4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI): Se une a regiones del ADN ricas en adenina y timina y se utiliza para visualizar el material genético de las células. Se utilizó el medio de montaje para microscopía ProLong™ Diamond Antifade Mountant (ThermoFisher) que incluye el DAPI.

1.14. Sondas empleadas para el estudio de alteraciones en la función mitocondrial

MitoSOX Red: Sonda utilizada para medir los niveles de anión superóxido producidos en la mitocondria (Invitrogen).

JC-1: Sonda empleada para estudiar alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial (Invitrogen).

Rodamina 123: Sonda empleada para estudiar alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial (Sigma).

FCCP: Carbonilcianuro-p-trifluorometoxifenilhidrazona. Es un ionóforo y agente desacoplante (interrumpe la síntesis de ATP al transportar protones a través de la membrana mitocondrial interna). Se utiliza como control de despolarización en los ensayos de determinación del potencial de membrana mitocondrial (Sigma).

Antimicina A: Es un inhibidor de la transferencia de electrones en el complejo III de la cadena respiratoria mitocondrial. Como consecuencia de ello, interrumpe la fosforilación oxidativa y genera radicales libres superóxido (Sigma).

2. Métodos

2.1. Metodologías básicas de biología molecular

El gen *ABC13* completo y las regiones UTR del mismo, utilizadas en las construcciones para la obtención de los mutantes nulos para dicho gen, se obtuvieron utilizando técnicas básicas de biología molecular tales como la amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR a partir de ADNg de *L. major*, la purificación de dichos fragmentos a partir de geles de agarosa, la digestión con enzimas de restricción, defosforilación y ligación de los fragmentos de ADN con la T4 ADN ligasa a los vectores de interés. Todas las reacciones de PCR de fragmentos mayores a 1 Kb se realizaron usando el Expand High Fidelity PLUS PCR System (Roche). Los fragmentos se clonaron inicialmente en pGEM-T y posteriormente en los vectores de expresión para *Leishmania*. Se transformaron bacterias electrocompetentes *E. coli* preparadas en nuestro laboratorio que se cultivaron y almacenaron siguiendo los métodos estándar. Además, todas las construcciones se secuenciaron antes de ser transfectadas en los parásitos.

2.2. Cultivo de *Leishmania*

Los promastigotes de *L. major* se cultivaron *in vitro* a 28 °C en medio RPMI 1640 modificado suplementado con 10% hiFBS. Cada 48 h los parásitos en fase logarítmica tardía se siembran a 4×10^6 /mL en frascos estériles de 25 mL. Se realizaron pases sucesivos de un mismo cultivo como máximo hasta un mes después de la fecha en que los parásitos se descongelaron.

Para la criopreservación de los cultivos, se centrifugaron aproximadamente 1×10^8 parásitos a 1500g y 4°C, y se resuspendieron en 1 mL de medio de congelación. Los viales se congelan a -80 °C en un recipiente con isopropanol. Después de 24 hs, los viales pueden transferirse a tanques de nitrógeno líquido para su almacenamiento por períodos de tiempo prolongados.

2.3. Transfección de *Leishmania*

Para la transfección de *L. major* se utilizaron promastigotes en fase logarítmica tardía. Los parásitos se lavaron 2 veces con HBS y se resuspendieron a $25\text{-}30 \times 10^6$ parásitos en 400 µL en HBS. Se añadieron 5 µg de ADN, se mezcló suavemente, se transfirió a una cubeta de electroporación de 2 mm y se incubó en hielo durante 10 min. Para la electroporación se utilizó un electroporador ECM 600 de BTX. Las condiciones del pulso eléctrico fueron las siguientes: 450 V, R1 y 500 µF. Inmediatamente después del pulso, se añadieron 600 µL de RPMI modificado con 10% hiFBS y se transfirieron a frascos con 4 mL del mismo medio. Se incuban a 28 °C y a las 24 h se realizan diluciones 1:5 y 1:10 en medio de cultivo fresco y se les añadió el antibiótico de selección correspondiente. Transcurridos entre 5-10 días, y una vez que los parásitos control hayan muerto, se procede a aumentar la concentración del antibiótico de selección para los parásitos transfectados.

Para obtener parásitos mutantes nulos se utilizó otro protocolo de transfección empleando el kit Amaxa[®] Human T Cell Nucleofector[®] (Lonza). Los parásitos se centrifugaron a 1500 g y 4 °C durante 10 min y se resuspendieron en Human T Cell Nucleofector Solution (5×10^7 en 100 µL de solución). Se agregaron 5-10 µg de ADN y se incubó la mezcla durante 10 min en hielo. Se transfirió la mezcla a una cubeta y se electroporaron los parásitos utilizando un electroporador Nucleofector[™] 2b y el programa U-033. Los parásitos se transfirieron a frascos con 5 mL de medio RPMI modificado con 10% hiFBS. A las 24 h se agregó el antibiótico de selección correspondiente (NEO 10 µg/mL o HYGRO 20 µg/mL) y se prepararon tres diluciones

en el mismo medio de cultivo para aislar clones por dilución límite: dilución I (24 mL de dilución 1/6 del cultivo original), dilución II (24 mL de dilución 1/12 de la dilución I) y dilución III (24 mL de dilución 1/12 de la dilución II). Se sembraron 200 µL de cada dilución por pocillo en placas de 96 pocillos y se incuban a 28 °C durante 7-10 días. Se transfirieron los parásitos a frascos con 5 mL del mismo medio de cultivo y se incubaron a 28 °C.

Alternativamente se pueden aislar clones de los parásitos transfectantes sembrando una dilución del cultivo en placas de RPMI-agar (medio semisólido). Se sembraron 300-400 µL con 1000-5000 parásitos por placa. Se incubaron durante 7-10 días hasta observar que aparecen colonias aisladas visibles al microscopio. Los parásitos de las colonias se transfirieron a frascos con 5 mL de RPMI modificado con 10% hiFBS y antibiótico de selección y se incubaron a 28 °C.

2.4. Obtención de parásitos mutantes nulos para *ABCI3*

Para generar parásitos mutantes nulos para el gen *ABCI3*, se realizaron 2 construcciones que contienen los genes que confieren resistencia a NEO e HYGRO flanqueados por fragmentos de las regiones 5'UTR y 3'UTR de *ABCI3*. Para ello se amplificaron por PCR a partir de ADN_g de *L. major*, utilizando los oligonucleótidos 5'UTRFw, 5'UTRRv, 3'UTRFw y 3'UTRRv. Se obtuvieron 2 fragmentos, uno de 1365 pb que contiene la región 5'UTR y un fragmento del extremo 5' de *ABCI3*, y otro de 1085 pb correspondiente a la región 3'UTR de *ABCI3* y un fragmento del gen aguas abajo. Los fragmentos se secuenciaron y se clonaron en pGEM-T.

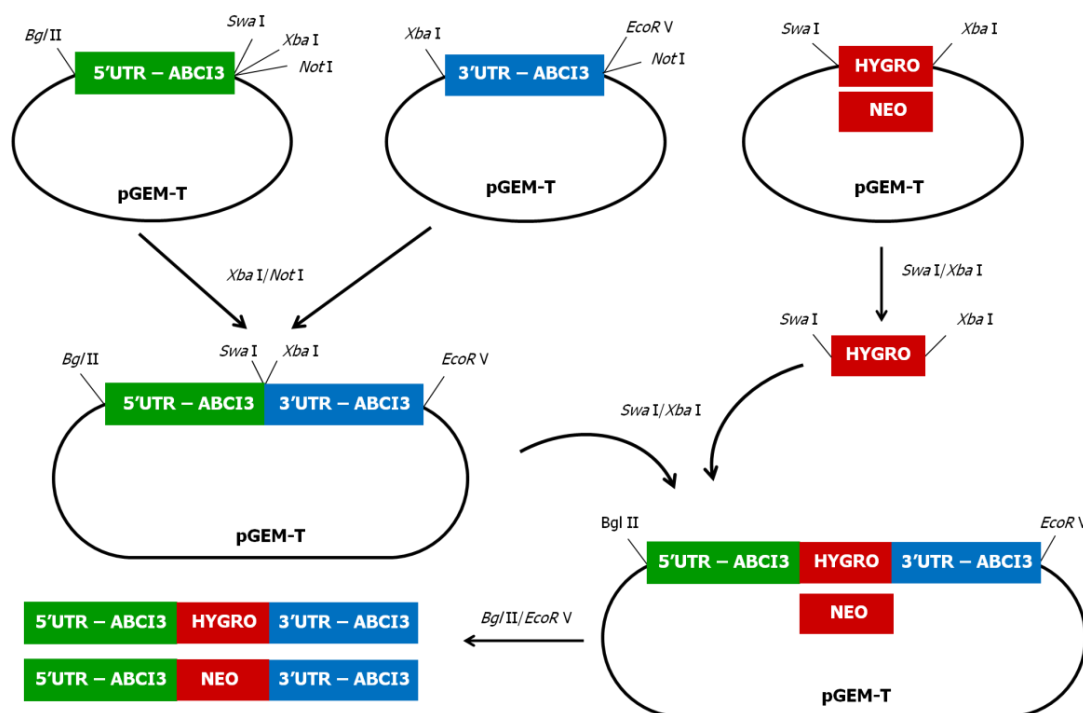


Figura 20. Generación de las construcciones para la obtención de parásitos mutantes nulos para ABCI3. Se clonaron las regiones 5'UTR y 3'UTR del gen *ABCI3*. Se digirieron los fragmentos con las enzimas de restricción *XbaI* y *NotI* y se ligaron los productos para obtener la construcción 5'UTR-3'UTR en pGEM-T. En el siguiente paso se digirió esta construcción y los cassetes de HYGRO y NEO con las enzimas de restricción *SwaI* y *XbaI*. Se ligaron los fragmentos resultantes y se obtuvieron los cassetes de resistencia flanqueados por las UTRs de *ABCI3*. Finalmente se obtuvo el fragmento para transfectar los parásitos mediante digestión con las enzimas *BglII* y *EcoRV*.

Se utilizaron además 2 construcciones que contienen los genes que confieren resistencia a los antibióticos de selección flanqueados por las regiones intergénicas de la dihidrofolato reductasa: el cassette de resistencia a NEO (2037 pb) y el de resistencia a HYGRO (2174 pb). Tras sucesivas digestiones y ligaciones con las enzimas correspondientes (Figura 20), se obtuvieron dos fragmentos de aproximadamente 4,5 kb que se purificaron para transfectar promastigotes de *L. major* de acuerdo al protocolo descrito en el apartado anterior. Se obtuvieron parásitos transfectantes por dilución límite en placas de 96 pocillos y colonias de clones aislados en placas con medio RPMI-agar. Por lo menos 20 clones de dos transfecciones independientes se analizaron mediante PCR para verificar la integración del cassette en el locus de *ABCI3*. Cuatro clones de cada transfección se analizaron posteriormente mediante Southern Blot.

2.5. Obtención de parásitos mutantes nulos parciales complementados con una copia episomal de *ABCI3*

Los parásitos *ABCI3*^{+/-} se transfectaron con las siguientes construcciones para complementar la copia genómica delecionada de *ABCI3* con una copia episomal: ABCI3pXG-NEO, GFP-ABCI3pXG, ABCI3pIR1SAT y 3×FABCI3pIR1SAT. El vector pIR1SAT puede utilizarse como vector episomal o integrativo. Para utilizarlo como vector integrativo, después de clonar el gen, el plásmido se digiere con la enzima *Swa*I. El gen se integra en el locus SSU de los ARNr de *Leishmania* y se transcribe utilizando el promotor de la ARN polimerasa I. La construcción 3×FABCI3pIR1SAT posee, además de 3 copias en tandem del tag FLAG en el extremo N-terminal de la proteína, la región 3'UTR completa del gen. Los parásitos *ABCI3*^{+/-} se transfectaron siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.3 y se seleccionaron utilizando los antibióticos correspondientes de acuerdo a las metodologías descritas anteriormente. Las distintas líneas celulares de parásitos complementados obtenidas se probaron en los ensayos de resistencia y sensibilidad a fármacos para determinar si eran capaces de restablecer el fenotipo wild-type (wt) de los parásitos *ABCI3*^{+/-}.

2.6. Análisis de la secuencia del gen *ABCI3* y predicción de la estructura del transportador *ABCI3* de *L. major*

Se realizó una búsqueda de genes homólogos en otras especies de *Leishmania*, en otros tripanosomátidos y en otros organismos procariotas y eucariotas utilizando la base de datos TriTrypsDB (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) y las herramientas informáticas de alineamiento de secuencias BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). El análisis de secuencia de la proteína y la predicción de estructura secundaria y topología del transportador *ABCI3* se realizó empleando el algoritmo TopPred [201] (version 1.0) (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::toppred>) y el servidor CCTOP (del inglés "Conserved Consensus TOPology prediction server") (<http://cctop.enzim.ttk.mta.hu/>) [202].

2.7. Extracción de ácidos nucleicos

2.7.1. Aislamiento de ADN plasmídico de bacterias

El método de extracción de ADN plasmídico de bacterias se basa en el método de la lisis alcalina y precipitación con acetato de potasio. Para ello se utilizó el

E.Z.N.A.[®] Plasmid Mini Kit I (Omega Bio-Tek) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. El ADN plasmídico se eluyó en tampón TE o agua milliQ.

2.7.2. Aislamiento de ADN genómico de *L. major*

Para obtener ADN genómico de *L. major* se utilizó el método de Sambrook et al. [203] con algunas modificaciones. Se centrifugaron 1×10^8 parásitos a 2000 g durante 10 min a 4 °C. Se lavaron con PBS frío y se resuspendieron en 900 µL de PBS frío. Para lisar los parásitos se agregaron 100 µL de PBS-NP-40 10% y se resuspendió el pellet suavemente. A continuación se centrifugaron a 14000 g durante 10 min a 4°C y se resuspendió el pellet conteniendo los núcleos en 200 µL de tampón TE con SDS 1%. Se agregó el mismo volumen de fenol, se agitó por inversión y se centrifugó a 14000 g durante 2 min. Se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se repitió el procedimiento con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1). A continuación se repitió la extracción con el mismo volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). Se precipitó el ADN por adición de 1/10 del volumen de acetato sódico 3 M pH 6,25 y 2,5 volúmenes de etanol absoluto frío. Se agitó y se centrifugó a 14000 g durante 20 min. Se lavó el pellet con etanol absoluto 70%, se secó y se resuspendió en tampón TE.

2.7.3. Aislamiento de ARN total de *L. major*

El aislamiento de ARN total de *L. major* se realizó en el Servicio de Genómica del IPBLN-CSIC utilizando el kit High Pure RNA isolation kit (Roche). Se partió de cultivos de promastigotes en fase logarítmica de crecimiento (5×10^7 parásitos) y se agregó el doble de la concentración de DNAsa recomendada por el fabricante.

La concentración y pureza de todos los ácidos nucleicos obtenidos mediante los diferentes métodos se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific).

2.8. Southern Blot

2.8.1. Separación de fragmentos de ADN genómico en geles de agarosa y transferencia a membranas de nylon

Para determinar que el cassette de resistencia se haya integrado correctamente en el locus del gen *ABC13*, se aisló ADNg de varios clones y se analizó mediante separación en geles de agarosa y Southern blot. Para ello se digirieron 6 µg de ADNg de promastigotes en fase logarítmica de crecimiento con la enzima *EcoRV* (14-18 h).

Tras la digestión, los fragmentos de ADN generados se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa 0,7% a 60 V durante 3 h. A continuación, el gel se incubó en solución de depurinización durante 3 min, seguido de 30 min en solución de desnaturalización y otros 30 min en solución de neutralización. Después de la neutralización, se realizó la transferencia del ADN del gel a membranas de nylon Hybond-N[®] (GE Healthcare), según la técnica descrita por E. Southern [204]. El ADN se transfirió a la membrana durante toda la noche, utilizando el tampón de transferencia SSC 20X. Una vez terminada la transferencia, las membranas se lavaron con tampón SSC 2X durante 10 min, se secaron a temperatura ambiente y se fijó covalentemente el ADN a las membranas utilizando un crosslinker de UV CL-1000 (UVP) a $\lambda=254$ nm y 120 mJ/cm².

2.8.2. Marcaje de sondas de ADN con digoxigenina

Para la detección de los fragmentos de ADN de interés, se utilizaron sondas de ADN_g marcadas con digoxigenina (DIG). Los fragmentos que se utilizaron como sondas se obtuvieron mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos para la región 3'UTR de *ABCI3*, para el cassette de HYGRO, NEO y para el gen *ABCI3*. En todos los casos el tamaño del fragmento amplificado fue de entre 600 y 700 pb. Se desnaturalizaron 100 ng de cada fragmento, calentándolos a 100 °C durante 10 min e incubándolos luego en hielo durante 10 min. Se añadieron 2 μ L de hexanucleótidos, 2 μ L de deoxiuridintrifosfato marcado con digoxigenina (DIG-11-dUTP) y 1 μ L de polimerasa Klenow. Se incubaron a 37 °C durante 4 h. Se agregaron 2 μ L EDTA 0,2 M pH 8,2, 2 μ L LiCl 4 M y 60 μ L de etanol absoluto a cada tubo y se incubaron las muestras a -80°C para precipitar el ADN. Se centrifugaron 5 min a 4 °C y 14000 g para eliminar el sobrenadante, se eliminaron los restos de etanol por evaporación y se resuspendieron las sondas en 50 μ L de tampón TE.

2.8.3. Hibridación y revelado

Las membranas se lavaron con tampón SSC 2X y se incubaron con 10 mL de solución de prehibridación a 42 °C durante 2 h en agitación. A continuación se retiró la solución de prehibridación y se agregaron 10 mL de solución de hibridación con la sonda marcada con DIG (15-20 ng sonda/mL). La sonda se desnaturalizó a 100 °C durante 10 min, se incubó 10 min en hielo y se agregó inmediatamente al tampón de hibridación. La membrana se incubó con la solución de hibridación a 42 °C durante toda la noche. Una vez finalizada la hibridación, las membranas se lavaron a

temperatura ambiente 2 veces durante 5 min en solución de lavado I, 2 veces durante 15 min con solución de lavado II y por último se enjuagaron brevemente con solución de lavado III. Las membranas se incubaron en solución de bloqueo durante 30 min y a continuación en solución de bloqueo con anticuerpo anti-DIG durante 30 min. Se realizaron 2 lavados de 15 min con solución de lavado III y se incubaron las membranas durante 5 min con solución de detección, se transfirieron a bolsas de plástico y se añadieron 10 mL de solución de detección con NBT/BCIP (200 µL). Las bolsas se sellaron y se incubaron en la oscuridad 10-30 min, hasta que aparecieron las bandas de ADN. Se retiró la solución de detección y se detuvo la reacción añadiendo agua milliQ.

2.9. Síntesis de ADNc

Para la síntesis de ADNc se realizó una PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR) utilizando 1 µg de ARN total de *L. major* y el kit qScript cDNA Synthesis Kit® (Quanta Biosciences, Inc), según las instrucciones del fabricante. Posteriormente, el ADNc se utilizó en una reacción de PCR convencional con oligonucleótidos específicos para determinar el sitio de adición del SL al gen *ABCI3* y para determinar el número de copias del gen y los niveles de expresión del mismo en reacciones de PCR en tiempo real.

2.10. PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)

Las qPCRs se llevaron a cabo utilizando un termociclador CFX96 Touch (Bio-Rad) y el kit PerfeCTa® SYBR® Green supermix (Quanta Biosciences) siguiendo las instrucciones del fabricante, exceptuando el volumen final de la reacción (10 µL). Todas las reacciones se realizaron por triplicado y los resultados representan la media de tres experimentos independientes.

2.10.1. Determinación del número de copias de *ABCI3*

Para determinar el número de copias genómicas de *ABCI3* en los parásitos mutantes nulos parciales para *ABCI3* se utilizó el método de cuantificación absoluta. Para ello se realizaron curvas de calibración utilizando ADNg de cada una de las líneas celulares de *L. major* y el gen de la tripanotión reductasa (TR) (LmjF.05.0350) como gen de referencia.

2.10.2. Determinación de los niveles de expresión de *ABCI3* en *L. major*

Para determinar la abundancia de transcritos de *ABCI3* en *Leishmania* se utilizó el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta C_T}$ [205] utilizando el software CFX Manager (Bio-Rad). Para utilizar este método, las eficiencias de amplificación del gen de referencia y del gen de interés deben ser similares y próximas a 1.

2.11. Mutagénesis dirigida

Obtuvimos una versión del gen *ABCI3* que posee una mutación en el residuo de K1088 conservado por un residuo de M en el motivo Walker A del NBD del transportador (*ABCI3*^{K/M}) mediante mutagénesis dirigida. Este residuo es esencial para la hidrólisis de ATP en los transportadores ABC, obteniéndose una versión de la proteína que no es funcional. Al formarse un dímero entre un monómero del mutante *ABCI3*^{K/M} y un monómero funcional, se inactivaría a la proteína nativa, impidiendo el transporte de sustrato. De este modo se generan parásitos dominantes negativos que poseen una menor cantidad de proteína nativa *ABCI3* funcional. El gen conteniendo la mutación se clonó en los vectores pXG y pXG-GFP+2/ y se transfectaron promastigotes de *L. major* para obtener parásitos dominantes negativos *ABCI3*^{K/M}.

Para realizar la mutagénesis dirigida se utilizó el kit QuickChange® II XL site-directed mutagenesis (Agilent). Se utilizó el software recomendado por el fabricante (<https://www.genomics.agilent.com/primerDesignProgram.jsp>) para diseñar un par de oligonucleótidos que contienen la mutación y son complementarios entre sí. Se utilizó el gen clonado en pGEM-T como molde en una reacción de PCR con la enzima *Pfu* Ultra High Fidelity DNA Polimerase y posteriormente se eliminó el ADN molde (que no contiene la mutación), utilizando la enzima *Dpn* I, que hidroliza el ADN plasmídico metilado. Se transformaron bacterias con el producto de la PCR y se verificó la mutación del gen por secuenciación.

2.12. Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

La separación de proteínas de acuerdo a su peso molecular en geles de acrilamida, en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), se realizó de acuerdo al método de Laemmli [206]. Para la electroforesis se prepararon geles discontinuos de acrilamida:bisacrilamida 30%, 29:1 (Bio-Rad) compuestos por un gel superior concentrador (3-5% acrilamida-bisacrilamida y pH 6,8) y un gel inferior de separación

al 8-10% de acrilamida-bisacrilamida y pH 8,8. Las muestras se desnaturalizaron a 95 °C durante 5 min en tampón de carga antes de cargarlas en el gel. Las migraciones electroforéticas se realizaron en cubetas Mini PROTEAN® (Bio-Rad) a 20 mA por gel.

2.13. Western Blot

Para la detección de proteínas mediante Western Blot, una vez finalizada la SDS-PAGE las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF Immobilon-P (Millipore). Las membranas se sumergieron en metanol durante 30 s, se lavaron con agua milliQ durante 2 min y finalmente se sumergieron en tampón de transferencia durante 5-10 min. Los papeles Whatman que se utilizarán para montar el "sandwich" de la transferencia se sumergieron también en tampón de transferencia. El "sandwich" se montó en un equipo de transferencia semi-seca Trans-Blot® SD (Bio-Rad) y la transferencia se realizó durante 45 min a un voltaje máximo de 25 V. Tras finalizar la transferencia, las membranas se tiñeron con rojo Ponceau durante unos min para visualizar las proteínas, se lavaron con PBS y se incubaron en solución de bloqueo durante 1 h a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4 °C. Una vez bloqueadas, las membranas se lavaron con solución de lavado tres veces en agitación durante 5 min y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo primario. Se repitieron los lavados y se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario conjugado a HRP. Finalmente, se repitieron los lavados y se incubaron las membranas con el sustrato de detección por quimioluminiscencia Pierce™ ECL (Thermo Fisher), según las instrucciones del fabricante. Las diluciones utilizadas para cada anticuerpo se detallan en el apartado de Anticuerpos (Materiales) de esta tesis.

2.14. Determinación de la localización celular de ABCI3 en *L. major*

Para los estudios de localización celular de ABCI3 se utilizaron promastigotes de *L. major* transfectados con ABCI3pXG-HYGRO que expresan el transportador ABCI3 fusionado a GFP en N- y C-terminal.

2.14.1. Microscopía de fluorescencia

Los parásitos en fase logarítmica de crecimiento se incubaron con 50 nM MitoTracker Deep Red FM (Thermo-Fisher) durante 30 min a 28°C en medio RPMI modificado sin hiFBS. Se lavaron 2 veces con PBS frío y se procesaron para su observación en un microscopio confocal SP5 (Leica) con un láser de He/Ne (543 nm) para la detección del Mitotracker Deep Red FM y con un láser de argón (488 nm) para

la detección de la GFP. Los análisis de colocalización se realizaron utilizando el plug-in JACoP del software de procesamiento de imagen Fiji (<https://fiji.sc/>).

2.14.2. Permeabilización de los parásitos con digitonina y digestión con tripsina

Para determinar la localización celular de ABCI3 se realizaron también ensayos de permeabilización con digitonina y digestión con tripsina. Los parásitos se lavaron 2 veces con PBS frío y se resuspendieron en tampón de lisis, a 4×10^7 parásitos/100 μ L para cada concentración de digitonina (0, 20, 50, 100 y 500 μ M). Después de agregar la digitonina, los parásitos se incubaron en hielo durante 30 min. A continuación, los 100 μ L de cada tubo se dividieron en 2 tubos: 50 μ L se utilizaron como controles y a los otros 50 μ L se les agregó tripsina a una concentración final de 0,06 mg/mL. Los parásitos se incubaron con la tripsina durante 10 min a temperatura ambiente. Se recolectaron los parásitos mediante un spin a 14000 g durante 30 s, y los pellets se lavaron con tampón de lisis con PMSF e inhibidor de proteasas. Los pellets se resuspendieron en tampón urea. Los lisados se mantuvieron en hielo durante 20 min y se les agregó tampón de carga 4X para su posterior análisis mediante SDS-PAGE y Western Blot.

2.14.3. Biotinilación de proteínas de superficie de *Leishmania*

La biotina se une específicamente a aminos primarios de proteínas presentes en la superficie celular. Para marcar las proteínas de superficie se utilizaron 1×10^8 promastigotes de *L. major* en fase logarítmica de crecimiento. Los parásitos se lavaron con PBS y se incubaron en 1 mL de PBS en hielo con biotina 1 mM durante 1 h. La reacción de biotinilación se detuvo mediante tres lavados con un tampón PBS suplementado con 50 mM Tris-HCl. A continuación los parásitos se incubaron en hielo durante 1 h con tampón de lisis suplementado con 2% Igepal CA-630 y 0,1% SDS. Los sobrenadantes se incubaron durante 1 h a 4 °C con 100 μ L de agarosa-streptavidina, que previamente se equilibró con tampón de lisis. La agarosa se lavó 4 veces con 1 mL de tampón de lisis y las proteínas biotiniladas se eluyeron con 30 μ L de tampón de carga. Las muestras se separaron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de PVDF como se describió anteriormente. Para la inmunodetección de GFP-ABCI3 se utilizó un anticuerpo anti-GFP. Se utilizaron anticuerpos anti-gp63 y anti-cTXNPx como controles de biotinilación positivo y negativo, respectivamente.

2.15. Determinación de la concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de fármacos en *Leishmania*

El ensayo de viabilidad celular en placa de 96 pocillos nos permite determinar la resistencia o sensibilidad de los parásitos a diferentes compuestos o fármacos de interés. Varias oxidorreductasas mitocondriales y citosólicas del parásito son capaces de reducir el sustrato soluble amarillo bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2yl]-2,5-difeniltetrazolio (MTT), a un producto insoluble de color púrpura denominado formazán [207]. La cantidad de producto formado es directamente proporcional al número de parásitos viables y se cuantifica espectrofotométricamente después de solubilizar los cristales de formazán con SDS. Los parásitos se sembraron en placas de 96 pocillos (300.000 parásitos/pocillo), 100 µL/pocillo, y se incubaron durante 72 h a 28°C en presencia de distintas concentraciones de fármaco, por triplicado. A continuación se añadieron 10 µL de MTT (5 mg/mL) y se incubó a 28 °C durante 4 h en la oscuridad. Se agregan 50 µL de SDS 20% a cada pocillo para disolver los cristales de formazán y las placas se incuban a 37 °C durante 16-20 h. Por último, la concentración de formazán se determina espectrofotométricamente midiendo la DO a 540 nm en un lector de placas de ELISA.

La concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) se define como la concentración de fármaco capaz de inhibir el crecimiento de los parásitos en un 50% cuando el cultivo en ausencia de fármaco alcanza la fase logarítmica tardía de crecimiento. El porcentaje de crecimiento se calculó dividiendo las absorbancias a las distintas concentraciones de fármaco entre la absorbancia control (sin fármaco).

2.15. Determinación de la acumulación y eflujo de antimonio en *Leishmania* mediante ICP-MS

Para determinar la acumulación de Sb^{III} en promastigotes de *L. major* se incubaron 1×10^8 parásitos con 100 µg/mL (163 µM) de tartrato de potasio y antimonio en medio M199 sin hiFBS durante 10, 30 y 60 min a 28°C. Los parásitos se centrifugaron para quitarles el medio y los pellets se conservaron a -80°C hasta la determinación de la acumulación de antimonio [91]. Para la determinación del eflujo de Sb^{III}, los parásitos wt y *ABCI3*^{-/-} se incubaron durante 1 h con 163 y 326 µM Sb^{III} respectivamente, para partir de una acumulación de Sb^{III} aproximadamente igual en ambas líneas celulares. A continuación los parásitos se lavaron con PBS y se incubaron a 28°C en el mismo medio de cultivo durante 30 y 60 min. Los parásitos se

centrifugaron y los pellets se almacenaron a -80°C hasta la determinación de Sb^{III} . Para la determinación de antimonio mediante ICP-MS (Espectrometría de Masa con Plasma de Acoplamiento Inductivo) se disolvieron los pellets en 200 μL de ácido nítrico concentrado durante 24 h a temperatura ambiente. Las muestras se diluyeron en agua destilada hasta 3 mL y se inyectaron en el equipo ICP-MS (Perkin-Elmer, perteneciente al Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada) para la cuantificación.

2.16. Acumulación de Zinc^{II}-Mesoporfirina en líneas celulares de *Leishmania*

Para determinar la acumulación de la Zinc^{II}-mesoporfirina (ZnMP), un análogo de grupo hemo fluorescente, se utilizaron promastigotes de *L. major* en fase logarítmica de crecimiento. Los parásitos se lavaron dos veces con medio HPPI y se resuspendieron en el mismo medio a una concentración final de $5 \times 10^7/\text{mL}$. A continuación se incubaron con 10 μM de ZnMP durante 15 min a 28°C . Se lavaron con PBS-BSA 5% y se incubaron durante 10 min a 4°C en el mismo tampón. Se lavaron con PBS y únicamente los parásitos que se permeabilizaron con digitonina se incubaron con 20 μM digitonina durante 10 min en hielo. Finalmente los parásitos se diluyeron a $10\text{--}15 \times 10^6/\text{mL}$ y se fijaron con paraformaldehído al 2% en PBS. Para determinar la cantidad de ZnMP retenida en el interior de los parásitos, se midió la fluorescencia mediante citometría de flujo ($\lambda_{\text{ex}}=405\text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}}=575\text{--}585\text{ nm}$) empleando un citómetro FACS Aria Cell Sorter III (Beckton Dickinson).

2.17. Determinación de los niveles de ATP en *Leishmania*

Los niveles de ATP en las líneas celulares de *Leishmania* se determinaron utilizando un ensayo de luminiscencia con el kit CellTiter-Glo (Promega). Se incubaron 4×10^6 promastigotes en fase logarítmica de crecimiento en RPMI modificado con 10% hiFBS y 100 μM Sb^{III} . Los parásitos se mezclaron con el mismo volumen de reactivo CellTiter-Glo (50 μL) y se incubaron en placas de 96 pocillos en la oscuridad, durante 10 min. La detección de la bioluminiscencia se realizó utilizando un lector de placas Infinite F200 (Tecan Austria GmbH).

2.18. Determinación de alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial de *Leishmania*

Para estudiar posibles alteraciones en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_{\text{m}}$) se utilizaron las sondas fluorescentes rodamina 123 (Rho) y JC-1. La

acumulación de ambas sondas depende del $\Delta\psi_m$. La acumulación de Rho en la matriz mitocondrial es mayor cuanto mayor es el $\Delta\psi_m$, experimentando un desplazamiento hacia el rojo en la emisión de fluorescencia, además de un descenso de la fluorescencia (quenching) debido a las altas concentraciones que puede alcanzar en el interior de la mitocondria. La acumulación de la sonda catiónica JC-1 en la mitocondria es sensible al $\Delta\psi_m$, observándose un cambio en la emisión de fluorescencia del verde (525 nm) al rojo (590 nm) al formarse agregados de este compuesto en el interior de la mitocondria. Se determina entonces el ratio entre las 2 fluorescencias para estudiar el $\Delta\psi_m$ (FL2/FL1). La sonda JC-1 es muy sensible a los tiempos y concentración de incubación. Además, es fotosensible y puede ocurrir que en algunos casos no se equilibre la formación de agregados con los monómeros. Estas características de JC-1 pueden provocar errores en la determinación del $\Delta\psi_m$ [208]. Por otra parte, Rho es sustrato de algunos transportadores ABC [209, 210], lo que puede también provocar una interpretación errónea de los resultados obtenidos en la determinación del $\Delta\psi_m$. Por dichos motivos y para obtener un resultado más fiable, decidimos utilizar ambas sondas para estudiar las alteraciones en el $\Delta\psi_m$.

Los parásitos (4×10^6 promastigotes/mL) se incubaron en tampón HBS con 5 μ M JC-1 o 1 μ M Rho a 28°C durante 10 min. A continuación se lavaron una vez con HBS y se determinó la fluorescencia por citometría de flujo. Se incubaron parásitos con 10 μ M FCCP durante 10 min a 28°C como control positivo de despolarización de la membrana mitocondrial.

2.19. Determinación de los niveles de ROS mitocondriales en *Leishmania*

Los niveles de radical superóxido mitocondrial se determinaron mediante citometría de flujo, utilizando MitoSOX red. Para ello se lavaron 10^7 parásitos con medio RPMI sin hiFBS y se incubaron con 5 μ M de MitoSOX red durante 30 min a 28°C. Los controles positivos se incubaron posteriormente con 15 μ M de antimicina A (AntA) durante 15 min a 28 °C. Después de lavar los parásitos con tampón HBS, la fluorescencia se determinó mediante citometría de flujo utilizando un citómetro FACSCalibur (Becton Dickinson) (λ_{ex} = 488 nm y λ_{em} = 580 nm).

2.20. Purificación de parásitos metacíclicos de *Leishmania*

Para determinar el porcentaje de parásitos metacíclicos presentes en los cultivos de cada una de las líneas celulares, se utilizó el método de selección negativa mediante aglutinina de cacahuete (PNA) [211]. La PNA se une selectivamente a los

carbohidratos de superficie Gal- β (1-3)-GalNAc presentes en la forma promastigote de *L. major* pero ausentes en la forma metacíclica infectiva del parásito. Para ello se cultivaron los parásitos durante 3, 6 o 9 días en medio RPMI 1640 modificado suplementado con 10% hiFBS a 28°C. A continuación se lavaron dos veces con PBS y 10^8 parásitos se incubaron con 100 μ g de PNA, durante 20 min a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, los parásitos se centrifugaron durante 10 min a 60g y 4°C. Se recogieron los sobrenadantes, que contienen los parásitos metacíclicos (PNA⁻), y se contaron los parásitos en una cámara de Neubauer.

2.21. Infección *in vitro* de macrófagos peritoneales de ratón con líneas de *L. major*.

Los macrófagos peritoneales de ratones BALB/c se extrajeron mediante masaje y lavado peritoneal utilizando RPMI 1640 a 4°C, en condiciones de esterilidad. Las células se centrifugaron a 500g y se resuspendieron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% hiFBS, 100 U/mL de penicilina y 100 μ g/mL de estreptomicina. Los macrófagos se contaron en una cámara de Neubauer, se ajustó el volumen para obtener 1×10^6 macrófagos/mL y se sembraron 500.000 macrófagos por pocillo en placas de 24 pocillos provistas de cristales de 22 mm en el fondo de cada pocillo. Para que las células se adhieran a los cristales, se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 6 h. Posteriormente se realizaron 3 lavados con RPMI 1640 y 10% hiFBS templado para eliminar las células en suspensión. Los macrófagos adheridos se incubaron en las mismas condiciones de temperatura y CO₂ hasta el día siguiente.

Previamente a la infección, los parásitos se lavaron con RPMI 1640 y 5% hiFBS y se contaron en cámara de Neubauer. Los macrófagos se incubaron con los parásitos a 35°C durante 4 h y se utilizó un ratio parásito:macrófago de 5:1. Una vez finalizada la infección, se realizaron 3 lavados con RPMI 1640 sin suero, para eliminar los parásitos no fagocitados. A continuación, los macrófagos infectados se incubaron durante 24 o 72 h a 37°C y 5% CO₂ en RPMI 1640 y 10% hiFBS. Una vez transcurrido este tiempo, los macrófagos se fijaron con paraformaldehído 2% en PBS suplementado con 1 mM Glucosa durante 30 min a 4 °C. Se lavaron 2 veces con PBS y se incubaron durante 30 min con PBS-Glicina 0,5 M. Por último, se repitieron los lavados y se incubaron con TritónX-100 0,2% en PBS para permeabilizar las células. Para realizar la tinción de las células con DAPI, los cristales se depositaron boca arriba, se dejaron secar unos min, se les añadió una gota de medio de montaje Prolong con DAPI, y se depositaron en portaobjetos para ser visualizados en un microscopio Olympus IX81.

Para cuantificar la infección, se realizaron fotos y se utilizó el programa de procesamiento de imágenes Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). En cada experimento se contaron un mínimo de 300 macrófagos de cada condición en 10-12 campos, por triplicado. El porcentaje de macrófagos infectados se calculó dividiendo el número de macrófagos infectados entre el número total de macrófagos. Para obtener la media de amastigotes por célula, se divide el total de amastigotes entre el número de macrófagos infectados. Para estudiar la susceptibilidad de los amastigotes intracelulares de *Leishmania* a Pentostam[®], se utilizó el mismo procedimiento de infección pero los cultivos de macrófagos infectados se incubaron con diferentes concentraciones del fármaco durante 72 h.

Resultados

1. Análisis predictivo de la estructura del transportador ABCI3 de *L. major*

El gen *ABCI3* (LmjF.33.3040) es un gen de copia única ubicado en el cromosoma 33 de *L. major* (TriTrypDB). *ABCI3* pertenece a la subfamilia ABCI, que incluye también al gen *ABCI4* (LmjF.33.3260), recientemente caracterizado en nuestro laboratorio [101], y los genes *ABCI1* (LmjF12.1190) y *ABCI2* (LmjF32.2060), todavía sin caracterizar. Este grupo de transportadores ABC se encuentra únicamente en tripanosomátidos y por dicho motivo poseen una elevada identidad de secuencia únicamente con los genes ortólogos de otras especies de *Leishmania*. Los alineamientos de secuencia realizados mostraron que la identidad de secuencia con los genes ortólogos de *Leishmania spp.* es entre el 70-95% (Tabla 1). En cambio, si lo comparamos con los genes de otros tripanosomátidos, como *T. cruzi* y *T. brucei brucei*, la identidad de secuencia no alcanza el 30%. Si tenemos en cuenta a los otros integrantes de la familia ABCI, la identidad de secuencia también es baja, siendo la mayor la observada con *ABCI4* (25%). Las búsquedas utilizando la herramienta de alineamiento BLAST no encontraron genes homólogos a *ABCI3* en otros organismos eucariotas ni procariotas.

Tabla 1: Porcentajes de identidad aminoacídica entre el transportador ABCI3 de *L. major* y los transportadores ortólogos de otras especies de tripanosomátidos.

Organismo	Gen	% identidad aminoacídica
<i>L. tropica</i>	LTRL590_330039800	95.8
<i>L. donovani</i>	LdBPK_333200.1	92.5
<i>L. mexicana</i>	LmxM.32.3040	89.9
<i>L. tarentolae</i>	LtaP33.3290	78.1
<i>L. braziliensis</i>	LbrM.33.3320	74.7
<i>C. fasciculata</i>	CFAC1_210042700	48.9
<i>T. cruzi</i>	TcCLB.508809.30	28.3
<i>T. brucei</i>	Tb927.2.5410	27.1

Según los datos de la secuencia disponible en la base de datos de genomas de kinetoplastidos TriTrypsDB, el gen codificaría una proteína de 1337 aminoácidos y poseería una masa molecular de 145 kDa. Debido a que en la base de datos aparecen

anotados varios sitios de adición del SL, decidimos confirmar cuál era el sitio de adición mayoritario del SL en promastigotes mediante RT-PCR. Para ello utilizamos un oligonucleótido con la secuencia del SL y un oligonucleótido reverso específico de *ABCI3* que amplifica un fragmento del gen. El fragmento obtenido contiene el sitio de adición del SL, una parte de la 5'UTR del gen y el inicio del gen *ABCI3*. A partir del ARN total de promastigotes de *L. major* se sintetizó el ADNc que utilizamos como molde en una PCR convencional. Obtuvimos un fragmento de 518 pb que verificamos mediante secuenciación. La secuencia obtenida concuerda con el principal sitio de adición del SL anotado en la base de datos, pero observamos que existen dos codones de inicio en marco de lectura. El ATG anotado como ATG de inicio en TriTrypDB (ATG2) se encuentra 317 pb aguas abajo del sitio de splicing, y un segundo codón de inicio (ATG1) se encuentra 26 pb aguas abajo del sitio de adición del SL (Figura 21). El nuevo marco abierto de lectura, que comienza con el ATG1 codificaría una proteína de 1434 aminoácidos y una masa molecular de 156 kDa. Este codón de inicio alternativo no es exclusivo de *L. major* y se halla presente también en los genes ortólogos de *L. donovani*, *L. braziliensis* y *L. mexicana*. Para asegurarnos de obtener un transportador funcional, decidimos amplificar el marco de lectura completo del gen *ABCI3* a partir del codón ATG1.

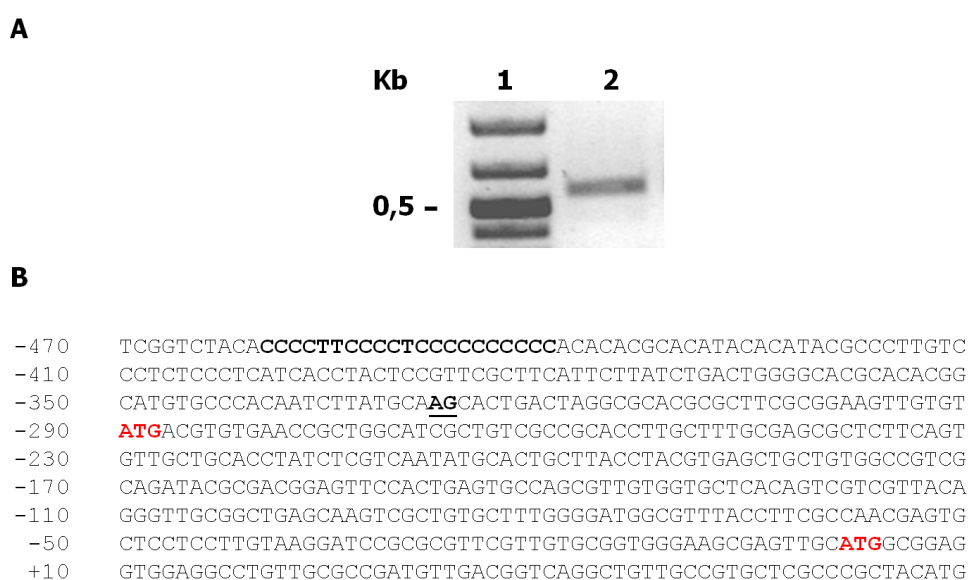


Figura 21. Determinación del sitio de adición del SL en el gen *ABCI3* de *L. major*. A. Producto de PCR obtenido a partir de ADNc de *L. major*. Carril 1: Marcador de peso molecular de 1 Kb. Carril 2: Fragmento de 518 pb obtenido utilizando un oligonucleótido SL y un oligonucleótido específico de *ABCI3*. B. Secuencia de una parte de la región 5'UTR y del gen *ABCI3*. Se indica el sitio de adición del SL (dinucleótido AG en negrita y subrayado). La región rica en pirimidinas aguas arriba del sitio de adición del SL se indica en negritas. Los codones ATG (-290 y +1) se indican en rojo.

Si tenemos en cuenta su secuencia aminoacídica, ABCI3 posee una topología de hemitransportador, con un dominio hidrofóbico que contiene varias hélices α transmembrana y un dominio NBD de unión a ATP en el extremo carboxilo terminal de la proteína. El NBD posee los motivos conservados característicos de dicho dominio (Figura 22A). Para realizar la predicción de la estructura y topología de ABCI3 decidimos utilizar dos algoritmos diferentes: TopPred y CCTOP. El primero utiliza un parámetro fisicoquímico, la hidrofobicidad de los residuos aminoacídicos, para proponer los segmentos transmembrana más probables en la secuencia de la proteína. Los modelos de topología obtenidos se ordenan de acuerdo a la "regla del interior positivo": las regiones citoplasmáticas de la proteína contienen una mayor proporción de residuos cargados positivamente, comparadas con la regiones extracelulares [201]. Por otra parte, el servidor CCTOP utiliza una serie de 10 algoritmos y métodos diferentes para obtener una topología consenso de la proteína. Estos métodos aplican análisis estadístico a las secuencias de las proteínas junto con algoritmos de aprendizaje de máquina (del inglés, "*machine learning*"), tales como las redes neuronales o los modelos ocultos de Markov (HMMs) para predecir la localización de los segmentos transmembrana así como la topología de las proteínas integrales de membrana [212-215]. Además, las metodologías consenso integran y optimizan información de diversos métodos de predicción de estructura para obtener resultados de topología más confiables.

La mayoría de los modelos topológicos obtenidos utilizando el algoritmo de TopPred se descartaron, debido a que la estructura obtenida incluía una parte del NBD, dominio soluble, como parte del dominio transmembrana del transportador. El modelo consenso obtenido utilizando el servidor CCTOP predice 5 hélices transmembrana en la proteína y además el NBD estaría ubicado en la cara citoplasmática de la membrana (Figura 22B).

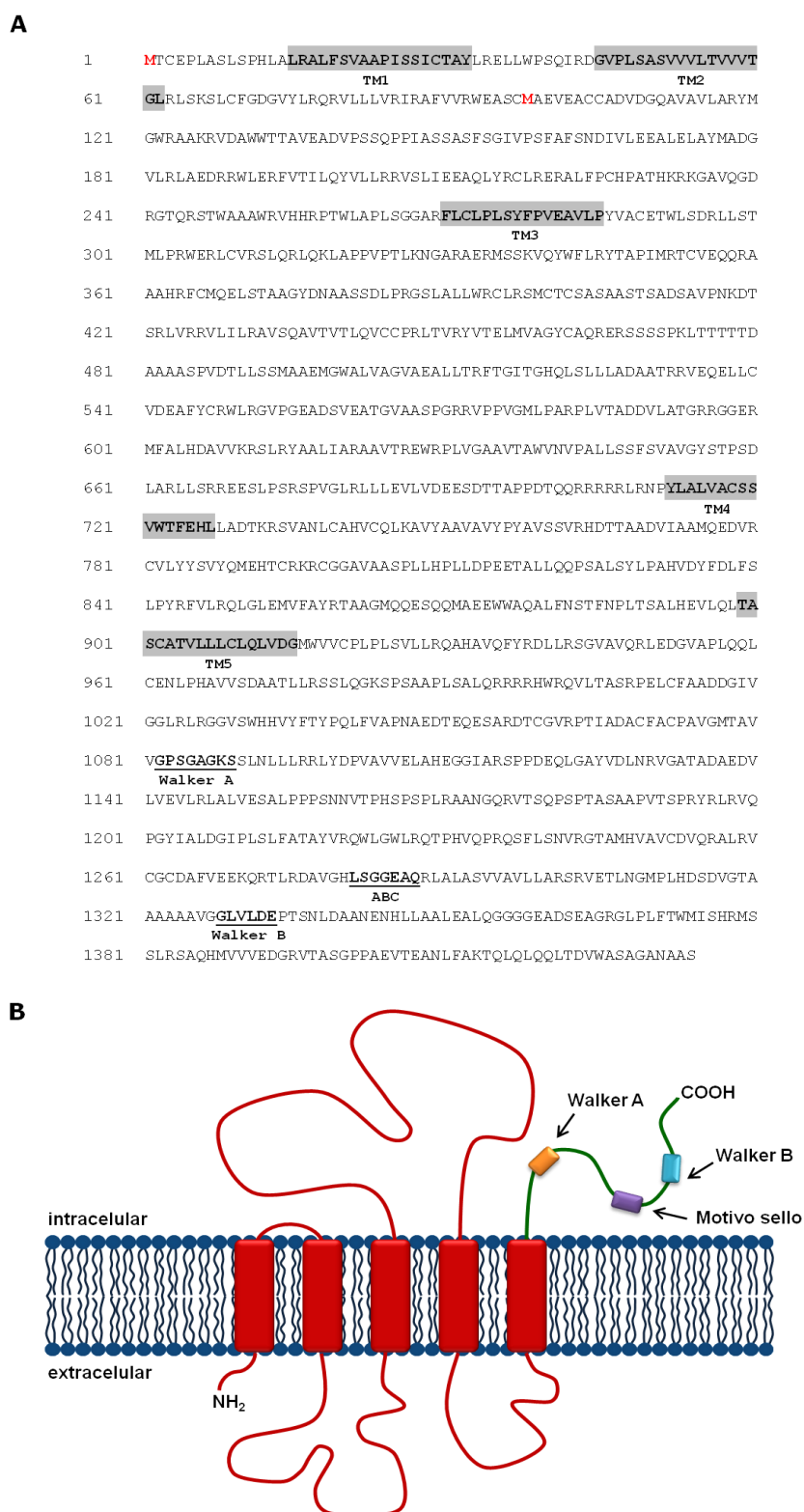


Figura 22. Secuencia aminoacídica y modelo topológico del transportador ABCI3 de *L. major*. A. Secuencia del transportador ABCI3. Se indican en rojo las dos metioninas en marco de lectura y en gris las hélices α transmembrana obtenidas en la predicción de la estructura consenso mediante CCTOP. Los motivos conservados del NBD se indican en negrita y subrayados: Walker A, Walker B y el motivo sello de la familia ABC (ABC). **B.** Esquema que muestra la predicción de la topología del transportador obtenida mediante CCTOP. En rojo se indica el TMD del transportador y en verde el NBD que contiene los motivos conservados Walker A (naranja), Walker B (azul) y motivo sello (morado).

2. Localización celular del transportador ABCI3 en *L. major*.

Para determinar la localización celular de ABCI3, utilizamos los vectores de expresión de *Leishmania* pXG-/GFP+ y pXG-GFP+2/, para obtener proteínas de fusión a GFP en C-terminal (ABCI3-GFP) y N-terminal (GFP-ABCI3), respectivamente. Las construcciones se transfectaron en promastigotes de *L. major* y la expresión de las proteínas se determinó mediante Western Blot utilizando un anticuerpo anti-GFP. Tras 2 semanas de selección con 100 µg/mL de G418 se obtuvieron buenos niveles de expresión para la proteína GFP-ABCI3 (Figura 23). Sin embargo, después de 6 semanas de selección en las mismas condiciones, los niveles de expresión de ABCI3-GFP seguían siendo muy bajos, la proteína no era detectable por microscopía de fluorescencia ni mediante Western Blot (Figura 23). Un problema similar con la expresión de la proteína fusionada a GFP en el extremo C-terminal se observó también durante la caracterización del transportador ABCI4 [101]. Por lo tanto se utilizaron únicamente los parásitos que expresan la proteína GFP-ABCI3 para los ensayos de localización celular.

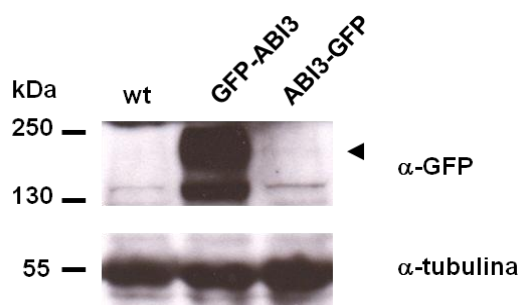


Figura 23. Expresión de las proteínas GFP-ABCI3 y ABCI3-GFP en promastigotes de *L. major*. Se obtuvieron extractos de proteínas totales de parásitos que expresan la proteína ABCI3 fusionada a GFP en N-terminal (GFP-ABCI3) y C-terminal (ABCI3-GFP). Los extractos de proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot utilizando anticuerpos anti-GFP y anti-tubulina (control de carga). Se indican las líneas de *L. major* correspondientes a cada carril: parásitos *L. major* wt (wt) y parásitos que expresan GFP-ABCI3 y ABCI3-GFP. Se indica el marcador de peso molecular a la izquierda de la figura.

2.1. Determinación de la localización celular de ABCI3 mediante microscopía de fluorescencia

Para estudiar la distribución celular de GFP-ABCI3 realizamos ensayos de colocalización utilizando la sonda fluorescente MitoTracker Deep Red FM y microscopía confocal (Figura 24). Para determinar la localización de ABCI3 se analizaron 30 imágenes de parásitos individuales deconvolucionadas y se calcularon los coeficientes de Pearson y Manders. Se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson (CCP) de $0,75 \pm 0,06$ y los siguientes coeficientes de colocalización de Manders (MCC): $M1 = 0,63 \pm 0,10$ y $M2 =$

$0,66 \pm 0,13$. Los valores del CCP pueden variar entre 1 y -1, donde 1 significa que las intensidades de fluorescencia están correlacionadas perfectamente, y -1 cuando la correlación entre las intensidades de fluorescencia es completamente inversa. Por otra parte, los MCC pueden tener valores entre 0 y 1 y nos dan una idea del grado de solapamiento entre las dos sondas.

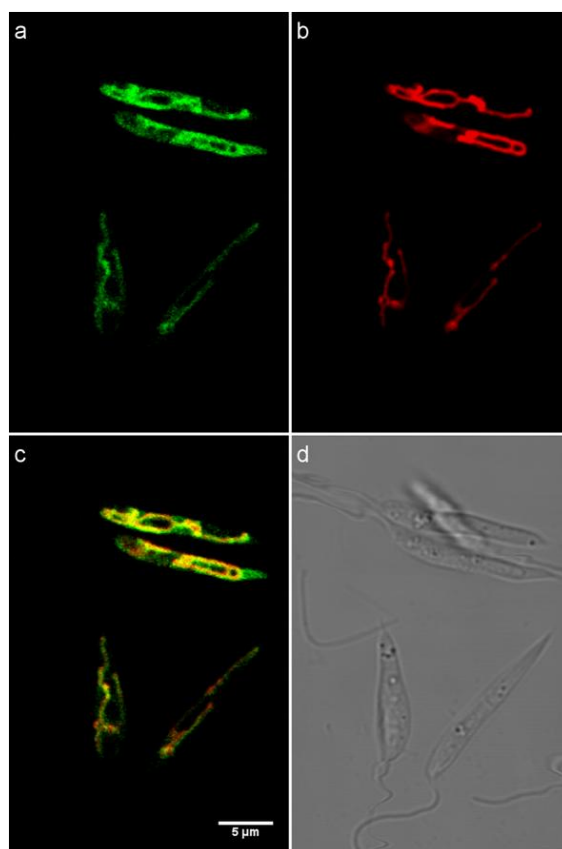


Figura 24. Localización celular del transportador ABCI3 de *L. major*. Imágenes de microscopía confocal de parásitos que expresan la proteína de fusión GFP-ABCI3. **a.** Fluorescencia verde asociada a GFP-ABCI3, **b.** mitocondrias marcadas con Mitotracker Deep Red FM, **c.** superposición de las imágenes a y b que muestra la colocación de ambos fluoróforos (amarillo) y **d.** imagen de contraste diferencial de interferencia (Nomarski).

Teniendo en cuenta los valores obtenidos para el CCP y los MCCs, el transportador ABCI3 de *Leishmania* se localizaría principalmente en la mitocondria del parásito. Se realizó el mismo análisis de microscopía confocal utilizando los parásitos que expresan el mutante ABCI3^{K/M}. La proteína GFP-ABCI3^{K/M} mostró un patrón de localización celular muy similar al obtenido para la proteína GFP-ABCI3 (Figura 25). Por lo tanto la localización de ABCI3 no se ve afectada por la mutación en el Walker A del transportador.

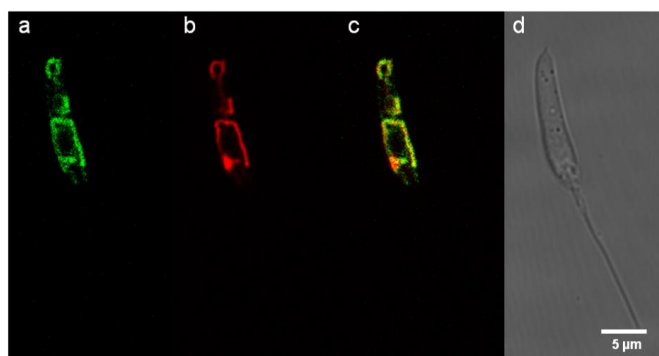


Figura 25. Localización celular del transportador ABCI3^{K/M} de *L. major*. Imágenes de microscopía confocal de parásitos que expresan la proteína de fusión mutada, GFP-ABCI3^{K/M}. **a.** Fluorescencia verde asociada a GFP-ABCI3^{K/M}, **b.** mitocondrias marcadas con Mitotracker Deep Red FM, **c.** superposición de las imágenes a y b que muestra la colocalización de ambos fluoróforos (amarillo) y **d.** imagen de contraste diferencial de interferencia (Nomarski).

2.2. Determinación de la localización celular de ABCI3 mediante ensayos con digitonina y tripsina.

Con el propósito de determinar si el transportador ABCI3 se localiza en la membrana interna o externa de la mitocondria, se utilizaron los parásitos que expresan la proteína de fusión GFP-ABCI3 en un ensayo de permeabilización con digitonina y digestión con tripsina. La digitonina es un detergente que permite permeabilizar selectivamente las diferentes membranas de una célula al aumentar progresivamente la concentración del mismo. La membrana plasmática de *Leishmania* se permeabiliza a concentraciones bajas de digitonina ($\sim 20 \mu\text{M}$), mientras que las proteínas de las membranas mitocondriales y glicosomales se liberan de la membrana, y por lo tanto son accesibles a la tripsina a concentraciones mayores. Después del tratamiento con digitonina y tripsina, los extractos de proteínas totales se analizaron mediante Western blot (Figura 26). Se utilizaron como controles la proteína citosólica cTXNPx y la proteína de la matriz mitocondrial HMGS. La banda correspondiente a la GFP-ABCI3 desaparece casi completamente a $50 \mu\text{M}$ de digitonina, a la misma concentración que la cTXNPx utilizada como control citosólico, lo que indicaría que el transportador ABCI3 estaría ubicado en la membrana mitocondrial externa del parásito, y los NBD estarían ubicados en el lado citosólico de la membrana.

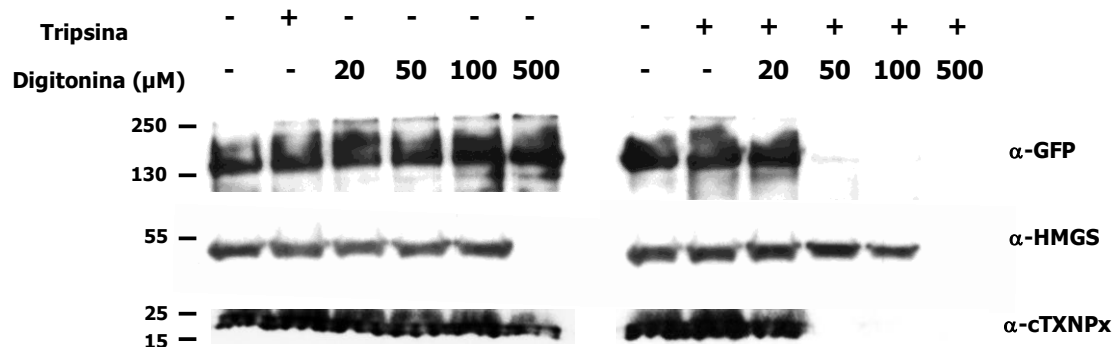


Figura 26. Ensayo de permeabilización con digitonina y digestión con tripsina en *L. major*. Extractos de proteínas totales de promastigotes de *L. major* que expresan la proteína GFP-ABCI3 se trataron con concentraciones crecientes de digitonina en presencia o ausencia de tripsina. Se indican las concentraciones de digitonina (20-500 µM). Se utilizó la proteína cTXNPx como marcador citosólico y la proteína soluble HMGS, como marcador de la matriz mitocondrial. El marcador de peso molecular (en kDa) se indica a la izquierda de la figura.

2.3. Determinación de la localización celular de ABCI3 mediante ensayos de biotinilación.

Por último, se realizaron estudios de biotinilación de proteínas de superficie para determinar si el transportador ABCI3 se encuentra también en la membrana plasmática del parásito. Varios transportadores ABC han demostrado tener localizaciones duales, entre ellos ABCG2 y ABCI4 [101, 102]. Mediante la biotinilación y la posterior unión estreptavidina-biotina, recuperamos GFP-ABCI3 en la fracción eluída. La proteína ABCI3 se detectó mediante Western Blot utilizando un anticuerpo anti-GFP (Figura 27). Se utilizó la proteasa gp63, la principal proteína de superficie en promastigotes de *Leishmania*, como control positivo de biotinilación. La ausencia de una banda correspondiente a la cTXNPx indica que el reactivo de biotinilación no penetró al interior del parásito, demostrando la especificidad del ensayo. Los resultados del ensayo de biotinilación demuestran que el transportador ABCI3 se localiza, además de en la mitocondria del parásito, en la membrana plasmática del mismo.

Por lo tanto, los resultados de los diferentes ensayos de localización celular del transportador ABCI3 indicarían que la proteína posee una ubicación dual, encontrándose mayoritariamente en la membrana externa de la mitocondria del parásito, pero también en la membrana plasmática del mismo.

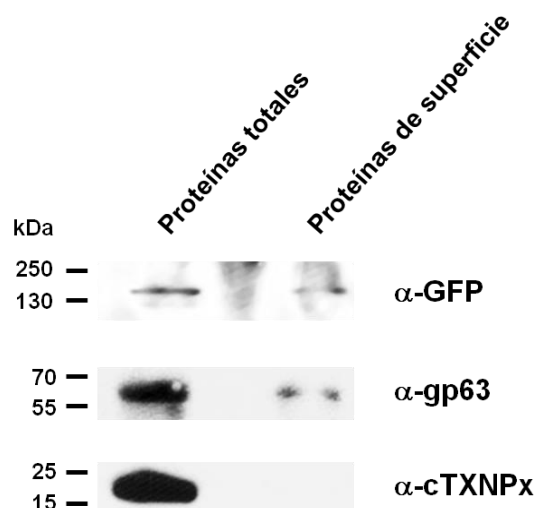


Figura 27. Biotinilación de proteínas de superficie de *L. major*. Se analizaron las proteínas totales y las proteínas biotiniladas de la superficie de promastigotes de *L. major* que expresaban GFP-ABCI3 mediante Western Blot. Se utilizaron los anticuerpos anti-GFP para detectar GFP-ABCI3, anti-gp63 (control positivo) y anti-cTXNPx (control negativo). Se indica el marcador de peso molecular (en kDa) a la izquierda de la figura.

3. Obtención de parásitos mutantes nulos parciales para *ABCI3*

Con el fin de realizar la caracterización funcional del transportador ABCI3 obtuvimos dos construcciones que contienen los cassettes de resistencia a NEO e HYGRO flanqueadas por las regiones UTR del gen *ABCI3*, tal como se describió en los Materiales y Métodos. Las dos construcciones se transfectaron en promastigotes de *L. major* para obtener, tras una primera ronda de transfección, mutantes nulos parciales para el gen *ABCI3* (*ABCI3*^{+/-}) mediante recombinación homóloga. Los clones obtenidos utilizando el cassette de resistencia a HYGRO se analizaron mediante PCR (20 clones) y posteriormente al menos dos clones de dos transfecciones independientes se analizaron mediante Southern Blot, para confirmar que el cassette de resistencia se integró correctamente en el locus del gen *ABCI3* (Figura 28). Se empleó la misma metodología para el cassette de resistencia a NEO, pero después de varias transfecciones, no conseguimos aislar parásitos *ABCI3*^{+/-} resistentes a este antibiótico. Para obtener mutantes nulos para *ABCI3* (*ABCI3*^{-/-}) realizamos una segunda transfección, en las mismas condiciones que la primera, donde transfectamos parásitos *ABCI3*^{+/-} resistentes a HYGRO con el cassette de resistencia a NEO. Sin embargo, aunque aislamos varios clones que eran resistentes a ambos antibióticos, al realizar la comprobación de la integración del cassette de NEO mediante Southern Blot, observamos que el mismo no se había integrado en el genoma del parásito en el locus de *ABCI3*. En el Southern Blot se observaba un banda difusa muy intensa (Figura 29), probablemente debido a la

presencia de una gran cantidad de copias del cassette NEO, lo que estaría indicando que el parásito mantuvo el cassette de resistencia a NEO de forma extracromosómica o episomal. Después de varias transfecciones, en las que obtuvimos resultados similares, no fue posible obtener mutantes nulos para el gen *ABCI3* mediante esta estrategia, lo que podría sugerir que *ABCI3* es esencial para el parásito.

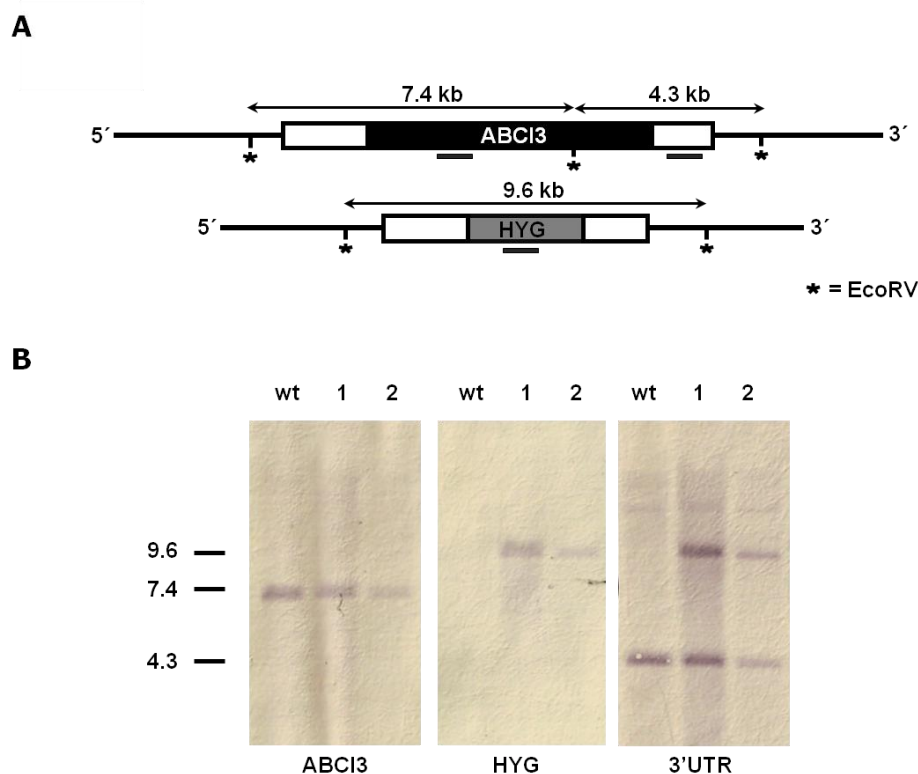


Figura 28. Generación de parásitos mutantes parciales *ABCI3*^{+/-} de *L. major*. **A.** Representación esquemática del locus *ABCI3* de *L. major* y la construcción que contiene el cassette de resistencia a higromicina (HYGRO) utilizada para sustituir una copia del gen *ABCI3* por recombinación homóloga. Se indican las regiones 5'UTR y 3'UTR del gen como rectángulos blancos. Las líneas negras debajo del gen *ABCI3*, el cassette de HYGRO y la 3'UTR indican las regiones que se amplificaron por PCR para utilizarse como sondas específicas en el Southern Blot. Se indican los tamaños de los fragmentos esperados después de digerir el ADN de *L. major* con la enzima de restricción *EcoRV*. **B.** Southern Blot del ADN de *L. major*. El carril 1 corresponde al ADN wt y los carriles 1 y 2 a dos clones de parásitos *ABCI3*^{+/-} obtenidos por transfecciones independientes del cassette de resistencia a HYGRO. Se indican las sondas con las que se hibridó cada una de las membranas (ABCI3, HYGRO y 3'UTR). Las posiciones del marcador de peso molecular (en Kb) se indican a la izquierda de la figura.

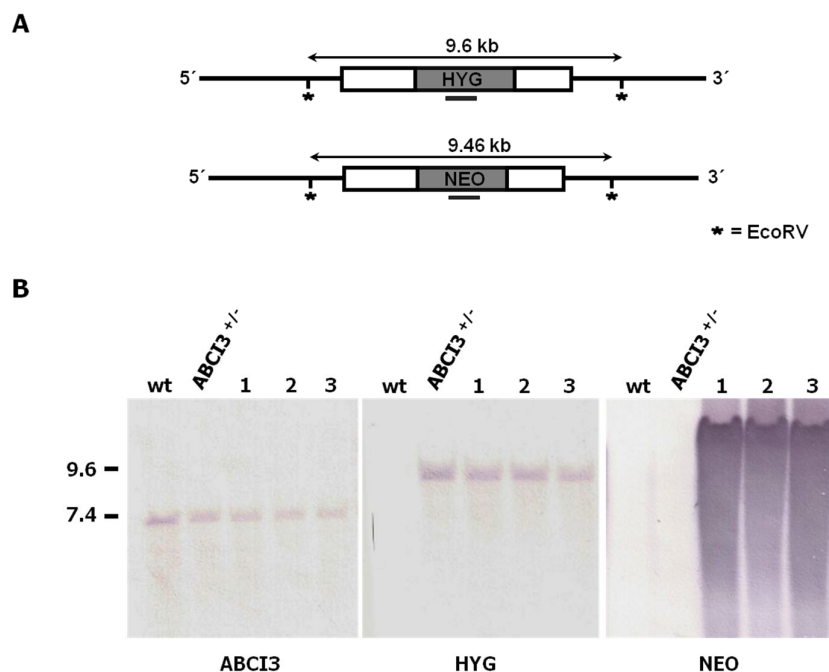


Figura 29. Estrategia para la generación de parásitos *ABCI3*^{-/-} de *L. major*. **A.** Representación esquemática del locus *ABCI3* de *L. major* en los parásitos *ABCI3*^{-/-}, en la que los dos loci del gen han sido sustituidos por los cassettes de resistencia a HYGRO y NEO por recombinación homóloga. Se indican las regiones 5'UTR y 3'UTR del gen como rectángulos blancos. Se indican con líneas negras debajo de los cassettes las regiones que se amplificaron por PCR para utilizarse como sondas específicas en el Southern Blot. Se indican además los tamaños de los fragmentos esperados después de digerir el ADNg de *L. major* con la enzima de restricción *EcoRV*. **B.** Southern Blot del ADNg de *L. major*. Se indican los carriles correspondientes al ADNg de parásitos wt (wt), parásitos *ABCI3*^{+/-} y tres clones de parásitos obtenidos después de transfectar parásitos *ABCI3*^{+/-} con el cassette de resistencia a NEO. Se indican las sondas específicas con las que se hibridó cada una de las membranas (ABCI3, HYGRO y NEO). Las posiciones del marcador de peso molecular (en Kb) se indican a la izquierda de la figura.

2. Determinación del número de copias génicas de *ABCI3* de *L. major*

Se ha observado anteriormente que cuando se intenta delecionar genes de *Leishmania* por recombinación homóloga, en numerosas ocasiones ocurre la duplicación del loci que queríamos delecionar, obteniéndose parásitos resistentes al antibiótico de selección que todavía conservan las dos copias del gen. Por lo tanto, decidimos verificar el número de copias del gen *ABCI3* en los parásitos *ABCI3*^{+/-} mediante qPCR. Para ello se utilizó 1 µg de ARN total de promastigotes de cada línea celular en fase logarítmica de crecimiento para obtener ADNc que se utilizó posteriormente en las qPCR. El ADNc se diluyó 1:5 y se montaron las reacciones de PCR según las instrucciones del fabricante (detalladas en Materiales y Métodos). Se utilizó el método de cuantificación absoluta en el que se comparan los C_T obtenidos,

con los de una curva de calibración utilizando ADNg de parásitos *L. major* wt [216]. Se utilizó el gen de la TR para normalizar la cantidad de ADNg presente en la muestra. Los resultados de la qPCR mostraron que, como era de esperar, la cantidad de copias del gen presentes en las muestras de ADNg de parásitos *ABCI3*^{+/-} era la mitad que las presentes en el ADNg de los parásitos wt (Figura 30).

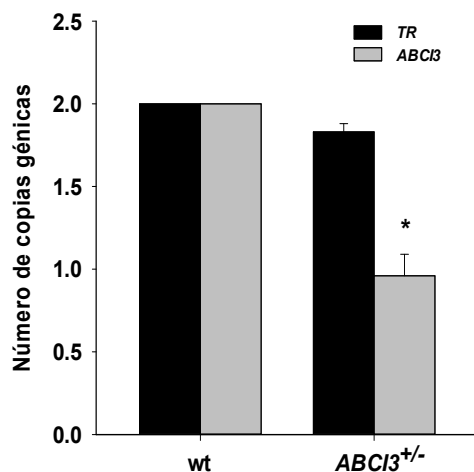


Figura 30. Determinación del número de copias génicas de *ABCI3* en *L. major*. Se determinaron el número de copias presentes en el genoma de parásitos *L. major* wt y *ABCI3*^{+/-} mediante qPCR. Para ello se utilizó el método de cuantificación absoluta. Los datos representan la media más la desviación estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas comparadas con el control se determinaron mediante la *t* de Student (*, $P < 0,01$).

3. Determinación de los niveles de expresión de *ABCI3* en los parásitos *ABCI3*^{+/-} de *L. major*

Para evaluar cómo se modificaban los niveles de expresión de *ABCI3* en los parásitos *ABCI3*^{+/-} determinaron los niveles de ARNm de *ABCI3* en promastigotes de *L. major* wt y *ABCI3*^{+/-} mediante qPCR. La abundancia relativa de cada ARNm se calculó empleando el método $\Delta\Delta C_T$ [216] y el Software CFX Manager (Bio-Rad). Los valores de C_T (ciclo umbral) obtenidos para *ABCI3* se normalizaron con los valores de C_T obtenidos para el gen de referencia, en este caso la TR. Se calculó la diferencia entre valores ΔC_T ($\Delta C_T = C_{TABCI3} - C_{TR}$). El nivel de expresión de *ABCI3* se calculó como la diferencia entre los ΔC_T ($\Delta\Delta C_T$) obtenidos para los parásitos wt y los parásitos *ABCI3*^{+/-}. La diferencia en la abundancia relativa del ARNm de *ABCI3* se calcula como $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Los resultados obtenidos mediante este método mostraron que los niveles de ARNm correspondientes a *ABCI3* en los parásitos *ABCI3*^{+/-} es de aproximadamente el 50% respecto a los parásitos control ($0,48 \pm 0,07$).

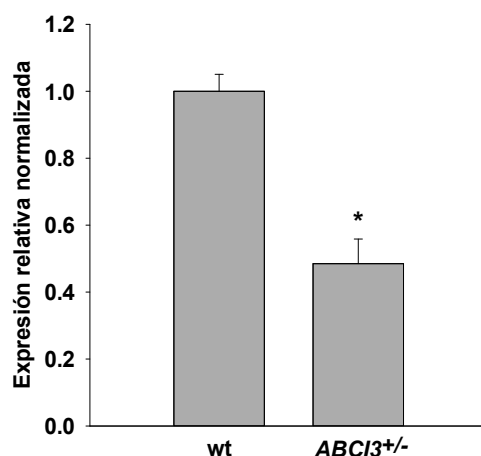


Figura 31. Niveles de expresión del gen *ABCI3* en parásitos wt y *ABCI3*^{+/-} de *L. major*. El ARN total se aisló de cada una de las líneas celulares, se sintetizó ADNc y se analizó la expresión del gen *ABCI3* mediante qPCR. Los valores representan la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes. La significancia estadística se determinó mediante la *t* de Student (*, $P < 0,01$).

4. Complementación de los parásitos *ABCI3*^{+/-} de *L. major*

Para realizar la caracterización de los parásitos *ABCI3*^{+/-} y descartar que las características fenotípicas observadas fueran debidas a propiedades intrínsecas de los clones seleccionados, se transfectaron los parásitos *ABCI3*^{+/-} con varias construcciones que contienen una copia episomal de ABCI3 para compensar por la pérdida de la copia genómica deletionada. Se obtuvieron clones de los parásitos complementados con todas las construcciones utilizadas: ABCI3pXG, GFP-ABCI3pXG, ABCI3pIR1SAT (episomal e integrativo) y 3XFABCI3pIR1SAT. No se observaron diferencias en la morfología o en las curvas de crecimiento de los parásitos complementados al compararlos con parásitos *L. major* wt. Las distintas líneas de parásitos complementadas se utilizaron posteriormente en los ensayos de resistencia a fármacos para evaluar su capacidad de revertir el fenotipo observado en los parásitos *ABCI3*^{+/-}. Debido a que no poseemos un anticuerpo específico frente a ABCI3, únicamente pudimos confirmar la expresión del transportador ABCI3 mediante Western Blot, en los parásitos transfectados con las construcciones GFP-ABCI3pXG y 3XFABCI3pIR1SAT (Figura 32).

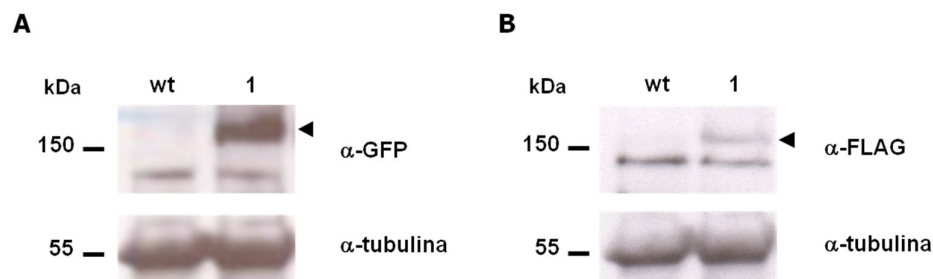


Figura 32. Expresión de las proteínas GFP-ABCI3 y 3xFABCI3 en líneas de *L. major* $ABCI3^{+/-}$ complementadas. Se obtuvieron extractos de proteínas totales de parásitos $ABCI3^{+/-}$:GFP-ABCI3pXG y $ABCI3^{+/-}$::3XFABCI3pIR1SAT que expresan la proteína GFP-ABCI3 (A) y ABCI3 fusionada a tres copias del tag FLAG en N-t (B), respectivamente. Se analizaron mediante SDS-PAGE y Western Blot utilizando anticuerpos anti-GFP, anti-FLAG y anti-tubulina (control de carga). Se indican los parásitos *L. major* wt (wt) y parásitos $ABCI3^{+/-}$:GFP-ABCI3pXG (A, carril 1) y $ABCI3^{+/-}$::3XFABCI3pIR1SAT (B, carril 1). Se indica el marcador de peso molecular a la izquierda de la figura. La banda correspondiente a la proteína se indica con una flecha. La banda de menor tamaño corresponde a una banda inespecífica.

Para evaluar los niveles de expresión de ABCI3 a nivel de ARNm en las líneas complementadas realizamos una qPCR a partir del ARN total de los parásitos. Se observó una mayor abundancia de ARNm (entre 2 y 3 veces más) de *ABCI3* en todas las líneas celulares complementadas, excepto en la línea $ABCI3^{+/-}$::3XFABCI3, que poseía unos niveles de ARNm similares a los observados en los parásitos wt (Figura 33). Además, tal como veremos en el siguiente apartado, los parásitos $ABCI3^{+/-}$::3XFABCI3 fueron los únicos que revirtieron parcialmente el fenotipo de resistencia a Sb^{III} observado en los parásitos $ABCI3^{+/-}$. Por lo tanto, esta línea de parásitos complementados será la única que utilizaremos posteriormente en los ensayos de la caracterización funcional del transportador ABCI3.

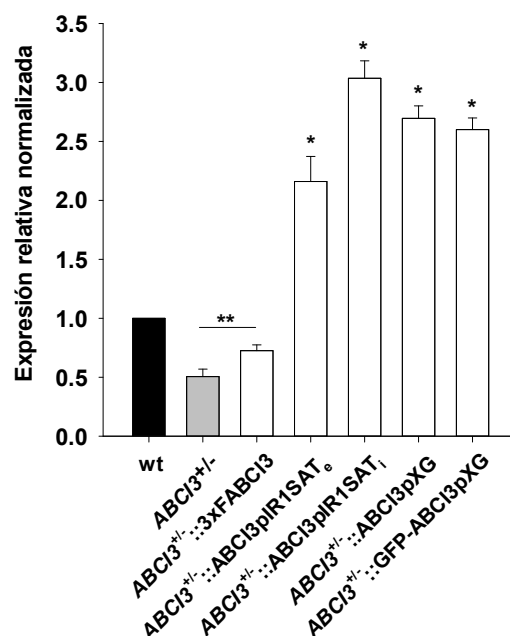


Figura 33. Abundancia relativa del ARNm de *ABCI3* en las diferentes líneas de *L. major* complementadas. La determinación de la abundancia del ARNm de *ABCI3* se determinó mediante qPCR. *L. major* wt (wt), el mutante nulo parcial (*ABCI3*^{+/-}) y las líneas celulares complementadas con las siguientes construcciones: 3xABC13pIR1SAT contiene la 3'UTR completa del gen (*ABCI3*^{+/-}::3xABC13), ABCI3pIR1SAT episomal (*ABCI3*^{+/-}::ABCI3pIR1SAT_e), ABCI3pIR1SAT integrativo (*ABCI3*^{+/-}::ABCI3pIR1SAT_i), ABCI3pXGNEO (*ABCI3*^{+/-}::ABCI3pXG) y ABCI3 en pXG-GFP+2 (*ABCI3*^{+/-}::GFP-ABCI3pXG). Los datos se normalizaron utilizando el gen de la tripanotión reductasa. Los datos son la media ± SD de triplicados de dos experimentos independientes. Los datos estadísticamente significativos respecto a los parásitos *ABCI3*^{+/-} se determinaron mediante la *t* de Student (**p*<0.001, ***p*=0.03).

5. Resistencia a fármacos y moléculas relacionadas

Para realizar la caracterización funcional del transportador ABCI3 utilizamos parásitos *L. major* transfectados con la construcción ABCI3pXG-HYGRO que sobreexpresaban la proteína ABCI3, parásitos transfectados con la construcción ABCI3^{K/M}pXG-HYGRO que expresan una versión mutada del transportador, los parásitos mutantes nulos parciales, *ABCI3*^{+/-} y las líneas complementadas con una copia episomal de *ABCI3*.

Varios transportadores ABC se han caracterizado previamente en parásitos del género *Leishmania*, y han demostrado estar relacionados con fenotipos de resistencia a fármacos por diversos mecanismos [217]. Por lo tanto nos pareció relevante estudiar el papel que podría tener el transportador ABCI3 en la resistencia a los fármacos más utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis, así como a varias moléculas

relacionadas. Para ello se realizaron ensayos de viabilidad celular en placas de 96 pocillos con concentraciones crecientes del fármaco utilizando el colorante vital MTT.

Los ensayos realizados con los parásitos que sobreexpresan ABCI3 no mostraron diferencias significativas con los parásitos control en la resistencia a los fármacos analizados (Tabla 1). De forma similar, no se observaron diferencias significativas en la susceptibilidad de los parásitos que expresaban la versión mutante del transportador, ABCI3^{K/M}, comparada con la de los parásitos control.

Tabla 1. Resistencia a fármacos en líneas de *L. major* que sobreexpresan el transportador ABCI3 y ABCI3^{K/M}.

	IC ₅₀ (μM) ± SD		
	pXG	ABCI3pXG	ABCI3 ^{K/M} pXG
Sb^{III}	12 ± 1	10,8 ± 0,8	14 ± 1
As^{III}	3,98 ± 0,08	4,3 ± 0,1	3,4 ± 0,3
Cd^{II}	32 ± 3	42 ± 2	41 ± 2
Anfotericina B	0,14 ± 0,04	0,17 ± 0,02	0,16 ± 0,01
Miltefosina	18,1 ± 0,4	22,5 ± 0,8	17,3 ± 0,7
Paromomicina	10,7 ± 0,6	8,4 ± 0,2	7,2 ± 0,5
Pentamidina	2,45 ± 0,03	2,33 ± 0,09	2,21 ± 0,02
Tafenoquina	3,04 ± 0,02	3,37 ± 0,05	3,43 ± 0,04

SD, desviación estándar.

Por otra parte, los ensayos de viabilidad celular con los parásitos mutantes nulos parciales ABCI3^{+/-} mostraron que dichos parásitos eran casi 5 veces más resistentes al Sb^{III} y 7 veces más resistentes al As^{III}, un ión metálico para el que se ha descrito anteriormente resistencia cruzada con el Sb^{III} [218](Tabla 2). Estos resultados sugieren que dichos metales podrían ser sustratos del transportador ABCI3. Incluimos en los ensayos de susceptibilidad una porfirina tóxica de zinc (ZnPPIX), análoga del grupo hemo; y H₂O₂, un subproducto de la formación del radical superóxido durante la activación de los macrófagos. Para validar los resultados obtenidos con los parásitos ABCI3^{+/-} se realizaron los ensayos con una segunda transfección independiente y los resultados obtenidos fueron muy similares a los obtenidos con la primera transfección.

Tabla 2. Resistencia a fármacos en promastigotes y susceptibilidad a Pentostam® en amastigotes intracelulares de líneas de *L. major* *ABCI3*^{+/-} y *ABCI3*^{+/-}::3×*FABCI3*.

	IC ₅₀ (μM) ± SD [RI] ^a		
	wt	<i>ABCI3</i> ^{+/-}	<i>ABCI3</i> ^{+/-} ::3× <i>FABCI3</i>
Sb^{III}	18 ± 1	88 ± 2 [4.9]*	43 ± 1 [2.4]*
As^{III}	1.8 ± 0.1	12.75 ± 0.08 [7.1]*	-
Cd^{II}	36 ± 8	44 ± 4 [1.2]	-
Anfotericina B	0.17 ± 0.02	0.13 ± 0.03 [0.8]	-
Miltefosina	20 ± 1	10 ± 2 [0.5]	-
Paromomicina	5.4 ± 0.3	8.1 ± 0.7 [1.5]	-
Pentamidina	1.85 ± 0.02	1.97 ± 0.12 [1.1]	-
Tafenoquina	2.68 ± 0.07	2.72 ± 0.05 [1.0]	-
ZnPPiX^b	2.4 ± 0.8	2.6 ± 0.4 [1.1]	-
H₂O₂	190 ± 7	187 ± 6 [1.0]	-
Pentostam (Sb^V)^c	73 ± 5	163 ± 12 [2.2]*	94 ± 7 [1.3]

^a Los índices de resistencia [RI] se indican entre paréntesis y se calcularon dividiendo la IC₅₀ para las líneas de *L. major* *ABCI3*^{+/-} y *ABCI3*^{+/-}::3×*FABCI3* entre la obtenida para *L. major* wt. Los resultados representan las medias ± SD de al menos tres experimentos independientes. Los datos estadísticamente significativos respecto a los parásitos wt se determinaron mediante la *t* de Student (**p* < 0.001). ^b La IC₅₀ para la ZnPPiX se determinó midiendo la concentración total de ATP utilizando el reactivo CellTiter Glo. ^c Los macrófagos infectados con las distintas líneas de *L. major* se incubaron a 37°C durante 72 h y la actividad del fármaco se determinó calculando el porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes por macrófago en cultivos con 0, 50, 100 y 200 μM de Pentostam®. SD, desviación estándar.

Debido a que los promastigotes *ABCI3*^{+/-} son más resistentes al Sb^{III} que los parásitos wt, decidimos estudiar si durante la infección de macrófagos peritoneales de ratón, los amastigotes intracelulares eran también más resistentes al Pentostam®, uno de los fármacos leishmanicidas que contiene Sb^V. Los ensayos de susceptibilidad a Pentostam® mostraron que los amastigotes *ABCI3*^{+/-} son aproximadamente 2 veces más resistentes al fármaco que los parásitos control. Además, de forma similar a lo observado para el Sb^{III} en promastigotes, los parásitos *ABCI3*^{+/-}::3×*FABCI3* mostraron una reversión parcial de la resistencia al Sb^V (Tabla 2).

Para descartar que la resistencia a Sb^{III} fuera el resultado de características intrínsecas de los clones, no relacionadas con la delección de una copia del gen, se transfectaron parásitos *ABCI3*^{+/-} con una copia episomal del gen para complementar por la pérdida parcial de *ABCI3*. Las copias episomales clonadas en los vectores pXG-NEO (con y sin GFP), y en el vector pIR1SAT, no fueron capaces de revertir el fenotipo de resistencia a Sb^{III} observado en los parásitos *ABCI3*^{+/-}. Tampoco conseguimos

revertir el fenotipo de resistencia utilizando el vector pIR1SAT de forma integrativa. Únicamente una nueva construcción que contiene la 3'UTR completa del gen, además de 3 copias del tag FLAG en el extremo N-t ($ABCI3^{+/-}::3\times FABC13$) (Figura 32), fue capaz de revertir parcialmente el fenotipo de resistencia a Sb^{III} . Aunque los parásitos $ABCI3^{+/-}::3\times FABC13$ continúan siendo más resistentes a Sb^{III} , son sólo entre 2 y 3 veces más resistentes que los parásitos control (Tabla 3), lo que indica que se ha complementado parcialmente el fenotipo de resistencia de los parásitos $ABCI3^{+/-}$.

Tabla 3. Resistencia a Sb^{III} en líneas de *L. major* $ABCI3^{+/-}$ complementados con una copia episomal de *ABCI3*.

Sb^{III} IC ₅₀ (μM) ± SD [RI]	
<i>L. major</i> wt	18 ± 1
<i>ABCI3</i> ^{+/-}	88 ± 2 [4.9]
<i>ABCI3</i> ^{+/-} :: <i>ABCI3</i> pXG	106 ± 3 [5.9]
<i>ABCI3</i> ^{+/-} ::GFP- <i>ABCI3</i> pXG	124 ± 7 [6.9]
<i>ABCI3</i> ^{+/-} :: <i>ABCI3</i> pIR1SAT	131 ± 10 [7.3]
<i>ABCI3</i> ^{+/-} :: <i>ABCI3</i> pIR1SAT _i	126 ± 3 [7.0]
<i>ABCI3</i> ^{+/-} ::3XFABC13pIR1SAT	43 ± 1 [2.4]*

^a Los índices de resistencia [RI] se indican entre paréntesis y se calcularon dividiendo la IC₅₀ para las líneas de *L. major* complementadas entre la IC₅₀ obtenida para los parásitos *L. major* wt. Los resultados representan las medias ± SD de al menos tres experimentos independientes. Los datos estadísticamente significativos respecto a los parásitos wt se determinaron mediante la *t* de Student (**p*<0.001). SD, desviación estándar.

6. Acumulación y eflujo de Sb^{III} en líneas de *L. major*

El efecto que tiene un fármaco depende en gran medida de que sea transportado y se acumule en el interior de la célula. Previamente, una menor acumulación de Sb^{III} se ha asociado a una mayor resistencia a dicho metal en *Leishmania* [91, 101]. Teniendo en cuenta estos antecedentes, decidimos determinar la acumulación de Sb^{III} mediante ICP-MS después de incubar a los promastigotes de *L. major* con tartrato de antimonio y potasio durante 10, 30 y 60 min. Después de 60 min de incubación, los parásitos wt acumularon aproximadamente el doble de Sb^{III} que los parásitos $ABCI3^{+/-}$ (Figura 34A). La disminución en la concentración intracelular de antimonio podría ser el resultado de una disminución en la entrada o de un aumento en el eflujo de Sb^{III} . Para poder determinar cuál de estos dos mecanismos era el responsable de la menor acumulación de Sb^{III} en los parásitos $ABCI3^{+/-}$, comparamos

el eflujo de Sb^{III} entre los parásitos wt y $ABCI3^{+/-}$. Los resultados de este ensayo mostraron que el eflujo de Sb^{III} es también un proceso dependiente del tiempo, pero no se observaron diferencias significativas entre los parásitos $ABCI3^{+/-}$ y los controles (Figura 34B).

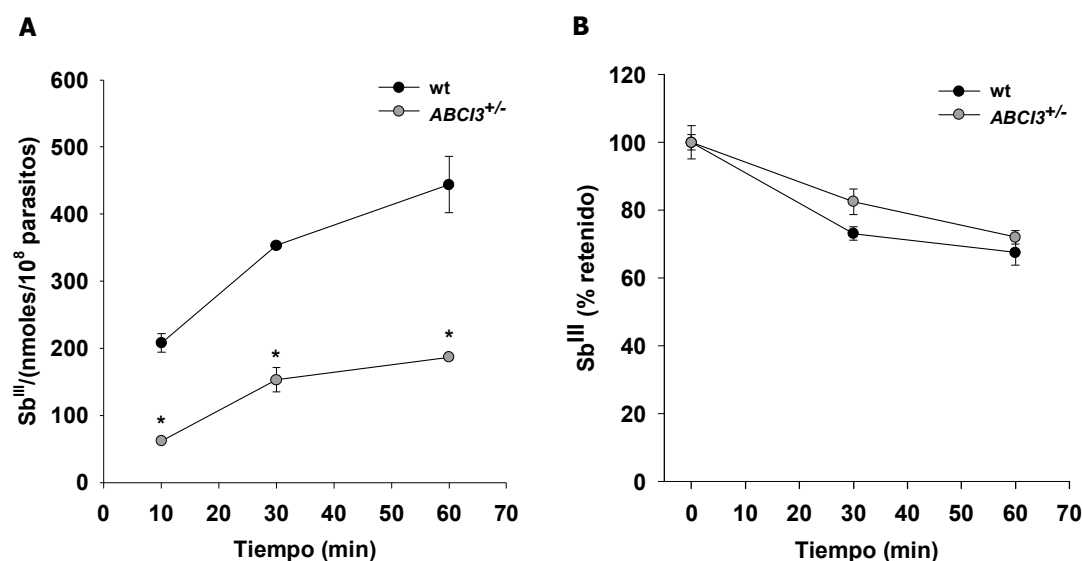


Figura 34. Acumulación y eflujo de Sb^{III} en líneas de *L. major*. La acumulación y eflujo de Sb^{III} se determinaron mediante ICP-MS. **A.** Acumulación de Sb^{III} dependiente del tiempo en parásitos wt y $ABCI3^{+/-}$. Los promastigotes en fase logarítmica de crecimiento se incubaron con 163 μM de tartrato de antimonio y potasio como se describe en los Materiales y Métodos. **B.** Eflujo de Sb^{III} en parásitos wt y $ABCI3^{+/-}$ incubados previamente con 163 y 326 μM de tartrato de antimonio y potasio, respectivamente, para obtener una carga inicial similar en ambas líneas celulares. Los resultados representan la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante la *t* de Student (*, $P < 0.001$).

Por lo tanto, la diferencia observada en la concentración intracelular de Sb^{III} entre los parásitos $ABCI3^{+/-}$ y wt se debe a una menor acumulación de Sb^{III} en los parásitos $ABCI3^{+/-}$ y está correlacionada con la mayor resistencia a Sb^{III} observada en dichos parásitos. La acumulación de Sb^{III} en los parásitos $ABCI3^{+/-}$ se restableció parcialmente en los parásitos $ABCI3^{+/-}::3\times\text{FABCI3}$, resultado que concuerda con la menor resistencia observada en estos parásitos comparada con los parásitos $ABCI3^{+/-}$ (Figura 35). Nuestros resultados sugieren que el transportador ABCI3 podría estar directamente implicado en el transporte de Sb^{III} al interior de la mitocondria del parásito.

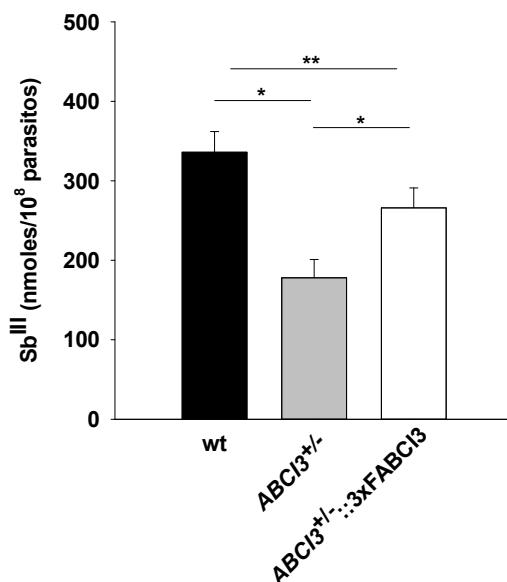


Figura 35. Acumulación de Sb^{III} en líneas de *L. major* wt, ABCI3^{+/-} y ABCI3^{+/-}::3xFABCI3. La acumulación de Sb^{III} se determinó después de incubar las diferentes líneas celulares durante 30 min con 163 μ M de tartrato de antimonio y potasio a 28°C. Los resultados representan la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante la *t* de Student (*, $P < 0.001$; **, $P = 0.004$).

7. Acumulación y toxicidad de porfirinas de Zn^{II} en líneas de *L. major*

Dada la localización mitocondrial del transportador ABCI3, decidimos estudiar su implicación en el tráfico de porfirinas. Para ello utilizamos dos porfirinas análogas del grupo hemo, la Zn^{II}protoporfirina (ZnPPIX) y la Zn^{II}mesoporfirina (ZnMP). Los ensayos para determinar la toxicidad de la ZnPPIX se realizaron de forma análoga a los ensayos para determinar la IC₅₀ de distintos fármacos, pero la viabilidad celular de los parásitos se determinó mediante el reactivo CellTiter Glo, debido a que se observaron interferencias en el desarrollo colorimétrico al utilizar MTT. No se observaron diferencias significativas en la susceptibilidad a ZnPPIX entre los parásitos wt y los parásitos ABCI3^{+/-} (Tabla 2). Además, utilizamos la ZnMP fluorescente para estudiar la acumulación de porfirinas mediante citometría de flujo. Tampoco se observaron diferencias significativas en la acumulación de ZnMP entre los parásitos wt y los parásitos ABCI3^{+/-}. Para poder evaluar la acumulación de ZnMP a nivel de los orgánulos celulares, incubamos los parásitos con 20 μ M digitonina, que permeabiliza la membrana plasmática, liberando la ZnMP acumulada en el citosol del parásito. Sin embargo, tampoco observamos diferencias significativas en la acumulación de ZnMP entre los parásitos wt y ABCI3^{+/-} después de la permeabilización (Figura 35).

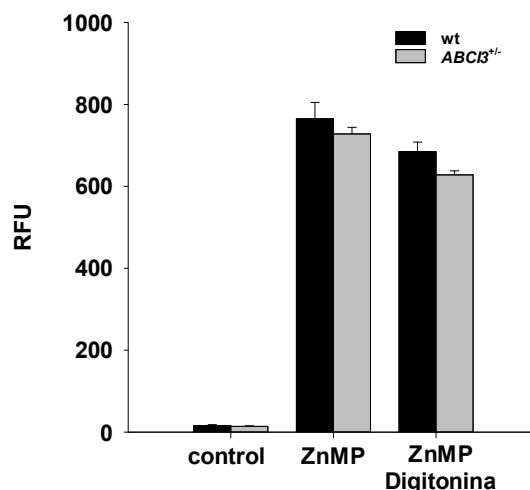


Figura35. Acumulación de Zn^{II}mesoporfirina (ZnMP) en líneas de *L. major*. Se incubaron promastigotes wt y *ABCI3*^{+/-} con 10 μ M ZnMP durante 10 min a 28°C. Los parásitos control se incubaron en ausencia de ZnMP. Los parásitos permeabilizados se incubaron con 20 μ M digitonina durante 10 min en hielo. RFU, unidades relativas de fluorescencia. Los datos representan la media $\pm$ SD de determinaciones por triplicado de un experimento representativo de tres experimentos independientes.

8. Análisis de la funcionalidad mitocondrial en líneas de *L. major*

Para determinar si el transportador ABCI3 es esencial para el funcionamiento normal de la mitocondria de *L. major*, decidimos estudiar si los parásitos *ABCI3*^{+/-} presentaban alguna evidencia de un funcionamiento mitocondrial anómalo. Las alteraciones en el funcionamiento de la mitocondria generalmente se asocian a una excesiva producción de ROS, una disminución del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) y una disminución en los niveles intracelulares de ATP [219].

8.1. Análisis de los niveles intracelulares de ATP

La concentración total de ATP en las distintas líneas celulares de *L. major*, después de la exposición a Sb^{III}, se determinó utilizando el reactivo luminiscente CellTiter Glo. Los parásitos se incubaron con 100 μ M Sb^{III} y se extrajeron alícuotas para determinar los niveles de ATP a distintos tiempos de incubación. En las condiciones normales de crecimiento (en RPMI modificado suplementado con 10% hiFBS a 28°C), los niveles basales de ATP de las diferentes líneas celulares eran prácticamente idénticos. Sin embargo, después de incubar los parásitos con 100 μ M de Sb^{III} durante 1 h, los niveles de ATP en los parásitos wt disminuyeron hasta un 20% de los niveles iniciales, mientras que los niveles de ATP en los parásitos *ABCI3*^{+/-} eran mayores al 50% de la concentración inicial después de 4 h de incubación a 28°C (Figura 36).

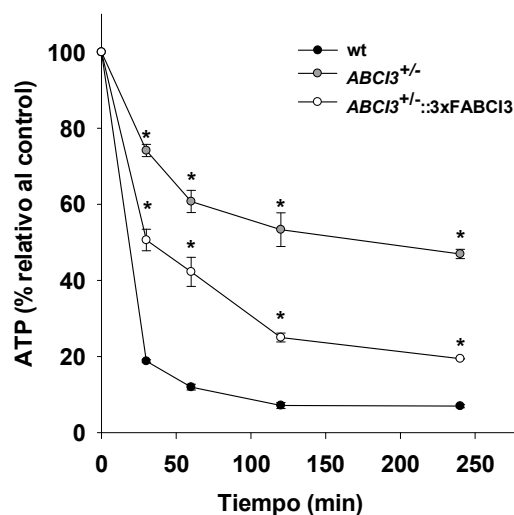


Figura 36. Determinación de los niveles de ATP en las diferentes líneas de *L. major*. Los niveles de ATP se midieron después de incubar los parásitos con 100 μ M de Sb^{III} durante 30, 60, 120 y 240 min. Se extrajeron alícuotas que se mezclaron con un volumen igual del reactivo CellTiter Glo en placas de 96 pocillos. La mezcla se incubó durante 10 min en la oscuridad y la luminiscencia se determinó utilizando un lector de placas Infinite F200. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante la *t* de Student (*, $P < 0.001$).

8.2. Determinación de alteraciones en el $\Delta\psi_m$ en líneas de *L. major*

Las alteraciones en el $\Delta\psi_m$ son también un indicador de perturbaciones en el funcionamiento normal de la mitocondria. Para estudiar las posibles alteraciones funcionales en la mitocondria de los parásitos *ABCI3*^{+/-} utilizamos dos sondas fluorescentes que presentan una acumulación mitocondrial dependiente del $\Delta\psi_m$: JC-1 y Rho. No se observaron diferencias significativas en los cocientes de fluorescencia de la sonda JC-1 entre los parásitos wt, *ABCI3*^{+/-} y *ABCI3*^{+/-}::3x*FABCI3*. Como era de esperar, se observó una disminución importante de la fluorescencia de JC-1 al incubar las líneas celulares de *L. major* con el FCCP, un potente desacoplante del $\Delta\psi_m$. Por otra parte, sí se observó una disminución significativa de la fluorescencia en los parásitos *ABCI3*^{+/-} cuando utilizamos Rho como sonda del $\Delta\psi_m$. Aunque estos resultados podrían parecer contradictorios, la Rho es sustrato de varios transportadores ABC, entre ellos ABCB1 [209]. Por lo tanto, la disminución de la fluorescencia podría explicarse debido a una menor acumulación de la sonda en la mitocondria de los parásitos *ABCI3*^{+/-}, lo que estaría indicando que la Rho podría ser también sustrato de *ABCI3*.

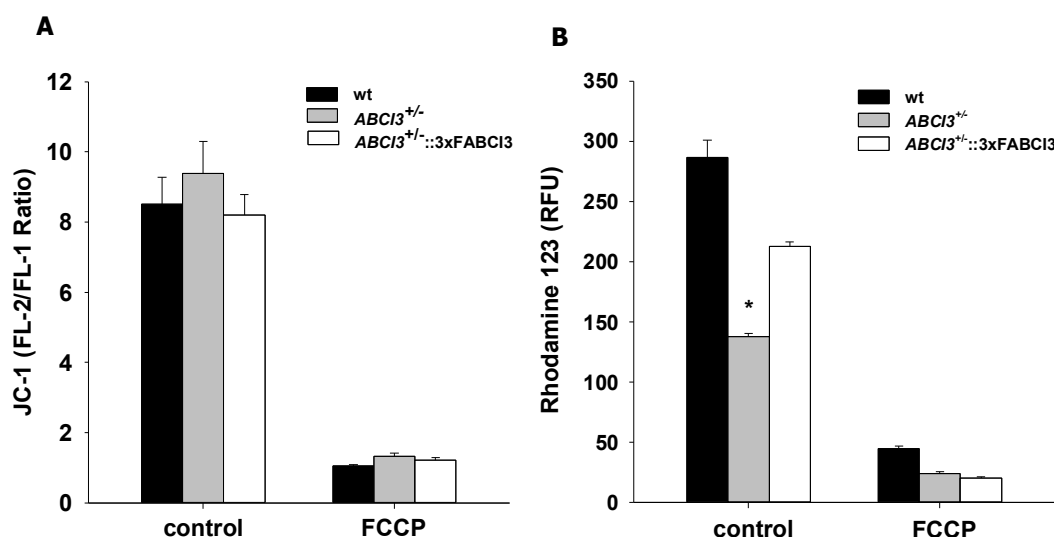


Figura 37. Determinación de alteraciones en el $\Delta\psi_m$ en líneas de *L. major*. **A.** Los parásitos de la diferentes líneas celulares de *L. major* se incubaron con JC-1 5 μ M durante 10 min a 28°C para determinar la presencia de alteraciones en el $\Delta\psi_m$. El ratio FL-2/FL-1 (fluorescencia 590 nm/530 nm) se determinó mediante citometría de flujo. Los controles de despolarización se preincubaron con FCCP 10 μ M. **B.** Los parásitos se incubaron con Rho 1 μ M durante 10 min a 28°C, los parásitos se lavaron con PBS y la fluorescencia se determinó mediante citometría de flujo. Los datos representan la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante la *t* de Student (*, $P < 0.001$). RFU, unidades relativas de fluorescencia.

8.3. Determinación de los niveles de ROS mitocondriales en líneas de *L. major*

Para evaluar los niveles mitocondriales de radical superóxido, una de las principales ROS producidas en la mitocondria, utilizamos la sonda fluorescente MitoSOX red, que se oxida específicamente por los radicales superóxido, aumentando su fluorescencia. La intensidad de fluorescencia observada en los parásitos *ABCI3*^{+/-} fue menor que en los parásitos wt y *ABCI3*^{+/-}::3x*FABCI3*, indicando que en la mitocondria de los parásitos *ABCI3*^{+/-} se genera una menor cantidad de radical superóxido, en las condiciones normales de crecimiento (Figura 38). Todos los parásitos tratados con Ant A (control positivo) mostraron un aumento en la fluorescencia del MitoSOX red debida a un aumento en la producción de radical superóxido como resultado de la inhibición del complejo de la citocromo c reductasa (Complejo III) de la cadena respiratoria mitocondrial.

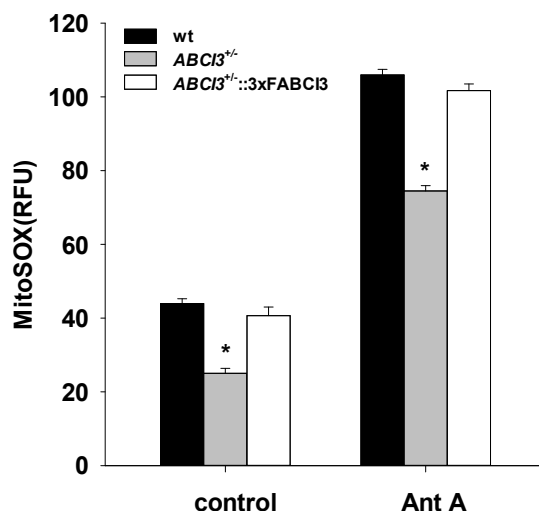


Figura 38. Determinación de la producción de radical superóxido mitocondrial en líneas de *L. major*. Los parásitos de las distintas líneas celulares de *L. major* se incubaron con MitoSOX red 5 μ M en medio RPMI modificado complementado con 10% hiFBS, a 28 °C durante 30 min. Se utilizó Ant A como control positivo de producción mitocondrial de ROS. La fluorescencia se determinó mediante citometría de flujo. Los datos representan la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante la *t* de Student (*, $P < 0.001$). RFU, unidades relativas de fluorescencia.

9. Purificación de parásitos metacíclicos de líneas de *L. major*

Para estudiar si el transportador ABCI3 está involucrado en el proceso de metaciclogénesis del parásito, decidimos estudiar el porcentaje de parásitos metacíclicos presentes en los cultivos de parásitos wt y *ABCI3*^{+/-}. Para ello utilizamos el método de purificación mediante lectina de cacahuete (PNA) que se une selectivamente a residuos β -galactósidos del LPG presentes en la superficie de las formas promastigotes de *L. major*, produciendo la aglutinación de los mismos y permitiendo la purificación de las formas metacíclicas. Después de cultivar ambas líneas de *L. major* durante 3, 6 y 9 días observamos que no existían diferencias significativas en el porcentaje de parásitos metacíclicos purificados (Figura 39). Por lo tanto, la reducción en los niveles de expresión de ABCI3 en los mutantes nulos parciales no afecta al proceso de metaciclogénesis en dichos parásitos.

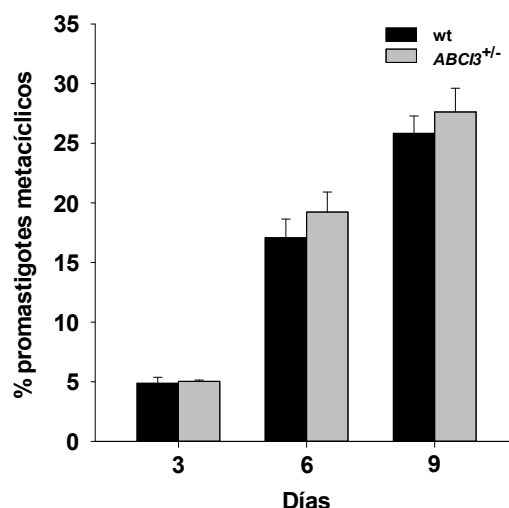


Figura39. Determinación del porcentaje de parásitos metacíclicos presentes en cultivos de *L. major* wt y *ABCI3*^{+/-}. Los parásitos metacíclicos (PNA-) se purificaron de los cultivos de *L. major* wt y *ABCI3*^{+/-} después de 3, 6 o 9 días desde el último pase. Los resultados se expresan como porcentaje de los parásitos totales y representan la media $\pm$ SD de tres experimentos independientes.

10. Infectividad y supervivencia de las líneas de *L. major* en macrófagos peritoneales de ratón

Para estudiar la capacidad de los parásitos wt, *ABCI3*^{+/-} y *ABCI3*^{+/-}::3 $\times$ FABCI3 de infectar, sobrevivir y replicarse en los macrófagos del hospedador, se infectaron macrófagos peritoneales de ratón con parásitos de cada una de la líneas celulares de *L. major* en fase estacionaria de crecimiento. Para determinar la capacidad infectiva de cada línea celular durante la primera fase del establecimiento de la infección, los macrófagos se fijaron 24 h después de la infección para su análisis mediante microscopía de fluorescencia. En estas condiciones observamos que los parásitos *ABCI3*^{+/-} mostraron una capacidad de infección levemente mayor ($\sim$ 13%) a los parásitos wt y a los parásitos *ABCI3*^{+/-}::3 $\times$ FABCI3. Además, el número promedio de parásitos intracelulares por macrófago infectado era el mismo para todas las líneas celulares estudiadas (Figura 40A).

Después de 72 h, el porcentaje de macrófagos infectados con las diferentes líneas celulares de *L. major* fue similar al obtenido a las de 24 h. Sin embargo, el número de parásitos intracelulares por macrófago aumentó significativamente (1,5 veces) en las infecciones con los parásitos *ABCI3*^{+/-}, mientras que permaneció inalterado en las infecciones con los parásitos wt y *ABCI3*^{+/-}::3 $\times$ FABCI3 (Figura 40B).

Estos resultados estarían indicando que los parásitos *ABCI3*^{+/-} son capaces de soportar mejor el ambiente hostil del interior del fagosoma, y por lo tanto, son más eficientes a la hora de replicarse dentro del macrófago. Al igual que observamos en otros ensayos, la línea celular complementada con la copia episomal de *ABCI3* presenta un fenotipo intermedio entre la línea wt y los parásitos *ABCI3*^{+/-}.

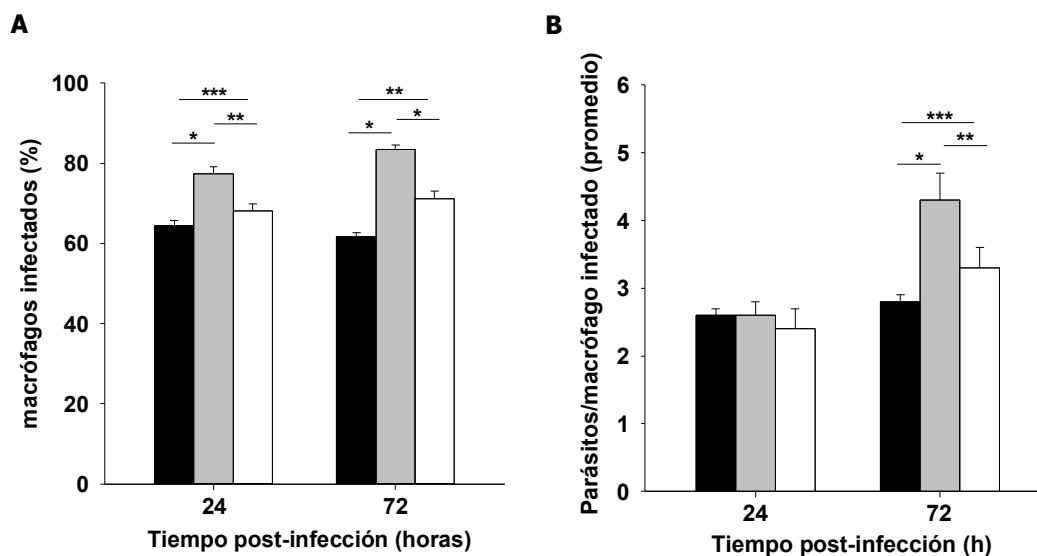


Figura 40. Infectividad y supervivencia de las líneas celulares de *L. major* en macrófagos peritoneales de ratón. Las infecciones de los macrófagos peritoneales de ratón se realizaron tal como se describen en los Materiales y Métodos. Se utilizó un ratio parásito:macrófago de 5:1, los macrófagos infectados se fijaron en los tiempos indicados y los preparados se tiñeron con DAPI. **A.** Porcentaje de macrófagos infectados con parásitos wt (negro), *ABCI3*^{+/-} (gris) y *ABCI3*^{+/-}::3x*ABCI3* (blanco). Los datos representan la media $\pm$ SD de triplicados y son representativos de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante la *t* de Student (*, $P < 0,001$; **, $P \leq 0,003$; ***, $P = 0,044$). **B.** El promedio de amastigotes intracelulares por macrófago infectado para los parásitos wt (negro), *ABCI3*^{+/-} (gris) y *ABCI3*^{+/-}::3x*ABCI3* (blanco) se determinó a las 24 y 72 h de finalizada la infección. Los datos representan la media $\pm$ SD de triplicados y son representativos de los resultados obtenidos en tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante la *t* de Student (*, $P < 0,01$; **, $P < 0,05$; ***, $P = 0,03$).

Discusión

1. Situación actual de la Leishmaniasis

La leishmaniasis pertenece al grupo de las denominadas enfermedades olvidadas o desatendidas, junto con la tripanosomiasis africana y la enfermedad de Chagas, producidas también por parásitos tripanosomátidos. Estas enfermedades afectan principalmente a países pobres o en vías de desarrollo, donde los escasos recursos económicos dificultan el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad, aumentando las tasas de morbilidad y mortalidad. Diversos factores socioeconómicos, tales como la falta de acceso a la asistencia sanitaria, las condiciones precarias de vivienda o la malnutrición, aumentan el riesgo de desarrollar la enfermedad. En 2015, el 75% de los nuevos casos de LC se produjeron en 5 países (Afganistán, Irán, Iraq, Siria y Brasil), mientras que el 73% de los nuevos casos de LV (>20.000 casos) comunicados a la OMS se produjeron en 10 países (Etiopía, Kenia, Somalia, Sudán, Sudán del Sur, Uganda, Bangladesh, India, Nepal y Brasil) [5]. Aunque en algunos países se han mejorado los sistemas de detección y tratamiento de la enfermedad, así como diversas estrategias para el control del vector y de los reservorios [220], en otros la situación ha empeorado considerablemente. La situación es extremadamente grave en Siria, donde la guerra ha provocado el colapso del sistema de salud, y la LC se ha diseminado por todo el país, desde Iraq hasta la frontera con el Líbano [221].

En España, se observó un aumento de los casos de LV y LC en la región sudoeste de Madrid a finales de 2010 [222]. Diversos estudios determinaron que el principal reservorio salvaje de *L. infantum* eran las liebres que habitaban las zonas verdes periurbanas de Fuenlabrada y Leganés [223, 224]. Para evitar la propagación de la enfermedad, se adoptaron diversas medidas: se capturaron liebres y conejos para reducir el reservorio, y se utilizaron insecticidas para reducir el número de insectos vectores en espacios verdes. Estas medidas resultaron en una disminución progresiva en el número de casos de leishmaniasis en los años siguientes [225].

Todavía no existen vacunas eficaces para el tratamiento de la enfermedad en humanos y el arsenal quimioterapéutico disponible es cada vez más limitado debido a la falta de eficacia, la toxicidad de los fármacos y el aumento del fallo terapéutico. Los antimoniales pentavalentes son cada vez menos utilizados debido a la emergencia de resistencias en numerosas regiones endémicas [4, 226]. La anfotericina B, la miltefosina y la paromomicina constituyen actualmente las mejores opciones para el tratamiento de

la enfermedad. Sin embargo, el elevado coste de los fármacos, la toxicidad y la duración prolongada de los tratamientos dificultan la accesibilidad a los mismos de gran parte de las poblaciones afectadas. Además, en los últimos años se ha descrito también la aparición de resistencia frente a estos fármacos [109, 111, 117, 131, 227].

La emergencia de resistencia frente a los fármacos leishmanicidas constituye uno de los principales problemas que presenta el tratamiento y control de la leishmaniasis. Los fenotipos de resistencia observados en *Leishmania* pueden ser el resultado de diferentes estrategias del parásito para disminuir los efectos nocivos del fármaco. Estos incluyen una disminución en la entrada, eflujo, inactivación (una vez que el fármaco se encuentra en el interior del parásito), la pérdida de vías de activación, la modificación de las dianas y la optimización de los sistemas de reparación del daño causado por el fármaco [228]. Además, algunas adaptaciones moleculares relacionadas con la resistencia a fármacos pueden conferir al parásito una mejor adaptación al medio o una mayor capacidad para sobrevivir bajo condiciones de estrés [229]. Diversos estudios han demostrado que los transportadores ABC de diferentes subfamilias están implicados en la resistencia a fármacos empleados en el tratamiento de la leishmaniasis [101, 102, 125, 192, 230-232]. Por dicho motivo consideramos interesante la caracterización de nuevos transportadores ABC que podrían ser utilizados en un futuro como dianas terapéuticas en el tratamiento de la enfermedad.

2. Transportadores ABC

La superfamilia de los transportadores ABC es una de las familias de proteínas más diversas, presentes en organismos pertenecientes a todos los reinos. *Leishmania* es el protozooario parásito con el mayor número de transportadores ABC, con 42 ORFs que codifican para estas proteínas. El número de ORFs es considerablemente mayor al que poseen otros parásitos tripanosomátidos como *T. brucei* y *T. cruzi*, en cuyo genoma encontramos 22 y 28 ORFs que codifican para transportadores ABC, respectivamente [180]. La variación observada en el número de genes presente en los tres organismos probablemente se debe a la expansión de las subfamilias ABCA, ABCC y ABCG en *Leishmania*, donde muchos genes proceden de la duplicación génica ocurrida tras la separación del linaje *Trypanosoma*, y la pérdida de algunos genes ABC en *T. brucei* después de que tuvieran lugar eventos de especiación en *Trypanosoma* [180].

Entre sus muy diversas funciones, los transportadores ABC han demostrado ser una parte fundamental de las defensas celulares frente a moléculas citotóxicas. Transportadores pertenecientes a las familias ABCB y ABCC están relacionados con la resistencia a fármacos, desde mamíferos hasta levaduras. En *Leishmania*, la subfamilia ABCB incluye transportadores homólogos a la Pgp de mamíferos que están implicados en la resistencia a numerosos fármacos. El primer transportador homólogo de Pgp identificado en varias líneas celulares de *Leishmania* resistentes a vinblastina y daunorubicina, fue ABCB4. Debido a que estos fármacos no se utilizan para el tratamiento de la leishmaniasis, el interés por el transportador ABCB4 surgió cuando se demostró que LtrMDR1 (LtrABCB4) también estaba implicado en la resistencia a miltefosina y edelfosina [233, 234]. La subfamilia ABCC incluye al transportador ABCC3 que le confiere a los parásitos resistencia a antimonio y arsenito mediante la translocación de metales conjugados a tripanotión al interior de vesículas intracelulares [100]. Varios transportadores pertenecientes a la subfamilia ABCG de *Leishmania* también se encuentran implicados en la resistencia a análogos de alquilfosfolípidos [124] y a Sb^{III} [102]. La subfamilia ABCI está compuesta por cuatro genes (*ABCI1-ABCI4*) que se encuentran exclusivamente en tripanosomátidos. Los transportadores pertenecientes a esta subfamilia son todos hemitransportadores que poseen el dominio NBD en el extremo carboxilo terminal de la proteína. ABCI4, el único miembro de esta subfamilia caracterizado hasta la fecha, está implicado en la resistencia a porfirinas tóxicas y Sb^{III}, probablemente mediando el transporte de este metal conjugado a tioles de bajo peso molecular [101].

3. Análisis de secuencia y predicción de topología del transportador ABCI3

El gen *ABCI3* (LmjF.33.3040) de *L. major* pertenece a la subfamilia ABCI de transportadores ABC. Este grupo de transportadores ABC están ausentes en el resto de organismos eucariotas, por lo que las búsquedas realizadas en bases de datos y el análisis comparativo de secuencias no dieron como resultado ningún gen homólogo presente en otros organismos. La secuencia primaria del transportador ABCI3 presenta los dominios conservados característicos de un hemitransportador, con un dominio TMD y un dominio NBD en el extremo carboxilo terminal que incluye los motivos conservados Walker A, Walker B y motivo sello, característico de esta familia de proteínas (Figura

22B). Cuando se clasificaron por primera vez los genes ABC de *Leishmania*, tres de sus cuatro integrantes de la familia ABCI (clasificados entonces como “otros”) estaban anotados como proteínas solubles que carecían de TMD [180]. Aunque existen algunas proteínas ABC que no son transportadores de membrana, y por lo tanto no poseen TMD, estas pertenecen a las subfamilias ABCE y ABCF. Al contrario de lo que ocurre con los NBD, los TMD de distintos transportadores ABC varían considerablemente, tanto en su secuencia primaria, como en la longitud, arquitectura y número de hélices- α transmembrana que lo componen [235]. Esto probablemente sea consecuencia directa de la gran diversidad de sustratos que transportan. Para obtener un modelo topológico de ABCI3 que pudiera contribuir a la posterior caracterización funcional de la proteína, decidimos utilizar métodos de predicción computacionales.

Utilizamos dos metodologías diferentes para obtener un modelo topológico del transportador ABCI3. TopPred fue uno de los primeros algoritmos utilizados para la predicción de la estructura de proteínas de membrana. Está basado en un parámetro fisicoquímico, la hidrofobicidad de los residuos aminoacídicos, y en la regla del interior positivo [201]. En los últimos años, los métodos de este tipo han sido suplantados por métodos más sofisticados que utilizan análisis estadístico e integran los resultados de diversas metodologías para realizar la predicción topológica de una proteína. Este es el caso del método CCTOP, que utiliza 10 algoritmos y métodos diferentes para obtener un modelo topológico consenso [202]. Este método ha demostrado una gran precisión en la predicción de proteínas de membrana en el proteoma humano, siendo capaz de discriminar en un 98,5% de los casos entre proteínas solubles y proteínas de membrana [236]. La combinación de diferentes algoritmos mejora la precisión del modelo al eliminar errores individuales de cada método, obteniéndose predicciones más robustas.

En nuestro caso, el algoritmo TopPred no fue capaz de predecir correctamente la topología del NBD de ABCI3 de *Leishmania*, pero algunos aspectos de los modelos obtenidos con este algoritmo fueron similares a los obtenidos con el modelo consenso de CCTOP. El número de hélices α transmembrana del modelo CCTOP se aproxima más a las seis que encontramos en la mayoría de los hemitransportadores ABC, y tres de estas hélices α coinciden en ambos modelos. La baja identidad de secuencia entre ABCI3 y otros transportadores ABC y el hecho de que los TMD no posean un elevado grado de conservación entre diferentes transportadores, dificulta la predicción de la topología de la proteína. Además, la mayoría de los modelos predictivos se basan en información

evolutiva y en estructuras conocidas de proteínas homólogas, información que no existe para este transportador en particular.

4. Localización celular del transportador ABCI3

Para determinar la localización celular del transportador utilizamos una versión de la proteína fusionada a GFP. Inicialmente realizamos dos construcciones que fueron transfectadas en promastigotes de *L. major* para expresar la proteína fusionada a GFP, tanto en el N- terminal (GFP-ABCI3) como en el C-terminal (ABCI3-GFP) de la proteína. Sin embargo, no pudimos utilizar la construcción ABCI3-GFP para los estudios de localización celular debido a los bajos niveles de expresión observados. Se ha descrito anteriormente que la adición de la GFP puede alterar la localización y funcionalidad de los transportadores ABC [125, 237, 238]. En los estudios de localización celular realizados con el transportador ABCI4 de *L. major* tampoco se pudo utilizar la proteína fusionada a GFP en C-terminal debido al mismo problema con la expresión del transportador [101]. Tanto ABCI4 como ABCI3 poseen el NBD en el extremo C-terminal de la proteína, por lo tanto la adición de GFP a dicho extremo podría estar interfiriendo con el correcto plegamiento y función de la proteína.

Utilizando entonces los parásitos que expresan la proteína GFP-ABCI3 determinamos la localización del transportador, inicialmente mediante microscopía confocal. El análisis de colocalización con MitoTracker Deep Red nos permitió determinar que ABCI3 está localizado en la mitocondria de *L. major*. Además, los ensayos realizados con los parásitos que expresaban la versión mutante del transportador, GFP-ABCI3^{K/M}, mostraron que la localización de la proteína no cambiaba al mutar el residuo de K por M en el Walker A. Se ha demostrado que dicha mutación puede alterar no sólo la funcionalidad de la proteína, sino también su localización celular. Este es el caso del transportador ABCG2 humano, que se localiza normalmente en la membrana plasmática, mientras que el mutante ABCG2^{K/M} se localiza en el aparato de Golgi y retículo endoplasmático [239].

A continuación realizamos ensayos de permeabilización con digitonina y digestión con tripsina para determinar si el transportador ABCI3 se localiza en la membrana mitocondrial interna o externa. Los resultados obtenidos sugieren que la proteína se localiza en la membrana mitocondrial externa (Figura 41). Estudios similares llevados a

cabo en *T. brucei* mostraron que el canal de aniones-voltaje dependiente (VDAC, del inglés, "voltage- dependent anion channel"), presente en la membrana mitocondrial externa del parásito, se recuperó en los sobrenadantes después de tratar a los parásitos con 200 μ M de digitonina [240]. Además, en un estudio del proteoma de la membrana mitocondrial externa de *T. brucei*, el gen ortólogo de *ABCI3* (Tb927.2.5410) también estaba localizado en la membrana mitocondrial externa del parásito [241].

Por último, los ensayos de biotinilación de proteínas de superficie sugieren que el transportador ABCI3 se localiza parcialmente en la membrana plasmática del parásito (Figura 41). Otros dos transportadores ABC caracterizados en nuestro laboratorio poseen también una localización dual. ABCI4 está localizado en la mitocondria y membrana plasmática, mientras que ABCG2 se localiza en vesículas intracelulares y en la membrana plasmática del parásito [101, 102]. No podemos descartar que la doble localización de estos transportadores sea consecuencia de la sobreexpresión de las proteínas a partir de copias episomales de los genes. Sin embargo, se ha descrito por lo menos otro transportador ABC que posee una localización dual. Ensayos realizados utilizando un anticuerpo específico frente al transportador ABCB6 humano, en líneas celulares que expresaban únicamente el transportador endógeno, demostraron que la proteína se encuentra tanto en la membrana mitocondrial externa como en la membrana plasmática [242].

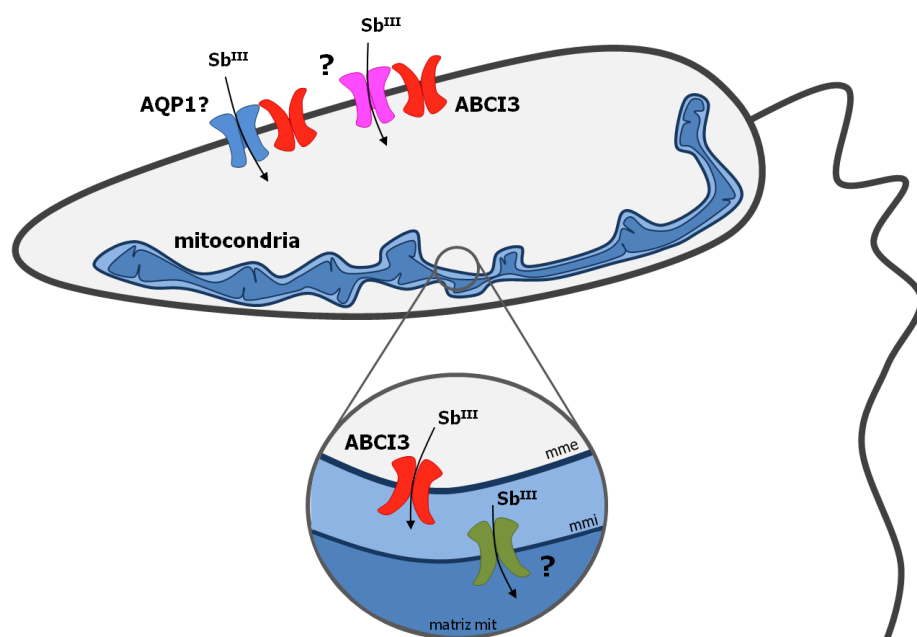


Figura 41. Representación esquemática de la localización celular del transportador ABCI3. El transportador ABCI3 se indica en rojo, la AQP1 en azul, y en rosa otros transportadores hipotéticos que podrían interactuar con ABCI3 en la membrana plasmática y transportar Sb^{III} al interior del parásito. En

verde se indica otro transportador hipotético que estaría ubicado en la membrana mitocondrial interna y sería el responsable de transportar el Sb^{III} al interior de la matriz mitocondrial. mme, membrana mitocondrial externa; mmi, membrana mitocondrial interna.

Varios transportadores ABC eucariotas están localizados en la mitocondria, y la mayoría de ellos son hemitransportadores pertenecientes a la subfamilia ABCB [243]. Se han estudiado principalmente en mamíferos y levaduras, y se ha demostrado que están implicados en diversos procesos relacionados con estrés oxidativo, metabolismo del grupo hemo, y de los clusters Fe-S, tanto en el citosol como en la mitocondria [244-246]. Algunos estudios sugirieron que ABCB6 podría estar involucrado en el transporte de porfirinas para la síntesis de hemo [242, 247], pero estos resultados no pudieron ser reproducidos en estudios posteriores [248]. ABCB7 juega un papel fundamental en el transporte de clusters de Fe-S al citosol [249, 250], mientras que ABCB8 es esencial para la homeostasis mitocondrial del hierro y la función cardíaca normal en ratones [251]. El transportador ABCB10 de mamíferos está involucrado en la formación del grupo hemo y en la protección de la mitocondria frente a estrés oxidativo, pero no está claro todavía qué papel juega exactamente en estos dos procesos [252, 253]. Recientemente se ha caracterizado un transportador mitocondrial de *L. major* perteneciente a la subfamilia ABCB. Al igual que otros miembros de esta subfamilia, LmABCB3 juega un papel esencial en la síntesis del grupo hemo y en la biogénesis citosólica de los clusters de Fe-S [188]. Aunque el transportador ABCI3 no pertenece a la subfamilia ABCB, el hecho de que esté localizado también en la mitocondria podría implicar que su función es similar o está vinculada a algunas de las funciones descritas anteriormente para la subfamilia ABCB.

5. Caracterización funcional del transportador ABCI3

5.1. Caracterización de parásitos *L. major* que sobreexpresan ABCI3 y ABCI3^{K/M}

Con el fin de realizar la caracterización funcional del transportador ABCI3, decidimos utilizar varias estrategias. En primer lugar, utilizamos parásitos que sobreexpresaban la proteína ABCI3 wt o una versión mutante de la misma (ABCI3^{K/M}). Todos los hemitransportadores ABC necesitan formar homo- o heterodímeros para ser funcionalmente activos. El mutante ABCI3^{K/M} posee una mutación K1088M en el Walker

A, que es un residuo esencial para la hidrólisis del ATP y la actividad del transportador. Por lo tanto, al formarse un dímero con la proteína ABCI3^{K/M} obtendríamos una proteína que carece de actividad transportadora. Esta estrategia se ha empleado anteriormente para inactivar otros transportadores ABC, entre ellos los transportadores ABCG2 y ABCG5 de *Leishmania* [196, 199, 254]. Sin embargo, en el caso del transportador ABCI3 no observamos cambios en el fenotipo de resistencia a fármacos en los parásitos que sobreexpresaban ABCI3 o ABCI3^{K/M}. Resultados similares se obtuvieron en ensayos utilizando también la versión mutante del transportador ABCI4 de *L. major*, aunque en este caso la sobreexpresión del transportador wt le confería a los parásitos resistencia a Sb^{III} [101]. La ausencia de fenotipo en los parásitos que sobreexpresan la versión wt de ABCI3 podría deberse a varios motivos. Si el transportador ABCI3 necesita formar heterodímeros con otros transportadores para ser funcional, al no estar estos sobreexpresados en la misma medida, el exceso de transportador ABCI3 no sería funcional. Otra posible explicación para la ausencia de fenotipo en los parásitos que sobreexpresan ABCI3 podría ser consecuencia de su ubicación subcelular. Al ubicarse en la membrana mitocondrial externa, el sustrato transportado por ABCI3 necesitaría de otro transportador, ubicado en la membrana mitocondrial interna, para transportar el sustrato al interior de la mitocondria. Al no hallarse sobreexpresado este segundo transportador, la sobreexpresión únicamente de ABCI3 no es suficiente para observar un fenotipo. Por lo tanto, para continuar con la caracterización funcional del transportador decidimos utilizar una estrategia diferente como es la generación de parásitos mutantes nulos para *ABCI3*.

5.2. Obtención de parásitos *L. major* mutantes nulos parciales, *ABCI3*^{+/-}

Para obtener parásitos *L. major* mutantes nulos para ABCI3, se realizaron dos construcciones que contenían las regiones 5' y 3'UTR del gen *ABCI3*, flanqueando un cassette de resistencia a HYGRO o NEO. Dichas construcciones se utilizaron para transfectar parásitos y eliminar las dos copias genómicas de *ABCI3* por recombinación homóloga, en dos rondas sucesivas de transfección. En la primera ronda se obtuvieron parásitos mutantes nulos parciales para *ABCI3*^{+/-} únicamente con la construcción que posee el cassette de resistencia a HYGRO. Después de varios intentos infructuosos no fue posible aislar mutantes nulos parciales con el cassette de resistencia a NEO. Además, tampoco fue posible obtener mutantes nulos para *ABCI3* después de realizar la segunda transfección de los parásitos *ABCI3*^{+/-} con el cassette de NEO. Problemas similares se han descrito anteriormente al intentar obtener mutantes nulos para un gen utilizando

esta metodología. Frecuentemente, los parásitos presentan aneuploidías o son capaces de mantener una copia del gen en elementos extracromosómicos después de que se hayan delecionado las dos copias genómicas del mismo [94, 255-258]. Durante la obtención de mutantes nulos para *AQP1* en *L. major* se obtuvieron parásitos que contenían los dos cassettes de resistencia (HYGRO y NEO) y además conservaban una copia del gen [94]. La obtención del mutante nulo tampoco fue posible mediante la complementación con una copia episomal de *AQP1*. Únicamente se obtuvo un clon de *L. major* mutante nulo para *AQP1*, y este poseía un genotipo HYGRO/HYGRO, generado probablemente como consecuencia de la pérdida de la heterocigosis [94]. En *L. amazonensis* tampoco fue posible obtener mutantes nulos para el transportador mitocondrial de hierro 1 (LMIT1) [258]. Al igual que en el caso de la *AQP1* y en nuestro caso, se obtuvieron parásitos que poseían los dos cassettes de resistencia y que además conservaban una copia del gen.

Generalmente la selección de parásitos que poseen estas modificaciones se considera evidencia de la importancia que tiene un determinado gen para el parásito, pero no es suficiente para determinar su esencialidad. La expresión de una copia ectópica del gen de interés a partir de un vector episomal, o mediante la integración genómica, permite la sustitución de las copias del gen sin que se generen alteraciones en la ploidía, y la retención de la copia episomal en ausencia de antibiótico de selección se considera evidencia de que el gen es esencial para la proliferación del parásito. Por lo tanto decidimos complementar la copia delecionada del gen con una copia episomal, antes de realizar la segunda transfección. El resultado obtenido fue el mismo que el que obtuvimos con los parásitos sin complementar, los parásitos eran resistentes tanto a HYGRO como a NEO, pero al verificar la integración del cassette de NEO observamos que no se había integrado en el locus de *ABCI3*. Los parásitos mantenían una copia del gen *ABCI3* y al mismo tiempo el cassette de resistencia a NEO en múltiples copias extracromosómicas. Los bajos niveles de expresión del locus *ABCI3* podrían ser los responsables de que no consiguiéramos aislar mutantes nulos de *ABCI3*. Aunque el gen de la neomicina fosfotransferasa se integrase correctamente, los niveles de expresión de la enzima podrían ser demasiado bajos, siendo insuficientes para conferirle a los parásitos resistencia a la G418 utilizada para seleccionar los parásitos.

Los parásitos *ABCI3*^{+/-} se estudiaron mediante qPCR para determinar el número de copias genómicas de *ABCI3* y los niveles de expresión del gen en los parásitos mutantes nulos parciales. La verificación del número de copias del gen es relevante

porque, tal como hemos mencionado anteriormente, a menudo se obtienen parásitos que presentan modificaciones en la ploidía o copias extracromosómicas del gen que se intenta deletar. En nuestro caso, los parásitos *ABCI3*^{+/-} poseen la mitad del ADN_g correspondiente al gen *ABCI3*, y además, los niveles de ARNm son aproximadamente la mitad de los observados en los parásitos wt, lo que concuerda con la delección de uno de los alelos del gen.

5.2.1. Complementación de los parásitos *ABCI3*^{+/-}

Los ensayos con parásitos mutantes nulos complementados se consideran necesarios para verificar que el fenotipo observado esté relacionado directamente con la pérdida de una o las dos copias de un gen, y no se deba a otras mutaciones espontáneas no relacionadas. Debido a que los vectores episomales carecen de mecanismos de segregación, la distribución igualitaria entre células durante la replicación de los parásitos no está garantizada. Además, los niveles de expresión a partir de un vector episomal no se pueden controlar, obteniéndose niveles de expresión variables entre los parásitos de una misma población, dependiendo del número de copias del vector. Por lo tanto, la expresión de una determinada proteína podría ser insuficiente para rescatar un fenotipo o demasiado alta y tener efectos deletéreos en el crecimiento del parásito [259].

En nuestro caso en particular, para completar la caracterización funcional de los parásitos *ABCI3*^{+/-}, decidimos transfectar a los parásitos con distintas construcciones que contenían una copia del gen para obtener parásitos complementados y así asegurarnos que el fenotipo observado era una consecuencia directa de la delección de una de las copias genómica de *ABCI3*. Para evaluar la capacidad de cada una de las construcciones para complementar la pérdida de función de *ABCI3* utilizamos el ensayo de susceptibilidad a Sb^{III}, ya que los parásitos *ABCI3*^{+/-} presentan un fenotipo de resistencia a dicho metal. Únicamente la construcción en el vector pIR1SAT que contenía la copia del gen y su 3'UTR completa fue capaz de revertir parcialmente el fenotipo de resistencia a Sb^{III}. Los restantes parásitos complementados no sólo no revertían el fenotipo de resistencia de los parásitos wt, sino que eran incluso más resistentes a Sb^{III} que los parásitos *ABCI3*^{+/-}. La localización de *ABCI3* en la membrana plasmática podría ser una consecuencia de la sobreexpresión de la proteína. Esto podría explicar que los parásitos *ABCI3*^{+/-} transfectados con copias episomales del gen no muestren una reversión completa del fenotipo de resistencia. Si el exceso de transportador *ABCI3* ubicado en la

membrana plasmática es funcional, podría estar modificando el transporte de Sb^{III} al interior del parásito, lo que podría explicar que dichos parásitos fueran incluso más resistentes al Sb^{III} que los parásitos *ABCI3*^{+/-}.

Si tenemos en cuenta el análisis de expresión a nivel del ARNm de las distintas líneas de parásitos complementados, observamos que los parásitos *ABCI3*^{+/-}::3XF*ABCI3* son los que poseen unos niveles de ARNm de *ABCI3* más bajos y similares a los observados en los parásitos control. Los niveles de ARNm de *ABCI3* en las restantes líneas eran entre 2 y 3 veces la observada en la línea wt, siendo los parásitos que poseen la copia integrada en el locus de los ARNr (*ABCI3*^{+/-}::*ABCI3*pIR1SAT_i) los que presentan una mayor cantidad de ARNm. Los elevados niveles de expresión de genes integrados en el locus de los ARNr, cuya transcripción está controlada por la ARNpol I, se ha descrito anteriormente [260, 261].

En *Leishmania*, los genes se transcriben constitutivamente a partir de clusters de gran tamaño como pre-ARNm policistrónicos. Los niveles de ARNm dependen principalmente del número de copias del gen y están regulados post-transcripcionalmente mediante trans-splicing y poliadenilación [262]. Diversos estudios de los mecanismos de control de la expresión génica en tripanosomátidos han demostrado la relevancia de elementos que actúan en cis, presentes en las regiones 3'UTR de los transcritos. Estos elementos modulan la expresión génica al interactuar con proteínas de unión a ARN (RBP, del inglés "*RNA binding proteins*") y están involucrados en la estabilidad del ARNm, y la eficiencia de la traducción [263-265]. Uno de elementos mejor caracterizados son elementos ricos en AU (ARE, del inglés "*AU-rich elements*"), que se unen a RBPs y modifican la estabilidad de los RNAs en *T. cruzi* [266]. En *Leishmania* se han identificado mediante métodos computacionales una serie de secuencias de entre 20 y 28 nucleótidos, presentes en las regiones 3'UTR de numerosos genes que estarían implicadas en la regulación de la expresión génica [265]. El hecho de que la única línea complementada que revierte parcialmente el fenotipo de *ABCI3*^{+/-} contiene la región 3'UTR completa del gen podría implicar que esta región juega un papel fundamental en la regulación de la expresión génica de *ABCI3*. Si la expresión del gen está estrechamente regulada, niveles de ARNm demasiado bajos o demasiado altos podrían afectar la expresión de la proteína, impidiendo la recuperación del fenotipo wt. Serán necesarios más estudios para determinar qué papel está jugando la región 3'UTR de *ABCI3* en la regulación de la expresión génica del transportador *ABCI3*.

6. Resistencia a antimonio en las líneas de *L. major*

Los promastigotes *ABCI3*^{+/-} de *L. major* presentaban un fenotipo de resistencia a Sb^{III} y As^{III}. La resistencia cruzada entre arsénico y antimonio se ha descrito anteriormente en parásitos que sobreexpresan otros transportadores ABC [101, 102, 267, 268]. En nuestro caso, el fenotipo de resistencia está asociado a una menor acumulación de Sb^{III} en los parásitos *ABCI3*^{+/-}. La menor acumulación de un fármaco suele ser consecuencia de una menor entrada o un mayor eflujo del mismo al exterior de una célula. En el caso de los parásitos *ABCI3*^{+/-} no se observaron diferencias en el eflujo de Sb^{III} por lo que la menor acumulación de Sb^{III} sería consecuencia de una menor entrada del metal a la célula y posteriormente al interior de la mitocondria.

Por otra parte, los amastigotes intracelulares de los parásitos *ABCI3*^{+/-} eran más resistentes que los controles a Pentostam[®], uno de los fármacos de primera línea para el tratamiento de la leishmaniasis que contiene Sb^V. Aunque el Sb^V posee cierta actividad leishmanicida, generalmente se considera que debe activarse mediante reducción a Sb^{III}. Esta reacción puede ocurrir tanto en el interior del macrófago como del parásito [269]. En *L. infantum*, la transfección del transportador ABCC3, le confiere a los promastigotes resistencia a Sb^{III}, y a los amastigotes axénicos obtenidos a partir de estos promastigotes, resistencia a Sb^V [270].

Aunque el transportador ABCI3 no esté directamente implicado en la entrada del Sb^{III} al interior del parásito, la localización del transportador en la membrana plasmática podría permitir que este interaccione con otros transportadores, por ejemplo con la AQP1, que es el transportador responsable de la entrada de Sb^{III} en *Leishmania*, modulando su actividad y por lo tanto la acumulación de Sb^{III} en el interior del parásito. El regulador transmembrana de la fibrosis quística (del inglés, "*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*" o CFTR), un miembro de la subfamilia MRP de transportadores ABC, funciona como regulador de otras proteínas transportadoras de membrana en mamíferos, entre ellas varias acuagliceroporinas [271]. CFTR colocaliza parcialmente e interactúa con la acuaporina 9, jugando un papel en la regulación de este transportador en células epiteliales [272]. Serán necesarios más estudios para determinar si ABCI3 podría estar interactuando con AQP1 o con otros transportadores de la membrana plasmática en *L. major* y para determinar como estas interacciones podrían modificar la entrada de Sb^{III} en el parásito.

Uno de los primeros transportadores descritos en *Leishmania* implicado en la resistencia a Sb^{III} fue el transportador ABCC3. Se localiza en vesículas intracelulares próximas al bolsillo flagelar, y su sobreexpresión le confiere resistencia a Sb^{III} a los parásitos al secuestrar conjugados de metales con tioles en el interior de dichas vesículas para su posterior exocitosis al exterior celular [100]. Además, este transportador se encuentra amplificado con frecuencia en parásitos de *Leishmania* seleccionados por su resistencia a fármacos que contienen antimonio y arsénico [268]. Además, el transportador ABCC7, que le confiere a los parásitos resistencia a pentamidina, también genera una resistencia cruzada a Sb^{III} [230]. Otros dos transportadores pertenecientes a la misma subfamilia, ABCC4 y ABCC5, se han relacionado con la resistencia a Sb^{III} , aunque los genes se sobreexpresaron en una línea de *L. tarentolae* resistente a Sb^{III} revertida parcialmente para la resistencia a dicho metal [231]. Aunque pertenece a otra subfamilia de transportadores, el transportador ABCG2 de *L. major* también se localiza en vesículas intracelulares y en la membrana plasmática, y está implicado en la resistencia a Sb^{III} mediante un mecanismo similar al descrito para ABCC3 [102]. Por otra parte, el transportador ABCI4, localizado en la membrana mitocondrial interna del parásito y también en la membrana plasmática, transporta Sb^{III} y Cd^{II} al exterior celular, probablemente formando complejos metal-tiol. Los parásitos que sobreexpresaban ABCI4 acumulan menos Sb^{III} que los parásitos controles, son más resistentes a Sb^{III} y mostraban un mayor eflujo del metal y de tioles no protéicos al exterior celular [101].

Los transportadores ABC no son las únicas proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia a antimonio. Se han descrito una serie de proteínas con localizaciones y funciones diversas que están directa o indirectamente relacionadas con la resistencia a antimonio en *Leishmania* y en otros organismos. La AQP1, una porina con capacidad para el transporte bidireccional de sustratos, involucrada en la osmoregulación y en el metabolismo del glicerol, es además responsable de la entrada del Sb^{III} al interior de las células [92, 273]. La sobreexpresión de la tripanotión reductasa, la ornitina descarboxilasa y la γ -glutamylcistein sintetasa, enzimas claves del metabolismo de tioles en *Leishmania*, provocan un aumento en los niveles intracelulares de tripanotión, induciendo la resistencia a Sb^{III} en los parásitos [96, 97, 274]. En *Leishmania*, la resistencia a antimonio es un proceso multifactorial, que involucra una serie de complejos mecanismos de resistencia interconectados entre sí, que dan como resultado una alteración del potencial redox dependiente de tioles [88, 275].

Nuestros resultados sugieren que el transportador ABCI3 de *L. major* podría estar jugando un papel relevante en el transporte de Sb^{III} al interior de la mitocondria, contribuyendo de este modo a los efectos nocivos generales provocados por el Sb^{III} . Además, la localización parcial de ABCI3 en la membrana plasmática, explicaría la menor acumulación de Sb^{III} en los parásitos *ABCI3*^{+/-} y los mayores niveles de resistencia frente a dicho metal de los parásitos mutantes nulos parciales.

7. Análisis de la funcionalidad mitocondrial en líneas de *L. major*

Varios estudios experimentales con fármacos leishmanicidas sugieren que la mitocondria puede considerarse como una de las principales dianas farmacológicas en parásitos tripanosomátidos [276-278]. Con el objetivo de determinar si la delección de una copia del gen *ABCI3*, que se localiza mayoritariamente en la membrana mitocondrial externa de *L. major*, podría afectar el funcionamiento de la mitocondria del parásito, decidimos estudiar los niveles de ATP celulares, los niveles de ROS mitocondrial, y las modificaciones en el $\Delta\psi_m$ de los parásitos. No observamos diferencias en los niveles de ATP basales entre los parásitos wt y los parásitos *ABCI3*^{+/-}. Sin embargo, la diferencia en el consumo de ATP entre las diferentes líneas de *L. major* fue significativa al incubar los parásitos con Sb^{III} . Previamente, se obtuvieron resultados similares en ensayos realizados con parásitos que sobreexpresaban el transportador ABCI4 en *L. major*, indicando que la sobreexpresión de este transportador era capaz de proteger a la mitocondria del parásito de los efectos nocivos del Sb^{III} [101]. En nuestro caso, se observa el mismo efecto protector, pero después de deleccionar una copia de *ABCI3*, con lo cual se vería reducida la entrada de Sb^{III} a la mitocondria del parásito.

En concordancia con estos resultados, tampoco observamos modificaciones en el $\Delta\psi_m$ en los ensayos de fluorescencia con la sonda JC-1. Sin embargo, los resultados obtenidos con la sonda Rho 123 sugieren que dicha sonda podría ser sustrato del transportador ABCI3. La sonda Rho 123 es sustrato de varios transportadores ABC, entre ellos ABCB1 y ABCG2, dos de los principales transportadores implicados en el fenómeno de multirresistencia asociado a diversos tipos de cáncer [209, 210]. En *Leishmania*, la sonda Rho 123 se ha utilizado en la caracterización de aislados clínicos resistentes a antimonio con el fin de determinar si la resistencia está asociada a la actividad de los transportadores ABC [279].

La cadena transportadora de electrones es el principal sitio de generación de ROS en la mitocondria. La producción de ROS por el "escape" ocasional de los electrones transportados puede dañar lípidos, proteínas y el ADN mitocondrial [280]. Además, la mayoría de los fármacos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis pueden generar ROS al provocar alteraciones en el metabolismo redox de los parásitos [120, 276, 281, 282]. En condiciones basales, los parásitos *ABCI3*^{+/-} presentaban una menor concentración de superóxido mitocondrial. En las últimas dos décadas, el papel que juega las ROS en la regulación de diversos procesos biológicos ha cobrado una mayor importancia [283]. Recientemente, se han realizado estudios en *L. amazonensis* que demuestran que el H₂O₂ generado en la mitocondria a través de la actividad de la enzima superóxido dismutasa, juega un papel fundamental en la regulación de la diferenciación del parásito [284]. En *T. cruzi*, la producción de ROS mediada por el grupo hemo es esencial para la proliferación de la forma promastigote del parásito [285]. Aunque desconocemos el sustrato fisiológico del transportador ABCI3, la disminución de los niveles de ROS en los parásitos *ABCI3*^{+/-} podría estar indicándonos que dicho sustrato es capaz de favorecer la generación de ROS una vez es transportado al interior de la mitocondria, pudiendo estar implicado en procesos fisiológicos esenciales para el parásito.

8. Metaciclologénesis, infectividad y supervivencia de los parásitos *ABCI3*^{+/-} en macrófagos peritoneales de ratón

La metaciclologénesis es un proceso de vital importancia en el ciclo de vida de *Leishmania*. Los parásitos metacíclicos son internalizados por los macrófagos y alojados en el fagolisosoma, donde son capaces de sobrevivir y diferenciarse a la forma intracelular amastigote. Aunque los mecanismos subyacentes a dicha transformación han sido objeto de estudio en *Leishmania* durante las tres últimas décadas [38, 286, 287], todavía estamos muy lejos de comprender los factores que desencadenan la metaciclologénesis en su totalidad. En nuestro caso, los experimentos realizados han mostrado que los parásitos *ABCI3*^{+/-} poseen la misma capacidad de convertirse en parásitos metacíclicos que los parásitos wt, por lo que una reducción en los niveles de ABCI3 no estaría afectando el proceso de metaciclologénesis de *L. major*. Prácticamente no hay datos experimentales que relacionen la actividad de transportadores ABC y la metaciclologénesis en *Leishmania*, a excepción de los resultados obtenidos recientemente

para los transportadores ABCG1 y ABCG2 de *L. major* [197]. Los ensayos realizados utilizando una línea de *L. major* mutante nula para ambos transportadores ABC mostraron alteraciones, no sólo a nivel de la metaciclo génesis, sino también a nivel de la infectividad, autofagia y metabolismo redox de los parásitos [197].

Los ensayos de infectividad en macrófagos peritoneales de ratón tampoco mostraron grandes diferencias en la capacidad de invasión celular de los parásitos *ABCI3*^{+/-}, lo que concuerda con la ausencia de diferencias en el número de metacíclicos observados en las distintas líneas celulares. Sin embargo, se observó un aumento significativo en el número de amastigotes *ABCI3*^{+/-} a las 72 h posteriores a la infección. Esto estaría indicando que los amastigotes *ABCI3*^{+/-} poseen una mayor capacidad de supervivencia que los parásitos control. Además, los ensayos realizados en presencia de Pentostam® también mostraron que estos parásitos eran más resistentes al fármaco que los parásitos control. Aunque desconocemos los mecanismos en los que está implicado el transportador que podrían estar afectando la supervivencia del parásito, ABCI3 podría permitir la entrada a la mitocondria de sustratos que afectan el funcionamiento de la mitocondria, por ejemplo al generar una mayor producción de ROS y por lo tanto un mayor estrés oxidativo mitocondrial. Ya hemos visto que los parásitos *ABCI3*^{+/-} presentan niveles basales de ROS mitocondriales más bajos que los de los parásitos control, lo que representaría una ventaja para los parásitos *ABCI3*^{+/-} al tener que hacer frente a las defensas oxidativas del macrófago. En ensayos realizados en la mismas condiciones que los realizados con los parásitos *ABCI3*^{+/-}, se ha observado que parásitos que sobreexpresan el transportador ABCI4 en *L. major*, también presentan una mayor supervivencia en macrófagos peritoneales de ratón a las 72 h post-infección [101]. Aunque no se ha descrito el papel que juegan otros transportadores ABC en la supervivencia de los amastigotes de *Leishmania* en el interior de los macrófagos, se han estudiado los niveles de expresión de los distintos transportadores ABC mediante microarrays y PCR en tiempo real, en *L. major* y *L. infantum* [180]. Los resultados de este estudio mostraron que dos genes, *ABCA3* y *ABCG3* están sobreexpresados en la formas amastigotes del parásito [180]. Curiosamente, el transportador ABCA3 de macrófagos transporta MLF al exterior de estas células y estaría implicado en la reducción de la actividad de dicho fármaco durante el tratamiento de la leishmaniasis [288]. Por otra parte, el gen ABCG3 de *L. major* codifica una proteína truncada que carece de varios segmentos transmembrana así como el motivo conservado Walker A,

con lo cual resulta difícil predecir su papel en la supervivencia de los amastigotes en el interior de los macrófagos [196].

En resumen, hemos identificado e iniciado la caracterización funcional de un nuevo transportador ABC de *L. major* que poseen una localización dual. Aunque tanto el sustrato de ABCI3 como su papel en la fisiología del parásito todavía deben dilucidarse, nuestros resultados muestran que ABCI3 juega un papel relevante en la susceptibilidad a antimonio en *L. major*. Debido a que la delección parcial de ABCI3 genera parásitos más resistentes a Sb^{III} que los parásitos wt, la inactivación de ABCI3 no parece ser, a priori, una buena estrategia terapéutica a seguir contra *Leishmania*. Sin embargo, la caracterización de ABCI3 aporta nueva información relevante en relación a los diversos e intrincados mecanismos de resistencia en el parásito. ABCI3 es una proteína única de tripanosomátidos y es el primer transportador ABC descrito en *Leishmania* que le confiere resistencia a los parásitos cuando se deleciona parcialmente. Próximamente centraremos nuestros esfuerzos en la identificación de otros transportadores que podrían estar interaccionando con ABCI3 en la membrana plasmática, además de identificar los sustratos fisiológicos de ABCI3 utilizando vesículas invertidas de membranas plasmáticas, enriquecidas con ABCI3, derivadas de las células de insecto Sf9 [289].

Conclusiones

1. Hemos identificado el gen *ABCI3* que codifica un nuevo transportador ABC de *Leishmania major*. El gen de copia única presente en el cromosoma 33, codifica un hemitransportador de 1434 aminoácidos que posee el dominio de unión a nucleótidos en el extremo C-terminal de la proteína.
2. Los distintos ensayos de localización celular realizados nos han permitido determinar que el transportador ABCI3 se localiza simultáneamente en la membrana externa de la mitocondria y en la membrana plasmática del parásito.
3. Los parásitos mutantes nulos parciales para ABCI3 (*ABCI3*^{+/-}) presentan un fenotipo de resistencia a antimonio y arsenito, siendo casi cinco veces más resistentes a Sb^{III} y siete veces más resistentes a As^{III}. Los parásitos complementados *ABCI3*^{+/-}::3XFABCI3pIR1SAT son capaces de revertir parcialmente el fenotipo de resistencia.
4. El fenotipo de resistencia observado en los parásitos *ABCI3*^{+/-} está asociado a una menor acumulación de Sb^{III}. Esta menor acumulación sería el resultado de una menor entrada de Sb^{III} al interior del parásito, ya que no se observaron diferencias en el eflujo de dicho metal.
5. No se observaron alteraciones en la funcionalidad de la mitocondria en los parásitos *ABCI3*^{+/-}. Aunque no hay diferencias en el $\Delta\psi_m$, ni en los niveles basales de ATP, los parásitos *ABCI3*^{+/-} poseen unos niveles basales de ROS mitocondriales menores a los observados en los parásitos wt.
6. Aunque prácticamente no se observaron diferencias en la capacidad infectiva de los parásitos *ABCI3*^{+/-} comparados con los parásitos wt, los parásitos *ABCI3*^{+/-} mostraron una mayor capacidad de supervivencia y una mayor tasa de replicación en el interior de los macrófagos peritoneales de ratón.
7. En los ensayos de infectividad en macrófagos peritoneales, las formas amastigotes *ABCI3*^{+/-} mostraron una mayor resistencia al fármaco leishmanicida Pentostam[®] que los parásitos wt.

Bibliografía

1. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votypka J, Marty P, Delaunay P, Sereno D: **A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies.** *PLoS Negl Trop Dis* 2016, **10**(3):e0004349.
2. **Global Health Estimates 2015: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2015.**
[http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html]
3. Akhoundi M, Downing T, Votypka J, Kuhls K, Lukes J, Cannet A, Ravel C, Marty P, Delaunay P, Kasbari M *et al*: **Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis.** *Mol Aspects Med* 2017, **57**:1-29.
4. Singh N, Kumar M, Singh RK: **Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets.** *Asian Pac J Trop Med* 2012, **5**(6):485-497.
5. WHO: **Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance.** In: *Weekly epidemiological record*. vol. 38; 2017: 557-572.
6. Ready PD: **Leishmaniasis emergence in Europe.** *Euro Surveill* 2010, **15**(10):19505.
7. Field V, Gautret P, Schlagenhauf P, Burchard GD, Caumes E, Jensenius M, Castelli F, Gkrania-Klotsas E, Weld L, Lopez-Velez R *et al*: **Travel and migration associated infectious diseases morbidity in Europe, 2008.** *BMC Infect Dis* 2010, **10**:330.
8. Moreno J, Alvar J: **Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model.** *Trends Parasitol* 2002, **18**(9):399-405.
9. Reguera RM, Moran M, Perez-Pertejo Y, Garcia-Estrada C, Balana-Fouce R: **Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis.** *Vet Parasitol* 2016, **227**:98-114.
10. Kaszak I, Planellas M, Dworecka-Kaszak B: **Canine leishmaniosis - an emerging disease.** *Ann Parasitol* 2015, **61**(2):69-76.
11. Colwell DD, Dantas-Torres F, Otranto D: **Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives.** *Vet Parasitol* 2011, **182**(1):14-21.
12. Baneth G, Aroch I: **Canine leishmaniasis: a diagnostic and clinical challenge.** *Vet J* 2008, **175**(1):14-15.
13. Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, Dedet JP, Gradoni L, Ter Horst R, Lopez-Velez R, Moreno J: **The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years.** *Clin Microbiol Rev* 2008, **21**(2):334-359, table of contents.
14. Okwor I, Uzonna JE: **The immunology of Leishmania/HIV co-infection.** *Immunol Res* 2013, **56**(1):163-171.
15. Singh S: **Changing trends in the epidemiology, clinical presentation, and diagnosis of Leishmania-HIV co-infection in India.** *Int J Infect Dis* 2014, **29**:103-112.
16. Lindoso JA, Cunha MA, Queiroz IT, Moreira CH: **Leishmaniasis-HIV coinfection: current challenges.** *HIV AIDS (Auckl)* 2016, **8**:147-156.
17. Ritmeijer K, Dejenie A, Assefa Y, Hundie TB, Mesure J, Boots G, den Boer M, Davidson RN: **A comparison of miltefosine and sodium stibogluconate for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high prevalence of HIV infection.** *Clin Infect Dis* 2006, **43**(3):357-364.
18. Ritmeijer K, ter Horst R, Chane S, Aderie EM, Piening T, Collin SM, Davidson RN: **Limited effectiveness of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high HIV prevalence.** *Clin Infect Dis* 2011, **53**(12):e152-158.
19. Saporito L, Giammanco GM, De Grazia S, Colomba C: **Visceral leishmaniasis: host-parasite interactions and clinical presentation in the immunocompetent and in the immunocompromised host.** *Int J Infect Dis* 2013, **17**(8):e572-576.
20. Von Stebut E: **Leishmaniasis.** *J Dtsch Dermatol Ges* 2015, **13**(3):191-200; quiz 201.
21. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S: **Cutaneous leishmaniasis.** *Lancet Infect Dis* 2007, **7**(9):581-596.
22. Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME: **Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis.** *Int J Mol Sci* 2017, **18**(6).
23. Zijlstra EE, Musa AM, Khalil EA, el-Hassan IM, el-Hassan AM: **Post-kala-azar dermal leishmaniasis.** *Lancet Infect Dis* 2003, **3**(2):87-98.

24. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD, Jr., Carvalho EM: **Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil.** *J Infect Dis* 2002, **186**(12):1829-1834.
25. Hashiguchi Y, Gomez EL, Kato H, Martini LR, Velez LN, Uezato H: **Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review.** *Trop Med Health* 2016, **44**:2.
26. Skraba CM, de Mello TF, Pedroso RB, Ferreira EC, Demarchi IG, Aristides SM, Lonardoni MV, Silveira TG: **Evaluation of the reference value for the Montenegro skin test.** *Rev Soc Bras Med Trop* 2015, **48**(4):437-444.
27. Sadeghian G, Ziaei H, Bidabadi LS, Nilforoushzadeh MA: **Evaluation of leishmanin skin test reaction in different variants of cutaneous leishmaniasis.** *Indian J Dermatol* 2013, **58**(3):239.
28. Salotra P, Sreenivas G, Nasim AA, Subba Raju BV, Ramesh V: **Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of post-kala-azar dermal leishmaniasis with crude or recombinant k39 antigen.** *Clin Diagn Lab Immunol* 2002, **9**(2):370-373.
29. Singh R, Subba Raju BV, Jain RK, Salotra P: **Potential of direct agglutination test based on promastigote and amastigote antigens for serodiagnosis of post-kala-azar dermal leishmaniasis.** *Clin Diagn Lab Immunol* 2005, **12**(10):1191-1194.
30. Salam MA, Mondal D, Kabir M, Ekram AR, Haque R: **PCR for diagnosis and assessment of cure in kala-azar patients in Bangladesh.** *Acta Trop* 2010, **113**(1):52-55.
31. de Ruitter CM, van der Veer C, Leeflang MM, Deborggraeve S, Lucas C, Adams ER: **Molecular tools for diagnosis of visceral leishmaniasis: systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy.** *J Clin Microbiol* 2014, **52**(9):3147-3155.
32. Khan MG, Bhaskar KR, Salam MA, Akther T, Pluschke G, Mondal D: **Diagnostic accuracy of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for detection of Leishmania DNA in buffy coat from visceral leishmaniasis patients.** *Parasit Vectors* 2012, **5**:280.
33. Sriwararat C, Phumee A, Mungthin M, Leelayoova S, Siriyasatien P: **Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for simple detection of Leishmania infection.** *Parasit Vectors* 2015, **8**:591.
34. Weyers W: **William Boog Leishman-A Brief Reminder of His Life and Work on the Occasion of His 150th Birthday.** *Am J Dermatopathol* 2016, **38**(6):436-443.
35. Kato H, Gomez EA, Caceres AG, Uezato H, Mimori T, Hashiguchi Y: **Molecular epidemiology for vector research on leishmaniasis.** *Int J Environ Res Public Health* 2010, **7**(3):814-826.
36. Pace D: **Leishmaniasis.** *J Infect* 2014, **69 Suppl 1**:S10-18.
37. Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC: **Protein turnover and differentiation in Leishmania.** *Int J Parasitol* 2007, **37**(10):1063-1075.
38. De Pablos LM, Ferreira TR, Walrad PB: **Developmental differentiation in Leishmania lifecycle progression: post-transcriptional control conducts the orchestra.** *Curr Opin Microbiol* 2016, **34**:82-89.
39. Sunter J, Gull K: **Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding.** *Open Biol* 2017, **7**(9).
40. Franco LH, Beverley SM, Zamboni DS: **Innate immune activation and subversion of Mammalian functions by leishmania lipophosphoglycan.** *J Parasitol Res* 2012, **2012**:165126.
41. Vinet AF, Fukuda M, Turco SJ, Descoteaux A: **The Leishmania donovani lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V.** *PLoS Pathog* 2009, **5**(10):e1000628.
42. Olivier M, Atayde VD, Isnard A, Hassani K, Shio MT: **Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease GP63.** *Microbes Infect* 2012, **14**(15):1377-1389.

43. Wanderley JLM, Thorpe PE, Barcinski MA, Soong L: **Phosphatidylserine exposure on the surface of Leishmania amazonensis amastigotes modulates in vivo infection and dendritic cell function.** *Parasite Immunol* 2013, **35**(3-4):109-119.
44. Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W: **Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes?** *Trends Microbiol* 2003, **11**(5):210-214.
45. Kaye P, Scott P: **Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface.** *Nat Rev Microbiol* 2011, **9**(8):604-615.
46. Rossi M, Fasel N: **How to master the host immune system? Leishmania parasites have the solutions!** *Int Immunol* 2017.
47. Gabriel C, McMaster WR, Girard D, Descoteaux A: **Leishmania donovani promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps.** *J Immunol* 2010, **185**(7):4319-4327.
48. Hurrell BP, Regli IB, Tacchini-Cottier F: **Different Leishmania Species Drive Distinct Neutrophil Functions.** *Trends Parasitol* 2016, **32**(5):392-401.
49. Mittra B, Andrews NW: **IRONy OF FATE: role of iron-mediated ROS in Leishmania differentiation.** *Trends Parasitol* 2013, **29**(10):489-496.
50. Podinovskaia M, Descoteaux A: **Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction.** *Future Microbiol* 2015, **10**(1):111-129.
51. Lievin-Le Moal V, Loiseau PM: **Leishmania hijacking of the macrophage intracellular compartments.** *FEBS J* 2016, **283**(4):598-607.
52. McConville MJ, Saunders EC, Kloehn J, Dagley MJ: **Leishmania carbon metabolism in the macrophage phagolysosome- feast or famine?** *F1000Res* 2015, **4**(F1000 Faculty Rev):938.
53. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream MA, Adlem E, Aert R *et al*: **The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major.** *Science* 2005, **309**(5733):436-442.
54. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, Quail MA, Peters N, Adlem E, Tivey A, Aslett M *et al*: **Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease.** *Nat Genet* 2007, **39**(7):839-847.
55. Laffitte MN, Leprohon P, Papadopoulou B, Ouellette M: **Plasticity of the Leishmania genome leading to gene copy number variations and drug resistance.** *F1000Res* 2016, **5**:2350.
56. Sterkers Y, Lachaud L, Crobu L, Bastien P, Pages M: **FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in Leishmania major.** *Cell Microbiol* 2011, **13**(2):274-283.
57. Reis-Cunha JL, Rodrigues-Luiz GF, Valdivia HO, Baptista RP, Mendes TA, de Moraes GL, Guedes R, Macedo AM, Bern C, Gilman RH *et al*: **Chromosomal copy number variation reveals differential levels of genomic plasticity in distinct Trypanosoma cruzi strains.** *BMC Genomics* 2015, **16**:499.
58. Ubeda JM, Legare D, Raymond F, Ouameur AA, Boisvert S, Rigault P, Corbeil J, Tremblay MJ, Olivier M, Papadopoulou B *et al*: **Modulation of gene expression in drug resistant Leishmania is associated with gene amplification, gene deletion and chromosome aneuploidy.** *Genome Biol* 2008, **9**(7):R115.
59. Leprohon P, Legare D, Raymond F, Madore E, Hardiman G, Corbeil J, Ouellette M: **Gene expression modulation is associated with gene amplification, supernumerary chromosomes and chromosome loss in antimony-resistant Leishmania infantum.** *Nucleic Acids Res* 2009, **37**(5):1387-1399.
60. Teixeira SM, de Paiva RM, Kangussu-Marcolino MM, Darocha WD: **Trypanosomatid comparative genomics: Contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases.** *Genet Mol Biol* 2012, **35**(1):1-17.
61. Dillon LA, Okrah K, Hughitt VK, Suresh R, Li Y, Fernandes MC, Belew AT, Corrada Bravo H, Mosser DM, El-Sayed NM: **Transcriptomic profiling of gene expression and RNA processing during Leishmania major differentiation.** *Nucleic Acids Res* 2015, **43**(14):6799-6813.

62. Matthews KR, Tschudi C, Ullu E: **A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes.** *Genes Dev* 1994, **8**(4):491-501.
63. LeBowitz JH, Smith HQ, Rusche L, Beverley SM: **Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in Leishmania.** *Genes Dev* 1993, **7**(6):996-1007.
64. Larreta R, Soto M, Quijada L, Folgueira C, Abanades DR, Alonso C, Requena JM: **The expression of HSP83 genes in Leishmania infantum is affected by temperature and by stage-differentiation and is regulated at the levels of mRNA stability and translation.** *BMC Mol Biol* 2004, **5**:3.
65. Dupe A, Dumas C, Papadopoulou B: **An Alba-domain protein contributes to the stage-regulated stability of amastin transcripts in Leishmania.** *Mol Microbiol* 2014, **91**(3):548-561.
66. De Gaudenzi JG, Noe G, Campo VA, Frasch AC, Cassola A: **Gene expression regulation in trypanosomatids.** *Essays Biochem* 2011, **51**:31-46.
67. Motta MC: **Kinetoplast as a potential chemotherapeutic target of trypanosomatids.** *Curr Pharm Des* 2008, **14**(9):847-854.
68. Liu B, Liu Y, Motyka SA, Agbo EE, Englund PT: **Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA.** *Trends Parasitol* 2005, **21**(8):363-369.
69. Salavati R, Moshiri H, Kala S, Shateri Najafabadi H: **Inhibitors of RNA editing as potential chemotherapeutics against trypanosomatid pathogens.** *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2012, **2**:36-46.
70. Haanstra JR, Gonzalez-Marcano EB, Gualdron-Lopez M, Michels PA: **Biogenesis, maintenance and dynamics of glycosomes in trypanosomatid parasites.** *Biochim Biophys Acta* 2016, **1863**(5):1038-1048.
71. Szoor B, Haanstra JR, Gualdron-Lopez M, Michels PA: **Evolution, dynamics and specialized functions of glycosomes in metabolism and development of trypanosomatids.** *Curr Opin Microbiol* 2014, **22**:79-87.
72. Vercesi AE, Moreno SN, Docampo R: **Ca²⁺/H⁺ exchange in acidic vacuoles of Trypanosoma brucei.** *Biochem J* 1994, **304** (Pt 1):227-233.
73. Docampo R, Huang G: **Acidocalcisomes of eukaryotes.** *Curr Opin Cell Biol* 2016, **41**:66-72.
74. Huang G, Docampo R: **Proteomic analysis of acidocalcisomes of Trypanosoma brucei uncovers their role in phosphate metabolism, cation homeostasis, and calcium signaling.** *Commun Integr Biol* 2015, **8**(2):e1017174.
75. Manta B, Comini M, Medeiros A, Hugo M, Trujillo M, Radi R: **Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids.** *Biochim Biophys Acta* 2013, **1830**(5):3199-3216.
76. Leroux AE, Krauth-Siegel RL: **Thiol redox biology of trypanosomatids and potential targets for chemotherapy.** *Mol Biochem Parasitol* 2016, **206**(1-2):67-74.
77. Sundar S, Chakravarty J: **An update on pharmacotherapy for leishmaniasis.** *Expert Opin Pharmacother* 2015, **16**(2):237-252.
78. Lyra MR, Passos SR, Pimentel MI, Bedoya-Pacheco SJ, Valette-Rosalino CM, Vasconcellos EC, Antonio LF, Saheki MN, Salgueiro MM, Santos GP *et al*: **Pancreatic Toxicity as an Adverse Effect Induced by Meglumine Antimoniate Therapy in a Clinical Trial for Cutaneous Leishmaniasis.** *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2016, **58**:68.
79. Haldar AK, Sen P, Roy S: **Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions.** *Mol Biol Int* 2011, **2011**:571242.
80. Ait-Oudhia K, Gazanion E, Vergnes B, Oury B, Sereno D: **Leishmania antimony resistance: what we know what we can learn from the field.** *Parasitol Res* 2011, **109**(5):1225-1232.
81. Shaked-Mishan P, Ulrich N, Ephros M, Zilberstein D: **Novel Intracellular SbV reducing activity correlates with antimony susceptibility in Leishmania donovani.** *J Biol Chem* 2001, **276**(6):3971-3976.
82. Hansen C, Hansen EW, Hansen HR, Gammelgaard B, Sturup S: **Reduction of Sb(V) in a human macrophage cell line measured by HPLC-ICP-MS.** *Biol Trace Elem Res* 2011, **144**(1-3):234-243.

83. Berman JD, Gallalee JV, Best JM: **Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes.** *Biochem Pharmacol* 1987, **36**(2):197-201.
84. Berman JD, Gallalee JV, Best JM, Hill T: **Uptake, distribution, and oxidation of fatty acids by *Leishmania mexicana* amastigotes.** *J Parasitol* 1987, **73**(3):555-560.
85. Sereno D, Holzmüller P, Mangot I, Cuny G, Ouassii A, Lemesre JL: **Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes.** *Antimicrob Agents Chemother* 2001, **45**(7):2064-2069.
86. Sudhandiran G, Shaha C: **Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes.** *J Biol Chem* 2003, **278**(27):25120-25132.
87. Cunningham ML, Zvelebil MJ, Fairlamb AH: **Mechanism of inhibition of trypanothione reductase and glutathione reductase by trivalent organic arsenicals.** *Eur J Biochem* 1994, **221**(1):285-295.
88. Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH: **Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*.** *J Biol Chem* 2004, **279**(38):39925-39932.
89. Frezard F, Silva H, Pimenta AM, Farrell N, Demicheli C: **Greater binding affinity of trivalent antimony to a CCCH zinc finger domain compared to a CCHC domain of kinetoplastid proteins.** *Metallomics* 2012, **4**(5):433-440.
90. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH: **Drug resistance in leishmaniasis.** *Clin Microbiol Rev* 2006, **19**(1):111-126.
91. Brochu C, Wang J, Roy G, Messier N, Wang XY, Saravia NG, Ouellette M: **Antimony uptake systems in the protozoan parasite *Leishmania* and accumulation differences in antimony-resistant parasites.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47**(10):3073-3079.
92. Marquis N, Gourbal B, Rosen BP, Mukhopadhyay R, Ouellette M: **Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*.** *Mol Microbiol* 2005, **57**(6):1690-1699.
93. Mandal S, Maharjan M, Singh S, Chatterjee M, Madhubala R: **Assessing aquaglyceroporin gene status and expression profile in antimony-susceptible and -resistant clinical isolates of *Leishmania donovani* from India.** *J Antimicrob Chemother* 2010, **65**(3):496-507.
94. Plourde M, Ubeda JM, Mandal G, Monte-Neto RL, Mukhopadhyay R, Ouellette M: **Generation of an aquaglyceroporin AQP1 null mutant in *Leishmania major*.** *Mol Biochem Parasitol* 2015, **201**(2):108-111.
95. Monte-Neto R, Laffitte MC, Leprohon P, Reis P, Frezard F, Ouellette M: **Intrachromosomal amplification, locus deletion and point mutation in the aquaglyceroporin AQP1 gene in antimony resistant *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*.** *PLoS Negl Trop Dis* 2015, **9**(2):e0003476.
96. Haimeur A, Guimond C, Pilote S, Mukhopadhyay R, Rosen BP, Poulin R, Ouellette M: **Elevated levels of polyamines and trypanothione resulting from overexpression of the ornithine decarboxylase gene in arsenite-resistant *Leishmania*.** *Mol Microbiol* 1999, **34**(4):726-735.
97. Grondin K, Haimeur A, Mukhopadhyay R, Rosen BP, Ouellette M: **Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene *gsh1* and of the ABC transporter gene *pgpA* in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae*.** *EMBO J* 1997, **16**(11):3057-3065.
98. Wyllie S, Mandal G, Singh N, Sundar S, Fairlamb AH, Chatterjee M: **Elevated levels of trypanothione peroxidase in antimony unresponsive *Leishmania donovani* field isolates.** *Mol Biochem Parasitol* 2010, **173**(2):162-164.
99. Ponte-Sucre A, Gamarro F, Dujardin JC, Barrett MP, Lopez-Velez R, Garcia-Hernandez R, Pountain AW, Mwenechanya R, Papadopoulos B: **Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge.** *PLoS Negl Trop Dis* 2017, **11**(12):e0006052.

100. Legare D, Richard D, Mukhopadhyay R, Stierhof YD, Rosen BP, Haimeur A, Papadopoulou B, Ouellette M: **The Leishmania ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase.** *J Biol Chem* 2001, **276**(28):26301-26307.
101. 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):3719-3730.
102. Perea A, Manzano JI, Castanys S, Gamarro F: **The LABC2 Transporter from the Protozoan Parasite Leishmania Is Involved in Antimony Resistance.** *Antimicrob Agents Chemother* 2016, **60**(6):3489-3496.
103. Mukherjee B, Mukhopadhyay R, Bannerjee B, Chowdhury S, Mukherjee S, Naskar K, Allam US, Chakravorty D, Sundar S, Dujardin JC *et al*: **Antimony-resistant but not antimony-sensitive Leishmania donovani up-regulates host IL-10 to overexpress multidrug-resistant protein 1.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013, **110**(7):E575-582.
104. No JH: **Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries.** *Acta Trop* 2015, **155**:113-123.
105. Balasegaram M, Ritmeijer K, Lima MA, Burza S, Ortiz Genovese G, Milani B, Gaspani S, Potet J, Chappuis F: **Liposomal amphotericin B as a treatment for human leishmaniasis.** *Expert Opin Emerg Drugs* 2012, **17**(4):493-510.
106. Moon S, Jambert E, Childs M, von Schoen-Angerer T: **A win-win solution?: A critical analysis of tiered pricing to improve access to medicines in developing countries.** *Global Health* 2011, **7**:39.
107. Kaminski DM: **Recent progress in the study of the interactions of amphotericin B with cholesterol and ergosterol in lipid environments.** *Eur Biophys J* 2014, **43**(10-11):453-467.
108. Al-Mohammed HI, Chance ML, Bates PA: **Production and characterization of stable amphotericin-resistant amastigotes and promastigotes of Leishmania mexicana.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**(8):3274-3280.
109. Purkait B, Kumar A, Nandi N, Sardar AH, Das S, Kumar S, Pandey K, Ravidas V, Kumar M, De T *et al*: **Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of Leishmania donovani.** *Antimicrob Agents Chemother* 2012, **56**(2):1031-1041.
110. Mwenechanya R, Kovarova J, Dickens NJ, Mudaliar M, Herzyk P, Vincent IM, Weidt SK, Burgess KE, Burchmore RJS, Pountain AW *et al*: **Sterol 14alpha-demethylase mutation leads to amphotericin B resistance in Leishmania mexicana.** *PLoS Negl Trop Dis* 2017, **11**(6):e0005649.
111. Mbongo N, Loiseau PM, Billion MA, Robert-Gero M: **Mechanism of amphotericin B resistance in Leishmania donovani promastigotes.** *Antimicrob Agents Chemother* 1998, **42**(2):352-357.
112. Equbal A, Suman SS, Anwar S, Singh KP, Zaidi A, Sardar AH, Das P, Ali V: **Stage-dependent expression and up-regulation of trypanothione synthetase in amphotericin B resistant Leishmania donovani.** *PLoS One* 2014, **9**(6):e97600.
113. Singh K, Ali V, Pratap Singh K, Gupta P, Suman SS, Ghosh AK, Bimal S, Pandey K, Das P: **Deciphering the interplay between cysteine synthase and thiol cascade proteins in modulating Amphotericin B resistance and survival of Leishmania donovani under oxidative stress.** *Redox Biol* 2017, **12**:350-366.
114. Sundar S, Singh A, Rai M, Prajapati VK, Singh AK, Ostyn B, Boelaert M, Dujardin JC, Chakravarty J: **Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use.** *Clin Infect Dis* 2012, **55**(4):543-550.
115. Sundar S, Mondal D, Rijal S, Bhattacharya S, Ghalib H, Kroeger A, Boelaert M, Desjeux P, Richter-Airijoki H, Harms G: **Implementation research to support the initiative on the elimination of kala azar from Bangladesh, India and Nepal--the challenges for diagnosis and treatment.** *Trop Med Int Health* 2008, **13**(1):2-5.
116. Sundar S, Singh A: **Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: present and future developments.** *Parasitology* 2017:1-7.

117. Perez-Victoria FJ, Gamarro F, Ouellette M, Castanys S: **Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from Leishmania involved in drug resistance.** *J Biol Chem* 2003, **278**(50):49965-49971.
118. Perez-Victoria FJ, Sanchez-Canete 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):23766-23775.
119. Barratt G, Saint-Pierre-Chazalet M, Loiseau PM: **Cellular transport and lipid interactions of miltefosine.** *Curr Drug Metab* 2009, **10**(3):247-255.
120. Luque-Ortega JR, Rivas L: **Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in Leishmania donovani promastigotes.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(4):1327-1332.
121. Paris C, Loiseau PM, Bories C, Breard J: **Miltefosine induces apoptosis-like death in Leishmania donovani promastigotes.** *Antimicrob Agents Chemother* 2004, **48**(3):852-859.
122. Perez-Victoria FJ, Castanys S, Gamarro F: **Leishmania donovani resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003, **47**(8):2397-2403.
123. Seifert K, Perez-Victoria FJ, Stettler M, Sanchez-Canete MP, Castanys S, Gamarro F, Croft SL: **Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of Leishmania donovani and persists in vivo.** *Int J Antimicrob Agents* 2007, **30**(3):229-235.
124. Castanys-Munoz E, Alder-Baerens N, Pomorski T, Gamarro F, Castanys S: **A novel ATP-binding cassette transporter from Leishmania is involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids.** *Mol Microbiol* 2007, **64**(5):1141-1153.
125. Castanys-Munoz E, Perez-Victoria JM, Gamarro F, Castanys S: **Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite Leishmania with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement.** *Antimicrob Agents Chemother* 2008, **52**(10):3573-3579.
126. Rakotomanga M, Saint-Pierre-Chazalet M, Loiseau PM: **Alteration of fatty acid and sterol metabolism in miltefosine-resistant Leishmania donovani promastigotes and consequences for drug-membrane interactions.** *Antimicrob Agents Chemother* 2005, **49**(7):2677-2686.
127. Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Sinha PK, Bhattacharya SK: **Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India.** *N Engl J Med* 2007, **356**(25):2571-2581.
128. Sundar S, Singh A, Tiwari A, Shukla S, Chakravarty J, Rai M: **Efficacy and Safety of Paromomycin in Treatment of Post-Kala-Azar Dermal Leishmaniasis.** *ISRN Parasitol* 2014, **2014**:548010.
129. Borovinskaya MA, Pai RD, Zhang W, Schuwirth BS, Holton JM, Hirokawa G, Kaji H, Kaji A, Cate JH: **Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling.** *Nat Struct Mol Biol* 2007, **14**(8):727-732.
130. Chawla B, Jhingran A, Panigrahi A, Stuart KD, Madhubala R: **Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin -susceptible -resistant Leishmania donovani.** *PLoS One* 2011, **6**(10):e26660.
131. Jhingran A, Chawla B, Saxena S, Barrett MP, Madhubala R: **Paromomycin: uptake and resistance in Leishmania donovani.** *Mol Biochem Parasitol* 2009, **164**(2):111-117.
132. Bhandari V, Sundar S, Dujardin JC, Salotra P: **Elucidation of cellular mechanisms involved in experimental paromomycin resistance in Leishmania donovani.** *Antimicrob Agents Chemother* 2014, **58**(5):2580-2585.
133. Verma A, Bhandari V, Deep DK, Sundar S, Dujardin JC, Singh R, Salotra P: **Transcriptome profiling identifies genes/pathways associated with experimental resistance to paromomycin in Leishmania donovani.** *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2017, **7**(3):370-377.

134. Babokhov P, Sanyaolu AO, Oyibo WA, Fagbenro-Beyioku AF, Iriemenam NC: **A current analysis of chemotherapy strategies for the treatment of human African trypanosomiasis.** *Pathog Glob Health* 2013, **107**(5):242-252.
135. Singh G, Dey CS: **Induction of apoptosis-like cell death by pentamidine and doxorubicin through differential inhibition of topoisomerase II in arsenite-resistant *L. donovani*.** *Acta Trop* 2007, **103**(3):172-185.
136. Sundar S, Chatterjee M: **Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities.** *Indian J Med Res* 2006, **123**(3):345-352.
137. Lepesheva GI, Waterman MR: **Sterol 14alpha-demethylase (CYP51) as a therapeutic target for human trypanosomiasis and leishmaniasis.** *Curr Top Med Chem* 2011, **11**(16):2060-2071.
138. Emami S, Tavangar P, Keighobadi M: **An overview of azoles targeting sterol 14alpha-demethylase for antileishmanial therapy.** *Eur J Med Chem* 2017, **135**:241-259.
139. Garcia-Hernandez R, Manzano JI, Castanys S, Gamarro F: **Leishmania donovani develops resistance to drug combinations.** *PLoS Negl Trop Dis* 2012, **6**(12):e1974.
140. Singh OP, Singh B, Chakravarty J, Sundar S: **Current challenges in treatment options for visceral leishmaniasis in India: a public health perspective.** *Infect Dis Poverty* 2016, **5**:19.
141. Musa A, Khalil E, Hailu A, Olobo J, Balasegaram M, Omollo R, Edwards T, Rashid J, Mbui J, Musa B *et al*: **Sodium stibogluconate (SSG) & paromomycin combination compared to SSG for visceral leishmaniasis in East Africa: a randomised controlled trial.** *PLoS Negl Trop Dis* 2012, **6**(6):e1674.
142. Sundar S, Rai M, Chakravarty J, Agarwal D, Agrawal N, Vaillant M, Olliaro P, Murray HW: **New treatment approach in Indian visceral leishmaniasis: single-dose liposomal amphotericin B followed by short-course oral miltefosine.** *Clin Infect Dis* 2008, **47**(8):1000-1006.
143. Miro G, Lopez-Velez R: **Clinical management of canine leishmaniosis versus human leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: Putting "One Health" principles into practice.** *Vet Parasitol* 2018, **254**:151-159.
144. Sundar S, Sinha PK, Rai M, Verma DK, Nawin K, Alam S, Chakravarty J, Vaillant M, Verma N, Pandey K *et al*: **Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial.** *Lancet* 2011, **377**(9764):477-486.
145. Van den Kerkhof M, Mabilie D, Chatelain E, Mowbray CE, Braillard S, Hendrickx S, Maes L, Caljon G: **In vitro and in vivo pharmacodynamics of three novel antileishmanial lead series.** *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2018, **8**(1):81-86.
146. Montakhab-Yeganeh H, Abdossamadi Z, Zahedifard F, Taslimi Y, Badirzadeh A, Saljoughian N, Taheri T, Taghikhani M, Rafati S: **Leishmania tarentolae expressing CXCL-10 as an efficient immunotherapy approach against Leishmania major-infected BALB/c mice.** *Parasite Immunol* 2017, **39**(10).
147. Castellano LR, Argiro L, Dessein H, Dessein A, da Silva MV, Correia D, Rodrigues V: **Potential Use of Interleukin-10 Blockade as a Therapeutic Strategy in Human Cutaneous Leishmaniasis.** *J Immunol Res* 2015, **2015**:152741.
148. Borja-Cabrera GP, Santos FN, Santos FB, Trivellato FA, Kawasaki JK, Costa AC, Castro T, Nogueira FS, Moreira MA, Luvizotto MC *et al*: **Immunotherapy with the saponin enriched-Leishmune vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis.** *Vaccine* 2010, **28**(3):597-603.
149. Dey R, Dagur PK, Selvapandiyan A, McCoy JP, Salotra P, Duncan R, Nakhasi HL: **Live attenuated *Leishmania donovani* p27 gene knockout parasites are nonpathogenic and elicit long-term protective immunity in BALB/c mice.** *J Immunol* 2013, **190**(5):2138-2149.
150. Fiuza JA, Gannavaram S, Santiago Hda C, Selvapandiyan A, Souza DM, Passos LS, de Mendonca LZ, Lemos-Giunchetti Dda S, Ricci ND, Bartholomeu DC *et al*: **Vaccination using live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites induces protection in dogs against *Leishmania infantum*.** *Vaccine* 2015, **33**(2):280-288.

151. Srivastava S, Shankar P, Mishra J, Singh S: **Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis.** *Parasit Vectors* 2016, **9**(1):277.
152. Noazin S, Khamesipour A, Moulton LH, Tanner M, Nasseri K, Modabber F, Sharifi I, Khalil EA, Bernal ID, Antunes CM *et al*: **Efficacy of killed whole-parasite vaccines in the prevention of leishmaniasis: a meta-analysis.** *Vaccine* 2009, **27**(35):4747-4753.
153. Miro G, Petersen C, Cardoso L, Bourdeau P, Baneth G, Solano-Gallego L, Pennisi MG, Ferrer L, Oliva G: **Novel Areas for Prevention and Control of Canine Leishmaniosis.** *Trends Parasitol* 2017, **33**(9):718-730.
154. Chakravarty J, Kumar S, Trivedi S, Rai VK, Singh A, Ashman JA, Laughlin EM, Coler RN, Kahn SJ, Beckmann AM *et al*: **A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis.** *Vaccine* 2011, **29**(19):3531-3537.
155. Campos BL, Silva TN, Ribeiro SP, Carvalho KI, Kallas EG, Laurenti MD, Passero LF: **Analysis of iron superoxide dismutase-encoding DNA vaccine on the evolution of the Leishmania amazonensis experimental infection.** *Parasite Immunol* 2015, **37**(8):407-416.
156. Riede O, Seifert K, Oswald D, Endmann A, Hock C, Winkler A, Salguero FJ, Schroff M, Croft SL, Juhls C: **Preclinical safety and tolerability of a repeatedly administered human leishmaniasis DNA vaccine.** *Gene Ther* 2015, **22**(8):628-635.
157. Didwania N, Shadab M, Sabur A, Ali N: **Alternative to Chemotherapy-The Unmet Demand against Leishmaniasis.** *Front Immunol* 2017, **8**:1779.
158. Seeger MA, van Veen HW: **Molecular basis of multidrug transport by ABC transporters.** *Biochim Biophys Acta* 2009, **1794**(5):725-737.
159. Theodoulou FL, Kerr ID: **ABC transporter research: going strong 40 years on.** *Biochem Soc Trans* 2015, **43**(5):1033-1040.
160. Rees DC, Johnson E, Lewinson O: **ABC transporters: the power to change.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, **10**(3):218-227.
161. ter Beek J, Guskov A, Slotboom DJ: **Structural diversity of ABC transporters.** *J Gen Physiol* 2014, **143**(4):419-435.
162. van Veen HW, Margolles A, Muller M, Higgins CF, Konings WN: **The homodimeric ATP-binding cassette transporter LmrA mediates multidrug transport by an alternating two-site (two-cylinder engine) mechanism.** *EMBO J* 2000, **19**(11):2503-2514.
163. Wilkens S: **Structure and mechanism of ABC transporters.** *F1000Prime Rep* 2015, **7**:14.
164. Chen J, Lu G, Lin J, Davidson AL, Quirocho FA: **A tweezers-like motion of the ATP-binding cassette dimer in an ABC transport cycle.** *Mol Cell* 2003, **12**(3):651-661.
165. Pakotiprapha D, Inuzuka Y, Bowman BR, Moolenaar GF, Goosen N, Jeruzalmi D, Verdine GL: **Crystal structure of Bacillus stearothermophilus UvrA provides insight into ATP-modulated dimerization, UvrB interaction, and DNA binding.** *Mol Cell* 2008, **29**(1):122-133.
166. Ward A, Reyes CL, Yu J, Roth CB, Chang G: **Flexibility in the ABC transporter MsbA: Alternating access with a twist.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(48):19005-19010.
167. Smith PC, Karpowich N, Millen L, Moody JE, Rosen J, Thomas PJ, Hunt JF: **ATP binding to the motor domain from an ABC transporter drives formation of a nucleotide sandwich dimer.** *Mol Cell* 2002, **10**(1):139-149.
168. Linton KJ, Higgins CF: **Structure and function of ABC transporters: the ATP switch provides flexible control.** *Pflugers Arch* 2007, **453**(5):555-567.
169. Newstead S, Fowler PW, Bilton P, Carpenter EP, Sadler PJ, Campopiano DJ, Sansom MS, Iwata S: **Insights into how nucleotide-binding domains power ABC transport.** *Structure* 2009, **17**(9):1213-1222.
170. Zoghbi ME, Fuson KL, Sutton RB, Altenberg GA: **Kinetics of the association/dissociation cycle of an ATP-binding cassette nucleotide-binding domain.** *J Biol Chem* 2012, **287**(6):4157-4164.

171. Aller SG, Yu J, Ward A, Weng Y, Chittaboina S, Zhuo R, Harrell PM, Trinh YT, Zhang Q, Urbatsch IL *et al*: **Structure of P-glycoprotein reveals a molecular basis for poly-specific drug binding.** *Science* 2009, **323**(5922):1718-1722.
172. Li J, Jaimes KF, Aller SG: **Refined structures of mouse P-glycoprotein.** *Protein Sci* 2014, **23**(1):34-46.
173. George AM, Jones PM: **Perspectives on the structure-function of ABC transporters: the Switch and Constant Contact models.** *Prog Biophys Mol Biol* 2012, **109**(3):95-107.
174. Senior AE, Bhagat S: **P-glycoprotein shows strong catalytic cooperativity between the two nucleotide sites.** *Biochemistry* 1998, **37**(3):831-836.
175. Dawson RJ, Locher KP: **Structure of a bacterial multidrug ABC transporter.** *Nature* 2006, **443**(7108):180-185.
176. Sauna ZE, Kim IW, Nandigama K, Kopp S, Chiba P, Ambudkar SV: **Catalytic cycle of ATP hydrolysis by P-glycoprotein: evidence for formation of the E.S reaction intermediate with ATP-gamma-S, a nonhydrolyzable analogue of ATP.** *Biochemistry* 2007, **46**(48):13787-13799.
177. Siarheyeva A, Liu R, Sharom FJ: **Characterization of an asymmetric occluded state of P-glycoprotein with two bound nucleotides: implications for catalysis.** *J Biol Chem* 2010, **285**(10):7575-7586.
178. Verhalen B, Wilkens S: **P-glycoprotein retains drug-stimulated ATPase activity upon covalent linkage of the two nucleotide binding domains at their C-terminal ends.** *J Biol Chem* 2011, **286**(12):10476-10482.
179. Locher KP: **Mechanistic diversity in ATP-binding cassette (ABC) transporters.** *Nat Struct Mol Biol* 2016, **23**(6):487-493.
180. 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):1713-1725.
181. Quazi F, Molday RS: **Lipid transport by mammalian ABC proteins.** *Essays Biochem* 2011, **50**(1):265-290.
182. Parodi-Talice A, Araujo JM, Torres C, Perez-Victoria JM, Gamarro F, Castanys S: **The overexpression of a new ABC transporter in Leishmania is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity.** *Biochim Biophys Acta* 2003, **1612**(2):195-207.
183. Araujo-Santos JM, Parodi-Talice A, Castanys S, Gamarro F: **The overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in Leishmania.** *Biochem Biophys Res Commun* 2005, **330**(1):349-355.
184. Sharom FJ: **The P-glycoprotein multidrug transporter.** *Essays Biochem* 2011, **50**(1):161-178.
185. Perez-Victoria JM, Perez-Victoria FJ, Parodi-Talice A, Jimenez IA, Ravelo AG, Castanys S, Gamarro F: **Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant Leishmania tropica and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator.** *Antimicrob Agents Chemother* 2001, **45**(9):2468-2474.
186. Wong IL, Chow LM: **The role of Leishmania enriettii multidrug resistance protein 1 (LeMDR1) in mediating drug resistance is iron-dependent.** *Mol Biochem Parasitol* 2006, **150**(2):278-287.
187. Katakura K, Fujise H, Takeda K, Kaneko O, Torii M, Suzuki M, Chang KP, Hashiguchi Y: **Overexpression of LaMDR2, a novel multidrug resistance ATP-binding cassette transporter, causes 5-fluorouracil resistance in Leishmania amazonensis.** *FEBS Lett* 2004, **561**(1-3):207-212.
188. Martinez-Garcia M, Campos-Salinas J, Cabello-Donayre M, Pineda-Molina E, Galvez FJ, Orrego LM, Sanchez-Canete MP, Malagarie-Cazenave S, Koeller DM, Perez-Victoria JM: **LmABCB3, an atypical mitochondrial ABC transporter essential for Leishmania major virulence, acts in heme and cytosolic iron/sulfur clusters biogenesis.** *Parasit Vectors* 2016, **9**:7.
189. Chen ZS, Tiwari AK: **Multidrug resistance proteins (MRPs/ABCCs) in cancer chemotherapy and genetic diseases.** *FEBS J* 2011, **278**(18):3226-3245.

190. Ouellette M, Fase-Fowler F, Borst P: **The amplified H circle of methotrexate-resistant leishmania tarentolae contains a novel P-glycoprotein gene.** *EMBO J* 1990, **9**(4):1027-1033.
191. Monte-Neto RL, Coelho AC, Raymond F, Legare D, Corbeil J, Melo MN, Frezard F, Ouellette M: **Gene expression profiling and molecular characterization of antimony resistance in Leishmania amazonensis.** *PLoS Negl Trop Dis* 2011, **5**(5):e11167.
192. Coelho AC, Messier N, Ouellette M, Cotrim PC: **Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in Leishmania amastigotes.** *Antimicrob Agents Chemother* 2007, **51**(8):3030-3032.
193. Coelho AC, Gentil LG, da Silveira JF, Cotrim PC: **Characterization of Leishmania (Leishmania) amazonensis promastigotes resistant to pentamidine.** *Exp Parasitol* 2008, **120**(1):98-102.
194. Coelho AC, Yamashiro-Kanashiro EH, Bastos SF, Mortara RA, Cotrim PC: **Intracellular location of the ABC transporter PRP1 related to pentamidine resistance in Leishmania major.** *Mol Biochem Parasitol* 2006, **150**(2):378-383.
195. BoseDasgupta S, Ganguly A, Roy A, Mukherjee T, Majumder HK: **A novel ATP-binding cassette transporter, ABCG6 is involved in chemoresistance of Leishmania.** *Mol Biochem Parasitol* 2008, **158**(2):176-188.
196. Campos-Salinas J, Leon-Guerrero D, Gonzalez-Rey E, Delgado M, Castanys S, Perez-Victoria JM, Gamarro F: **LABCG2, 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.
197. Manzano JI, Perea A, Leon-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.** *Parasit Vectors* 2017, **10**(1):267.
198. Perea A, Manzano JI, Kimura Y, Ueda K, Castanys S, Gamarro F: **Leishmania LABCG2 transporter is involved in ATP-dependent transport of thiols.** *Biochem J* 2017.
199. Campos-Salinas J, Cabello-Donayre M, Garcia-Hernandez R, Perez-Victoria I, Castanys S, Gamarro F, Perez-Victoria JM: **A new ATP-binding cassette protein is involved in intracellular haem trafficking in Leishmania.** *Mol Microbiol* 2011, **79**(6):1430-1444.
200. Ha DS, Schwarz JK, Turco SJ, Beverley SM: **Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected Leishmania.** *Mol Biochem Parasitol* 1996, **77**(1):57-64.
201. von Heijne G: **Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule.** *J Mol Biol* 1992, **225**(2):487-494.
202. Dobson L, Remenyi I, Tusnady GE: **CCTOP: a Consensus Constrained TOPology prediction web server.** *Nucleic Acids Res* 2015, **43**(W1):W408-412.
203. Sambrook J, Russell DW: **Isolation of High-Molecular-Weight DNA Using Organic Solvents to Purify DNA.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 2001.
204. Southern EM: **Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.** *J Mol Biol* 1975, **98**(3):503-517.
205. Livak KJ, Schmittgen TD: **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** *Methods* 2001, **25**(4):402-408.
206. Laemmli UK: **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** *Nature* 1970, **227**(5259):680-685.
207. Mosmann T: **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** *J Immunol Methods* 1983, **65**(1-2):55-63.
208. Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA: **Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: a practical usage guide.** *Biotechniques* 2011, **50**(2):98-115.
209. Ludescher C, Thaler J, Drach D, Drach J, Spitaler M, Gattringer C, Huber H, Hofmann J: **Detection of activity of P-glycoprotein in human tumour samples using rhodamine 123.** *Br J Haematol* 1992, **82**(1):161-168.

210. Ozvegy C, Litman T, Szakacs G, Nagy Z, Bates S, Varadi A, Sarkadi B: **Functional characterization of the human multidrug transporter, ABCG2, expressed in insect cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **285**(1):111-117.
211. 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):564-569.
212. Tusnady GE, Simon I: **The HMMTOP transmembrane topology prediction server.** *Bioinformatics* 2001, **17**(9):849-850.
213. Kall L, Krogh A, Sonnhammer EL: **A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method.** *J Mol Biol* 2004, **338**(5):1027-1036.
214. Jones DT: **Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information.** *Bioinformatics* 2007, **23**(5):538-544.
215. Shen H, Chou JJ: **MemBrain: improving the accuracy of predicting transmembrane helices.** *PLoS One* 2008, **3**(6):e2399.
216. Schmittgen TD, Livak KJ: **Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method.** *Nat Protoc* 2008, **3**(6):1101-1108.
217. Sauvage V, Aubert D, Escotte-Binet S, Villena I: **The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites.** *Mol Biochem Parasitol* 2009, **167**(2):81-94.
218. Mukhopadhyay R, Dey S, Xu N, Gage D, Lightbody J, Ouellette M, Rosen BP: **Trypanothione overproduction and resistance to antimonials and arsenicals in *Leishmania*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996, **93**(19):10383-10387.
219. Fidalgo LM, Gille L: **Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs.** *Pharm Res* 2011, **28**(11):2758-2770.
220. Hirve S, Kroeger A, Matlashewski G, Mondal D, Banjara MR, Das P, Be-Nazir A, Arana B, Olliaro P: **Towards elimination of visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent-Translating research to practice to public health.** *PLoS Negl Trop Dis* 2017, **11**(10):e0005889.
221. Burki T: **Leishmaniasis unleashed in Syria.** *Lancet Infect Dis* 2017, **17**(2):144-145.
222. Arce A, Estirado A, Ordobas M, Sevilla S, Garcia N, Moratilla L, de la Fuente S, Martinez AM, Perez AM, Aranguet E *et al*: **Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012.** *Euro Surveill* 2013, **18**(30):20546.
223. Molina R, Jimenez MI, Cruz I, Iriso A, Martin-Martin I, Sevillano O, Melero S, Bernal J: **The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain.** *Vet Parasitol* 2012, **190**(1-2):268-271.
224. Ruiz-Fons F, Ferroglio E, Gortazar C: **Leishmania infantum in free-ranging hares, Spain, 2004-2010.** *Euro Surveill* 2013, **18**(30):20541.
225. Seva ADP, Martcheva M, Tuncer N, Fontana I, Carrillo E, Moreno J, Keesling J: **Efficacies of prevention and control measures applied during an outbreak in Southwest Madrid, Spain.** *PLoS One* 2017, **12**(10):e0186372.
226. Hefnawy A, Berg M, Dujardin JC, De Muylder G: **Exploiting Knowledge on *Leishmania* Drug Resistance to Support the Quest for New Drugs.** *Trends Parasitol* 2017, **33**(3):162-174.
227. Srivastava S, Mishra J, Gupta AK, Singh A, Shankar P, Singh S: **Laboratory confirmed miltefosine resistant cases of visceral leishmaniasis from India.** *Parasit Vectors* 2017, **10**(1):49.
228. Rastrojo A, Garcia-Hernandez R, Vargas P, Camacho E, Corvo L, Imamura H, Dujardin JC, Castanys S, Aguado B, Gamarro F *et al*: **Genomic and transcriptomic alterations in *Leishmania donovani* lines experimentally resistant to antileishmanial drugs.** *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2018, **8**(2):246-264.
229. Garcia-Hernandez R, Gomez-Perez V, Castanys S, Gamarro F: **Fitness of *Leishmania donovani* parasites resistant to drug combinations.** *PLoS Negl Trop Dis* 2015, **9**(4):e0003704.
230. Coelho AC, Beverley SM, Cotrim PC: **Functional genetic identification of PRP1, an ABC transporter superfamily member conferring pentamidine resistance in *Leishmania major*.** *Mol Biochem Parasitol* 2003, **130**(2):83-90.

231. Leprohon P, Legare D, Ouellette M: **Intracellular localization of the ABCC proteins of Leishmania and their role in resistance to antimonials.** *Antimicrob Agents Chemother* 2009, **53**(6):2646-2649.
232. Rai S, Bhaskar, Goel SK, Nath Dwivedi U, Sundar S, Goyal N: **Role of efflux pumps and intracellular thiols in natural antimony resistant isolates of Leishmania donovani.** *PLoS One* 2013, **8**(9):e74862.
233. Perez-Victoria JM, Parodi-Talice A, Torres C, Gamarro F, Castanys S: **ABC transporters in the protozoan parasite Leishmania.** *Int Microbiol* 2001, **4**(3):159-166.
234. Perez-Victoria JM, Cortes-Selva F, Parodi-Talice A, Bavchvarov BI, Perez-Victoria FJ, Munoz-Martinez F, Maitrejean M, Costi MP, Barron D, Di Pietro A *et al*: **Combination of suboptimal doses of inhibitors targeting different domains of LtrMDR1 efficiently overcomes resistance of Leishmania spp. to Miltefosine by inhibiting drug efflux.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006, **50**(9):3102-3110.
235. Hollenstein K, Dawson RJ, Locher KP: **Structure and mechanism of ABC transporter proteins.** *Curr Opin Struct Biol* 2007, **17**(4):412-418.
236. Dobson L, Remenyi I, Tusnady GE: **The human transmembrane proteome.** *Biol Direct* 2015, **10**:31.
237. Orban TI, Seres L, Ozvegy-Laczka C, Elkind NB, Sarkadi B, Homolya L: **Combined localization and real-time functional studies using a GFP-tagged ABCG2 multidrug transporter.** *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **367**(3):667-673.
238. Watanasrisin W, Iwatani S, Oura T, Tomita Y, Ikushima S, Chindamporn A, Niimi M, Niimi K, Lamping E, Cannon RD *et al*: **Identification and characterization of Candida utilis multidrug efflux transporter CuCdr1p.** *FEMS Yeast Res* 2016, **16**(4).
239. Henriksen U, Gether U, Litman T: **Effect of Walker A mutation (K86M) on oligomerization and surface targeting of the multidrug resistance transporter ABCG2.** *J Cell Sci* 2005, **118**(Pt 7):1417-1426.
240. Skodova I, Verner Z, Bringaud F, Fabian P, Lukes J, Horvath A: **Characterization of two mitochondrial flavin adenine dinucleotide-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenases in Trypanosoma brucei.** *Eukaryot Cell* 2013, **12**(12):1664-1673.
241. Niemann M, Wiese S, Mani J, Chanfon A, Jackson C, Meisinger C, Warscheid B, Schneider A: **Mitochondrial outer membrane proteome of Trypanosoma brucei reveals novel factors required to maintain mitochondrial morphology.** *Mol Cell Proteomics* 2013, **12**(2):515-528.
242. Paterson JK, Shukla S, Black CM, Tachiwada T, Garfield S, Wincovitch S, Ernst DN, Agadir A, Li X, Ambudkar SV *et al*: **Human ABCB6 localizes to both the outer mitochondrial membrane and the plasma membrane.** *Biochemistry* 2007, **46**(33):9443-9452.
243. Schaedler TA, Faust B, Shintre CA, Carpenter EP, Srinivasan V, van Veen HW, Balk J: **Structures and functions of mitochondrial ABC transporters.** *Biochem Soc Trans* 2015, **43**(5):943-951.
244. Kispal G, Csere P, Guiard B, Lill R: **The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis.** *FEBS Lett* 1997, **418**(3):346-350.
245. Chloupkova M, LeBard LS, Koeller DM: **MDL1 is a high copy suppressor of ATM1: evidence for a role in resistance to oxidative stress.** *J Mol Biol* 2003, **331**(1):155-165.
246. Liesa M, Luptak I, Qin F, Hyde BB, Sahin E, Siwik DA, Zhu Z, Pimentel DR, Xu XJ, Ruderman NB *et al*: **Mitochondrial transporter ATP binding cassette mitochondrial erythroid is a novel gene required for cardiac recovery after ischemia/reperfusion.** *Circulation* 2011, **124**(7):806-813.
247. Krishnamurthy PC, Du G, Fukuda Y, Sun D, Sampath J, Mercer KE, Wang J, Sosa-Pineda B, Murti KG, Schuetz JD: **Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter.** *Nature* 2006, **443**(7111):586-589.
248. Kiss K, Brozik A, Kucsma N, Toth A, Gera M, Berry L, Vallentin A, Vial H, Vidal M, Szakacs G: **Shifting the paradigm: the putative mitochondrial protein ABCB6 resides in the lysosomes of cells and in the plasma membrane of erythrocytes.** *PLoS One* 2012, **7**(5):e37378.

249. Pondarre C, Antiochos BB, Campagna DR, Clarke SL, Greer EL, Deck KM, McDonald A, Han AP, Medlock A, Kutok JL *et al*: **The mitochondrial ATP-binding cassette transporter Abcb7 is essential in mice and participates in cytosolic iron-sulfur cluster biogenesis.** *Hum Mol Genet* 2006, **15**(6):953-964.
250. Ye H, Rouault TA: **Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease.** *Biochemistry* 2010, **49**(24):4945-4956.
251. Ichikawa Y, Bayeva M, Ghanefar M, Potini V, Sun L, Mutharasan RK, Wu R, Khechaduri A, Jairaj Naik T, Ardehali H: **Disruption of ATP-binding cassette B8 in mice leads to cardiomyopathy through a decrease in mitochondrial iron export.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, **109**(11):4152-4157.
252. Chen W, Paradkar PN, Li L, Pierce EL, Langer NB, Takahashi-Makise N, Hyde BB, Shiriha OS, Ward DM, Kaplan J *et al*: **Abcb10 physically interacts with mitoferrin-1 (Slc25a37) to enhance its stability and function in the erythroid mitochondria.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(38):16263-16268.
253. Yamamoto M, Arimura H, Fukushima T, Minami K, Nishizawa Y, Tanimoto A, Kanekura T, Nakagawa M, Akiyama S, Furukawa T: **Abcb10 role in heme biosynthesis in vivo: Abcb10 knockout in mice causes anemia with protoporphyrin IX and iron accumulation.** *Mol Cell Biol* 2014, **34**(6):1077-1084.
254. Frelet A, Klein M: **Insight in eukaryotic ABC transporter function by mutation analysis.** *FEBS Lett* 2006, **580**(4):1064-1084.
255. Mukherjee A, Roy G, Guimond C, Ouellette M: **The gamma-glutamylcysteine synthetase gene of Leishmania is essential and involved in response to oxidants.** *Mol Microbiol* 2009, **74**(4):914-927.
256. Romao S, Castro H, Sousa C, Carvalho S, Tomas AM: **The cytosolic trypanothione reductase of Leishmania infantum is essential for parasite survival.** *Int J Parasitol* 2009, **39**(6):703-711.
257. McCall LI, El Aroussi A, Choi JY, Vieira DF, De Muylder G, Johnston JB, Chen S, Kellar D, Siqueira-Neto JL, Roush WR *et al*: **Targeting Ergosterol biosynthesis in Leishmania donovani: essentiality of sterol 14 alpha-demethylase.** *PLoS Negl Trop Dis* 2015, **9**(3):e0003588.
258. Mittra B, Laranjeira-Silva MF, Perrone Bezerra de Menezes J, Jensen J, Michailowsky V, Andrews NW: **A Trypanosomatid Iron Transporter that Regulates Mitochondrial Function Is Required for Leishmania amazonensis Virulence.** *PLoS Pathog* 2016, **12**(1):e1005340.
259. Roberts SC: **The genetic toolbox for Leishmania parasites.** *Bioeng Bugs* 2011, **2**(6):320-326.
260. Lodes MJ, Merlin G, deVos T, Ghosh A, Madhubala R, Myler PJ, Stuart K: **Increased expression of LD1 genes transcribed by RNA polymerase I in Leishmania donovani as a result of duplication into the rRNA gene locus.** *Mol Cell Biol* 1995, **15**(12):6845-6853.
261. Wyllie S, Patterson S, Fairlamb AH: **Assessing the essentiality of Leishmania donovani nitroreductase and its role in nitro drug activation.** *Antimicrob Agents Chemother* 2013, **57**(2):901-906.
262. Kramer S: **Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids.** *Mol Biochem Parasitol* 2012, **181**(2):61-72.
263. Clayton C, Shapira M: **Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias.** *Mol Biochem Parasitol* 2007, **156**(2):93-101.
264. Holzer TR, Mishra KK, LeBowitz JH, Forney JD: **Coordinate regulation of a family of promastigote-enriched mRNAs by the 3'UTR PRE element in Leishmania mexicana.** *Mol Biochem Parasitol* 2008, **157**(1):54-64.
265. Terrao MC, Rosas de Vasconcelos EJ, Defina TA, Myler PJ, Cruz AK: **Disclosing 3' UTR cis-elements and putative partners involved in gene expression regulation in Leishmania spp.** *PLoS One* 2017, **12**(8):e0183401.
266. D'Orso I, Frasch AC: **Functionally different AU- and G-rich cis-elements confer developmentally regulated mRNA stability in Trypanosoma cruzi by interaction with specific RNA-binding proteins.** *J Biol Chem* 2001, **276**(19):15783-15793.

267. Papadopoulou B, Roy G, Dey S, Rosen BP, Olivier M, Ouellette M: **Gene disruption of the P-glycoprotein related gene pgpa of Leishmania tarentolae.** *Biochem Biophys Res Commun* 1996, **224**(3):772-778.
268. Haimeur A, Brochu C, Genest P, Papadopoulou B, Ouellette M: **Amplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant Leishmania tarentolae.** *Mol Biochem Parasitol* 2000, **108**(1):131-135.
269. Ashutosh, Sundar S, Goyal N: **Molecular mechanisms of antimony resistance in Leishmania.** *J Med Microbiol* 2007, **56**(Pt 2):143-153.
270. 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):1988-1993.
271. Jesus TT, Bernardino RL, Martins AD, Sa R, Sousa M, Alves MG, Oliveira PF: **Aquaporin-4 as a molecular partner of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in rat Sertoli cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2014, **446**(4):1017-1021.
272. Jesus TT, Bernardino RL, Martins AD, Sa R, Sousa M, Alves MG, Oliveira PF: **Aquaporin-9 is expressed in rat Sertoli cells and interacts with the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator.** *IUBMB Life* 2014, **66**(9):639-644.
273. Maharjan M, Singh S, Chatterjee M, Madhubala R: **Role of aquaglyceroporin (AQP1) gene and drug uptake in antimony-resistant clinical isolates of Leishmania donovani.** *Am J Trop Med Hyg* 2008, **79**(1):69-75.
274. Mittal MK, Rai S, Ashutosh, Ravinder, Gupta S, Sundar S, Goyal N: **Characterization of natural antimony resistance in Leishmania donovani isolates.** *Am J Trop Med Hyg* 2007, **76**(4):681-688.
275. Decuypere S, Vanaerschot M, Brunker K, Imamura H, Muller S, Khanal B, Rijal S, Dujardin JC, Coombs GH: **Molecular mechanisms of drug resistance in natural Leishmania populations vary with genetic background.** *PLoS Negl Trop Dis* 2012, **6**(2):e1514.
276. Mehta A, Shaha C: **Mechanism of metalloinduced death in Leishmania spp.: role of iron, reactive oxygen species, Ca²⁺, and glutathione.** *Free Radic Biol Med* 2006, **40**(10):1857-1868.
277. de Macedo-Silva ST, Urbina JA, de Souza W, Rodrigues JC: **In vitro activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against Leishmania amazonensis.** *PLoS One* 2013, **8**(12):e83247.
278. Sundar S, Singh B: **Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis.** *Expert Opin Ther Targets* 2018:1-20.
279. Mandal G, Sarkar A, Saha P, Singh N, Sundar S, Chatterjee M: **Functionality of drug efflux pumps in antimonial resistant Leishmania donovani field isolates.** *Indian J Biochem Biophys* 2009, **46**(1):86-92.
280. Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K: **Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life.** *Curr Med Chem* 2003, **10**(23):2495-2505.
281. Shadab M, Jha B, Asad M, Deepthi M, Kamran M, Ali N: **Apoptosis-like cell death in Leishmania donovani treated with KalsomeTM10, a new liposomal amphotericin B.** *PLoS One* 2017, **12**(2):e0171306.
282. Coimbra ES, Antinarelli LM, Silva NP, Souza IO, Meinel RS, Rocha MN, Soares RP, da Silva AD: **Quinoline derivatives: Synthesis, leishmanicidal activity and involvement of mitochondrial oxidative stress as mechanism of action.** *Chem Biol Interact* 2016, **260**:50-57.
283. Schieber M, Chandel NS: **ROS function in redox signaling and oxidative stress.** *Curr Biol* 2014, **24**(10):R453-462.
284. Mittra B, Cortez M, Haydock A, Ramasamy G, Myler PJ, Andrews NW: **Iron uptake controls the generation of Leishmania infective forms through regulation of ROS levels.** *J Exp Med* 2013, **210**(2):401-416.
285. Nogueira NP, de Souza CF, Saraiva FM, Sultano PE, Dalmau SR, Bruno RE, Goncalves Rde L, Laranja GA, Leal LH, Coelho MG *et al*: **Heme-induced ROS in Trypanosoma cruzi**

- activates CaMKII-like that triggers epimastigote proliferation. One helpful effect of ROS. *PLoS One* 2011, **6**(10):e25935.
286. da Silva R, Sacks DL: **Metacyclogenesis is a major determinant of Leishmania promastigote virulence and attenuation.** *Infect Immun* 1987, **55**(11):2802-2806.
287. Zakai HA, Chance ML, Bates PA: **In vitro stimulation of metacyclogenesis in Leishmania braziliensis, L. donovani, L. major and L. mexicana.** *Parasitology* 1998, **116 (Pt 4)**:305-309.
288. Dohmen LC, Navas A, Vargas DA, Gregory DJ, Kip A, Dorlo TP, Gomez MA: **Functional Validation of ABCA3 as a Miltefosine Transporter in Human Macrophages: IMPACT ON INTRACELLULAR SURVIVAL OF LEISHMANIA (VIANNIA) PANAMENSIS.** *J Biol Chem* 2016, **291**(18):9638-9647.
289. Sjostedt N, van den Heuvel J, Koenderink JB, Kidron H: **Transmembrane Domain Single-Nucleotide Polymorphisms Impair Expression and Transport Activity of ABC Transporter ABCG2.** *Pharm Res* 2017, **34**(8):1626-1636.

Anexo

ABCI3, a new mitochondrial ABC transporter from *Leishmania major* involved in susceptibility to antimonials and infectivity

Talia Arcari, José Ignacio Manzano and Francisco Gamarro.

Antimicrob Agents Chemother. 2017 Nov 22;61(12). pii: e01115-17.

doi: 10.1128/AAC.01115-17

<http://aac.asm.org/content/early/2017/09/26/AAC.01115-17>

ABSTRACT

We have identified and characterized ABCI3 as a new mitochondrial ABC transporter from *Leishmania major*. Localization studies using confocal microscope, surface biotinylation assay and trypsin digestion after digitonin permeabilization suggested that ABCI3 presents a dual localization in both mitochondria and plasma membrane. Using single-knock out parasites for *ABCI3* (*ABCI3*^{+/-}), we provided evidence that ABCI3 is directly involved in Sb^{III} and metal ions susceptibility. Attempts to obtain double knock-out parasites for *ABCI3* were unsuccessful, suggesting that *ABCI3* could be an essential gene in *L. major*. *ABCI3*^{+/-} promastigotes were 5-fold more resistant to Sb^{III}, while *ABCI3*^{+/-} amastigotes were approximately 2-fold more resistant to Sb^V. This resistant phenotype was associated with a decreased Sb^{III} accumulation due to a decreased Sb^{III} uptake. *ABCI3*^{+/-} parasites presented higher ATP levels and generated less mitochondrial superoxide after Sb^{III} incubation. Finally, we have observed that *ABCI3*^{+/-} parasites showed a slightly higher infection capacity than wild-type and add-back *ABCI3*^{+/-}::3xFABCI3 parasites; however, after 72 h the number of *ABCI3*^{+/-} intracellular parasites per macrophage increased significantly. Our results show that ABCI3 is responsible for Sb^{III} transport inside mitochondria, where it would contribute to enhance the general toxic effects caused by Sb^{III}. To our knowledge, ABCI3 is the first ABC transporter which is involved in susceptibility towards antimony, conferring Sb^{III} resistance to parasites when partially deleted.

INTRODUCTION

Protozoan parasites belonging to the genus *Leishmania* are the causative agents of a group of diseases known as leishmaniasis. With an estimated 1 million new cases and 20,000 to 30,000 deaths, leishmaniasis is still one of the world's most neglected tropical diseases (1). In the absence of an effective vaccine, current treatment relies mainly on chemotherapy. The usual drugs for leishmaniasis include pentavalent antimony (Sb^V), the antibiotic amphotericin B, the oral drug miltefosine and the aminoglycoside paromomycin (2). Unfortunately, treatment choice is frequently dictated by economic considerations, and being pentavalent antimonial compounds one of the most affordable, makes them the most widely used drugs in Africa and Latin America. On the other hand, the severe side effects including pancreatitis, cardiac and renal toxicity (3), the high treatment failure rate (up to 65%) and the emergence of resistance made the drug obsolete in the Indian subcontinent (3). The analysis of antimony resistance mechanisms in *Leishmania* has revealed that several mechanisms may occur simultaneously and also different mechanisms may operate in field isolates compared to lab-generated resistant *Leishmania* parasites (4, 5). One known mechanism of resistance to antimony in *Leishmania* involves a reduction in its accumulation, either by reduced uptake or increased efflux, with the latter being mediated by different ABC transporters: ABCC3 (also known as PgpA or MRPA) (6, 7), ABCI4 (8) and ABCG2 (9).

ABC (ATP-binding cassette) transporters are a family of ubiquitous integral membrane proteins that couple hydrolysis of ATP to translocation of substrates across cellular membranes. Major physiological functions of eukaryotic ABC transporters include the translocation across lipid bilayers of a wide variety of endogenous metabolites (sugars, aminoacids, phospholipids, ions, among others) and cytotoxic compounds (10). The essential structure of an ABC transporter consists of two highly conserved nucleotide binding domains (NBD), which bind and hydrolyze ATP, and two hydrophobic transmembrane domains (TMD), with six membrane-spanning helices each. Eukaryotic ABC transporters can be organized either as full transporters (two NBD and two TMD) or as half-transporters, containing one NBD and one TMD. Half-transporters require dimerization in order to assemble a functional protein (11).

With its 42 ABC ORFs identified, *Leishmania* is the protozoan parasite with the largest ABC transporter data set. Several have been studied and many of them play a relevant role in resistance to different drugs. *Lt*ABCB4 was shown to confer resistance to miltefosine and edelfosine (12), and its copy number was found to be correlated with the accumulation of Pentamidine in *Leishmania enrietti* (13). ABCC3 is frequently amplified in *Leishmania* parasites that are selected for resistance to first line antimony and arsenite containing drugs, and it presents the ability to sequester thiol-conjugated metals in intracellular vesicles close to the flagellar pocket (14, 15). Overexpression of ABCG4 and ABCG6 transporters resulted in resistance to miltefosine in *Leishmania infantum*, while overexpression of the ABCG6 transporter is involved in camptothecin resistance in *Leishmania donovani* (16-18). A new ABC transporter from the previously unknown ABCI group of transporters was described in our laboratory. ABCI4 is involved in drug susceptibility to antimony and other compounds by efflux of conjugated thiol complexes (8). Recently, overexpression of ABCG2 was also shown to confer resistance to antimony in *Leishmania major*, by sequestering and efflux of metal-thiol conjugates (19).

The aim of our work was to study the functionality of ABCI3 transporter from *L. major* (LmjF.33.3040), a member of the recently described subgroup of ABC transporters that don't belong to any of the subfamilies previously described in eukaryotes, which are only found in trypanosomatids (20). Although membrane proteins mediate many vital biological processes and may represent promising novel targets against leishmaniasis, most of them remain unexplored in *Leishmania*. In order to begin to understand the role ABCI3 plays in the biology of *L. major*, functional studies were carried out using single-knock out parasites for *ABCI3* (*ABCI3*^{+/−}). Attempts to obtain double knock-out parasites for *ABCI3* were unsuccessful, suggesting that *ABCI3* could be an essential gene in *L. major*. Our main goals were to determine the possible role this protein plays in drug resistance and in macrophage infectivity in *L. major*.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. All chemical compounds were of the highest quality available and were purchased from Sigma-Aldrich, unless otherwise stated. Miltefosine was purchased from Æterna Zentaris (Frankfurt, Germany). Pentostam and tafenoquine were provided by GlaxoSmithKline (Greenford, United Kingdom). MitoTracker Deep Red, MitoSOX Red and JC-1, were from Molecular Probes™ (Invitrogen). Zinc-protoporphyrin and Zn-mesoporphyrin IX were purchased from Frontier Scientific (Logan, UT).

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

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

Bioinformatic tools. Search for homology patterns and multiple sequence alignments were done with BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) and Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) programs respectively. Secondary structure and membrane topology prediction softwares were used: TopPred 1.0 (<http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py#forms::toppred>) and the Constrained Consensus Topology prediction server: CCTOP (<http://cctop.enzim.ttk.mta.hu/>).

Leishmania culture conditions. *L. major* promastigotes (MHOM/JL/80/Friedlin) were cultured at 28 °C in modified RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (hiFBS; Invitrogen).

DNA constructs and generation of *ABCI3* null mutant parasites. To create *ABCI3* deleted mutants, the *L. major ABCI3* open reading frame (ORF) was genetically targeted

for removal by homologous recombination using gene deletion constructs containing phosphotransferase genes conferring resistance to hygromycin (HYG) or neomycin (NEO). Homologous 5'- and 3'- flanking regions were amplified using the following primers: 5'UTRFw (5'- AGATCTAGCCGGTGTAACACAGCA-3'), 5'UTRRv (5'- ATTTAAATGCCGCAACCCTGTAACGACG-3'), 3'UTRFw (5'-ATTTAAATTCTA GAGTGCATGCTCAACACCTCGC-3') and 3'UTRRv (5'- GATATCTCACCCGGTCCATCAGTGGT-3'). PCR products were ligated in pGEM-T vector and confirmed by sequencing. Previous to transfection, constructs were linearised with *NotI* and *EcoRV* restriction enzymes and purified. Parasites were electroporated with 5 µg of the targeting fragment using Amaxa Human T Cell Nucleofector™ kit. Transfectant colonies were obtained by limit dilution on 96-well plates or by plating on semisolid modified RPMI medium with 10% hiFBS containing 20 µg/mL hygromycin B or 10 µg/ml G418. At least 20 clones from two independent transfections were checked by PCR and 4 positive clones from each transfection were confirmed to be single-knock out by southern blot analysis.

ABCI3 (GeneDB *L. major* accession no. LmjF.33.3040) was isolated from genomic DNA of *L. major* by PCR using primers ABCI3Fw1 (5'- GTCCCGGGATGCAAGCACTGACTAGGCG-3') and ABCI3Rv1 (5'- GACCCGGGTCTGAAGCAGCAACGGAGT-3'). For homologous expression of the untagged version of the protein, the *ABCI3* gene was cloned in the *Leishmania* expression vector pXG. To produce ABCI3 fusion proteins with green fluorescent protein (GFP), either at N- or C-terminus, pXG-GFP+2' and pXG-GFP+ vectors were used and the following primers: ABCI3Fw2 (5'- ATGCGGCCGCTGTATGACGTGTGAACCGCTG-3'), ABCI3Rv2 (5'- CACAATTGG TGACACGCCACGCCATCGTCGTGC-3') for cloning in pXG-GFP+2' and ABCI3Fw2 and ABCI3Rv3 (5'- CTAATATTAGAAGCCGCGTTGGCGCCCGCC-3') for cloning in pXG-GFP+.

To obtain parasites expressing non-functional ABCI3, a mutation was introduced in the Walker A motif of the ATP-binding domain, replacing Lys 1088 with Met using the QuikChange XL Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies) and the following sense (5'-CCAAGTGGGGCAGGAATGAGTTCGCTCAATCT-3') and antisense (5'-AGATTGAGCGAACTCATTCCCTGCCCCACTTGG-3') primers. The resulting mutated gene *ABCI3*^{K/M} was cloned into the *Leishmania* expression vectors pXG and pXG-GFP+2'. *ABCI3* was also cloned in the pIR1SAT vector, with a 3xFLAG peptide tag (3xF) with the following

sequence: MDYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKPG at the N-terminus of the protein, and the complete 3' flanking region of the gene. This last construct was used for complementation through episomal expression in *ABCI3*^{+/-} parasites. The resulting add-back line will be referred to as *ABCI3*^{+/-}::3xFABCI3 parasites from here on.

Southern blotting. Probe labeling and detection were done using DIG-High Prime DNA labeling and Detection Kit (Roche). For DIG labeling, target sequences were amplified by PCR using specific primers for 3 different probes: (i) for the ABCI3 probe, sense (5'-GCAGACAGTGTGGAAGC-3'); antisense (5'-CGAAGTAGTCCACATGCGC-3') primers; (ii) for the HYG probe, sense (5'-CAGCGAGAGCCTGACCTATTGC-3'); antisense (5'-GATCGGACGATTGCGTCGCAT-3') primers, and (iii) for the 3'UTR probe, sense (5'-TCTACCGTGTCTGGGCTTTGT-3'); antisense (5'-GAACCGTGCTGGTTCACCTT-3') primers. The PCR products were gel purified and 1 µg of the purified products was labeled with DIG according to the manufacturer's instructions. *Leishmania* genomic DNA (6 µg) was digested overnight with *EcoRV* (Roche). The digested DNA was run on a 0.7% low melting point agarose gel and transferred onto positively charged nylon membranes. Blots were detected with anti-DIG-AP antibody solution (1/1,000) following the manufacturer's instructions.

RNA isolation and gene expression analysis. Total RNA was isolated from 50×10^6 log-phase promastigotes using the total RNA isolation kit (Roche). cDNA was synthesized from 1 µg total RNA using qSCRIPTTM cDNA synthesis kit (Quanta Biosciences, Inc), according to the manufacturer's instructions. All real-time PCRs were performed in triplicate in a 10 µL volume, using SYBR green as reporter dye in a CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (BioRad). The analysis of gene expression was performed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, employing *trypanothione reductase* (*TR*) as reference gene. Copy number determination was achieved by absolute quantification, using the standard curve method with genomic DNA from *L. major* and *TR* as reference gene.

Drug susceptibility analysis. The susceptibility of *L. major* promastigote lines to different compounds was determined using the MTT colorimetric assay, as described

previously (21). The 50% effective concentration (EC_{50}) is the concentration of drug that decreases cell growth by 50%.

Fluorescence microscopy. Promastigotes overexpressing ABCI3 GFP-fused proteins were used for co-localization studies. Parasites were labelled with 50 nM MitoTracker DeepRed FM for 30 min at 28°C in RPMI medium without hiFBS. They were washed with PBS and analyzed under a TCS SP5 model confocal microscope (Leica) without fixation. Co-localization analysis was performed with Fiji image software using JaCOP plugin.

Cell surface biotinylation. Parasite surfaces were labelled as described previously (9) with some modifications. Briefly, promastigotes (1×10^8) were washed with PBS and incubated on ice with 1 mM EZ-Link Sulfo-NHS-SS-biotin (Pierce, Thermo Fisher, Rockford, IL) in 1 ml PBS for 60 min at 4°C. The reaction was stopped by washing the cells three times with PBS supplemented with 50 mM Tris-HCl. Parasites were then incubated on ice with lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl) supplemented with IGEPAL[®] CA-630 2% and SDS 0.1% for 60 min. The supernatants obtained from the previous lysate were incubated for 1 h at 4°C with 100 μ l of packed streptavidin-agarose (Pierce) prewashed in the previous lysis buffer. Agarose beads were washed four times with 1 ml of lysis buffer and the biotinylated proteins eluted in 30 μ l of 2x Laemmli buffer. Protein samples were fractionated by SDS-PAGE under standard conditions, then electrotransferred onto Immobilon P membranes (Millipore, Bedford, MA). Immunodetection was performed using 1:5,000 polyclonal anti-GFP or 1:10,000 monoclonal anti-gp63, respectively, in PBS plus 0.01% Tween 20 and 0.1% BSA. Control of plasma membrane (PM) integrity was determined by immunodetection with monoclonal anti-cytosolic trypanothione peroxidase (cTXNPx) antibody (a gift from Ana M. Tomás, IBMC, Porto, Portugal) at 1:6,000 dilution. After washing, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit (1:5,000) IgG (Dako) secondary antibody for anti-GFP, and rabbit anti-mouse (1:5,000) IgG (Dako) for anti-gp63 and anti-cTXNPx. Signals were detected using the ECL western blotting substrate (Pierce).

Digitonin permeabilization and Western Blotting. For digitonin permeabilization, 25×10^7 parasites were washed twice in ice-cold PBS. 40×10^6 parasites were resuspended in

100 μ l lysis buffer (150mM Tris-HCl, 50 mM NaCl, pH 7.8-8) for each digitonin concentration used (0, 20, 50, 100 and 500 μ M). After the addition of digitonin, parasites were incubated on ice for 30 min. Tubes were split in two, one for the control condition and one for trypsin digestion. Trypsin was added at a final concentration of 0.06 mg/mL and parasites were incubated at room temperature for 10 min. Tubes were centrifuged at 14,000 $\times g$ for 30 s and pellets were washed with lysis buffer containing PMSF and protease inhibitor cocktail (Thermo). Pellets were resuspended in urea cracking buffer (5M Urea, 10 mM Na₂HPO₄, 1% β -mercaptoethanol, 1% SDS). Lysates were kept on ice for 20 min, Laemmli buffer 4X was added and samples were heated at 95 °C for 5 min before loading them in 8% acrylamide gels for SDS-PAGE. Proteins were transferred to PDVF membranes (Millipore) and blots were blocked overnight with 5% skimmed milk in PBS. Primary rabbit anti-GFP polyclonal antibody (Molecular probes), anti-3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A synthase (anti-HMGS) (kindly provided by D. Gonzalez Pacanowska and L.M. Ruiz-Perez) and anti-cTXNPx antibody were used at 1:5,000, 1:100,000 and 1:6,000 dilutions, respectively in PBS 0.1% Tween 20, 0.1% BSA. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG secondary antibody (Dako) was used at 1:5,000 dilution for anti-GFP and anti-HMGS, and rabbit anti-mouse immunoglobulin G (Dako) for anti-cTXNPx was used at 1:5,000 dilution, in the same buffer. Antibodies were incubated for 1 h with the membrane and washed 3 times for 10 min with PBS, 0.1% Tween 20, 0.1% BSA. ECL western blotting substrate (Pierce) was used to detect proteins.

Antimony accumulation and efflux. Promastigotes (10^8 parasites) were incubated with 100 μ g/mL (163 μ M) potassium antimony tartrate in M199 medium without hiFBS at 28 °C for 30 min, washed twice with PBS, and the resultant pellet stored at -80 °C until measurement of antimony accumulation as described previously (6). To determine antimony efflux, wild-type (wt) and *ABCI3*^{+/-} parasites were preloaded with 163 μ M and 326 μ M Sb^{III}, respectively, in culture medium at 28 °C for 1 h. They were washed with PBS, resuspended in culture medium at 28 °C, and pelleted at different time points. The cell pellet was dissolved in 200 μ l of concentrated nitric acid for 24 h at room temperature. The sample was diluted to 3 ml with distilled water and then injected into an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS; Perkin-Elmer) for quantitation.

Measurement of ATP, ROS and mitochondrial membrane potential. ATP was measured using a CellTiter-Glo luminescent assay (Promega), as described (22). After incubation with 100 μM Sb^{III} , promastigotes ($4 \times 10^6/\text{mL}$) in RPMI plus 10% hiFBS were mixed with the same volume of CellTiter-Glo, and incubated at 28 °C in the dark for 10 min. The resulting bioluminescence was measured using an Infinite F200 microplate reader (Tecan Austria GmbH, Austria). Mitochondrial superoxide levels were determined by flow cytometry using MitoSOX Red as described (8). 1×10^7 parasites were washed with fresh RPMI and incubated with 5 μM MitoSOX Red at 28 °C for 30 min. Positive controls were then incubated with 15 μM antimycin A (Ant A) for 15 min at 28 °C. After washing with HBS buffer (21 mM HEPES, 0.7 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 5 mM KCl, and 6 mM glucose, pH 7), fluorescence was measured by flow cytometry using a FACScan flow cytometer (excitation, 488 nm; emission, 580 nm). Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi\text{m}$) was measured by flow cytometry using Rhodamine 123 (Rho) and JC-1 fluorescent markers, as described (8). Parasites (4×10^6 promastigotes/ml) were incubated in HBS buffer at 28 °C with 5 μM JC-1 or 1 μM Rho for 10 min, washed once with HBS and cellular fluorescence was measured by flow cytometry. Parasites fully depolarized by incubation in 10 μM carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) for 10 min at 28 °C were used as controls.

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 (8), with some modifications. Briefly, the adherent macrophages placed in 24-wells plate with coverslips, were infected for 5 h at 35 °C with stationary-phase promastigotes at a parasite-to-cell ratio of 5:1. The infection was stopped by washing with serum free medium and the infected macrophages were incubated for 24 and 72 h. After incubation, the cultures were processed and stained with DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole diacetate). The percentage of infected macrophages and the mean number of amastigotes per macrophage were determined by fluorescence microscopy.

Statistical analysis. Experiments were performed in triplicate, and the data are presented as means $\pm$ SD. Statistical comparisons between groups were performed using

Student's *t* test. A *p* value ≤ 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were carried out using the software SigmaPlot version 12.0 (Systat software Inc.).

RESULTS

Sequence features of *L. major ABCI3* gene.

ABCI3 is a single copy gene from chromosome 33 (TriTryp DB *L. major* genome, accession code LmjF.33.3040) which belongs to the ABC transporter superfamily. *ABCI3* is a member of the recently denominated ABCI group of transporters (8). This group comprises 4 genes which are only found in trypanosomatids. *ABCI3* only shares a high sequence identity with orthologues genes from other *Leishmania* species: ~92% amino acid (aa) identity with *L. donovani* and *L. infantum*, 90% with *Leishmania mexicana* and 75% with *Leishmania braziliensis* orthologues (see Fig. S1 in supplemental material). However, it only shares 27% aa identity with its orthologous genes from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. Sequence identity with *ABCI4* and other members of the ABCI subfamily in *L. major* is low, reaching only a 25% identity with *ABCI4*. BLAST searches of the GenBank database found no *ABCI3* related genes in other eukaryotic organisms.

According to TriTryp DB, *ABCI3* codes for a 1337 aa protein with a predicted molecular mass of ~145 kDa. Several alternative splice sites are listed, being one of them more relevant than the others. We decided to confirm this splice leader (SL) adding site by RT-PCR using an SL primer and an *ABCI3* specific primer. Our results agree with the dominant splice site listed. However, there are two ATG codons in phase, ATG1 and ATG2, located 26 and 317 bp downstream of the splice site, respectively. ATG2 is annotated as the start codon for *ABCI3* ORF in TriTryp DB. This new ORF starting at ATG1 would code for a protein with a predicted mass of 1434 aa and ~156 kDa. Interestingly, this alternative start codon is also present in the orthologues genes from *L. donovani*, *L. braziliensis* and *L. mexicana*. To further characterize this gene and the *ABCI3* transporter, we decided to amplify the sequence starting at ATG1, to be sure the ORF was complete and we obtained a fully functional protein.

ABCI3 has a half-transporter topology, with a hydrophobic region containing several transmembrane α -helices (TMD) and a NBD at the C-terminus, which is a highly conserved domain characteristic of this family of proteins (Fig. 1A). Predicting membrane proteins 2-D and 3-D structure remains a challenge, especially when there are non-orthologous protein structures available in the databases. Several computational tools have been developed to improve predictions of transmembrane protein topologies. These range from simple algorithms (*e.g.* TopPred (23)) to more sophisticated methods (*e.g.* HMMTOP (24), Phobius (25)) and MEMSAT3 (26)). We decided to use TopPred and the CCTOP (Consensus Constrained TOPology prediction) algorithm (27), a novel consensus topology predictor for α -helical transmembrane proteins based on 10 state-of-the-art topology prediction methods, to obtain topology models for ABCI3. Most of the topology models obtained with TopPred were discarded as the NBD was predicted to be a part of the TMD. The consensus model obtained with the CCTOP server contained a TMD with 5 transmembrane α -helices and the NBD is predicted to be located on the cytoplasmic side of the membrane (Fig. 1B).

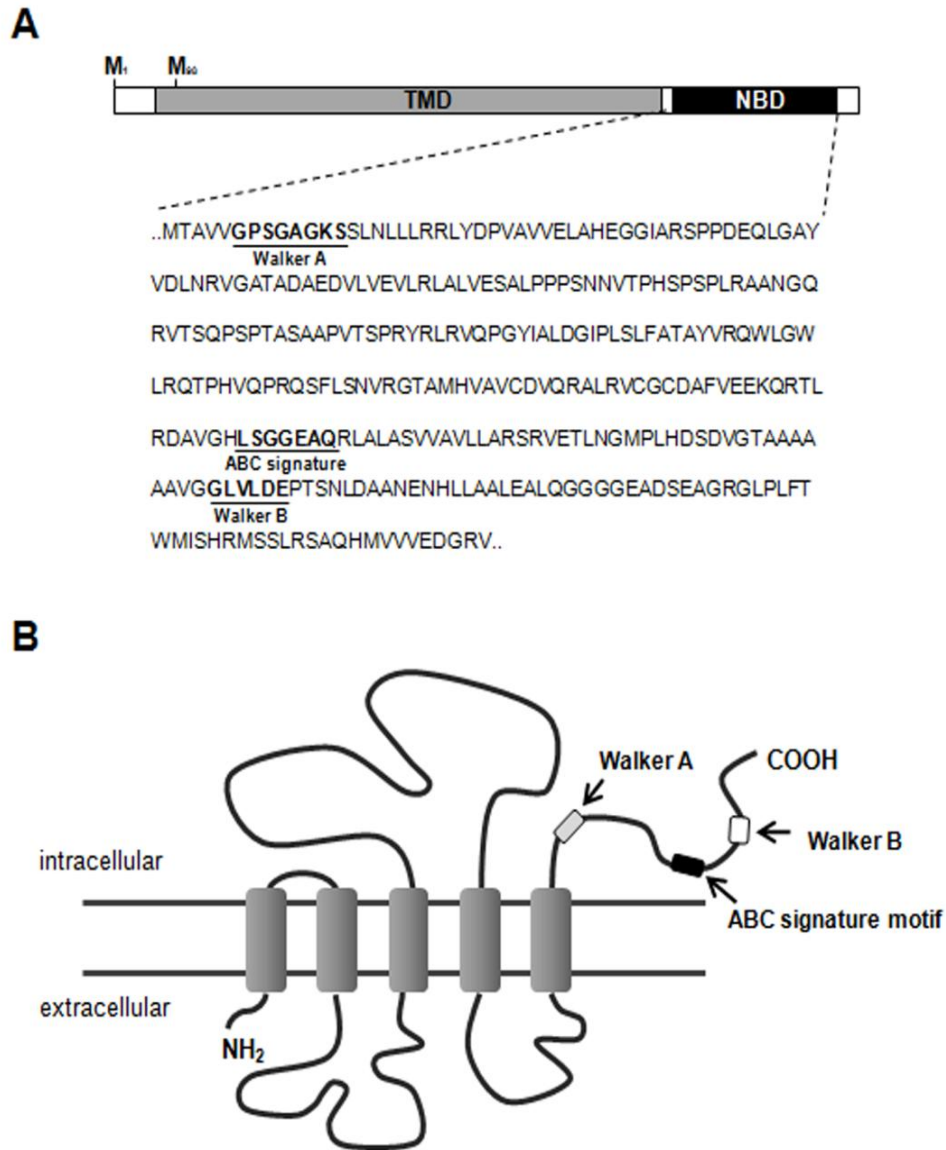
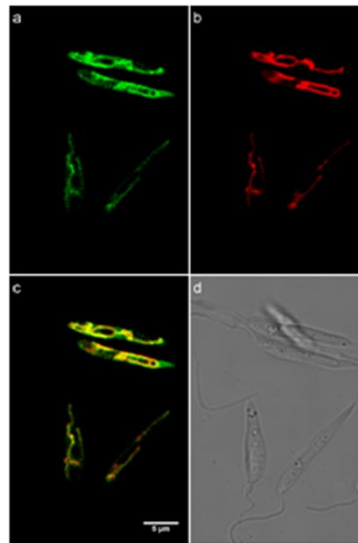


Figure 1. Predicted structure of *Leishmania* ABCI3. **A**, Schematic diagram of ABCI3 protein showing the annotated start Met residue, M98 (coded by ATG2), and the upstream Met residue, M1 (coded by ATG1), we have used in our constructs, the transmembrane domain (TMD) and the nucleotide binding domain (NBD). The schematic representation of the NBD sequence highlights conserved motifs found in all ABC transporters: Walker A motif, ABC signature (C-motif) and Walker B motif. **B**, Schematic representation of the model obtained for ABCI3 using the CCTOP server. The TMD is composed by five alpha-helices (grey boxes) spanning the membrane and several connecting loops on both sides of the membrane. Conserved motifs are also shown in boxes (white, black and grey). Given the results obtained for the subcellular localization of ABCI3 (see Fig. 2), the extracellular side of the membrane would correspond to the cytosol, and the intracellular one, to the mitochondrial intermembrane space.

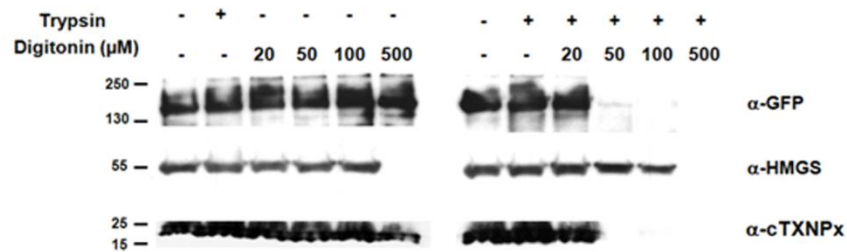
Localization of ABCI3 in *L. major* promastigotes.

To determine the subcellular localization of ABCI3, N- and C-terminus GFP-fused proteins were created using pXG-GFP+2 and pXG-GFP+ vectors. Expression was determined by Western Blot using an anti-GFP antibody. High levels of expression were achieved in *L. major* promastigotes with the N-terminal tagged protein (GFP-ABCI3) after a 2 week selection period with 100 µg/mL NEO (see Fig. S2 in supplemental material). However, almost no expression was obtained for the C-terminal tagged version of ABCI3 (ABCI3-GFP) after 6 weeks (see Fig. S2). Thus, only GFP-ABCI3 transfected parasites were further used for fluorescence microscopy co-localization studies. To study the cellular distribution of the GFP-tagged protein, we used the mitochondrial marker MitoTracker Deep Red and confocal microscopy (Fig. 2A). Co-localization analysis was performed using JACoP, a co-localization plug-in available for Fiji image software. Pearsons and Manders coefficients were calculated for each individual deconvolved image. The result of this analysis showed that GFP-ABCI3 is localized mainly in the mitochondria of *Leishmania* promastigotes with a Pearson's co-localization index of 0.75 ± 0.06 and Mander's coefficients M1 (0.63 ± 0.10) and M2 (0.66 ± 0.13). Using digitonin and trypsin, the subcellular localization of ABCI3 was further studied in parasites expressing the GFP-tagged version of the protein. Increasing concentrations of digitonin sequentially permeabilizes cell membranes on the basis of their different levels of sterol content (28). The PM is permeabilized with low doses of detergent, whereas glycosomal and mitochondrial proteins are released at higher concentrations, becoming accessible to trypsin. GFP-ABCI3 accessibility to trypsin was evaluated by Western Blot (Fig 2B). A relatively low digitonin concentration is enough to make ABCI3 accessible to trypsin, therefore the GFP-ABCI3 band is missing from our Western Blot at 50 µM digitonin. Antibodies against cTXNPx and HMGS, a soluble mitochondrial matrix protein, were used as controls. Both, cTXNPx and ABCI3 were accessible to trypsin almost at the same digitonin concentration, suggesting that GFP-ABCI3 was localized in the outer mitochondrial membrane. HMGS was only accessible to trypsin at the highest digitonin concentration because it is localized in the mitochondrial matrix.

A



B



C

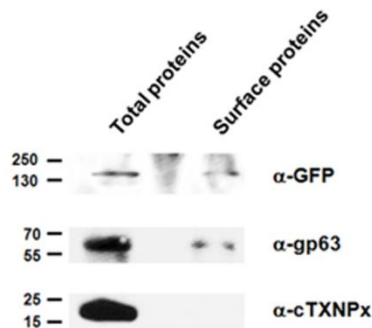


Figure 2. Subcellular localization of ABCI3 in *Leishmania*. **A**, Confocal microscopy images of *L. major* promastigotes expressing GFP-ABCI3 are shown. **a**. Green fluorescence associated with the GFP-fusion protein is shown. **b**. Mitochondria labeled with MitoTracker Red. For mitochondrial labeling, promastigotes were incubated at 28 °C with 50 nM MitoTracker Red for 30 min. **c**. The merged image indicates co-localization (yellow) of GFP-ABCI3 and MitoTracker Red. **d**. DIC, differential interference contrast. Representative parasites are shown from a population of parasites with a similar fluorescence pattern. **B**, Western Blot analysis of total protein extract from *L. major* promastigotes expressing GFP-ABCI3 treated with increasing concentrations of digitonin in the

presence and absence of trypsin. Concentrations of digitonin (20-500 μ M) are indicated. cTXNPx was used as cytosolic marker. HMGS is a soluble protein found in the mitochondrial matrix and was used as mitochondrial matrix marker. The position of the prestained molecular weight markers are indicated on the left. **C**, Biotinylated proteins from the surface of promastigotes expressing GFP-ABCI3 were analysed by immunoblotting with anti-GFP, anti-gp63 (positive control), and anti-cTXNPx (negative control) antibodies. The position of the prestained molecular weight markers are indicated on the left.

Given some previous reports of ABC transporters with a dual subcellular localization (8, 9), we decided to determine if ABCI3 was also localized in the parasites' PM. In order to corroborate this, we performed a cell surface biotinylation assay. We observed small amounts of GFP-ABCI3 localized in the PM of *L. major* (Fig. 2C). Subcellular fractions were obtained and ABCI3 was recovered in the fraction eluted from the streptavidin beads and detected with anti-GFP antibody by immunoblotting. Gp63, the major cell surface protein in promastigotes (29), served as positive control (Fig. 2C). No bands were detected after immunoblotting of biotinylated proteins against anti-cTXNPx. This control confirms that the labeling reagent did not penetrate the PM, thereby demonstrating the specificity of the biotinylation procedure. Overall, these studies suggest that ABCI3 has a dual localization in both, the outer mitochondrial membrane and PM of *Leishmania*.

Generation of *Leishmania ABCI3* knock-out mutants.

To find out the biological relevance of ABCI3 in *Leishmania* parasites, we attempted to create single and double knock-out parasites using a gene replacement strategy by homologous recombination. *Leishmania* are asexual diploids and thus require two rounds of gene replacement to achieve this. We generated *ABCI3* knock-out constructs either with HYG or NEO selectable markers (Fig. 3A). After one round of transfection, several HYG resistant clones were obtained. To screen for single knock-out parasites, genomic DNA (gDNA) was isolated from 20 HYG resistant clones and analyzed by PCR using specific primers. 18 clones were positive by PCR, and 2 of these clones were further analyzed by southern blot (Fig. 3B) to check for the correct integration of the HYG construct in the *ABCI3* locus.

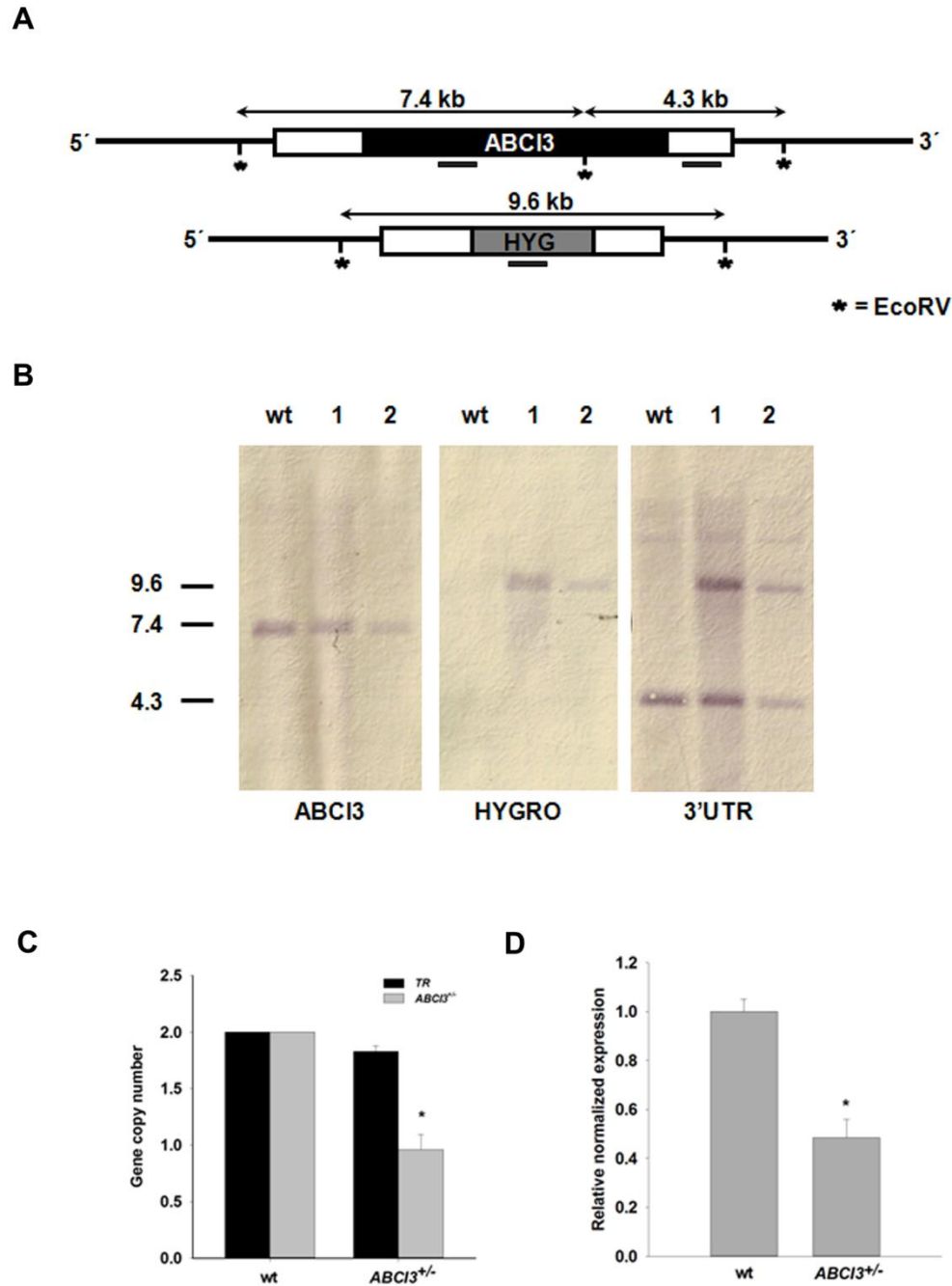


Figure 3. Target gene replacement of one *Leishmania* ABCI3 allele. **A**, Schematic representation of ABCI3 locus and the hygromycin construct used for gene replacement. (*) *EcoRV* restriction sites. White boxes are 5'UTR and 3'UTR. Predicted restriction fragments sizes are indicated. Black boxes below ABCI3, HYG, and 3'UTR represent gene specific probes used in southern blot analysis. **B**, Southern blot of *EcoRV* digested genomic DNA of wt *L. major* promastigotes (wt) and two representative ABCI3^{+/-} clones obtained in two independent transfections (1 and 2). The blot was hybridized with ABCI3, HYG and 3'UTR probes as indicated. The positions of molecular markers (Kbp) are indicated on the left. **C**, Gene copy number determination of ABCI3 in wt and ABCI3^{+/-} parasites by qRT-PCR. The absolute quantification

method was used as described. The data represent the mean $\pm$ SD of three independent experiments. Statistical significance versus the control was determined by Student's *t* test (**p*<0.01). **D**, Expression levels of *ABCI3* in wt and *ABCI3*^{+/-} parasites. mRNA was isolated from each *Leishmania* cell line and analysed by qRT-PCR. The data represent the mean $\pm$ SD of three independent experiments. Statistical significance versus the control was determined by Student's *t* test (**p*<0.01).

Despite several attempts, no single knock-out clone was obtained with NEO, neither by limit dilution nor by plating on semisolid RPMI plates with 10 μ g/ml NEO. Parasites isolated that showed resistance to NEO didn't have the cassette integrated in the *ABCI3* locus, but somehow managed to keep the resistance cassette as an episome in high copy numbers. A similar situation happened when we tried to obtain double knock-out parasites for *ABCI3*. After a second round of transfection, several clones were obtained which were resistant to both antibiotics, but parasites still kept one copy of *ABCI3* and the NEO cassette was not integrated at the *ABCI3* locus (data not shown). This could be the first indication that *ABCI3* is essential in *L. major* promastigotes. As it has been described previously that some loci duplicate when attempting to obtain null mutants (30, 31), we decided to confirm the gene copy number of *ABCI3* in *ABCI3*^{+/-} parasites using real-time PCR (qPCR). As expected, *ABCI3*^{+/-} parasites had half the amount of gDNA corresponding to the *ABCI3* gene than wt parasites (Fig. 3C). *ABCI3*^{+/-} parasites were transfected with the pIR1SAT expression vector carrying one copy of the *ABCI3* gene prior to targeting the second allele. This complemented single knock-out parasites (*ABCI3*^{+/-}::3xFLAG*ABCI3*pIR1SAT) (see Fig. S3 in supplemental material) were then transfected with the NEO cassette, but again, no double-knock out parasites were obtained (data not shown).

Analysis by qPCR showed an approximate 50% reduction in mRNA levels in *ABCI3*^{+/-} compared to wt parasites (Fig. 3D). These results suggested an expected similar reduction in protein levels in *ABCI3*^{+/-} parasites, an issue that we could not confirm due to the lack of a specific antibody against ABCI3. To assess if the reduced expression of *ABCI3* compromised the parasite's physiology, various parameters were analyzed. Morphologically, *ABCI3*^{+/-} promastigotes were identical to their wt counterparts at all stages of their *in vitro* life cycle (data not shown). Also, the division rate of *ABCI3*^{+/-}

parasites was identical to that of wt parasites, indicating that one copy of *ABCI3* is enough to ensure promastigote growth in our culture conditions (data not shown).

Drug susceptibility profiles of *ABCI3*^{+/-} and overexpressing parasites.

Considering that some ABC transporters have been implicated in drug resistance in *Leishmania* (8, 17, 19, 32), we decided to analyze whether the overexpression or partial knock-out of *ABCI3* could confer resistance to drugs and other related molecules. Different leishmanicidal drugs including antimonials (Sb^{III}), miltefosine, amphotericin B and paromomycin were tested, as well as As^{III}, a metal ion which has been shown to be cross-resistant to Sb^{III} (33); Zn-protoporphyrin, a toxic porphyrin and validated heme analog (8) and H₂O₂, a by-product of superoxide radical formation during macrophage activation (34) (Table 1). Parasites overexpressing *ABCI3* showed no resistant phenotype towards the tested compounds (data not shown). On the contrary, *ABCI3*^{+/-} parasites were almost 5- and 7-fold more resistant to Sb^{III} and As^{III} than wt parasites, respectively (Table 1). These results suggest that metal ions could be possible substrates of *ABCI3*. To validate the observed resistance phenotype, *ABCI3*^{+/-} parasites from a second independent transfection event were also tested, and similar results were obtained (data not shown). To rule out that the observed resistance was the result of other unrelated intrinsic characteristic of the selected clones, *ABCI3*^{+/-} parasites were transfected with an episomal copy of the gene to complement for the partial loss of function of *ABCI3*. *ABCI3*^{+/-}::3x*FABCI3* parasites partially reverted the *ABCI3*^{+/-} Sb^{III} resistance phenotype, being only 2-fold more resistant to Sb^{III} than wt parasites (Table 1).

As *ABCI3*^{+/-} promastigotes were resistant to Sb^{III}, we decided to determine if intracellular amastigotes in infected macrophages were also resistant to Pentostam, a leishmanicidal drug that contains Sb^V, which is reduced to Sb^{III} either inside the macrophage or within the amastigotes (35). Pentostam susceptibility assays showed that *ABCI3*^{+/-} amastigotes were approximately 2-fold more resistant to Sb^V than wt parasites (Table 1). Intracellular add-back *ABCI3*^{+/-}::3x*FABCI3* parasites showed a partial reversion of the resistance to Sb^V (Table 1).

Table 1. Drug resistance profile for promastigotes and susceptibility to pentostam in intracellular amastigotes of *L. major* lines ^a

	EC ₅₀ (μM) ± SD [RI] ^b		
	wt	<i>ABCI3</i> ^{+/-}	<i>ABCI3</i> ^{+/-} ::3x <i>FABCI3</i>
Sb ^{III}	18 ± 1	88 ± 2 [4.9]*	43 ± 1 [2.4]*
As ^{III}	1.8 ± 0.1	12.75 ± 0.08 [7.1]*	-
Cd ^{II}	36 ± 8	44 ± 4 [1.2]	-
Amphotericin B	0.17 ± 0.02	0.13 ± 0.03 [0.8]	-
Miltefosine	20 ± 1	10 ± 2 [0.5]	-
Paromomycin	5.4 ± 0.3	8.1 ± 0.7 [1.5]	-
Pentamidine	1.85 ± 0.02	1.97 ± 0.12 [1.1]	-
Tafenoquine	2.68 ± 0.07	2.72 ± 0.05 [1.0]	-
ZnPPiX ^c	2.4 ± 0.8	2.6 ± 0.4 [1.1]	-
H ₂ O ₂	190 ± 7	187 ± 6 [1.0]	-
Pentostam (Sb ^V) ^d	73 ± 5	163 ± 12 [2.2]*	94 ± 7 [1.3]

^a*L. major* promastigotes were grown as described in Materials and Methods for 72 h at 28°C in the presence of increasing concentration of drugs. Cell viability was determined by using an MTT-based assay. Data are the means of three independent experiments ± SD.

^bResistance indexes (RI) were calculated by dividing the EC₅₀ obtained for *ABCI3*^{+/-} by that obtained for *L. major* wt. Significant differences were determined by Student's test (**p*<0.001).

^cEC₅₀ for Zn-protoporphyrinIX (ZnPPiX) was determined by measuring total ATP using CellTiter-Glo luminescence assay.

^dMacrophages infected with *L. major* lines were incubated at 37°C for 72h and drug activity was determined by calculating the percentage of infected cells and the number of amastigotes per macrophage in cultures treated with 0, 50, 100 and 200 μM of Pentostam.

- , not determined.

Accumulation and efflux of Sb^{III} in *Leishmania* lines.

A decreased accumulation of Sb^{III} has been previously described in parasites resistant to Sb^{III} (6, 8). The accumulation of Sb^{III} was measured using ICP-MS. Accumulation of Sb^{III} in wt and *ABCI3*^{+/-} parasites was time-dependent. After 60 min incubation with 163 μM potassium antimony tartrate, wt parasites accumulated approximately 2-fold more Sb^{III} than *ABCI3*^{+/-} parasites (Fig. 4A).

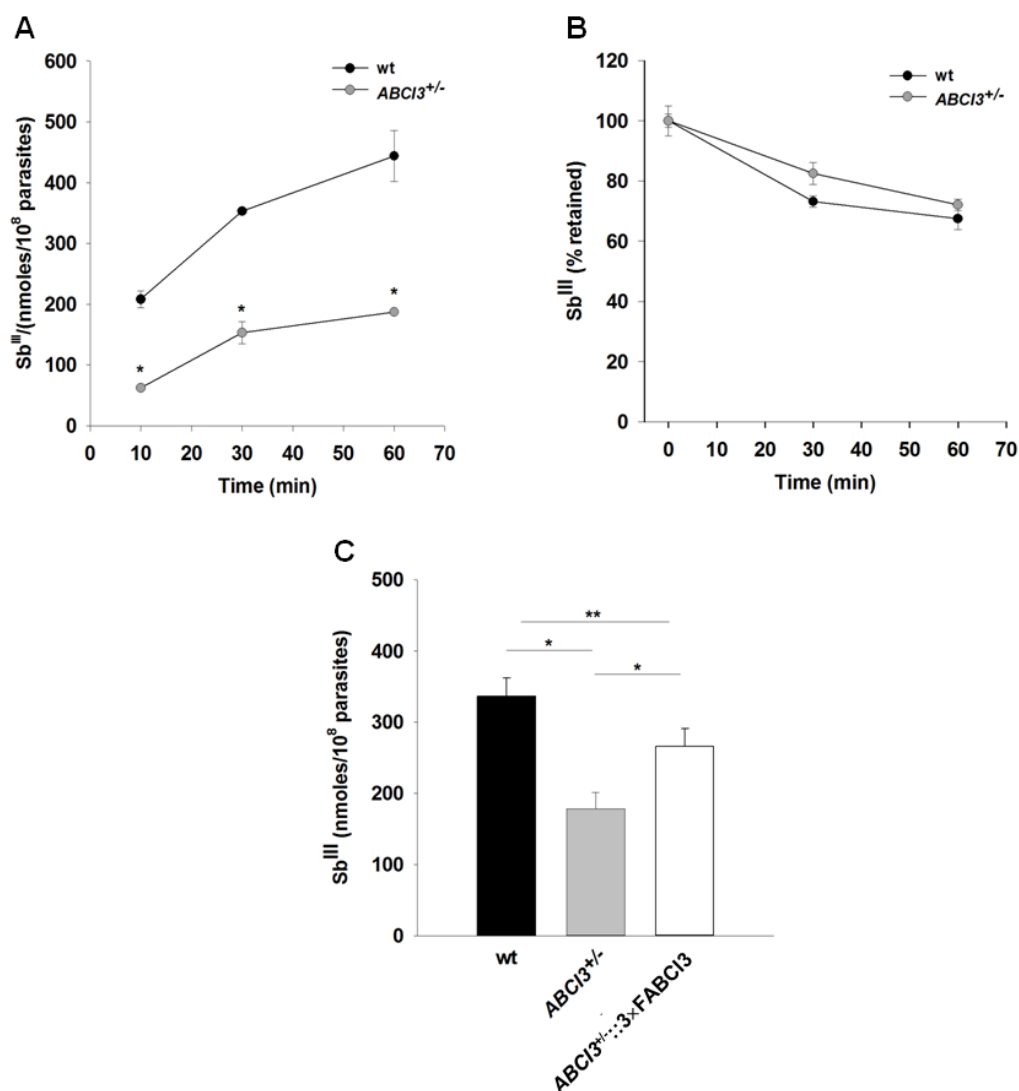


Figure 4. Accumulation and efflux of Sb^{III} in *Leishmania* lines. Antimony accumulation and efflux was measured by ICP-MS. **A**, Time-dependent accumulation of Sb^{III}. *L. major* wt (black) and *ABCI3*^{+/-} (grey) log phase promastigotes were incubated with 163 μ M Sb^{III} for 10, 30 and 60 min at 28 °C. **B**, Efflux of Sb^{III} was measured after wt and *ABCI3*^{+/-} parasites were incubated with 163 and 326 μ M Sb^{III} respectively, for 1 h at 28 °C, to obtain similar initial loads of Sb^{III} in both cell lines. Parasites were then washed three times with PBS and resuspended in M199 medium without hiFBS. Retained Sb^{III} was measured between 0 and 60 min. **C**, Accumulation of Sb^{III} in *L. major* wt (black), *ABCI3*^{+/-} (grey) and *ABCI3*^{+/-}::3x*FABCI3* add-back line (white) parasites. Promastigotes were incubated with 163 μ M for 30 min at 28 °C. Results are the means $\pm$ SD of three independent experiments. Statistical significance versus the control was determined by Student's *t* test (**p*<0.001 and ***p*=0.004).

The decreased Sb^{III} accumulation observed in *ABCI3*^{+/-} parasites could be the result of a decreased uptake or an increased efflux of Sb^{III}. To distinguish between these two possible resistance mechanisms, we compared the efflux of Sb^{III} between wt and *ABCI3*^{+/-} parasites after loading the parasites with Sb^{III} for 60 min with 163 and 326 μ M Sb^{III},

respectively. Efflux was also a time-dependent process but no significant differences were observed between wt and *ABCI3*^{+/-} parasites (Fig. 4B) despite ABCI3 being to some extent localized in the parasite's PM. Thus, the difference in Sb^{III} accumulation between wt and *ABCI3*^{+/-} parasites correlates with the resistant phenotype observed in *ABCI3*^{+/-} parasites. Sb^{III} accumulation was partially restored in *ABCI3*^{+/-}::3xFABCI3 add-back line, in agreement with the reversion of the resistance phenotype observed in these parasites (Fig. 4C).

Our Sb^{III} accumulation results suggest that ABCI3 might be directly involved in Sb^{III} transport inside mitochondria, with the protein located in the outer membrane with its NDBs located on the cytosolic side of the membrane. The observation that ABCI3 is also localized on the parasite's PM might imply that it is indirectly involved in Sb^{III} uptake.

Analysis of mitochondrial function: ATP levels, ROS and $\Delta\psi_m$.

To determine if ABCI3 is essential for normal mitochondrial function in *Leishmania*, we decided to study if *ABCI3*^{+/-} parasites showed any evidence of altered mitochondrial function. Mitochondrial dysfunction is generally associated with an excessive release of ROS, a decrease in $\Delta\psi_m$ and ATP loss (36). We analyzed total ATP levels in *ABCI3*^{+/-} parasites, using CellTiter-Glo luminescent assay. Under normal growth conditions (28 °C in modified RPMI with 10% hiFBS), ATP intracellular basal levels in wt and *ABCI3*^{+/-} parasites were almost identical (data not shown). However, when parasites were exposed to 100 μ M Sb^{III}, wt ATP levels dropped to 20% within the first hour, while ATP levels in *ABCI3*^{+/-} parasites remained above 50% of the initial levels after 4 h of Sb^{III} incubation (Fig. 5A). To confirm for possible mitochondrial functional alterations, log-phase promastigotes were treated with two different fluorescent probes which exhibit membrane potential-dependent accumulation in mitochondria: JC-1 and Rho. No differences in $\Delta\psi_m$ were observed between wt, *ABCI3*^{+/-} and *ABCI3*^{+/-}::3xFABCI3 parasites when using the JC-1 probe (Fig 5B). A strong $\Delta\psi_m$ decrease was observed in all three parasite lines following control treatment with FCCP, a mitochondrial membrane potential uncoupler. On the other hand, a decrease in $\Delta\psi_m$ was observed in

ABCI3^{+/-} parasites when Rho was used (Fig 5C). Although these results might seem contradictory, they can have one possible explanation. It is well established that Rho is a substrate for ABCB1 or P-glycoprotein, and it has been widely used to study this transporter (37, 38). If Rho is also a substrate of ABCI3, then the lower fluorescence observed in *ABCI3*^{+/-} parasites could be explained because less Rho is being accumulated inside the mitochondria of *ABCI3*^{+/-} parasites. The electron transport chain of mitochondria is known to be a site of ROS generation resulting from the occasional escape of transported electrons (39). To evaluate the mitochondrial levels of superoxide radical in wt and *ABCI3*^{+/-} parasites, we used MitoSOX Red fluorogenic dye which is selectively oxidized by superoxide radical. Intracellular ROS-dependent MitoSOX oxidation was monitored by measurement of fluorescence emission using flow cytometry analysis. The superoxide dependent fluorescence intensity was lower in *ABCI3*^{+/-} parasites compared to wt cells, indicating that partial knock-out parasites generate less mitochondrial superoxide under normal culture conditions (Fig. 5D). *ABCI3*^{+/-}::3xFABCI3 parasites showed similar superoxide levels to wt parasites (Fig. 5D). All Ant A treated parasites showed an increase in MitoSOX fluorescence indicating an increase in superoxide production as a result of cytochrome c reductase (complex III) inhibition.

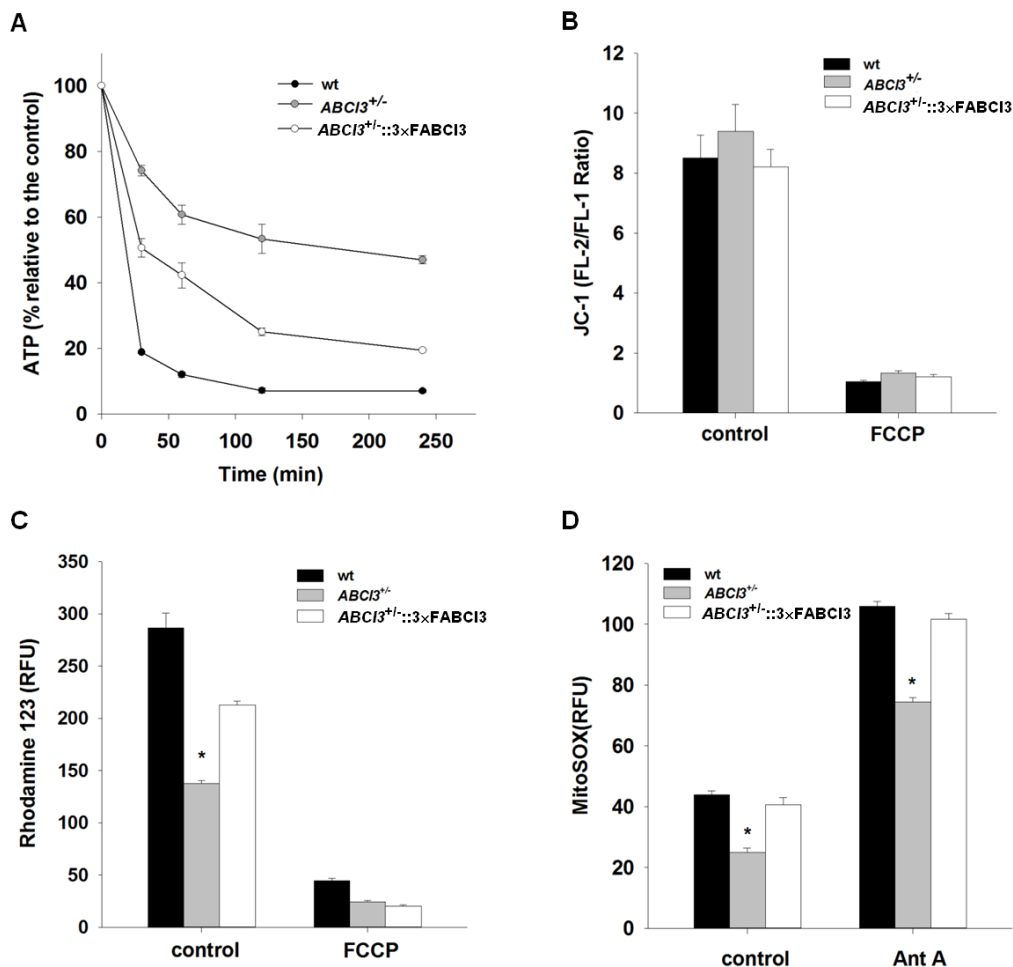


Figure 5. ATP, $\Delta\psi_m$ and ROS levels in *Leishmania* lines. **A**, ATP levels were measured after incubating the parasites with 100 μM Sb^{III} for 30, 60, 120 and 240 min. Aliquots were mixed with an equal volume of CellTiter Glo (Promega) in a 96-well white plate, incubated for 10 min in the dark and luminescence was determined using an Infinite F200 microplate reader. **B**, *L. major* (black), *ABC13*^{+/-} (grey) and *ABC13*^{+/-}::3x*FABC13* add-back line (white) were incubated with 5 μM JC-1 for 10 min at 28 °C to determine their $\Delta\psi_m$. The FL-2/FL-1 ratio was determined by flow cytometry analysis. Depolarization controls were pretreated with 10 μM FCCP. **C**, Parasites were incubated with 1 μM Rhodamine 123 for 10 min at 28 °C, washed with PBS and fluorescence was determined by flow cytometry. Depolarization controls were pretreated with 10 μM FCCP. The data represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments. Statistical significance versus the control was determined by Student's *t* test (**p*<0.001). **D**, Parasites were incubated with 5 μM MitoSOX red in RPMI with 10% hiFBS at 28 °C for 30 min. Antimycin A (Ant A) was used as a positive control for ROS generation. The data represents the mean $\pm$ SD of three independent experiments. Statistical significance versus the control was determined by Student's *t* test (**p*<0.001).

Infectivity and intracellular survival of *Leishmania* lines in mouse peritoneal macrophages.

To compare the ability of wt and *ABCI3*^{+/-} parasites to infect, survive and replicate inside host macrophages, mouse peritoneal macrophages were infected with stationary phase promastigotes from the different *Leishmania* lines. The percentage of infected macrophages and the number of intracellular amastigotes were quantified at 24 and 72 h post-infection. To assess the infectivity of wt, *ABCI3*^{+/-} and add-back *ABCI3*^{+/-}::3xFABCI3 parasites during the early stages of infection, parasites were fixed and counted 24 h post-infection. In this case, we observed that *ABCI3*^{+/-} parasites showed a slightly higher infection capacity (~13%) than wt and add-back *ABCI3*^{+/-}::3xFABCI3 parasites (Fig. 6A); however, the number of intracellular parasites per macrophage was similar for all *Leishmania* lines (Fig. 6B). To determine if the differences observed in infectivity at 24 h post-infection could be related to alterations in the metacyclogenesis of *ABCI3*^{+/-} parasites, a PNA based assay was used, but no significant differences in the number of metacyclics were observed between *Leishmania* lines (data not shown). After 72 h, the percentage of macrophages infected with the different *Leishmania* lines were similar to the results obtained at 24 h post-infection (Fig. 6A). However, the number of *ABCI3*^{+/-} intracellular parasites per macrophage increased significantly (1.5-fold), while the number of wt parasites remained unchanged, indicating that intracellular *ABCI3*^{+/-} parasites are more capable of withstanding the hostile environment inside macrophages and replicate inside these cells. At 72 h post-infection, add-back parasites carrying the episomal copy of *ABCI3* showed an intermediate phenotype (Fig. 6B), in agreement with the results obtained for Sb^{III} resistance and accumulation in promastigotes.

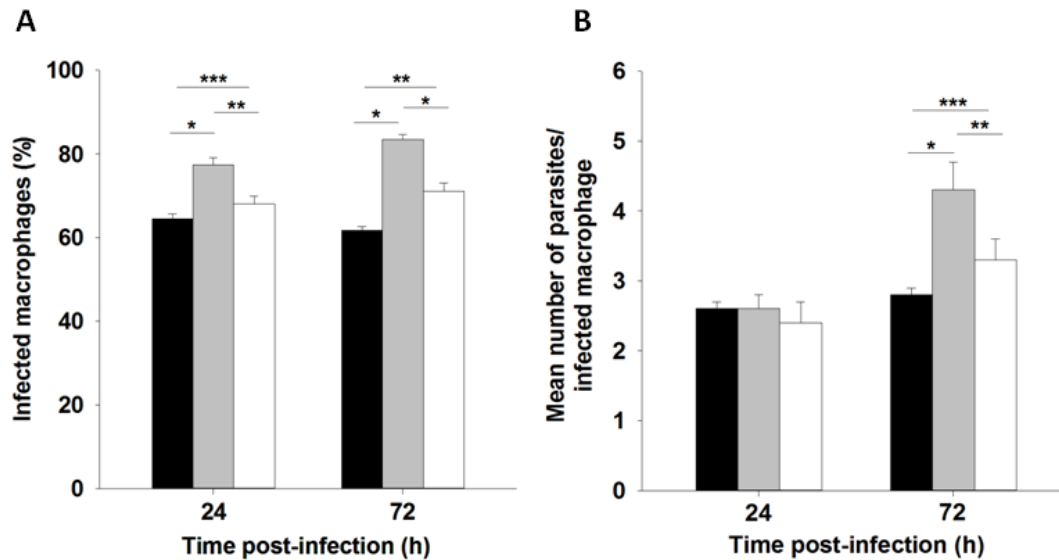


Figure 6. Infectivity and survival of *Leishmania* lines in mouse peritoneal macrophages.

Infections of mouse peritoneal macrophages were carried out as described in Materials and Methods. A 5:1 parasite to macrophage ratio was used and parasites were fixed at 24 or 72 h post-infection and stained with DAPI. **A**, Percentage of infected macrophages using wt (black), *ABCI3*^{+/-} (grey) and *ABCI3*^{+/-}:3xFABCI3 (white) parasites after 24 or 72 h post-infection. Statistical significance versus the control was determined by Student's *t* test (**p*<0.001, ***p*≤0.003 and ****p*=0.044). **B**, Mean number of wt (black), *ABCI3*^{+/-} (grey) and *ABCI3*^{+/-}:3xFABCI3 (white) amastigotes per infected macrophage were determined after 24 and 72 h post-infection. Statistical significance versus the control was determined by Student's *t* test (**p*<0.01, ***p*<0.05 and ****p*=0.03). The data represents the means ± SD of triplicate determinations and are representative of three independent experiments.

DISCUSSION

The *Leishmania* genome is around 32 Mb and displays over 8300 coding genes (40). The superfamily of ABC transporters is one of the largest families of ubiquitous proteins; they represent 0.5 % of the *Leishmania* genome, which is the protozoan parasite with the largest data set. Among many other biological functions, ABC transporters have been shown to be an essential part of cellular defenses against cytotoxic molecules. Genes belonging to ABCB and ABCC families have been shown to be related to drug resistance. ABCI subfamily of transporters

is only found in trypanosomatids, a trait that makes them interesting potential drug targets. This group includes four genes: *ABCI1* (LmjF12.1190), *ABCI2* (LmjF32.2060), *ABCI3* (LmjF33.3040), and *ABCI4* (LmjF33.3260), all of which code for half-transporters. In this work we used partial knock-out parasites to study the biological relevance of ABCI3, particularly its role in drug resistance mechanisms, macrophage infectivity and intracellular survival in *L. major*.

We used several computational prediction methods to obtain a topology model for ABCI3 which helped us characterize this transporter. Unlike the NBDs, the membrane-spanning TMDs vary considerably in primary sequence, length, architecture, and the number of transmembrane helices between different ABC transporters (41). Thus, the TMDs are not well conserved, probably reflecting their role in binding to diverse substrates. Although the models that we have obtained from TopPred and CCTOP differed greatly in some aspects, they also shared some similarities. The predicted number of transmembrane α -helices was close to the expected 6 membrane spanning α -helices found typically in half-transporters, and three of them were the same in both models. The differences observed between different methods could be a consequence of the low aa identity and conserved structural motifs shared with other ABC transporters, as most of these methods rely on evolutionary and homology information, which is lacking for this particular transporter.

Subcellular localization studies showed that *Leishmania* GFP-ABCI3 presents a dual localization in both mitochondria and PM. Digitonin and trypsin assay suggested that the protein might be located in the mitochondrial outer membrane (with the NBD facing the cytosol). Similar studies carried out in *T. brucei* showed mitochondrial outer membrane-specific voltage-dependent anion channel (VDAC) was recovered in the supernatant after treatment with 200 μ M digitonin (28). Moreover, a mitochondrial outer membrane proteome study of *T. brucei* revealed that an ABCI3 orthologue (Tb927.2.5410) is also localized in the mitochondrial outer membrane of *T. brucei* (42). Additionally, biotinylation assays suggested that

part of the protein is localized in the PM, where the transporter could be interacting with other PM transporters involved in antimony uptake, such as aquaglyceroporin (AQP1). Two ABC transporters described by our group, ABCI4 and ABCG2, also showed a dual localization and played a role in Sb^{III} resistance (8, 9). Several other eukaryotic ABC transporters are found in mitochondria and most of them belong to the B subfamily of ABC transporters (43). They have often been linked to oxidative stress and iron metabolism in the cytosol and mitochondria (44-46). Human ABCB6 was initially identified as an inner mitochondrial membrane transporter, with its NBD facing the matrix; however, subsequent studies suggested a dual localization, both in the outer mitochondrial membrane (with the NBD facing the cytosol) as well as in the PM (47). Some controversial studies suggested ABCB6 was involved in porphyrin transport (47, 48) for haem biosynthesis, but these findings could not be reproduced in another study (49); consequently the function of this transporter is still a matter of debate. Also, the exact role of mammalian ABCB10 in haem formation and protection of mitochondria against oxidative stress, including its substrate, remain unclear (50) (51). Recently, LmABCB3, another mitochondrial ABCB transporter was described in *L. major*, and was shown to play an essential role in mitochondrial haem and cytosolic iron sulfur cluster biogenesis (52). Although ABCI3 does not belong to this family of mitochondrial ABC transporters, we decided to study if ABCI3 could be playing a relevant role in porphyrin transport in *L. major*. Toxicity assays using Zn-protoporphyrin (Table 1) and accumulation assays with fluorescent Zn-mesoporphyrin (data not shown) in *ABCI3*^{+/-} parasites showed no differences in susceptibility or accumulation when compared to wt parasites.

Several other ABC transporters in *Leishmania* have been shown to be related to Sb^{III} resistance and have been directly involved in Sb^{III} transport. PgpA from *L. tarentolae*, a member of the ABCC subfamily, was shown to transport metal-thiol conjugates to intracellular vesicles (15). Two other ABC transporters that play an important role in Sb^{III} resistance were described by our group. ABCI4, a potential

thiol-X-pump which is also involved in drug susceptibility towards antimony and arsenite (8). Similar results were obtained with *L. major* parasites overexpressing ABCG2, , which was previously described to be involved in phosphatidylserine externalization required for macrophage infection (53). However, ABCI3 overexpressing parasites did not show a resistance phenotype towards Sb^{III}. ABC transporters are not the only proteins involved in antimony resistance mechanisms and many specific proteins have also been described. AQP1 transporter, a bidirectional membrane water channel involved in osmoregulation and glycerol metabolism, is also responsible for Sb^{III} entry inside the cells (54). Overexpression of trypanothione reductase, ornithine decarboxylase and γ -glutamylcysteine synthetase enzymes from *Leishmania* thiol metabolism pathways, lead to an increase in the intracellular levels of trypanothione, also inducing resistance to Sb^{III} (55) (56). Antimony resistance is multifactorial, with many key proteins which are part of a group of complex interconnected resistance mechanisms (57), which result in a reduction of the intracellular thiol-buffering capacity and alteration of the thiol redox potential (58). Our results suggest a possible role for ABCI3 in Sb^{III} transport inside mitochondria, where it would contribute to enhance the general effects caused by Sb^{III}. This, together with our observation that ABCI3 is partially localized on the PM, were it could interact with other membrane transporters, could explain the lower Sb^{III} accumulation inside *ABCI3*^{+/-} parasites and their higher resistance levels towards Sb^{III}. Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), a member of the MRP subfamily of ABC transporters, functions as a regulator of other membrane transport proteins, among which are several aquaporins (59). CFTR partially localizes and interacts with aquaporin 9 and plays a role in the regulation of this transporter in epithelial cells (60). Further studies will be required to determine if ABCI3 is interacting with AQP1 or other membrane transporters and how these interactions might be altering the uptake of Sb^{III}.

Although the wt phenotype could not be completely restored in *ABCI3*^{+/-} ::3xFABCI3 parasites, these parasites showed a midway phenotype between wt

and *ABCI3*^{+/-} parasites. There are some previous reports of only partial phenotype recovery when attempting to re-express a previously deleted gene in *Leishmania*, but all studies were done with null mutants. When *L. infantum* cystein peptidase gene (*LiCPA*) was re-introduced into the CPA locus of Δ Licpa parasites, the loss of virulence of the null mutant was only partially restored in one of the complemented clones, and did not show any recovery at all when tested in *in vivo* experiments (61).

Whatever the physiological substrate of ABCI3 transporter may be, the mitochondrial function of *ABCI3*^{+/-} parasites does not appear to be compromised, at least in our specific working conditions. Given the lower basal levels of mitochondrial superoxide found in *ABCI3*^{+/-} compared to wt parasites, the lack of one *ABCI3* allele could become an advantage to *ABCI3*^{+/-} parasites. During infection, *Leishmania* parasites are able to survive inside macrophages. It is possible that *ABCI3*^{+/-} parasites are able to cope better with situations of increased stress, such as ROS production during macrophage infection. This could also explain the differences observed in infectivity and why *ABCI3*^{+/-} intracellular parasites are more resistant to Pentostam during macrophage infection.

In conclusion, we have identified and characterized ABCI3, a new mitochondrial ABC transporter from *L. major*. The physiological role of ABCI3 remains to be established. Taken together our results suggest an important role for ABCI3 in antimony resistance. Inactivation or inhibition of this particular transporter does not seem to be a good strategy to use against *Leishmania*, as *ABCI3*^{+/-} parasites were 5-fold more resistant to Sb^{III}. To our knowledge, ABCI3 is the first ABC transporter which is involved in susceptibility towards antimony, conferring Sb^{III} resistance to parasites when partially deleted. Future activities will be directed towards the elucidation of the substrates transported by ABCI3 using Sf9 PMs enriched with ABCI3 (62). We have described a novel and unique trypanosomatid protein, established its relevance and contributed to the understanding of the role it plays in the complex resistance mechanisms towards Sb^{III} found in *Leishmania*.

FUNDING INFORMATION

This work was supported by the Spanish Grants 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 F.G. T. Arcari was supported by a predoctoral grant for PhD training from the Ministerio de Economía y Competitividad (in charge of Project SAF2012-34267).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thanks S.M. Beverley (Washington University, USA) for providing the pXG, pXG-GFP+2', pXG-GFP+ and pIRSAT vectors used throughout this research work, D. Gonzalez-Pacanowska and L.M. Ruiz-Perez (IPBLN-CSIC, Granada, Spain) for the LmHMGS antibody and Ana Maria Tomás (Institute for Molecular and Cell Biology, Porto, Portugal), for the cTXNPx antibody.

REFERENCES

1. WHO. 2017. Leishmaniasis, *on* World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.
2. No JH. 2015. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. *Acta Trop* 155:113-123.
3. Sundar S, Pai K, Kumar R, Pathak-Tripathi K, Gam AA, Ray M, Kenney RT. 2001. Resistance to treatment in Kala-azar: speciation of isolates from northeast India. *Am J Trop Med Hyg* 65:193-6.
4. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 19:111-26.
5. Croft SL, Yardley V. 2002. Chemotherapy of leishmaniasis. *Curr Pharm Des* 8:319-42.
6. 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* 47:3073-9.
7. Dey S, Papadopoulou B, Haimeur A, Roy G, Grondin K, Dou D, Rosen BP, Ouellette M. 1994. High level arsenite resistance in *Leishmania tarentolae* is mediated by an active extrusion system. *Mol Biochem Parasitol* 67:49-57.
8. 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* 57:3719-30.
9. Perea A, Manzano JI, Castanys S, Gamarro F. 2016. The LABC2 Transporter from the Protozoan Parasite *Leishmania* Is Involved in Antimony Resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 60:3489-96.

10. 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.
11. Haider AJ, Briggs D, Self TJ, Chilvers HL, Holliday ND, Kerr ID. 2011. Dimerization of ABCG2 analysed by bimolecular fluorescence complementation. *PLoS One* 6:e25818.
12. Perez-Victoria JM, Parodi-Talice A, Torres C, Gamarro F, Castanys S. 2001. ABC transporters in the protozoan parasite *Leishmania*. *Int Microbiol* 4:159-66.
13. Wong IL, Chow LM. 2006. The role of *Leishmania enriettii* multidrug resistance protein 1 (LeMDR1) in mediating drug resistance is iron-dependent. *Mol Biochem Parasitol* 150:278-87.
14. Haimeur A, Brochu C, Genest P, Papadopoulou B, Ouellette M. 2000. Amplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol* 108:131-5.
15. 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* 276:26301-7.
16. 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* 64:1141-53.
17. Castanys-Munoz E, Perez-Victoria JM, Gamarro F, Castanys S. 2008. Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite *Leishmania* with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3573-9.
18. BoseDasgupta S, Ganguly A, Roy A, Mukherjee T, Majumder HK. 2008. A novel ATP-binding cassette transporter, ABCG6 is involved in chemoresistance of *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol* 158:176-88.
19. Perea A, Manzano JI, Castanys S, Gamarro F. 2016. LABCG2 transporter from the protozoan parasite *Leishmania* is involved in antimony resistance. *Antimicrob Agents Chemother*.
20. 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* 5:1713-25.
21. Kennedy ML, Cortes-Selva F, Perez-Victoria JM, Jimenez IA, Gonzalez AG, Munoz OM, Gamarro F, Castanys S, Ravelo AG. 2001. Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *J Med Chem* 44:4668-76.
22. Manzano JI, Carvalho L, Garcia-Hernandez R, Poveda JA, Ferragut JA, Castanys S, Gamarro F. 2011. Uptake of the antileishmania drug tafenoquine follows a sterol-dependent diffusion process in *Leishmania*. *J Antimicrob Chemother* 66:2562-5.
23. von Heijne G. 1992. Membrane protein structure prediction. Hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol* 225:487-94.
24. Tusnady GE, Simon I. 2001. The HMMTOP transmembrane topology prediction server. *Bioinformatics* 17:849-50.
25. Kall L, Krogh A, Sonnhammer EL. 2004. A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J Mol Biol* 338:1027-36.
26. Jones DT. 2007. Improving the accuracy of transmembrane protein topology prediction using evolutionary information. *Bioinformatics* 23:538-44.

27. Dobson L, Remenyi I, Tusnady GE. 2015. CCTOP: a Consensus Constrained TOPology prediction web server. *Nucleic Acids Res* 43:W408-12.
28. Skodova I, Verner Z, Bringaud F, Fabian P, Lukes J, Horvath A. 2013. Characterization of two mitochondrial flavin adenine dinucleotide-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenases in *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell* 12:1664-73.
29. Yao C, Donelson JE, Wilson ME. 2003. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol* 132:1-16.
30. Mukherjee A, Roy G, Guimond C, Ouellette M. 2009. The gamma-glutamylcysteine synthetase gene of *Leishmania* is essential and involved in response to oxidants. *Mol Microbiol* 74:914-27.
31. Romao S, Castro H, Sousa C, Carvalho S, Tomas AM. 2009. The cytosolic trypanothione synthetase gene of *Leishmania* is essential for parasite survival. *Int J Parasitol* 39:703-11.
32. Coelho AC, Messier N, Ouellette M, Cotrim PC. 2007. Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania* amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 51:3030-2.
33. 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* 93:10383-7.
34. Van Assche T, Deschacht M, da Luz RA, Maes L, Cos P. 2011. *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med* 51:337-51.
35. Ashutosh, Sundar S, Goyal N. 2007. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J Med Microbiol* 56:143-53.
36. Fidalgo LM, Gille L. 2011. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. *Pharm Res* 28:2758-70.
37. Ludescher C, Thaler J, Drach D, Drach J, Spitaler M, Gattringer C, Huber H, Hofmann J. 1992. Detection of activity of P-glycoprotein in human tumour samples using rhodamine 123. *Br J Haematol* 82:161-8.
38. Gueiros-Filho FJ, Viola JP, Gomes FC, Farina M, Lins U, Bertho AL, Wirth DF, Lopes UG. 1995. *Leishmania amazonensis*: multidrug resistance in vinblastine-resistant promastigotes is associated with rhodamine 123 efflux, DNA amplification, and RNA overexpression of a *Leishmania* *mdr1* gene. *Exp Parasitol* 81:480-90.
39. Inoue M, Sato EF, Nishikawa M, Park AM, Kira Y, Imada I, Utsumi K. 2003. Mitochondrial generation of reactive oxygen species and its role in aerobic life. *Curr Med Chem* 10:2495-505.
40. Laffitte MN, Leprohon P, Papadopoulou B, Ouellette M. 2016. Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. *F1000Res* 5:2350.
41. Hollenstein K, Dawson RJ, Locher KP. 2007. Structure and mechanism of ABC transporter proteins. *Curr Opin Struct Biol* 17:412-8.
42. Niemann M, Wiese S, Mani J, Chanfon A, Jackson C, Meisinger C, Warscheid B, Schneider A. 2013. Mitochondrial outer membrane proteome of *Trypanosoma brucei* reveals novel factors required to maintain mitochondrial morphology. *Mol Cell Proteomics* 12:515-28.
43. Schaedler TA, Faust B, Shintre CA, Carpenter EP, Srinivasan V, van Veen HW, Balk J. 2015. Structures and functions of mitochondrial ABC transporters. *Biochem Soc Trans* 43:943-51.
44. Kispal G, Csere P, Guiard B, Lill R. 1997. The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Lett* 418:346-50.

45. Chloupkova M, LeBard LS, Koeller DM. 2003. MDL1 is a high copy suppressor of ATM1: evidence for a role in resistance to oxidative stress. *J Mol Biol* 331:155-65.
46. Liesa M, Luptak I, Qin F, Hyde BB, Sahin E, Siwik DA, Zhu Z, Pimentel DR, Xu XJ, Ruderman NB, Huffman KD, Doctrow SR, Richey L, Colucci WS, Shirihai OS. 2011. Mitochondrial transporter ATP binding cassette mitochondrial erythroid is a novel gene required for cardiac recovery after ischemia/reperfusion. *Circulation* 124:806-13.
47. Paterson JK, Shukla S, Black CM, Tachiwada T, Garfield S, Wincovitch S, Ernst DN, Agadir A, Li X, Ambudkar SV, Szakacs G, Akiyama S, Gottesman MM. 2007. Human ABCB6 localizes to both the outer mitochondrial membrane and the plasma membrane. *Biochemistry* 46:9443-52.
48. Krishnamurthy PC, Du G, Fukuda Y, Sun D, Sampath J, Mercer KE, Wang J, Sosa-Pineda B, Murti KG, Schuetz JD. 2006. Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. *Nature* 443:586-9.
49. Kiss K, Brozik A, Kucsma N, Toth A, Gera M, Berry L, Vallentin A, Vial H, Vidal M, Szakacs G. 2012. Shifting the paradigm: the putative mitochondrial protein ABCB6 resides in the lysosomes of cells and in the plasma membrane of erythrocytes. *PLoS One* 7:e37378.
50. Chen W, Paradkar PN, Li L, Pierce EL, Langer NB, Takahashi-Makise N, Hyde BB, Shirihai OS, Ward DM, Kaplan J, Paw BH. 2009. Abcb10 physically interacts with mitoferrin-1 (Slc25a37) to enhance its stability and function in the erythroid mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:16263-8.
51. Yamamoto M, Arimura H, Fukushima T, Minami K, Nishizawa Y, Tanimoto A, Kanekura T, Nakagawa M, Akiyama S, Furukawa T. 2014. Abcb10 role in heme biosynthesis in vivo: Abcb10 knockout in mice causes anemia with protoporphyrin IX and iron accumulation. *Mol Cell Biol* 34:1077-84.
52. Martinez-Garcia M, Campos-Salinas J, Cabello-Donayre M, Pineda-Molina E, Galvez FJ, Orrego LM, Sanchez-Canete MP, Malagarie-Cazenave S, Koeller DM, Perez-Victoria JM. 2016. LmABCB3, an atypical mitochondrial ABC transporter essential for *Leishmania major* virulence, acts in heme and cytosolic iron/sulfur clusters biogenesis. *Parasit Vectors* 9:7.
53. Campos-Salinas J, Leon-Guerrero D, Gonzalez-Rey E, Delgado M, Castanys S, Perez-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.
54. Marquis N, Gourbal B, Rosen BP, Mukhopadhyay R, Ouellette M. 2005. Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol* 57:1690-9.
55. Grondin K, Haimeur A, Mukhopadhyay R, Rosen BP, Ouellette M. 1997. Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene *gsh1* and of the ABC transporter gene *pgpA* in arsenite-resistant *Leishmania tarentolae*. *EMBO J* 16:3057-65.
56. Haimeur A, Guimond C, Pilote S, Mukhopadhyay R, Rosen BP, Poulin R, Ouellette M. 1999. Elevated levels of polyamines and trypanothione resulting from overexpression of the ornithine decarboxylase gene in arsenite-resistant *Leishmania*. *Mol Microbiol* 34:726-35.
57. Decuypere S, Vanaerschot M, Brunker 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.

58. 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* 279:39925-32.
59. Jesus TT, Bernardino RL, Martins AD, Sa R, Sousa M, Alves MG, Oliveira PF. 2014. Aquaporin-4 as a molecular partner of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in rat Sertoli cells. *Biochem Biophys Res Commun* 446:1017-21.
60. Pietrement C, Da Silva N, Silberstein C, James M, Marsolais M, Van Hoek A, Brown D, Pastor-Soler N, Ameen N, Laprade R, Ramesh V, Breton S. 2008. Role of NHERF1, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, and cAMP in the regulation of aquaporin 9. *J Biol Chem* 283:2986-96.
61. Denise H, Poot J, Jimenez M, Ambit A, Herrmann DC, Vermeulen AN, Coombs GH, Mottram JC. 2006. Studies on the CPA cysteine peptidase in the *Leishmania infantum* genome strain JPCM5. *BMC Mol Biol* 7:42.
62. Sjostedt N, van den Heuvel J, Koenderink JB, Kidron H. 2017. Transmembrane Domain Single-Nucleotide Polymorphisms Impair Expression and Transport Activity of ABC Transporter ABCG2. *Pharm Res* 34:1626-1636.