

**Mecanismo de Acción de las 8-Aminoquinolinas
Sitamaquina y Tafenoquina e Identificación de
Marcadores de Resistencia en *Leishmania*.**



Luis Andrés Carvalho Riverón
Tesis Doctoral
Octubre 2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Luis Andrés Carvalho Riverón
D.L.: GR 1058-2012
ISBN: 978-84-695-1045-2



Instituto de Parasitología y Biomedicina
"López-Neyra"



Universidad de Granada

**Mecanismo de Acción de las 8-Aminoquinolinas
Sitamaquina y Tafenoquina e Identificación de
Marcadores de Resistencia en *Leishmania*.**

Directores de Tesis:

Dr. Francisco Gamarro Conde Dr. Santiago Castanys Cuello

Memoria presentada por el Licenciado **Luis Andrés Carvalho Riverón**
para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

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

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “**Mecanismo de Acción de las 8-Aminoquinolinas Sitamaquina y Tafenoquina e Identificación de Marcadores de Resistencia en *Leishmania***” ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC) de Granada por **Luis Andrés Carvalho Riverón**, Licenciado en Bioquímica por la Universidad de la República (Montevideo-Uruguay), para optar al grado de Doctor por la Universidad de Granada.

Fdo. Dr. Francisco Gamarro Conde

Investigador Científico del CSIC

Fdo. Dr. Santiago Castanys Cuello

Investigador Científico del CSIC

Esta Tesis Doctoral se ha realizado en el Departamento de Bioquímica y Farmacología Molecular del Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra” (CSIC) de Granada, y ha sido financiada con una beca predoctoral de la Agencia Española de Cooperación Internacional (A.E.C.I.) del Ministerio de Asuntos Exteriores y de Cooperación, con una beca de investigación apoyada por GlaxoSmithKline, con financiación concedida por la “Red de Flipasas”, dentro de los proyectos “Marie Curie” de la Unión Europea y con un contrato con cargo a un proyecto intramural del CSIC.

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

López-Martín, C., Pérez-Victoria, J.M., Carvalho, L., Castanys, S., and Gamarro, F. (2008). Sitamaquine sensitivity in *Leishmania* species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 52: 4030-36.

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

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

Carvalho, L., Luque-Ortega, J.R., López-Martín, C., Castanys, S., Rivas, L., and Gamarro, F. (2011). The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 55: 4204-10.

Manzano, J.I., Carvalho, L., García-Hernández, R., Poveda, J.A., Ferragut, J.A., Castanys, S., and Gamarro, F. (2011). Uptake of the antileishmania drug tafenoquine follows a sterol-dependent diffusion process in *Leishmania*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, en prensa.



Agradecimientos

A los Doctores Gamarro y Castanys, Paco y Santiago, por darme la oportunidad de realizar la Tesis Doctoral en su laboratorio. Agradezco haber podido trabajar en un laboratorio donde siempre me he sentido a gusto, en donde se me han brindado muchas oportunidades y donde también han sabido tenerme paciencia. En el laboratorio he trabajado y he aprendido, pero sobre todo, he disfrutado mucho mientras lo hacía.

A mis Padres, porque son los principales artífices de que haya podido llegar hasta aquí. Porque sé que han disfrutado de que pudiera vivir ésta experiencia tanto como han sufrido la distancia que nos separaba. Siempre me han impulsado a realizar mis objetivos y siempre he sentido su cariño como fuerza para afrontar cualquier desafío.

A Pepe Araújo, por ser mi amigo, por brindarme su confianza y afecto, y por haberse preocupado por mí. Ha sido un apoyo fundamental en el transcurso de esta Tesis Doctoral, el hermano mayor con quien siempre pude contar tanto para las alegrías como las tristezas. Agradezco a la familia Araújo-Santos que me hayan tratado como uno más de la familia, y hacerme sentir que en Tarifa tengo una segunda casa.

A los muchos compañeros, que se han ido transformando en amigos, que tuve el gusto y la suerte de conocer en el laboratorio 203-204, la herencia del 307 y todos los que han seguido enriqueciéndolo: Fer, Javi, José María, Cris, Patxi, Esther, Antonio, María, Bego, Susi, Vivi, Ana, Boris, Antonio Luis, Adrien, Betsabe, Margarita, María A., Carmen, Nacho, Raquel, David, Sebastián y Talia. Porque han hecho que venir a trabajar cada día sea un placer. Hemos compartido muchas risas, me han ayudado en el trabajo y me han dado ánimo en los momentos bajos. Agradezco especialmente a Meri Pierce por su alegría y apoyo, y a Nacho y Carmen por su importante aporte a los resultados de esta Tesis Doctoral.

A todos los “amigos del López”, tanto Borbones como Gañanes, con los que he compartido muchos buenos momentos, tanto dentro como fuera del Instituto. Me siento afortunado de haber conocido personas muy especiales que me han dado mucho cariño.

A todo el personal de los diferentes servicios del Instituto por hacernos más cómodo el trabajo diario. Siempre me han auxiliado cuando lo he necesitado y siempre ha sido de muy buena manera. En especial a Vivi y Antonio, que fueron de gran ayuda y apoyo en mis primeros pasos en el Instituto.

A Malón y Adriana, por su ayuda y apoyo desinteresado para que lograra realizar esta Tesis Doctoral. Gracias a la buena estela que han dejado a su paso por el laboratorio, los Uruguayos somos muy bien recibidos.

A la Agencia Española de Cooperación Internacional, porque gracias a su ayuda pude venir a España y comenzar esta Tesis Doctoral.

En definitiva, GRACIAS A TODOS los que han hecho posible que esta experiencia en el “López-Neyra” quede grabada para siempre, no sólo en mi cerebro por lo aprendido, sino principalmente en mi corazón por lo vivido.

MUCHAS GRACIAS !!!!!



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Leishmaniasis	1
El parásito <i>Leishmania</i>	3
Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	4
Biología y bioquímica del parásito	6
Establecimiento de la infección	18
Respuesta inmune del hospedador	21
Manifestaciones clínicas	23
Diagnóstico	24
Control del vector	26
Prevención mediante el desarrollo de vacunas frente a la leishmaniasis	27
Tratamiento	28
Fármacos leishmanicidas	29
Tratamiento combinado de fármacos	35
Resistencia a fármacos en <i>Leishmania</i>	36
8-Aminoquinolinas	39
Generalidades	39
Actividad leishmanicida de las 8-aminoquinolinas	41
Sitamaquina	42

Tafenoquina	45
OBJETIVOS	48
RESULTADOS	49
ARTICULO I: Sitamaquine Sensitivity in <i>Leishmania</i> Species Is Not Mediated by Drug Accumulation in Acidocalcisomes	49
ARTICULO II: Uptake of the Antileishmania Drug Tafenoquine Follows a Sterol-Dependent Diffusion Process in <i>Leishmania</i>	50
ARTICULO III: The 8-aminoquinoline Analogue Sitamaquine Causes Oxidative Stress in <i>Leishmania donovani</i> Promastigotes by Targeting Succinate Dehydrogenase	51
ARTICULO IV: Tafenoquine, an Antiplasmodial 8-Aminoquinoline, Targets <i>Leishmania</i> Respiratory Complex III and Induces Apoptosis	52
ARTICULO V: Increased Glycolytic ATP Synthesis is Associated with Tafenoquine Resistance in <i>Leishmania major</i>	53
DISCUSIÓN	54
Estado actual de la leishmaniasis	54
Las 8-aminoquinolinas como posibles agentes leishmanicidas	55
Mecanismo de entrada de sitamaquina y tafenoquina en <i>Leishmania</i>, y la influencia de los organelos ácidos en la acumulación y sensibilidad al fármaco	56
Efecto de la sitamaquina y tafenoquina en el metabolismo energético de <i>Leishmania</i>	60

Sitamaquina y tafenoquina inducen la muerte de <i>Leishmania</i> por un proceso similar a la apoptosis.....	63
Estudio de la resistencia a sitamaquina y tafenoquina en <i>Leishmania</i>....	65
Perspectivas.....	69
CONCLUSIONES.....	70
BIBLIOGRAFÍA.....	71



Introducción

INTRODUCCIÓN

Leishmaniasis

La leishmaniasis comprende un grupo de enfermedades causada por parásitos protozoos pertenecientes al género *Leishmania*. La leishmaniasis, conocida también como botón de oriente, úlcera de Bagdad, kala-azar, fiebre negra, fiebre dum-dum o espundia, es un serio problema de salud pública en el contexto mundial, siendo considerada como la enfermedad protozoaria más importante después de la malaria. Tradicionalmente la leishmaniasis ha sido separada en dos grupos: leishmaniasis del Viejo Mundo y leishmaniasis del Nuevo Mundo, refiriéndose esta clasificación a la región geográfica donde se adquiere la infección. La leishmaniasis, inicialmente hallada en el sudeste Asiático, este de África y en Brasil, es endémica en 22 países del Nuevo Mundo (América) y en 66 del Viejo Mundo (África, Asia y Europa) (<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>) (Figura 1). El reconocimiento y diagnóstico de la leishmaniasis son de importancia creciente aún en países donde la enfermedad no es endémica debido al creciente traslado de militares y voluntarios a países endémicos. Aproximadamente 350 millones de personas viven o se mueven en zonas de riesgo, su prevalencia excede los 12 millones de casos, presentándose alrededor de 2 millones de nuevos casos al año, de los cuales 0,5 millones corresponden a la forma visceral (LV) y 1,5 millones a la forma cutánea de la enfermedad (LC). La leishmaniasis se asocia a más de 50 mil muertes por año (<http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>).

La propagación y el solapamiento de infecciones con *Leishmania* y VIH descrito en 35 países, hacen de la co-infección *Leishmania*-VIH un serio problema mundial, principalmente en los focos más importantes de leishmaniasis (India, Brasil y el sudeste de África). La LV es una infección oportunista en individuos infectados con VIH. La infección con VIH incrementa el riesgo de desarrollar LV de 100 a 2000 veces en áreas endémicas, reduce la posibilidad de una respuesta terapéutica e incrementa significativamente la posibilidad de recidivas (Alvar *et al.* 2008). Al mismo tiempo, la LV promueve la progresión de la infección con VIH a SIDA. Ambas enfermedades ejercen un efecto sinérgico en detrimento de la respuesta inmune celular, debido a que ambas afectan a células similares del sistema inmune. Tanto macrófagos como células dendríticas pueden ser infectadas por *Leishmania* y VIH.

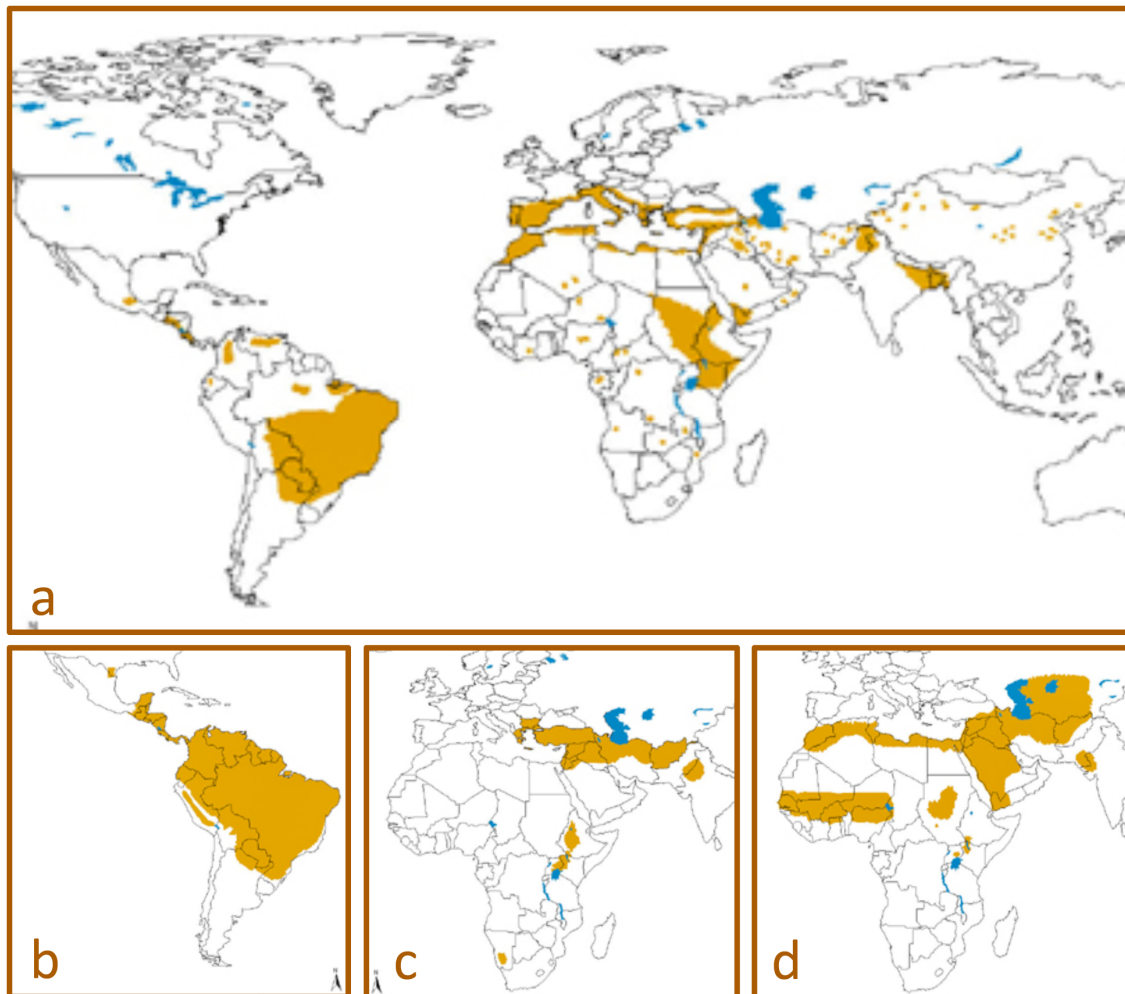


Figura 1. Distribución mundial de algunos tipos de leishmaniasis. Leishmaniasis visceral (a), cutánea y mucocutánea en el Nuevo Mundo (b), leishmaniasis cutánea debida a *Leishmania tropica* y *Leishmania aethiopica* (c) y leishmaniasis cutánea debida a *Leishmania major* (d) (www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html).

El uso de la terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA) ha disminuido de forma pronunciada el número de casos de coinfección en países europeos donde la leishmaniasis es endémica. Sin embargo, el problema se ha expandido en otros importantes focos de leishmaniasis donde hay muy poco acceso a tratamientos como TARGA. Las manifestaciones clínicas de la LV en personas infectadas con VIH no son significativamente diferentes de las que se observan en individuos no infectados con VIH, pero la tasa de mortalidad de los LV-VIH coinfectados es mucho mayor que la de los pacientes con LV VIH-negativos (Alvar *et al.* 2008).



Figura 2. Mosca hembra del genero *Phlebotomus*.

Los parásitos son transmitidos entre hospedadores, con pocas excepciones, por un insecto vector perteneciente al orden Diptera, subfamilia Phlebotominae, conocidos vulgarmente como moscas de la arena (Figura 2). Los vectores de la leishmaniasis son insectos hembra de las especies *Phlebotomus* (Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (Nuevo Mundo). Las excepciones a esta forma de transmisión son casos raros de transmisión venérea, transmisión congénita, infección por transfusión de sangre, o transmisión por agujas entre drogadictos (Killick-Kendrick, 1999). La mayoría de las formas de la enfermedad son transmitidas al hombre desde animales (zoonosis), pero algunas pueden ser transmitidas entre humanos (antroponosis). Por ejemplo, la LV, la forma zoonótica de la enfermedad en la cual el perro es el reservorio principal, está presente en la cuenca mediterránea, China, Medio Oriente y Sudamérica, y es causada principalmente por *Leishmania infantum* o *Leishmania chagasi*. La forma antroponótica (reservorio humano) es causada por *Leishmania donovani* y prevalece en el este de África y en el Subcontinente Indio (van Griensven *et al.* 2010).

La leishmaniasis canina (LCan) debida a la infección con *L. infantum* (= *L. chagasi* en el Nuevo Mundo) es muy importante en veterinaria por tratarse de una zoonosis grave que puede llegar a ser mortal para el perro. El perro se considera el principal reservorio de estos parásitos para el humano, por lo cual, una alta prevalencia de infección canina se asocia a un alto riesgo de la enfermedad en humanos. La LCan tiene una amplia distribución en Europa, Asia, África y América (Alvar *et al.* 2004). Se estima que solamente en el suroeste europeo hay al menos 2,5 millones de perros infectados (Baneth *et al.* 2008).

El parásito *Leishmania*

En 1901, W.B. Leishman identificó ciertos organismos en frotis procedentes de bazo de un paciente muerto por la fiebre dum-dum. En ese momento “Dum-dum”, un pueblo cercano a Calcuta, era considerado particularmente insalubre. La enfermedad se caracterizó por una debilidad general, ataques de fiebre irregulares y repetitivos, anemia severa, atrofia muscular e inflamación excesiva del bazo. Inicialmente estos organismos

fueron considerados como tripanosomas, pero en 1903 el capitán Charles Donovan los describió como nuevos organismos. La relación entre estos organismos y el kala-azar (leishmaniasis visceral) fue descubierta por Major Ross, quien los llamó *L. donovani* (www.who.int/leishmaniasis/history_disease/en).

Leishmania es un parásito protozario patógeno perteneciente a la familia Trypanosomatidae, Orden Kinetoplastida (Figura 3). El género *Leishmania* contiene aproximadamente 30 especies que infectan mamíferos (Shaw, 1994). Las diferentes especies son morfológicamente muy similares, aunque se pueden diferenciar analizando su composición en isoenzimas, mediante análisis de la secuencia de ADN y utilizando anticuerpos monoclonales.

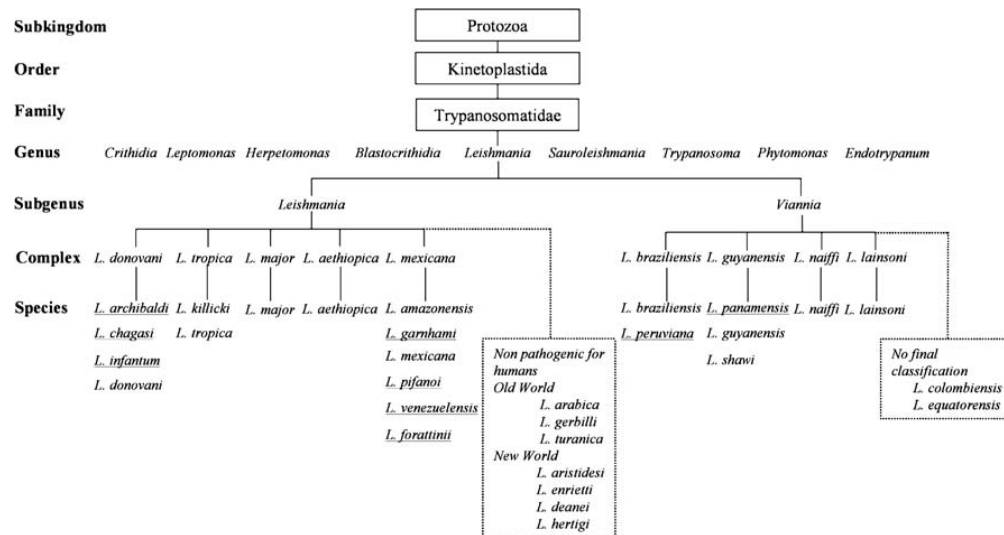


Figura 3. Taxonomía de *Leishmania* (Bañuls et al. 2007).

Ciclo de vida de *Leishmania*

El ciclo de vida de este parásito es digenético, alternando entre dos formas morfológica y bioquímicamente distintas: la forma promastigote (Figura 4a), flagelada y extracelular, que se multiplica y desarrolla en el tracto digestivo del insecto vector de la enfermedad, y la forma amastigote (Figura 4b), no flagelada e intracelular, que se replica en los macrófagos del hospedador vertebrado.

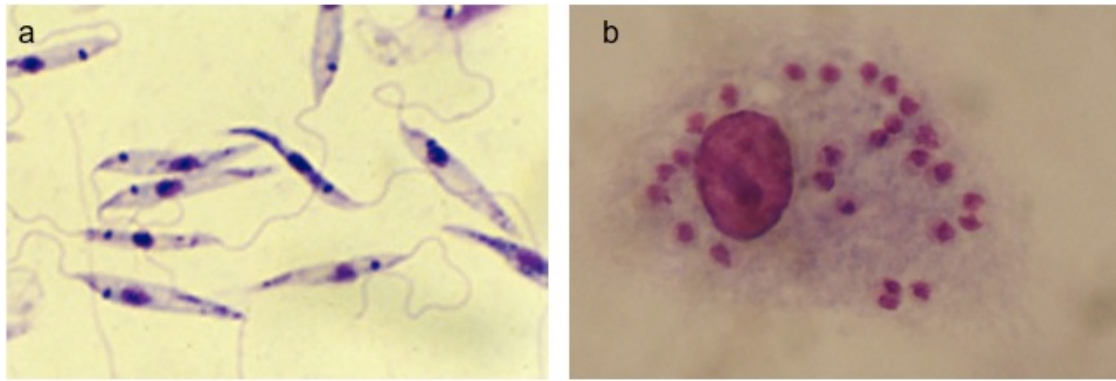


Figura 4. Forma promastigote extracelular (a) y amastigote intracelular (b) de *Leishmania*.

Los promastigotes de *Leishmania* experimentan un proceso de metacicloénesis en el tracto digestivo del insecto vector, transformándose en formas altamente infectivas para el hospedador vertebrado (Muskus y Marín Villa, 2002). Los promastigotes metacíclicos, inoculados por la picadura del insecto vector, son fagocitados por células retículoendoteliales del huésped y se diferencian a amastigotes, los cuales se replican dentro de los macrófagos en fagolisosomas hasta romper la célula, liberándose al torrente sanguíneo para invadir diferentes tejidos donde serán fagocitados nuevamente por los macrófagos. El ciclo se completa cuando el insecto vector ingiere macrófagos infectados, o amastigotes liberados al torrente sanguíneo, al alimentarse de la sangre del hospedador; en el insecto, los amastigotes se transforman en promastigotes que podrán ser inoculados a un nuevo hospedador vertebrado (Figura 5).

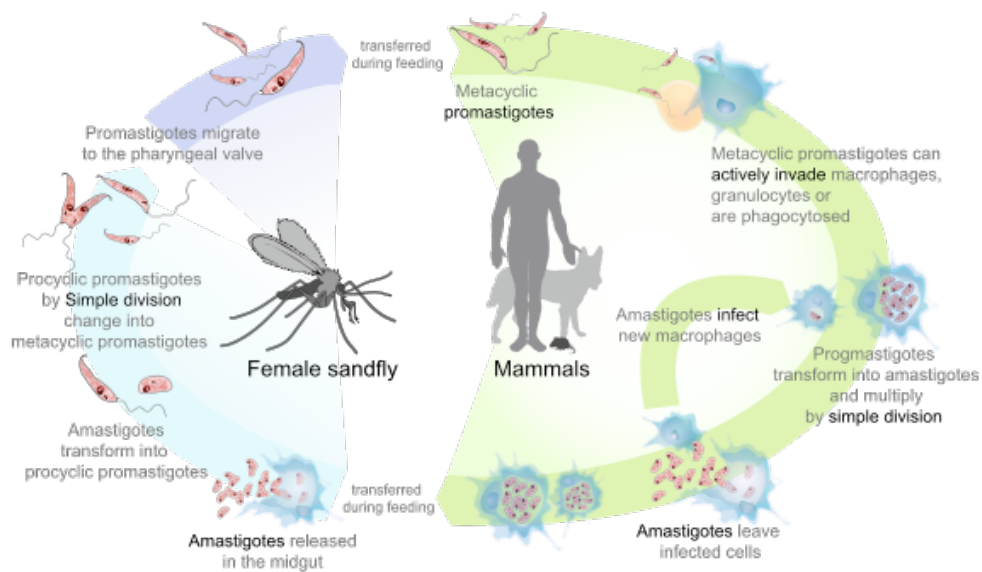


Figura 5. Ciclo de vida de *Leishmania*.
(http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg)

Biología y bioquímica del parásito

El genoma de *Leishmania*. En los últimos años, los genomas de tres especies de *Leishmania* (*L. major*, *L. infantum* y *L. braziliensis*) han sido secuenciados, revelando que contiene unos 8.300 genes que codifican proteínas y 900 genes de ARN (Myler, 2008). El contenido de los genomas se puede encontrar en GeneDB (<http://www.genedb.org/Homepage>); como ejemplo, el genoma de *L. major* MHOM/IL/81/Friedlin (LmjF), tiene un tamaño de 32,8 Mb, con un cariotipo de 36 cromosomas. El resto de especies secuenciadas de *Leishmania* tienen una estructura genómica muy similar, constituida por 35 cromosomas (32 Mb) en *L. braziliensis* y por 36 cromosomas (32 Mb) en *L. infantum* (Peacock *et al.* 2007), con tamaños que oscilan entre 250 kb y 4 Mb. Casi la mitad del genoma (47,9 %) codifica para proteínas. El contenido en GC de las regiones codificantes y no codificantes es de un 62,5 % y un 57,3 %, respectivamente.

Una particularidad de los genomas de los tripanosomátidos es que los genes que codifican proteínas están organizados en largas unidades donde se produce una transcripción policistrónica. La gran mayoría de los genes que codifican proteínas en *Leishmania* carecen de intrones, de hecho hasta ahora sólo dos genes de *L. major* se ha descrito que contienen intrones, uno que codifica una poli(A) polimerasa y el otro una ARN helicasa (Myler, 2008). Se sabe muy poco sobre las secuencias involucradas en la iniciación de la transcripción en *Leishmania*; parecería que la iniciación de la transcripción por la ARN polimerasa II se daría en las regiones entre unidades de transcripción divergentes, o entre policistrones y regiones transcritas por otra ARN polimerasa, aunque esto aún no está claro (Martínez-Calvillo *et al.* 2010). Se ha descrito en *L. major* que se encuentran histonas H3 acetiladas en K9/K14, un conocido marcador para sitios de iniciación de la transcripción en otros eucariotas, en todas estas regiones entre unidades divergentes (Thomas *et al.* 2009).

El proceso de transcripción da lugar a ARN policistrónicos que son procesados mediante corte y empalme en trans, y poliadenilación, lo que resulta en la adición de una secuencia de 39 nucleótidos, llamada mini-exón, en el extremo 5' de cada ARNm y de una cola poliA en el extremo 3' (Perry y Agabian, 1991) (Figura 6); ambos procesos estarían acoplados ya que la selección del sitio de poliadenilación estaría influenciada por la selección del sitio de adición del mini-exón (LeBowitz *et al.* 1993). La expresión

génica está regulada post-transcripcionalmente por secuencias ubicadas en las regiones no traducidas 3', que usualmente controlan la estabilidad del ARNm y su traducción. La regulación post-traduccional se asocia a la expresión de genes específicos para cada estadio del parásito (Papadopoulou *et al.* 2008).

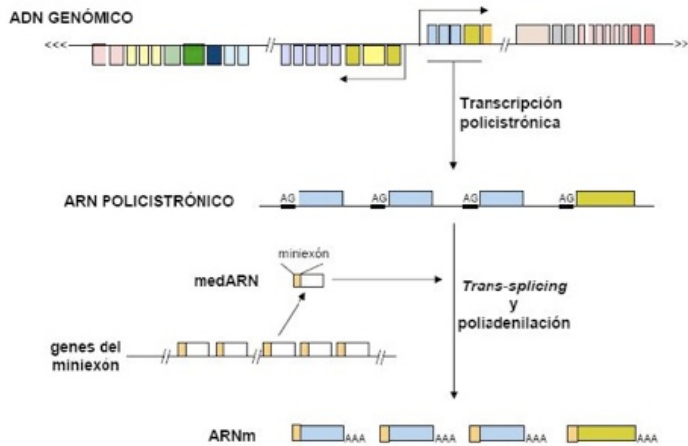


Figura 6. Mecanismo de transcripción en *Leishmania* (esquema de J.M. Requena; <http://www.ricet.es/es/5/grp-grupo-de-biologia-molecular-de-parasitos-tropicales.htm>).

Kinetoplasto. Una característica de los protozoos kinetoplásticos, como *Leishmania*, es que el ADN mitocondrial se ubica en una estructura particular llamada kinetoplasto (Figura 7), que se localiza cerca del cuerpo basal del flagelo. El ADN del kinetoplasto comprende una red de anillos de ADN entrelazados, denominados maxicírculos y minicírculos. Hay varios miles de minicírculos con un tamaño entre 0,5 y 2,5 kb, y unas pocas docenas de maxicírculos, cuyo tamaño varía entre 20 y 40 kb. Los maxicírculos son estructural y funcionalmente análogos al ADN mitocondrial de eucariotas superiores, y codifican para ARNr y subunidades de los complejos de la cadena respiratoria. Los minicírculos codifican para ARN guías que modifican los transcritos de los maxicírculos mediante inserción o delección de uridilato en un proceso conocido como edición del ARN (de Souza *et al.* 2009).

Acidocalcisosmas. *Leishmania* posee unos orgánulos ácidos densos, llamados acidocalcisosmas (Figura 7), que acumulan una gran concentración de fósforo presente como pirofosfato y polifosfato asociado con calcio y otros cationes, y aminoácidos

básicos. Son orgánulos redondeados cuyo tamaño y número es variable de acuerdo a la especie, al estadio del parásito, y al medio de cultivo. A pesar de estas variaciones se ha visto que el volumen celular que ocupa se mantiene aproximadamente en un 2 % (Docampo *et al.* 2005). Los acidocalcisomas se asocian a varias funciones, incluidas almacenamiento de cationes y fósforo, metabolismo del polifosfato, homeostasis de calcio, mantenimiento de la homeostasis del pH intracelular, y a la osmoregulación. Para llevar a cabo varias de sus funciones tienen en su membrana intercambiadores Na^+/H^+ y $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, y dos bombas de protones de tipo vacuolar: una H^+ -ATPasa (V- H^+ -ATPasa) y una H^+ -pirofosfatasa (V- H^+ -PPasa) responsables de la acidificación de los acidocalcisomas. Se ha descrito que los acidocalcisomas pertenecen al grupo de orgánulos relacionados con el lisosoma (LRO) con los que comparte algunas características (Moreno y Docampo, 2009); por ejemplo se ha demostrado que la *proteína adaptadora 3* (AP-3), implicada en el transporte de proteínas de membrana al lisosoma y LROs, tiene una función similar en los acidocalcisomas de *L. major* (Besteiro *et al.* 2008). Estos orgánulos están conservados desde bacterias al hombre, sin embargo se les considera potenciales blancos de acción para la quimioterapia frente a parásitos protozoos dado que los acidocalcisomas de *Leishmania* y otros parásitos protozoos poseen enzimas que no se encuentran en su contraparte en mamíferos, y además su pH ácido hace que puedan acumular fármacos básicos, pudiendo potenciar de esta manera su toxicidad (Docampo y Moreno, 2008).

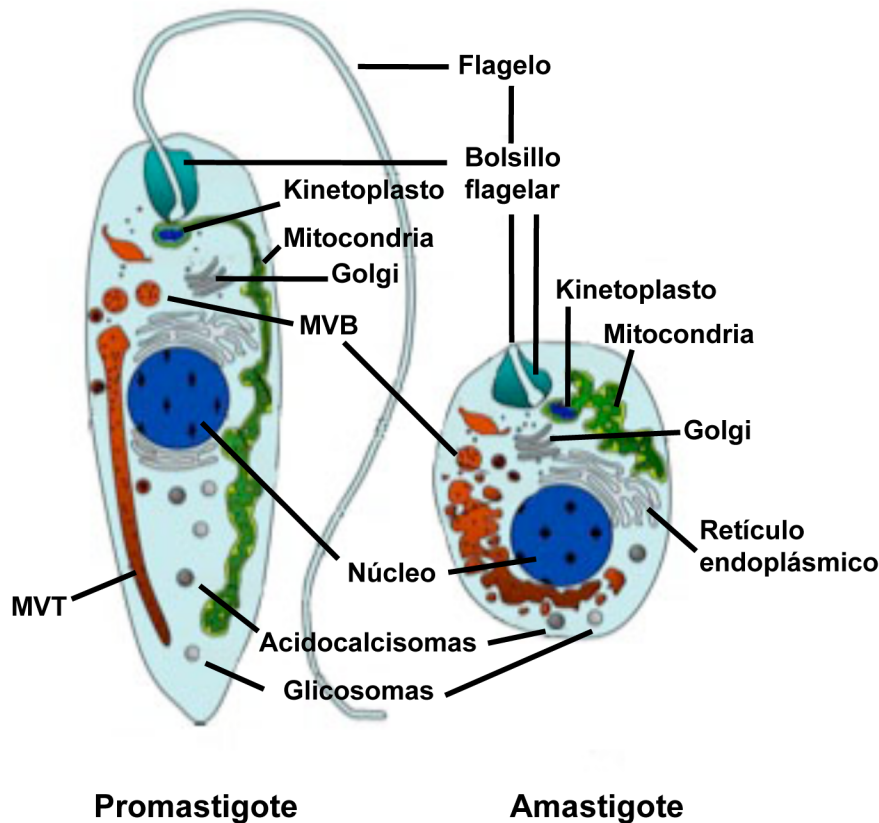


Figura 7. Representación esquemática de los orgánulos de *Leishmania* en las formas promastigote y amastigote. MVB, cuerpo multivesicular; MVT, túbulo multivesicular (Besteiro *et al.* 2007)

Metabolismo de *Leishmania*. Se han identificado en *L. major* unos cuatrocientos genes que codifican para enzimas de las principales vías metabólicas, sin embargo, se desconoce su nivel de actividad a lo largo del ciclo de vida del parásito. Más aún, lo poco que se conoce de los distintos ambientes en donde residen las diferentes formas del parásito, hace que sea muy difícil para los investigadores el poder reproducir esas condiciones experimentalmente. Una variación conocida es el pH, los amastigotes residen en un ambiente ácido mientras el hábitat de los promastigotes se cree que es neutro, aunque el pH interno de ambas formas está cercano a ser neutro. Esta diferencia así como la adquisición de nutrientes, la disponibilidad de oxígeno y dióxido de carbono, etc., hacen que las dos formas del parásito tengan un metabolismo diferente (Oppendoes y Coombs, 2007; McConville *et al.* 2008).

Los estudios sobre el **metabolismo energético** en promastigotes, han mostrado que la glucosa y los aminoácidos (principalmente prolina) pueden ser usados como fuente de energía, y que la generación de energía implicaría a la glicólisis y al metabolismo mitocondrial, el cual incluye una muy activa cadena de transporte de electrones (Figura

8) (Opperdoes y Coombs, 2007). En el caso de los amastigotes, se sabe mucho menos del metabolismo energético, principalmente debido a la menor disponibilidad de formas amastigotes intracelulares. Estudios realizados con amastigotes de *L. mexicana*, demostraron que, en comparación con los promastigotes, los amastigotes tienen incrementada la β -oxidación de los ácidos grasos y tienen una menor necesidad de consumir glucosa (Hart y Coombs, 1982), ya que están expuestos a altos niveles de aminoácidos que pueden usarlos como sustrato para el metabolismo energético mediante el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (McConville *et al.* 2008; Saunders *et al.* 2010).

En los kinetoplastos encontramos unos orgánulos de origen peroxisomal, llamados **glicosomas**, que son el principal lugar donde se lleva a cabo el metabolismo de los carbohidratos, ya que además de muchas de las enzimas de la glucólisis (Opperdoes, 1987), también se encuentran en él, casi todas las enzimas de la vía de las pentosas fosfato (Hannaert *et al.* 2003), al igual que la enzima gluconeogénica, fructosa-1,6-bifosfatasa (Naderer *et al.* 2006). La co-expresión y co-localización de enzimas gluconeogénicas y glucolíticas permite al parásito que se adapte rápidamente a diferentes fuentes de carbono. *Leishmania* utiliza una serie de hexosas y pentosas que se interconvierten con glucosa para su uso en estas vías, también tiene amilasa y sucrasa que le permiten a los promastigotes obtener sustratos digiriendo el almidón y disacáridos tomados por el insecto vector al alimentarse de néctar. Igualmente, se ha descrito que *Leishmania* sintetiza manano (polímero de manosa), como una reserva de energía. Además cuenta con quinasas de azúcares como ribuloquinasa y xiluloquinasa que le facilitan la digestión de una variedad de azúcares (Opperdoes y Coombs, 2007). En los glicosomas se han encontrado también enzimas de la vía de la β -oxidación de los ácidos grasos, de la biosíntesis de ésteres lipídicos, de la biosíntesis de isoprenoides (que da lugar a una gran familia de compuestos, incluidos los esteroides), e involucradas en el metabolismo de las purinas y pirimidinas (Michels *et al.* 2006). Se desconoce aún cómo es el transporte de metabolitos hacia dentro/fuera del glicosoma, no habiéndose localizado transportadores de proteínas en la membrana glicosomal (McConville *et al.* 2008).

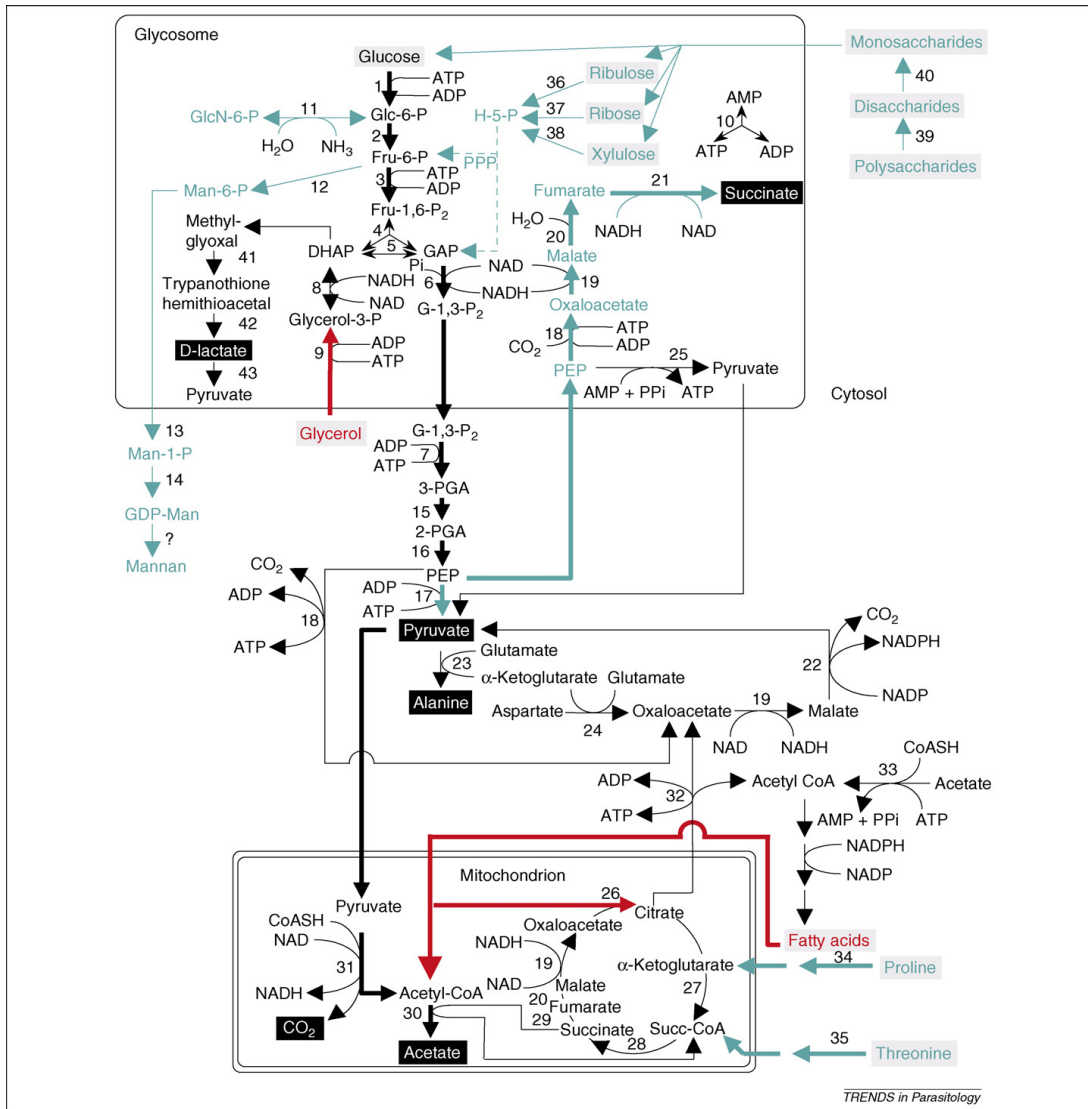


Figura 8. Vías metabólicas en *L. major* (Oppendoes y Coombs, 2007). La figura muestra las reacciones que tienen lugar en el glicosoma, que están involucradas en el metabolismo de los carbohidratos, y en la mitocondria, con su ciclo de los ácidos tricarbóxicos, y el flujo de metabolitos entre estos dos organelos. Los metabolitos resaltados son sustratos (fondo gris) o productos finales (fondo negro) del metabolismo. Las flechas anchas representan los principales flujos de metabolitos. Las vías verdes son consideradas más importantes en la forma promastigote y las rojas son consideradas más importantes en la forma amastigote. Abreviaturas: Fru, fructosa; GAP, gliceraldehido-3-fosfato; Glc, glucosa; H-5-P, hexosa-5-fosfato; Man, manosa; PEP, fosfoenolpiruvato; PGA, fosfoglicerato; PPP, ciclo de las pentosas fosfato. Enzimas: 1, hexoquinasa; 2, fosfoglucosa isomerasa; 3, fosfofructoquinasa; 4, fructosabifosfato aldolasa; 5, triosafosfato isomerasa; 6, gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa; 7, fosfoglicerato quinasa; 8, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; 9, glicerol quinasa; 10, adenilato quinasa; 11, glucosamina-6-fosfato desaminasa; 12, manosa-6-fosfato isomerasa; 13, fosfomanomutasa; 14, GDP-manosa pirofosforilasa; 15, fosfoglicerato mutasa; 16, enolasa; 17, piruvato quinasa; 18, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; 19, malato deshidrogenasa; 20, fumarato hidratasa; 21, fumarato reductasa dependiente de NADH; 22,

enzima málica; 23, alanina aminotransferasa; 24, aspartato aminotransferasa; 25, piruvato fosfato diquinasa; 26, citrato sintasa; 27, 2-cetoglutarato deshidrogenasa; 28, succinil-CoA ligasa; 29, succinato deshidrogenasa; 30, acetato-succinato CoA transferasa; 31, piruvato deshidrogenasa; 32, citrato liasa; 33, acetil-CoA sintetasa; 34, vía de oxidación de prolina; 35, vía de oxidación de treonina; 36, ribuloquinasa; 37, riboquinasa; 38, xiluloquinasa; 39, proteína tipo amilasa; 40, proteína tipo sucrasa.

La **glucólisis** es una vía metabólica presente en todos los eucariotas, pero en los kinetoplástidos tiene la particularidad de que gran parte de ella tiene lugar dentro de los glicosomas; esta compartimentación facilita la regulación de la misma. No se produce una síntesis neta de ATP como resultado de la glucólisis dentro de los glicosomas; el ATP es generado fuera del glicosoma, cuando la piruvato quinasa transfiere el fosfato de alta energía desde el fosfoenolpiruvato al ADP (Parsons, 2004). Cuando hay abundancia de glucosa, los principales productos de la vía glucolítica, fosfoenolpiruvato

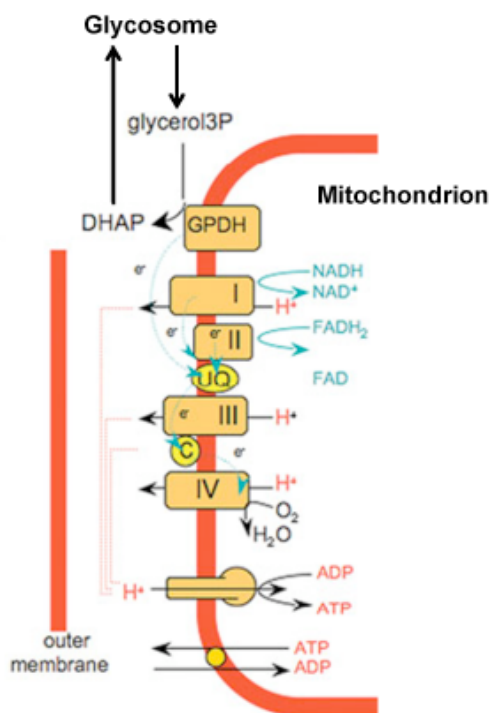


Figura 9. Cadena respiratoria en *Leishmania*. DHAP, dihidroxiacetona fosfato; GPDH, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; UQ, ubiquinona; C, citocromo c (Basado en Saunders *et al.* 2010).

y piruvato, son el primero catabolizado a succinato en el glicosoma, y el segundo transportado a la mitocondria y oxidado a CO₂ y acetato (Figura 8).

Leishmania, al igual que otros tripanosomátidos, contiene una única mitocondria, que se ramifica y ocupa aproximadamente el 12 % del volumen celular (Brun y Krassner, 1976). La mitocondria contiene los componentes de una **cadena respiratoria** funcional, codificados por genes nucleares y mitocondriales procedentes de los maxicírculos. La cadena respiratoria está formada por cuatro complejos enzimáticos que se encuentran en la

membrana interna mitocondrial: NADH deshidrogenasa (complejo I), succinato deshidrogenasa (complejo II), coenzima Q-citocromo c reductasa (complejo III), y citocromo c oxidasa (complejo IV), con la ubiquinona (coenzima Q) y el citocromo c actuando como portadores de electrones entre los complejos. Los complejos I, III y IV

funcionan como bombas de protones generando un gradiente electroquímico de protones que dirige la síntesis de ATP mediante una ATP sintasa mitocondrial (complejo V), que acopla los procesos de respiración y fosforilación (de Souza *et al.* 2009) (Figura 9). La presencia del complejo I en la mitocondria de *Leishmania* es un tema controvertido ya que hay autores que evidencian su presencia en *L. tropica* y *L. mexicana* (Martin y Mukkada, 1979; Bermúdez *et al.* 1997), y otros que sostienen que está ausente de la cadena respiratoria en *L. donovani* (Santhamma y Bhaduri, 1995). Por otro lado, inhibidores de los complejos II, III y IV (por ejemplo: malonato, tenoiltrifluoroacetona, antimicina A y cianuro) son efectivos, aunque a veces producen una inhibición parcial de la respiración, e inducen un estado reversible de arresto metabólico en varias especies de *Leishmania* (Van Hellemond y Tielens, 1997). En la mitocondria de *Leishmania* hay una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) dependiente de FAD^+ (que cataliza la oxidación de glicerol-3-fosfato, proveniente del glicosoma, a dihidroxiacetona fosfato) que contribuye a la reducción de la ubiquinona (Guerra *et al.* 2006) (Figura 9). A su vez se observó que esta GPDH dependiente de FAD^+ contribuye al balance redox del glicosoma, permitiendo de esta manera incrementar la eficiencia de la glucólisis ya que evita la necesidad de una fermentación del succinato glicosomal, y permite la utilización del glicerol como fuente de carbono (Guerra *et al.* 2006).

A diferencia de sus hospedadores, el parásito *Leishmania* carece de la maquinaria metabólica necesaria para la síntesis de **purinas** de novo, por lo que dependen de las purinas sintetizadas por su hospedador, para lo que secreta nucleotidasas y nucleasas para la degradación de los nucleótidos y ácidos nucleicos extracelulares, y cuenta con transportadores en la membrana plasmática que median la entrada de nucleósidos de purinas (y de pirimidina). Esta característica ha hecho que la vía utilizada por el parásito para el rescate de purinas sea investigada como posible blanco de acción de fármacos leishmanicidas. Por el contrario, el parásito es capaz de sintetizar de novo **pirimidinas**, y lo hace por una vía biosintética similar a la del humano (Carter *et al.* 2008). A su vez, *Leishmania* es auxótrofa para varias **vitaminas** y **cofactores**, como por ejemplo: bipterina, folato y grupo hemo, y debe obtenerlos de su hospedador (McConville *et al.* 2008).

Otra particularidad de los tripanosomátidos es que poseen un peculiar **metabolismo redox**, que depende de tioles. En cualquier organismo vivo, la homeostasis redox

celular está afectada por un exceso de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno originadas como subproductos del crecimiento aeróbico y a partir del medio ambiente. En la mayoría de los organismos eucariotas los sistemas glutatión/glutatión reductasa y tioredoxina/tioredoxina reductasa, son los encargados de mantener la homeostasis redox. Sin embargo, en los tripanosomátidos el metabolismo redox se basa en el tripanotión [N¹N⁸-bis(glutationil) espermidine; T(SH)₂], la tripanotión reductasa (TR) que lo mantiene en su forma reducida y el sistema de peroxidasas dependientes de tripanotión. Esta diferencia con mamíferos, hace a los componentes de este metabolismo blancos atractivos para fármacos leishmanicidas. El T(SH)₂ es el principal tiol que dona electrones para la síntesis de precursores de ADN, siendo clave para la detoxificación de hidropéroxidos, y de otros compuestos tóxicos (Krauth-Siegel y Comini, 2008).

Superficie celular. *Leishmania* presenta una **cubierta externa** cuyas principales macromoléculas en la forma promastigote son lipofosfoglicanos (LPG), glicoproteínas y proteofosfoglicanos (PPG), todas ellas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), y una familia de glicolípidos GPI libres, llamados glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) (Naderer *et al.* 2004) (Figura 10). La tasa de biosíntesis de moléculas ancladas a GPI varía marcadamente en los diferentes estadios del desarrollo, siendo mayor y más rápida en promastigotes en división y menor en fase estacionaria y en formas amastigotes. La forma amastigote de *Leishmania* expresa niveles muy bajos, o prácticamente indetectables de LPG y también disminuye la expresión de proteínas ancladas a GPI, como la glicoproteína metaloproteasa de 63 kDa conocida como gp63. En cambio, el nivel de expresión de GPIs libres continua siendo muy alto, de tal forma que son el principal componente de la superficie de la forma amastigote intracelular (McConville *et al.* 2008) (Figura 10).

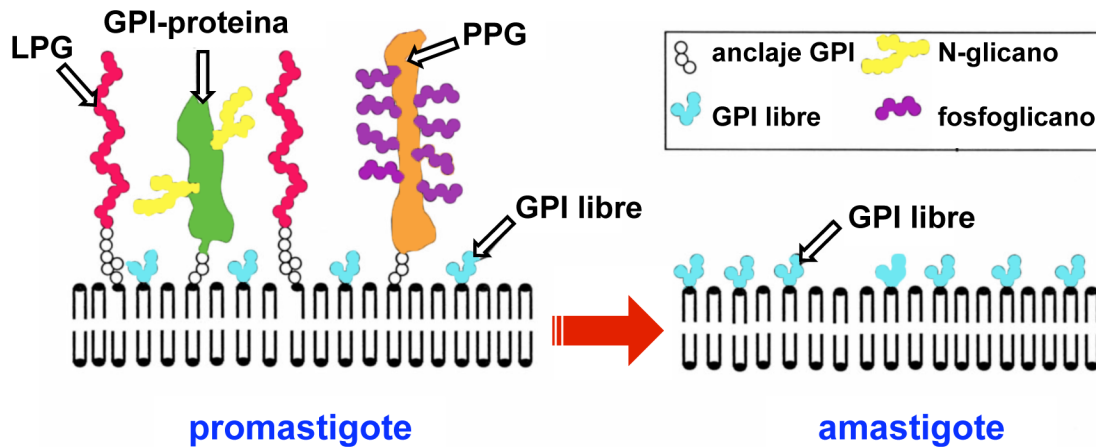


Figura 10. Composición de la cubierta externa en formas promastigote y amastigote de *Leishmania*. LPG, lipofosfoglicano; GPI, glicosilfosfatidilinositol; PPG, proteofosfoglicano (Ilgoutz y McConville, 2001).

Una característica en la composición de las membranas de *Leishmania* es que el principal esteroles tanto en la forma promastigote como en la amastigote es el **ergosterol** (ergosta-5,7,24-trien-3 β -ol), en contraste con lo que sucede en mamíferos donde el principal esteroles es el colesterol (Roberts *et al.* 2003). Otro grupo de esteroides que encontramos en *Leishmania* son del tipo estigmasta, que usualmente representan el 5 % de los esteroides totales en la forma promastigote, pero que en la forma amastigote intracelular pueden alcanzar hasta el 20 %, sugiriendo que pueden beneficiar de alguna manera al parásito cuando se encuentra en el macrófago huésped. También encontramos colesterol (menos del 10 % del total de esteroides), el cual puede derivar tanto del medio de cultivo como del huésped animal. Igualmente, *Leishmania* tiene una ruta de biosíntesis de esteroides similar a la que encontramos en hongos, y su crecimiento es susceptible a inhibidores de la biosíntesis de esteroides, como por ejemplo a inhibidores de la 14- α -desmetilasa y de la esteroles 24-metiltransferasa (Lorente *et al.* 2005). Sin embargo, se ha descrito que *Leishmania* es capaz de sobrevivir con una gran alteración en su perfil de esteroides, y que también tiene la capacidad de utilizar y metabolizar esteroides del huésped (Roberts *et al.* 2003).

En la membrana plasmática de *Leishmania*, al igual que sucede en eucariotas superiores, existen subgrupos específicos de proteínas y glicolípidos que están organizados en microdominios, llamados **balsas lipídicas** (*Lipid rafts*) que son equivalentes a los dominios denominados membranas resistentes a detergente (DRMs). En *Leishmania*, se han definido estas balsas lipídicas como microdominios enriquecidos

en esfingolípidos, esterol (ergosterol) y moléculas ancladas a GPI (Denny *et al.* 2001). Estos microdominios se ha visto que tienen un papel importante en la diferenciación de los promastigotes a su forma infectiva metacíclica, en la resistencia al sistema del complemento del huésped, y en la invasión al macrófago (Denny y Smith, 2004).

Apoptosis en *Leishmania*. Los estudios realizados para evaluar el efecto sobre *Leishmania* de distintos fármacos o diferentes condiciones de estrés (choque térmico, privación de nutrientes, etc.) han permitido observar que el tratamiento daba como resultado la muerte del parásito mediante la producción de unos efectos típicos de la muerte por apoptosis (Shaha, 2006). Tratamientos con fármacos leishmanicidas han dado lugar en el parásito a efectos como despolarización de la membrana mitocondrial, condensación del ADN, externalización de fosfatidilserina, aumento del Ca^{2+} citosólico y de especies reactivas de oxígeno (ROS), fragmentación del ADN, e inducción de actividad tipo caspasas (Shaha, 2006) mediada supuestamente por metacaspasas; no obstante, existe un gran debate sobre si la actividad tipo caspasas realmente influye en la muerte por apoptosis en *Leishmania* o si tienen otra función independiente (Deponte, 2008). Recientemente se ha descrito en *L. major* que cuando los parásitos son expuestos a un choque térmico, H_2O_2 , miltefosina o curcumina, la metacaspasa LmjMCA es procesada y su dominio catalítico liberado; a su vez se observó que la sobreexpresión de la LmjMCA induce la aparición de marcadores fenotípicos de muerte celular por apoptosis y a su vez hace más sensible al parásito a un estrés oxidativo (Zalila *et al.* 2011). Se ha descrito que los cambios a nivel mitocondrial inducidos por diferentes agentes leishmanicidas están estrechamente ligados con la inducción de un proceso de muerte del parásito por apoptosis. La actividad antiparasitaria de muchos fármacos está mediada por la despolarización de la membrana mitocondrial, debido a alteraciones en el funcionamiento de la cadena respiratoria. Igualmente, se ha observado en diferentes vías apoptóticas, que existe una estrecha relación entre la modificación del potencial mitocondrial, el aumento del Ca^{2+} citosólico y la producción de ROS. Posterior a estos eventos, tiene lugar la activación de proteasas y nucleasas (Figura 11) (Smirlis *et al.* 2010).

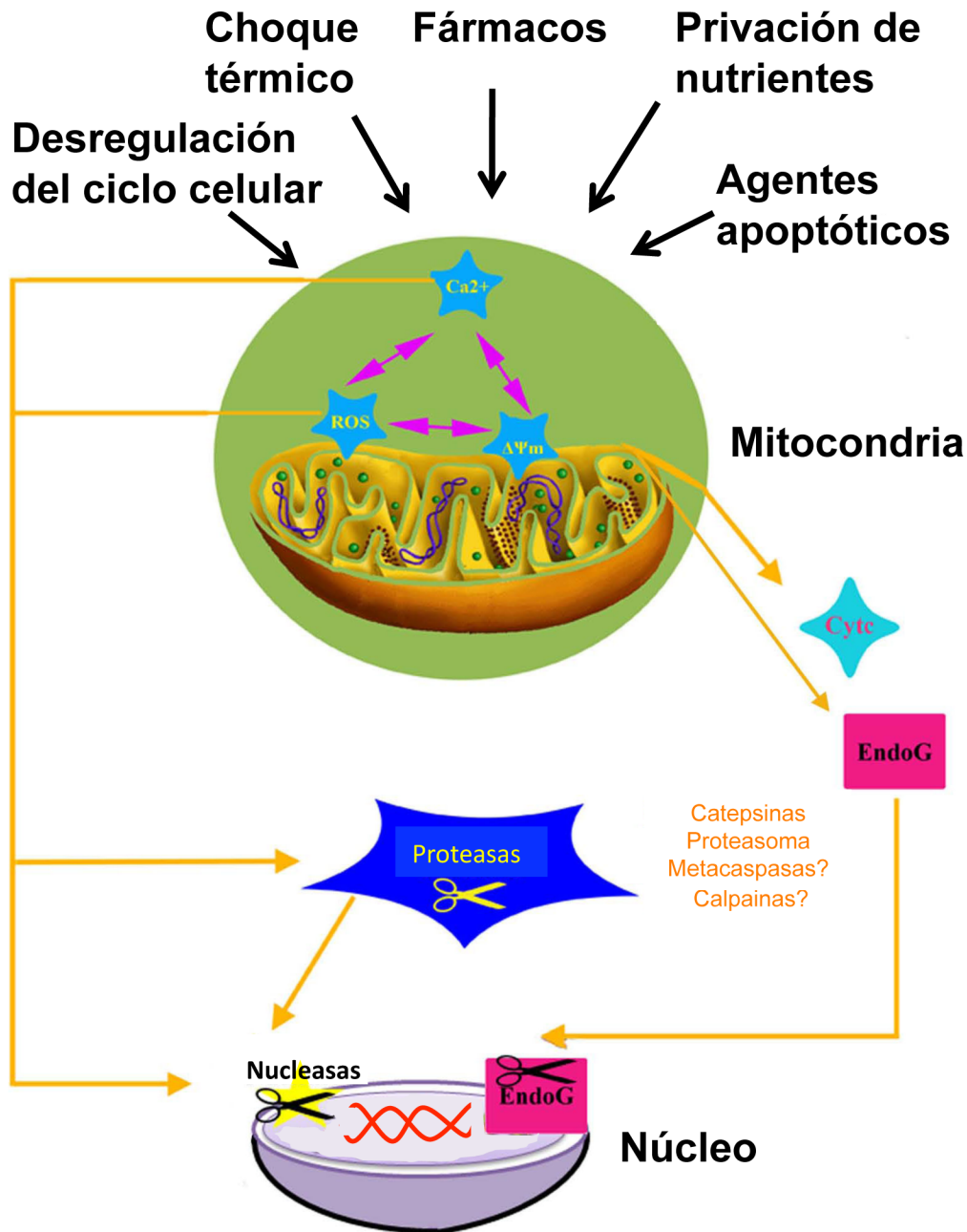


Figura 11: Representación de las principales vías que dan como resultado la muerte por apoptosis en los tripanosomátidos. ROS, especies reactivas de oxígeno; $\Delta\Psi_m$; potencial de la membrana mitocondrial; Cyt c, citocromo c, EndoG, endonucleasa G (Smirlis et al. 2010).

Igualmente, se especula que el proceso de apoptosis en *Leishmania* es importante para el mantenimiento del ciclo de vida del parásito. En el intestino medio del insecto vector, durante la metacicloogénesis, el proceso de apoptosis permite eliminar los parásitos no aptos para la posterior infección, evitando de esta manera el consumo innecesario de nutrientes provenientes del vector y además evitando un crecimiento incontrolado de parásitos y la consecuente muerte del vector (Debrabant y Nakhasi, 2003). Una

característica de la muerte celular programada por apoptosis es la habilidad de las células apoptóticas de ser eficientemente internalizadas por células fagocíticas sin la activación de los procesos de inflamación e inmune del organismo huésped. Los parásitos, mediante un mecanismo llamado mimetización de la apoptosis, se aprovechan de este sistema de eliminación de células apoptóticas como una estrategia para evadir el sistema inflamatorio e inmune del hospedador. La mimetización de la apoptosis por parte del parásito, es el resultado de la exposición de fosfatidilserina en su superficie, sin que la consecuencia necesaria sea la muerte celular (Wanderley y Barcinski, 2010).

Establecimiento de la infección

Para poder infectar al huésped vertebrado, *Leishmania* debe en primer lugar poder sobrevivir dentro del intestino medio del insecto vector. Para esto *Leishmania* cuenta con LPG y gp63 en su superficie, las cuales protegen al parásito de las enzimas hidrolíticas del intestino del insecto. A su vez, los promastigotes procíclicos permanecen adheridos al epitelio del intestino mediante uniones del LPG con lectinas del intestino y así evitan ser excretados; cuando los promastigotes se diferencian a la forma metacíclica, las moléculas de LPG sufren una serie de modificaciones que reducen su afinidad por las lectinas. Esto hace que el promastigote metacíclico se separe del epitelio del intestino medio y pueda migrar a la faringe preparándose para la transmisión al huésped vertebrado (Cunningham, 2002).

Cuando el insecto vector infectado con *Leishmania* pica al huésped vertebrado para alimentarse de sangre, produce una herida donde secretará saliva y regurgitará los parásitos. Los neutrófilos son las primeras células en ser movilizadas y en llegar al sitio del daño tisular y de entrada del parásito. Junto con los macrófagos, estas células fagocitan los parásitos, pero sólo los macrófagos son las células huésped definitivas para *Leishmania*. La mayoría de los microorganismos ingeridos por los neutrófilos son destruidos con facilidad (Nathan, 2006). Sin embargo, algunos patógenos como *Leishmania* pueden sobrevivir transitoriamente dentro de los neutrófilos; para esto el parásito ha desarrollado varios mecanismos de protección que evitan el estallido oxidativo (generación de especies reactivas de oxígeno altamente tóxicas), dan lugar al escape de los compartimentos líticos del neutrófilo, aumentan la vida media del neutrófilo, e interfieren en la vía de señalización mediante interferón- γ (IFN γ). Se ha descrito también que la presencia de parásitos apoptóticos en el inóculo media el

silenciamiento de las células (evita la activación de mecanismos antimicrobianos), dado que inducen por un lado la liberación de citoquinas antiinflamatorias como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) y la interleuquina 10 (IL-10), y por otro la disminución en la expresión de la citoquina proinflamatoria: factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), apoyando de esta manera la supervivencia de la población infectiva (van Zandbergen *et al.* 2006). Cuando los neutrófilos se vuelven apoptóticos, son fagocitados por macrófagos, pasando los parásitos al macrófago donde podrán replicarse; se sugiere que los neutrófilos actuarían como un “Caballo de Troya” que contendría los parásitos intactos (Laskay *et al.* 2008), permitiendo a estos entrar en el macrófago de una forma “silenciosa” (sin ser reconocidos); sin embargo, aún se desconoce cómo es la transferencia de parásitos entre neutrófilos y macrófagos (Charmoy *et al.* 2010) (Figura 12). Una forma que tiene el parásito de persistir en el hospedador vertebrado por un periodo largo de tiempo, es infectar células denominadas blancos seguros (que tienen una reducida actividad antimicrobiana) como son los fibroblastos y hepatocitos (Bogdan, 2008).

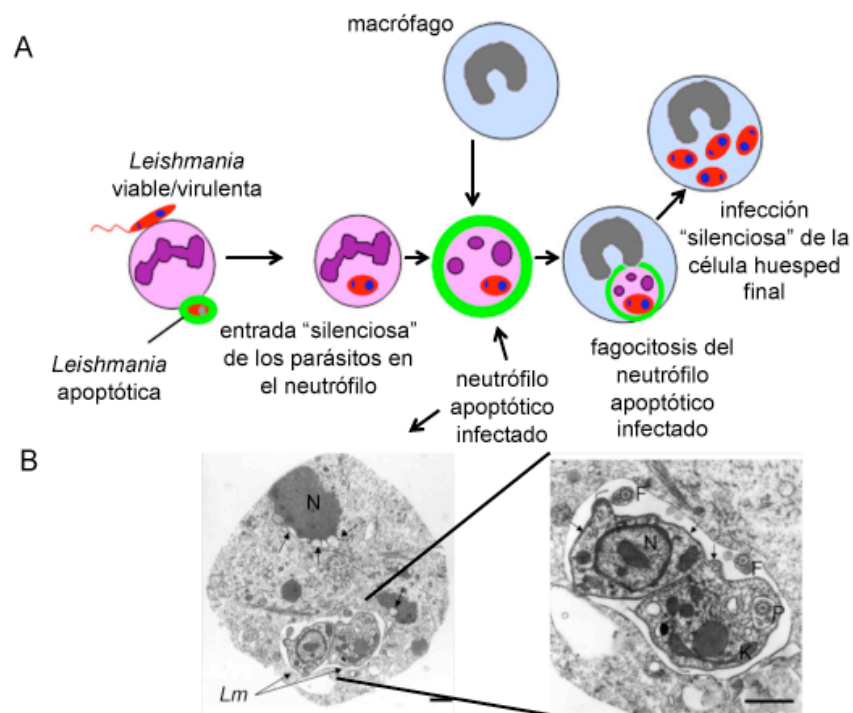


Figura 12. Primeras etapas de la infección con *Leishmania*. A) Los parásitos son fagocitados por neutrófilos y cuando los neutrófilos se vuelven apoptóticos son fagocitados por macrófagos donde los parásitos pueden multiplicarse (Laskay *et al.* 2008). B) Promastigotes viables en la vacuola parasitófora de un neutrófilo apoptótico. Lm, *L. major*; N, núcleo; K, kinetoplasto; F, flagelo; P, bolsillo flagelar (van Zandbergen *et al.* 2004).

Las formas metacíclicas son más resistentes a la lisis por complemento que los promastigotes en fase logarítmica. Esto se debe en parte a que los promastigotes metacíclicos expresan un mayor número de moléculas de LPG y de gp63, que permiten que la proteína C3 del complemento se una a la superficie del parásito y que sea reconocida por receptores del complemento (CR) presentes en los macrófagos. Los parásitos opsonizados entran al macrófago por endocitosis, esto es posible en parte

gracias a la acción de la gp63 que degrada la proteína C3b (forma activa de la proteína C3) del complemento, transformándola en C3bi y previniendo de esta forma la lisis del parásito (Denkers *et al.* 2005). Tras la unión a la superficie del macrófago, los promastigotes son endocitados en un fagosoma conocido como “vacuola parasitófora”, la cual sufre una serie de eventos de fusión hasta transformarse en un fagolisosoma. Las moléculas de LPG protegen al

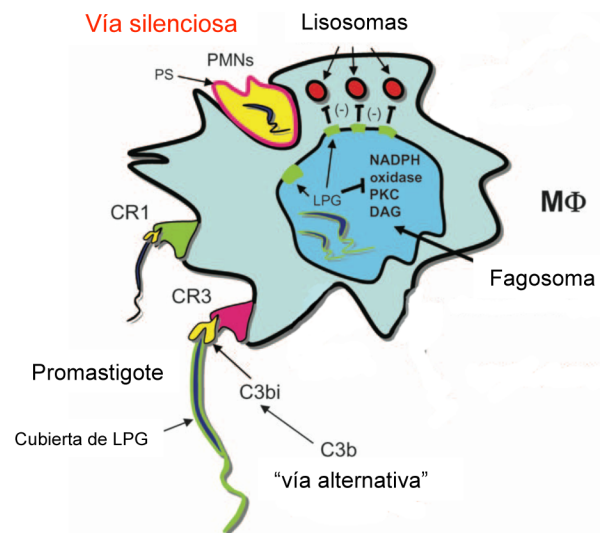


Figura 13. Entrada de *Leishmania* en el macrófago. MΦ, macrófago, PMNs, leucocitos polimorfonucleares; PS, fosfatidilserina; LPG, lipofosfoglicano; PKC, proteína quinasa C; DAG, diacilglicerol (Peters and Sacks, 2006).

promastigote de las condiciones adversas para la supervivencia durante el proceso de maduración de la vacuola parasitófora (Figura 13). La transformación de la forma promastigote a la amastigote y su subsiguiente proliferación ocurre en el ambiente ácido y rico en hidrolasas del fagolisosoma (Cunningham, 2002). Una vez dentro, el parásito usa la maquinaria de la célula huésped para poder sobrevivir y replicarse. Una forma de supervivencia es la distorsión de las vías de señalización del macrófago para reprimir o estimular la expresión de varias citoquinas, moléculas microbicidas y la presentación de antígenos (Bhardwaj *et al.* 2010). Los amastigotes obtienen del fagolisosoma del macrófago la mayoría de los nutrientes y fuentes de carbono que requieren para su metabolismo, en cambio el fagolisosoma de los neutrófilos se cree que contiene bajos niveles de aminoácidos esenciales, pudiendo ser esta la causa que imposibilitaría que el parásito pueda diferenciarse y crecer en ellos (Naderer y McConville, 2008). Diferentes especies de *Leishmania* modulan de diferente manera las vías de señalización y el metabolismo de los macrófagos. Por ejemplo, la activación con bajos niveles de IFN- γ de macrófagos infectados con *L. major* es suficiente para eliminar los amastigotes

intracelulares, mientras que la misma activación con IFN- γ pero en macrófagos infectados con *L. amazonensis* promueve el crecimiento de los amastigotes intracelulares (Qi *et al.* 2004).

Respuesta inmune del hospedador

Después de la infección con *Leishmania*, se inicia un proceso de inflamación local, que involucra una acumulación de leucocitos en el sitio de inoculación de los parásitos. La composición de la población celular reclutada en esta primera etapa de infección es esencial para el pronóstico de la enfermedad. Durante este proceso, miembros de la familia de las quimioquinas tienen un papel fundamental para atraer subgrupos específicos de leucocitos y para su posterior estimulación (Teixeira *et al.* 2006).

Los neutrófilos son las primeras células en ser movilizadas y en llegar al sitio de entrada del parásito, sumado a su función fagocítica los neutrófilos contribuyen al inicio del proceso inflamatorio. Su rápido reclutamiento todavía no está bien definido pero podría involucrar quimioquinas, citoquinas y otras moléculas secretadas por el huésped y/o por el parásito, así como moléculas contenidas en la saliva del insecto vector. A su vez, se ha visto que los neutrófilos que han fagocitado *Leishmania* liberan quimioquinas, por ejemplo, IL-8 en humanos y la quimioquina KC en ratón, que promueven el reclutamiento de más neutrófilos (Charmoy *et al.* 2010). Además de la fagocitosis, los neutrófilos poseen un mecanismo dependiente de oxígeno, el estallido oxidativo, para generar ROS altamente tóxicas para el patógeno (Laskay *et al.* 2008).

Las células dendríticas (DCs) son potentes células presentadoras de antígeno, que tienen un papel importante como puente entre la respuesta inmune innata y la adaptativa mediante la inducción de la activación de las células T. También se ha visto que las DCs son la fuente de diferentes citoquinas como la IL-12, IL-10 e IFN- γ . La incubación de promastigotes de *Leishmania* con DCs produce IL-12, que es la principal citoquina que induce protección frente a *Leishmania*. La IL-12 estimula la diferenciación de los linfocitos T CD4 en células T cooperadoras de tipo 1 (Th1), e induce la producción de IFN- γ por las células T y las células “natural killer” (NK), que a su vez da lugar a la activación de los macrófagos y la muerte del parásito (Cunningham, 2002; Awasthi *et al.* 2004).

Los macrófagos son la segunda oleada de células que llegan al sitio de infección con *Leishmania*. En las primeras etapas de la infección, los macrófagos serían atraídos por componentes de la saliva del insecto vector. En humanos, las quimioquinas CCL2 y la proteína inflamatoria de macrófago 1 α (MIP-1 α) parecen ser las responsables de la activación de los macrófagos en las lesiones de la piel. Los macrófagos tienen varias funciones, sirven como células huésped para la replicación del parásito, así como de células presentadoras de antígeno y como fuente de citoquinas modulando la respuesta inmune mediada por células T (Teixeira *et al.* 2006). Más aún, tras una apropiada activación por Th1, sirven como células efectoras matando al parásito intracelular. La vía común por la cual los macrófagos murinos destruyen al parásito implica la producción de óxido nítrico inducida por IFN- γ mediante la activación de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS).

Las células T ayudadoras juegan un papel fundamental en la respuesta inmune frente a *Leishmania*. En modelos murinos se ha observado que, mientras una respuesta Th1 es clave para dar muerte al parásito y lograr la curación de la lesión, una respuesta Th2 secreta IL-4, IL-5 e IL-10 que limitan la respuesta inmune por Th1 desactivando al macrófago y de esta manera ayudando al crecimiento intracelular del parásito y a la progresión de la enfermedad (Awasthi *et al.* 2004) (Figura 14).

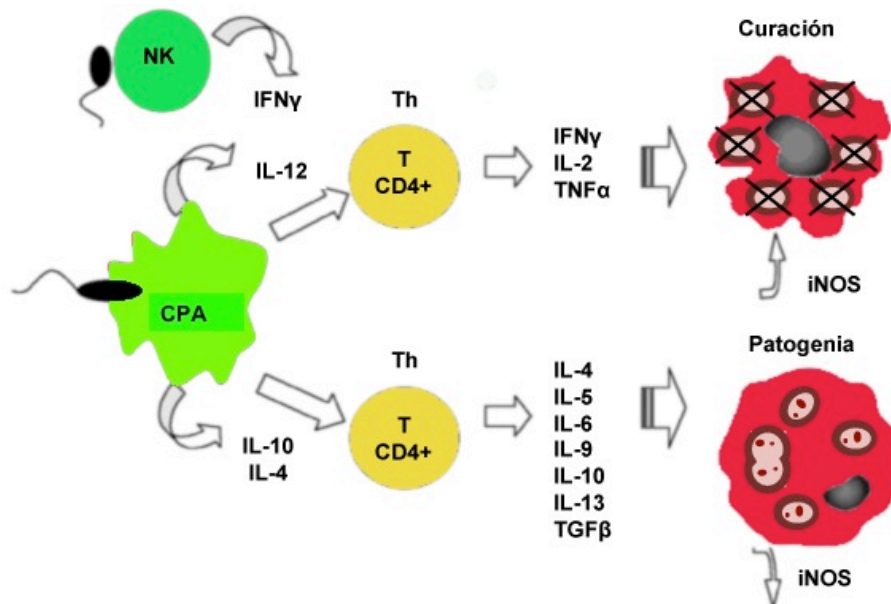


Figura 14. Reacción inmunitaria frente a *Leishmania*. NK, célula “natural killer”; CPA, célula presentadora de antígeno; Th, célula T cooperadora; IL, interleuquina; iNOS, óxido nítrico sintasa inducible (Hernandez-Ruiz y Becker, 2006).

Manifestaciones clínicas

Las distintas manifestaciones clínicas con que se puede presentar la leishmaniasis en humanos dependen de las características genéticas e inmunológicas de la persona infectada, así como de la especie de *Leishmania* que realiza la infección. Cada una de las especies de *Leishmania* presenta diferente tropismo por determinadas partes del organismo infectado. Las diferentes manifestaciones clínicas de la leishmaniasis permiten clasificar esta enfermedad en: Leishmaniasis visceral (LV), Leishmaniasis cutánea (LC) y Leishmaniasis mucocutánea (LMC), las cuales resultan de la replicación del parásito en macrófagos en el sistema fagocito mononuclear, dermis, y mucosa nasoro-faríngea, respectivamente (Herwaldt, 1999). La LV es causada principalmente por *L. donovani* en el este de África y en la India, y por *L. infantum/chagasi* en Europa, norte de África y Latinoamérica. La LC es comúnmente causada por las especies *L. mexicana*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, o *L. panamensis* en Sudamérica, y *L. major* o *L. tropica* en los otros países. La LMC se da en casos de infectados con especies de *Leishmania* del subgénero *Viannia*, localizadas en Sudamérica: (*L. (V) braziliensis*, *L. (V) amazonensis*, *L. (V) panamensis*, y *Leishmania (V) guyanensis* (Chappuis *et al.* 2007; David y Craft, 2009).

LV o “kala-azar”. Es la forma más grave de leishmaniasis, siendo mortal tras unos meses en ausencia de tratamiento. Involucra a todo el sistema retículo-endotelial y se caracteriza por espasmos irregulares y fiebre, pérdida sustancial de peso, hepato y esplenomegalia, y anemia (Figura 15a). Después de una curación aparente pueden aparecer complicaciones cutáneas tardías, las dermatitis post-kala-azar, particularmente frecuentes en la India y en Sudán. La LV es particularmente frecuente en Bangladesh, India, Nepal, Sudan y Brasil, países que representan en conjunto el 90% de la incidencia global. La malnutrición es un factor de riesgo conocido en el desarrollo de esta forma de leishmaniasis, y las epidemias florecen bajo condiciones de hambruna, emergencias complejas y movimientos en masa de la población.

LC. Es la forma más común. La incubación, de duración muy variable, a menudo es de uno a tres meses, tiempo al final del cual generalmente aparece en el sitio de picadura del insecto vector una lesión ulcerosa de 0,5 a 10 cm de diámetro, recubierta de una costra y con un borde saliente morado y escamoso (Figura 15b). El 90% de los casos de

leishmaniasis cutánea se concentran en Afganistán, Pakistán, Argelia, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudita y Siria. A pesar de no representar un riesgo de muerte para el paciente, las epidemias de la forma cutánea son un problema importante en algunos países y son difíciles de controlar. Una variedad de esta forma de leishmaniasis es la **leishmaniasis cutánea difusa**. Es una enfermedad difícil de tratar que se caracteriza por la aparición en todo el cuerpo de nódulos diseminados que se extienden poco a poco hasta llegar a ser confluentes. Se trata de una forma que corresponde a un estado anérgico del paciente, que no produce anticuerpos anti-*Leishmania*.

LMC. También llamada "espundia", es una afección de las selvas tropicales amazónicas. Al principio es exclusivamente cutánea (una o varias lesiones) y parece curar al cabo de algunos meses. Pero en el 20 al 50% de los casos, según los focos, al cabo de un tiempo aparecen lesiones granulomatosas hemorrágicas en la mucosa nasal, luego bucal y rinofaríngea, evolucionando hacia una necrosis extendida y espantosas mutilaciones (Figura 15c).

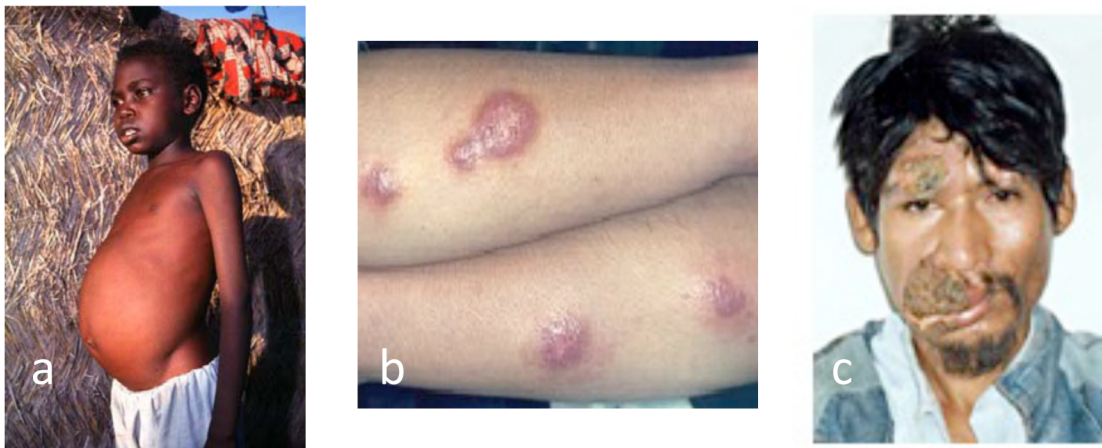


Figura 15. Leishmaniasis visceral (a), cutánea (b) y mucocutánea (c).

Diagnóstico

El método de referencia para el diagnóstico de leishmaniasis es la identificación del parásito, teniendo en consideración que la forma amastigote de *Leishmania* es la única con relevancia clínica. En el caso de lesiones cutáneas o mucocutáneas, sospechosas de leishmaniasis, el primer paso es tratar de determinar la presencia de amastigotes por microscopia, mediante la tinción de Giemsa de un frotis y/o biopsia. Si combinamos la

microscopia con cultivo *in vitro*, por ejemplo en medio NNN (Novy-MacNeal-Nicolle), la sensibilidad del diagnóstico supera el 85%. El cultivo y la identificación de la especie de *Leishmania*, mediante técnicas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y/o el análisis de isoenzimas, pueden aportar datos importantes para el tratamiento y pronóstico de la enfermedad, el problema es que estas técnicas sólo pueden realizarse en centros especializados. Otro método para diagnosticar LC es la prueba de Montenegro que consiste en inyectar al paciente antígenos de *Leishmania*, la reacción se considera positiva con la aparición de un nódulo palpable en 48-72 horas, el problema de esta prueba es que no distingue entre una infección activa y una previa (David y Craft, 2009). En pacientes sospechosos de LV, por ejemplo con una fiebre prolongada y esplenomegalia, el método de referencia para confirmarlo es la identificación de *Leishmania* intracelular mediante microscopía y cultivo a partir de aspirados de bazo, medula ósea, o ganglio linfático, siempre que se cuente con las instalaciones y habilidades técnicas para la obtención y examen de las muestras. La sensibilidad de este diagnóstico varía, siendo más alta para bazo (93-99%), que para médula ósea (53-86%), o ganglio linfático (53-65%). La detección de parásitos en la sangre u órganos mediante cultivo o técnicas como la PCR es más sensible que la observación al microscopio, pero como se dijo antes, estas técnicas tienen limitado su uso a centros de investigación y ciertos hospitales. Debido a las dificultades para realizar los métodos anteriores, en muchas zonas endémicas los métodos serológicos son la forma de diagnóstico más común. Títulos altos de la inmunoglobulina G en el suero del paciente es un hallazgo común en pacientes con LV. La prueba de formol-gelificación (o prueba de Napier) se basa en la detección de un aumento de las γ globulinas, es un método simple y de bajo costo, pero tiene como contra su baja sensibilidad (34%). Varias pruebas detectan anticuerpos específicos frente a *Leishmania* pero tienen dos importantes desventajas, no sirven para detectar recaídas de LV ya que una vez curado el paciente mantiene niveles detectables de anticuerpos por varios años, y tampoco discriminan entre individuos enfermos y sanos con infecciones asintomáticas. Pruebas como la inmunofluorescencia indirecta (IFI), el análisis de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) o Western blot, han mostrado alta sensibilidad y especificidad, pero poca adaptación para su uso en zonas rurales endémicas. Dos pruebas serológicas muy sensibles son las que han sido específicamente desarrolladas para su uso en campo y han sido suficientemente validadas: 1.- la prueba de aglutinación directa (DAT), si hay anticuerpos específicos en el suero o la sangre del paciente, la aglutinación es apreciable a simple vista tras 18

horas de reacción, y 2.- una prueba inmunocromatográfica frente al antígeno rK39, la prueba se lleva a cabo en una tira reactiva, un formato apropiado para el diagnóstico de campo, además es rápida (resultado en 20 min) y barata (Figura 16). En busca de pruebas más específicas, se ha desarrollado una prueba de detección de antígenos del parásito, que consiste en la prueba de aglutinación en látex para detectar el antígeno en la orina (Chappuis *et al.* 2007; Murray *et al.* 2005). Para el diagnóstico de LCan, las formas más utilizadas incluyen estudios serológicos mediante técnicas cuantitativas, y PCR. Niveles altos de anticuerpos se asocian a un parasitismo severo y a enfermedad, pero en la mayoría de los casos se trata de perros con infecciones subclínicas, o perros infectados clínicamente sanos (Solano-Gallego *et al.* 2009).

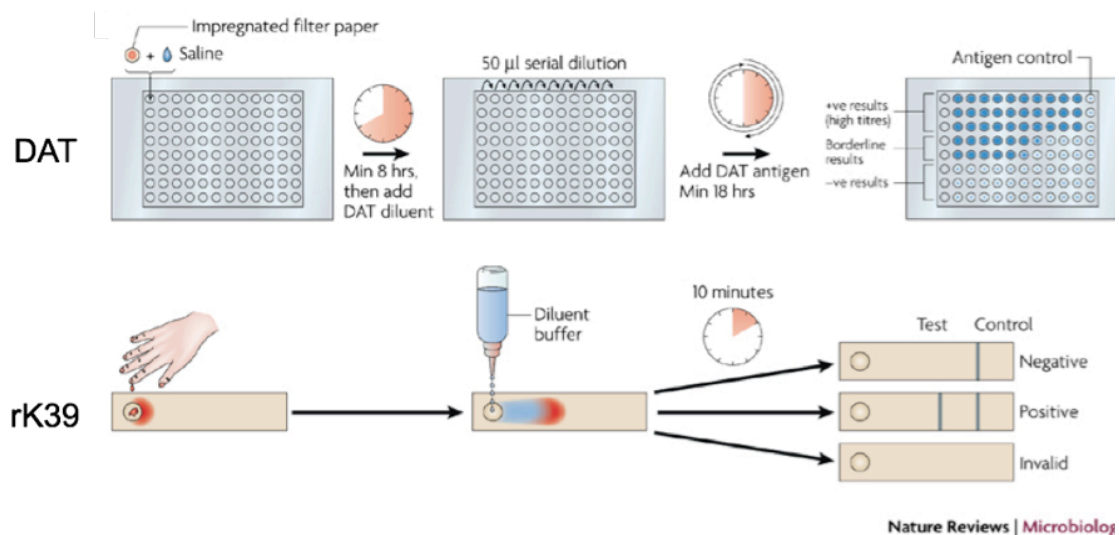


Figura 16. Pruebas serológicas para el diagnóstico de leishmaniasis: la prueba de aglutinación directa DAT y una prueba inmunocromatográfica basada en rK39 en tira reactiva.

Control del vector

El control de la leishmaniasis es muy difícil debido a la diversidad de vectores, parásitos y huéspedes reservorios. Para el control del vector se han desarrollado diversas estrategias. Una vía de control del vector es mediante la completa destrucción de su hábitat para evitar las condiciones apropiadas para el desarrollo de la mosca, como por ejemplo, los programas de deforestación llevados a cabo en Bolivia. En algunos casos, modificaciones del medio ambiente en lugar de su completa destrucción pueden ser efectivas, como por ejemplo, el revoque de paredes con cal o barro. Igualmente, los programas de fumigación de casas con DDT o deltametrina llevados a cabo en países

como Argelia, India o Brasil, han disminuido considerablemente el número de vectores en ambientes peridomésticos. También se han utilizado mosquiteras para camas y cortinas impregnadas con insecticidas con diversa efectividad. Por otro lado, para el control de vectores de leishmaniasis canina, los collares para perros impregnados con deltametrina han demostrado ser efectivos frente a una variedad de especies del insecto vector en diferentes lugares de Europa, Asia y Sudamérica (Killick-Kendrick, 1999; Joshi *et al.* 2009).

Prevención mediante el desarrollo de vacunas frente a la leishmaniasis

El hecho de que en casos de LC las lesiones tienden a curarse solas y la inmunidad que resulta de esta curación natural protege al individuo de una reinfección, son indicadores de que el desarrollo de una vacuna contra la leishmaniasis es posible. Sin embargo, hasta ahora, el progreso en el desarrollo de una vacuna que proteja de las diferentes formas de leishmaniasis en humanos ha sido muy limitado. La “leishmanización”, que simulaba una infección activa mediante la inoculación de parásitos vivos, como vacuna contra la LC, ha sido discontinuada debido a la aparición de lesiones inaceptables. Igualmente, el uso de preparaciones a partir de parásitos muertos, con o sin adyuvantes, no ha demostrado gran eficacia profiláctica (Murray *et al.* 2005; Chappuis *et al.* 2007). Otras aproximaciones se han hecho a partir de proteínas específicas del parásito, ADN, parásitos genéticamente atenuados, componentes de la saliva del insecto vector, etc. Actualmente, los ensayos que se están llevando a cabo para el desarrollo de una vacuna están basados en gran medida en la identificación de antígenos de superficie de *Leishmania*. Sería de esperar que una vacuna contra la leishmaniasis combinara más de un antígeno y que estos estuvieran conservados entre distintas especies de *Leishmania*, y presentes tanto en la forma amastigote como promastigote del parásito (de Oliveira *et al.* 2009). En Brasil se aprobó el uso de dos vacunas frente a LCan debido a que los estudios clínicos de fase I y II mostraron una disminución de la severidad de la enfermedad en los perros. Se están llevando a cabo estudios de fase III para evaluar la efectividad de estas vacunas en la disminución de la transmisión de la enfermedad (http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf).

Tratamiento

El tratamiento frente a la leishmaniasis no es sencillo debido a la complejidad de la enfermedad. Diversos ensayos clínicos realizados han demostrado resultados variables según el estado del paciente, las manifestaciones clínicas, la especie de *Leishmania* a tratar y la localización geográfica. Sumado a esto, el número creciente de casos de coinfección con VIH hace aún más difícil el tratamiento. Se han desarrollado tratamientos diversos basados en quimioterapia, quimioterapia combinada, inmunoterapia e inmunoquimioterapia. En el caso de pacientes con manifestaciones clínicas de LV, donde la muerte puede ser inminente, el llevar a cabo una terapia efectiva en un breve periodo de tiempo es muy importante, así como un control de hemorragias, de infecciones intercurrentes (neumonía, tuberculosis y disentería) y de la malnutrición (Herwaldt, 1999; Chappuis *et al.* 2007). Que no se produzca una recaída de LV en 6 meses es el mejor indicador de curación. Si el estado del paciente es dudoso, se recomienda un nuevo análisis de muestras de tejidos. Sin embargo, la presencia de parásitos residuales no necesariamente debe presagiar un mal resultado, así como la aparente ausencia de los mismos no se opone a la posibilidad de una recaída. En pacientes con manifestaciones clínicas de LC, en los que en un alto porcentaje las lesiones curan solas en 3-18 meses, el tratamiento generalmente es para acelerar la cura, reducir cicatrices, tratar de evitar su diseminación, y disminuir la posibilidad de recaída. La decisión de tratar al paciente y de cómo hacerlo debe tener en cuenta en primera instancia si el paciente está en riesgo de contraer una LMC, ya que ésta podría provocar la muerte del paciente. Otro factor a tener en cuenta es cuán molestas son las lesiones en la piel dada su localización, tamaño, número, persistencia, etc (David y Craft, 2009). Las infecciones bacterianas superficiales de la piel pueden complicar las lesiones ulcerosas debidas a leishmaniasis, por lo que deben ser tratadas con antibióticos. Por otro lado, frente a la LC el tratamiento farmacológico de primera línea más utilizado es una combinación de antimonio de meglumina y alopurinol. Sin embargo, a pesar de que la mayoría de los perros se recuperan clínicamente con esta terapia, generalmente no se logra una completa eliminación del parásito y los perros infectados pueden recaer. Por lo cual, un seguimiento de los perros post-tratamiento es muy importante para evitar la reaparición de la enfermedad. También se utilizan insecticidas tópicos como protección contra la picadura del insecto vector, y recientes estudios han dado indicios

de que la prevención mediante vacunación sería factible en un futuro (Solano-Gallego *et al.* 2009).

Fármacos leishmanicidas

El arsenal terapéutico frente a la leishmaniasis es limitado (Figura 17). Además, los fármacos en uso, en general, tienen ciertas desventajas entre las que se incluyen su toxicidad, eficacia variable, la administración parenteral y la duración del tratamiento (Croft, 2008). Sumado a estos problemas, el alto costo de los compuestos hace en muchos casos que los tratamientos disten mucho de ser aplicables (Santos *et al.* 2008).

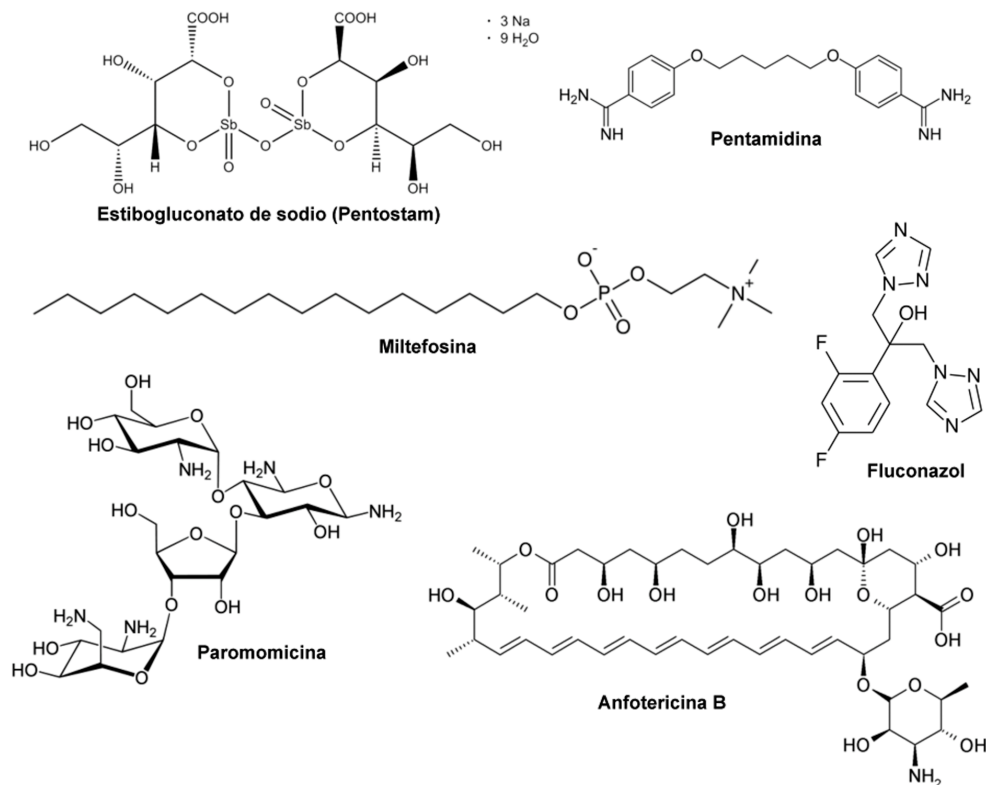


Figura 17. Fármacos leishmanicidas.

Dentro de los compuestos en uso o en ensayos clínicos frente a la leishmaniasis encontramos los siguientes (Tabla 1):

Antimoniales pentavalentes. Por más de 70 años, los antimoniales pentavalentes (estibogluconato de sodio y antimoniato de meglumina) han sido la piedra angular del tratamiento frente a LC y LV. Actualmente siguen siendo los fármacos de elección, excepto en el estado de Bihar, India (donde se encuentra el 90% de los casos de LV de

la India y el 45% a nivel mundial), ya que más del 60% de los pacientes con leishmaniasis presenta resistencia al tratamiento con antimoniales pentavalentes, lo que hace que ya no sean útiles en esta zona endémica. El estibogluconato de sodio es de uso parenteral con una dosis diaria de 20 mg/kg durante 30 días. Los antimoniales son fármacos tóxicos con efectos adversos que incluyen arritmias cardíacas y pancreatitis aguda (Chappuis *et al.* 2007). El requerimiento de inyecciones diarias y la necesidad de un control frecuente debido a la posibilidad de que surjan efectos secundarios, puede suponer un reto en el medio rural y en lugares con pocos recursos económicos. No se sabe muy bien aún su mecanismo de acción, pero hay un consenso de que los antimoniales actuarían sobre varios blancos, influyendo sobre la bioenergética de los parásitos de *Leishmania* mediante la inhibición de la glucólisis, la β -oxidación de los ácidos grasos, y la inhibición de la fosforilación del ADP. También se ha observado que actuarían sobre los tioles, promoviendo su eflujo o bloqueando los grupos SH. Además, inhiben la tripanotión reductasa produciendo una acumulación de las formas oxidadas tanto de tripanotión como de glutatión (Wyllie *et al.* 2004). Estos dos mecanismos actuarían sinérgicamente frente al parásito.

Anfotericina B. La anfotericina B es un antibiótico macrólido poliénico que formulado como desoxicolato es el fármaco que ha sustituido a los antimoniales como tratamiento de primera línea frente a la LV en muchas áreas del estado de Bihar (India). Se administra por infusión intravenosa. En dosis de 0,75-1 mg/kg/día por 15-20 días o en días alternos, se logran curas del 97 % (Sundar y Rai, 2002). Su actividad leishmanicida se basa en su afinidad selectiva por el ergosterol, el principal esteroles en *Leishmania*. Altera la permeabilidad de la membrana formando canales para iones monovalentes produciendo un colapso bioenergético y la lisis celular. Efectos secundarios como fiebre y escalofríos son comunes en la infusiones intravenosas, pero además la administración de anfotericina B puede tener efectos secundarios más graves como miocarditis, hipocalemia severa, neurotoxicidad e incluso la muerte del paciente. Otros inconvenientes de este fármaco son su alto costo y una hospitalización prolongada (Sundar y Chatterjee, 2006; Chappuis *et al.* 2007). Para tratar de suavizar su toxicidad se han testado otras formulaciones de anfotericina B, de ellas la que mejor resultado ha dado es la anfotericina B liposomal.

Anfotericina B liposomal. La formulación de anfotericina B liposomal es considerada actualmente por muchos expertos como el mejor fármaco contra la LV. La anfotericina B liposomal es bien tolerada y muy efectiva, haciendo posible tratamientos con altas dosis por tiempos cortos, pero su alto costo restringe el uso en países en desarrollo. Se administra por infusión intravenosa. Se emplea como tratamiento de primera línea en Europa y Estados Unidos, en la India una dosis total de 10 mg/kg (5 dosis de 2 mg/kg) logra una tasa de cura mayor del 95 % frente a *L. donovani*. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha logrado una disminución de su precio en un 90% para los países donde la LV es endémica (Chappuis *et al.* 2007), pero aún así sigue siendo un fármaco caro. Dentro de las marcas de anfotericina B liposomal que encontramos en el mercado la que ha resultado ser más eficaz y con menos efectos tóxicos es el AmBisome (Gilead Sciences Inc., San Dimas, California-EEUU).

Miltefosina. Es un alquil-fosfolípido (hexadecilfosfocolina) inicialmente desarrollado como un fármaco anticancerígeno. Es un fármaco de administración oral, efectivo para tratar LV (registrado en la India en 2002) y LC (Berman, 2008). En la India se da durante 28 días en dosis diarias de 50 mg/kg si el peso corporal es menor de 25 kg o 100 mg/kg si es mayor o igual a 25 kg. Se ha descrito que inhibe la citocromo c oxidasa (Luque-Ortega y Rivas, 2007) y es posible que actúe sobre diferentes dianas. Tiene una vida media larga y la resistencia al fármaco por parte del parásito es fácil de inducir experimentalmente. Por lo tanto, para evitar la generación de resistencias debe asegurarse una continuidad en el tratamiento y la administración de miltefosina debe llevarse a cabo bajo observación directa. Otra desventaja es que la miltefosina es teratogénica, por lo que no debe ser usada en mujeres embarazadas ni en las que podrían quedar embarazadas durante el tratamiento y en los dos meses siguientes. Igualmente, como efecto adverso se ha observado toxicidad gastrointestinal (Sundar y Chatterjee, 2006; Chappuis *et al.* 2007).

Paromomicina. La paromomicina es un antibiótico aminoglicósido que posee actividad antibacteriana y antiprotozoaria. El fármaco es efectivo frente a LV por vía parenteral

(registrado en la India en 2006) y frente a LC tanto en administración tópica como parenteral. Es un fármaco seguro y muy barato, pero para el tratamiento de la LV requiere de inyecciones intramusculares durante 21 días (16-20 mg/kg/día) (Sundar y Chatterjee, 2006; Chappuis *et al.* 2007). Se ha observado que la aplicación tópica de paromomicina es insuficiente para el tratamiento de cualquier forma de LC, sin embargo, la administración parenteral es tan efectiva como los antimoniales (David y Craft, 2009). El mecanismo de acción de la paromomicina en *Leishmania* sería similar al descrito en bacterias. El antibiótico se une al sitio A del ribosoma provocando errores en el proceso de traducción (Fernández *et al.* 2011).

Pentamidina. Es una diamidina aromática, usada generalmente como fármaco de segunda línea, principalmente en casos que no respondieron al tratamiento con antimoniales. Frente a LC es administrada de forma intramuscular o intravenosa con una dosis de 4 mg/kg/día por 3-4 días o por 7 días cuando es usado como fármaco de primera línea (David y Craft, 2009). Su mecanismo de acción leishmanicida no está bien definido pero probablemente incluye la inhibición de la biosíntesis de poliaminas, interferencia en la síntesis de ADN y en el potencial de la membrana mitocondrial (Croft *et al.* 2006). Debido a su toxicidad (puede producir diabetes mellitus dependiente de insulina y posteriormente la muerte del paciente) y a su baja eficacia, se ha abandonado su uso frente a LV en la India (Sundar y Chatterjee, 2006).

Azoles. Los azoles como por ejemplo: ketoconazol, fluconazol e itraconazol, son antifúngicos que esencialmente inhiben la biosíntesis de esteroides. Bloquean específicamente la síntesis de ergosterol, el principal esteroide en *Leishmania*, mediante la inhibición de la C14 α -desmetilasa. Estudios *in vitro* han demostrado actividad leishmanicida, aunque hay controversia con respecto a la sensibilidad hacia los azoles por parte de distintas especies de *Leishmania* (Croft *et al.* 2006).

Sitamaquina. Es una 8-aminoquinolina eficaz por vía oral para tratar la LV. Ensayos clínicos fase I y II han mostrado resultados con distintos niveles de éxito dependiendo de las especies de *Leishmania* y de la zona donde fueron realizados. Se han detectados

efectos secundarios adversos como nefropatía y metahemoglobinemia (Sundar y Chatterjee, 2006). En un ensayo clínico fase IIb llevado a cabo en India, la sitamaquina mostró ser eficaz y mejor tolerada que el desoxicolato de anfotericina B (GlaxoSmithKline website: <http://www.gsk.com/responsibility/access/medicines-for-developing-world.htm>). Actualmente, la empresa GlaxoSmithKline está intentando solventar los problemas de toxicidad de la sitamaquina antes de continuar con los estudios clínicos.

Alopurinol. Es un análogo estructural de la hipoxantina, que inhibe las enzimas que llevan a cabo la interconversión de las purinas en *Leishmania*. Afecta la biosíntesis de ARN y por ende de las proteínas del parásito (Singh y Sivakumar 2004; Croft *et al.* 2006). A pesar de no ser efectivo como monoterapia para el tratamiento de la leishmaniasis en humanos, se usa frente a la LCan y es más eficaz en combinación con antimoniales. Se ha observado en estudios farmacológicos que los niveles del fármaco en plasma humano son bajos comparados con los alcanzados en plasma de perro, (Croft *et al.* 2006).

Imiquimod. Es un análogo nucleosídico antiviral que actúa estimulando una respuesta inmune local en el sitio de aplicación. Induce la producción de citoquinas y de óxido nítrico en los macrófagos. Ha demostrado tener efecto en infecciones experimentales de LC, y en combinación con los antimoniales ha sido usado con éxito para tratar pacientes con lesiones cutáneas que no respondieron a la monoterapia con antimoniales (Croft *et al.* 2006).

	Fármacos	Comentarios
Leishmaniasis visceral		
Fármacos en primera línea	Estibogluconato de sodio (Pentostam y SSG) Antimoniato de meglumina (Glucantime)	El estibogluconato de sodio genérico (SSG) de Albert David (India) ha abaratado el tratamiento. A su vez, Sanofi-Aventis ha reducido el precio de Glucantime
	Anfotericina B (Fungizone)	
	Anfotericina B Liposomal (Ambisome)	Esta ha probado ser la formulación lipídica más efectiva y menos tóxica frente a LV.
	Miltefosine	Registrado en la India y disponible en el mercado. Precio más barato disponible por intermedio de la OMS.
	Paromomicina	
En ensayos clínicos	Sitamaquina	Ensayos en fase 2 finalizados en India
	Otras formulaciones de anfotericina B	En investigaciones pre-clínicas para el desarrollo de formulaciones más baratas
Leishmaniasis cutánea		
Fármacos en primera línea	Estibogluconato de sodio (Pentostam y SSG) Antimoniato de meglumina (Glucantime)	
	Anfotericina B (Fungizone)	Para manifestaciones complejas como la leishmaniasis mucosal
	Pentamidina	Para formas específicas en Sud America
	Paromomicina (formulación tópica)	
En ensayos clínicos	Paromomicina (formulaciones tópicas, fase 2 y fase 3)	Formulaciones del WRAIR (Washington) y del FioCruz (Belo Horizonte).
	Miltefosina (oral, fase 3)	La sensibilidad varía entre especies. Registrada en Colombia
	Imiquimod (inmunomodulador tópico, fase 2)	Como terapia adjunta a los antimoniales. Se ha descrito que no es efectiva en Iran

Tabla 1. Resumen de la situación actual de algunos de los fármacos para el tratamiento de leishmaniasis (Croft, 2008).

Otros fármacos candidatos para tratar la leishmaniasis.

Además de los fármacos descritos, se están llevando a cabo estudios dirigidos a la búsqueda de nuevos fármacos leishmanicidas más potentes y menos tóxicos. Una de las estrategias de búsqueda de nuevos fármacos leishmanicidas es el ensayo de fármacos comúnmente usados frente a otras patologías, de sustancias aisladas de microorganismos y plantas, y otras utilizadas en la medicina popular (Santos et al. 2008). Entre los compuestos candidatos seleccionados hay chalconas, flavonoides, alquilfosfocolinas, bifosfonatos, sesquiterpenos, quinolinas, formulaciones orales de anfotericina B, buparvaquona, y compuestos que interfieren con el metabolismo del esterol (Polonio and Efferth 2008, Richard and Werbovetz 2010). Para identificar los compuestos más prometedores, las moléculas candidatas deben ser comparadas con uno o más fármacos leishmanicidas conocidos como fármacos de referencia (por ejemplo anfotericina B), en estudios experimentales empleando modelos *in vivo* (por ejemplo: ratones BALB/c o hamster); posteriormente, sobre los compuestos más activos *in vivo* se realizarán estudios de farmacocinética, metabolismo y toxicidad. Sin embargo, todos

estos estudios son caros y la inversión requerida para llevar a cabo experimentos con fármacos candidatos para el tratamiento de la leishmaniasis representa un gran reto (Richard and Werbovetz 2010).

Tratamiento combinado de fármacos

El uso de terapias combinadas, utilizando fármacos de distinta estructura química y con diferentes blancos de acción, constituye actualmente la estrategia más recomendada por los organismos internacionales, encabezados por la OMS, para abordar el difícil reto de conseguir mejores tratamiento para la leishmaniasis, dado que permitirá una mayor eficacia terapéutica así como una reducción en la toxicidad y periodo de tratamiento, una disminución de las probabilidades de adquisición de resistencias, y quizás una reducción en los costes (van Griensven *et al.* 2010). En relación a la posibilidad de prevenir la aparición de resistencias, ambos fármacos idealmente deberían tener farmacocinéticas similares. Si el parásito siempre tiene que hacer frente a ambos fármacos sería de esperar que la probabilidad de que emerjan parásitos doble-resistentes sea muy baja. No obstante, hay que tener en consideración que el desarrollo de una terapia combinada tiene que tener en cuenta los sistemas de salud de las regiones endémicas, a los efectos de no aumentar la complejidad en términos de logística, formas de administración y monitoreo del tratamiento.

Sin embargo, considerando la gran plasticidad cromosómica de *Leishmania* y su capacidad de desarrollar resistencias, no puede descartarse que el parásito desarrolle en un futuro resistencias a las combinaciones de fármacos.

Se han realizados varios estudios con terapias combinadas que han demostrado ser eficaces con resultados prometedores, por ejemplo, la combinación de bajas dosis de pentamidina con alopurinol frente a LV fue más efectiva que la pentamidina sola; la paromomicina más cloruro de metilbencetonio en forma de ungüento es más efectiva frente a LC que muchas monoterapias (Singh y Sivakumar, 2004); la asociación de estibogluconato de sodio y paromomicina para tratar la LV es segura y efectiva en ensayos llevados a cabo en India y en el este de África y ha sido utilizada exitosamente por Médicos sin Fronteras en pacientes sudaneses, mostrando menor mortandad y menores complicaciones durante el tratamiento en comparación con una monoterapia

con estibogluconato de sodio (Chappuis *et al.* 2007; van Griensven *et al.* 2010). Otras combinaciones de fármacos como anfotericina B liposomal y miltefosina o paromomicina, o miltefosina y paromomicina, ensayadas en India para tratar la LV, son más eficaces que el tratamiento estándar con anfotericina B y con menos efectos adversos (Sundar *et al.* 2011); además, se ha demostrado en modelos experimentales murinos que existe un sinergismo entre miltefosina y anfotericina B y también con paromomicina frente a LV (Seifert y Croft, 2006). A su vez el empleo de anfotericina B liposomal más miltefosina o estibogluconato de sodio en una población VIH-negativa está siendo estudiado en el este de África (van Griensven *et al.* 2010).

A pesar de que la idea de una terapia combinada es en general aceptada, las bases para la elección de los fármacos en esos regímenes combinados está todavía en discusión por parte de la OMS y otros organismos internacionales (DNDi). Hacen falta varios años para tener disponibles suficientes datos experimentales y clínicos para poder seleccionar una combinación de fármacos eficaz para ser empleada frente a cada una de las especies de *Leishmania*.

Resistencia a fármacos en *Leishmania*

El reducido arsenal de fármacos frente a la leishmaniasis se enfrenta con la frecuente aparición de resistencia, lo que dificulta el control de la enfermedad. Muchas veces una inadecuada administración (dosis o tiempo de tratamiento) del fármaco da lugar a una tolerancia progresiva al mismo por parte del parásito. Esta resistencia puede deberse a múltiples mecanismos, como por ejemplo: alteración de los niveles intracelulares del fármaco, inactivación por metabolismo o secuestro del fármaco, variación de los niveles del blanco de acción, sobreexpresión de los mecanismos de reparación del parásito, etc. (Figura 18). El conocimiento sobre los mecanismos de resistencia puede mejorar el uso de los fármacos, lo cual podría minimizar el desarrollo de resistencias y lograr tratamientos más efectivos (Croft *et al.* 2006).

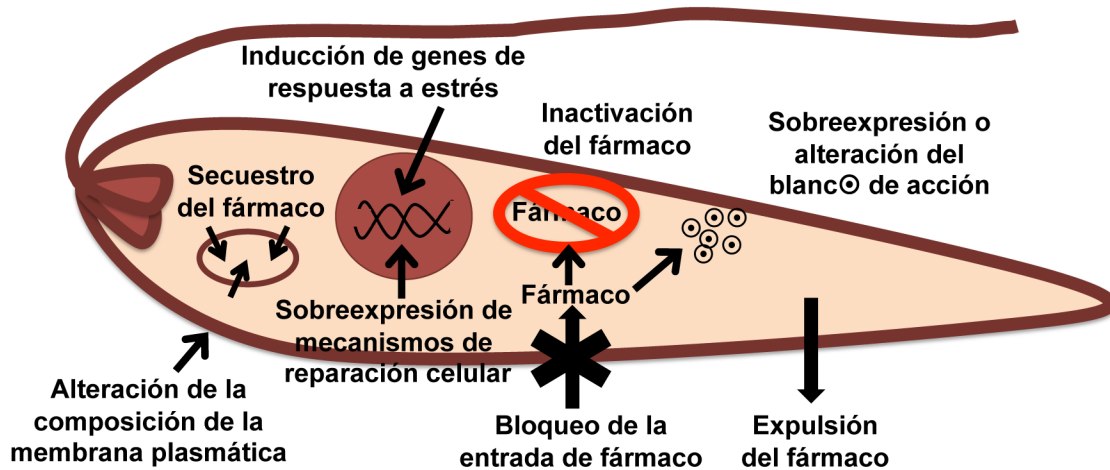


Figura 18. Algunos de los posibles mecanismos de resistencia a fármacos en protozoos parásitos.

Se han descrito diferentes mecanismos de resistencia frente a los fármacos usados en clínica para el tratamiento de la leishmaniasis:

Los **antimoniales pentavalentes** (SbV) tienen que ser convertidos a trivalentes (SbIII) para ser activos, esto puede darse tanto en el macrófago como en el parásito. Se ha visto que los tioles cisteína, cisteinil-glicina y tripanotión pueden reducir SbV a SbIII (Ferreira *et al.* 2003), también se ha sugerido que la reductasa dependiente de tioles, denominada TDR1, y la arsenato reductasa (ACR2) podrían participar en este proceso de reducción (Denton *et al.* 2004; Zhou *et al.* 2004). Una reducción o pérdida de la activación del fármaco puede ser un mecanismo mediante el cual el parásito adquiere resistencia. También se ha observado en *Leishmania* resistente al fármaco una menor acumulación del mismo, esto puede deberse a una disminución en la entrada del fármaco al parásito o a un aumento en su eflujo. Se ha descrito que el SbIII entra en *Leishmania* por una acuagliceroporina llamada AQP1; habiéndose demostrado que aislados resistentes a Pentostam transfectados con AQP1, recuperan la sensibilidad al fármaco (Gourbal *et al.* 2004). Un transportador de la familia ABCC (MRPA) parece estar involucrado en la resistencia a antimoniales, reconoce SbIII conjugado a tioles como glutatión y tripanotión, y confiere resistencia mediante el secuestro del conjugado tiol-metal en una vacuola (Ouellette *et al.* 2004). A su vez, se ha observado un aumento en los tioles totales (cisteína, glutatión y tripanotión) en cepas de *Leishmania* resistentes a antimoniales y arsenicales, esto sugiere que una reducción en el nivel de tioles de la célula podría reducir el nivel de resistencia. Esta hipótesis está fundamentada ya que la

resistencia a SbV observada en aislados clínicos de *L. donovani* fue revertida en modelos animales mediante tratamiento con inhibidores de la biosíntesis de glutatión (Carter *et al.* 2003). Además, en macrófagos infectados con *L. donovani* se ha observado un aumento en la expresión de glicoproteína-P (P-gp, MDR1) y de la proteína relacionada con resistencia a múltiples fármacos MRP1, dando como resultado que no se acumulen antimoniales en la célula huésped (Mookerjee *et al.* 2008). También se ha observado un aumento de la actividad antioxidante en aislados clínicos de *Leishmania* resistentes a antimoniales, asociada a la sobreexpresión de triparedoxina y de triparedoxina peroxidasa (Wyllie *et al.* 2010).

La **pentamidina** se acumula en la mitocondria mientras que en mutantes resistentes a pentamidina *in vitro*, el fármaco no se acumula en la mitocondria y la fracción citosólica de la pentamidina es eliminada del parásito (Basselin *et al.* 2002). En formas amastigotes de *Leishmania* se ha demostrado que la resistencia al fármaco está mediada por la proteína PRP1, un transportador ABC (ABCC7) localizado en vesículas intracelulares (Coelho *et al.* 2007).

En relación con la resistencia a **anfotericina B**, a nivel experimental se ha obtenido resistencia al fármaco mediante exposición a concentraciones crecientes del fármaco. Las líneas resistentes mostraron un cambio significativo en el perfil de esteroides de la membrana plasmática, donde el ergosterol fue reemplazado por diferentes precursores de esteroides que carecen de metilación en C-24 (Mbongo *et al.* 1998). Sin embargo, hasta ahora, no se han encontrado resistencias clínicas a la anfotericina B.

En el caso de la **miltefosina**, los casos de resistencia experimental están asociados con una menor acumulación del fármaco, debido tanto a la presencia de mutaciones puntuales en las proteínas LdMT (una aminofosfolípido translocasa [P4-ATPasa] que forma parte del complejo del transportador de miltefosina) y LdRos3 (la subunidad no catalítica de LdMT perteneciente a la familia CDC50), como a la subexpresión de LdRos3 (Pérez-Victoria *et al.* 2003; Pérez-Victoria *et al.* 2006; Sánchez-Cañete *et al.* 2009), y en menor medida a modificaciones en la membrana plasmática del parásito por la depleción de esteroides (Saint-Pierre-Chazalet *et al.* 2009). También, a nivel experimental, se ha observado que la sobreexpresión de dos transportadores de la superfamilia ABC, un transportador tipo ABCB (P-glicoproteína) en *L. tropica*, y otro tipo ABCG en *L. infantum* dan lugar a un incremento en el flujo del fármaco y por

ende a una disminución en la acumulación de la miltefosina en el parásito (Pérez-Victoria *et al.* 2001; Castanys-Muñoz *et al.* 2008). A su vez, mediante el análisis proteómico de una línea de *L. donovani* con resistencia experimental a miltefosina, se demostró la posible implicación en la resistencia del factor de iniciación eucariótico 4A (Singh *et al.* 2008). Igualmente, mediante el análisis proteómico de aislados clínicos de *L. donovani* resistentes a SbV y que presentan resistencia cruzada a miltefosina, se ha demostrado que la proteína de choque térmico HSP83 y una proteína de la familia de la calpaína (SKCRP 14.1), protegen al parásito frente a la acción leishmanicida de la miltefosina (Vergnes *et al.* 2007). Además, la sobreexpresión en *L. donovani* de la histona H2A se ha descrito que induce una disminución en la sensibilidad hacia la miltefosina (Singh *et al.* 2010).

El creciente uso de la miltefosina para tratar la leishmaniasis canina en Europa podría acelerar el desarrollo de resistencias a miltefosina en *L. infantum*.

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

Es importante disponer de un adecuado arsenal de fármacos con diferentes mecanismos de acción, para que puedan ser empleados en el tratamiento de la leishmaniasis en casos de aparición de resistencias (Croft *et al.* 2006).

8-Aminoquinolinas

Generalidades

Las 8-aminoquinolinas fueron desarrolladas inicialmente para el tratamiento de la malaria. En 1920 se sintetizó la primera 8-aminoquinolina, llamada pamaquina o plasmokino, con el propósito de buscar un compuesto alternativo a la quinina para el tratamiento de la malaria. Posteriores modificaciones de la pamaquina dieron lugar en los años 40 al descubrimiento de pentaquina y primaquina (Figura 19) (Tekwani y Walker, 2006). Actualmente, y después de más de 60 años, la primaquina sigue siendo

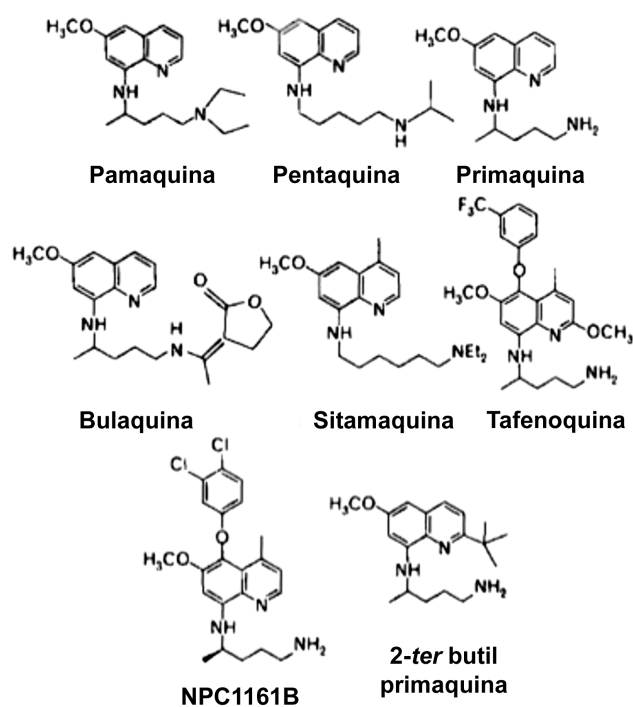


Figura 19. 8-Aminoquinolinas

el único antimalárico disponible en clínica que bloquea la transmisión del parásito, mostrando una marcada actividad frente a los gametocitos de todas las especies de *Plasmodium* que producen la malaria humana, incluyendo las cepas multirresistentes de *Plasmodium falciparum*. Además de su uso como antimalárico, se ha demostrado que la primaquina es efectiva contra especies de *Trypanosoma* y *Leishmania*, y se ha utilizado también en

combinación con clindamicina en el

tratamiento de neumonía causada por *Pneumocystis carinii* (Vale *et al.* 2009).

Al objeto de mejorar el índice terapéutico de la primaquina y encontrar análogos más activos y específicos, se ha desarrollado por parte de diferentes laboratorios, entre ellos el Walter Reed Army Institute for Research (WRAIR) en los EEUU, la síntesis de un gran número de 8-aminoquinolinas análogas de la primaquina, entre los que cabe resaltar los compuestos WR 238605 (tafenoquina) y WR 6026 (sitamaquina) (Figura 19) para el tratamiento de la malaria y leishmaniasis, respectivamente (Tekwani y Walker, 2006). La bulaquina, un profármaco de primaquina, desarrollado por el Central Drug Research Institute de India para el tratamiento de malaria causada por *Plasmodium vivax*, ha mostrado menor toxicidad y mayor eficacia que la primaquina, actualmente en uso clínico limitado en India (Gogtay *et al.* 2006). La mayoría de los fármacos antimaláricos (incluidos primaquina y tafenoquina) son compuestos quirales pero son usados como racemato (Brocks y Mehvar, 2003). El desarrollo de métodos analíticos capaces de medir los enantiómeros individuales de estos antimaláricos ha mostrado que casi todos estos fármacos poseen estereoselectividad. Dentro de las 8-aminoquinolinas, un ejemplo claro de tener un perfil farmacológico enantioselectivo es NPC1161C, siendo el compuesto NPC1161B, enantiómero (-), el que ha mostrado un

gran potencial para ser usado como un nuevo fármaco frente a varias infecciones parasitarias (Nanayakkara *et al.* 2008).

La distribución y el metabolismo de las 8-aminoquinolinas juegan un papel muy importante en su eficacia antiparasitaria *in vivo* (Tekwani y Walker, 2006). Nuevas formulaciones pueden aumentar la eficacia; así por ejemplo, nanopartículas de poliisohexilcianoacrilato y poli(D,L-láctido) cargadas con primaquina, muestran más actividad leishmanicida que la primaquina frente a *L. donovani* tanto *in vitro* en células de macrófagos como *in vivo* en ratones BALB/c, (Tekwani y Walker, 2006).

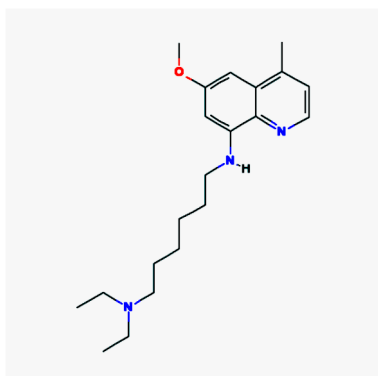
El mecanismo de acción de las 8-aminoquinolinas como antimaláricos no está claro todavía, aunque su biotransformación parece ser necesaria tanto para su eficacia como para su toxicidad; igualmente, la generación de estrés oxidativo selectivamente en las células parasitadas es el mecanismo más probable de su eficacia y toxicidad (Tekwani y Walker, 2006).

Actividad leishmanicida de las 8-aminoquinolinas

El potencial leishmanicida de las 8-aminoquinolinas se descubrió al mismo tiempo que el hallazgo de la primaquina como fármaco antimalárico. Desde entonces, ha habido un considerable interés en el desarrollo de análogos de 8-aminoquinolinas, tratando de mejorar la actividad contra los protozoos parásitos del género *Leishmania*. Se ha estudiado la actividad leishmanicida de muchos análogos de 8-aminoquinolinas con sustituciones en el anillo de quinolina (principalmente en las posiciones 2, 4, 5 y 6) o en la cadena lateral 8-amino; la eficacia de estos compuestos fue variable dependiendo de la especie de *Leishmania* y del modelo *in vitro* o *in vivo* utilizado. Dentro de los que mostraron mayor eficacia están: moxipraquina, 8-(6-(4'-3-hidroxitil)butil)piperazina-1'-ilexilamino-6-metoxi-quinolina, cuyos ensayos clínicos fueron finalizados debido a que presentaba una significativa toxicidad fetal (Beveridge *et al.* 1980), y sitamaquina, *N,N*-dietil-*N'*-(6-metoxi-4-metil-8-quinolinil)-1,6-hexanodiamina (Yeates, 2002), en ensayos clínicos en fase 2b en India. Recientemente, se ha visto que análogos 5-(3-trifluorometilfenoxi)-2-ter-butil de la primaquina presentan una actividad leishmanicida *in vitro* comparable a la de la pentamidina, pero menos potente que la de la anfotericina B (Jain *et al.* 2005). Otros compuestos como NPC1161B, (-)-8-[(4-amino-1-

metilbutil)amino]-6-metoxi-4-metil-5-(3,4-diclorofenoxi)quinolina succinato, ha mostrado una actividad leishmanicida *in vivo* similar a la de sitamaquina y con baja toxicidad (Nanayakkara *et al.* 2008). Igualmente, la tafenoquina, 5-[3-(trifluorometil)fenoxi]-*N*-(5-aminopentano-2-il)-2,6-dimetoxi-4-metilquinolina-8-amina, ha mostrado una alta actividad leishmanicida tanto *in vitro* como *in vivo* (Yardley *et al.* 2010).

Sitamaquina



La sitamaquina fue sintetizada en 1946 por Campbell y colaboradores dentro de un proyecto dirigido a la búsqueda de antimaláricos. Posteriormente, en la década de los 70, en un estudio llevado a cabo por la WRAIR dirigido hacia la selección de nuevos fármacos con actividad leishmanicida en un modelo hamster-*L. donovani*, se ensayaron una serie de lepidinas (derivados de 6-metoxi-4-metil-8-aminoquinolina), seleccionando a la sitamaquina (designada originalmente como WR 6026), que administrada de forma oral resultó ser el compuesto candidato más prometedor para un desarrollo clínico, con una actividad leishmanicida muy superior a la del antimonio de meglumina (Kinnamon *et al.* 1978; Yeates, 2002). Además, la sitamaquina ha mostrado ser efectiva frente a *Pneumocystis carinii*, siendo su actividad en el modelo experimental de ratas mayor que la combinación de primaquina con clindamicina. Igualmente, la sitamaquina demostró una significativa actividad frente a la babesiosis, incluso superior a la combinación de quinina con clindamicina en hamsters infectados con *Babesia microti*, sugiriendo el amplio potencial clínico de la sitamaquina (Yeates, 2002).

Se han llevado a cabo ensayos clínicos de fase II frente a la LV en India y Kenia con 97 y 120 pacientes, respectivamente, al objeto de determinar la dosis-repuesta y el perfil de seguridad de la sitamaquina por vía oral (Jha *et al.* 2005; Wasunna *et al.* 2005). Los pacientes recibieron diariamente durante 28 días una de las siguientes dosis de sitamaquina: 1,5, 1,75, 2 y 2,5 mg/kg/día en India, y 1,75, 2, 2,5 y 3 mg/kg/día en Kenia. La tasa de curación fue de un 87% en India y de un 83% en Kenia transcurridos 180 días desde el comienzo del tratamiento; sin embargo, no se llegó a una conclusión clara sobre la dosis óptima de fármaco. En ambos ensayos clínicos, la sitamaquina fue

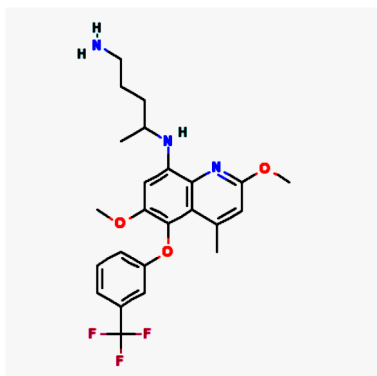
bien tolerada por los pacientes en general. Entre los efectos adversos observados más frecuentes se detectaron pacientes con dolor de cabeza, dolor abdominal o vómitos. La metahemoglobinemia, que es un efecto secundario reconocido de las 8-aminoquinolinas, sólo apareció en dos pacientes en India, y no se detectó en ningún paciente del ensayo de Kenia. Sin embargo, se detectaron efectos adversos renales en pacientes en ambos ensayos tratados con dosis mayores o iguales a 2 mg/kg/día; a pesar de que el número de casos es bajo, se ha sugerido que podría tratarse de un efecto dosis dependiente, y que la sitamaquina podría tener un efecto tóxico directo sobre el riñón. El problema es que la LV por sí misma produce fallo renal, además debido a la alta mortandad de pacientes con LV sin tratar, es imposible evaluar nuevas terapias frente a un placebo, por lo cual es complicado discernir si los efectos observados son debidos a la LV o a su tratamiento. Antes de pasar a un ensayo clínico fase III, GlaxoSmithKline llevó a cabo un ensayo de fase 2b en India, para comparar la seguridad y tolerabilidad de un tratamiento durante 21 días con sitamaquina con uno con anfotericina B-desoxicolato intravenosa, que es el tratamiento estándar actualmente en India. Los resultados mostraron una eficacia comparable a la de estudios previos, a pesar de ser de menor duración, y la sitamaquina fue mejor tolerada que la anfotericina B, aunque un pequeño número de pacientes tuvieron efectos adversos renales leves y reversibles (GlaxoSmithKline website: <http://www.gsk.com/responsibility/access/medicines-for-developing-world.htm>).

Un estudio realizado en *L. mexicana* demostró que tanto promastigotes como amastigotes intracelulares en macrófagos presentan susceptibilidades similares frente a la sitamaquina (Callahan *et al.* 1997). Sin embargo, la significativa actividad leishmanicida de la sitamaquina observada frente a *L. donovani* en hamster, se vio que disminuía en otros modelos experimentales como ratón y perro, lo que podría deberse al diferente metabolismo en cada uno de los modelos utilizados. La sitamaquina tiene una buena actividad *in vitro* frente a *L. donovani* y se cree que la desarrollada *in vivo* puede ser debida a uno o más metabolitos derivados de la sitamaquina (Yeates, 2002). En estudios usando microsomas de hígado de rata y hamster, los principales metabolitos encontrados de la sitamaquina fueron el desetil y el derivado 4-CH₂OH, y hay evidencia de que su producción está mediada por diferentes citocromos P450. Además, otros estudios sugieren que la oxidación de la cadena lateral es un importante paso en la vía metabólica de las 8-aminoquinolinas (Yeates, 2002).

Mediante la administración de ^{14}C -sitamaquina a ratas, se determinó que aproximadamente el 35 y 11% de la dosis fue eliminada en la orina y heces respectivamente, dentro de las 48 h post-administración. Los mayores niveles de radioactividad se detectaron en el hígado (aproximadamente un 10% de la dosis después de 1 a 4 h de su administración), donde aún se podía detectar radioactividad después de 7 días. Igualmente, se ha determinado que los niveles de radioactividad detectados en riñón, pulmón y bazo eran 10 veces los encontrados en sangre tras 1 a 4 horas de la administración de sitamaquina. Estos datos son consistentes con los altos valores de extracción de sitamaquina de los órganos y la gran excreción biliar de los metabolitos (Yeates, 2002). Se ha determinado que la sitamaquina tiene un $t_{1/2}$ de eliminación de 26,1 h en humanos. El derivado 4- CH_2OH es el principal metabolito en la orina con un $t_{1/2}$ de eliminación de 29,1 h, y las especies desetiladas son metabolitos menores. La mayoría de las especies de 8-aminoquinolinas formadas en el cuerpo son desconocidas (Yeates, 2002).

El mecanismo de acción de las 8-aminoquinolinas frente a los protozoos es, en general, poco conocido. La sitamaquina da lugar a una despolarización de la membrana mitocondrial en promastigotes de *L. donovani* permeabilizados con digitonina. Debido a su naturaleza catiónica lipofílica, el fármaco entraría en la mitocondria a través de un mecanismo dirigido por un potencial negativo de la membrana interna de la mitocondria, afectando la membrana mitocondrial y produciendo un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa en el parásito (Vercesi y Docampo, 1992). La sitamaquina se acumula rápidamente en compartimentos ácidos, produciendo la alcalinización de los acidocalcisomas del parásito (Vercesi *et al.* 2000). También se ha sugerido que se produciría una interacción electrostática entre la sitamaquina cargada positivamente y fosfolípidos aniónicos de la membrana plasmática del parásito, y posteriormente el fármaco se insertaría en la bicapa lipídica gracias a interacciones hidrofóbicas (Dueñas-Romero *et al.* 2007).

Tafenoquina



La tafenoquina, originalmente llamada WR 238605 o etaquina, fue identificada en 1963 a través de un programa de la WRAIR para descubrir fármacos antimaláricos. Inicialmente la tafenoquina fue estudiada como un sustituto de la primaquina para la cura radical de la malaria causada por *P.vivax*, pero luego se identificó como un fármaco antimalárico de amplio espectro con potencial para ser usado para la profilaxis

frente a malaria en viajeros no inmunes y para el tratamiento de infecciones establecidas con *P. falciparum* resistentes a múltiples fármacos (Peters, 1999). Ensayos clínicos en fase II han demostrado que la tafenoquina es muy eficaz para la profilaxis frente a infecciones con *P. falciparum* y *P. vivax*, equivalente a la eficacia lograda con mefloquina y primaquina. A su vez, la aparición de recaídas por *P. vivax* se redujo en un 90 % en pacientes tratados con tafenoquina comparado con pacientes tratados con placebo (Crockett y Kain, 2007). Se ha observado que la administración de cloroquina seguido de un tratamiento con tafenoquina puede ser más efectivo para evitar las recaídas con *P. vivax* que un tratamiento de cloroquina con primaquina (Kitchener *et al.* 2007). Actualmente, la tafenoquina está siendo desarrollada por WRAIR junto a GlaxoSmithKline en asociación con Medicines for Malaria Venture, como un potencial tratamiento para la cura radical de malaria causada por *P. vivax*.

Además de su gran eficacia en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, la tafenoquina mostró ser menos tóxica que la primaquina. Como es el caso de otras 8-aminoquinolinas, la tafenoquina produce metahemoglobinemia. Sin embargo, los niveles de metahemoglobinemia asociadas con la administración de tafenoquina en humanos no han sido de relevancia clínica (Crockett y Kain, 2007). La tafenoquina al igual que la primaquina y otras 8-aminoquinolinas produce, como un efecto adverso grave, hemólisis en individuos con deficiencia en glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) (<http://www.gsk.com/responsibility/access/medicines-for-developing-world.htm>). Los efectos adversos más comunes de la tafenoquina observados en los ensayos clínicos en fase I y II, han sido molestias gastrointestinales: acidez, gases,

vómitos, diarrea y malestar abdominal. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales para determinar la seguridad de la tafenoquina para su uso en niños y mujeres embarazadas.

La tafenoquina administrada por vía oral muestra un largo periodo de absorción y, a diferencia con la primaquina, es lentamente metabolizada y presenta una $t_{1/2}$ de eliminación de 14 días (Brueckner *et al.* 1998). Se ha observado que la absorción se incrementa cuando se administra con comida y además se reducen los efectos adversos gastrointestinales (Crockett y Kain, 2007). La concentración de la tafenoquina en sangre total es 1,8 veces mayor que la concentración en plasma; a su vez, el fármaco se acumula en los glóbulos rojos, con una concentración de 2,8 veces mayor que la encontrada en plasma (Brueckner *et al.* 1998). La tafenoquina es eliminada por excreción biliar con recirculación hepática; siendo metabolizada a compuestos aminofenólicos por múltiples vías. La tafenoquina sufre C-hidroxilación de la cadena lateral 8-(4-amino-1-metilbutil)amino, lo cual no ocurre en el metabolismo de otras 8-aminoquinolinas, aunque su significancia aún se desconoce. No hay evidencia de excreción urinaria de la tafenoquina (Crockett y Kain, 2007).

El mecanismo de acción de la tafenoquina como fármaco antimalárico no es bien conocido aunque se han postulado varias hipótesis; una de ellas, considera que la cadena lateral 4-amino-1-metilbutil puede generar superóxidos, lo cual puede contribuir a la actividad de esta clase de fármacos contra parásitos exo-eritrocíticos (Bates *et al.* 1990). La tafenoquina se ha demostrado que inhibe la formación de hematina, lo cual podría contribuir a su actividad esquizonticida (Vennerstrom *et al.* 1999). También se ha sugerido que el tratamiento con tafenoquina, al igual que sucede con otras 8-aminoquinolinas, podría producir una disfunción mitocondrial en el parásito.

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que la tafenoquina tiene actividad *in vitro* e *in vivo* frente a distintas especies de *Leishmania* (Yardley *et al.* 2010). Específicamente, se estudió *in vitro* su actividad frente a amastigotes intracelulares de cepas de *L. donovani* provenientes de India y África, incluidas cepas de *L. donovani* procedentes de India que presentan resistencia a antimoniales. La tafenoquina, administrada tanto como racemato o en forma de enantiómero (+) o (-), fue activa frente a los amastigotes intracelulares, mostrando niveles de EC_{50} comparables con otros

fármacos leishmanicidas como la miltefosina, inclusive frente a las cepas resistentes a antimoniales (Yardley *et al.* 2010).

Los estudios de actividad leishmanicida *in vivo* se realizaron en modelos animales (ratones BALB/c) infectados con *L. donovani*, a los que se les administró tafenoquina por vía oral durante 5 días a 5 mg/kg, formulada en 10% Tween-80/Etanol 70:30 ddH₂O. Los resultados demostraron un nivel de reducción de la carga parasitaria superior al 95 % tanto frente a las cepas sensibles como resistentes a antimoniales, y además en un experimento dosis-respuesta se observó que los valores de EC₅₀ estaban en el rango de 1 a 3,5 mg/kg (Yardley *et al.* 2010).

Estos resultados demuestran que la tafenoquina, al igual que otras 8-aminoquinolinas, tiene un gran potencial para ser usado como agente leishmanicida. Estos ensayos realizados frente a *Leishmania*, sumado a los estudios de seguridad del fármaco como antimalárico que se están llevando a cabo, apoyan el futuro empleo de la tafenoquina como fármaco leishmanicida, así como el uso de la tafenoquina en un tratamiento combinado frente a la LV (Yardley *et al.* 2010).



OBJETIVOS

La leishmaniasis, con 2 millones de nuevos casos anuales y 350 millones de personas en situación de riesgo, sigue siendo una de las enfermedades olvidadas más importantes en el mundo. En los últimos 10 años se han logrado avances en el tratamiento, diagnóstico y prevención de la leishmaniasis, y se ha reducido el precio de algunos de los fármacos en uso. Sin embargo, la morbilidad y mortandad de esta enfermedad muestran una preocupante tendencia al alza. El tratamiento de la leishmaniasis está basado principalmente en la quimioterapia; los fármacos disponibles incluyen antimoniales pentavalentes, anfotericina B, anfotericina B liposomal, miltefosina y paromomicina. Sin embargo, el tratamiento está limitado por la toxicidad, duración, coste y una creciente aparición de resistencias. Esto hace necesario la búsqueda de nuevos compuestos para desarrollar nuevas terapias leishmanicidas más eficaces. En esta búsqueda, las 8-aminoquinolinas han mostrado ser buenos candidatos. Dentro de las 8-aminoquinolinas, tanto la sitamaquina como la tafenoquina presentan actividad leishmanicida *in vitro* e *in vivo*; a su vez, en el caso de la sitamaquina se han realizado varios ensayos clínicos para evaluar su eficiencia frente a la leishmaniasis visceral con resultados prometedores.

Dado el potencial de estos compuestos para convertirse en fármacos leishmanicidas de uso clínico, y que el conocimiento sobre su interacción con *Leishmania* es escaso, nos planteamos como **objetivo general** de esta Tesis estudiar el mecanismo mediante el cual la sitamaquina y tafenoquina producen la muerte del parásito, y la posibilidad de que *Leishmania* pueda generar resistencias a estos compuestos. Para ello, nos planteamos los siguientes objetivos específicos:

- 1- Establecer el mecanismo mediante el cual la sitamaquina y tafenoquina entran en *Leishmania* y si existe una correlación entre la acumulación y la sensibilidad hacia el fármaco.
- 2- Determinar el mecanismo de acción de ambos fármacos en *Leishmania*.
- 3- Generar líneas de *Leishmania* resistentes a sitamaquina y a tafenoquina, y tratar de identificar los marcadores moleculares de resistencia.



Resultados

RESULTADOS

ARTICULO I

Sitamaquine Sensitivity in *Leishmania* Species Is Not Mediated by Drug Accumulation in Acidocalcisomes.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 52, p. 4030-36; 2008.

Carmen López-Martín, Jose María Pérez-Victoria, Luis Carvalho, Santiago Castanys y Francisco Gamarro.

La 8-aminoquinolina sitamaquina es un nuevo fármaco oral que se encuentra en fase clínica IIb frente a la leishmaniasis visceral. Al ser una base débil lipofílica, se acumula rápidamente en compartimentos ácidos, principalmente en acidocalcisomas. En este trabajo, demostramos que la actividad leishmanicida de la sitamaquina no está relacionada con su acumulación en estas vesículas ácidas. El fármaco entra en el parásito en un proceso no saturable, dependiente de pH e independiente de ATP y temperatura. Hemos observado diferencias significativas tanto en la sensibilidad como en la acumulación de sitamaquina entre varias especies y cepas de *Leishmania*. Hemos determinado que no existe una correlación entre sensibilidad y acumulación del fármaco. Sin embargo, observamos una relación entre los niveles de acumulación de sitamaquina y de sondas acidotrópicas, el tamaño de los acidocalcisomas, y los niveles de polifosfatos. Una línea de *Leishmania major* mutante nula para la subunidad δ del complejo 3 de proteínas adaptadoras (AP3 δ), en la cual los acidocalcisomas se encuentran alcalinizados y están desprovistos de polifosfatos, es incapaz de acumular sitamaquina; pero tanto las formas promastigotas como amastigotas intracelulares de la línea parental como la mutante nula para la AP3 δ , mostraron una sensibilidad similar hacia la sitamaquina. Estos resultados aportan una clara evidencia de que la actividad leishmanicida de la sitamaquina no está relacionada con su acumulación en los acidocalcisomas.

Sitamaquine Sensitivity in *Leishmania* Species Is Not Mediated by Drug Accumulation in Acidocalcisomes[∇]

Carmen López-Martín, José María Pérez-Victoria, Luis Carvalho, Santiago Castanys,* and Francisco Gamarro*

Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain

Received 21 July 2008/Returned for modification 18 August 2008/Accepted 5 September 2008

Sitamaquine (WR6026), an 8-aminoquinoline derivative, is a new antileishmanial oral drug. As a lipophilic weak base, it rapidly accumulates in acidic compartments, represented mainly by acidocalcisomes. In this work, we show that the antileishmanial action of sitamaquine is unrelated to its level of accumulation in these acidic vesicles. We have observed significant differences in sitamaquine sensitivity and accumulation between *Leishmania* species and strains, and interestingly, there is no correlation between them. However, there is a relationship between the levels of accumulation of sitamaquine and acidotropic probes, acidocalcisomes size, and polyphosphate levels. The *Leishmania major* AP3 δ -null mutant line, in which acidocalcisomes are devoid of their usual polyphosphate and proton content, is unable to accumulate sitamaquine; however, both the parental strain and the AP3 δ -null mutants showed similar sensitivities to sitamaquine. Our findings provide clear evidence that the antileishmanial action of sitamaquine is unrelated to its accumulation in acidocalcisomes.

In the absence of effective vaccines against leishmaniasis, the main weapon to control the disease relies exclusively on chemotherapy. Although pentavalent antimonials have been the first-line treatment for many years, the emergence of antimony resistance compromised their use. Alternative treatments such as amphotericin B, paromomycin, and more recently, miltefosine have replaced antimonials for use in disease control (1). Sitamaquine (WR6026) is a new antileishmanial oral drug currently in phase 2b clinical trials by GlaxoSmithKline (16, 28). Sitamaquine is a lipophilic weak base that rapidly accumulates in acidic compartments of *Leishmania* spp., mainly in acidocalcisomes. It has been suggested, using permeabilized *Leishmania* parasites, that the alkalization produced by sitamaquine in the acidocalcisomes could be involved in its antileishmanial action (27); however, its mechanism of action is still unknown. In addition to this, it has been reported that *Leishmania* species show different sensitivities to sitamaquine in vitro (12). This characteristic could affect sitamaquine effectiveness and should be considered in future treatments.

Acidocalcisomes are dense acidic organelles with a high concentration of phosphorus present as pyrophosphate and polyphosphate (polyP) complexed with calcium and other elements, including sodium, magnesium, and zinc, and are the main calcium storage compartments of trypanosomatids (6). Acidocalcisomes, conserved from bacteria to humans, could play an important role in *Leishmania* physiology. Their functions include (i) storage for polyP and calcium, which could be

involved in energy sources and signaling processes, respectively; (ii) pH homeostasis, in which polyP could be involved in intracellular pH regulation through the H⁺ produced from its hydrolysis; and (iii) osmoregulation, in which acidocalcisomes respond to osmotic stress by changing their sodium and chloride content. Some of these functions are related to the presence of several pumps and exchangers in the acidocalcisome membrane. Pumps that have been described are calcium pumps (Ca²⁺-ATPase), two proton pumps, a vacuolar-type H⁺-ATPase (V-H⁺-ATPase) and a vacuolar-type H⁺-pyrophosphatase (V-H⁺-PPase), and Na⁺/H⁺ and Ca²⁺/H⁺ exchangers (6).

The aim of this study was to determine if there was a correlation between sitamaquine sensitivity and accumulation in different *Leishmania* species. Furthermore, we have found an explanation for the differences observed in sitamaquine accumulation between the *Leishmania* species *L. donovani* and *L. tropica*. We have identified the fact that acidocalcisomes play a key role in the accumulation of sitamaquine in nonpermeabilized parasites and that they can be considered the main factor which determines the differences shown by *Leishmania* strains in terms of sitamaquine accumulation but not the antileishmanial potency of the drug.

MATERIALS AND METHODS

Leishmania strains and culture. *L. donovani* MHOM/ET/67/L82, *L. donovani* MHOM/IN/80/DD8, *L. tropica* MHOM/SU/60/LCR-L39, *L. tropica* MHOM/SU/74/SAF-K27, *Leishmania infantum* MHOM/ES/1993/BCN-99, *Leishmania mexicana* M9012, and *Leishmania braziliensis* MHOM/PE/03/LH2419 promastigotes were grown at 28°C in RPMI 1640-modified medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) and supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen). So that they worked under the same growth stage conditions, all the parasite strains were always collected after 48 h of growth, by centrifugation, and washed in phosphate-buffered saline (PBS; 1.2 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, 130 mM NaCl, and 2.6 mM KCl, adjusted to pH 7). The final concentration of parasites was determined using a Coulter Counter Z1 system.

The *Leishmania major* (MHOM/JL/80/Friedlin) promastigote lines, the wild

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain. Phone for Francisco Gamarro: 34 958 181667. Fax: 34 958 181632. E-mail: gamarro@ipb.csic.es. Phone for Santiago Castanys: 34 958 181666. Fax: 34 958 181632. E-mail: castanys@ipb.csic.es.

[∇] Published ahead of print on 15 September 2008.

type, the AP38-null mutant, and the AP38-null mutant transfected with the AP38 gene (designated AP3 complemented) were from J. Mottram (4).

Chemical compounds. Sitamaquine [*N,N*-diethyl-*N'*-(6-methoxy-4-methylquinolin-8-yl)hexane-1,6-diamine] dihydrochloride and benzene ring U-¹⁴C-labeled sitamaquine [¹⁴C]sitamaquine; 2.07 GBq/mmol) were provided by GlaxoSmithKline (Greenford, United Kingdom). Ammonium chloride, monensin sodium salt, nigericin sodium salt, sodium azide, 2-deoxy-D-glucose, resazurin sodium salt (Alamar Blue), and DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole diacetate) were purchased from Sigma. LysoTracker Green DND-26, LysoTracker Red DND-99, and LysoSensor Yellow-Blue DND-160 were from Invitrogen.

Determination of sitamaquine accumulation. *Leishmania* parasites washed twice with PBS were resuspended in HEPES-buffered saline (HBS; 21 mM HEPES, 0.7 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, and 6 mM dextrose, adjusted to pH 7). A final concentration of 2×10^7 parasites per ml was incubated at 28°C or 4°C with 5 μ M [¹⁴C]sitamaquine for 15 min in the presence or absence of different concentrations of nonradioactive sitamaquine. Afterwards, samples were removed and placed on ice. The parasites were spun down in a microcentrifuge and washed in PBS or in PBS containing 100 μ M sitamaquine for 10 min on ice, followed by two washes with PBS to remove the radiolabeled drug adhered to the cell surface, as previously described for the chloroquine uptake assays in yeast (10). Finally, the cell pellet was resuspended in 0.1 ml of 1% Triton X-100. Eight microliters of the sample were used for protein determination with a Bradford kit (Bio-Rad), and the remaining volume was used to determine cell-associated radioactivity by liquid scintillation counting.

Energy, protein, pH, and H⁺ gradient dependence in the sitamaquine uptake process. Parasite suspensions were prepared as described above. For the energy depletion study, parasites were preincubated for 30 min at 28°C in HBS buffer without glucose, with 5 mM 2-deoxy-D-glucose and 20 mM sodium azide as previously described (2). For protein modification, parasites were treated with 1 mM *N*-ethylmaleimide (NEM) for 15 min on ice, centrifuged, and resuspended in fresh HBS as previously described (22). H⁺ gradient dependence was determined with parasites pretreated at 28°C in HBS with 20 mM NH₄Cl for 1 min and 10 μ M of the ionophores nigericin and monensin for 10 min. Finally, 2×10^7 parasites per ml were incubated at 28°C with 5 μ M [¹⁴C]sitamaquine for 15 min in HBS for parasites pretreated with NEM or in HBS without glucose for energy depletion studies. Parasites preincubated with ionophores and NH₄Cl were incubated with 5 μ M [¹⁴C]sitamaquine for 5 min in HBS. The influence of extracellular pH in drug uptake was established with parasites incubated at 28°C with radiolabeled sitamaquine in HBS adjusted to different pHs. Samples were then removed and placed on ice. The parasites were spun down and washed in PBS containing 100 μ M sitamaquine for 10 min on ice, followed by two washes with PBS. The amount of drug incorporated into the cells was determined as described above.

Sitamaquine sensitivity assay. The sensitivity of *Leishmania* parasites to sitamaquine was determined after a 72-h incubation at 28°C in the presence of increasing concentrations of sitamaquine (24). The concentration of sitamaquine necessary to inhibit the parasites growth by 50% (EC₅₀) was calculated by the Alamar Blue method (20) using a spectrofluorometer (Molecular Devices Ltd., Wokingham, United Kingdom) at an excitation and emission wavelength of 530 nm and 585 nm, respectively.

Amastigote sensitivity in vitro. Late-stage promastigotes of wild-type and AP38-null mutant *L. major* lines were used to infect peritoneal macrophages from BALB/c mice (Charles River Ltd.) at a ratio of 1:5 macrophages/parasites, as previously described (25). After 4 h of infection, excess parasites were removed by washing with serum-free medium. The infected macrophage cultures were maintained at 37°C with 5% CO₂ with different sitamaquine concentrations in RPMI 1640 medium plus 10% heat-inactivated fetal bovine serum. After 72 h, samples were fixed for 20 min at 4°C with 2% (wt/vol) paraformaldehyde in PBS, followed by permeabilization with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min. Intracellular parasites were detected by nuclear staining (Prolong-Gold antifade reagent with DAPI; Invitrogen). The percentage of infection and the mean number of amastigotes by infected macrophages were calculated in 200 macrophages/well. Three independent experiments were performed with duplicates.

pH determination of acidic organelles. The measurements of acidic vesicle pHs in different *Leishmania* strains and species were carried out using a modification of a previously described assay for the determination of lysosomal pH in fibroblasts (15). The pH-sensitive fluorescent probe LysoSensor Yellow-Blue DND-160 (Molecular Probes) was used at 50 μ M for 5 min at 28°C with 1.5×10^8 parasites per ml, previously washed with PBS and resuspended in HBS glucose buffer. Excess dye was removed with cold PBS washing. Finally, 1×10^7 parasites per ml were resuspended in 2 ml of morpholineethanesulfonic buffer at pH 7 (5 mM NaCl, 115 mM KCl, 1.2 mM MgSO₄, 25 mM morpholineethanesulfonic acid), and transferred into magnetically stirred four-window cuvettes at

28°C. The fluorescence emission intensity ratios at 490 and 530 nm were measured in an Aminco-Bowman series 2 spectrometer using excitation at 360 nm (emission and excitation bandwidths were set to 4 nm).

Flow cytometry analysis. Parasites (4×10^6 cells/ml) were labeled with 100 nM of the acidotropic dye LysoTracker Green DND-26 in HBS buffer at 28°C. After a 10-min incubation, parasites were treated with 20 mM NH₄Cl for 1, 5, and 8 min or with 1, 10, and 30 μ M sitamaquine for 15 min at 28°C. Washed parasites were resuspended in PBS, and the cellular fluorescence intensity of the probe was measured by flow cytometry in a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA) equipped with an argon laser operating at 488 nm. The cells were gated to eliminate dead cells and debris, and the cell fluorescence was quantified by scanning the emissions between 515 and 545 nm (FL-1) by using Cell Quest software.

Confocal microscopy analysis. The acidocalcisome accumulation of the acidotropic dye LysoTracker Red DND-99 was determined by confocal microscopy analysis, essentially as previously described (21). LysoTracker Red DND-99 (75 nM) was added to 4×10^6 parasites/ml maintained in HBS buffer, and, after a 10-min incubation at 28°C, the parasites were washed with PBS and analyzed with an Axiovert confocal microscope (TCS SP5 model; Leica), operating with a He/Ne laser (633 nm) and coupled to MRC1024 model confocal scanning laser equipment.

Determination of polyP levels in *Leishmania* lines. Fluorescence staining using DAPI is commonly used for nucleic acid detection (using an excitation wavelength at 360 nm, with a peak of emission wavelength at 475 nm), but it is known that DAPI also binds and stains other polyanions such as polyP (3), using an excitation wavelength at 415 nm with a peak of emission wavelength at 525 nm. We used DAPI staining to quantify the acidocalcisomal polyP content in different *Leishmania* species and strains. *Leishmania* parasites (2×10^7) were resuspended in 1 ml of PBS and incubated for 10 min at room temperature with 10 μ g/ml DAPI. After two washes with PBS, parasites in 2 ml of PBS were transferred into magnetically stirred four-window cuvettes at 28°C. Cell density determined at 600 nm was equilibrated in all the samples before fluorescence measurement. Sample fluorescence was calculated by an emission spectrum (from 450 to 650 nm) using excitation at 415 nm in an Aminco-Bowman series 2 spectrometer.

Statistical analysis. Experiments were performed three times in duplicate. Statistical significance was calculated by using Student's *t* test. Significance was considered *P* values of <0.05.

RESULTS AND DISCUSSION

Uptake of sitamaquine. We studied the uptake of [¹⁴C]sitamaquine at 4°C and 28°C in *L. donovani* strain L82 to find out if the mechanism used by sitamaquine to cross the plasma membrane is temperature dependent. No significant differences in [¹⁴C]sitamaquine accumulation at 4°C and 28°C were observed (Fig. 1A); also, [¹⁴C]sitamaquine accumulation decreases in a similar way at both temperatures after washing with a nonradioactive drug. Furthermore, we did not observe a decrease in [¹⁴C]sitamaquine uptake when cells were pretreated with NEM, which is considered a protein inhibitor, as it forms covalent bonds with protein sulfhydryl groups (18), or when parasites were ATP depleted (data not shown). In addition, sitamaquine entry in *Leishmania* is a nonsaturable process. It does not saturate either when the nonradioactive sitamaquine concentrations are increased (Fig. 1B) or when the concentration of [¹⁴C]sitamaquine is increased (data not shown). These results confirm the fact that a transporter protein does not mediate the sitamaquine entry process. We propose that in a first step, sitamaquine would be retained in the outer side of the plasma membrane, and subsequently, it would cross the membrane, reaching the cytosol by a process independent of energy and endocytosis. Recent studies of the interaction of sitamaquine with membrane lipids of *L. donovani* suggest that the hydrophobic interaction between the aromatic ring of sitamaquine, a positively charged drug, and alkyl chains

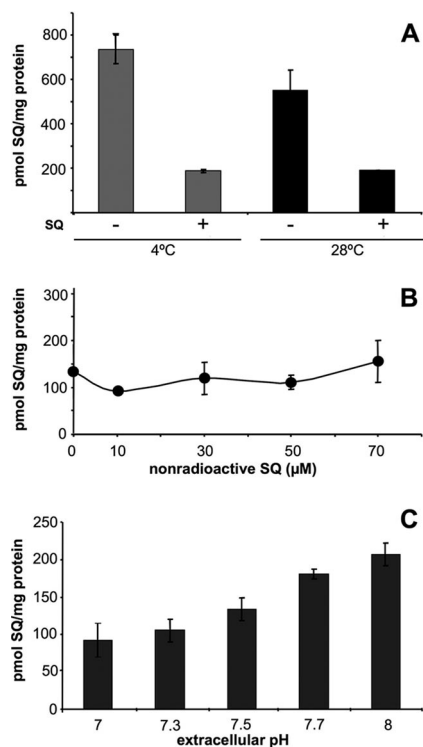


FIG. 1. Uptake of sitamaquine in *L. donovani* parasites. (A) Effect of temperature on [14 C]sitamaquine uptake. Cells were incubated with 5 μ M [14 C]sitamaquine for 15 min at 4°C and 28°C, with (+) and without (-) subsequent washing with 100 μ M nonradioactive sitamaquine. No significant differences were observed in sitamaquine accumulation at 4°C and 28°C ($P > 0.05$). (B) Effect of nonradioactive sitamaquine on [14 C]sitamaquine uptake. Cells were incubated with 5 μ M [14 C]sitamaquine and at the same time with increasing concentrations of nonradioactive sitamaquine at 28°C. After 15 min, cells were washed with 100 μ M sitamaquine. (C) Effect of extracellular pH on [14 C]sitamaquine uptake. Cells were incubated with [14 C]sitamaquine in HBS at several pHs and processed as described above. Results are means \pm standard deviations of three independent experiments. SQ, sitamaquine.

of membrane phospholipids leads to insertion of sitamaquine into a monolayer, mediating the drug entry in the parasite (9). Sitamaquine is a weak base, and its uptake was dependent on the extracellular pH. At basic pHs, such as pH 8, there was a higher sitamaquine uptake than at less basic pHs such as pH 7 to 7.3 (Fig. 1C). Consequently, all data suggest that sitamaquine seems to cross the plasma membrane by a diffusion process driven by its chemical potential gradient and possible pH gradient of intracellular organelles as previously described for the aminoquinolines amodiaquine and chloroquine in mammalian cells (14).

There is no correlation between sitamaquine uptake and sensitivity in different *Leishmania* species. Sensitivity to sitamaquine was assessed with different *Leishmania* species, obtaining EC₅₀ values ranging from 9.5 to 19.8 μ M (Fig. 2A). Under our experimental conditions, *L. infantum* and *L. donovani* were the most and the least sensitive species, respectively. Similarly, variability of sitamaquine susceptibility was previously reported for promastigotes of different *Leishmania* species (12), showing EC₅₀ values ranging from 5.7 to 75.7 μ M. In

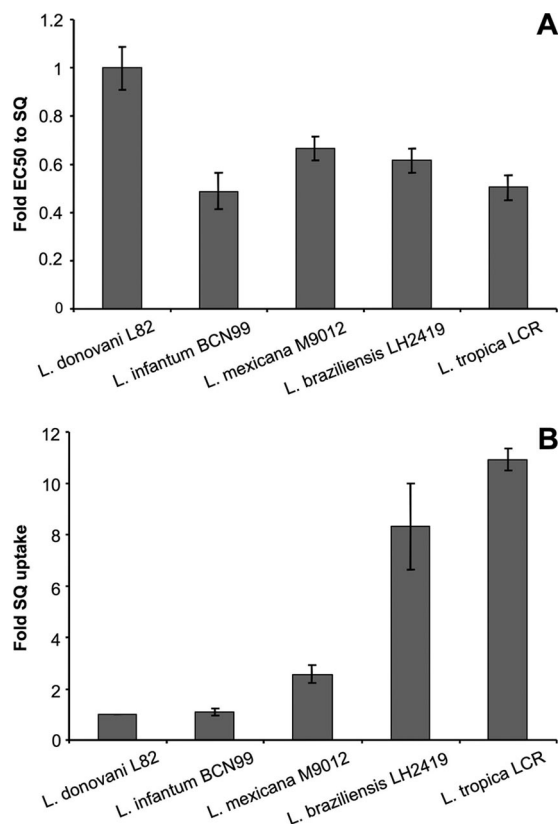


FIG. 2. Sitamaquine sensitivity and uptake in different *Leishmania* species. (A) Differences in sensitivity to sitamaquine between *Leishmania* species, compared with *L. donovani* 82, as assessed by Alamar Blue. (B) Differences in sitamaquine uptake between *Leishmania* species, compared with *L. donovani* L82, using 5 μ M [14 C]sitamaquine for 15 min at 28°C and then washed with 100 μ M nonradioactive sitamaquine as described in Materials and Methods. Statistical significance using Student's *t* test was considered for *P* values of <0.05 . Values for *L. donovani* L82 versus those of *L. mexicana* M9012, *L. braziliensis* LH2419, and *L. tropica* LCR were significantly different ($P < 0.02$, $P < 0.0005$, and $P < 0.0003$, respectively). Values for *L. infantum* BCN99 versus *L. mexicana* M9012, *L. braziliensis* LH2419, and *L. tropica* LCR were significantly different ($P < 0.04$, $P < 0.0006$, and $P < 0.0001$, respectively). Values for *L. mexicana* M9012 versus *L. braziliensis* LH2419 and *L. tropica* LCR were significantly different ($P < 0.0005$ and $P < 0.00007$, respectively). Data are the means \pm standard deviations of five independent experiments. SQ, sitamaquine.

addition, we studied the uptake of [14 C]sitamaquine in these *Leishmania* species to find out if the sensitivity observed could be caused by dissimilarities in the uptake of sitamaquine. Results showed significant differences between *Leishmania* species in terms of [14 C]sitamaquine accumulation (Fig. 2B). However, the values corresponding to the uptake of sitamaquine did not correlate with the sensitivity to the drug.

To determine if the level of sitamaquine uptake is an intrinsic feature of each species of *Leishmania*, we assessed their behavior in terms of [14 C]sitamaquine uptake by different strains of *L. donovani* and *L. tropica*, which showed the lowest and the highest rates of sitamaquine uptake, respectively. We obtained different levels of sitamaquine uptake in each strain, which suggests that sitamaquine uptake is an intrinsic feature

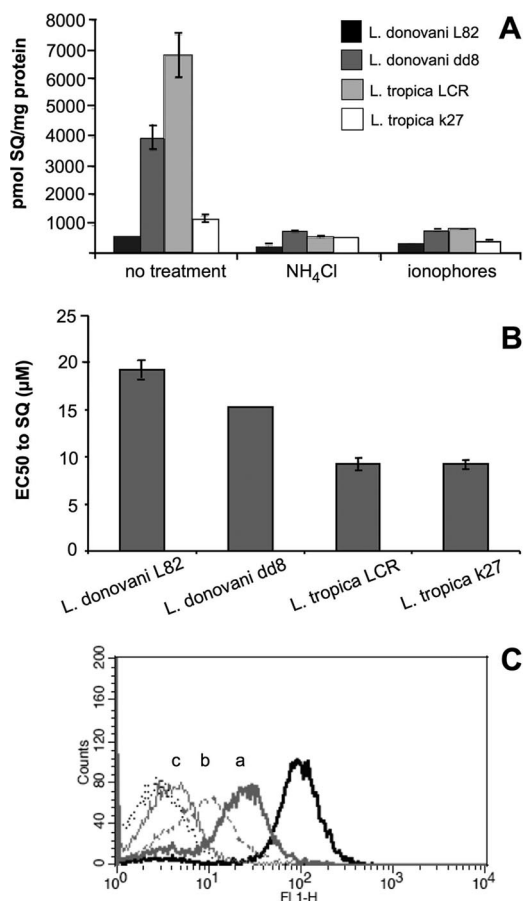


FIG. 3. Correlation between sitamaquine uptake and the pH of acidic organelles in different *Leishmania* strains. (A) [¹⁴C]sitamaquine uptake in different *Leishmania* strains. Accumulation assays were determined as described in the legend to Fig. 2. Parasites were pretreated with 20 mM NH₄Cl for 1 min and with the ionophores nigericin and monensin at 10 μM for 10 min at 28°C. [¹⁴C]sitamaquine uptake was determined for 5 min as described in Materials and Methods. (B) Determination of the sensitivity to sitamaquine in *L. tropica* and *L. donovani* strains by Alamar Blue assay. Statistical significance using Student's *t* test was considered for *P* values of <0.05. Values for *L. donovani* L82 versus those of *L. donovani* dd8, *L. tropica* LRC, and *L. tropica* k27 were significantly different (*P* < 0.05, *P* < 0.0005, and *P* < 0.0004, respectively). Values for *L. donovani* dd8 versus those of *L. tropica* LRC and *L. tropica* k27 were significantly different (*P* < 0.001 and *P* < 0.02, respectively). (C) Effect of NH₄Cl on LysoTracker Green fluorescence by flow cytometry. A representative graph is shown. Fluorescence of *L. donovani* L82 after incubation with 100 nM LysoTracker Green for 10 min is shown in black. Decrease in fluorescence produced by 20 mM NH₄Cl at 1, 5, and 8 min is represented by the gray lines (a, b and c, respectively). The dotted line corresponds to parasites' autofluorescence. Data are the means ± standard deviations of three independent experiments. SQ, sitamaquine.

of each *Leishmania* strain (Fig. 3A). The sensitivity assays to sitamaquine in *L. donovani* L82, *L. donovani* dd8, *L. tropica* LRC, and *L. tropica* k27 reaffirmed the fact that there is no correlation between sitamaquine uptake and sensitivity (Fig. 3B). On the other hand, when cells were treated with 20 mM NH₄Cl, which induces rapid alkalization in acidic organelles (18), the differences observed for the uptake of sitamaquine between *Leishmania* strains completely disappeared (Fig. 3A). The alkalization produced by NH₄Cl was checked by flow

cytometry in all the strains assayed. A decrease in the fluorescence of cells loaded with 100 nM LysoTracker Green was observed after the addition of 20 mM NH₄Cl (Fig. 3C). Furthermore, we observed the same behavior when the cells were incubated with the ionophores monensin and nigericin (Fig. 3A), which enable exchange of sodium and potassium ions with protons, respectively, affecting the pH gradient in the cell (23). These data suggest that differences in sitamaquine uptake between *Leishmania* strains could be related to differences at the level of acidic organelles, such as lysosomes or acidocalcisomes. Consequently, we continued the study to find out what determines the differences in sitamaquine accumulation in *Leishmania* strains.

Acidic organelles such as acidocalcisomes are involved in the differences observed for sitamaquine accumulation of *Leishmania* strains. Vercesi et al. (27) suggested that sitamaquine induces extensive alkalization in the acidocalcisomes of permeabilized *L. donovani* parasites. Our studies of [¹⁴C]sitamaquine accumulation in the presence of NH₄Cl and the ionophores monensin and nigericin also suggested a relationship between [¹⁴C]sitamaquine uptake and acidic organelles. Furthermore, we studied the possible implication of acidic organelles in the differences observed for the accumulation of [¹⁴C]sitamaquine in *Leishmania* strains. First, we studied the ability of sitamaquine to displace the accumulation of LysoTracker Green mediated by the alkalization of acidic organelles. LysoTracker Green is a fluorescent acidotropic probe used to label acidic organelles in live cells. LysoTracker was previously found to label mainly acidocalcisomes rather than multivesicular tubules, the lysosomal compartment of *Leishmania* (21). In all the strains assessed, sitamaquine reduced the fluorescence of LysoTracker Green measured by flow cytometry analysis (Fig. 4A). Spectrofluorometric studies did not show a quenching phenomenon between LysoTracker Green and sitamaquine (data not shown). These results confirm the role of acidic organelles, acidocalcisomes, in the accumulation of sitamaquine in *Leishmania*. They also suggest an important role for these organelles in the differences observed for [¹⁴C]sitamaquine accumulation between *Leishmania* strains. However, significant differences between *Leishmania* strains were observed in terms of accumulation of LysoTracker Green, in spite of the variable behavior of *L. tropica* strain k27 (Fig. 4B). These differences could be due to different pHs in acidic organelles of the strains, or they also could be explained by differences in the volume (size and/or number) of acidic organelles.

To study the role of acidic organelle pHs in the differences observed for LysoTracker Green accumulation, we used LysoSensor Yellow/Blue, a marker used to measure acidic organelle pHs (5, 15). The 490/530-nm ratio values obtained showed no statistically significant differences between acidic organelle pHs in *Leishmania* strains (Fig. 4C). Consequently, variations observed for LysoTracker Green accumulation are not explained by differences in acidic organelle pHs; thus, they may be explained by another mechanism, such as differences in the volumes of these organelles in *Leishmania* strains.

***Leishmania* strains show differences in the sizes of acidic organelles.** We studied the size of acidic organelles in *Leishmania* strains after labeling the parasites with LysoTracker Red.

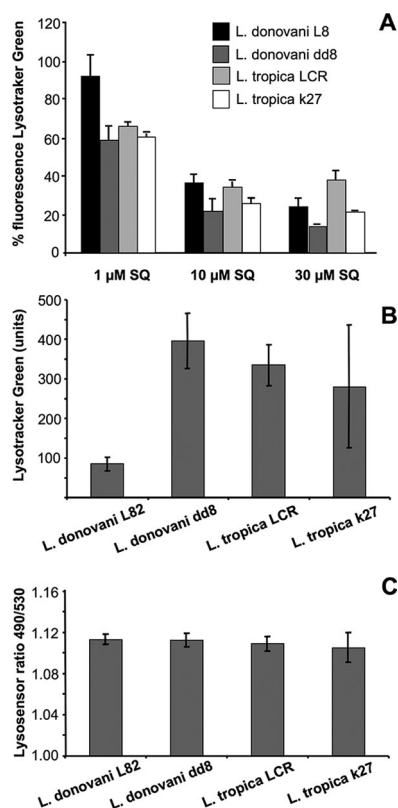


FIG. 4. Lysotracker Green and Lysosensor Yellow-Blue accumulation in *Leishmania* strains. (A) Effect of sitamaquine on Lysotracker Green fluorescence by flow cytometry. Parasites were labeled for 10 min with 100 nM Lysotracker Green. Afterwards, several concentrations of sitamaquine were added as described in Materials and Methods. Sample fluorescence is represented as the percentage of treated compared to nontreated parasites. (B) Lysotracker Green accumulation in *Leishmania* strains. Units are mean fluorescent units. Values for *L. donovani* L82 versus those for *L. donovani* dd8 and *L. tropica* LCR were significantly different ($P < 0.0007$ and $P < 0.0005$, respectively) using Student's *t* test. (C) Lysosensor Yellow-Blue 490 nm/530 nm ratio values in *Leishmania* strains. Data are the means \pm standard deviations of three independent experiments. SQ, sitamaquine.

We determine the accumulation of Lysotracker Red in the different strains, comparing their fluorescence intensities by confocal microscopy. We observed differences in the sizes of acidic organelles between the strains. Thus, the *L. tropica* LRC and *L. donovani* dd8 strains showed bigger acidic organelles, while the *L. donovani* L82 and *L. tropica* k27 strains showed smaller ones (Fig. 5). We found a correlation between Lysotracker Red and Lysotracker Green fluorescence intensities and [14 C]sitamaquine accumulation (compare the results shown in Fig. 3A, 4B, and 5). These results suggest a possible relationship between acidic organelle volume and [14 C]sitamaquine accumulation. With other aminoquinolines such as chloroquine, changes in the volume of the digestive vacuole of *P. falciparum* were associated with drug accumulation and sensitivity in different parasite strains (13).

Leishmania strains show differences in polyP levels. Based on the fact that acidocalcisomes contain particularly high levels of polyP (7), we studied polyP levels in *Leishmania* strains (3). We used DAPI fluorescence at 525 nm after an excitation at 415 nm to measure polyP levels (Fig. 6A). We obtained higher levels of polyP with *L. tropica* LRC and *L. donovani* dd8 and lower levels with *L. tropica* k27 and *L. donovani* L82 (Fig. 6B). These results showed a good correlation between polyP levels, Lysotracker Green/Lysotracker Red accumulation, and [14 C]sitamaquine accumulation.

Accumulation and sensitivity to sitamaquine in *Leishmania major* AP3 δ -null mutant. To confirm that sitamaquine is accumulated in acidic vesicles such as acidocalcisomes and that there is no correlation between uptake and sensitivity to sitamaquine, we used the *L. major* AP3 δ -null mutant line in which acidocalcisomes lacked several membrane proteins (transporters or ion channels), were devoid of their usual polyP and proton content, and had a higher acidocalcisomal pH (4). AP3 is a heterodimeric protein complex mediator of protein transport (such as integral membrane proteins) to the lysosomes and lysosome-related organelles, such as acidocalcisomes (4). Using the *L. major* AP3 δ -null mutant line and *L. major* cell line in which the AP3 δ gene was complemented from the ribosomal locus in the *L. major* AP3 δ -null mutant (designated AP3-com-

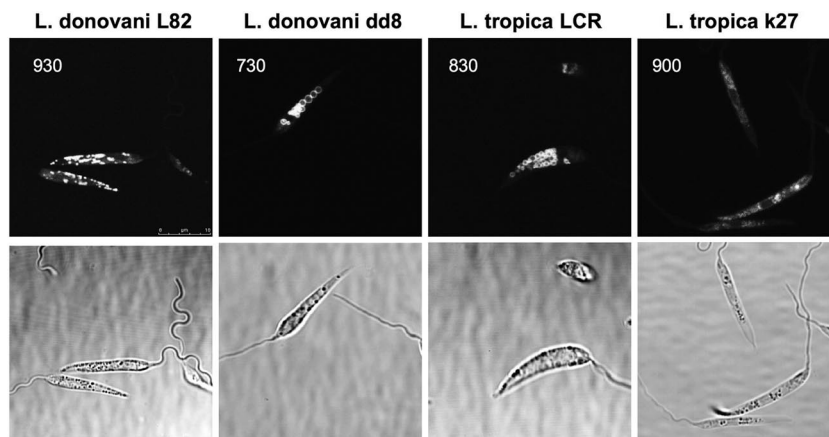


FIG. 5. Size of acidic organelles in *Leishmania* strains. Differences in the sizes of acidic organelles of *Leishmania* strains labeled with 75 nM Lysotracker Red were determined by confocal microscopy as described in Materials and Methods. Top row shows details of acidic organelles in *Leishmania* strains at the optimal voltage used to visualize each strain. Inserted values are volts. Bottom row shows corresponding differential interference contrast images.

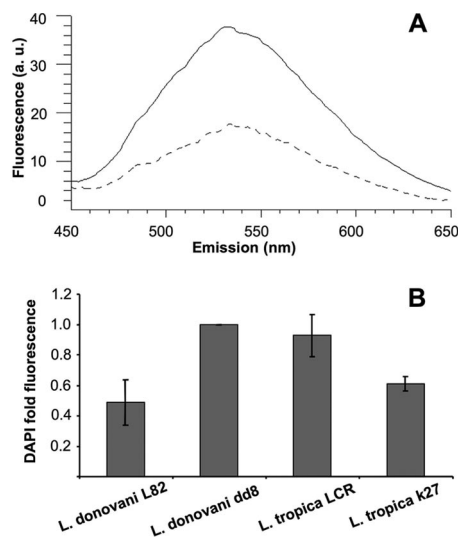


FIG. 6. Determination of polyP levels in *Leishmania* strains. (A) Representative emission spectra of polyP-bound DAPI in *L. donovani* dd8 (continuous line) and *L. donovani* L82 (dashed line) after sample excitation at 415 nm. Parasites were incubated for 10 min with 10 $\mu\text{g/ml}$ DAPI as described in Materials and Methods. (B) PolyP levels in different *Leishmania* strains were determined by spectral integration from 450 to 650 nm as described above and compared with those in *L. donovani* dd8. Values for *L. donovani* L82 versus those for *L. donovani* dd8 and *L. tropica* k27 were significantly different ($P < 0.004$ and $P < 0.0001$, respectively), using Student's *t* test. Results represent means \pm standard deviations of four independent experiments. a. u., arbitrary units.

plemented), we studied sitamaquine accumulation and sensitivity. [^{14}C]sitamaquine uptake was significantly reduced in the AP3 δ -null mutant parasites (more than 95% reduction versus control parasites), while in the AP3-complemented lines, the [^{14}C]sitamaquine accumulation was significantly increased (Fig. 7A). To further confirm if there was a correlation between sitamaquine uptake and sensitivity, we studied the sensitivity to sitamaquine by using the AP3 δ -null mutant and the AP3-complemented *L. major* lines. The results clearly show that there are no significant differences in sitamaquine sensitivity in the promastigote forms of *L. major* lines (Fig. 7B). Similarly, to assess sitamaquine sensitivity of intracellular amastigotes, mouse peritoneal macrophages were infected with late-stage promastigotes of wild-type and AP3 δ -null mutant parasites. Sensitivities to sitamaquine of the intracellular amastigotes of *L. major* lines were similar, with EC_{50} values of $4.3 \pm 0.6 \mu\text{M}$ and $3.9 \pm 0.4 \mu\text{M}$ for the wild-type and AP3 δ -null mutant lines, respectively, and similar to those previously described (12). Overall, these data confirm that sitamaquine accumulates in acidic vesicles such as acidocalcisomes and that there is no correlation between uptake and sensitivity to sitamaquine in *Leishmania* parasites. This conclusion is similar to those obtained from studies of the mechanism of action of drugs that accumulate in acidocalcisomes: diamidines against *Trypanosoma brucei* (17, 19) and *N*-alkyl and *N*-aryl-biphosphonates against parasites of the order *Kinetoplastida* and the phylum *Apicomplexa* (8, 11). Thus, the accumulation of drugs in acidocalcisomes may not predict in vitro activity and seems to be a widespread phenomenon.

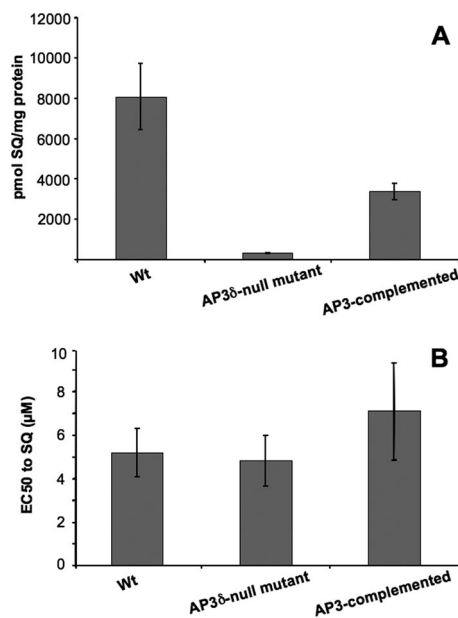


FIG. 7. Accumulation and sensitivity to sitamaquine in *L. major* AP3 δ -null mutant lines. (A) Sitamaquine uptake in the *L. major* AP3 δ -null mutant line and AP3-complemented parasites, using 5 μM [^{14}C]sitamaquine for 15 min as described in Materials and Methods. (B) Sitamaquine sensitivity in the *L. major* lines by Alamar Blue assay after 72 h of incubation at 28°C in the presence of increasing concentrations of sitamaquine is shown. Results represent means \pm standard deviations of three independent experiments. SQ, sitamaquine.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Spanish grants SAF2006-02093 (to F.G.) and ISCIII-Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET) RD06/0021/0002 (FG) and by the Plan Andaluz de Investigación (Cod. BIO130).

We thank GlaxoSmithKline (Greenford, United Kingdom) for the sitamaquine and [^{14}C]sitamaquine used throughout this research work.

We also thank Jeremy Mottram (University of Glasgow, Glasgow, Scotland, United Kingdom) for the AP3 δ -null mutant and AP3-complemented *L. major* lines used in the manuscript, Roberto Docampo (University of Georgia, Athens, GA) for advice on all aspects concerning acidocalcisomes, and Ana Muñoz Gomez for assistance with the manuscript.

C.L.M. has a fellowship from the Ministerio de Educación y Ciencia (Spain).

REFERENCES

- Alvar, J., S. Croft, and P. Olliaro. 2006. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv. Parasitol.* **61**:223–274.
- Araujo-Santos, J. M., F. Gamarro, S. Castanys, A. Herrmann, and T. Pomorski. 2003. Rapid transport of phospholipids across the plasma membrane of *Leishmania infantum*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **306**:250–255.
- Aschar-Sobbi, R., A. Y. Abramov, C. Diao, M. E. Kargacin, G. J. Kargacin, R. J. French, and E. Pavlov. 2008. High sensitivity, quantitative measurements of polyphosphate using a new DAPI-based approach. *J. Fluoresc.* **18**:859–866.
- Besteiro, S., D. Tonn, L. Tetley, G. H. Coombs, and J. C. Mottram. 2008. The AP3 adaptor is involved in the transport of membrane proteins to acidocalcisomes of *Leishmania*. *J. Cell Sci.* **121**:561–570.
- Diwu, Z., C. S. Chen, C. Zhang, D. H. Klaubert, and R. P. Haugland. 1999. A novel acidotropic pH indicator and its potential application in labeling acidic organelles of live cells. *Chem. Biol.* **6**:411–418.
- Docampo, R., W. de Souza, K. Miranda, P. Rohloff, and S. N. Moreno. 2005. Acidocalcisomes: conserved from bacteria to man. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:251–261.
- Docampo, R., and S. N. Moreno. 1999. Acidocalcisome: a novel Ca^{2+} storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. *Parasitol. Today* **15**:443–448.

8. **Docampo, R., and S. N. Moreno.** 2001. Bisphosphonates as chemotherapeutic agents against trypanosomatid and apicomplexan parasites. *Curr. Drug Targets Infect. Disord.* **1**:51–61.
9. **Duenas-Romero, A. M., P. M. Loiseau, and M. Saint-Pierre-Chazalet.** 2007. Interaction of sitamaquine with membrane lipids of *Leishmania donovani* promastigotes. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**:246–252.
10. **Emerson, L. R., M. E. Nau, R. K. Martin, D. E. Kyle, M. Vahey, and D. F. Wirth.** 2002. Relationship between chloroquine toxicity and iron acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**:787–796.
11. **Ferella, M., Z. H. Li, B. Andersson, and R. Docampo.** 2008. Farnesyl diphosphate synthase localizes to the cytoplasm of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei*. *Exp. Parasitol.* **119**:308–312.
12. **Garnier, T., M. B. Brown, M. J. Lawrence, and S. L. Croft.** 2006. In-vitro and in-vivo studies on a topical formulation of sitamaquine dihydrochloride for cutaneous leishmaniasis. *J. Pharm. Pharmacol.* **58**:1043–1054.
13. **Gligorijevic, B., T. Bennett, R. McAllister, J. S. Urbach, and P. D. Roepe.** 2006. Spinning disk confocal microscopy of live, intraerythrocytic malarial parasites. 2. Altered vacuolar volume regulation in drug resistant malaria. *Biochemistry* **45**:12411–12423.
14. **Hawley, S. R., P. G. Bray, B. K. Park, and S. A. Ward.** 1996. Amodiaquine accumulation in *Plasmodium falciparum* as a possible explanation for its superior antimalarial activity over chloroquine. *Mol. Biochem. Parasitol.* **80**:15–25.
15. **Holopainen, J. M., J. Saarikoski, P. K. Kinnunen, and I. Jarvela.** 2001. Elevated lysosomal pH in neuronal ceroid lipofuscinoses (NCLs). *Eur. J. Biochem.* **268**:5851–5856.
16. **Kinnamon, K. E., E. A. Steck, P. S. Loizeaux, W. L. Hanson, W. L. Chapman, Jr., and V. B. Waits.** 1978. The antileishmanial activity of lepidines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**:751–757.
17. **Lanteri, C. A., R. R. Tidwell, and S. R. Meshnick.** 2008. The mitochondrion is a site of trypanocidal action of the aromatic diamidine DB75 in blood-stream forms of *Trypanosoma brucei*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:875–882.
18. **Marchesini, N., and R. Docampo.** 2002. A plasma membrane P-type H(+)-ATPase regulates intracellular pH in *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **119**:225–236.
19. **Mathis, A. M., A. S. Bridges, M. A. Ismail, A. Kumar, I. Francesconi, M. Anbazhagan, Q. Hu, F. A. Tanious, T. Wenzler, J. Saulter, W. D. Wilson, R. Brun, D. W. Boykin, R. R. Tidwell, and J. E. Hall.** 2007. Diphenyl furans and aza analogs: effects of structural modification on in vitro activity, DNA binding, and accumulation and distribution in trypanosomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:2801–2810.
20. **Mikus, J., and D. Steverding.** 2000. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue. *Parasitol. Int.* **48**:265–269.
21. **Mullin, K. A., B. J. Foth, S. C. Ilgoutz, J. M. Callaghan, J. L. Zawadzki, G. I. McFadden, and M. J. McConville.** 2001. Regulated degradation of an endoplasmic reticulum membrane protein in a tubular lysosome in *Leishmania mexicana*. *Mol. Biol. Cell* **12**:2364–2377.
22. **Perez-Victoria, F. J., S. Castanys, and F. Gamarro.** 2003. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2397–2403.
23. **Sanchez, C. P., W. D. Stein, and M. Lanzer.** 2007. Is PfCRT a channel or a carrier? Two competing models explaining chloroquine resistance in *Plasmodium falciparum*. *Trends Parasitol.* **23**:332–339.
24. **Seifert, K., S. Matu, F. J. Perez-Victoria, S. Castanys, F. Gamarro, and S. L. Croft.** 2003. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int. J. Antimicrob. Agents* **22**:380–387.
25. **Seifert, K., F. J. Pérez-Victoria, M. Stettler, M. P. Sánchez-Cañete, S. Castanys, F. Gamarro, and S. L. Croft.** 2007. Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists in vivo. *Int. J. Antimicrob. Agents* **30**:229–235.
26. Reference deleted.
27. **Vercesi, A. E., C. O. Rodrigues, R. Catisti, and R. Docampo.** 2000. Presence of a Na(+)/H(+) exchanger in acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by antileishmanial drugs. *FEBS Lett.* **473**:203–206.
28. **Yeates, C.** 2002. Sitamaquine (GlaxoSmithKline/Walter Reed Army Institute). *Curr. Opin. Investig. Drugs* **3**:1446–1452.

ARTICULO II**Uptake of the Antileishmania Drug Tafenoquine Follows a Sterol-Dependent Diffusion Process in *Leishmania*.****Journal of Antimicrobial Chemotherapy, en prensa.**

José Ignacio Manzano, Luis Carvalho, Raquel García-Hernández, José Antonio Poveda, José Antonio Ferragut, Santiago Castanys y Francisco Gamarro.

Este trabajo fue diseñado para dilucidar el mecanismo de entrada de la tafenoquina en *Leishmania*, y su dependencia de esteroides. Al ser la tafenoquina un compuesto fluorescente, mediante espectrofluorimetría pudimos monitorizar su entrada al parásito. El fármaco presenta una cinética rápida en la entrada, el proceso es independiente de energía y no saturable, pero dependiente del gradiente de protones y de temperatura. La reducción de esteroides de la membrana plasmática, obtenida tras el tratamiento con metil- β -ciclodextrina, produce una disminución significativa de la entrada de tafenoquina en el parásito. Estos resultados sugieren que la entrada de tafenoquina en *Leishmania* tiene lugar mediante un proceso de difusión y que los cambios en el contenido de esteroides de la membrana plasmática pueden causar una disminución en la entrada del fármaco.

Uptake of the antileishmania drug tafenoquine follows a sterol-dependent diffusion process in *Leishmania*

José Ignacio Manzano¹, Luis Carvalho¹, Raquel García-Hernández¹, José Antonio Poveda², José Antonio Ferragut², Santiago Castanys^{1†} and Francisco Gamarro^{1*†}

¹Instituto de Parasitología y Biomedicina 'López-Neyra', CSIC (IPBLN-CSIC), Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain; ²IBMC-Universidad Miguel Hernández, Elche (Alicante), Spain

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

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

Received 10 May 2011; returned 13 June 2011; revised 25 July 2011; accepted 26 July 2011

Objectives: The present study was designed to elucidate the mechanism of tafenoquine uptake in *Leishmania* and its sterol dependence.

Methods: Because tafenoquine is a fluorescent compound, spectrofluorimetric analysis allowed us to monitor its uptake by *Leishmania* promastigotes and intracellular amastigotes, and to evaluate the effect of temperature, energy and H⁺ gradient on drug entry. The influence of sterols on tafenoquine uptake in *Leishmania* parasites was determined in experiments using sterol-depleting agents such as methyl- β -cyclodextrin or cholesterol oxidase.

Results: Tafenoquine exhibited fast entry kinetics into *Leishmania* in an energy-independent, but pH- and temperature-dependent, non-saturable process. Furthermore, sterol depletion decreased tafenoquine uptake.

Conclusions: These findings suggest that *Leishmania* takes up tafenoquine by a diffusion process and that decreases in membrane sterol content may induce a decrease in drug uptake.

Keywords: 8-aminoquinolines, tafenoquine uptake, plasma membrane fluidity, sterol depletion

Introduction

Leishmaniasis, which is caused by the parasitic protozoan *Leishmania*, has a wide variety of clinical manifestations, ranging from self-healing cutaneous lesions to visceral disease,¹ with an annual incidence of more than 2 million new cases. Treatment of this disease relies exclusively on chemotherapy, limited to a few first-line drugs, including miltefosine, paromomycin, amphotericin B deoxycholate and lipid amphotericin B, along with pentavalent antimonials, although the last group are no longer effective in endemic areas in Bihar (India) due to drug resistance. The limited number of active drugs has prompted the WHO to recommend combination therapy in order to extend the life expectancy of these compounds. New drugs, including the 8-aminoquinolines, are being developed as part of the search for cheaper oral treatments for visceral leishmaniasis. The 8-aminoquinoline scaffold has been extensively used in the development of antiprotozoal drugs,² typically as antiplasmodial compounds. The most recent application for these drugs is the use of sitamaquine and tafenoquine as alternative leishmanicidal compounds; these two drugs are at different stages of introduction because of differences in their

haematological toxicity (primarily methaemoglobinemia and haemolysis).

Tafenoquine, an 8-aminoquinoline analogue of primaquine that is in clinical trials for the treatment and prevention of *Plasmodium* infections,³ may be a good candidate for an alternative leishmaniasis therapy. Indeed, tafenoquine has shown potent *in vivo* leishmanicidal activity by affecting mitochondrial activity in *Leishmania* parasites, leading to an apoptosis-like death process;^{4,5} however, the precise mechanism of tafenoquine uptake in *Leishmania* remains unknown. The present article is focused on elucidating the mechanism of tafenoquine uptake in *Leishmania* and its sterol dependence.

Methods

Leishmania strain and culture

Leishmania major (MHOM/JL/80/Friedlin) promastigotes were grown at 28°C in RPMI 1640 modified medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (HIFBS) (Invitrogen).⁶ Intracellular amastigotes were obtained as described previously.⁷ Briefly, macrophages differentiated from THP-1 cells were

infected with late-stage promastigotes at a ratio of 1:10 macrophages/parasites. Infected macrophages were maintained for 96 h at 37°C and 5% CO₂ in RPMI 1640 medium plus 10% HIFBS. Amastigotes were harvested from macrophages selectively lysed with 0.0125% SDS in PBS (1.2 mM KH₂PO₄, 8.1 mM NaH₂PO₄, 130 mM NaCl and 2.6 mM KCl, pH 7).

Tafenoquine uptake

Promastigotes (2 × 10⁷ cells/mL) were treated with 5 μM tafenoquine for different times (1, 3, 5, 8, 10 and 15 min) or with different tafenoquine concentrations (0.2, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 and 20 μM) for 1 min in culture medium at 28°C. For tafenoquine uptake experiments in amastigotes, 10⁷ cells/mL were treated with 10 μM tafenoquine for different times (1, 5 and 15 min) in culture medium (pH 5.5) at 37°C and 5% CO₂. Parasites were then washed with the same medium followed by PBS and re-suspended in 10% SDS. Tafenoquine accumulation was determined fluorimetrically by recording an emission spectrum in the range 360–460 nm upon excitation at 340 nm using an Aminco-Bowman Series 2 spectrometer as described previously.⁸

Effects of temperature, energy and H⁺ gradient on tafenoquine uptake

These experiments were performed as described previously.⁹ Briefly, promastigotes (2 × 10⁷ cells/mL) or amastigotes (10⁷ cells/mL) were incubated for 10 min with 5 μM tafenoquine at 28 and 4°C or with 10 μM tafenoquine at 37 and 4°C, respectively, in HEPES-buffered saline (HBS; 21 mM HEPES, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.7 mM NaH₂PO₄ and 6 mM glucose, adjusted to pH 7.4 for promastigotes or pH 5.5 for amastigotes), and the amount of drug incorporated into the cells was determined as described above. For energy depletion studies, promastigotes or amastigotes were pre-incubated for 30 min with 5 mM 2-deoxy-D-glucose and 20 mM NaN₃ at 28 or 37°C, respectively, in HBS buffer without glucose. H⁺-gradient dependence was determined in parasites pre-treated with 10 μM of the ionophores nigericin and monensin in HBS for 10 min at 28 or 37°C.

Preparation of parasite surface membrane-enriched fraction

Leishmania promastigotes (10⁹ cells/mL) in lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA and 25 μg/mL leupeptin, pH 8.0) were disrupted for 45 min in a pre-chilled, high-pressure cavitor. The parasite lysates were centrifuged at 1000 g to eliminate cell debris, then the supernatant was centrifuged at 8000 g at 4°C for 30 min to obtain parasite surface membrane-enriched fractions. The supernatant was removed and the pellets were washed twice with 10 mM HEPES/145 mM NaCl, pH 7.4, buffer before being re-suspended in the same buffer. Alkaline phosphatase tartrate-resistant activity was determined as a control for membrane-enriched fractions, as described previously.¹⁰

Anisotropy of parasite plasma membrane

Leishmania plasma membrane samples (0.14–0.15 mg/mL) in 10 mM HEPES/145 mM NaCl, pH 7.4, buffer were incubated with 1,6-diphenylhexa-1,3,5-triene (DPH) or 1-[4-(trimethylamino) phenyl]-6-phenylhexa-1,3,5-triene (TMA-DPH) probes in *N,N*-dimethylformamide (DMF) in the dark for 30 min at a 1/2500 probe/protein weight ratio. The final DMF concentration in the membrane suspension was always <0.05%. The slit widths for both excitation and emission were 5 nm and the integration time was 1 s. Steady-state fluorescence anisotropy (*r*), as defined by Lackowicz,¹¹ was determined by measuring the vertical and horizontal components of the fluorescence emission with

excitation polarized vertically. The excitation wavelength for DPH and TMA-DPH was 360 nm, with emission being monitored at 430 nm. Temperature ramps were done from 4 to 40°C in steps of 0.5°C, with an equilibration time at each temperature of 30 s and a heating rate of 30°C/min. The data point at each temperature was the average of ten 1 s anisotropy measurements.

Tafenoquine uptake after sterol depletion in *L. major*

Promastigotes (10⁷ cells/mL) were pre-incubated with 10 mM methyl-β-cyclodextrin (MCD) or 1 U/mL cholesterol oxidase (CH-OX) for 1 h in culture medium without HIFBS at 4°C in order to deplete sterols from the plasma membrane, as described previously.¹² Similar experiments with intracellular amastigotes (10⁷ cells/mL) were determined using 10 mM MCD in culture medium (pH 5.5). After washing twice with PBS, parasites were stained with the sterol dye marker filipin.¹³ *Leishmania* parasites were incubated on ice with 10 μg/mL filipin for 10 min in culture medium without HIFBS and washed twice with PBS, and the sample fluorescence was determined by recording an emission spectrum (400–600 nm) upon excitation at 350 nm. After sterol depletion, promastigotes and amastigotes were incubated, respectively, with 5 μM tafenoquine at 28°C and 10 μM at 37°C for 15 min in culture medium. Tafenoquine accumulation was measured as described above.

Statistical analysis

Statistical comparisons between groups were performed using Student's *t*-test. Differences were considered significant at a level of *P* < 0.05.

Results and discussion

The present work aimed to examine the mechanism of tafenoquine uptake in the protozoan parasite *Leishmania*; tafenoquine is a promising leishmanicidal oral drug with less haematological toxicity than sitamaquine. The tafenoquine concentrations used in these experiments were designed considering the EC₅₀ value of tafenoquine in *L. major* promastigotes (2.24 μM), as previously described.⁸ The uptake of tafenoquine at 28°C reached saturation in about 5 min (Figure 1a); similar behaviour was observed at 4°C, but with lower accumulation than at 28°C (Figure 1a). Similar results were obtained in amastigotes incubated at 37°C (Figure 1a). Furthermore, the initial rate of tafenoquine uptake was not saturable at up to at least 20 μM tafenoquine (Figure 1b). No differences in tafenoquine uptake were observed in the ATP-depleted parasites (Figure 1c), although tafenoquine uptake was found to be 50% lower at 4°C than at 28°C (*P* < 0.05) for promastigotes and 60% lower at 4°C than at 37°C for amastigotes (*P* < 0.05) (Figure 1c). In summary, tafenoquine shows fast entry kinetics into *Leishmania* parasites in a protein- and energy-independent, but temperature-dependent, non-saturable process. Furthermore, the accumulation of weakly basic aminoquinolines such as chloroquine and, more recently, sitamaquine seems to be pH-dependent.^{14,15} This finding was confirmed by the observation of a significant reduction in tafenoquine accumulation only in promastigotes pre-incubated with the ionophores monensin and nigericin (*P* < 0.05) (Figure 1c), which enable the exchange of sodium and potassium ions with protons, respectively, thereby affecting the pH gradient in the cell. No differences in drug accumulation

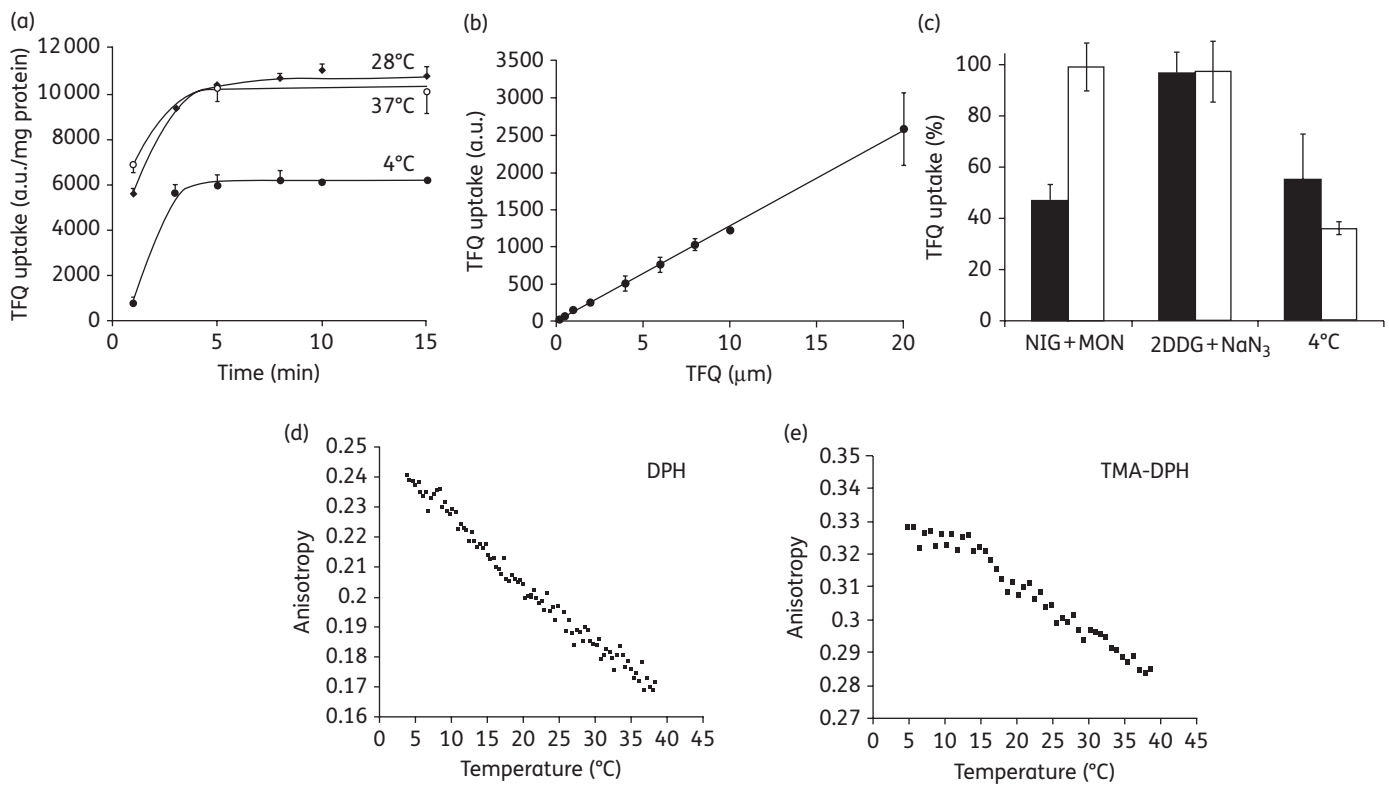


Figure 1. Tafenoquine (TFQ) uptake by *Leishmania* parasites. (a) Kinetics of tafenoquine uptake at 28°C (diamonds) and 4°C (filled circles) in promastigotes and at 37°C in amastigotes (open circles). a.u., arbitrary units. (b) Concentration-dependent uptake of tafenoquine in promastigotes. a.u., arbitrary units. (c) Inhibition of tafenoquine uptake. Non-treated parasites (100% uptake), parasites treated with nigericin plus monensin (NIG+MON) or 2-deoxy-D-glucose plus NaN₃ (2DDG+NaN₃) and parasites incubated at 4°C. Promastigotes, black bars; amastigotes, white bars. Data are the means±SD of three and two independent experiments for promastigotes and amastigotes, respectively. Temperature-dependent steady-state fluorescence anisotropy experiments in promastigotes using DPH (d) and TMA-DPH (e) probes. Data are averages of three independent experiments.

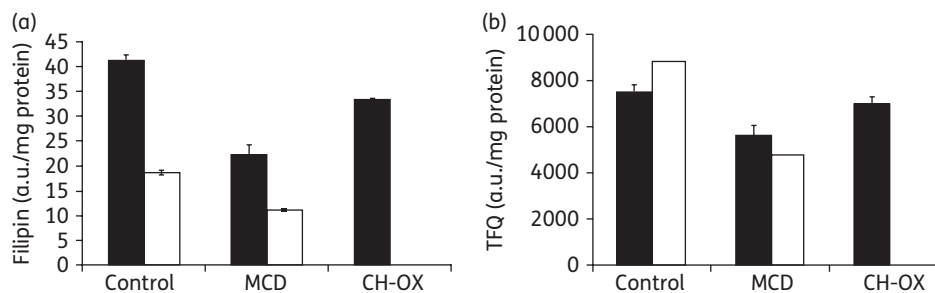


Figure 2. Tafenoquine (TFQ) accumulation after sterol depletion. (a) Filipin staining after incubation without (Control) or with MCD or CH-OX for 1 h at 4°C. a.u., arbitrary units. (b) Tafenoquine uptake after sterol depletion. Promastigotes, black bars; amastigotes, white bars. Results are means±SD of three and two independent experiments for promastigotes and amastigotes, respectively.

were observed in amastigotes after ionophore treatment due to the acidic pH of the incubation medium (pH 5.5). Finally, fluorescence anisotropy studies showed significant differences between the anisotropy values for the measurements at 4 and 40°C (Figure 1d and e). Since the anisotropy values for TMA-DPH and DPH give an estimate of their free rotation in the lipid bilayer, higher fluorescence anisotropy should correspond to a decrease in membrane fluidity. This could explain the

lower tafenoquine uptake observed at 4°C (with lower fluidity). Consequently, tafenoquine appears to cross the plasma membrane via a diffusion process driven by its chemical potential gradient and the pH gradient, as well as being influenced by the lipophilicity of this compound (XlogP3=5.4; <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=115358>).

The plasma membrane is the site where the drug is taken up, and any modification to its composition or dynamics is therefore

likely to have an impact on drug–membrane interactions, especially when the drug must be solubilized into the lipid bilayer before it can be taken up. To study the influence of sterols on tafenoquine uptake in *Leishmania* parasites, we first examined whether treatment with MCD or CH-OX induced changes in the sterol content of *L. major*, using filipin fluorescence to monitor sterol depletion. The relationship between sterol content and plasma membrane fluidity has been described in a previous study¹² showing that a decrease in sterol content in *Leishmania* was associated with higher fluidity. As can be seen from Figure 2(a), treatment with MCD and CH-OX produced a 45% and 21% decrease in filipin fluorescence, respectively. Similar behaviour was observed in amastigotes after MCD treatment (Figure 2a). Furthermore, sterol depletion induced by MCD and CH-OX did not have a significant effect on parasite viability, as assessed by morphology and motility (data not shown), in agreement with previous findings.¹² Sterol depletion resulted in a significant 26% reduction in tafenoquine uptake in promastigotes after MCD treatment ($P < 0.05$), whereas no significant difference was observed after treatment with CH-OX (Figure 2b). In amastigotes, a 45% reduction in tafenoquine uptake was observed after MCD treatment ($P < 0.05$) (Figure 2b). These results can be explained by the extent of sterol extraction observed in Figure 2(a). These results were consistent with possible drug entry through lipid raft domains, as previously described for the uptake of other antileishmania drugs.¹² However, recent studies have shown that sitamaquine uptake in *Leishmania* parasites is a sterol-independent diffusion process.¹⁵ Thus, there is significant variability in the uptake phenomena of different compounds included in the 8-aminoquinoline family.

In conclusion, our results suggest that tafenoquine uptake in *Leishmania* follows a sterol-dependent diffusion process.

Acknowledgements

We acknowledge the support of GlaxoSmithKline (Greenford, UK) for the tafenoquine used throughout this research work.

Funding

This work was supported by the Spanish grant SAF2009-07440 (to F. G.) and by FEDER funds from the EU to F. G. and S. C.

Transparency declarations

None to declare.

References

- Alvar J, Croft S, Olliaro P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol* 2006; **61**: 223–74.
- Tekwani BL, Walker LA. 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Curr Opin Infect Dis* 2006; **19**: 623–31.
- Walsh DS, Wilairatana P, Tang DB et al. Randomized trial of 3-dose regimens of tafenoquine (WR238605) versus low-dose primaquine for preventing *Plasmodium vivax* malaria relapse. *Clin Infect Dis* 2004; **39**: 1095–103.
- Yardley V, Gamarro F, Croft SL. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal activity of the 8-aminoquinoline tafenoquine. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 5356–8.
- Carvalho L, Laque-Ortega JR, Manzano JI et al. Tafenoquine, an antiplasmodial 8-aminoquinoline, targets *Leishmania* respiratory complex III and induces apoptosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; **54**: 5344–51.
- Jackson PR, Wohlhieter JA, Jackson JE et al. Restriction endonuclease analysis of *Leishmania* kinetoplast DNA characterizes parasites responsible for visceral and cutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg* 1984; **33**: 808–19.
- Seifert K, Pérez-Victoria FJ, Stettler M et al. Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists in vivo. *Int J Antimicrob Agents* 2007; **30**: 229–35.
- Manzano JI, Carvalho L, Pérez-Victoria JM et al. Increased glycolytic ATP synthesis is associated with tafenoquine resistance in *Leishmania major*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 1045–52.
- López-Martin C, Pérez-Victoria JM, Carvalho L et al. Sitamaquine sensitivity in *Leishmania* species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 4030–6.
- Basselín M, Robert-Gero M. Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity, and lipophosphoglycan expression in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Parasitol Res* 1998; **84**: 78–83.
- Lackowicz JR, ed. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. New York: Plenum Press, 1983.
- Saint-Pierre-Chazalet M, Ben Brahim M, Le Moyec L et al. Membrane sterol depletion impairs miltefosine action in wild-type and miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *J Antimicrob Chemother* 2009; **64**: 993–1001.
- Van Leeuwen MR, Smant W, de Boer W et al. Filipin is a reliable *in situ* marker of ergosterol in the plasma membrane of germinating conidia (spores) of *Penicillium discolor* and stains intensively at the site of germ tube formation. *J Microbiol Methods* 2008; **74**: 64–73.
- Augustijns PF. Uptake and transport characteristics of chloroquine in an *in-vitro* cell culture system of the intestinal mucosa, Caco-2. *J Pharm Pharmacol* 1996; **48**: 277–80.
- Coimbra ES, Libong D, Cojean S et al. Mechanism of interaction of sitamaquine with *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 2548–55.

ARTICULO III**The 8-aminoquinoline Analogue Sitamaquine Causes Oxidative Stress in *Leishmania donovani* Promastigotes by Targeting Succinate Dehydrogenase.**

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 55, p. 4204-10; 2011.

Luis Carvalho, Juan Román Luque-Ortega, Carmen López-Martín, Santiago Castanys, Luis Rivas y Francisco Gamarro.

La sitamaquina, análogo de la 8-aminoquinolina, es un fármaco oral leishmanicida actualmente en ensayos clínicos de fase IIb para el tratamiento de la leishmaniasis visceral. En este trabajo hemos estudiado el mecanismo de acción de este fármaco en las formas promastigotes de *Leishmania donovani*. La sitamaquina inhibe, de una manera dosis-dependiente, el complejo II (succinato deshidrogenasa) de la cadena respiratoria en promastigotes permeabilizados con digitonina. A su vez, se produce una caída del nivel de ATP intracelular y una disminución del potencial de la membrana mitocondrial; esto está asociado con un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno y de Ca^{2+} libre intracelular, con un mayor porcentaje de parásitos con ADN en fase sub-G1, y con la exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática. Estos resultados en conjunto indican que la actividad leishmanicida de la sitamaquina está determinada por la inhibición del complejo II de la cadena respiratoria, lo cual desencadena un estrés oxidativo y finalmente la muerte del parásito mediante un proceso similar a la apoptosis.

The 8-Aminoquinoline Analogue Sitamaquine Causes Oxidative Stress in *Leishmania donovani* Promastigotes by Targeting Succinate Dehydrogenase[∇]

Luis Carvalho,¹§ Juan Román Luque-Ortega,²§ Carmen López-Martín,¹
Santiago Castanys,¹ Luis Rivas,^{2*} and Francisco Gamarro^{1*}

Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC (IPBLN-CSIC), Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avd. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain,¹ and Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC (CIB-CSIC), Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid, Spain²

Received 18 April 2011/Returned for modification 25 May 2011/Accepted 6 June 2011

The 8-aminoquinoline analogue sitamaquine (SQ) is an oral antileishmanial drug currently undergoing phase 2b clinical trials for the treatment of visceral leishmaniasis. In the present study, we investigated the mechanism of action of this drug in *Leishmania donovani* promastigotes. SQ causes a dose-dependent inhibition of complex II (succinate dehydrogenase) of the respiratory chain in digitonin-permeabilized promastigotes, together with a drop in intracellular ATP levels and a decrease of the mitochondrial electrochemical potential. This is associated with increases of reactive oxygen species and intracellular Ca²⁺ levels, a higher percentage of the population with sub-G₁ DNA content, and exposure of phosphatidylserine. Taken together, these results support a lethal mechanism for SQ that involves inhibition of the respiratory chain complex II, which in turn triggers oxidative stress and finally leads to an apoptosis-like death of *Leishmania* parasites.

Leishmaniasis, a protozoal infectious disease caused by a set of 17 species of the genus *Leishmania*, shows a wide spectrum of clinical manifestations, including, in order of increasing severity, cutaneous (CL), mucocutaneous (MCL), and visceral (VL) leishmaniasis (3). Although chemotherapy is the only current treatment option for leishmaniasis, its efficacy is increasingly limited by growing resistance to first-line drugs, especially antimonials, by the frequent side effects associated with their use, and by the high cost of treatment (30). The paucity of new drugs in the pipeline, together with the poor definition of *Leishmania* targets for the drugs in current clinical use, represents an additional concern for current chemotherapy. Solutions to curb this pessimistic scenario rely on combination therapy (40) and the rescue of old drugs, such as paromomycin (17, 36) and sitamaquine (SQ) (39), that were previously discarded.

8-Aminoquinolines are an important class of antiparasitic agents (37) with broad application and excellent efficacy but with limitations due to their hematological toxicity (primarily methemoglobinemia and hemolysis). SQ, formerly known as WR6026, is an 8-aminoquinoline that was initially developed by the Walter Reed Army Institute (46). The results of phase 2b clinical trials of this drug against VL in India (16) and Kenya (45) by GlaxoSmithKline were encouraging. These re-

sults, together with its oral administration, represent a substantial advantage in terms of its future widespread implementation.

The targets for SQ remain elusive. Entry of SQ into the parasite starts with an electrostatic interaction with anionic phospholipids of the plasma membrane (11). In a seminal work, Vercesi and Docampo (43) observed a loss of mitochondrial electrochemical potential in digitonin-permeabilized parasites after SQ addition, together with alkalinization of acidocalcisomes (44), which also underwent a privileged SQ accumulation, although no correlation was found with its toxicity (18).

Herein we provide further insight into the leishmanicidal mechanism of SQ, which induces an apoptosis-like death of the parasite, as confirmed by phosphatidylserine (PS) externalization and chromatin fragmentation (sub-G₁ population) in association with enhanced reactive oxygen species (ROS) production, elevation of intracellular Ca²⁺ levels, and depolarization of the mitochondrial membrane potential. The site of action was mapped to complex II (succinate dehydrogenase [SDH]) by systematic analysis of the different complexes in the respiratory chain, with SQ inhibiting its activity in a dose-dependent manner.

MATERIALS AND METHODS

Chemical compounds. SQ (*N,N*-diethyl-*N'*-[6-methoxy-4-methylquinolin-8-yl]hexane-1,6-diamine) dihydrochloride was kindly provided by GlaxoSmithKline (Greenford, United Kingdom). A 40 mM SQ stock solution was prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO). DMNPE-luciferin {D-luciferin-1[-(4,5-dimethoxy-2-nitrophenyl) ethyl ester]}, Fluo4-AM, H₂DCF-DA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester), pluronic F127, rhodamine 123 (Rh123), Sytox green, DiBAC₄(3) [bis-(1,3-dibutylbarbituric acid)trimethine oxonol], and Alexa Fluor 488-conjugated annexin V were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). Fatty acid-free bovine serum albumin (BSA), digitonin, ADP, carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP), carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP), KCN, tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD),

* Corresponding author. Mailing address for Francisco Gamarro: Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC (IPBLN-CSIC), Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avd. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain. Phone: 34 958 181667. Fax: 34 958 181632. E-mail: gamarro@ipb.csic.es. Mailing address for Luis Rivas: Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC (CIB-CSIC), Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid, Spain. Phone: 34 91 8373112, ext. 4234. Fax: 34 91 5360432. E-mail: luis.rivas@cib.csic.es.

§ L.C. and J.R.L.-O. contributed equally to this work.

[∇] Published ahead of print on 13 June 2011.

α -glycerophosphate, malonate, oligomycin, succinate, propidium iodide (PI), and Triton X-100 were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). All other chemicals were of the highest quality available.

Parasites. *Leishmania donovani* promastigotes (MHOM/ET/67/L82) and promastigotes of the derived line *L. donovani* 3-Luc (22), which expresses cytoplasmic firefly luciferase mutated at its C-terminal tripeptide, were grown at 28°C in RPMI 1640 modified medium (Invitrogen) supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (Invitrogen).

Bioluminescence assays. The *in vivo* variation in intracellular ATP levels was monitored in promastigotes expressing a cytoplasmic form of firefly luciferase, as described previously (19). Briefly, parasites from the *L. donovani* 3-Luc strain (2×10^7 promastigotes/ml) were resuspended in HEPES-buffered saline (HBS; 21 mM HEPES, 0.7 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 5 mM KCl, and 6 mM D-glucose, pH 7.1), and DMNPE-luciferin was added to a final concentration of 25 μM . Aliquots of this suspension (100 μl /well) were immediately added to a 96-well black polystyrene microplate, and different SQ concentrations were added once the luminescence had reached a plateau. Changes in luminescence were recorded with an Infinite F200 microplate reader (Tecan Austria GmbH, Austria). Inhibition of recombinant firefly luciferase activity by SQ *in vitro* was discarded by using an ATP determination kit (Invitrogen) in the presence of saturable ATP concentrations. The release of ATP from *L. donovani* promastigotes into the external medium was determined using the same kit.

Determination of $\Delta\Psi_p$. The membrane potential probe DiBAC₄(3) was used to measure the plasma membrane potential ($\Delta\Psi_p$). Parasites (10^7 promastigotes/ml) were incubated with or without 100 μM SQ in HBS for 15, 30, 60, or 120 min at 28°C and then treated with 1 μM DiBAC₄(3) for 10 min at 28°C. Parasites treated with a 10 μM concentration of the depolarizing agent CCCP for 15 min were used as a control. DiBAC₄(3) fluorescence was analyzed by flow cytometry using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) equipped with an argon laser operating at 488 nm. Fluorescence emission between 515 and 545 nm was quantified using Cell Quest software.

Plasma membrane permeabilization. Sytox green dye was used to assess plasma membrane integrity as described previously (21), with some modifications. Briefly, parasites (4×10^6 promastigotes/ml) were treated with 100 μM SQ in HBS for 10, 30, and 60 min at 28°C, washed twice with HBS, and then incubated with 2 μM Sytox green (final concentration) for 15 min at 28°C. The parasites were subsequently transferred to a 96-well microplate (100 μl /well), and fluorescence due to binding of the dye to intracellular nucleic acids was recorded using an Infinite F200 microplate reader (Tecan Austria GmbH, Austria) equipped with 485- and 535-nm filters for excitation and emission wavelengths, respectively. The control for maximum fluorescence was obtained by addition of 0.05% Triton X-100.

Analysis of $\Delta\Psi_m$. The variation of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in promastigotes was monitored using Rh123 accumulation, as described previously (8). Parasites (10^7 promastigotes/ml) were incubated with 50 and 100 μM SQ in HBS for 15 min at 28°C, and then 0.8 μM Rh123 was added and incubated for 5 min. Afterwards, the parasites were washed twice, resuspended in phosphate-buffered saline (PBS), and analyzed by flow cytometry in a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) equipped with an argon laser operating at 488 nm. Fluorescence emission between 515 and 545 nm was quantified using Cell Quest software. Parasites either left untreated or fully depolarized by incubation with 10 μM FCCP for 10 min were used as controls.

Determination of oxygen consumption rates. Oxygen consumption rates were measured using a Clark oxygen electrode (Hansatech, KingsLynn, United Kingdom) at 25°C, using 1 ml of promastigote suspension (10^8 cells/ml) in respiration buffer (10 mM Tris-HCl, 125 mM sucrose, 65 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2.5 mM NaH_2PO_4 , 0.3 mM EGTA, pH 7.2) supplemented with 5 mM succinate and 1 mg/ml fatty acid-free BSA, as described previously (1). Cells were permeabilized with 60 μM digitonin, which allows selective permeation of the plasma membrane but not of the inner mitochondrial membrane (42), and then 100 μM ADP was added to restore state 3 respiration, followed by 250 μM SQ once a steady rate had been reached. Although this concentration is much higher than the 50% effective concentration (EC_{50}) for SQ, it mimics the intracellular concentration of SQ: a previous estimation has found a 10-fold greater enrichment of SQ in cytosol than on the membrane, in equilibrium with the external concentration (5). A set of substrates and inhibitors specific to the different complexes inside the respiratory chain was used to map the site of inhibition by SQ within the respiratory chain. Their final concentrations were 6.7 mM α -glycerophosphate, 1 mM KCN, 0.1 mM TMPD plus 1.7 mM ascorbate, and 2 mM malonate.

SDH activity. A mitochondrion-enriched fraction was obtained as described by Chen et al. (4). *Leishmania* promastigotes were washed twice in PBS, resuspended in hypo-osmotic buffer (5 mM Tris-HCl, pH 7.4) for 10 min at 25°C, and then homogenized on ice using a Potter-Elvehjem homogenizer. Cell debris was

removed by centrifugation ($1,000 \times g$, 10 min, 4°C). The supernatant was then centrifuged at $13,000 \times g$ (20 min, 4°C). The resulting pellet, containing the mitochondrial fraction, was resuspended in isotonic phosphate saline buffer (50 mM Na_2HPO_4 , 90 mM NaCl, and 5 mM KCl, pH 7.2) at a protein concentration of 0.2 mg/ml. Aliquots (100 μl /well) of the mitochondrial fraction were added to a 96-well microplate and incubated for 1 h at 25°C with either SQ (10, 25, 50, 75, 100, 150, and 200 μM) or 10 mM malonate. The SDH activity was measured spectrophotometrically at 415 nm, using a model 680 Bio-Rad microplate enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader, in the presence of 10 mM succinate and 1 mM potassium ferricyanide (13).

Detection of ROS production. The generation of ROS was measured using the cell-permeating probe $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ as described previously (35), with some modifications. The increase in fluorescence due to the oxidation of H_2DCF (non-fluorescent) to the fluorogenic compound 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) is commonly used to detect the generation of reactive oxygen species. Parasites (1×10^7 promastigotes/ml) were incubated with 100 μM SQ in HBS for 30, 60, and 120 min at 28°C and then centrifuged and incubated with $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in HBS for 15 min at 28°C in the dark. DCF fluorescence was measured by flow cytometry using a FACScan flow cytometer, and fluorescence emission was quantified using Cell Quest software. Parasites either left untreated or incubated with 10 μM oligomycin for 15 min to enhance ROS production were used as controls.

Measurement of free intracellular Ca^{2+} . Changes in the cytosolic Ca^{2+} level were monitored using the Ca^{2+} -specific fluorescent probe Fluo4-AM, as described previously (9). Briefly, cells (1×10^7 promastigotes/ml) were incubated with 5 μM Fluo4-AM for 60 min at 28°C in RPMI 1640 medium devoid of phenol red and supplemented with 0.02% pluronic acid F127 to improve dispersion of the nonpolar acetyloxymethyl ester in aqueous media. After incubation, the cells were washed and incubated with 100 μM SQ in fresh medium supplemented or not with 8 mM EGTA. The fluorescence of Ca^{2+} -bound Fluo4 was analyzed at 28°C by using an Aminco-Bowman series 2 fluorometer (excitation and emission wavelengths of 490 and 518 nm, respectively).

Analysis of PS externalization. The exposure of PS at the outer leaflet of the plasma membrane is often a hallmark of apoptosis-like cell death. The externalization of PS was determined by measuring Alexa Fluor 488-conjugated annexin V binding to the cell, thereby exploiting its high Ca^{2+} -dependent affinity for PS, according to the manufacturer's instructions, with slight modifications. Parasites (1×10^7 promastigotes/ml) were treated with or without 50 and 100 μM SQ in HBS for 1 h, washed twice with PBS, and resuspended in annexin binding buffer (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, and 2.5 mM CaCl_2 , pH 7.4) at 5×10^6 parasites/100 μl . A 2.5- μl aliquot of Alexa Fluor-conjugated annexin V and PI at 0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ were added to 100 μl of parasite suspension, which was further incubated for 15 min at room temperature. Afterwards, 400 μl of annexin binding buffer was added, and the fluorescence of the stained parasites was analyzed by flow cytometry using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) equipped with an argon laser operating at 488 nm. Fluorescence intensity was measured on the FL1-H channel for Alexa Fluor 488-conjugated annexin V and on the FL3-H channel for PI, using Cell Quest software.

DNA content analysis. DNA content was analyzed by flow cytometry as described previously (12). Briefly, parasites (1×10^7 promastigotes/ml) were incubated with or without 50 and 100 μM SQ in culture medium for 24 h at 28°C, washed twice with PBS, fixed with ice-cold methanol by incubation for 3 min on ice, resuspended in 500 μl of PBS containing 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PI and 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A, and incubated for 1 h in the dark at room temperature. Dye fluorescence was measured by flow cytometry using a FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA), and fluorescence emission was quantified using Cell Quest software.

Statistical analysis. Statistical comparisons between groups were performed using Student's *t* test. Differences were considered significant at *P* values of <0.05 .

RESULTS

SQ decreases intracellular ATP levels in *L. donovani* promastigotes. We previously determined the EC_{50} of SQ for *L. donovani* promastigotes to be $19.8 \pm 1.9 \mu\text{M}$. The *in vivo* bioluminescence of *Leishmania* parasites of the 3-Luc strain was assayed after incubation with increasing concentrations of SQ (range, 0 to 200 μM). Above 30 μM SQ, the luminescence measured 10 min after drug addition decreased by 50% (Fig. 1). Since luminescence is directly related to the concentration

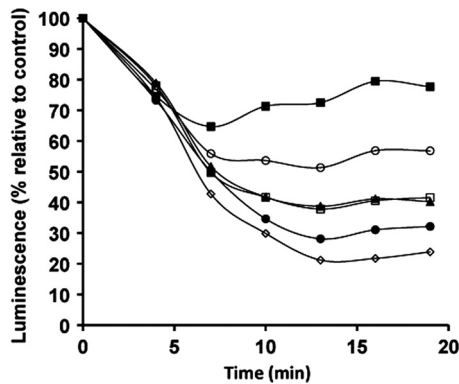


FIG. 1. SQ reduces intracellular ATP levels. Changes in intracellular ATP levels were determined on the basis of changes in the luminescence of *L. donovani* 3-Luc promastigotes treated with the following SQ concentrations: 5 (■), 10 (○), 30 (□), 50 (▲), 100 (●), and 200 (◇) μM. Promastigotes were preloaded with 25 μM DMNPE-luciferin. SQ was added (time zero) once luminescence had reached a plateau, and the luminescence was monitored as described in Materials and Methods. Luminescence changes were normalized with respect to the control untreated parasites. Similar results were obtained in three independent experiments.

of free intracellular ATP under these experimental conditions, SQ induces a fast and irreversible bioenergetic collapse in *L. donovani* promastigotes.

Effect of SQ on plasma membrane integrity. Because SQ inserts into the *Leishmania* membrane, it may cause permeabilization by induction of faulty phospholipid packing (11). Depolarization of the plasma membrane and entry of the vital dye Sytox green (molecular weight = 600) were therefore measured after treatment with SQ to assess membrane permeabilization. SQ was found to induce plasma membrane depolarization, as monitored using DiBAC₄(3) as a fluorescent probe (Fig. 2A); however, this cellular event occurred just after the

decrease of intracellular ATP levels. Furthermore, the assays with the vital dye Sytox green revealed that incubation with 100 μM SQ for 60 min produced only 10% of the fluorescence increase obtained with 0.05% Triton X-100, which induces full permeabilization (data not shown). Leakage of ATP into the supernatant was also measured, and SQ did not induce ATP release into the medium compared with that for the control parasites (<50 pmol ATP × 10⁻⁶ promastigotes).

SQ induces depolarization of ΔΨ_m. Mitochondrial oxidative phosphorylation is the main source of ATP in *Leishmania* parasites (41). To determine whether intracellular ATP decay was associated with an effect of SQ on the mitochondria, the variation of the mitochondrial electrochemical potential was monitored in parasites incubated with SQ. Parasites incubated for 15 min with 100 μM SQ or with 10 μM FCCP as a positive depolarization control showed significant decreases in Rh123 accumulation (3.1- and 3.8-fold, respectively) compared with untreated parasites (*n* = 3; *P* < 0.02), while only 47% of the parasites incubated with 50 μM SQ showed a 3.4-fold decrease of Rh123 accumulation with respect to control parasites (*n* = 3; *P* < 0.01) (Fig. 2B and C).

Oxygen consumption and SDH activity are inhibited by SQ.

In the next step, we set out to determine the molecular target of SQ responsible for intracellular ATP decay. As noted above, oxidative phosphorylation is the main source of ATP for *Leishmania*. To afford unrestricted access of substrates and inhibitors to the respiratory chain, the plasma membrane was permeabilized with digitonin. Preservation of the mitochondrial inner membrane's integrity was confirmed by the increase of respiration after ADP addition (state 3), as it is no longer the limiting substrate for oxidative phosphorylation. The oxygen consumption rate in this state was 8.6 nmol/min × 10⁸ cells (Fig. 3A). The addition of SQ (250 μM final concentration) to digitonin-treated parasites fully inhibited the succinate-dependent respiration (Fig. 3A). Furthermore, the oxygen consump-

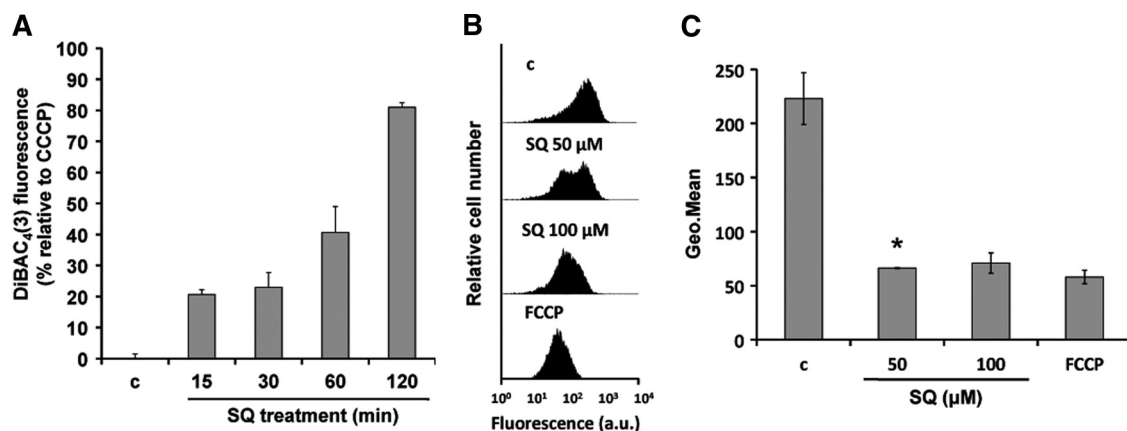


FIG. 2. Effects of SQ on ΔΨ_p and ΔΨ_m. (A) Promastigotes were incubated without (c) and with 100 μM SQ in HBS for 15, 30, 60, and 120 min at 28°C and then treated with a 1 μM concentration of the specific plasma membrane potential probe DiBAC₄(3) for 10 min at 28°C. DiBAC₄(3) fluorescence is represented relative to that of parasites treated with 10 μM CCCP, used as 100% depolarization of the plasma membrane potential. Results are means ± standard deviations (SD) for three independent experiments. (B and C) SQ-induced ΔΨ_m depolarization. *L. donovani* promastigotes were treated without (c) and with 50 and 100 μM SQ for 15 min, stained with 0.8 μM Rh123, and analyzed for fluorescence by flow cytometry. Parasites treated with 10 μM FCCP for 10 min were used as a depolarization control. (B) Histograms from a representative experiment of three independent experiments. (C) Geometric mean (Geo.Mean) channel fluorescence values ± SD for three experiments. The experimental values were significantly different from control values by Student's *t* test (*P* < 0.02). *, geometric mean for the 47% of parasites that showed an Rh123 accumulation decrease compared to the control.

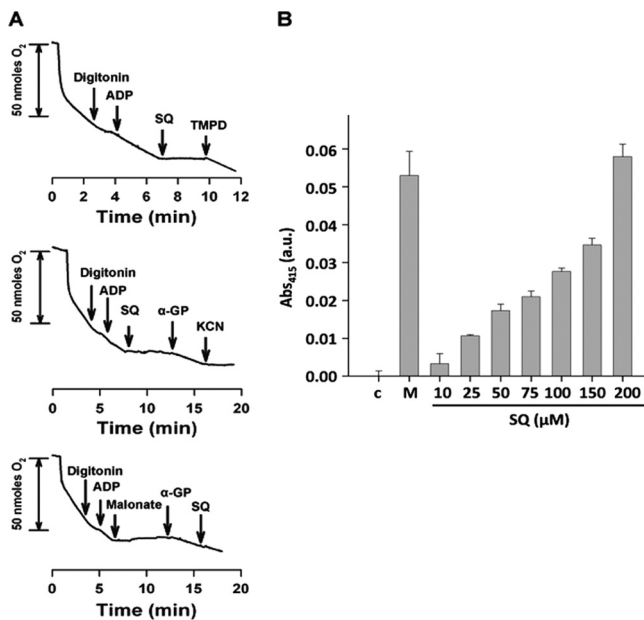


FIG. 3. Identification of the inhibition site of SQ in the respiratory chain of *Leishmania*. (A) Traces represent the oxygen consumption rates of *L. donovani* promastigotes in the presence of 5 mM succinate. Arrows indicate the addition of appropriate substrates and inhibitors at their respective final concentrations, namely, 60 μ M digitonin, 100 μ M ADP, 0.1 mM TMPD plus 1.7 mM ascorbate, 1 mM KCN, 2 mM malonate, 6.7 mM α -glycerophosphate (α -GP), and 250 μ M SQ. (B) SDH activity in the presence of increasing concentrations of SQ. Activity was measured by the decrease of absorbance at 415 nm due to the reduction of ferricyanide by the SDH activity of the mitochondrial fraction in the presence of succinate, as described in Materials and Methods. Error bars indicate the SD. Samples not treated with SQ (c) and samples in the presence of malonate (M), an SDH inhibitor, were used as positive and negative controls, respectively. Activity was measured at 37°C.

tion rate was restored after addition of TMPD-ascorbate, an electron donor for cytochrome *c* (Fig. 3A), thereby ruling out cytochrome *c* oxidase (complex IV) and ATP synthase (complex V), located downstream, as SQ targets and restricting the search to targets upstream of cytochrome *c* (Fig. 4). Addition of 6.7 mM α -glycerophosphate (Fig. 3A), which feeds the electron transport chain through the mitochondrial flavin adenine dinucleotide (FAD)-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase by producing reduced ubiquinone (Fig. 4), partially reverted (60.3% of the original rate) SQ inhibition of respiration (14). This observation confirmed the functionality of complex III in the presence of SQ and pinpointed complex II as the drug target. To verify this hypothesis, succinate-dependent respiration was fully inhibited with malonate at the level of complex II, and α -glycerophosphate was added. Under these conditions, oxygen consumption proceeds only through complex III, and this rate was not inhibited by SQ (Fig. 3A), thereby ruling out complex III and confirming complex II as the sole SQ target within oxidative phosphorylation.

To verify this finding, inhibition of SDH by increasing SQ concentrations was assayed in mitochondrial fractions. Figure 3B shows the dose-dependent inhibition of SDH activity by SQ. Total inhibition of this enzyme was achieved with 10 mM malonate as a control.

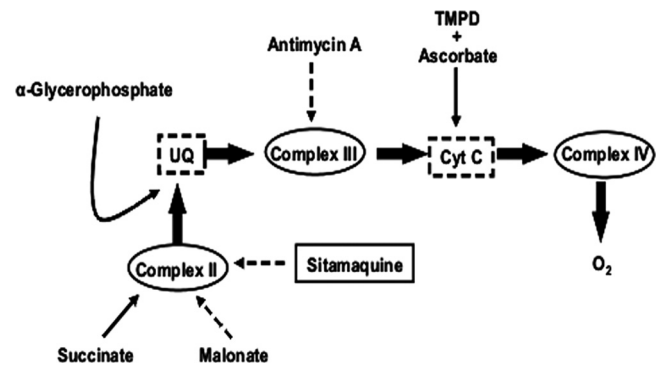


FIG. 4. Scheme of the respiratory chain in *Leishmania*, shown with the specific substrates and inhibitors used in this study. Sites of electron feeding and inhibition are indicated by solid and dotted lines, respectively. UQ, ubiquinone; Cyt C, cytochrome *c*. The role of complex I was based on the concepts compiled in reference 29.

SQ increases ROS production in *Leishmania*. Since mitochondrial depolarization is strongly associated with ROS production, which is induced by a variety of leishmanicidal drugs (2, 7, 23, 31, 33, 34), we determined the potential of SQ to induce ROS production. For this purpose, we used the ROS-sensitive probe H_2DCF in *L. donovani* promastigotes treated with 100 μ M SQ for different incubation times (30, 60, and 120 min) or treated with oligomycin (10 μ M; 15 min) as a positive control for ROS formation. Flow cytometry analysis revealed that SQ induced significant ($n = 3$; $P < 0.01$) ROS production in a time-dependent manner (Fig. 5A and B).

SQ increases free cytosolic Ca^{2+} levels. ROS generation and changes of $\Delta\Psi_m$ are associated with altered intracellular Ca^{2+} homeostasis (25). The fluorescent probe Fluo4 was used to monitor cytosolic Ca^{2+} variation. Promastigotes treated with 100 μ M SQ showed an increased cytosolic Ca^{2+} level compared with untreated control parasites (Fig. 5C). To ascertain the source of the Ca^{2+} responsible for this effect, the experiment was repeated in the presence of EGTA to rule out the entry of external Ca^{2+} . Under these conditions, the fluorescence increase was reduced by 56%, thereby evidencing a dual source for the observed Ca^{2+} increase, namely, release from intracellular stores and entry of external Ca^{2+} , with their contributions being approximately equal.

SQ induces externalization of PS. All of the previous experimental evidence pointed toward an apoptosis-like process of *Leishmania* death. To provide further experimental support for this process, we assayed the externalization of PS, a hallmark of apoptosis. Translocation of PS from the cytoplasmic space into the external leaflet of the plasma membrane was evidenced by the binding of fluorescent annexin V to the parasites. To rule out access of the reagent to the PS pool facing the cytoplasm due to membrane permeabilization, annexin V was incubated together with PI as a control for necrosis. Parasites treated with 100 μ M SQ for 1 h showed a significant, 1.9-fold increase in the percentage of apoptotic promastigotes (annexin V positive and PI negative) by flow cytometry compared with untreated control parasites ($n = 3$; $P < 0.02$), while parasites treated with 50 μ M SQ showed no significant difference (Fig. 6A).

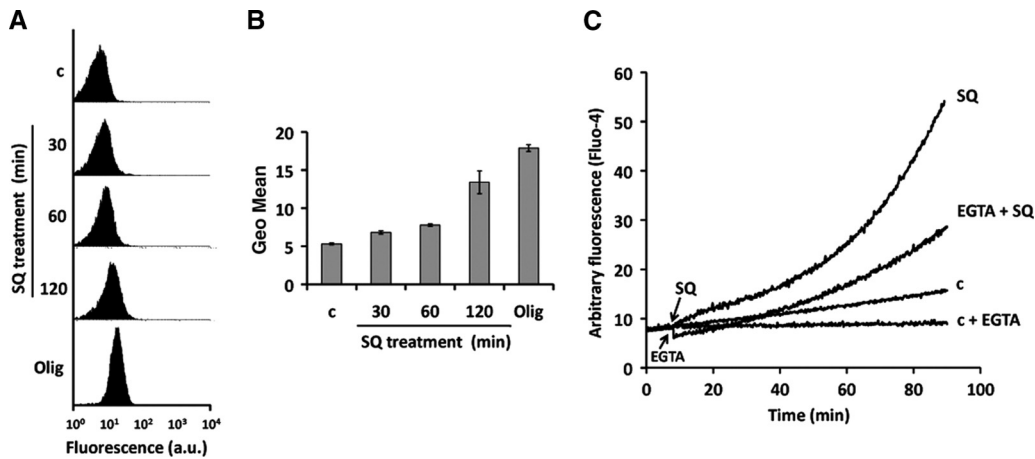


FIG. 5. SQ induces ROS generation and increases cytosolic Ca²⁺ levels. ROS levels were measured using the specific fluorescent dye H₂DCF-DA. *L. donovani* promastigotes were incubated without (c) and with 100 μM SQ for 30, 60, and 120 min and then loaded with 2 μg/ml H₂DCF-DA for 15 min. Oligomycin (Olig) (10 μM; 15 min) was used as a control for ROS generation. The fluorescence intensity was determined by flow cytometry analysis as described in Materials and Methods. (A) Histograms for a representative experiment of three independent ones. (B) Geometric mean (Geo. Mean) channel fluorescence values ± SD for three experiments. The experimental values were significantly different from control values by Student's *t* test (*P* < 0.01). (C) Fluo4-preloaded parasites were treated without (c) and with 100 μM SQ and then analyzed for increasing fluorescence over 90 min at 28°C, using an Aminco-Bowman series 2 spectrometer. The experiments were assessed with and without the presence of the Ca²⁺ chelator EGTA. Arrows indicate the addition of SQ and EGTA. Similar results were obtained in three independent experiments.

SQ increases the sub-G₁ DNA parasite population. SQ-induced chromatin degradation was measured by determining the hypodiploid DNA content in parasites, as monitored by PI fluorescence using flow cytometry. The fluorescence values for cells with DNA degradation were lower than those for G₁ cells (sub-G₁ peak in the DNA histograms) (28). After 24 h of incubation with 50 and 100 μM SQ in culture medium, 17.8 and 38.3% of the parasites, respectively, had DNA in the sub-G₁ region, compared with only 10.7% of untreated control parasites (*n* = 3; *P* < 0.02) (Fig. 6B).

DISCUSSION

Definition of a drug target is an important step in establishing a robust rationale for optimization and design of new surrogate generations from an initial lead. Examples of drug targets in *Leishmania* are rather scarce, with ergosterol, a membrane ligand targeted by amphotericin B, and redox metabolism, a target for antimonials, perhaps being the best-defined targets (6).

SQ was rescued from temporary oblivion after its initial

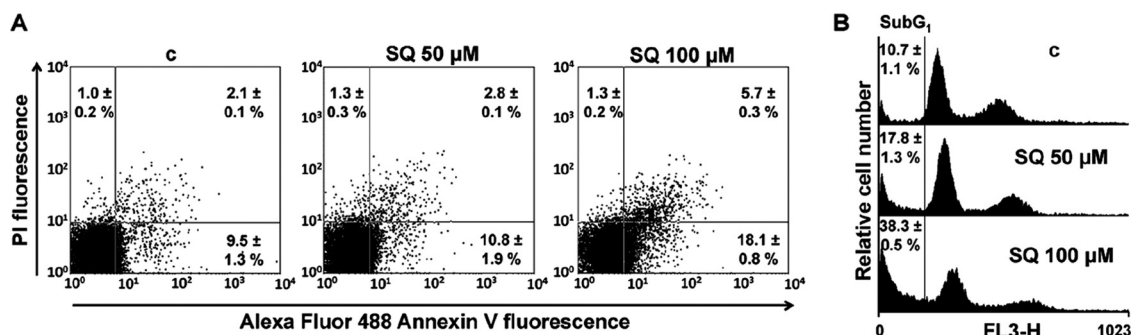


FIG. 6. SQ induces PS externalization and DNA fragmentation. (A) Parasites were treated without (c) and with 50 and 100 μM SQ in HBS for 1 h, costained with Alexa Fluor 488-conjugated annexin V and PI, and analyzed by flow cytometry (FL1 versus FL3) as described in Materials and Methods. Representative dot plots are divided into four quadrants. The percentage of cells in each quadrant is expressed as the mean ± SD for three independent experiments. Viable cells that did not bind annexin V or incorporate PI are represented in the lower left quadrant of each dot plot. The bottom right quadrants indicate apoptotic cells. The percentages of cells in these quadrants, expressed as means ± SD for three independent experiments, were significantly different from control values by *t* test (*P* < 0.02) only for parasites treated with 100 μM SQ. (B) SQ causes an increase of parasites in the sub-G₁ phase. DNA fragmentation was quantified by the percentage of cells in the sub-G₁ DNA region. The DNA content degradation profiles of parasites were determined by flow cytometry and PI staining. Parasites were incubated without (c) or with 50 and 100 μM SQ for 24 h and then loaded with PI as described in Materials and Methods. The distribution of DNA content was analyzed by flow cytometry. The percentages of cells in the sub-G₁ phase, expressed as means ± SD for three independent experiments, were significantly different from control values by *t* test (*P* < 0.02).

successful assay in the 1970s by the Walter Reed Army Institute. Although mitochondria and acidocalcisomes were initially proposed as SQ targets (43, 44), further studies of parasites with acidocalcisomes defective for SQ accumulation showed identical SQ susceptibilities, thus providing clear evidence that the antileishmanial action of SQ is unrelated to its accumulation in acidocalcisomes (18).

In this work, we aimed to pinpoint the target for SQ in *L. donovani* promastigotes. To attain this goal, we carried out a systematic analysis, starting with the general effects of the drug on the parasite and finishing by defining the molecular entity inhibited by this drug. SQ induces a fast and significant decrease of intracellular free ATP levels, thus leading to a bioenergetic collapse of the parasite. This may be due either to a direct inhibition of ATP synthesis or to a plasma membrane permeabilization phenomenon where ATP is leaked through membrane lesions or hydrolyzed in a futile manner by ionic pumps in an attempt to recover initial ionic gradients across the plasma membrane. In support of the last hypothesis, it has been reported that SQ interacts with the plasma membranes of parasites in a two-step mode involving electrostatic binding to anionic phospholipids and further insertion into the hydrophobic matrix to minimize aqueous exposure of its rather hydrophobic quinoline nucleus (5, 11). Hence, a feasible perturbation of phospholipid packing (5, 11) that leads to membrane permeability may ensue. This assumption was not supported experimentally, however, as plasma membrane permeabilization barely reached 10% of full permeabilization after 1 h of incubation with 100 μ M SQ. Thus, inhibition of ATP synthesis was the only remaining option to account for collapse of the ATP levels. In contrast to the case for other trypanosomatids, such as the bloodstream trypomastigotes of African trypanosomes, the contribution of glycolysis to the overall ATP pool in *Leishmania* is considerably lower than that from oxidative phosphorylation (38). Hence, inhibition of ATP synthesis necessarily implies inhibition of oxidative phosphorylation, as confirmed by the SQ-induced inhibition of the oxygen consumption rate of these parasites. Polarographic analysis of the oxygen consumption rate of digitonin-treated parasites showed that complex II (SDH) was the target for SQ, after other targets within the oxidative phosphorylation pathway were systematically discarded by the use of selective substrates and inhibitors. Thus, reversion of SQ inhibition by TMPD plus ascorbate and α -glycerophosphate excluded complex IV and III as SQ targets, respectively, as well as the ATP synthase downstream of complex IV. Although complex I is present in trypanosomatids, it is defective in four subunits supposedly involved in proton extrusion, thereby excluding this complex from energy generation and relegating its activity to maintenance of the mitochondrial NADH/NAD ratio (29). SDH activity in the mitochondrion-enriched fractions was inhibited in a dose-dependent manner by SQ.

Although complexes I and III are the main producers of ROS in mammalian cells (26), complex II may also act as a source of ROS (15). Indeed, ROS production by inhibition of complex II is increasingly considered an objective for anticancer drugs that target mitochondria (10), thereby triggering apoptosis in these cells. Complex II has also been demonstrated to be a good target in *Leishmania* for phenyl-phenale-

nonones (19), benzophenone-derived biphosphonium surrogates (20), and thenoyltrifluoroacetone (24).

ROS production triggers the increase of intracellular Ca^{2+} and subsequent steps of the apoptotic process in *Leishmania*. Interestingly, the Ca^{2+} pools involved may vary according to the stimulus. Thus, whereas oxidative stress induced by H_2O_2 involves mobilization from intra- and extracellular Ca^{2+} pools (25), only the intracellular pool is implicated after complex II poisoning with thenoyltrifluoroacetone plus pentamidine (24). Although both external and internal sources account for this process for SQ, the question of whether the entry of external Ca^{2+} is due to unspecific and transitory membrane permeabilization by SQ or to effects on Ca^{2+} channels remains unanswered.

In any case, we propose the following sequence of events triggered by SQ, as described for other leishmanicidal drugs, including antimonials (24, 25, 35): ROS production \rightarrow oxidative stress \rightarrow increase of intracellular Ca^{2+} \rightarrow final steps of apoptosis (PS externalization plus chromatin degradation).

In summary, we have demonstrated that SQ acts against the respiratory chain complex II, an essential target for *Leishmania*. This result, together with related findings for tafenoquine, which acts on the next downstream complex in the respiratory chain (2), demonstrates the versatility of the 8-aminoquinoline scaffold for the development of leishmanicidal drugs. The recently described improvement of 8-aminoquinolines (27) therefore appears to be an attractive strategy for development of analogs with promising antimalarial, antimicrobial, and antileishmanial activities, together with lower hematological toxicity. Furthermore, SQ was recently suggested as a candidate for drug combinations (32), thus supporting its use for reduced drug dosage, toxicity, and therapeutic failure.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Spanish grant SAF2009-07440 (to F.G.), by ISCIII-Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET)-FEDER grants RD06/0021/0002 (F.G.) and RD 06/0021/0006 (L.R.), by European Union grants HEALTH-2007-223414 and FIS PS09-01928 (L.R.), by the Plan Andaluz de Investigación (BIO130), and by FEDER funds from the European Union to F.G.

We acknowledge the support of GlaxoSmithKline (Greenford, United Kingdom), who provided the sitamaquine used throughout this research work.

REFERENCES

1. Alvarez-Fortes, E., L. M. Ruiz-Perez, F. Bouillaud, E. Rial, and L. Rivas. 1998. Expression and regulation of mitochondrial uncoupling protein 1 from brown adipose tissue in *Leishmania major* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **93**:191–202.
2. Carvalho, L., et al. 2010. Tafenoquine, an antiplasmodial 8-aminoquinoline, targets *Leishmania* respiratory complex III and induces apoptosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:5344–5351.
3. Chappuis, F., et al. 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* **5**:873–882.
4. Chen, M., L. Zhai, S. B. Christensen, T. G. Theander, and A. Kharazmi. 2001. Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by chalcones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2023–2029.
5. Coimbra, E. S., et al. 2010. Mechanism of interaction of sitamaquine with *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.* **65**:2548–2555.
6. Croft, S. L., S. Sundar, and A. H. Fairlamb. 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**:111–126.
7. Das, R., A. Roy, N. Dutta, and H. K. Majumder. 2008. Reactive oxygen species and imbalance of calcium homeostasis contributes to curcumin induced programmed cell death in *Leishmania donovani*. *Apoptosis* **13**:867–882.
8. Diaz-Achirica, P., J. Ubach, A. Guinea, D. Andreu, and L. Rivas. 1998. The plasma membrane of *Leishmania donovani* promastigotes is the main target

- for CA(1-8)M(1-18), a synthetic cecropin A-melittin hybrid peptide. *Biochem. J.* **330**:453–460.
9. **Dolai, S., R. K. Yadav, S. Pal, and S. Adak.** 2009. Overexpression of mitochondrial *Leishmania major* ascorbate peroxidase enhances tolerance to oxidative stress-induced programmed cell death and protein damage. *Eukaryot. Cell* **8**:1721–1731.
 10. **Dong, L. F., et al.** 2011. Mitochondrial targeting of vitamin E succinate enhances its pro-apoptotic and anti-cancer activity via mitochondrial complex II. *J. Biol. Chem.* **286**:3717–3728.
 11. **Duenas-Romero, A. M., P. M. Loiseau, and M. Saint-Pierre-Chazalet.** 2007. Interaction of sitamaquine with membrane lipids of *Leishmania donovani* promastigotes. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**:246–252.
 12. **Dutta, A., et al.** 2007. Racemoside A, an anti-leishmanial, water-soluble, natural steroidal saponin, induces programmed cell death in *Leishmania donovani*. *J. Med. Microbiol.* **56**:1196–1204.
 13. **Elingold, I., et al.** 2008. Mitochondrial toxicity and antioxidant activity of a prenylated flavonoid isolated from *Dalea elegans*. *Chem. Biol. Interact.* **171**:294–305.
 14. **Guerra, D. G., A. Decottignies, B. M. Bakker, and P. A. Michels.** 2006. The mitochondrial FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase of Trypanosomatidae and the glycosomal redox balance of insect stages of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania spp.* *Mol. Biochem. Parasitol.* **149**:155–169.
 15. **Ishii, N., T. Ishii, and P. S. Hartman.** 2007. The role of the electron transport SDHC gene on lifespan and cancer. *Mitochondrion* **7**:24–28.
 16. **Jha, T. K., et al.** 2005. A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**:1005–1011.
 17. **Jhingran, A., B. Chawla, S. Saxena, M. P. Barrett, and R. Madhubala.** 2009. Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **164**:111–117.
 18. **Lopez-Martin, C., J. M. Perez-Victoria, L. Carvalho, S. Castanys, and F. Gamarro.** 2008. Sitamaquine sensitivity in *Leishmania* species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:4030–4036.
 19. **Luque-Ortega, J. R., et al.** 2004. Fungus-elicited metabolites from plants as an enriched source for new leishmanicidal agents: antifungal phenyl-phenalenone phytoalexins from the banana plant (*Musa acuminata*) target mitochondria of *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1534–1540.
 20. **Luque-Ortega, J. R., P. Reuther, L. Rivas, and C. Dardonville.** 2010. New benzophenone-derived bisphosphonium salts as leishmanicidal leads targeting mitochondria through inhibition of respiratory complex II. *J. Med. Chem.* **53**:1788–1798.
 21. **Luque-Ortega, J. R., and L. Rivas.** 2007. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome *c* oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1327–1332.
 22. **Luque-Ortega, J. R., J. M. Saugar, C. Chiva, D. Andreu, and L. Rivas.** 2003. Identification of new leishmanicidal peptide lead structures by automated real-time monitoring of changes in intracellular ATP. *Biochem. J.* **375**:221–230.
 23. **Mandal, G., et al.** 2007. Increased levels of thiols protect antimony unresponsive *Leishmania donovani* field isolates against reactive oxygen species generated by trivalent antimony. *Parasitology* **134**:1679–1687.
 24. **Mehta, A., and C. Shaha.** 2004. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **279**:11798–11813.
 25. **Mukherjee, S. B., M. Das, G. Sudhandiran, and C. Shaha.** 2002. Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Biol. Chem.* **277**:24717–24727.
 26. **Murphy, M. P.** 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* **417**:1–13.
 27. **Nanayakkara, N. P., et al.** 2008. Antiparasitic activities and toxicities of individual enantiomers of the 8-aminoquinoline 8-[(4-amino-1-methylbutyl)amino]-6-methoxy-4-methyl-5-[3,4-dichlorophenoxy]quinoline succinate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:2130–2137.
 28. **Nicoletti, I., G. Migliorati, M. C. Pagliacci, F. Grignani, and C. Riccardi.** 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* **139**:271–279.
 29. **Oppendoes, F. R., and P. A. Michels.** 2008. Complex I of Trypanosomatidae: does it exist? *Trends Parasitol.* **24**:310–317.
 30. **Richard, J. V., and K. A. Werbovetz.** 2010. New antileishmanial candidates and lead compounds. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**:447–455.
 31. **Roy, A., et al.** 2008. Mitochondria-dependent reactive oxygen species-mediated programmed cell death induced by 3,3'-diindolylmethane through inhibition of F₀F₁-ATP synthase in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Mol. Pharmacol.* **74**:1292–1307.
 32. **Seifert, K., J. Munday, T. Syeda, and S. L. Croft.** 2011. In vitro interactions between sitamaquine and amphotericin B, sodium stibogluconate, miltefosine, paromomycin and pentamidine against *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.* **66**:850–854.
 33. **Sen, N., et al.** 2007. Apoptosis is induced in leishmanial cells by a novel protein kinase inhibitor withaferin A and is facilitated by apoptotic topoisomerase I-DNA complex. *Cell Death Differ.* **14**:358–367.
 34. **Sen, N., et al.** 2004. Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Cell Death Differ.* **11**:924–936.
 35. **Sudhandiran, G., and C. Shaha.** 2003. 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.* **278**:25120–25132.
 36. **Sundar, S., and J. Chakravarty.** 2008. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert Opin. Invest. Drugs* **17**:787–794.
 37. **Tekwani, B. L., and L. A. Walker.** 2006. 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **19**:623–631.
 38. **Tielens, A. G., and J. J. van Hellemond.** 2009. Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. *Trends Parasitol.* **25**:482–490.
 39. **Vale, N., R. Moreira, and P. Gomes.** 2009. Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur. J. Med. Chem.* **44**:937–953.
 40. **van Griensven, J., et al.** 2010. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* **10**:184–194.
 41. **van Hellemond, J. J., and A. G. Tielens.** 1997. Inhibition of the respiratory chain results in a reversible metabolic arrest in *Leishmania* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **85**:135–138.
 42. **Vercesi, A. E., C. F. Bernardes, M. E. Hoffmann, F. R. Gadelha, and R. Docampo.** 1991. Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ. *J. Biol. Chem.* **266**:14431–14434.
 43. **Vercesi, A. E., and R. Docampo.** 1992. Ca²⁺ transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca²⁺, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. *Biochem. J.* **284**:463–467.
 44. **Vercesi, A. E., C. O. Rodrigues, R. Catisti, and R. Docampo.** 2000. Presence of a Na(+)/H(+) exchanger in acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by anti-leishmanial drugs. *FEBS Lett.* **473**:203–206.
 45. **Wasunna, M. K., et al.** 2005. A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **73**:871–876.
 46. **Yeates, C.** 2002. Sitamaquine (GlaxoSmithKline/Walter Reed Army Institute). *Curr. Opin. Invest. Drugs* **3**:1446–1452.

ARTICULO IV

Tafenoquine, an Antiplasmodial 8-Aminoquinoline, Targets *Leishmania* Respiratory Complex III and Induces Apoptosis.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 54, p. 5344-51; 2010.

Luis Carvalho, Juan Román Luque-Ortega, José Ignacio Manzano, Santiago Castanys, Luis Rivas y Francisco Gamarro.

La tafenoquina, una 8-aminoquinolina análoga de la primaquina, con la que se están llevando a cabo ensayos clínicos de fase IIb/III para el tratamiento y la prevención de la malaria, puede representar una alternativa para el tratamiento de la leishmaniasis dado que ha mostrado ser eficaz frente infecciones experimentales de *Leishmania donovani* en ratón. En este trabajo, hemos estudiado el mecanismo de acción de la tafenoquina frente a *Leishmania*. Al igual que sucede con la sitamaquina, la toxicidad de la tafenoquina es independiente del contenido de acidocalcisomas. La tafenoquina afecta al metabolismo energético de los promastigotes de *Leishmania*, causando una rápida caída en el nivel de ATP intracelular sin afectar la permeabilidad de la membrana plasmática. La tafenoquina induce disfunción mitocondrial a través de la inhibición de la citocromo c reductasa (complejo III de la cadena respiratoria), lo que lleva aparejado una disminución en la tasa de consumo de oxígeno y la despolarización del potencial de la membrana mitocondrial; a esto le sucede una producción de especies reactivas de oxígeno, la elevación del nivel de Ca^{2+} libre intracelular y una posterior fragmentación del ADN. En base a estos resultados, concluimos que la tafenoquina tiene como blanco de acción en *Leishmania* a la mitocondria, e induce la muerte del parásito mediante un proceso similar a la apoptosis.

Tafenoquine, an Antiplasmodial 8-Aminoquinoline, Targets *Leishmania* Respiratory Complex III and Induces Apoptosis[∇]

Luis Carvalho,¹ Juan Román Luque-Ortega,² José Ignacio Manzano,¹ Santiago Castanys,¹
Luis Rivas,^{2*} and Francisco Gamarro^{1*}

Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra,” CSIC, Granada, Spain,¹ and Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid, Spain²

Received 9 June 2010/Returned for modification 6 July 2010/Accepted 30 August 2010

Tafenoquine (TFQ), an 8-aminoquinoline analogue of primaquine, which is currently under clinical trial (phase IIb/III) for the treatment and prevention of malaria, may represent an alternative treatment for leishmaniasis. In this work, we have studied the mechanism of action of TFQ against *Leishmania* parasites. TFQ impaired the overall bioenergetic metabolism of *Leishmania* promastigotes, causing a rapid drop in intracellular ATP levels without affecting plasma membrane permeability. TFQ induced mitochondrial dysfunction through the inhibition of cytochrome *c* reductase (respiratory complex III) with a decrease in the oxygen consumption rate and depolarization of mitochondrial membrane potential. This was accompanied by ROS production, elevation of intracellular Ca²⁺ levels and concomitant nuclear DNA fragmentation. We conclude that TFQ targets *Leishmania* mitochondria, leading to an apoptosis-like death process.

Leishmaniasis includes a wide variety of clinical manifestations caused by the protozoan parasite *Leishmania*. Visceral leishmaniasis is the most severe form of the disease and is usually fatal if not treated (<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>). In the absence of a reliable vaccine, leishmaniasis treatment relies exclusively on chemotherapy. Resistance to organic pentavalent antimonials (until recently considered to be the standard treatment) in northeast India (4), together with the severe side effects associated with their use, has led to the use of alternative treatments based on the incorporation of drugs such as amphotericin B, miltefosine, and paromomycin into the arsenal of antileishmanial drugs (8). Nevertheless, the limited number of active drugs has prompted the WHO to recommend a combined therapy in order to extend the life expectancy of these compounds.

Among the new drugs under development, sitamaquine (WR6026; GlaxoSmithKline), an 8-aminoquinoline, currently under phase IIb clinical trials, represents a promising drug for the oral treatment of leishmaniasis (35). In addition, another 8-aminoquinolines have been synthesized and evaluated for their leishmanicidal activity (29, 36). However, the leishmanicidal mechanism of 8-aminoquinolines is still unknown. Sitamaquine, for example, accumulates in the acidocalcisomes, but this organelle has been ruled out as its final target (17). The collapse of mitochondrial potential in digitonized *Leishmania donovani* promastigotes has also been reported (39). Tafenoquine (TFQ), formerly known as WR238605, is an analogue of

primaquine with much lower toxicity than the parental drug. It has demonstrated significant leishmanicidal activity in the mouse experimental model (41) and may represent an alternative treatment for leishmaniasis.

In the present study, we have shown that TFQ inhibits the mitochondrial cytochrome *c* reductase of *Leishmania* promastigotes. This inhibition causes a drop in the intracellular ATP levels of the parasite and the loss of mitochondrial membrane potential. TFQ induces ROS production and deregulation of Ca²⁺ homeostasis, followed by nicking and fragmentation of DNA in *Leishmania* promastigotes leading to an apoptosis-like death. Our results provide the first insight into the mechanistic lethal pathway of an 8-aminoquinoline in *Leishmania*. This information may be useful for the design of more specific and less toxic compounds against leishmaniasis.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Tafenoquine (TFQ) was kindly provided by GlaxoSmithKline (Greenford, United Kingdom). A stock solution of 10 mM TFQ was prepared in ethanol. DMNPE-luciferin {D-luciferin-1-[-(4, 5-dimethoxy-2-nitrophenyl) ethyl ester]}, Fluo4-AM, LysoTracker Green DND-26, MitoSOX Red, Pluronic F-127, rhodamine 123 (Rh123) and SYTOX Green, were purchased from Invitrogen (Carlsbad, CA). Fatty acid-free bovine serum albumin (BSA), digitonin, ADP, antimycin A, ascorbate, cytochrome *c* (from equine heart), FCCP (carbonyl cyanide 4-trifluoromethoxyphenylhydrazone), α -glycerophosphate, malonate, MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide), KCN, TMPD (tetramethyl-*p*-phenylenediamine), succinate, propidium iodide (PI), and Triton X-100 were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). All other chemicals were of the highest quality available.

Strains and parasite cultures. *Leishmania donovani* promastigotes (MHOM/ET/67/HU3) were grown at 28°C in RPMI 1640-modified medium (Invitrogen) supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (HIFBS; Invitrogen). The *L. donovani* strain MHOM/SD/00/1S-2D and its derived line, *L. donovani* 3-Luc, which expresses cytoplasmic firefly luciferase (19), were grown at 25°C in RPMI 1640 medium with 10% HIFBS. *L. major* MHOM/JL/80/Friedlin parental and AP38-null mutant (Δ AP3) were kindly provided by J. Mottram (Institute of Biomedical and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom) (2) and cultured at 28°C in RPMI 1640-modified medium supplemented with 20% HIFBS.

* Corresponding author. Mailing address for F. Gamarro: Instituto de Parasitología y Biomedicina “López-Neyra,” CSIC, Granada, Spain. Phone: 34 958 181667. Fax: 34 958 181632. E-mail: gamarro@ipb.csic.es. Mailing address for L. Rivas: Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Ramiro de Maeztu 9, E-28040 Madrid, Spain. Phone: 34 91 8373112, ext. 4234. Fax: 34 91 5360432. E-mail: luis.rivas@cib.csic.es.

[∇] Published ahead of print on 13 September 2010.

TFQ sensitivity assay. Logarithmic-phase parasites (2×10^6 promastigotes/ml) were incubated with TFQ (0.5 to 20 μM) for 72 h at 28°C in culture medium. Cell proliferation was determined by the MTT colorimetric assay, as described previously (15). Parasites incubated with 0.2% ethanol were used as control.

Bioluminescence assays. The *in vivo* variation in intracellular ATP levels was monitored in promastigotes expressing a cytoplasmic form of firefly luciferase, as described previously (19). Briefly, parasites from the *L. donovani* 3-Luc strain (2×10^7 promastigotes/ml) were resuspended in HEPES-buffered saline (HBS; 21 mM HEPES, 0.7 mM Na_2HPO_4 , 137 mM NaCl, 5 mM KCl and 6 mM D-glucose, pH 7.1) and DMNPE-luciferin was added at a final concentration of 25 μM . Aliquots of this suspension (100 μl /well) were immediately distributed into a 96-well black polystyrene microplate. Once the luminescence reached a plateau, different TFQ concentrations were added. Changes in luminescence were recorded with an Infinite F200 microplate reader (Tecan Austria GmbH, Austria). *In vitro* inhibition of recombinant firefly luciferase activity by TFQ was discarded using the ATP determination kit (Invitrogen) in the presence of saturable ATP concentrations. The release of ATP from *L. donovani* promastigotes into the external medium was determined using the same kit.

Plasma membrane permeabilization. Plasma membrane integrity was assessed by the entry of the vital dye SYTOX Green, as described previously (20) with some modifications. Briefly, parasites (2×10^6 promastigotes/ml) were treated with 1, 5, and 10 μM TFQ for 45 min at 28°C in HBS, washed twice with HBS, and incubated with 2 μM SYTOX Green (final concentration) for 15 min at 28°C. The parasites were then transferred into a 96-well microplate (100 μl /well) and fluorescence, due to the binding of the dye to intracellular nucleic acids, was recorded with an Infinite F200 microplate reader (Tecan Austria GmbH, Austria) equipped with 485- and 535-nm filters for excitation and emission wavelengths, respectively. Control for maximum fluorescence was obtained by addition of 0.05% Triton X-100.

Analysis of $\Delta\Psi_m$. The variation of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in the promastigotes was monitored using rhodamine 123 (Rh123) accumulation, as described previously (9). To this end, the parasites (10^7 promastigotes/ml) were incubated with 5 μM TFQ for 1, 5, 10, and 30 min at 28°C in HBS, and then 0.8 μM Rh123 was added and incubated for 5 min. Subsequently, the parasites were washed twice, resuspended in phosphate-buffered saline (PBS) and analyzed by flow cytometry in a FACScan flow cytometer (Becton-Dickinson, San Jose, CA) equipped with an argon laser operating at 488 nm. Fluorescence emission between 515 and 545 nm was quantified using Cell Quest software. Parasites that were either untreated or fully depolarized by incubation with 10 μM FCCP for 10 min were used as controls.

Determination of oxygen consumption rates. Oxygen consumption rates were measured with a Clark-oxygen electrode (Hansatech, KingsLynn, United Kingdom) at 25°C, using 1 ml of promastigote suspension (10^8 cells/ml) in respiration buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.2, 125 mM saccharose, 65 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2.5 mM NaH_2PO_4 , 0.3 mM EGTA) supplemented with 5 mM succinate and 1 mg/ml fatty acid-free BSA, as described previously (1). Cells were permeabilized with 60 μM digitonin, which allows selective permeation of the plasma membrane but not of the inner mitochondrial membrane (38). Subsequently, 100 μM ADP was added to restore state 3 respiration; once a steady rate was reached, TFQ was added. In order to map the site of inhibition by TFQ within the respiratory chain, a set of substrates and inhibitors specific to the different complexes inside the respiratory chain were used. Their final concentrations were: 6.7 mM α -glycerophosphate, 0.1 mM TMPD plus 1.7 mM ascorbate, and 2 mM malonate.

Isolation of mitochondrial fraction. A mitochondrion-enriched fraction was obtained as described by Chen et al. (5). *Leishmania* promastigotes were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS), resuspended in hypo-osmotic buffer (5 mM Tris-HCl, pH 7.4) for 10 min at 25°C, and homogenized in a Potter-Elvehjem homogenizer on ice. Cell debris was removed by centrifugation ($1,000 \times g$, 10 min, 4°C). The supernatant was next centrifuged at $13,000 \times g$ (20 min, 4°C). The pellet, containing the mitochondrial fraction, was resuspended in 75 mM sodium phosphate, pH 7.4, and the protein content was adjusted to 2 mg/ml, as measured using Bradford reagent (Bio-Rad).

Measurement of CcR activity. Determination of cytochrome *c* reductase (CcR) activity was carried out according to Sottocasa et al. (34), based on the reduction of oxidized cytochrome *c*. Briefly, different TFQ concentrations were added to the incubation mixture (200 μg /ml of mitochondrial fraction, 0.02% Triton X-100 and 32 μM oxidized cytochrome *c* in 75 mM sodium phosphate pH 7.4). The reaction started by addition of 10 mM succinate (final concentration). The increase of absorbance at 550 nm was monitored for 5 min at 37°C in a Varioskan Flash (Thermo Scientific) microplate reader. Oxidation of reduced cytochrome *c* by cytochrome *c* oxidase (respiratory complex IV) was precluded by previous inhibition of this enzyme with 10 mM KCN. Samples without suc-

cinatate or in the presence of 2 μM antimycin A, an inhibitor of cytochrome *c* reductase, were taken as controls.

Determination of ROS production. To detect mitochondrial reactive oxygen species (ROS) production we used the cell-permeable fluorogenic probe MitoSOX Red, which targets mitochondria selectively, being oxidized by local superoxide (32). Parasites (2×10^7 promastigotes/ml) were preincubated with 0.5 μM MitoSOX Red for 30 min at 28°C in HBS and then treated with 5 μM TFQ for 1, 5, 10, and 30 min. Fluorescence emission at 580 nm was measured by flow cytometry, in a FACScan flow cytometer, with an excitation wavelength of 488 nm. Antimycin A (0.3 μg /ml) was used as a positive control for ROS generation.

Variation in free intracellular Ca^{2+} . Changes in the cytosolic Ca^{2+} levels were monitored using Fluo4-AM, as described previously (11). Briefly, parasites (2×10^7 promastigotes/ml) were incubated with 5 μM Fluo4-AM for 60 min at 28°C in RPMI 1640 medium devoid of phenol red and supplemented with 0.02% pluronic acid F127 to improve dispersion of the nonpolar acetyloxy-methyl ester in aqueous media. After incubation, cells were washed and incubated with 2, 5, and 10 μM TFQ in a fresh medium, with and without addition of 8 mM EGTA. The fluorescence of Ca^{2+} -bound Fluo4 was analyzed at 28°C in an Aminco-Bowman series 2 fluorometer (490/518 nm, excitation and emission wavelengths, respectively). Parasites treated with NH_4Cl (20 mM) were used as positive control for calcium release from intracellular organelles as described previously (18).

TFQ-induced alkalinization. Parasites (4×10^6 promastigotes/ml), treated either with or without 5 μM TFQ (10 min at 28°C), were incubated with 100 nM the acidotropic dye LysoTracker Green DND-26 for 10 min in HBS at 28°C. Afterwards, the parasites were washed and then resuspended in PBS, and dye fluorescence was measured by flow cytometry in a FACScan flow cytometer (excitation at 488 nm; emission between 515 and 545 nm).

TFQ localization. Using the intrinsic fluorescence of TFQ (excitation at 340 nm; emission at 388 nm), its intracellular distribution was ascertained by fluorescence microscopy. Parasites were treated with 5 μM TFQ for 15 min at 28°C in culture medium, washed successively with the same medium and then with PBS, and finally observed under a Zeiss Axiophot (Germany) epifluorescence microscope; images were captured with a SPOT camera (Diagnostic Instrument, Inc.). Parasites labeled with LysoTracker Green (as mentioned above) were used to visualize the distribution of acidocalcisomes and analyzed in parallel by fluorescence microscopy.

Analysis of autophagy in *Leishmania* induced by TFQ treatment. Induction of autophagy by TFQ was analyzed in *L. donovani* lines using autophagy-related protein 8 (ATG8) fused to green fluorescent protein (GFP) as a marker of autophagosomes (3). Parasites were transfected with an episomal expression vector plasmid containing the GFP-ATG8 construct, kindly provided by J. Mottram, as described previously (31). Parasites expressing GFP-ATG8 were treated with 5 μM TFQ for 24 h in culture medium at 28°C. The presence of autophagic bodies was observed under a Zeiss Axiophot epifluorescence microscope. Images were captured with a SPOT camera. The percentage of autophagosome-bearing cells and the number of these structures per cell were analyzed. At least four series of 200 cells were counted, and this was repeated three times.

DNA fragmentation analysis. DNA fragmentation was analyzed by terminal deoxynucleotidyltransferase (TdT)-mediated dUTP end labeling (TUNEL) using the Roche *in situ* cell death detection kit. Parasites (10^7 promastigotes/ml) were incubated with 5, 10, and 20 μM TFQ for 4 h at 28°C in culture medium, fixed with 4% formaldehyde in PBS for 15 min at room temperature, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 2 min at 4°C. The cells were labeled with TUNEL reaction mixture following the manufacturer's instructions. Fluorescence was measured by flow cytometry, in a FACScan flow cytometer, with excitation and emission wavelengths of 488/520 nm. Unfixed parasites were labeled with 0.4 μg /ml PI for 5 min at 4°C and measured at 488/617 nm to detect necrotic cells.

Additionally, DNA fragmentation was detected as described by Vergnes et al. (40). After treatment with TFQ, total DNA was extracted from the parasites using the "salting-out DNA extraction" method. Briefly, parasites were pelleted and treated with lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 8.0, 0.5% SDS, 200 mM NaCl, 100 μg /ml proteinase K) for 1 h at 65°C. Two volumes of ice-cold absolute ethanol were added, and the DNA was centrifuged for 15 min at $13,000 \times g$. The supernatant was discarded, and the dried pellet was resuspended in 100 μl of a mixture of 10 mM Tris-HCl, pH 7.4, and 0.1 mM EDTA and treated with RNase A (0.3 μg /ml) for 1 h at 37°C. The DNA was analyzed on 2% agarose gel.

RESULTS

TFQ inhibits *Leishmania* proliferation in vitro. After 72 h of TFQ exposure, proliferation of *L. donovani* and *Leishmania major* promastigotes was inhibited at the micromolar range in a dose-dependent manner, with 50% effective concentrations (EC_{50} s) of $5.6 \pm 1.0 \mu\text{M}$ and $5.3 \pm 2.1 \mu\text{M}$ for *L. donovani* MHOM/ET/67/HU3 and MHOM/SD/00/1S-2D, respectively, and $2.2 \pm 0.2 \mu\text{M}$ and $2.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$ for *L. major* MHOM/JL/80/Friedlin parental strain and ΔAP3 mutant, respectively.

TFQ reduces the intracellular ATP level of *L. donovani* promastigotes. In order to ascertain the general metabolic processes underlying the leishmanicidal effect of this drug, the bioenergetic state of *L. donovani* promastigotes was first studied. Parasites of the 3-Luc strain, expressing a cytoplasmic form of luciferase, were employed together with the membrane-permeable luciferase substrate DMNPE-luciferin. Under these conditions, the luminescence of these promastigotes is directly related to the concentration of free cytoplasmic ATP, the limiting substrate of the reaction (21). TFQ decreased the luminescence in a concentration-dependent manner, reaching the respective endpoint level about 15 min after addition of the drug (Fig. 1A), leading to the bioenergetic collapse of the promastigotes.

TFQ does not affect the plasma membrane integrity. One of the more likely reasons to account for the observed decrease in the intracellular ATP content may be that TFQ compromises plasma membrane integrity. To test this hypothesis, the entrance of the vital dye SYTOX Green (molecular weight [MW], 600) into the cytoplasm of *L. donovani* promastigotes, induced by TFQ, was monitored. At the highest TFQ concentration assayed (10 μM , 45 min), the increase in SYTOX Green fluorescence accounted for only 11% of the maximal permeabilization, defined as that obtained with 0.05% Triton X-100 (Fig. 1B), ruling out the formation of large lesions on the parasite plasma membrane as a key event in the mechanism of action of TFQ. Furthermore, we measured leakage of ATP into the supernatant; TFQ does not induce an enhanced ATP liberation to the medium when compared to the control parasites ($<50 \text{ pmol ATP} \times 10^{-6} \text{ cells}$).

TFQ induces $\Delta\Psi_m$ depolarization. The decrease in intracellular ATP levels caused by TFQ is consistent with impairment of the processes involved in ATP synthesis. In *Leishmania*, mitochondrial oxidative phosphorylation accounts for most of the ATP expenditure of the parasite, with glycolysis being of minor importance in this process (37). As $\Delta\Psi_m$ is essential to drive mitochondrial ATP synthesis, its variation with TFQ was monitored in *Leishmania* promastigotes by cytofluorometry using Rh123 accumulation. After the addition of 5 μM TFQ to promastigotes, in the first 30 min, dye accumulation falls to levels approximately 7 times lower than that for the untreated parasites, similar to those obtained by incubation of parasites with the uncoupling reagent FCCP (10 μM , 30 min), used as control for full depolarized promastigotes (Fig. 2).

Inhibition of CcR activity by TFQ. Mitochondrial respiratory chain complexes I, III, and IV drive the maintenance of $\Delta\Psi_m$ through the proton pumping generated during electron transfer. In trypanosomatids, the contribution of complex I to this process was questioned as it lacks subunits essential for H^+ extrusion present in other eukaryotes (30). We hypothesized

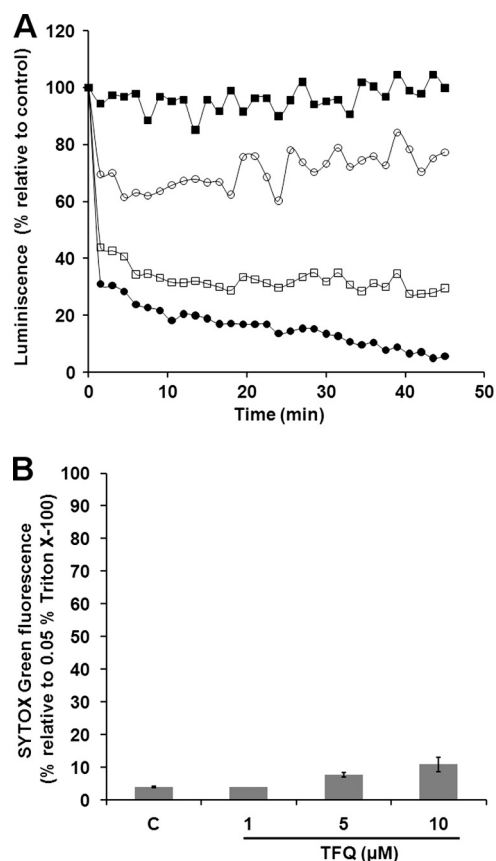


FIG. 1. TFQ reduces intracellular ATP level without plasma membrane permeabilization. (A) Changes in the intracellular ATP levels were determined by variation of luminescence in *L. donovani* 3-Luc promastigotes treated with different TFQ concentrations: 2 (\blacksquare), 5 (\circ), 8 (\square), and 10 μM (\bullet). Promastigotes were preloaded with 25 μM DMNPE-luciferin, and when luminescence reached a plateau, TFQ was added ($t = 0$) and luminescence was monitored as described in Materials and Methods. Variation of luminescence was normalized relative to the level in the control untreated parasites. Similar results were obtained in three independent experiments. At the concentrations tested, TFQ did not inhibit the activity of recombinant firefly luciferase. (B) The effect of TFQ on the plasma membrane permeability was determined by incubating promastigotes without (control [c]) and with 1, 5, and 10 μM TFQ for 45 min in HBS at 28°C and then treating them with 2 μM SYTOX Green for 15 min at 28°C. SYTOX Green fluorescence is represented relative to parasites treated with 0.05% Triton X-100 used as 100% permeabilization. Results are means \pm standard deviations (SD) from three independent experiments.

whether the observed TFQ-induced $\Delta\Psi_m$ depolarization may correspond to a specific inhibition within the respiratory chain. To pinpoint the TFQ target in the respiratory chain of *Leishmania*, parasites were permeabilized with digitonin to allow unrestricted access of specific substrates and inhibitors to the different complexes of the respiratory chain. Preservation of the integrity of the inner mitochondrial membrane was demonstrated by the increase of respiration after the addition of ADP (state 3), as it is no longer the limiting substrate for oxidative phosphorylation. At this state, using succinate as the sole substrate that feeds complex II (Fig. 3A and B), the oxygen consumption rate of digitonin-permeabilized parasites

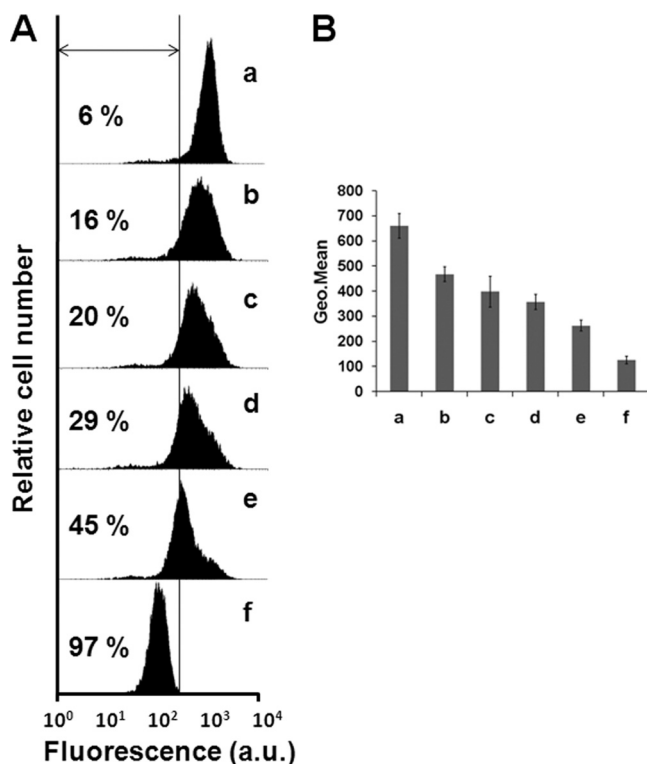


FIG. 2. $\Delta\Psi_m$ depolarization induced by TFQ. *L. donovani* promastigotes were treated with 5 μM TFQ for 1, 5, 10, and 30 min (b to e, respectively) and analyzed for fluorescence by flow cytometry, after being stained with 0.8 μM Rh123. TFQ-untreated parasites were used as a control (a), and treatment with 10 μM FCCP for 10 min was used as a depolarization control (f). (A) Histogram of a representative experiment. Percentages of depolarized cells are shown. (B) Geometrical (Geo.) mean channel fluorescence values \pm SD from three experiments versus the control were significantly different by Student's *t* test ($P < 0.05$).

was $8.9 \pm 0.6 \text{ nmol} \times \text{min}^{-1} \times 10^{-8} \text{ cells}$ (Fig. 3A). The addition of 5 μM TFQ led to a full inhibition of this process (Fig. 3A), which was restored to 50% after addition of TMPD-ascorbate, an electron donor to cytochrome *c* (Fig. 3A). This excluded cytochrome *c* oxidase (complex IV) as the site for TFQ inhibition, and pinpoints the potential target as complex II or III (Fig. 4).

In *Leishmania*, the pool of reduced ubiquinone used by complex III as substrate to reduce cytochrome *c* comes from two sources: the mitochondrial FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, channeling the α -glycerophosphate produced by glycolysis (13); and complex II, which is of much higher relevance in *Leishmania*, using succinate as substrate. The addition of 5 μM TFQ led to a full inhibition of the oxygen consumption rate using succinate as sole substrate (Fig. 3A), and a further addition of 6.7 mM α -glycerophosphate did not reverse at all the inhibition caused by TFQ (Fig. 3A). The modest rate increase obtained by α -glycerophosphate after full inhibition of complex II by malonate was also inhibited after the addition of TFQ (Fig. 3B). Altogether, these results pinpointed complex III (cytochrome *c* reductase [CcR]) as the main target for TFQ inside the respiratory chain. To corroborate this result, the inhibition of CcR by increasing TFQ

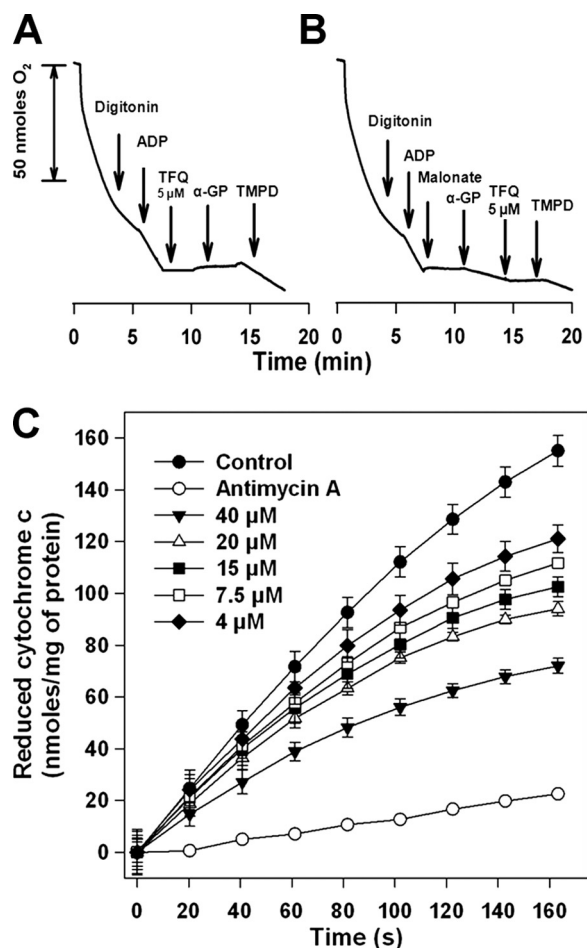


FIG. 3. Identification of the inhibition site of the respiratory chain of *Leishmania* by TFQ. (A and B) Inhibition of the oxygen consumption rates of permeabilized *L. donovani* promastigotes in the presence of 5 mM succinate as the substrate. The arrows indicate the addition of the indicated substrates and inhibitors at their respective final concentrations as stated: 60 μM digitonin, 100 μM ADP, 0.1 mM TMPD plus 1.7 mM ascorbate, 2 mM malonate, 6.7 mM α -glycerophosphate (α -GP), and 5 μM TFQ. (C) Inhibition of CcR activity by TFQ. CcR activity \pm SD was monitored by the increase of absorbance at 550 nm due to the reduction of initially oxidized cytochrome *c* solution (32 μM) after addition of different TFQ concentrations to mitochondrial fraction as described in Materials and Methods. Samples without succinate or in the presence of antimycin A, as the inhibitor of CcR, were considered as controls. Activity was measured at 37°C.

concentrations was assayed in mitochondrial fractions. Figure 3C shows the specific dose-dependent inhibition of CcR activity by TFQ. Total inhibition of this enzyme was achieved with 2 μM antimycin A.

ROS production in *Leishmania* by TFQ. Due to the inherent relationship between ROS generation and respiratory chain inhibition, and as respiratory complex III was described as the main source of superoxide anion radicals in both mammals and *Leishmania* (12, 24), we explored the potential of TFQ to induce ROS production. *Leishmania* promastigotes were incubated with the ROS-sensitive probe MitoSOX Red and treated with 5 μM TFQ for 30 min. Flow cytometry analysis showed a time-dependent increase in ROS generation after treatment with TFQ (Fig. 5A and B). As a positive control for ROS

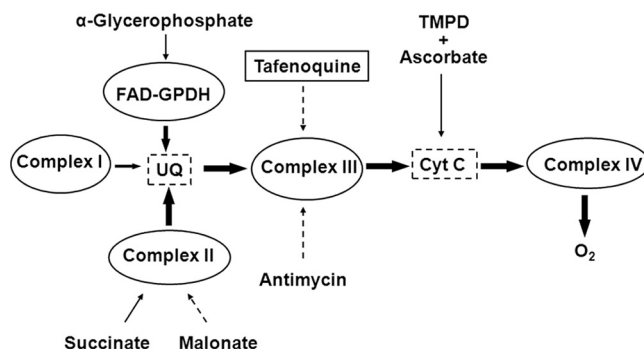


FIG. 4. Scheme of the respiratory chain in *Leishmania* with the specific substrates and inhibitors used in this study. Sites of electron feeding or inhibition are indicated by solid or dotted lines, respectively. UQ, ubiquinone; Cyt C, cytochrome *c*. Feeding of the respiratory chain by α -glycerophosphate through flavin adenine dinucleotide-dependent glycerophosphate dehydrogenase (FAD-GPDH) is according to references 13 and 30.

generation, parasites were treated with antimycin A (0.3 μ g/ml) as reported previously (24).

TFQ increases free cytosolic Ca^{2+} level. Mitochondrial damage, exemplified by $\Delta\Psi_m$ depolarization, is frequently associated not only with ROS production but also with an increase of intracellular Ca^{2+} concentration (28). The relevance of Ca^{2+} mobilization from intracellular stores during the progression of apoptosis in *Leishmania* has been reported previously (33). With this premise in mind, we studied the variation of cytosolic Ca^{2+} levels in both control and TFQ-treated *Leishmania* promastigotes, using Fluo4 as a calcium fluorescent probe. In the presence of EGTA, 5 and 10 μ M TFQ induced Ca^{2+} mobilization from its intracellular stores, resulting in a significant increase of cytosolic Ca^{2+} concentration (Fig. 5C). In the absence of EGTA, parasites treated for 30 min with 5 μ M TFQ showed a Ca^{2+} -bound Fluo4 fluorescence 30% higher than that obtained with EGTA (data not shown), suggesting that

mobilization from intracellular stores is the main source of the observed cytosolic Ca^{2+} increase.

TFQ is partly localized in acidocalcisomes. Acidocalcisomes are important Ca^{2+} reservoirs in *Leishmania* (10); this, together with our previous report on the privileged accumulation of sitamaquine, a close analogue of TFQ (17), in these organelles, prompted us to investigate whether TFQ may accumulate in acidocalcisomes, inducing the release of Ca^{2+} .

First, we studied the decrease in the accumulation of the acidotropic probe LysoTracker Green, mediated by TFQ through the alkalization of acidic organelles. The results showed that TFQ reduced the cellular accumulation of LysoTracker Green measured by flow cytometry (Fig. 6A), due, at least in part, to an increase in the pH of acidocalcisomes induced by TFQ. The feasibility of quenching of the LysoTracker Green fluorescence signal by TFQ was discarded by spectrofluorometry (data not shown).

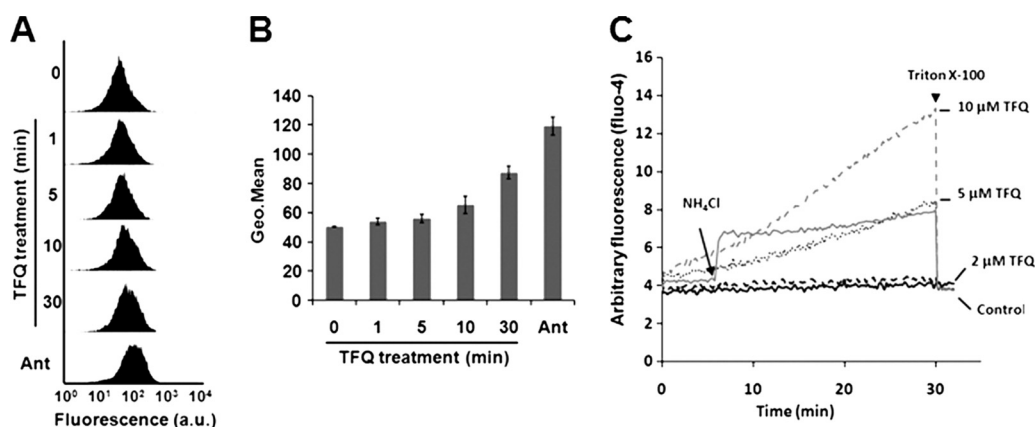


FIG. 5. TFQ induces ROS generation and changes in cytosolic Ca^{2+} levels. ROS levels were measured using the specific fluorescent dye MitoSOX Red. *L. donovani* promastigotes preloaded with 0.5 μ M MitoSOX Red were incubated without (0) and with 5 μ M TFQ at the time points indicated. Antimycin A (Ant) (0.3 μ g/ml, 30 min) was used as the control of ROS generation. Fluorescence intensity (arbitrary units [a.u.]) was determined by flow cytometry analysis, as described in Materials and Methods. (A) Histogram of a representative experiment. (B) Geometrical (Geo.) mean channel fluorescence values \pm SD of three experiments were significantly different versus control by Student's *t* test ($P < 0.05$), except for parasites treated for 1 min. (C) Variation in cytosolic Ca^{2+} levels of *L. donovani* promastigotes. Fluo4-preloaded parasites were treated with different concentrations of TFQ as indicated and then analyzed for increasing fluorescence over a period of 30 min at 28°C using an Aminco-Bowman series 2 spectrometer. The experiments were assessed in the presence of Ca^{2+} chelator EGTA. The arrow indicates the addition of NH_4Cl , taken as positive control. The arrowhead ($t = 30$ min) indicates the addition of 0.05% Triton X-100 to assess complete permeabilization of parasites. The trace "Control" represents TFQ-untreated parasites. Similar results were obtained in three independent experiments.

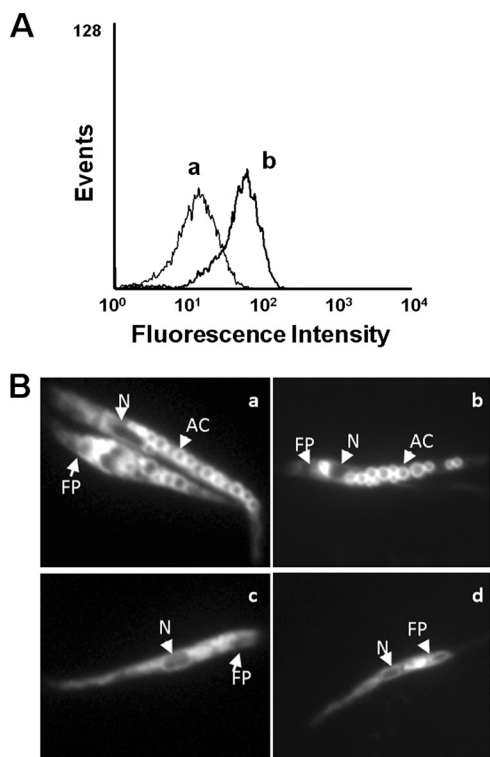


FIG. 6. Intracellular localization of TFQ in *Leishmania*. (A) *L. donovani* promastigotes were pretreated with (a) and without (b) 5 μ M TFQ for 10 min at 28°C and then labeled with 100 nM LysoTracker Green DND-26 for 10 min. Fluorescence was analyzed by flow cytometry as described in Materials and Methods. Representative histograms of three independent experiments are shown. (B) Intracellular localization of TFQ and LysoTracker Green in the control (a and b, respectively) and Δ AP3 (c and d, respectively) *L. major* promastigote lines were visualized by fluorescence microscopy after incubation with 5 μ M TFQ or 100 nM LysoTracker Green DND-26 for 10 min at 28°C, as described in Materials and Methods. AC, acidocalcisome; N, nucleus; FP, flagellar pocket.

Subsequently, the intrinsic fluorescence of TFQ was used to assess its intracellular distribution. Fluorescence microscopy images showed a vesiculated pattern throughout the whole cell body (Fig. 6Ba), resembling that for acidocalcisomes stained with LysoTracker Green (Fig. 6Bb), pointing toward a privileged accumulation of TFQ in these organelles. Apparently, TFQ did not localize in the acidocalcisomes of *L. major* Δ AP3 (Fig. 6Bc); a mutant line that is devoid of several acidocalcisome membrane proteins, which is therefore defective for polyphosphate accumulation and internal acidic milieu, and has an alkaline pH inside these organelles (2). As no differences for TFQ sensitivity were observed between the wild type and the Δ AP3 mutant, resembling the results with sitamaquine, the acidocalcisome could be rule out as final target for TFQ (17). However, an increase in pH reduced the TFQ fluorescence intensity (data not shown), and consequently, we cannot exclude the possibility that TFQ accumulates in the acidocalcisomes of the Δ AP3 mutant.

TFQ induces an apoptosis-like death in *Leishmania*. Since elevation of cytosolic Ca^{2+} , mitochondrial dysfunction, ROS generation, and reduction of intracellular ATP levels are all distinctive events during the progression of an apoptosis-like

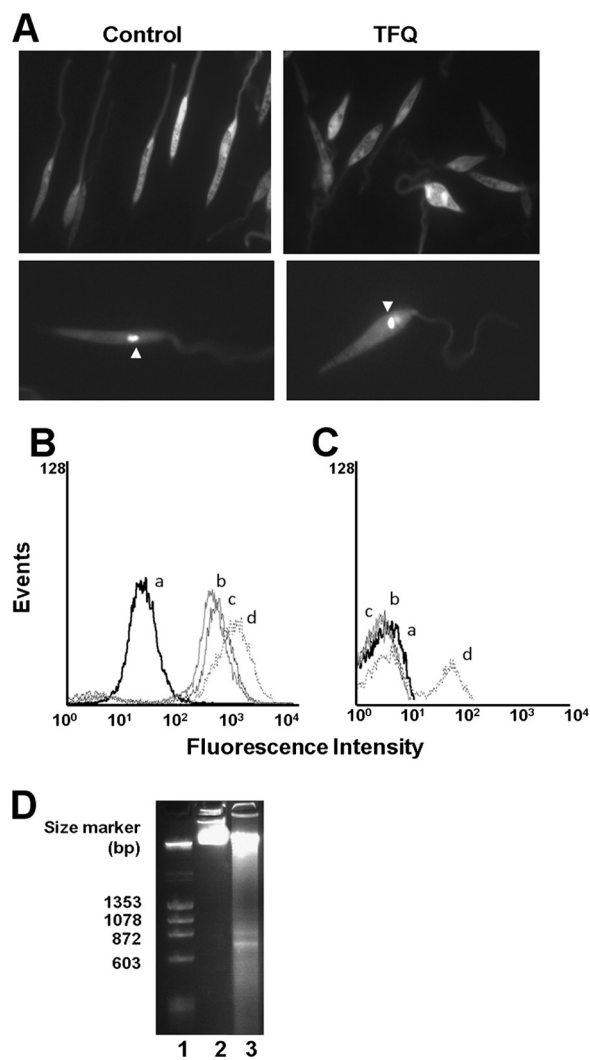


FIG. 7. TFQ induces programmed cell death in *Leishmania*. (A) Autophagosome formation in *L. donovani* promastigotes. (Upper panel) Distribution of GFP-ATG8 in *L. donovani* promastigotes untreated or treated with 5 μ M TFQ. (Lower panel) Autophagosomes could be identified as punctate structures clearly observable in the cytoplasm (arrowhead). (B and C) Representative histogram of TUNEL analysis and PI labeling, respectively, of *L. donovani* promastigotes treated with TFQ. Parasites were treated with different concentrations of TFQ: 5 (b), 10 (c) and 20 (d) μ M for 4 h at 28°C, using untreated parasites (a) as controls. Fluorescein-dUTP and PI nucleic acid labeling were analyzed by flow cytometry as described in Materials and Methods. PI was used as the control of necrosis. Histograms are representative of three independent experiments with 10,000 parasites analyzed per group. (D) DNA fragmentation in *L. donovani* promastigotes. Genomic DNAs were isolated from parasites either untreated (lane 2) or treated for 4 h with 5 μ M TFQ in HBS (lane 3), run through a 2% agarose gel, and visualized by ethidium bromide as described in Materials and Methods. DNA size markers (lane 1) are shown in base pairs (bp).

death process, we examined this possibility for TFQ. In trypanosomatids, there are several classes of programmed cell death (25). The induction of autophagy by TFQ was determined by using an *L. donovani* line overexpressing the autophagosome marker GFP-ATG8 (3). No significant increase in the number of autophagosomes was observed after 24 h of TFQ treatment versus untreated parasites (Fig. 7A). Accord-

ingly, in a further step, TFQ-induced DNA nicking, typical of apoptotic-like processes, was tested using the TUNEL assay. Parasites treated with different concentrations of TFQ for 4 h were significantly TUNEL positive (Fig. 7B). Necrotic cell death was rejected due to the lack of parasite staining with PI, as it requires a permeable plasma membrane in order to reach the intracellular nucleic acid. Only at 20 μ M TFQ, a concentration 4-fold higher than the EC_{50} , were parasites PI positive (Fig. 7C). These conclusions were confirmed by the fragmentation of genomic DNA in parasites treated with 5 μ M TFQ for 4 h (Fig. 7D).

DISCUSSION

The 8-aminoquinoline scaffold has been extensively used in the development of antiprotozoal drugs (36), typically as antiplasmodial compounds. The most recent application for these drugs is the use of sitamaquine and TFQ as alternative leishmanicidal compounds, currently at different stages of implementation (35, 41). Unfortunately their mechanism of action is scarcely known, jeopardizing the rational optimization of new analogues. In order to address this problem, we decided to outline the leishmanicidal mechanism of TFQ.

At the concentrations at which TFQ inhibits promastigote proliferation, the most conspicuous effect observed is the rapid drop in the intracellular ATP levels. A similar effect has been described for the mechanism of action of other potential and established leishmanicidal drugs (19–23). Arguably, the two most likely hypotheses to account for this result are (i) inhibition of ATP synthesis and (ii) permeabilization of the plasma membrane with release of intracellular ATP into the external medium. The last hypothesis is typical for the membrane active reagents, including antimicrobial peptides and polyenes such as amphotericin B (21, 22). Nevertheless, even at concentrations producing above 95% growth inhibition, entry of the vital dye SYTOX Green only reached a small percentage (11%) of that corresponding to full permeabilization. Thus, the observed drop in ATP levels is more likely to be due to inhibition of ATP synthesis. In *Leishmania*, approximately 70% of the total bioenergetic requirements are fulfilled by oxidative phosphorylation, tightly coupled with $\Delta\Psi_m$, which appeared to be decreased in TFQ-treated parasites. This prompted us to carry out a systematic study to identify the TFQ target among the different complexes involved in oxidative phosphorylation. As a result, complex III was defined as its main target; this statement was further validated by the inhibition of CcR *in vitro* by TFQ. It is noteworthy that, complex III is the crossroads where the reduced ubiquinone pools from complex II and the oxidation of α -glycerophosphate converge (13).

There is a wealth of knowledge linking 8-aminoquinolines to mitochondrial dysfunction in their respective target cells, such as primaquine in *Plasmodium falciparum* gametocytes (16) or sitamaquine in *Leishmania* mitochondria (39). The *Leishmania* mitochondrion is the target for a wide variety of leishmanicidal drugs; including some in clinical use such as pentamidine (27) and miltefosine (20), and others at different stages of development, such as chalcones or histatin 5, (5, 23). The inhibition of complex III by TFQ led to the production of superoxide radicals at levels similar to those produced by antimycin A (24).

ROS, either produced inside the cell by drugs (7) or added exogenously (6), trigger an apoptosis-like death process.

Programmed cell death (PCD) was classified by biochemical and morphological criteria under three major classes, which are not mutually exclusive (25). Autophagy was discarded as being the predominant PCD induced by TFQ, as no significant differences were found between treated and control parasites for distribution and expression levels of the autophagosome marker GFP-ATG8. Necrosis (another PCD class) was also ruled out as plasma membrane disruption (one of its hallmarks) only reached significant values at concentrations far higher than those that are lethal. In contrast, TFQ-treated parasites showed typical features for apoptosis-like PCD, including a decrease in $\Delta\Psi_m$ (28), a rise in intracellular Ca^{2+} levels, and late-stage apoptosis markers (such as DNA nucleosomal fragmentation), which is similar in many aspects to that described in metazoan organisms (6).

The increased intracellular Ca^{2+} levels induced by TFQ came from both an external medium and intracellular stores, as the addition of EGTA led to only a 30% abrogation. The entry of external Ca^{2+} was described in *Leishmania* apoptosis induced by external H_2O_2 (28), camptothecin (33), and curcumin (7) and mediated by specific channels activated by ROS or its derived metabolites inside the cells (14). Accordingly, the remaining 70% came from intracellular stores, mainly the endoplasmic reticulum, glycosomes, acidocalcisomes, and/or mitochondria (26).

All these molecular events activate PCD with DNA nicking and fragmentation as the final outcome, both of which are characteristic of an apoptosis-like death in *Leishmania*. Studies are currently in progress to determine whether other potential leishmanicidal 8-aminoquinolines act through a similar mechanism. In conclusion, our studies suggest that TFQ inhibits the functionality of the mitochondrial respiratory chain through CcR (complex III) inhibition, inducing a rapid drop in the intracellular ATP levels in *Leishmania*. At the same time, the increase in mitochondrial ROS production and elevation of intracellular Ca^{2+} leads to a depolarization of $\Delta\Psi_m$. Taken together, these biological events induced by TFQ, trigger an apoptosis-like death in *Leishmania*.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Spanish grants SAF2006-02093 (to F.G.), ISCIII-Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET)-FEDER RD06/0021/0002 (F.G.) and RD 06/0021/0006 (L.R.) European Union (HEALTH—2007-223414) (L.R.) and FIS PS09-01928 (L.R.) and by the Plan Andaluz de Investigación (Cod. BIO130).

We acknowledge the support of GlaxoSmithKline (Greenford, United Kingdom) for the tafenoquine used throughout this research work.

REFERENCES

- Alvarez-Fortes, E., L. M. Ruiz-Perez, F. Bouillaud, E. Rial, and L. Rivas. 1998. Expression and regulation of mitochondrial uncoupling protein 1 from brown adipose tissue in *Leishmania major* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **93**:191–202.
- Besteiro, S., D. Tonn, L. Tetley, G. H. Coombs, and J. C. Mottram. 2008. The AP3 adaptor is involved in the transport of membrane proteins to acidocalcisomes of *Leishmania*. *J. Cell Sci.* **121**:561–570.
- Besteiro, S., R. A. Williams, L. S. Morrison, G. H. Coombs, and J. C. Mottram. 2006. Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. *J. Biol. Chem.* **281**:11384–11396.
- Chappuis, F., S. Sundar, A. Hailu, H. Ghalib, S. Rijal, R. W. Peeling, J.

- Alvar, and M. Boelaert. 2007. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat. Rev. Microbiol.* **5**:873–882.
5. Chen, M., L. Zhai, S. B. Christensen, T. G. Theander, and A. Kharazmi. 2001. Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by chalcones. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:2023–2029.
 6. Das, M., S. B. Mukherjee, and C. Shaha. 2001. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Cell Sci.* **114**:2461–2469.
 7. Das, R., A. Roy, N. Dutta, and H. K. Majumder. 2008. Reactive oxygen species and imbalance of calcium homeostasis contributes to curcumin induced programmed cell death in *Leishmania donovani*. *Apoptosis* **13**:867–882.
 8. den Boer, M. L., J. Alvar, R. N. Davidson, K. Ritmeijer, and M. Balasegaram. 2009. Developments in the treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Opin. Emerg. Drugs* **14**:395–410.
 9. Diaz-Achirica, P., J. Ubach, A. Guinea, D. Andreu, and L. Rivas. 1998. The plasma membrane of *Leishmania donovani* promastigotes is the main target for CA(1–8)M(1–18), a synthetic cecropin A-melittin hybrid peptide. *Biochem. J.* **330**:453–460.
 10. Docampo, R., W. de Souza, K. Miranda, P. Rohloff, and S. N. Moreno. 2005. Acidocalcisomes—conserved from bacteria to man. *Nat. Rev. Microbiol.* **3**:251–261.
 11. Dolai, S., R. K. Yadav, S. Pal, and S. Adak. 2009. Overexpression of mitochondrial *Leishmania major* ascorbate peroxidase enhances tolerance to oxidative stress-induced programmed cell death and protein damage. *Eukaryot. Cell* **8**:1721–1731.
 12. Droese, S., and U. Brandt. 2008. The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex. *J. Biol. Chem.* **283**:21649–21654.
 13. Guerra, D. G., A. Decottignies, B. M. Bakker, and P. A. Michels. 2006. The mitochondrial FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase of *Trypanosomatidae* and the glycosomal redox balance of insect stages of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania spp.* *Mol. Biochem. Parasitol.* **149**:155–169.
 14. Halliwell, B., and J. M. Gutteridge. 1990. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol.* **186**:1–85.
 15. Kennedy, M. L., F. Cortes-Selva, J. M. Perez-Victoria, I. A. Jimenez, A. G. Gonzalez, O. M. Munoz, F. Gamarro, S. Castanys, and A. G. Ravelo. 2001. Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *J. Med. Chem.* **44**:4668–4676.
 16. Lanners, H. N. 1991. Effect of the 8-aminoquinoline primaquine on culture-derived gametocytes of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Parasitol. Res.* **77**:478–481.
 17. Lopez-Martin, C., J. M. Perez-Victoria, L. Carvalho, S. Castanys, and F. Gamarro. 2008. Sitamaquine sensitivity in *Leishmania* species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:4030–4036.
 18. Lu, H. G., L. Zhong, K. P. Chang, and R. Docampo. 1997. Intracellular Ca²⁺ pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes. *J. Biol. Chem.* **272**:9464–9473.
 19. Luque-Ortega, J. R., S. Martinez, J. M. Saugar, L. R. Izquierdo, T. Abad, J. G. Luis, J. Pinero, B. Valladares, and L. Rivas. 2004. Fungus-elicited metabolites from plants as an enriched source for new leishmanicidal agents: antifungal phenyl-phenalenone phytoalexins from the banana plant (*Musa acuminata*) target mitochondria of *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1534–1540.
 20. Luque-Ortega, J. R., and L. Rivas. 2007. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1327–1332.
 21. Luque-Ortega, J. R., O. M. Rivero-Lezcano, S. L. Croft, and L. Rivas. 2001. In vivo monitoring of intracellular ATP levels in *Leishmania donovani* promastigotes as a rapid method to screen drugs targeting bioenergetic metabolism. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:1121–1125.
 22. Luque-Ortega, J. R., J. M. Saugar, C. Chiva, D. Andreu, and L. Rivas. 2003. Identification of new leishmanicidal peptide lead structures by automated real-time monitoring of changes in intracellular ATP. *Biochem. J.* **375**:221–230.
 23. Luque-Ortega, J. R., W. van't Hof, E. C. Veerman, J. M. Saugar, and L. Rivas. 2008. Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in *Leishmania*. *FASEB J.* **22**:1817–1828.
 24. Mehta, A., and C. Shaha. 2004. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J. Biol. Chem.* **279**:11798–11813.
 25. Menna-Barreto, R. F., K. Salomao, A. P. Dantas, R. M. Santa-Rita, M. J. Soares, H. S. Barbosa, and S. L. de Castro. 2009. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron* **40**:157–168.
 26. Moreno, S. N., and R. Docampo. 2003. Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:359–364.
 27. Mukherjee, A., P. K. Padmanabhan, M. H. Sahani, M. P. Barrett, and R. Madhubala. 2006. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **145**:1–10.
 28. Mukherjee, S. B., M. Das, G. Sudhandiran, and C. Shaha. 2002. Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J. Biol. Chem.* **277**:24717–24727.
 29. Nanayakkara, N. P., A. L. Ager, Jr., M. S. Bartlett, V. Yardley, S. L. Croft, I. A. Khan, J. D. McChesney, and L. A. Walker. 2008. Antiparasitic activities and toxicities of individual enantiomers of the 8-aminoquinoline 8-[(4-amino-1-methylbutyl)amino]-6-methoxy-4-methyl-5-[3,4-dichlorophenoxy] quinoline succinate. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:2130–2137.
 30. Opperdoes, F. R., and P. A. Michels. 2008. Complex I of *Trypanosomatidae*: does it exist? *Trends Parasitol.* **24**:310–317.
 31. Perez-Victoria, F. J., F. Gamarro, M. Ouellette, and S. Castanys. 2003. Functional cloning of the miltefosine transporter. A novel P-type phospholipid translocase from *Leishmania* involved in drug resistance. *J. Biol. Chem.* **278**:49965–49971.
 32. Piacenza, L., F. Irigoien, M. N. Alvarez, G. Peluffo, M. C. Taylor, J. M. Kelly, S. R. Wilkinson, and R. Radi. 2007. Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. *Biochem. J.* **403**:323–334.
 33. Sen, N., B. B. Das, A. Ganguly, T. Mukherjee, S. Bandyopadhyay, and H. K. Majumder. 2004. Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *J. Biol. Chem.* **279**:52366–52375.
 34. Sottocasa, G. L., B. Kuylenstierna, L. Ernster, and A. Bergstrand. 1967. An electron-transport system associated with the outer membrane of liver mitochondria. A biochemical and morphological study. *J. Cell Biol.* **32**:415–438.
 35. Sundar, S., and M. Chatterjee. 2006. Visceral leishmaniasis—current therapeutic modalities. *Indian J. Med. Res.* **123**:345–352.
 36. Tekwani, B. L., and L. A. Walker. 2006. 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **19**:623–631.
 37. Van Hellemond, J. J., and A. G. Tielens. 1997. Inhibition of the respiratory chain results in a reversible metabolic arrest in *Leishmania* promastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **85**:135–138.
 38. Vercesi, A. E., C. F. Bernardes, M. E. Hoffmann, F. R. Gadelha, and R. Docampo. 1991. Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ. *J. Biol. Chem.* **266**:14431–14434.
 39. Vercesi, A. E., and R. Docampo. 1992. Ca²⁺ transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca²⁺, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. *Biochem. J.* **284**:463–467.
 40. Vergnes, B., B. Gourbal, I. Girard, S. Sundar, J. Drummel-Smith, and M. Ouellette. 2007. A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplast calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol. Cell Proteomics* **6**:88–101.
 41. Yardley, V., F. Gamarro, and S. L. Croft. 2010. Antileishmanial and anti-trypanosomal activities of the 8-aminoquinoline tafenoquine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:XXX–XXX.

ARTICULO V

Increased Glycolytic ATP Synthesis is Associated with Tafenoquine Resistance in *Leishmania major*.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, vol. 55, p. 1045-52; 2011.

José Ignacio Manzano, Luis Carvalho, José M. Pérez-Victoria, Santiago Castanys y Francisco Gamarro.

La tafenoquina, una 8-aminoquinolina usada para prevenir y tratar infecciones con *Plasmodium*, puede representar una terapia alternativa para tratar la leishmaniasis. La tafenoquina ha mostrado tener una significativa actividad leishmanicida tanto *in vitro* como *in vivo*, tiene como blanco de acción la mitocondria del parásito y le induce un proceso de muerte similar a la apoptosis. Con el objetivo de aportar datos sobre la durabilidad que tendría en clínica este potencial fármaco leishmanicida, es importante determinar la probabilidad de que *Leishmania* pueda desarrollar resistencia a tafenoquina y los mecanismos de resistencia que pueda generar. Para abordar este estudio, se seleccionó una línea de promastigotes de *Leishmania major* resistente a tafenoquina (R4). Esta resistencia, la cual resultó inestable en medio libre de fármaco (línea revertida), se mantuvo en la forma amastigote intracelular en macrófagos. Además, los promastigotes de la línea R4 presentaron resistencia cruzada a otras 8-aminoquinolinas. Tanto en la línea R4 como en la línea revertida, se observó una disminución en la acumulación de la tafenoquina, lo cual probablemente esté asociado con la alcalinización del pH intracelular y una reducción en el contenido de acidocalcisomas que desarrollan ambas líneas, dado que no se apreciaron diferencias en el eflujo de tafenoquina en comparación con la línea salvaje. En todas las líneas de *Leishmania* se observó una disminución en la síntesis de ATP debido a la acción de la tafenoquina, aunque los niveles de ATP total se mantuvieron más altos en los parásitos de la línea R4. Igualmente, se observó que la síntesis de ATP mediante la vía glucolítica estaba significativamente incrementada en los parásitos de la línea R4, mientras que la síntesis de ATP mitocondrial era similar a la de los parásitos salvajes. Por lo tanto concluimos que el incremento en la síntesis de ATP glucolítico es el principal mecanismo responsable de la resistencia a tafenoquina en la línea R4 de *Leishmania*.

Increased Glycolytic ATP Synthesis Is Associated with Tafenoquine Resistance in *Leishmania major*[∇]

José Ignacio Manzano, Luis Carvalho, José M. Pérez-Victoria,
Santiago Castanys,* and Francisco Gamarro*

*Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud,
Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain*

Received 8 November 2010/Returned for modification 15 December 2010/Accepted 22 December 2010

Tafenoquine (TFQ), an 8-aminoquinoline used to treat and prevent *Plasmodium* infections, could represent an alternative therapy for leishmaniasis. Indeed, TFQ has shown significant leishmanicidal activity both *in vitro* and *in vivo*, where it targets *Leishmania* mitochondria and activates a final apoptosis-like process. In order not to jeopardize the life span of this potential antileishmania drug, it is important to determine the likelihood that *Leishmania* will develop resistance to TFQ and the mechanisms of resistance induced. To address this issue, a TFQ-resistant *Leishmania major* promastigote line (R4) was selected. This resistance, which is unstable in a drug-free medium (revertant line), was maintained in intramacrophage amastigote forms, and R4 promastigotes were found to be cross-resistant to other 8-aminoquinolines. A decreased TFQ uptake, which is probably associated with an alkalinization of the intracellular pH rather than drug efflux, was observed for both the R4 and revertant lines. TFQ induces a decrease in ATP synthesis in all *Leishmania* lines, although total ATP levels were maintained at higher values in R4 parasites. In contrast, ATP synthesis by glycolysis was significantly increased in R4 parasites, whereas mitochondrial ATP synthesis was similar to that in wild-type parasites. We therefore conclude that increased glycolytic ATP synthesis is the main mechanism underlying TFQ resistance in *Leishmania*.

Treatment for leishmaniasis currently relies on a reduced arsenal of drugs, including pentavalent antimonials (which cannot be given in areas where drug resistance is endemic), amphotericin B deoxycholate, lipid formulations of amphotericin B, miltefosine, and paromomycin, all of which have drawbacks in terms of toxicity, efficacy, price, and inconvenient treatment schedules (6, 17). To increase the therapeutic life span of these drugs and delay the emergence of resistance, the World Health Organization has recommended combination therapy as a strategy to be implemented in clinical trials. Of the new drugs under development, 8-aminoquinolines such as sitamaquine (WR6026; GlaxoSmithKline), which is currently in phase 2b clinical trials (12, 34), represent a promising new oral leishmanicidal treatment. Although the mechanism of action of sitamaquine is still unknown, it has been reported that acidocalcisomes play a key role in the accumulation of sitamaquine, although they do not determine the leishmanicidal potency of the drug (14). Other 8-aminoquinolines chemically related to primaquine have been synthesized and evaluated for their antiparasitic activity (1, 25). Thus, tafenoquine (TFQ), formerly known as WR238605, is a primaquine analogue which is being developed jointly by the Walter Reed Army Institute of Research and GlaxoSmithKline pharmaceuticals for the treatment and prevention of relapsing malaria (31). Phase I, II, and III clinical studies with this drug have shown that TFQ is a safe,

well-tolerated, and highly effective oral chemoprophylactic agent for the treatment of plasmodial infections (8, 24, 30). Recently, we have proposed that TFQ could be used as a new leishmanicidal drug (33) and have determined that TFQ targets *Leishmania* mitochondria by specifically inhibiting mitochondrial cytochrome *c* reductase, thus leading to a final apoptosis-like process (3). However, to ensure the future long life of this promising leishmanicidal drug, it is important to determine how easy it is to induce TFQ resistance experimentally, as this information can then be extrapolated to the possible emergence of drug resistance in the field. The mechanism of resistance to other aminoquinoline derivatives, such as the 4-aminoquinoline derivative chloroquine, in *Plasmodium*, for example, has been associated with a reduction in drug accumulation (13, 27).

In the present study, we have determined the mechanism of resistance to TFQ in *Leishmania* parasites and have found that TFQ resistance is unstable. TFQ accumulation was lower in resistant parasites than in sensitive parasites, although reduced drug accumulation was found not to be a mechanism of resistance, as it was present in revertant (i.e., nonresistant) lines. However, the mechanism of TFQ resistance does appear to be linked to increased ATP synthesis from glycolysis.

MATERIALS AND METHODS

Chemical compounds. TFQ [2-methoxy-4-methyl-5-(3-trifluoromethylphenoxy)primaquine succinate], sitamaquine [*N,N*-diethyl-*N'*-(6-methoxy-4-methylquinolin-8-yl)hexane-1,6-diamine] dihydrochloride and [benzene ring-¹⁴C]sitamaquine (¹⁴C]sitamaquine; 2.07 GBq/mmol) were provided by GlaxoSmithKline (Greenford, United Kingdom). [¹⁴C]Glucose (11.8 GBq/mmol) was purchased from PerkinElmer. Amplex Red, LysoTracker Green DND-26, LysoTracker Red DND-99, BCECF-AM [2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5-(and-6)-carboxyfluorescein, acetoxymethyl ester], and BCECF (free acid) were purchased from Invitrogen. Dicyclohexylcarbodiimide (DCCD), trivalent anti-

* Corresponding author. Mailing address: Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Avda. del Conocimiento s/n, 18100 Armilla, Granada, Spain. Phone for Francisco Gamarro: 34 958 181667. Fax: 34 958 181632. E-mail: gamarro@ipb.csic.es. Phone for Santiago Castanys: 34 958 181666. Fax: 34 958 181632. E-mail: castanys@ipb.csic.es.

[∇] Published ahead of print on 3 January 2011.

mony, pentamidine, paromomycin, amphotericin B, ketoconazole, chloroquine, quinine, mefloquine, primaquine, glucose, sodium azide, ammonium chloride, nigericin sodium salt, 2-deoxy-D-glucose, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole dilactate), phosphoenolpyruvate, propidium iodide, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), flavin adenine dinucleotide (FAD), thiamine pyrophosphate (TPP), horseradish peroxidase (HRP), pyruvate oxidase, and sodium pyruvate were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Lactate dehydrogenase was purchased from Roche Applied Science, and miltefosine was purchased from Aeterna Zentaris (Frankfurt, Germany). All chemicals were of the highest quality available.

Leishmania culture conditions. Promastigotes of *Leishmania major* (MHOM/JL/80/Friedlin) and derivative lines used in this study were cultured at 28°C in RPMI 1640 modified medium (Invitrogen, Carlsbad, CA) supplemented with 20% heat-inactivated fetal bovine serum (iFBS; Invitrogen), as described previously (10). All parasite lines were collected from culture by centrifugation after 48 h of growth and washed in phosphate-buffered saline (PBS; 1.2 mM KH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄, 130 mM NaCl, and 2.6 mM KCl adjusted to pH 7). The final parasite concentration was determined using a Coulter Z1 counter.

Generation of a TFQ-resistant *L. major* line. A TFQ-resistant *L. major* line was obtained by following a previously described stepwise selection process (4, 23) with a starting concentration of 2.5 μM TFQ increasing to 4 μM TFQ over 10 weeks. The TFQ-resistant (R4) line was maintained in the continuous presence of 4 μM TFQ. To determine the stability of the resistant phenotype, the R4 line was grown in a drug-free medium for 1 month (revertant line; revR4). The sensitivity of wild-type (WT), R4 and revR4 *L. major* promastigotes to TFQ and the cross-resistance profile of the R4 line to different compounds were determined after incubation for 72 h at 28°C in the presence of increasing concentrations of the drug. The concentration of TFQ required to inhibit parasite growth by 50% (EC₅₀), and the resistance indices (ratio of EC₅₀s for resistant and WT parasites) were calculated using an MTT colorimetric assay, as described previously (11).

TFQ sensitivity in intracellular amastigotes of *Leishmania*. Late-stage promastigotes from the WT and R4 lines were used to infect mouse peritoneal macrophages from BALB/c mice (Charles River, Ltd.) at a macrophage/parasite ratio of 1:10, as described previously (14). After infection for 6 h, extracellular parasites were removed by washing with serum-free medium. Infected macrophage cultures were maintained at 37°C with 5% CO₂ at different TFQ concentrations in RPMI 1640 medium plus 10% iFBS, as described previously (14). After 72 h, macrophages were fixed for 20 min at 4°C with 2.5% paraformaldehyde in PBS, permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 10 min, and treated with RNase A (1 mg/ml) for 30 min. Intracellular parasites were detected by nuclear staining with 5 μg/ml propidium iodide and Prolong Gold antifade reagent without DAPI (Invitrogen).

TFQ uptake and efflux. *L. major* promastigotes (2 × 10⁷ per ml) were incubated with 5 μM TFQ for 15 min at 28°C in culture medium and then washed twice with PBS and lysed by the addition of 10% SDS, pH 4. Sample fluorescence (in the range of 360 to 460 nm) was then measured using an Aminco Bowman series 2 spectrometer upon excitation at 340 nm. The time course uptake of TFQ at 28°C was determined at different time intervals (1, 3, 5, 8, 10, and 15 min). To determine TFQ efflux, WT and R4 parasites (2 × 10⁷ per ml) were incubated with 2 and 2.5 μM TFQ, respectively, for 1 h in culture medium at 28°C to allow for a similar labeling in the two lines. The parasites were then washed with PBS and resuspended in culture medium at 28°C, and the fluorescence retained was measured at different time points (0, 15, 30, 60, and 90 min).

Accumulation of sitamaquine. Sitamaquine accumulation was determined as described previously (14). Briefly, promastigotes were incubated at 28°C with 0.5 μM [¹⁴C]sitamaquine for 15 min and then washed with PBS containing 100 μM nonradioactive sitamaquine. The cell-associated radioactivity was measured by liquid scintillation counting, and the protein concentration was determined using a Bradford kit (Bio-Rad).

Microscopy analysis. Promastigotes (10⁷ per ml) were incubated with 5 μM TFQ for 15 min in culture medium. After being washed twice with PBS, the pellet was resuspended in PBS and analyzed by fluorescence microscopy (Zeiss). Acidocalcisome accumulation of the acidotropic dye LysoTracker Red DND-99 was determined by confocal microscopy analysis, as described previously (14). Briefly, promastigotes were incubated with 75 nM LysoTracker Red DND-99 in HBS buffer (21 mM HEPES, 0.7 mM Na₂HPO₄, 137 mM NaCl, 5 mM KCl, and 6 mM glucose [pH 7]), and the parasites were then washed with PBS and analyzed with a confocal microscope (TCS SP5 model; Leica) equipped with a He/Ne laser (633 nm) and coupled to an MRC1024 model confocal scanning laser equipment.

pHi measurement. The intracellular pH (pHi) of *L. major* lines was determined fluorimetrically using a BCECF-AM probe, as described previously (28). Briefly, promastigotes (2 × 10⁷ per ml) were resuspended in standard buffer (136.89 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 8.46 mM Na₂HPO₄, 11.1 mM glucose, 1 mM CaCl₂, 0.8 mM MgSO₄, and 20 mM HEPES [pH 7.4]). After incubation for 30 min at 28°C in the presence of BCECF-AM (5 μg/ml), the parasites were washed twice. The fluorescence ratios (excitation ratio, 490 nm/440 nm; emission, 535 nm) were monitored continuously using an Aminco Bowman series 2 spectrometer. For calibration curves, the BCECF ratio fluorescence as a function of pH was obtained using a parasite suspension incubated with BCECF-AM and treated with the ionophore nigericin (5 μg/ml). Different pH values were obtained by the addition of 1 M MES (morpholineethanesulfonic acid; pH 5.0) or 1.5 M Tris-ClH (pH 8.8) followed by measurement of the pH. The intracellular alkalinization of parasites was obtained after pretreatment of *L. major* lines at 28°C with 20 mM NH₄Cl for 1 min, followed by incubation with 5 μM TFQ in the presence of NH₄Cl for 15 min. For the studies involving parasite acidification, the pHi was lowered using the NH₄Cl prepulse technique, as described previously (15). Thus, promastigotes (2 × 10⁷) were resuspended in 50 μl of standard buffer (described above) containing 40 mM NH₄Cl at 28°C for 15 min. The parasites were then centrifuged and resuspended in standard buffer with or without the H⁺-ATPase inhibitor DCCD and in chloride-free buffer (135 mM sodium gluconate, 5 mM potassium gluconate, 5 mM glucose, 1 mM calcium gluconate, 1 mM MgSO₄, and 10 mM HEPES-Tris [pH 7.4]). The rate of recovery from acidification was determined from the slope of the initial 100 s of recovery, and the final pHi was determined after 10 min. To determine the acidification produced by TFQ and sodium azide, BCECF-loaded promastigotes (2 × 10⁷ per ml) were incubated in culture medium with 5 μM TFQ or 20 mM sodium azide for different times (1, 3, 5, 10, and 30 min).

Proton efflux measurements for *Leishmania* parasites. Extracellular pH, which reflects the proton efflux activity of parasites, was determined as described previously (15). Thus, parasites (1 × 10⁸) were washed and resuspended in 2 ml of weakly buffered (0.1 mM HEPES-Tris; pH 7.4) standard buffer containing 0.38 μM BCECF (free acid). The fluorescence excitation ratio (490 nm/440 nm; emission, 535 nm) was then recorded and translated into nmol of H⁺ released/min on the basis of ratios obtained at various extracellular pHs by the addition of known HCl equivalents.

ATP measurements for *L. major* lines. ATP was measured using a CellTiter-Glo luminescent assay (Promega), which generates a luminescent signal proportional to the amount of ATP present. Promastigotes (4 × 10⁶ per ml) were incubated in culture medium at different TFQ concentrations (1, 2, 5, 10, and 20 μM) for 60 min. For glycolytic and mitochondrial ATP determination, parasites were incubated separately in HBS buffer plus 20 mM sodium azide to inhibit mitochondrial oxidative ATP generation, and glucose-free HBS buffer plus 5 mM 2-deoxy-D-glucose and 5 mM sodium pyruvate to inhibit glycolytic ATP generation, for 1 h at 28°C. For the study of ATP levels at different pHi values, promastigotes (2 × 10⁷ per ml) were incubated in distinct buffers to obtain a different pHi, as described previously (15). The buffers used were regular buffer (135 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM glucose, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, and 10 mM HEPES-Tris for pH 7.4 or 10 mM MES-Tris for pH 5.5), regular buffer containing 25 mM HCO₃⁻, sodium-free buffer (135 mM choline Cl, 5 mM KCl, 5 mM glucose, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgSO₄, and 10 mM HEPES-Tris [pH 7.4]) and chloride-free buffer (described above). The pHi of parasites was measured using BCECF-AM as the pHi fluorescent probe, as described above. A 25-μl aliquot of parasites was then transferred to a 96-well plate, mixed with the same volume of CellTiter-Glo, and incubated in the dark for 10 min, and the bioluminescence was measured using an Infinite F200 microplate reader (Tecan Austria GmbH, Austria).

Determination of intracellular pyruvate levels in *Leishmania* lines. Pyruvate was extracted as described by Zhu et al. (35). Briefly, 5 × 10⁸ parasites were incubated in HBS buffer or in glucose-free HBS buffer plus 5 mM 2-deoxy-D-glucose for 1 h at 28°C. The parasites were then collected and resuspended in 0.1 ml of ice-cold 0.25 M HClO₄ and incubated on ice for 5 min. The resulting mixture was neutralized with 2.8 μl of 5 M K₂CO₃ (pH ≈ 6.5). The supernatant was collected after centrifugation at 10,000 × g for 5 min. Pyruvate was measured using a fluorimetric assay (35) based on the oxidation of pyruvate by pyruvate oxidase. The hydrogen peroxide generated reacts with nonfluorescent Amplex Red at a 1:1 stoichiometry to form the red fluorescent product resorufin. This fluorescence is proportional to the initial pyruvate concentration in the solution. Briefly, 20 μl of intracellular pyruvate extract was pipetted into a 96-well white plate, and 180 μl of reaction solution (final concentration, 100 mM potassium phosphate with 1 mM EDTA [pH 6.7], 1 mM MgCl₂, 10 μM FAD, 0.2 mM TPP, 0.2 U/ml pyruvate oxidase, 50 μM Amplex Red, and 0.2 U/ml HRP) was then

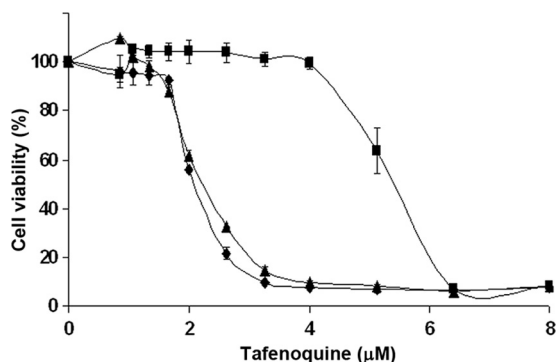


FIG. 1. TFQ sensitivity of *L. major* promastigotes. *L. major* WT (diamonds), R4 (squares), and revR4 (triangles) lines were assayed for TFQ sensitivity by determination of the percent cell viability using an MTT-based assay, as described in Materials and Methods. Shown are the means \pm standard deviations (SD) from four independent experiments.

added. Fluorescence at 590 nm was measured upon excitation at 535 nm using a microplate reader (Infinite F200; Tecan Austria GmbH, Austria).

Determination of pyruvate kinase activity in *Leishmania* lines. Pyruvate kinase activity was determined as described previously (21). Briefly, parasites (1×10^8) were washed twice in PBS, resuspended in hypotonic buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.4) plus a protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) for 10 min at 4°C, and then disrupted by nitrogen cavitation (90 bar, 30 min, 4°C). Cell debris was removed by centrifugation at $800 \times g$ and 4°C for 10 min, and the supernatant was then centrifuged at $100,000 \times g$ and 4°C for 60 min. Pyruvate kinase activity was determined with a lactate dehydrogenase-coupled assay system by measuring the decrease of NADH absorbance at 340 nm. The enzymatic assay was performed at 25°C in 1 ml of reaction mixture containing 50 mM triethanolamine buffer (pH 7.2), 2.5 mM phosphoenolpyruvate, 2 mM ADP, 6 mM $MgSO_4$, 50 mM KCl, 0.42 mM NADH, and 6.25 μg lactate dehydrogenase. The reaction was initiated by the addition of 50 μg of protein from the supernatant from the centrifugation performed at $100,000 \times g$.

Glucose uptake assay for *Leishmania* lines. The accumulation of glucose was determined after incubation of 2×10^7 promastigotes with 0.15 $\mu Ci/ml$ [^{14}C]glucose for 10 min at 28°C in glucose-free HBS buffer. The parasites were subsequently washed with PBS containing 6 mM nonradioactive glucose at 4°C and then with PBS alone. The cell-associated radioactivity was measured by liquid scintillation counting, and the protein concentration was determined using a Bradford kit (Bio-Rad).

Statistical analysis. Statistical significance was calculated by using Student's *t* test. Differences were considered significant at a *P* value of <0.05 .

RESULTS

Generation of a TFQ-resistant *L. major* line. A TFQ-resistant *L. major* line was selected *in vitro* by a stepwise adaptation process up to a maximum of 4 μM TFQ. Subsequent attempts to increase the level of TFQ resistance were unsuccessful. This TFQ-resistant line (R4) has an EC_{50} of $5.45 \pm 0.35 \mu M$, a 2.5-fold-higher concentration than for the WT line (Fig. 1 and Table 1). The R4 parasites showed a growth rate similar to that of the WT line. Additionally, no morphological differences were observed between the two lines, as determined by light microscopy and flow cytometry analyses (data not shown). The resistance phenotype was unstable in drug-free medium for up to 4 weeks; the revertant line (revR4) presented a sensitivity ($2.26 \pm 0.02 \mu M$) that was similar to that of the WT parasites (Fig. 1). Additionally, we found that TFQ resistance in the promastigote forms was maintained in intracellular amastigotes obtained after infection of mouse peritoneal macrophages with WT and R4 promastigotes (EC_{50} s of 0.38 ± 0.03

and $0.95 \pm 0.02 \mu M$ for intracellular WT and R4 amastigotes, respectively) and that R4 amastigotes were 2.5-fold more resistant, similar to the value obtained for R4 promastigotes. Additionally, the R4 line profile showed significant cross-resistance to the 8-aminoquinolines sitamaquine (2-fold more resistant) and primaquine (1.9-fold; Table 1); no cross-resistance to the 4-aminoquinolines chloroquine and mefloquine and the quinoline derivative quinine was observed. As can be seen from Table 1, the R4 parasites did not show any significant cross-resistance to other antileishmanial drugs, such as trivalent antimony, pentamidine, miltefosine, paromomycin, and ketoconazole.

TFQ uptake and accumulation in acidic vesicles. To determine whether TFQ resistance in R4 parasites was associated with a failure to accumulate the drug, TFQ uptake experiments were therefore carried out using spectrofluorometric techniques. The time course uptake of TFQ in WT, R4, and revR4 lines showed that TFQ uptake became saturated after 5 min (data not shown), with a 24% lower uptake in R4 parasites with respect to their WT counterparts and intermediate values for the revR4 line (data not shown). Additionally, no significant differences in TFQ efflux between the R4 and WT parasites were observed (data not shown). A decrease in R4 and revR4 drug uptake was also observed for [^{14}C]sitamaquine, which present a 55% lower uptake in R4 parasites than in WT parasites, and the revR4 line presents accumulation values of 25% (data not shown). Since TFQ and sitamaquine accumulate in acidic vesicles, such as acidocalcisomes (3, 14), the differences in the size of such organelles could determine the TFQ accumulation. In fact, with the acidic organelles in WT parasites being larger than those in the R4 and revR4 lines, as can be seen from the significantly lower accumulation of LysoTracker Green (data not shown), a fluorescent acidotropic probe was used to label acidic organelles (mainly acidocalcisomes) in *Leishmania* (18).

TABLE 1. Drug sensitivity profile for *L. major* promastigote lines^a

Drug	EC_{50} (μM) ^b		RI ^c
	WT	R4	
Tafenoquine	2.24 ± 0.15	5.49 ± 0.35	2.5*
Sitamaquine	12.02 ± 0.38	24.49 ± 1.92	2*
Primaquine	27.73 ± 0.24	53.04 ± 1.14	1.9*
Quinine	9.41 ± 0.11	9.53 ± 0.06	1
Chloroquine	18.75 ± 1.25	23.82 ± 0.81	1.3
Mefloquine	12.48 ± 0.55	13.92 ± 0.86	1.1
Sb ^{III}	15.43 ± 0.73	21.12 ± 0.88	1.4
Amphotericin B	1.87 ± 0.12	3.16 ± 0.23	1.7
Ketoconazole	19.98 ± 0.56	28.05 ± 0.71	1.4
Pentamidine	0.28 ± 0.02	0.45 ± 0.04	1.8
Miltefosine	17.69 ± 0.51	25.69 ± 1.12	1.5
Paromomycin	4.29 ± 0.04	3.98 ± 0.14	1
Daunomycin	0.22 ± 0.01	0.38 ± 0.01	1.7

^a *L. major* WT and R4 lines were grown as described in Materials and Methods for 72 h at 28°C in the presence of increasing concentrations of drugs. Subsequently, cell viability was determined using an MTT-based assay.

^b Data are means of EC_{50} s \pm SD from three independent experiments.

^c Resistance index (RI) was calculated by dividing the EC_{50} s for R4 parasites by that for WT parasites. Significant differences were determined by Student's *t* test (*, *P* <0.05).

^d EC_{50} s for Sb^{III} are expressed in $\mu g/ml$.

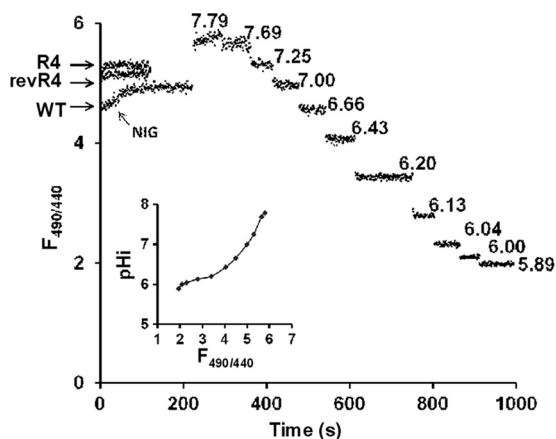


FIG. 2. Determination of intracellular pH (pHi) in *L. major* lines. *Leishmania* WT promastigotes loaded with BCECF-AM (5 μ g/ml, 30 min) were exposed to a KCl/HEPES-nigericin (NIG)-containing solution (pH 7.1). The traces represent the fluorescence signal ratio (excitation ratio, 490 nm/440 nm; emission, 535 nm) obtained at different pHs after the addition of acidic MES or basic Tris-CIH. The inset represents the dependence of the fluorescence excitation ratio on pHi, i.e., extracellular pH. According to this calibration curve, *L. major* WT has a pHi of 6.75. Similar calibration curves were obtained for R4 and revR4 parasites (data not shown). R4 has a pHi of 7.21, and revR4 has a pHi of 7.11.

An increase in pHi reduces TFQ accumulation. The accumulation of weakly basic aminoquinolines, such as amodiaquine, chloroquine, and more recently, sitamaquine, seems to be pH dependent (9, 14). Initially, we determined the pHi of *Leishmania* lines using BCECF as a fluorescent-dependent pH indicator (28). Under physiological culture conditions, WT promastigotes maintained a steady-state pHi of 6.75 ± 0.01 ($n = 5$) (Fig. 2), a value similar to that reported by other authors (28), whereas R4 parasites presented a pHi of 7.21 ± 0.02 ($n = 5$) (Fig. 2), which is 0.46 pH units higher than that observed for WT parasites. Interestingly, a similar pHi alkalization was observed in revR4 parasites, which presented a pHi of 7.11 ± 0.01 (Fig. 2), 0.36 units higher than that for WT parasites. These findings suggest that an increased pHi could be associated, in part, with decreased TFQ accumulation in R4 parasites. To validate this hypothesis, we induced an intracellular alkalization of parasites with NH_4Cl and then incubated the parasites with TFQ. The pHi obtained for WT parasites pretreated with NH_4Cl increased by 0.94 units ($n = 4$) and was associated with a significant reduction in TFQ accumulation (close to 35%) with respect to the control parasites (Table 2). Similar experiments using R4 and revR4 parasites led to a moderate increase in the pHi values (0.24 and 0.30 units, respectively), both of which were associated with a lower, but nevertheless significant, decrease in TFQ accumulation (4% and 11.7% for R4 and revR4, respectively; Table 2).

Activation of a plasma membrane P-type H^+ -ATPase in R4 parasites. One proposed mechanism for pHi regulation in *Leishmania* promastigotes involves a plasma membrane P-type H^+ -ATPase (15) identified for other unicellular organisms (15, 28). In light of the possibility that the increased pHi observed with the R4 and revR4 *Leishmania* lines could be due to an increased P-type H^+ -ATPase activity, we determined the pro-

ton efflux activity as described previously (15). The fluorescence ratios obtained (excitation at 505/440 nm and emission detected at 530 nm) were transformed into the amount of H^+ released min^{-1} . The results confirmed that the proton efflux in R4 parasites was significantly higher, with a value of 24.58 ± 0.05 $\text{nmol H}^+/\text{min}$ per 10^8 cells (7.65 ± 0.44 $\text{nmol H}^+/\text{min}$ per 10^8 WT parasites). The R4 parasites therefore presented a higher proton efflux activity (3.21-fold) than WT parasites as a mechanism of pHi alkalization. Additionally, revR4 parasites presented a proton efflux activity similar to that of R4 parasites (22.63 ± 0.37 $\text{nmol H}^+/\text{min}$ per 10^8 cells). Experiments to determine the recovery capacity of pHi following acidification support these findings. Thus, as can be seen from Table 3, R4 parasites recovered their pHi significantly faster than WT parasites (recovery rates of 0.32 ± 0.04 and 0.17 ± 0.02 , respectively). Similar results were obtained for revR4 parasites, which presented a recovery rate intermediate between those for WT and R4 parasites (0.28 ± 0.02 ; Table 3). The recovery rates for the different *Leishmania* lines were slightly lower when using the specific H^+ -ATPase inhibitor DCCD, and a significant decrease in the final pHi was also observed. These results support the presence of a plasma membrane H^+ -ATPase as a major pHi regulator (15). The pHi recovery was also determined by using chloride-free buffer, as the chloride ion is essential for acid extrusion in *Leishmania* promastigotes (29). The recovery rates for the R4 and revR4 *Leishmania* lines were found to be higher than that for WT parasites under these conditions (Table 3).

The effect of TFQ on ATP synthesis. We assessed the ATP levels in *L. major* lines in the presence of TFQ and found that WT parasites exhibit a significant decrease in total ATP levels in response to different TFQ concentrations (Fig. 3A). Furthermore, R4 parasites showed significantly higher basal ATP levels than WT parasites, along with a lower decrease in ATP levels in response to TFQ treatment (Fig. 3A). Additionally, revR4 parasites presented ATP levels intermediate between those for the WT and R4 lines, although the levels were similar to those for WT parasites at TFQ concentrations above 5 μM (Fig. 3A). We also examined whether the increased total ATP levels observed for R4 parasites were due to an increase in mitochondrial ATP synthesis or increased glycolysis. Sodium azide treatment inhibits the F1-ATPase and cytochrome *c* oxidase from complex IV, thus producing a loss of mitochondrial membrane potential that is critical for the electron transport

TABLE 2. pHi dependence of tafenoquine accumulation in *Leishmania* promastigotes^a

Promastigote	pHi		TFQ uptake (AU/mg protein)	
	Control	NH_4Cl	Control	NH_4Cl
WT	6.75 ± 0.01	$7.69 \pm 0.02^*$	$10,775 \pm 149$	$7,009 \pm 95^*$
R4	7.21 ± 0.02	$7.45 \pm 0.01^*$	$8,809 \pm 84$	$8,462 \pm 67^*$
revR4	7.11 ± 0.01	$7.41 \pm 0.02^*$	$9,657 \pm 127$	$8,524 \pm 59^*$

^a WT, R4, and revR4 *L. major* promastigotes were pretreated at 28°C with 20 mM NH_4Cl for 1 min and incubated with 5 μM tafenoquine (TFQ) in the presence of NH_4Cl for 15 min. pHi values were determined as described in the legend of Fig. 2. Data are the means \pm SD from three independent experiments. Significant differences were determined by Student's *t* test (*, *P* value was <0.05 versus the corresponding control without NH_4Cl). AU, arbitrary units.

TABLE 3. pH_i recovery in *L. major* lines^a

Buffer (pH 7.4)	Final pH _i			Recovery rate		
	WT	R4	revR4	WT	R4	revR4
Standard	6.73 ± 0.03	7.13 ± 0.02*	7.03 ± 0.02*	0.17 ± 0.02	0.32 ± 0.04*	0.28 ± 0.02*
DCCD (50 μM)	6.52 ± 0.04†	7.03 ± 0.03*†	6.88 ± 0.03*†	0.14 ± 0.01	0.26 ± 0.03*	0.21 ± 0.01*†
Cl ⁻ -free	6.37 ± 0.03†	6.87 ± 0.01*†	6.78 ± 0.02*†	0.06 ± 0.01†	0.18 ± 0.02*†	0.15 ± 0.02*†

^a BCECF-loaded (5 mg/ml, 30 min) WT, R4, and revR4 promastigotes were acidified by NH₄Cl pretreatment (40 mM) for 15 min and resuspended in standard or Cl⁻-free buffers at pH 7.4. The H⁺-ATPase inhibitor DCCD (dicyclohexylcarbodiimide) was added to the standard buffer at 50 μM. Rate of recovery from acidification was determined from the slope of the initial 100 s of recovery, and final intracellular pH (pH_i) was determined after 10 min as described by Marchesini and Docampo (15). Data are the means ± SD from three independent experiments. Significant differences (*, *P* < 0.05 versus WT parasites; †, *P* < 0.05 versus standard buffer) were determined by Student's *t* test.

chain activity involved in the generation of ATP. Under our experimental conditions, sodium azide decreased the ATP levels in all *Leishmania* lines studied, although the ATP levels in R4 parasites were significantly higher than those observed for

the WT and revR4 lines (Fig. 3B), thus suggesting that glycolytically generated ATP is higher in R4 parasites. We therefore inhibited glycolysis in *Leishmania* lines deprived of glucose but provided with 2-deoxy-D-glucose, a competing substrate for hexokinase, and pyruvate to ensure that the majority of ATP generation was dependent on mitochondrial electron transport and the function of complex V. This inhibition of glycolytic ATP synthesis significantly reduced ATP levels to reach similar values in all *Leishmania* lines (Fig. 3B).

Increased ATP synthesis by glycolysis in R4 parasites. The TFQ-resistant *Leishmania* line upregulates glycolysis, whose final step involves the conversion of phosphoenolpyruvate into pyruvate by the enzyme pyruvate kinase. The change in intracellular pyruvate concentration is therefore proportional to the glycolytic activity. We compared the levels of pyruvate between *Leishmania* lines using a highly sensitive Amplex Red-based fluorescent assay. As shown in Fig. 4A, the pyruvate concentration in R4 parasites was higher (approximately 3-fold) than that observed for the WT line, in agreement with the higher levels of glycolytically generated ATP. The revR4 parasites presented pyruvate levels intermediate between those for the WT and R4 lines. Furthermore, when parasites were pretreated with the glycolysis inhibitor 2-deoxy-D-glucose, the amount of pyruvate in the three lines dropped significantly (Fig. 4A), thereby supporting the hypothesis that the higher pyruvate levels present in the R4 line result from glycolysis. As pyruvate kinase activity is known to be critical in glycolysis, we determined this activity in *Leishmania* lines; no significant differences between parasite lines were observed (data not shown). Furthermore, as trypanosomatids normally use glucose as their main carbon source, we tested whether R4 parasites increased their glucose uptake as the starting product for glycolysis. Thus, the parasites were cultured in the presence of 0.5 mM [¹⁴C]glucose for 10 min, and analysis of the uptake of [¹⁴C]glucose showed no significant differences between the different *Leishmania* lines (data not shown). Additionally, to discard the possibility that the observed higher level of ATP produced by glycolysis in the R4 line could be due to a different pH_i, which could influence the activity of key enzymes involved in glycolysis, we determined the ATP levels for the *Leishmania* WT line with different pH_i values. The results showed that total ATP values were similar at the different *Leishmania* pH_i values studied (Fig. 4B).

TFQ induces a decrease in pH_i. As TFQ induces a reduction in intracellular ATP levels and the plasma membrane H⁺-ATPase is the major regulator of pH_i in *Leishmania*, we investigated whether TFQ treatment modified the pH_i of para-

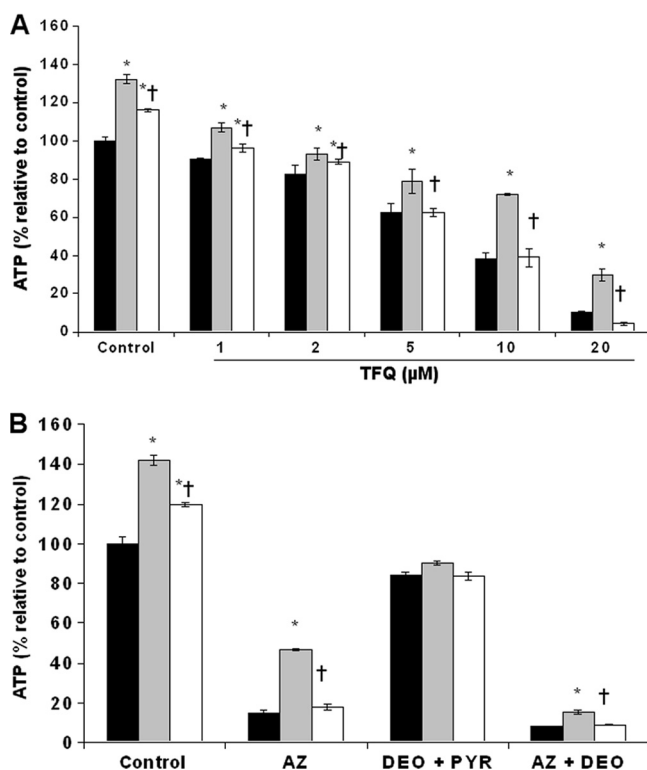


FIG. 3. Effect of TFQ on ATP levels in *L. major* promastigotes. Promastigotes (4×10^6 per ml) of WT (black histograms), R4 (gray histograms), and revR4 (white histograms) *L. major* lines were incubated (A) in culture medium with different concentrations (1, 2, 5, 10, and 20 μM) of TFQ for 60 min or (B) in HBS buffer (control), HBS buffer plus 20 mM sodium azide (AZ) to inhibit mitochondrial oxidative ATP generation, glucose-free HBS buffer plus 5 mM 2-deoxy-D-glucose (DEO) and 5 mM sodium pyruvate (PYR) to inhibit glycolytic ATP generation (DEO + PYR), and glucose-free HBS buffer plus 5 mM DEO and 20 mM AZ to inhibit both glycolytic and oxidative ATP generation (AZ + DEO). Afterward, 25-μl aliquots of the parasites were transferred to a 96-well plate, mixed with the same volume of CellTiter-Glo (Promega), and incubated for 10 min in the dark, and the sample bioluminescence was measured. ATP levels were calculated relative to 100% of the control WT. Data are the means ± SD from three independent experiments. Significant differences were determined using Student's *t* test (*, *P* < 0.05 versus WT parasites; †, *P* < 0.05 versus R4 parasites).

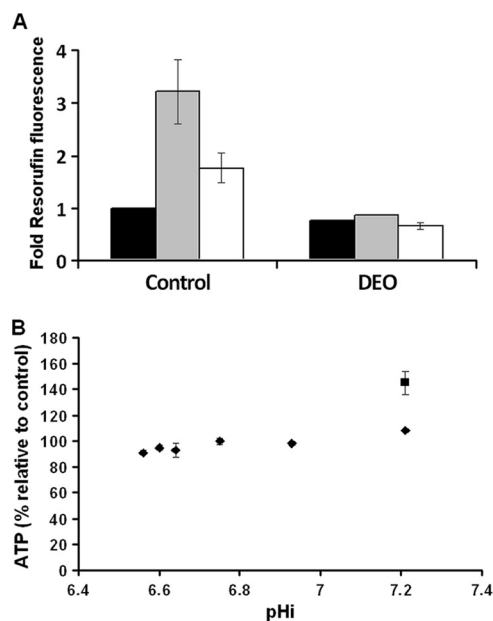


FIG. 4. Intracellular pyruvate values and the effect of pH_i on ATP levels. (A) Intracellular pyruvate levels for WT (black), R4 (gray), and revR4 (white) lines pretreated without (Control) or with (DEO) 2-deoxy-D-glucose were determined by a fluorimetric assay, as described in Materials and Methods. Different intracellular pyruvate levels of the samples were compared with that of the WT control. The fluorescence of resorufin is proportional to the initial pyruvate concentration in the solution. Data are the means \pm SD from three independent experiments. (B) The effect of pH_i on ATP levels was determined for WT promastigotes (diamonds) at different pH_i values as described in Materials and Methods. The *Leishmania* R4 line (square) was used as the control. Data are the means \pm SD from three independent experiments.

sites. The results of this study showed that TFQ produces a significant and rapid acidification of pH_i after 1 min of treatment (Fig. 5A). Indeed, after 30 min, the pH_i values for WT and revR4 parasites were 6.50 and 6.49, respectively, whereas the acidification induced by TFQ in R4 parasites was significantly lower (pH_i 6.94) (Fig. 5A). These results support our hypothesis that R4 parasites increase their ATP synthesis in order to maintain the functionality of a plasma membrane H⁺-ATPase involved in the regulation and recovery of pH_i as a defensive strategy against the TFQ toxicity. Similar results were observed after treatment with sodium azide (Fig. 5B), which produces a reduction in pH_i as a consequence of ATP depletion and nonoptimal functioning of the plasma membrane H⁺-ATPase in *Leishmania*.

DISCUSSION

8-Aminoquinolines, such as sitamaquine and TFQ, have recently been reported to be promising antileishmania drugs (12, 33, 34). Furthermore, we have shown that TFQ induces mitochondrial dysfunction in *Leishmania*, with the resulting decreased oxygen consumption and depolarization of the mitochondrial membrane potential leading to a final apoptosis-like process (3). In this study, we induced experimental resistance to TFQ in order to determine the ability of *Leishmania* to generate resistance to this 8-aminoquinoline and as a strategy

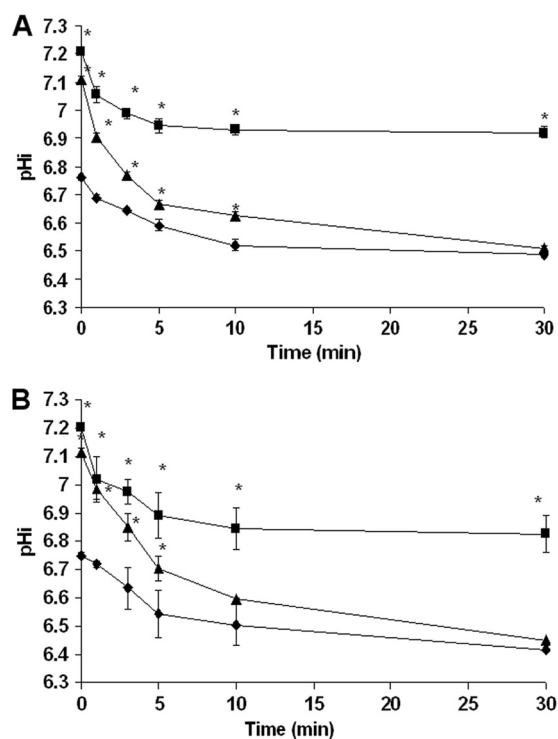


FIG. 5. Acidification of pH_i by TFQ and sodium azide in *L. major* lines. WT (diamonds), R4 (squares), and revR4 (triangles) BCECF-loaded promastigotes were incubated with 5 μ M TFQ (A) or with 20 mM sodium azide (B) at different time points (1, 3, 5, 10, and 30 min). The pH_i was calculated from a calibration curve as described in the legend of Fig. 2. The results are the means \pm SD from three independent experiments. Significant differences versus the WT were determined using Student's *t* test (*, *P* < 0.05 versus WT parasites).

to validate the mechanism of action of these compounds in this protozoan parasite. Thus, we selected for a TFQ-resistant *L. major* (R4) line that presents 2.5-fold higher EC₅₀s for TFQ in both the promastigote and intracellular amastigote stages, with an unstable resistant phenotype after 1 month without drug pressure. Experiments to increase the TFQ resistance level further were unsuccessful, although it should be noted that other authors have obtained 5- and 3-fold-higher resistance levels for sitamaquine in the promastigote and intracellular amastigote forms of *Leishmania*, respectively (2). None of the standard leishmanicidal drugs (Sb^{III}, amphotericin B, miltefosine, and paromomycin) displayed a cross-resistance profile with TFQ in the R4 line; cross-resistance was limited to other 8-aminoquinolines, such as sitamaquine and primaquine. The cross-resistance to sitamaquine detected is interesting, as this is a promising oral drug against leishmaniasis.

Reduced drug uptake is one of the main mechanisms of resistance in *Leishmania* (2, 5, 19); however, this mechanism was not relevant for the resistance to TFQ, as decreased TFQ uptake levels were similar for the R4 and revR4 lines.

Similarly to sitamaquine (14) and other aminoquinolines (9), TFQ appears to cross the plasma membrane by a pH gradient-driven diffusion process. The R4 parasites present a higher pH_i than WT parasites, as does the revR4 line, thus suggesting that these parasites maintain a phenotype with characteristics similar to that of the resistant line even though the TFQ sensitivity

was identical to that for WT parasites. The increase of pHi in R4 and revR4 *Leishmania* lines could contribute to the lower TFQ accumulation observed for these parasites. Indeed, the change in pHi observed as a result of pretreatment with NH₄Cl resulted in a significant reduction in TFQ accumulation. Additionally, we observed that R4 and revR4 *Leishmania* lines have a higher capacity to regulate the pHi than the WT line, although this regulation is not sufficient to prevent the toxicity of this drug in revR4.

Under physiological conditions, approximately 70% of the total bioenergetic requirements of *Leishmania* are fulfilled by oxidative phosphorylation in the mitochondria, a metabolic process which produces more ATP molecules from a given amount of glucose than glycolysis. However, when the ability of parasites to generate ATP through mitochondrial oxidative phosphorylation is compromised, parasites are able to adapt alternative metabolic pathways, such as increasing their glycolytic activity, to maintain their energy supply. We have demonstrated that an increase in glycolytic metabolism observed for R4 parasites is associated with increased ATP delivery to essential ATP-consuming cell processes, such as the maintenance of ion-motive ATPases required to retain their pHi values. A similar situation has been described for cancer cells, where mitochondrial metabolic defects due, in part, to mutations in mitochondrial DNA, dysfunction of the electron transport chain, aberrant expression of enzymes involved in energy metabolism, and insufficient oxygen available in the cellular microenvironment contribute to an increased dependency on glycolysis (32). This results in increased expression of enzymes required for glycolysis, such as hexokinase II, the enzyme catalyzing the first step of the glycolytic pathway (16). *Leishmania* R4 parasites can increase glycolytic ATP synthesis in several different ways, including upregulation of glycolytic enzymes or an increased uptake of glucose as a carbon source. Additionally, the modification of pHi in the R4 line can also change the enzymatic activities of glycolytic enzymes. We have observed that *Leishmania* R4 parasites present an increased accumulation of pyruvate as the end product of glycolysis but with no modification of their pyruvate kinase activity, this kinase being one of the key enzymes involved in glycolysis in trypanosomatids (26). Additionally, R4 parasites do not modify the accumulation of glucose as a carbon source. Thus, *Leishmania* R4 parasites can increase glycolytic ATP either through upregulation of the metabolism using other substrates as a carbon and energy source or by upregulation of other glycolytic enzymes. The first option can be ruled out in light of the fact that the ATP levels after treatment with sodium azide and deoxyglucose, which inhibits both mitochondrial synthesis and glycolysis, are significantly diminished. This indicates that R4 parasites cannot make use of other carbon sources, such as β -oxidation of fatty acids or the catabolism of certain amino acids (22). Experiments are under way to determine which glycolytic enzymes are upregulated and could therefore be used as molecular markers of TFQ resistance in *Leishmania*. Additionally, further studies using a metabolomics-based approach will be undertaken to identify the metabolic pathways associated with TFQ resistance.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Spanish grants SAF2009-07440 (to F.G.), ISCIII-Red de Investigación Cooperativa en Enfermedades Tropicales (RICET) RD06/0021/0002 (to F.G.), and MSC-FIS PI081902 (to J.M.P.-V.) and by the Plan Andaluz de Investigación (code BIO130).

We acknowledge the support of GlaxoSmithKline (Greenford, United Kingdom) for the tafenoquine, sitamaquine, and [¹⁴C]sitamaquine used throughout this research work.

We thank Roberto Docampo for his useful suggestions for the manuscript.

REFERENCES

- Berman, J. D., and L. S. Lee. 1983. Activity of 8-aminoquinolines against *Leishmania tropica* within human macrophages in vitro. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**:753–759.
- Bories, C., S. Cojean, F. Huteau, and P. M. Loiseau. 2008. Selection and phenotype characterisation of sitamaquine-resistant promastigotes of *Leishmania donovani*. *Biomed. Pharmacother.* **62**:164–167.
- Carvalho, L., et al. 2010. Tafenoquine, an antiplasmodial 8-aminoquinoline, targets *Leishmania* respiratory complex III and induces apoptosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:5344–5351.
- Chiquero, M. J., et al. 1998. Altered drug membrane permeability in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. *Biochem. Pharmacol.* **55**:131–139.
- Croft, S. L., S. Sundar, and A. H. Fairlamb. 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**:111–126.
- Guerin, P. J., et al. 2002. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect. Dis.* **2**:494–501.
- Reference deleted.
- Hale, B. R., et al. 2003. A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-ranging trial of tafenoquine for weekly prophylaxis against *Plasmodium falciparum*. *Clin. Infect. Dis.* **36**:541–549.
- Hawley, S. R., P. G. Bray, B. K. Park, and S. A. Ward. 1996. Amodiaquine accumulation in *Plasmodium falciparum* as a possible explanation for its superior antimalarial activity over chloroquine. *Mol. Biochem. Parasitol.* **80**:15–25.
- Jackson, P. R., et al. 1986. Detection and characterization of *Leishmania* species and strains from mammals and vectors by hybridization and restriction endonuclease digestion of kinetoplast DNA. *Vet. Parasitol.* **20**:195–215.
- Kennedy, M. L., et al. 2001. Chemosensitization of a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line by new sesquiterpenes from *Maytenus magellanica* and *Maytenus chubutensis*. *J. Med. Chem.* **44**:4668–4676.
- Kinnamon, K. E., et al. 1978. The antileishmanial activity of lepidines. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **27**:751–757.
- Krogstad, D. J., et al. 1987. Efflux of chloroquine from *Plasmodium falciparum*: mechanism of chloroquine resistance. *Science* **238**:1283–1285.
- López-Martín, C., J. M. Pérez-Victoria, L. Carvalho, S. Castanys, and F. Gamarro. 2008. Sitamaquine sensitivity in *Leishmania* species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**:4030–4036.
- Marchesini, N., and R. Docampo. 2002. A plasma membrane P-type H(+)-ATPase regulates intracellular pH in *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **119**:225–236.
- Mathupala, S. P., A. Rempel, and P. L. Pedersen. 2001. Glucose catabolism in cancer cells: identification and characterization of a marked activation response of the type II hexokinase gene to hypoxic conditions. *J. Biol. Chem.* **276**:43407–43412.
- Moore, E. M., and D. N. Lockwood. 2010. Treatment of visceral leishmaniasis. *J. Glob. Infect. Dis.* **2**:151–158.
- Mullin, K. A., et al. 2001. Regulated degradation of an endoplasmic reticulum membrane protein in a tubular lysosome in *Leishmania mexicana*. *Mol. Biol. Cell* **12**:2364–2377.
- Ouellette, M., J. Drummelsmith, and B. Papadopolou. 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist. Updat.* **7**:257–266.
- Reference deleted.
- Sandoval, W., R. Isea, E. Rodriguez, and J. L. Ramirez. 2008. A biochemical and genetic study of *Leishmania donovani* pyruvate kinase. *Gene* **424**:25–32.
- Saunders, E. C., et al. 2010. Central carbon metabolism of *Leishmania* parasites. *Parasitology* **137**:1303–1313.
- Seifert, K., et al. 2003. Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int. J. Antimicrob. Agents* **22**:380–387.
- Shanks, G. D., et al. 2001. A new primaquine analogue, tafenoquine (WR 238605), for prophylaxis against *Plasmodium falciparum* malaria. *Clin. Infect. Dis.* **33**:1968–1974.
- Tekwani, B. L., and L. A. Walker. 2006. 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **19**:623–631.

26. **van Schaftingen, E., F. R. Opperdoes, and H. G. Hers.** 1985. Stimulation of *Trypanosoma brucei* pyruvate kinase by fructose 2,6-bisphosphate. *Eur. J. Biochem.* **153**:403–406.
27. **Verdier, F., J. Le Bras, F. Clavier, I. Hatin, and M. C. Blayo.** 1985. Chloroquine uptake by *Plasmodium falciparum*-infected human erythrocytes during in vitro culture and its relationship to chloroquine resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **27**:561–564.
28. **Vieira, L., A. Lavan, F. Dagger, and Z. I. Cabantchik.** 1994. The role of anions in pH regulation of *Leishmania major* promastigotes. *J. Biol. Chem.* **269**:16254–16259.
29. **Vieira, L., I. Slotki, and Z. I. Cabantchik.** 1995. Chloride conductive pathways which support electrogenic H⁺ pumping by *Leishmania major* promastigotes. *J. Biol. Chem.* **270**:5299–5304.
30. **Walsh, D. S., et al.** 2004. Efficacy of monthly tafenoquine for prophylaxis of *Plasmodium vivax* and multidrug-resistant *P. falciparum* malaria. *J. Infect. Dis.* **190**:1456–1463.
31. **Walsh, D. S., et al.** 2004. Randomized trial of 3-dose regimens of tafenoquine (WR238605) versus low-dose primaquine for preventing *Plasmodium vivax* malaria relapse. *Clin. Infect. Dis.* **39**:1095–1103.
32. **Xu, R. H., et al.** 2005. Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia. *Cancer Res.* **65**:613–621.
33. **Yardley, V., F. Gamarro, and S. L. Croft.** 2010. Antileishmanial and anti-trypanosomal activity of the 8-aminoquinoline tafenoquine. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**:5356–5358.
34. **Yeates, C.** 2002. Sitamaquine (GlaxoSmithKline/Walter Reed Army Institute). *Curr. Opin. Investig. Drugs* **3**:1446–1452.
35. **Zhu, A., R. Romero, and H. R. Petty.** 2010. A sensitive fluorimetric assay for pyruvate. *Anal. Biochem.* **396**:146–151.



Discusión

DISCUSIÓN

Estado actual de la leishmaniasis.

La leishmaniasis se engloba dentro del grupo de enfermedades tropicales olvidadas, afecta a 12 millones de personas y es endémica en 88 países con 350 millones de personas en situación de riesgo (<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>). A pesar de los avances tangibles en el diagnóstico, tratamiento, e investigación básica en los últimos 10 años, la leishmaniasis sigue arraigada en la pobreza y olvidada por los gobiernos y la industria farmacéutica. Los actuales obstáculos para una prevención realista y un tratamiento eficaz incluyen un inadecuado control del vector (mosca de la arena), carencia de vacunas, un insuficiente acceso a los fármacos y la falta de interés para desarrollar nuevos fármacos económicamente accesibles (Murray *et al.* 2005). El reducido arsenal de fármacos disponibles en el mercado para combatir la leishmaniasis presenta varios inconvenientes, entre los cuales se incluyen la toxicidad, una eficacia variable, el requerimiento de un tratamiento prolongado y precios muy altos, aunque con respecto a este último punto, los esfuerzos realizados por parte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de organizaciones no gubernamentales (ONG), han logrado que tengan un precio preferencial para países donde la leishmaniasis es endémica, transformándolos en una opción más accesible para países con ingresos medios y bajos (van Griensven *et al.* 2010). El conocimiento reciente del genoma completo de diferentes especies de *Leishmania*, brinda nuevas oportunidades para estudiar e identificar rutas metabólicas específicas de estos parásitos, lo que podría ayudar a desarrollar nuevos fármacos hacia blancos de acción específicos del parásito, pero esto requiere muchos años de investigación y ensayos clínicos antes de contar con nuevos compuestos en el mercado para combatir la leishmaniasis. Ante este escenario la OMS recomienda el uso de terapias combinadas, al objeto de aumentar la vida útil de los fármacos existentes, tratando de retrasar la aparición de resistencia a los mismos, y a su vez disminuir la duración de los tratamientos y su toxicidad. Otra estrategia en uso para aumentar el arsenal de fármacos es el estudio de la actividad leishmanicida de compuestos originalmente desarrollados o en uso frente a otras enfermedades. Esto ha dado sus frutos en el caso del antitumoral miltefosina y el antibiótico paromomicina, fármacos empleados en la actualidad para el tratamiento de la leishmaniasis (Sundar *et al.* 2000; Sundar *et al.* 2007).

Las 8-aminoquinolinas como posibles agentes leishmanicidas.

Las 8-aminoquinolinas, desarrolladas inicialmente para buscar un sustituto de la quinina para combatir la malaria, forman parte de los compuestos candidatos para tratar la leishmaniasis (Richard y Werbovetz, 2010). Las 8-aminoquinolinas vienen usándose desde hace más de 80 años como fármacos antiprotozoarios principalmente como antimaláricos (Tekwani y Walter, 2006). Desde 1950, cuando se observó por primera vez su potencial como agentes leishmanicidas, ha habido un considerable interés en el desarrollo de análogos de 8-aminoquinolinas con mayor actividad frente a protozoos parásitos del género *Leishmania* (Tekwani y Walter, 2006).

Dentro de la extensa síntesis de análogos de 8-aminoquinolinas llevada a cabo por el Walter Reed Army Institute for Research (WRAIR) en 1978, se identificó a la sitamaquina como uno de los compuestos más activos frente a *L. donovani in vivo*, convirtiéndose en el candidato más prometedor para un desarrollo clínico. Previamente, se había observado que tenía actividad frente a malaria y, a su vez, que era activo *in vitro* frente a *L. donovani*, *L. mexicana* y *L. tropica* (Kinnamon *et al.* 1978). Posteriormente, se han desarrollado diversos ensayos clínicos con este fármaco, entre los cuales están los estudios de fase II llevados a cabo en Kenia e India con pacientes con LV, donde se ha producido un 85% de cura 6 meses después de un tratamiento de 28 días (Wasunna *et al.* 2005; Jha *et al.* 2005). A pesar de que en general los pacientes toleraron bien el fármaco, ciertos problemas renales se detectaron en unos pocos pacientes, lo que hizo que la compañía farmacéutica GlaxoSmithKline (GSK) realizara un estudio de fase IIb en India donde se observó que la sitamaquina era mucho mejor tolerada que la anfotericina B-desoxicolato intravenosa y que unos pocos pacientes presentaron efectos secundarios renales reversibles. Actualmente, GSK ha parado los estudios de fase clínica IIb hasta conseguir solventar los problemas de toxicidad de la sitamaquina, principalmente casos de metahemoglobinemia, asociada a pacientes con deficiencia de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.

La tafenoquina, sintetizada también dentro del programa de WRAIR para buscar nuevos fármacos para tratar la malaria, ha mostrado ser, en estudios clínicos de fase II, altamente efectiva para la cura radical de la malaria y para la profilaxis de infecciones causadas por *P. vivax* y *P. falciparum*. En general, la tafenoquina ha mostrado ser un compuesto seguro y bien tolerado (Crockett y Kain, 2007). Actualmente, está siendo desarrollada por GSK en asociación con Medicines for Malaria Venture, como un potencial nuevo tratamiento para la cura radical de la malaria causada por *P. vivax*.

Recientemente, en colaboración con el grupo del Prof. Simon Croft (LSHTM-University of London), hemos estudiado la actividad leishmanicida de la tafenoquina. Los resultados obtenidos han demostrado que la tafenoquina es efectiva, tanto *in vitro* frente a formas promastigotes y amastigotes, como *in vivo* en modelos de leishmaniasis en ratón, con una potencia similar a la observada con sitamaquina (Yardley *et al.* 2010). Las 8-aminoquinolinas sitamaquina y tafenoquina tienen un futuro prometedor como fármacos leishmanicidas pero, sin embargo, se desconoce tanto su mecanismo de acción como las posibilidades de que *Leishmania* desarrolle mecanismos de resistencia. Es por tanto que decidimos abordar los estudios presentados en esta Tesis Doctoral que permitirán un mayor conocimiento sobre estos fármacos, y en particular sobre la tafenoquina que ha demostrado tener una menor toxicidad, siendo un fármaco oral prometedor frente al tratamiento de la leishmaniasis.

Específicamente, la información que existía hasta el momento sobre el mecanismo de acción de la sitamaquina en *Leishmania* era muy escasa. Se había descrito que la sitamaquina produce cambios morfológicos en el parásito (Langreth *et al.* 1983), acumulándose en compartimentos ácidos y produciendo alcalinización en los acidocalcisomas (Vercesi *et al.* 2000); igualmente, se había sugerido que la sitamaquina puede generar alteraciones a nivel mitocondrial en parásitos permeabilizados (Vercesi y Docampo, 1992). Con respecto a tafenoquina, antes del comienzo de esta Tesis Doctoral se desconocía tanto su mecanismo de acción y resistencia en *Leishmania*.

Mecanismo de entrada de sitamaquina y tafenoquina en *Leishmania*, y la influencia de los organelos ácidos en la acumulación y sensibilidad al fármaco.

La membrana plasmática es la primera barrera que limita la entrada de un fármaco, por lo que es de gran importancia dilucidar cómo penetra un fármaco al interior celular, lo cual facilita su posterior optimización y el análisis de la posibilidad de aparición de resistencias. Con el fin de estudiar el mecanismo de entrada de ambas 8-aminoquinolinas al parásito, realizamos estudios para poder discriminar si se trata de una entrada dependiente de energía, mediada por un transportador, mediante endocitosis o si es mediante un proceso pasivo por difusión.

La sitamaquina es una base débil lipofílica, los estudios previos sobre su interacción con la membrana del parásito sugieren que la entrada de la sitamaquina al parásito estaría mediada por interacciones hidrofóbicas entre la sitamaquina y los fosfolípidos de la membrana (Dueñas-Romero *et al.* 2007). Empleando sitamaquina marcada con ^{14}C ,

hemos demostrado que la entrada de la sitamaquina al parásito es un proceso independiente de energía y de temperatura, y por tanto no interviene un transportador proteico dependiente de ATP ni penetra mediante endocitosis. Todos estos datos nos sugieren que la sitamaquina entra al parásito por un proceso de difusión (*Artículo I del apartado de resultados*). Igualmente, observamos que la entrada de sitamaquina es dependiente del pH extracelular, la protonación del fármaco reduce la velocidad de difusión a través de la membrana plasmática, al igual que se ha descrito para otras bases débiles lipofílicas que son protonables a pH fisiológico. En un estudio posterior, se ha confirmado que la sitamaquina entra al parásito mediante un proceso de difusión dependiente de un gradiente eléctrico e independiente tanto de energía como de esteroides (Coimbra *et al.* 2010).

Para estudiar el mecanismo de entrada de la tafenoquina llevamos a cabo un análisis similar al realizado con la sitamaquina. Los resultados obtenidos mostraron que la tafenoquina, también una base débil, entra en *Leishmania* mediante un proceso no saturable, independiente de energía y dependiente de gradiente de pH, dando indicios de que la entrada está mediada por un proceso de difusión al igual que sucede con la sitamaquina, pero a diferencia de ésta, la entrada de tafenoquina mostró ser dependiente de temperatura (*Artículo II del apartado de resultados*). La fluidez de la membrana plasmática podría afectar en este caso la permeabilidad del fármaco. Los estudios de anisotropía de la membrana plasmática de *Leishmania* mostraron un incremento significativo de la rigidez a 4°C (*Artículo II del apartado de resultados*). Resultados similares han sido descritos para la mitoxantrona en células de mamífero. La acumulación de ese fármaco antitumoral hidrofóbico se reduce a 4°C, incluso en células que sobreexpresan bombas de eflujo dependientes de energía, mientras que la permeabilidad se reestablece al añadir agentes que fluidifican la membrana plasmática (Breuzard *et al.* 2005). Igualmente, se conoce que la temperatura puede afectar los valores de pKa del fármaco, como sucede con la 4-aminoquinolina cloroquina (Augustijns, 1996), reduciendo de esta manera el paso de la tafenoquina a través de la membrana plasmática y/o su acumulación en orgánulos internos.

Al considerar que cualquier alteración a nivel de la membrana plasmática del parásito puede modificar la interacción de ésta con un fármaco, y por consiguiente afectar la entrada del mismo al interior del parásito, decidimos estudiar la influencia de los esteroides en el proceso de entrada de la tafenoquina en *Leishmania*. Para realizar el

estudio utilizamos dos compuestos que extraen los esteroides de la membrana plasmática, la metil- β -ciclodextrina (MCD) y la colesterol oxidasa (CH-OX), logrando una disminución en la cantidad de esteroides de membrana (*Artículo II del apartado de resultados*). Al estudiar el efecto que ejerce la disminución de los esteroides de membrana en la entrada de la tafenoquina al parásito, observamos que la acumulación del fármaco no se ve alterada significativamente post-tratamiento con CH-OX, mientras que el tratamiento con MCD produce una reducción de la cantidad de tafenoquina en el interior del parásito. La diferencia entre los dos compuestos en su efecto sobre la entrada del fármaco puede explicarse por su eficacia para extraer esteroides de la membrana plasmática. Los resultados obtenidos nos indican que la tafenoquina entra al parásito mediante un proceso de difusión, y que este es dependiente de esteroides; sin embargo, los esteroides no influyen en el proceso de entrada de la sitamaquina (Coimbra *et al.* 2010). Quedaría por determinar si la entrada del fármaco es dependiente de una interacción directa con los esteroides y si se lleva a cabo a través de las denominadas "balsas lipídicas".

En el caso de la sitamaquina, evaluamos también si existía una relación entre la acumulación del fármaco y la susceptibilidad al mismo por parte del parásito. Estudios previos *in vitro* han mostrado que diferentes especies de *Leishmania* presentan una distinta sensibilidad a la sitamaquina (Garnier *et al.* 2006). En este estudio, hemos corroborado estos resultados y observamos que los promastigotes de *L. donovani* y de *L. infantum* eran los que presentaban menor y mayor sensibilidad a la sitamaquina, respectivamente. Decidimos estudiar si la diferencia observada en la sensibilidad al fármaco podía estar relacionada con diferencias en el nivel de acumulación de la sitamaquina en el parásito. Como en el caso de la sensibilidad, las diferentes especies de *Leishmania* analizadas mostraron diferentes niveles de acumulación de sitamaquina; sin embargo, no se observó una relación entre los niveles de sensibilidad y acumulación. Más aún, observamos que el nivel de acumulación es característico de cada cepa y no de especie (*Artículo I del apartado de resultados*). Por otra parte, tanto al tratar los parásitos con NH_4Cl , que incrementa el pH de los compartimentos ácidos intracelulares, o con los ionóforos monensina (Na^+ , H^+) y nigericina (K^+ , H^+), que alteran el gradiente de pH en el parásito y por tanto alcalinizan los acidocalcisomas, se produce una disminución en la acumulación de sitamaquina y una reducción en las diferencias observadas entre las diferentes cepas ensayadas. Además, la sitamaquina

puede producir alcalinización en los acidocalcisomas de parásitos de *L. donovani* permeabilizados (Vercesi *et al.* 2000). Los ensayos que hemos realizado mostraron que efectivamente la sitamaquina produce alcalinización en los acidocalcisomas, y los resultados obtenidos tras el uso de sondas acidotrópicas y el estudio del contenido en polifosfatos, sugieren que existe una relación entre el volumen de acidocalcisomas en cada cepa y su nivel de acumulación de sitamaquina (*Artículo I del apartado de resultados*). Para reforzar la conclusión de que la sitamaquina se acumula en orgánulos ácidos, estudiamos lo que sucedía en una línea de *L. major* mutante nula para la AP3 δ (Δ AP3 δ). En esta línea, los acidocalcisomas carecen de la pirofosfatasa translocadora de protones de tipo vacuolar (V-H⁺-PPasa) y tienen afectada la actividad de otra bomba de protones de tipo vacuolar, la V-H⁺-ATPasa, lo cual produce su alcalinización y además tienen reducido el contenido de polifosfatos (Besteiro *et al.* 2008). Lo que observamos fue que la acumulación de sitamaquina en la línea Δ AP3 δ es de un 5% con respecto a la línea parental, confirmando que la sitamaquina se acumula en orgánulos ácidos principalmente en acidocalcisomas. Además, se corroboró la ausencia de correlación entre acumulación y sensibilidad, ya que la susceptibilidad de ambas líneas hacia la sitamaquina fue prácticamente la misma tanto en promastigotes como en amastigotes intracelulares.

La fluorescencia intrínseca de la tafenoquina nos permitió estudiar la distribución del fármaco dentro del parásito. Observamos mediante microscopía que la tafenoquina se localizaba principalmente en vesículas que podrían ser acidocalcisomas (*Artículo IV del apartado de resultados*). La tafenoquina en la línea Δ AP3 δ , descrita anteriormente, mostró una distribución dispersa, diferente a la observada en la línea salvaje; sin embargo, la susceptibilidad de ambas líneas hacia la tafenoquina fue la misma, descartando que la localización de la tafenoquina en los acidocalcisomas influya en su mecanismo de acción (*Artículo IV del apartado de resultados*), al igual que habíamos descrito para la sitamaquina. Esta conclusión, en el caso de la tafenoquina, tiene una salvedad y es que en la línea Δ AP3 δ los acidocalcisomas tienen un pH más alcalino, y como la fluorescencia de la tafenoquina disminuye al aumentar el pH, en realidad no podemos descartar al 100% que la tafenoquina se localice en los acidocalcisomas de la línea mutada. Aún así, en la línea Δ AP3 δ los acidocalcisomas presentan tan grandes diferencias en su composición al compararlos con los de la línea salvaje que aunque la

tafenoquina se acumulara en ellos, es muy poco probable que sean el blanco de acción del fármaco cuando ambas líneas presentan la misma sensibilidad.

Efecto de la sitamaquina y tafenoquina en el metabolismo energético de *Leishmania*.

En estudios preliminares se ha descrito que la sitamaquina puede bloquear la función mitocondrial en formas promastigotas permeabilizadas de *Leishmania* (Vercesi y Docampo, 1992). Por tanto, analizamos con mayor profundidad la influencia de ambas 8-aminoquinolinas sobre el metabolismo energético de *Leishmania* y hallamos que la acción de ambos fármacos produce una rápida caída de los niveles de ATP libre en el parásito, reducción que es dependiente de la concentración del fármaco. (*Artículos III y IV del apartado de resultados*). Los ensayos se realizaron a tiempo real empleando promastigotes transfectados con una forma mutada de la enzima luciferasa de *Photinus pyralis* que se localiza en el citosol del parásito (Luque-Ortega *et al.* 2003). La disminución en los niveles de ATP puede deberse principalmente a dos causas: a un efecto del fármaco a nivel de la síntesis de ATP, o a una salida de ATP del parásito debido a una alteración de la membrana plasmática. En el caso de la sitamaquina, una alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática podría producirse tras las interacciones que suceden entre la sitamaquina y los fosfolípidos aniónicos de la membrana plasmática (Dueñas-Romero *et al.* 2007). La tafenoquina sabemos que presenta una entrada rápida aunque desconocemos exactamente como interacciona con la membrana plasmática. Para evaluar el efecto de ambos fármacos sobre la membrana plasmática utilizamos dos aproximaciones (Luque-Ortega *et al.* 2003). Por un lado utilizamos la sonda fluorescente SYTOX Green que requiere de lesiones grandes de la membrana plasmática para poder atravesarla y unirse a los ácidos nucleicos intracelulares; los experimentos mostraron que después de incubar los parásitos con sitamaquina y tafenoquina en condiciones en las que se produce una caída del contenido de ATP, la acumulación de la sonda fluorescente en los parásitos fue sólo de aproximadamente un 10% comparada con la observada en parásitos con la membrana plasmática 100% permeabilizada debido a la incubación de estos con 0.05% de Triton X-100, descartando así que el mecanismo de acción de ambos fármacos involucre la formación de grandes lesiones en la membrana plasmática (*Artículos III y IV del apartado de resultados*). En el caso de la sitamaquina utilizamos una segunda

aproximación que consistió en el estudio del efecto de ésta sobre el potencial de la membrana plasmática ya que su modificación puede afectar el consumo de ATP, necesario para el mantenimiento de este potencial; para ello también usamos una sonda fluorescente y observamos que la sitamaquina produce despolarización de la membrana plasmática, pero esta alteración del gradiente iónico a través de la membrana ocurre posterior a la caída del nivel de ATP libre intracelular (*Artículo III del apartado de resultados*). Además, tras el tratamiento con ambos fármacos, no se detectó una liberación significativa de ATP al medio extracelular. Estos resultados descartan que la caída del ATP libre intracelular observada para ambos fármacos sea debida a un efecto de estos sobre la integridad de la membrana plasmática, y sugieren que pueda deberse a un efecto sobre la síntesis de ATP.

Leishmania se clasifica dentro del grupo de tripanosomátidos donde la producción de ATP se da principalmente por fosforilación oxidativa (Tielens y van Hellemond, 2009), por lo que decidimos estudiar el efecto que tenían tanto la sitamaquina como la tafenoquina sobre la mitocondria. La actividad antiparasitaria de muchos fármacos está mediada por una alteración del potencial de la membrana mitocondrial, como por ejemplo, la pentamidina y la miltefosina (Mukherjee *et al.* 2006; Luque-Ortega and Rivas, 2007), que son fármacos de uso clínico frente a la leishmaniasis, y otros como chalconas, la histatina 5, la edelfosina y la camptotecina frente a diferentes especies de *Leishmania*, (Chen *et al.* 2001; Luque-Ortega *et al.* 2008; Alzate *et al.* 2008; Sen *et al.* 2004), alcaloides frente a *Trypanosoma brucei brucei* (Rosenkranz y Wink, 2008) o derivados del ácido cinámico frente a *T. cruzi* (Pardo Andreu *et al.* 2009). Vercesi y Docampo ya en 1992 habían observado que en promastigotes de *L. donovani* permeabilizados con digitonina, la sitamaquina produce un desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, convirtiendo a la mitocondria en un posible blanco de acción para el fármaco (Vercesi y Docampo, 1992). Hemos observado que al tratar promastigotes de *L. donovani* con sitamaquina y tafenoquina, se produce una despolarización del potencial de la membrana mitocondrial; resultados que sugieren que el blanco de acción para cada uno de los fármacos podría estar a nivel mitocondrial, y específicamente dentro de la cadena respiratoria. Para validar esta hipótesis decidimos estudiar el efecto de los fármacos sobre el consumo de oxígeno en parásitos permeabilizados. Una vez comprobado, tras añadir ADP, que la permeabilización de los parásitos no afecta el funcionamiento de la cadena respiratoria, se adicionaron los fármacos y en ambos casos observamos una total inhibición del consumo de oxígeno. A

continuación, estudiamos específicamente sobre qué complejo actúa cada uno de los fármacos, empleando para ello distintos sustratos e inhibidores de los diferentes complejos que componen la cadena respiratoria (Figura I). La adición de tetrametil-*p*-fenildiamina (TMPD) más ascorbato, que dona electrones al citocromo c, produjo una reversión en la inhibición del consumo de oxígeno producido por ambos fármacos, descartando así al complejo IV (citocromo c oxidasa) como su blanco de acción. En *Leishmania*, el complejo II, que utiliza succinato como sustrato, y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de FAD⁺ (FAD-GPDH), que utiliza α -glicerofosfato como sustrato, son los que aportan electrones a la ubiquinona para que ésta los traslade al complejo III. Al agregar α -glicerofosfato observamos una reversión de la inhibición producida por la sitamaquina pero no así de la inducida por la tafenoquina. Además, al inhibir el consumo de oxígeno adicionando malonato, un inhibidor del complejo II, y revertir en parte esta inhibición mediante la adición de α -glicerofosfato, observamos que la adición de sitamaquina era incapaz de volver a inhibir el consumo de oxígeno; sin embargo, el consumo de oxígeno era nuevamente inhibido mediante la adición de tafenoquina. Llegamos entonces a la conclusión de que la sitamaquina actúa sobre el complejo II (succinato deshidrogenasa), mientras que el blanco de acción de la tafenoquina sería el complejo III (citocromo c reductasa) (Artículos III y IV del apartado de resultados) (Figura I).

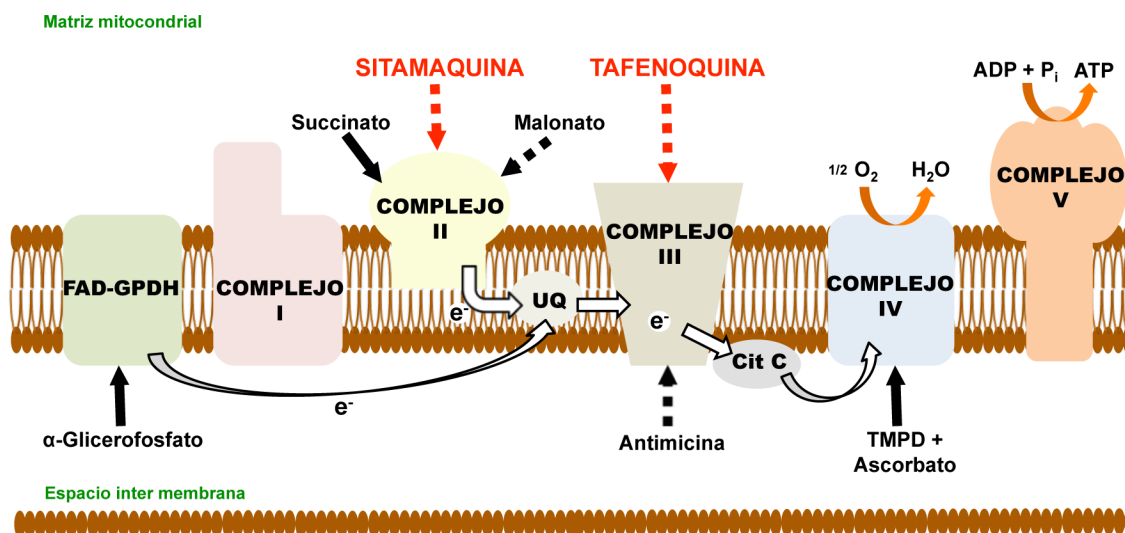


Figura I. Representación de la cadena respiratoria en *Leishmania* con los sustratos e inhibidores usados para el ensayo. El aporte de electrones está marcado con flechas de trazo continuo y su inhibición con flechas de trazo discontinuo. UQ: ubiquinona; Cit C: citocromo c; TMPD: tetrametil-*p*-fenildiamina; FAD-GPDH: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de FAD⁺. Esquema basado en Guerra *et al.* 2006, y en Oppendoes y Michels, 2008.

Estos resultados los confirmamos al observar la inhibición de la actividad de la succinato deshidrogenasa y de la citocromo c reductasa por la sitamaquina y la tafenoquina, respectivamente. En ambos casos, la inhibición de la enzima se producía en una forma dosis-dependiente (*Artículos III y IV del apartado de resultados*). El complejo II ya se ha descrito anteriormente como blanco de acción de otros compuestos leishmanicidas como son las fenil fenalenonas, bifosfonato derivado de la benzofenona, y tenoil-trifluoro-acetona (Luque-Ortega *et al.* 2004; Luque-Ortega *et al.* 2010; Mehta y Shaha, 2004). Además, el complejo III se ha descrito como blanco de acción de distintos agentes antimicrobianos, como por ejemplo, del fármaco antimalárico atovacuona (Fry y Pudney, 1992) y de la propamidina que actúa frente al hongo patógeno *Botrytis cinerea* (Wu *et al.* 2010).

Sitamaquina y tafenoquina inducen la muerte de *Leishmania* por un proceso similar a la apoptosis.

El desacoplamiento de la fosforilación oxidativa debido a la acción de compuestos leishmanicidas, en la mayoría de los casos, se ha visto que está estrechamente ligado a un aumento en los niveles de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en el parásito. Además, se ha descrito en *L. donovani* que la inhibición de los complejos II y III de la cadena respiratoria da lugar a la producción de peróxido de hidrógeno y superóxido, respectivamente (Mehta y Shaha, 2004). En base a estos antecedentes, determinamos si ambos fármacos inducen la producción de ROS empleando dos sondas fluorescentes: H₂DCF-DA, que principalmente detecta peróxido de hidrógeno, y MitoSOX Red, que detecta superóxido mitocondrial. El tratamiento con ambos fármacos produjo un aumento de los niveles de ROS (*Artículos III y IV del apartado de resultados*). La alteración del potencial mitocondrial y el aumento en los niveles de ROS son característicos dentro de una cascada de eventos que se producen cuando se desencadena un proceso de apoptosis. La alteración de la homeostasis del calcio es otro evento típico dentro de esta cascada y a su vez está íntimamente ligado a la generación de ROS y a la disfunción mitocondrial (Smirlis *et al.* 2010). Esto nos llevó a estudiar el efecto de la sitamaquina y tafenoquina sobre los niveles de Ca²⁺ libre citosólico en *Leishmania*. Un aumento en los niveles de Ca²⁺ citosólico debido a un incremento tanto del influjo de Ca²⁺ extracelular como de la liberación de Ca²⁺ al citosol a partir de reservorios intracelulares, principalmente el retículo endoplásmico, acidocalcisomas y

mitocondria (Moreno y Docampo, 2003), produce citotoxicidad. Comprobamos que tanto la sitamaquina como la tafenoquina inducen un aumento en el nivel de Ca^{2+} libre citosólico. El uso de un quelante de calcio, EGTA, en el medio extracelular, nos permitió discriminar la procedencia del Ca^{2+} ; mientras que en el caso de la sitamaquina este aumento se debe, aproximadamente a partes iguales, a un aporte de Ca^{2+} extra e intracelular; en el caso de la tafenoquina, el aporte es en un 70% debido al Ca^{2+} procedente de reservorios intracelulares (*Artículos III y IV del apartado de resultados*). Se ha descrito anteriormente al estudiar el mecanismo de acción de varios compuestos con actividad leishmanicida que estos tres efectos: alteración del $\Delta\Psi_m$, ROS y Ca^{2+} citosólico, pueden sucederse en diferente orden (Mukherjee *et al.* 2002; Das *et al.* 2008; Sudhandiran y Shaha, 2003; Sen *et al.* 2004); harían falta experimentos adicionales para evaluar cómo cada uno de ellos influye en la aparición de los otros.

En *Leishmania* se ha descrito que la aparición de estos tres eventos moleculares es un indicador de la activación en el parásito de un proceso de muerte similar a la apoptosis (Mehta y Shaha, 2004; Mukherjee *et al.* 2002; Sudhandiran y Shaha, 2003). La externalización de fosfatidilserina, uno de los primeros eventos que se observa en un proceso de apoptosis, sumado a la degradación de la cromatina que se refleja en el aumento en el contenido en ADN hipodiploide debido a la acción de ambos fármacos, refuerzan los resultados obtenidos al estudiar el $\Delta\Psi_m$, ROS y Ca^{2+} citosólico, y nos permite concluir que tanto la sitamaquina como la tafenoquina inducen la muerte en *Leishmania* mediante un proceso similar a la apoptosis (Figura II).

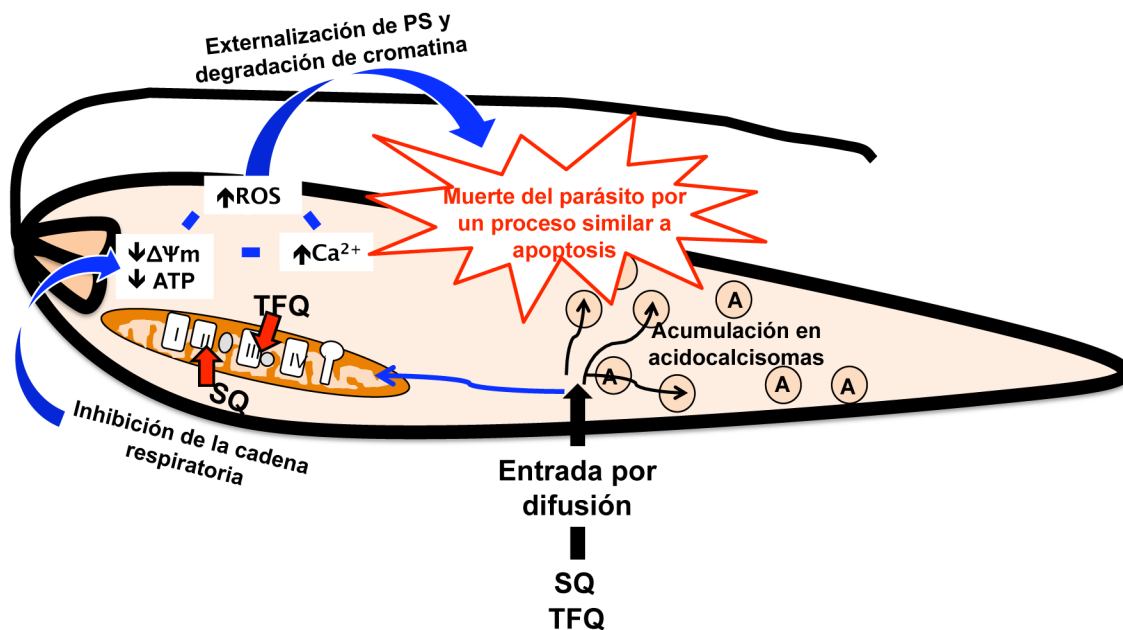


Figura II. Mecanismo de acción de la sitamaquina y la tafenoquina en *Leishmania*. La tafenoquina y sitamaquina entran al parásito por un proceso de difusión. Se acumulan principalmente en acidocalcisomas, pero su blanco de acción está en la mitocondria. La sitamaquina y la tafenoquina inhiben los complejos II y III, respectivamente, de la cadena respiratoria, produciendo una caída en los niveles de ATP y la despolarización del potencial de la membrana mitocondrial. Esto va acompañado de un aumento en los niveles de Ca²⁺ libre intracelular y de ROS. Estos eventos inducen la externalización de fosfatidilserina y la degradación de la cromatina, dando lugar a la muerte del parásito por un proceso similar a la apoptosis. SQ: sitamaquina; TFQ: tafenoquina; ΔΨ_m: potencial de la membrana mitocondrial; ROS: especies reactivas de oxígeno; A: acidocalcisomas.

Estudio de la resistencia a sitamaquina y tafenoquina en *Leishmania*.

La actividad *in vivo* de la sitamaquina y tafenoquina frente a *Leishmania*, hace de estos fármacos una alternativa a tener en consideración dentro del tratamiento actual frente a la leishmaniasis, así como también permite considerarlos como fármacos de elección a la hora de diseñar terapias combinadas.

Hemos determinado la forma de entrada, y el mecanismo de acción de ambos fármacos que actúan sobre la mitocondria del parásito, produciendo la muerte celular mediante un proceso similar a la apoptosis. El siguiente paso, pensando en un futuro uso clínico, es tratar de asegurar que tengan una larga vida, evaluando la facilidad con que se puede inducir experimentalmente resistencia a los mismos, y en caso de aparición de resistencia evaluar los mecanismos por los cuales se genera. El conocimiento de los

mecanismos de resistencia podría ayudar a un uso racional de los fármacos en zonas endémicas y, a su vez, a combatir la aparición de resistencia a los mismos.

La forma en que intentamos obtener experimentalmente *Leishmania* resistentes a sitamaquina y tafenoquina por separado, fue mediante el método de exposición a concentraciones crecientes de fármaco. Este método ya ha sido usado con éxito para generar líneas de *Leishmania* resistente a otros fármacos, entre ellos, miltefosina, anfotericina B, glucantime o paromomicina (Seifert *et al.* 2003; Mbongo *et al.* 1998; Arana *et al.* 1998; Maarouf *et al.* 1998). Sin embargo, bajo nuestras condiciones experimentales, empleando este método no logramos generar una línea resistente a sitamaquina. Por el contrario, el grupo del Dr. Philippe Loiseau (Université Paris-Sud, Paris, Francia), mediante este mismo método, generó *in vitro* una línea de promastigotes de *L. donovani* casi 5 veces menos sensible a sitamaquina que la línea salvaje (Bories *et al.* 2008). Sin embargo, hay que tener en consideración que las condiciones experimentales empleadas por este grupo, en particular el cultivo en presencia de un 5 % CO₂, son diferentes a las usuales en el mantenimiento de *Leishmania*. Los estudios realizados por ese grupo demostraron que la resistencia se mantenía en formas intracelulares amastigotes dentro de macrófagos peritoneales de ratón (aunque en este caso el índice de resistencia pasaba de 5 a 3 veces). Adicionalmente, se determinó que la resistencia a sitamaquina era estable cuando los parásitos eran mantenidos en medio de cultivo sin sitamaquina por un periodo de tiempo de 3 meses. Los estudios de infección experimental, demostraron que esta línea de *Leishmania* resistente a sitamaquina era significativamente menos infectiva que la control (Bories *et al.* 2008), sin embargo no argumentan posibles causas que pudiesen explicar este descenso en la capacidad infectiva de los parásitos.

En el caso de la tafenoquina, sí hemos logrado mediante este método obtener experimentalmente una línea de promastigotes de *L. major* menos sensible al fármaco, llamada R4, con una tasa de crecimiento en presencia de 4 µM de tafenoquina similar a la de la línea control, y con un índice de resistencia de 2,5, el máximo valor que se pudo obtener. Esta línea R4, al ser mantenida un mes en medio de cultivo sin fármaco, demostró tener un fenotipo de resistencia inestable, dado que tras este periodo de tiempo los valores de sensibilidad a tafenoquina eran similares a los controles; a esta línea revertida le llamamos revR4. Igualmente, observamos que el índice de resistencia de las formas promastigotes de la línea R4, se mantenía en las formas amastigotes

intracelulares dentro de macrófagos peritoneales de ratón. La línea R4 no presentó resistencia cruzada a fármacos leishmanicidas en uso como el SbIII (forma activa tras la reducción intracelular del complejo de SbV), anfotericina B, miltefosina y paromomicina, pero sí a otras 8-aminoquinolinas como primaquina y sitamaquina (*Artículo V del apartado de resultados*). Curiosamente, frente a la sitamaquina, la línea R4 tiene un índice de resistencia (2) que no logramos exponiendo a la línea control a concentraciones crecientes de este fármaco.

Una vez obtenida la línea resistente, iniciamos el estudio del mecanismo de resistencia de *L. major* a tafenoquina. La obtención de la línea revR4, que presenta la misma sensibilidad hacia la tafenoquina que la línea control pero que a su vez comparte muchas características con la línea R4, nos ayudó a discriminar que fenotipos de la línea R4 podrían estar implicados en el proceso de resistencia al fármaco.

Lo primero que abordamos fue el estudio de la acumulación de fármaco en las tres líneas de *Leishmania*, considerando que uno de los principales mecanismos de resistencia a fármacos que *Leishmania* puede desarrollar es una disminución en la entrada o un aumento en el eflujo de los mismos (Polonio y Efferth, 2008). Observamos una disminución en la acumulación del fármaco en la línea R4 con respecto a la línea control, pero no la asociamos con un mecanismo de resistencia relevante dado que esta disminución en la acumulación de fármaco también se observó en la línea revR4. Estudiamos el pHi de las tres líneas y observamos que tanto la línea R4 como la revR4 tienen un pHi mayor que la línea control. Previamente, habíamos descrito que la entrada de la tafenoquina es dependiente del gradiente de pH (*Artículo V del apartado de resultados*), el mayor pHi de las líneas R4 y revR4 podría explicar las diferencias observadas en la acumulación del fármaco. Para confirmar la influencia del pHi en la acumulación de tafenoquina en las tres líneas, realizamos un pretratamiento con NH₄Cl para inducir un incremento del pHi y observamos como efectivamente disminuía la acumulación de fármaco.

Hemos descrito previamente que la tafenoquina actúa sobre la cadena respiratoria del parásito produciendo una rápida caída en el nivel de ATP. Cuando realizamos un estudio comparativo de los niveles de ATP en las tres líneas de *Leishmania* (control, R4 y revR4) y el efecto de la tafenoquina, comprobamos que el nivel basal de ATP en la línea R4 es mayor que en el control; igualmente, comprobamos que la caída de ATP debido a la acción del fármaco es menor en la línea R4 que en el control. La línea revR4 presenta un nivel basal de ATP intermedio entre el de las líneas R4 y control, pero a

partir de una concentración 5 μ M de tafenoquina, el nivel de ATP observado posterior a la acción del fármaco es igual al de la línea control (*Figura 3 del Artículo V del apartado de resultados*). *Leishmania* produce ATP principalmente mediante la fosforilación oxidativa, pero cuando ésta se ve afectada, puede hacer uso de la vía glucolítica para suplir el aporte energético. Previamente, se ha descrito la capacidad que tiene *Leishmania* de alternar entre distintos sustratos y vías para producir ATP cuando alguna está afectada (Uzcategui *et al.* 2005). La línea R4 mostró una mayor síntesis de ATP por la vía glucolítica que las líneas control y revR4 (*Artículo V del apartado de resultados*), explicando el mayor nivel de ATP basal observado. Este mayor nivel de ATP permite a la línea R4 aportar mayor energía a diversos mecanismos para hacer frente a la acción de la tafenoquina, por ejemplo, tratar de contrarrestar la caída en el valor de pH_i producida por el fármaco (*Figura III*). Las causas para que tenga lugar una mayor actividad glucolítica pueden ser principalmente que haya una mayor cantidad de sustrato de la vía metabólica, o una mayor actividad catalítica en alguna de las enzimas de la vía. Descartamos una mayor disponibilidad de glucosa como fuente de carbono, por sobreexpresión de un transportador de glucosa o una mayor actividad del mismo, dado que la acumulación de glucosa en las tres líneas no presentó diferencias (*Artículo V del apartado de resultados*). A su vez, al tratar los parásitos con azida de sodio y 2-deoxi-D-glucosa, inhibiendo la fosforilación oxidativa y la glicólisis, la síntesis de ATP disminuye marcadamente casi al mismo nivel en las tres líneas, descartando la utilización por parte de la línea R4 de una fuente de carbono alternativa, como puede ser la oxidación- β de ácidos grasos o el catabolismo de ciertos aminoácidos, para la producción de ATP (Saunders *et al.* 2010). Respecto a la posibilidad de que exista una modificación en la expresión o actividad de las enzimas de la vía, ya que observamos en la línea R4 una mayor producción de piruvato, producto final de la glucólisis, medimos la actividad de la piruvato quinasa, una de las enzimas más importantes, pero no observamos diferencias entre las líneas control y R4 (*Artículo V del apartado de resultados*). Queda por determinar aún, porqué se produce un aumento en la actividad glucolítica, al objeto de disponer de un posible marcador de resistencia hacia la tafenoquina en *Leishmania*.

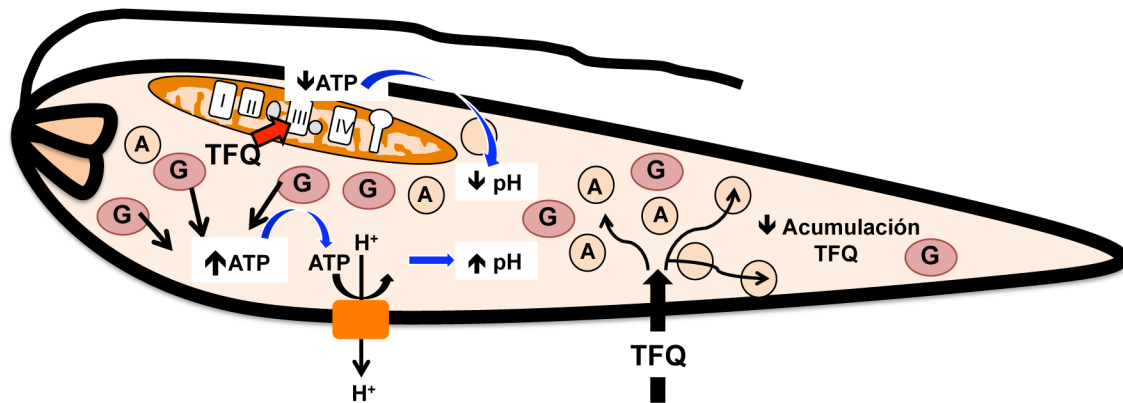


Figura III. Mecanismo de resistencia en la línea R4 de *Leishmania*. El aumento de ATP glucolítico permite aumentar el pHi, contrarrestando su bajada debido a la acción de la tafenocina. TFQ: tafenocina; G: glicosoma; A: acidocalcisomas.

La poca infectividad *in vivo* de la línea de *Leishmania* resistente a sitamaquina obtenida por el Dr. Philippe Loiseau, así como el bajo índice de resistencia y poca estabilidad de la línea resistente a tafenocina *in vitro*, hacen pensar que la aparición de resistencia clínica a estos fármacos, si finalmente son aprobados para su uso clínico, es poco probable.

Perspectivas

1. Estudiar el empleo de estas 8-aminoquinolinas frente a la leishmaniasis en combinación con otros fármacos leishmanicidas. Las 8-aminoquinolinas, al igual que las 4-aminoquinolinas tales como la cloroquina, tienen como limitación su hemotoxicidad, producen metahemoglobinemia y hemólisis, por lo que la reducción de la dosis y la frecuencia de administración, favorecería su tolerancia y baja toxicidad.
2. Emplear estos fármacos como cabezas de serie para desarrollar nuevos compuestos más potentes y selectivos frente a la leishmaniasis.
3. Estudiar los marcadores de resistencia hacia estos fármacos, por ejemplo, mediante una aproximación metabólica.



Conclusiones

CONCLUSIONES

1. La sitamaquina y la tafenoquina son 8-aminoquinolinas que entran en *Leishmania* mediante un proceso de difusión dependiente de un gradiente de protones.
2. La reducción del contenido de esteroides de la membrana plasmática inhibe la entrada de la tafenoquina en *Leishmania*.
3. Ambos fármacos se acumulan en las vesículas ácidas del parásito, principalmente en acidocalcisomas. Sin embargo, no existe correlación entre acumulación y sensibilidad, lo cual sugiere que su blanco de acción no reside en dichas vesículas.
4. La sitamaquina y la tafenoquina disminuyen el contenido de ATP del parásito. Ambos fármacos inhiben respectivamente los complejos II y III de la cadena respiratoria.
5. La sitamaquina y la tafenoquina inducen en el parásito la aparición de marcadores fenotípicos de muerte celular por apoptosis tales como, la exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática, disminución del potencial de membrana mitocondrial, producción de especies reactivas de oxígeno, incremento del contenido de calcio libre citosólico y fragmentación del ADN nuclear.
6. En nuestras condiciones experimentales, el principal mecanismo de resistencia a la tafenoquina en *Leishmania* viene determinado por un aumento en la síntesis de ATP procedente de la glucólisis.



Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

- Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Canavate, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Ter Horst, R., Lopez-Velez, R., and Moreno, J. (2008). The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 21, 334-359, table of contents.
- Alvar, J., Canavate, C., Molina, R., Moreno, J., and Nieto, J. (2004). Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol* 57, 1-88.
- Alzate, J. F., Arias, A., Mollinedo, F., Rico, E., de la Iglesia-Vicente, J., and Jimenez-Ruiz, A. (2008). Edelfosine induces an apoptotic process in *Leishmania infantum* that is regulated by the ectopic expression of Bcl-XL and Hrk. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 3779-378
- Arana, F. E., Perez-Victoria, J. M., Repetto, Y., Morello, A., Castanys, S., and Gamarro, F. (1998). Involvement of thiol metabolism in resistance to glucantime in *Leishmania tropica*. *Biochem Pharmacol* 56, 1201-1208.
- Awasthi, A., Mathur, R. K., and Saha, B. (2004). Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res* 119, 238-258.
- Baneth, G., Koutinas, A. F., Solano-Gallego, L., Bourdeau, P., and Ferrer, L. (2008). Canine leishmaniosis - new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. *Trends Parasitol* 24, 324-330.
- Banuls, A. L., Hide, M., and Prugnolle, F. (2007). *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol* 64, 1-109.
- Basselin, M., Denise, H., Coombs, G. H., and Barrett, M. P. (2002). Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 3731-3738.
- Bates, M. D., Meshnick, S. R., Sigler, C. I., Leland, P., and Hollingdale, M. R. (1990). *In vitro* effects of primaquine and primaquine metabolites on exoerythrocytic stages of *Plasmodium berghei*. *Am J Trop Med Hyg* 42, 532-537.
- Berman, J. J. (2008). Treatment of leishmaniasis with miltefosine: 2008 status. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 4, 1209-1216.
- Bermudez, R., Dagger, F., D'Aquino, J. A., Benaim, G., and Dawidowicz, K. (1997). Characterization of mitochondrial electron-transfer in *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 90, 43-54.
- Besteiro, S., Tonn, D., Tetley, L., Coombs, G. H., and Mottram, J. C. (2008). The AP3 adaptor is involved in the transport of membrane proteins to acidocalcisomes of *Leishmania*. *J Cell Sci* 121, 561-570.
- Besteiro, S., Williams, R. A. M., Coombs, G. H., and Mottram, J. C. (2007). Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol* 37, 1063-1075.
- Beveridge, E., Caldwell, I. C., Latter, V. S., Neal, R. A., Udall, V., and Waldron, M. M. (1980). The activity against *Trypanosoma cruzi* and cutaneous leishmaniasis, and toxicity, of moxipraquine (349C59). *Trans R Soc Trop Med Hyg* 74, 43-51.
- Bhardwaj, S., Srivastava, N., Sudan, R., and Saha, B. (2010). *Leishmania*

- interferes with host cell signaling to devise a survival strategy. *J Biomed Biotechnol* 2010, 109189.
- Bogdan, C. (2008). Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. *Cell Microbiol* 10, 1221-1234.
- Bories, C., Cojean, S., Huteau, F., and Loiseau, P. M. (2008). Selection and phenotype characterisation of sitamaquine-resistant promastigotes of *Leishmania donovani*. *Biomed Pharmacother* 62, 164-167.
- Breuzard, G., Piot, O., Angiboust, J. F., Manfait, M., Candeil, L., Del Rio, M., and Millot, J. M. (2005). Changes in adsorption and permeability of mitoxantrone on plasma membrane of BCRP/MXR resistant cells. *Biochem Biophys Res Commun* 329, 64-70.
- Brocks, D. R., and Mehvar, R. (2003). Stereoselectivity in the pharmacodynamics and pharmacokinetics of the chiral antimalarial drugs. *Clin Pharmacokinet* 42, 1359-1382.
- Brueckner, R. P., Lasseter, K. C., Lin, E. T., and Schuster, B. G. (1998). First-time-in-humans safety and pharmacokinetics of WR 238605, a new antimalarial. *Am J Trop Med Hyg* 58, 645-649.
- Brun, R., and Krassner, S. M. (1976). Quantitative ultrastructural investigations of mitochondrial development in *Leishmania donovani* during transformation. *J Protozool* 23, 493-497.
- Callahan, H. L., Portal, A. C., Devereaux, R., and Grogl, M. (1997). An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob Agents Chemother* 41, 818-822.
- Carter, K. C., Sundar, S., Spickett, C., Pereira, O. C., and Mullen, A. B. (2003). The *in vivo* susceptibility of *Leishmania donovani* to sodium stibogluconate is drug specific and can be reversed by inhibiting glutathione biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 1529-1535.
- Carter, N. S., Yates, P., Arendt, C. S., Boitz, J. M., and Ullman, B. (2008). Purine and pyrimidine metabolism in *Leishmania*. *Adv Exp Med Biol* 625, 141-154.
- Castanys-Muñoz, E., Perez-Victoria, J. M., Gamarro, F., and Castanys, S. (2008). Characterization of an ABCG-like transporter from the protozoan parasite *Leishmania* with a role in drug resistance and transbilayer lipid movement. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 3573-3579.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J., and Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* 5, 873-882.
- Charmoy, M., Auderset, F., Allenbach, C., and Tacchini-Cottier, F. (2010). The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *J Biomed Biotechnol* 2010, 719361.
- Chen, M., Zhai, L., Christensen, S. B., Theander, T. G., and Kharazmi, A. (2001). Inhibition of fumarate reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by chalcones. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2023-2029.
- Coelho, A. C., Messier, N., Ouellette, M., and Cotrim, P. C. (2007). Role of

- the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in *Leishmania* amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 3030-3032.
- Coimbra, E. S., Libong, D., Cojean, S., Saint-Pierre-Chazalet, M., Solgadi, A., Le Moyec, L., Duenas-Romero, A. M., Chaminade, P., and Loiseau, P. M. (2010). Mechanism of interaction of sitamaquine with *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother* 65, 2548-2555.
- Crockett, M., and Kain, K. C. (2007). Tafenoquine: a promising new antimalarial agent. *Expert Opin Investig Drugs* 16, 705-715.
- Croft, S. L. (2008). Kinetoplastida: new therapeutic strategies. *Parasite* 15, 522-527.
- Croft, S. L., Sundar, S., and Fairlamb, A. H. (2006). Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 19, 111-126.
- Cunningham, A. C. (2002). Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. *Exp Mol Pathol* 72, 132-141.
- Das, R., Roy, A., Dutta, N., and Majumder, H. K. (2008). Reactive oxygen species and imbalance of calcium homeostasis contributes to curcumin induced programmed cell death in *Leishmania donovani*. *Apoptosis* 13, 867-882.
- David, C. V., and Craft, N. (2009). Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther* 22, 491-502.
- de Oliveira, C. I., Nascimento, I. P., Barral, A., Soto, M., and Barral-Netto, M. (2009). Challenges and perspectives in vaccination against leishmaniasis. *Parasitol Int* 58, 319-324.
- de Souza, W., Attias, M., and Rodrigues, J. C. (2009). Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Int J Biochem Cell Biol* 41, 2069-2080.
- Debrabant, A., and Nakhasi, H. (2003). Programmed cell death in trypanosomatids: is it an altruistic mechanism for survival of the fittest? *Kinetoplastid Biol Dis* 2, 7.
- Denkers, E. Y., and Butcher, B. A. (2005). Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends Parasitol* 21, 35-41.
- Denny, P. W., Field, M. C., and Smith, D. F. (2001). GPI-anchored proteins and glycoconjugates segregate into lipid rafts in Kinetoplastida. *FEBS Lett* 491, 148-153.
- Denny, P. W., and Smith, D. F. (2004). Rafts and sphingolipid biosynthesis in the kinetoplastid parasitic protozoa. *Mol Microbiol* 53, 725-733.
- Denton, H., McGregor, J. C., and Coombs, G. H. (2004). Reduction of anti-leishmanial pentavalent antimonial drugs by a parasite-specific thiol-dependent reductase, TDR1. *Biochem J* 381, 405-412.
- Deponte, M. (2008). Programmed cell death in protists. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1396-1405.
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., and Moreno, S. N. (2005). Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol* 3, 251-261.
- Docampo, R., and Moreno, S. N. (2008). The acidocalcisome as a target for chemotherapeutic agents in protozoan parasites. *Curr Pharm Des* 14,

882-888.

- Duenas-Romero, A. M., Loiseau, P. M., and Saint-Pierre-Chazalet, M. (2007). Interaction of sitamaquine with membrane lipids of *Leishmania donovani* promastigotes. *Biochim Biophys Acta* 1768, 246-252.
- Fernandez, M. M., Malchiodi, E. L., and Algranati, I. D. (2011). Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells. *Antimicrob Agents Chemother* 55, 86-93.
- Ferreira Cdos, S., Martins, P. S., Demicheli, C., Brochu, C., Ouellette, M., and Frezard, F. (2003). Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinylglycine, cysteine and glutathione. *Biometals* 16, 441-446.
- Fry, M., and Pudney, M. (1992). Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochem Pharmacol* 43, 1545-1553.
- Garnier, T., Brown, M. B., Lawrence, M. J., and Croft, S. L. (2006). *In vitro* and *in vivo* studies on a topical formulation of sitamaquine dihydrochloride for cutaneous leishmaniasis. *J Pharm Pharmacol* 58, 1043-1054.
- Gogtay, N. J., Kamtekar, K. D., Dalvi, S. S., Mehta, S. S., Chogle, A. R., Aigal, U., and Kshirsagar, N. A. (2006). A randomized, parallel study of the safety and efficacy of 45 mg primaquine versus 75 mg bulaquine as gametocytocidal agents in adults with blood schizonticide-responsive uncomplicated *falciparum* malaria [ISCRTN50134587]. *BMC Infect Dis* 6, 16.
- Gourbal, B., Sonuc, N., Bhattacharjee, H., Legare, D., Sundar, S., Ouellette, M., Rosen, B. P., and Mukhopadhyay, R. (2004). Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem* 279, 31010-31017.
- Guerra, D. G., Decottignies, A., Bakker, B. M., and Michels, P. A. (2006). The mitochondrial FAD-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase of Trypanosomatidae and the glycosomal redox balance of insect stages of *Trypanosoma brucei* and *Leishmania* spp. *Mol Biochem Parasitol* 149, 155-169.
- Hannaert, V., Bringaud, F., Opperdoes, F. R., and Michels, P. A. (2003). Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol Dis* 2, 11.
- Hart, D. T., and Coombs, G. H. (1982). *Leishmania mexicana*: energy metabolism of amastigotes and promastigotes. *Exp Parasitol* 54, 397-409.
- Hernandez-Ruiz, J., and Becker, I. (2006). [CD8+ cytotoxic lymphocytes in cutaneous leishmaniasis]. *Salud Publica Mex* 48, 430-439.
- Herwaldt, B. L. (1999). Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191-1199.
- Ilgoutz, S. C., and McConville, M. J. (2001). Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int J Parasitol* 31, 899-908.
- Jain, M., Khan, S. I., Tekwani, B. L., Jacob, M. R., Singh, S., Singh, P. P., and Jain, R. (2005). Synthesis, antimalarial, antileishmanial, and antimicrobial activities of some 8-quinolinamine analogues. *Bioorg*

- Med Chem *13*, 4458-4466.
- Jha, T. K., Sundar, S., Thakur, C. P., Felton, J. M., Sabin, A. J., and Horton, J. (2005). A phase II dose-ranging study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in India. *Am J Trop Med Hyg* *73*, 1005-1011.
- Jhingran, A., Chawla, B., Saxena, S., Barrett, M. P., and Madhubala, R. (2009). Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* *164*, 111-117.
- Joshi, A. B., Das, M. L., Akhter, S., Chowdhury, R., Mondal, D., Kumar, V., Das, P., Kroeger, A., Boelaert, M., and Petzold, M. (2009). Chemical and environmental vector control as a contribution to the elimination of visceral leishmaniasis on the Indian subcontinent: cluster randomized controlled trials in Bangladesh, India and Nepal. *BMC Med* *7*, 54.
- Killick-Kendrick, R. (1999). The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol* *17*, 279-289.
- Kinnamon, K. E., Steck, E. A., Loizeaux, P. S., Hanson, W. L., Chapman, W. L., Jr., and Waits, V. B. (1978). The antileishmanial activity of lepidines. *Am J Trop Med Hyg* *27*, 751-757.
- Kitchener, S., Nasveld, P., and Edstein, M. D. (2007). Tafenoquine for the treatment of recurrent *Plasmodium vivax* malaria. *Am J Trop Med Hyg* *76*, 494-496.
- Krauth-Siegel, R. L., and Comini, M. A. (2008). Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta* *1780*, 1236-1248.
- Langreth, S. G., Berman, J. D., Riordan, G. P., and Lee, L. S. (1983). Fine-structural alterations in *Leishmania tropica* within human macrophages exposed to antileishmanial drugs *in vitro*. *J Protozool* *30*, 555-561.
- Laskay, T., van Zandbergen, G., and Solbach, W. (2008). Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology* *213*, 183-191.
- LeBowitz, J. H., Smith, H. Q., Rusche, L., and Beverley, S. M. (1993). Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. *Genes Dev* *7*, 996-1007.
- Lorente, S. O., Jimenez, C. J., Gros, L., Yardley, V., de Luca-Fradley, K., Croft, S. L., J, A. U., Ruiz-Perez, L. M., Pacanowska, D. G., and Gilbert, I. H. (2005). Preparation of transition-state analogues of sterol 24-methyl transferase as potential anti-parasitics. *Bioorg Med Chem* *13*, 5435-5453.
- Luque-Ortega, J. R., Martinez, S., Saugar, J. M., Izquierdo, L. R., Abad, T., Luis, J. G., Pinero, J., Valladares, B., and Rivas, L. (2004). Fungus-elicited metabolites from plants as an enriched source for new leishmanicidal agents: antifungal phenyl-phenalenone phytoalexins from the banana plant (*Musa acuminata*) target mitochondria of *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* *48*, 1534-1540.
- Luque-Ortega, J. R., Reuther, P., Rivas, L., and Dardonville, C. (2010). New benzophenone-derived bisphosphonium salts as leishmanicidal leads

- targeting mitochondria through inhibition of respiratory complex II. *J Med Chem* *53*, 1788-1798.
- Luque-Ortega, J. R., and Rivas, L. (2007). Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* *51*, 1327-1332.
- Luque-Ortega, J. R., Saugar, J. M., Chiva, C., Andreu, D., and Rivas, L. (2003). Identification of new leishmanicidal peptide lead structures by automated real-time monitoring of changes in intracellular ATP. *Biochem J* *375*, 221-230.
- Luque-Ortega, J. R., van't Hof, W., Veerman, E. C., Saugar, J. M., and Rivas, L. (2008). Human antimicrobial peptide histatin 5 is a cell-penetrating peptide targeting mitochondrial ATP synthesis in *Leishmania*. *FASEB J* *22*, 1817-1828.
- Maarouf, M., Adeline, M. T., Solignac, M., Vautrin, D., and Robert-Gero, M. (1998). Development and characterization of paromomycin-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *Parasite* *5*, 167-173.
- Martin, E., and Mukkada, A. J. (1979). Respiratory chain components of *Leishmania tropica* promastigotes. *J Protozool* *26*, 138-142.
- Martinez-Calvillo, S., Vizuet-de-Rueda, J. C., Florencio-Martinez, L. E., Manning-Cela, R. G., and Figueroa-Angulo, E. E. (2010). Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol* *2010*, 525241.
- Mbongo, N., Loiseau, P. M., Billion, M. A., and Robert-Gero, M. (1998). Mechanism of amphotericin B resistance in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* *42*, 352-357.
- McConville, M. J., De Souza, D. P., Saunders, E. C., Pyke, J., Naderer, T., Ellis, M. A., Sernee, F. M., Ralton, J. E., and Likić V.A. (2008). Analysis of the *Leishmania* metabolome. En: *Leishmania After the Genome*, eds. Myler, P. J., and Fasel, N., pag. 75-106. Editorial Caister Academic Press.
- McConville, M. J., Mullin, K. A., Ilgoutz, S. C., and Teasdale, R. D. (2002). Secretory pathways of trypanosomatid parasites. *Microbiol. Mol. Biol Rev.* *66*, 122-154.
- Mehta, A., and Shaha, C. (2004). Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J Biol Chem* *279*, 11798-11813.
- Michels, P. A., Bringaud, F., Herman, M., and Hannaert, V. (2006). Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim Biophys Acta* *1763*, 1463-1477.
- Mookerjee Basu, J., Mookerjee, A., Banerjee, R., Saha, M., Singh, S., Naskar, K., Tripathy, G., Sinha, P. K., Pandey, K., Sundar, S., *et al.* (2008). Inhibition of ABC transporters abolishes antimony resistance in *Leishmania* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* *52*, 1080-1093.
- Moreno, S. N., and Docampo, R. (2003). Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr Opin Microbiol* *6*, 359-364.
- Moreno, S. N., and Docampo, R. (2009). The role of acidocalcisomes in

- parasitic protists. *J Eukaryot Microbiol* 56, 208-213.
- Mukherjee, A., Padmanabhan, P. K., Sahani, M. H., Barrett, M. P., and Madhubala, R. (2006). Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 145, 1-10.
- Mukherjee, S. B., Das, M., Sudhandiran, G., and Shaha, C. (2002). Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Biol Chem* 277, 24717-24727.
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., and Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366, 1561-1577.
- Muskus, C. E., and Marin Villa, M. (2002). Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. *Biomedica* 22, 167-177.
- Myler, P. J. (2008). Genome structure and content. En: *Leishmania After the Genome*, eds. Myler, P. J., and Fasel, N., pag. 15-28. Editorial Caister Academic Press.
- Naderer, T., Ellis, M. A., Sernee, M. F., De Souza, D. P., Curtis, J., Handman, E., and McConville, M. J. (2006). Virulence of *Leishmania major* in macrophages and mice requires the gluconeogenic enzyme fructose-1,6-bisphosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5502-5507.
- Naderer, T., and McConville, M. J. (2008). The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiol* 10, 301-308.
- Naderer, T., Vince, J. E., and McConville, M. J. (2004). Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Curr Mol Med* 4, 649-665.
- Nanayakkara, N. P., Ager, A. L., Jr., Bartlett, M. S., Yardley, V., Croft, S. L., Khan, I. A., McChesney, J. D., and Walker, L. A. (2008). Antiparasitic activities and toxicities of individual enantiomers of the 8-aminoquinoline 8-[(4-amino-1-methylbutyl)amino]-6-methoxy-4-methyl-5-[3,4-dichlorophenoxy]quinoline succinate. *Antimicrob Agents Chemother* 52, 2130-2137.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* 6, 173-182.
- Opperdoes, F. R. (1987). Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annu Rev Microbiol* 41, 127-151.
- Opperdoes, F. R., and Coombs, G. H. (2007). Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. *Trends Parasitol* 23, 149-158.
- Opperdoes, F. R., and Michels, P. A. (2008). Complex I of Trypanosomatidae: does it exist? *Trends Parasitol* 24, 310-317.
- Ouellette, M., Drummel-Smith, J., and Papadopoulou, B. (2004). Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* 7, 257-266.
- Papadopoulou, B., Müller, M., Rochette, A., McNicoll, F., Dumas, C., and Chow, C. (2008). Regulation of gene expression in *Leishmania* throughout a complex digenetic life cycle. En: *Leishmania After the Genome*, eds. Myler, P. J., and Fasel, N., pag. 29-54. Editorial Caister

Academic Press.

- Pardo Andreu, G. L., Inada, N. M., Pellon, R. F., Docampo, M. L., Fascio, M. L., D'Accorso, N. B., and Vercesi, A. E. (2009). *In vitro* effect of a new cinnamic acid derivative against the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Arzneimittelforschung* 59, 207-211.
- Parsons, M. (2004). Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. *Mol Microbiol* 53, 717-724.
- Peacock, C. S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J. C., Quail, M. A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., *et al.* (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 39, 839-847.
- Perez-Victoria, F. J., Castanys, S., and Gamarro, F. (2003). *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 2397-2403.
- Perez-Victoria, F. J., Sánchez-Cañete M. P., Castanys, S., and Gamarro, F. (2006). Phospholipid translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. *J Biol Chem* 281, 23766-23775.
- Perez-Victoria, J. M., Perez-Victoria, F. J., Parodi-Talice, A., Jimenez, I. A., Ravelo, A. G., Castanys, S., and Gamarro, F. (2001). Alkyllysophospholipid resistance in multidrug-resistant *Leishmania tropica* and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2468-2474.
- Perry, K., and Agabian, N. (1991). mRNA processing in the Trypanosomatidae. *Experientia* 47, 118-128.
- Peters, N., and Sacks, D. (2006). Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. *Immunol Rev* 213, 159-179.
- Peters, W. (1999). The evolution of tafenoquine-antimalarial for a new millennium? *J R Soc Med* 92, 345-352.
- Polonio, T., and Efferth, T. (2008). Leishmaniasis: drug resistance and natural products (review). *Int J Mol Med* 22, 277-286.
- Qi, H., Ji, J., Wanasen, N., and Soong, L. (2004). Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 72, 988-995.
- Richard, J. V., and Werbovetz, K. A. (2010). New antileishmanial candidates and lead compounds. *Curr Opin Chem Biol* 14, 447-455.
- Roberts, C. W., McLeod, R., Rice, D. W., Ginger, M., Chance, M. L., and Goad, L. J. (2003). Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Mol Biochem Parasitol* 126, 129-142.
- Rosenkranz, V., and Wink, M. (2008). Alkaloids induce programmed cell death in bloodstream forms of trypanosomes (*Trypanosoma b. brucei*). *Molecules* 13, 2462-2473.
- Saint-Pierre-Chazalet, M., Ben Brahim, M., Le Moyec, L., Bories, C., Rakotomanga, M., and Loiseau, P. M. (2009). Membrane sterol

- depletion impairs miltefosine action in wild-type and miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *J Antimicrob Chemother* *64*, 993-1001.
- Sanchez-Canete, M. P., Carvalho, L., Perez-Victoria, F. J., Gamarro, F., and Castanys, S. (2009). Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. *Antimicrob Agents Chemother* *53*, 1305-1313.
- Santhamma, K. R., and Bhaduri, A. (1995). Characterization of the respiratory chain of *Leishmania donovani* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* *75*, 43-53.
- Santos, D. O., Coutinho, C. E., Madeira, M. F., Bottino, C. G., Vieira, R. T., Nascimento, S. B., Bernardino, A., Bourguignon, S. C., Corte-Real, S., Pinho, R. T., *et al.* (2008). Leishmaniasis treatment--a challenge that remains: a review. *Parasitol Res* *103*, 1-10.
- Saunders, E. C., DP, D. E. S., Naderer, T., Sernee, M. F., Ralton, J. E., Doyle, M. A., Macrae, J. I., Chambers, J. L., Heng, J., Nahid, A., *et al.* (2010). Central carbon metabolism of *Leishmania* parasites. *Parasitology* *137*, 1303-1313.
- Seifert, K., and Croft, S. L. (2006). *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrob Agents Chemother* *50*, 73-79.
- Seifert, K., Matu, S., Javier Perez-Victoria, F., Castanys, S., Gamarro, F., and Croft, S. L. (2003). Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int J Antimicrob Agents* *22*, 380-387.
- Sen, N., Das, B. B., Ganguly, A., Mukherjee, T., Tripathi, G., Bandyopadhyay, S., Rakshit, S., Sen, T., and Majumder, H. K. (2004). Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Cell Death Differ* *11*, 924-936.
- Shaha, C. (2006). Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *Indian J Med Res* *123*, 233-244.
- Shaw, J. J. (1994). Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz* *89*, 471-478.
- Singh, G., Chavan, H. D., and Dey, C. S. (2008). Proteomic analysis of miltefosine-resistant *Leishmania* reveals the possible involvement of eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A). *Int J Antimicrob Agents* *31*, 584-586.
- Singh, R., Kumar, D., Duncan, R. C., Nakhasi, H. L., and Salotra, P. (2010). Overexpression of histone H2A modulates drug susceptibility in *Leishmania* parasites. *Int J Antimicrob Agents* *36*, 50-57.
- Singh, S., and Sivakumar, R. (2004). Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother* *10*, 307-315.
- Smirlis, D., Duszenko, M., Ruiz, A. J., Scoulica, E., Bastien, P., Fasel, N., and Soteriadou, K. (2010). Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. *Parasit Vectors* *3*, 107.
- Solano-Gallego, L., Koutinas, A., Miro, G., Cardoso, L., Pennisi, M. G.,

- Ferrer, L., Bourdeau, P., Oliva, G., and Baneth, G. (2009). Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol* *165*, 1-18.
- Sudhandiran, G., and Shaha, C. (2003). 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* *278*, 25120-25132.
- Sundar, S., and Chatterjee, M. (2006). Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J Med Res* *123*, 345-352.
- Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P., Sinha, P. K., and Bhattacharya, S. K. (2007). Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. *N Engl J Med* *356*, 2571-2581.
- Sundar, S., Makharia, A., More, D. K., Agrawal, G., Voss, A., Fischer, C., Bachmann, P., and Murray, H. W. (2000). Short-course of oral miltefosine for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* *31*, 1110-1113.
- Sundar, S., and Rai, M. (2002). Advances in the treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis* *15*, 593-598.
- Sundar, S., Sinha, P. K., Rai, M., Verma, D. K., Nawin, K., Alam, S., Chakravarty, J., Vaillant, M., Verma, N., Pandey, K., *et al.* (2011). Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet* *377*, 477-486.
- Teixeira, M. J., Teixeira, C. R., Andrade, B. B., Barral-Netto, M., and Barral, A. (2006). Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol* *22*, 32-40.
- Tekwani, B. L., and Walker, L. A. (2006). 8-Aminoquinolines: future role as antiprotozoal drugs. *Curr Opin Infect Dis* *19*, 623-631.
- Thomas, S., Green, A., Sturm, N. R., Campbell, D. A., and Myler, P. J. (2009). Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. *BMC Genomics* *10*, 152.
- Tielens, A. G., and van Hellemond, J. J. (2009). Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. *Trends Parasitol* *25*, 482-490.
- Uzcategui, N. L., Figarella, K., Camacho, N., and Ponte-Sucre, A. (2005). Substrate preferences and glucose uptake in glibenclamide-resistant *Leishmania* parasites. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* *140*, 395-402.
- Vale, N., Moreira, R., and Gomes, P. (2009). Primaquine revisited six decades after its discovery. *Eur J Med Chem* *44*, 937-953.
- van Griensven, J., Balasegaram, M., Meheus, F., Alvar, J., Lynen, L., and Boelaert, M. (2010). Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* *10*, 184-194.
- Van Hellemond, J. J., and Tielens, A. G. (1997). Inhibition of the respiratory chain results in a reversible metabolic arrest in *Leishmania* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* *85*, 135-138.
- van Zandbergen, G., Bollinger, A., Wenzel, A., Kamhawi, S., Voll, R., Klinger, M., Muller, A., Holscher, C., Herrmann, M., Sacks, D., *et al.* (2006). *Leishmania* disease development depends on the presence of

- apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13837-13842.
- van Zandbergen, G., Klinger, M., Mueller, A., Dannenberg, S., Gebert, A., Solbach, W., and Laskay, T. (2004). Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 173, 6521-6525.
- Vennerstrom, J. L., Nuzum, E. O., Miller, R. E., Dorn, A., Gerena, L., Dande, P. A., Ellis, W. Y., Ridley, R. G., and Milhous, W. K. (1999). 8-Aminoquinolines active against blood stage *Plasmodium falciparum* *in vitro* inhibit hemozoin polymerization. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 598-602.
- Vercesi, A. E., and Docampo, R. (1992). Ca²⁺ transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca²⁺, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential *in situ*. *Biochem J* 284 (Pt 2), 463-467.
- Vercesi, A. E., Rodrigues, C. O., Catisti, R., and Docampo, R. (2000). Presence of a Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger in acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalization by anti-leishmanial drugs. *FEBS Lett* 473, 203-206.
- Vergnes, B., Gourbal, B., Girard, I., Sundar, S., Drummelsmith, J., and Ouellette, M. (2007). A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics* 6, 88-101.
- Wanderley, J. L., and Barcinski, M. A. (2010). Apoptosis and apoptotic mimicry: the *Leishmania* connection. *Cell Mol Life Sci* 67, 1653-1659.
- Wasunna, M. K., Rashid, J. R., Mbui, J., Kirigi, G., Kinoti, D., Lodenyo, H., Felton, J. M., Sabin, A. J., Albert, M. J., and Horton, J. (2005). A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *Am J Trop Med Hyg* 73, 871-876.
- Wu, F., Jin, W., Feng, J., Chen, A., Ma, Z., and Zhang, X. (2010). Propamidine decreases mitochondrial complex III activity of *Botrytis cinerea*. *BMB Rep* 43, 614-621.
- Wyllie, S., Cunningham, M. L., and Fairlamb, A. H. (2004). Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 279, 39925-39932.
- Wyllie, S., Mandal, G., Singh, N., Sundar, S., Fairlamb, A. H., and Chatterjee, M. (2010). Elevated levels of trypanothione peroxidase in antimony unresponsive *Leishmania donovani* field isolates. *Mol Biochem Parasitol* 173, 162-164.
- Yardley, V., Gamarro, F., and Croft, S. L. (2010). Antileishmanial and antitrypanosomal activities of the 8-aminoquinoline tafenoquine. *Antimicrob Agents Chemother* 54, 5356-5358.
- Yeates, C. (2002). Sitamaquine (GlaxoSmithKline/Walter Reed Army Institute). *Curr Opin Investig Drugs* 3, 1446-1452.
- Zalila, H., Gonzalez, I. J., El-Fadili, A. K., Delgado, M. B., Desponds, C., Schaff, C., and Fasel, N. (2011). Processing of metacaspase into a cytoplasmic catalytic domain mediating cell death in *Leishmania*

- major*. Mol Microbiol 79, 222-239.
- Zhou, Y., Messier, N., Ouellette, M., Rosen, B. P., and Mukhopadhyay, R. (2004). *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. J Biol Chem 279, 37445-37451.