

INTERACCIONES PATÓGENO-HOSPEDERO EN LA SUSCEPTIBILIDAD
AL ANTIMONIATO DE MEGLUMINA EN *Leishmania (V) panamensis*.

MARÍA CLAUDIA BARRERA FLAQUER

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI
2016

INTERACCIONES PATÓGENO-HOSPEDERO EN LA SUSCEPTIBILIDAD
AL ANTIMONIATO DE MEGLUMINA EN *Leishmania (V) panamensis*.

MARÍA CLAUDIA BARRERA FLAQUER

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de Maestría
en Ciencias Biomédicas

Directora: MARÍA ADELAIDA GÓMEZ PhD.

UNIVERSIDAD DEL VALLE
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE CIENCIAS BÁSICAS
PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
SANTIAGO DE CALI

2016

AGRADECIMIENTOS

*"You have brains in your head.
You have feet in your shoes.
You can steer yourself
Any direction you choose.
You're on your own. And you know what you know.
And YOU are the guy who'll decide where to go."
Dr. Seuss*

Quiero empezar por dar gracias a la Dra. Nancy Saravia, directora científica de CIDEIM, por su apoyo durante todos estos años, por enseñarme "The power of nice" y regalarme... mi libro máspreciado. Un libro que habla de la vida misma, del día a día; es una lástima que lo entendí cuando proféticamente me pasaron cada una de sus páginas. Lo mejor que puedo hacer es darle un buen final a ésta historia, y trabajar en... ¡Doctora "I will to succeed, I will indeed! (98 and $\frac{3}{4}$ percent quaranteed)" Thank you!

También agradezco a mi tutora María Adelaida Gómez por todas sus palabras, por enseñarme como debo ser, íntegra por convicción y no por observación, por mostrarme el camino a ser una buena investigadora principal y por darme la oportunidad de hacer lo que más me gusta, INVESTIGAR, le agradezco por confiar en mí en su momento y ofrecerme la oportunidad de avanzar en mi carrera. Gracias.

A mis compañeros de CIDEIM, los que están y los que ya no (Isa, Aleja, Laura, Mariana, Julieth, Mildred, Pili, Maryori, Alejo, Carlos, Cristian, Elsitá, Raffa, CIDEBAND etc... mil y mil gracias por su compañía, por ser cómplices de todo, por reír hasta llorar y llorar por vivir reídos☺. Gracias.

Quiero agradecer a Olguita, Adriana, Carolina, Lady, Doña B y Jennifer por su apoyo técnico y moral, por enseñarme y sacar un poco de su tiempo para hacer que esto fuera posible. Gracias.

A mis profesores de la Universidad del Valle gracias por su tiempo, diligencia, paciencia y ejemplo. Gracias.

Y en último lugar en ésta tesis pero de primeros en mi vida, infinitas gracias doy a la vida por tener el honor de compartir y contar con el apoyo de mi Madre, gracias por un esfuerzo de vida en enseñarme a ser mejor, gracias a Mi amor por su apoyo incondicional siempre, gracias a mi Tia bella que desde la distancia siempre estuvo aquí y al resto de mi familia y amigos que me han apoyado día a día. Los amo infinitamente. GRACIAS!!!

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS	i
LISTA DE FIGURAS	ii
LISTA DE ANEXOS	iv
ABREVIATURAS.....	v
1. INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	1
2. OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo general.....	4
2.2 Objetivos específicos	4
3. MARCO TEÓRICO	6
3.1 Ciclo de vida.....	9
3.2 Manifestaciones clínicas	11
3.2.1 <i>Leishmaniasis cutánea (LC)</i>	11
3.2.2 <i>Leishmaniasis mucocutánea (LMC)</i>	12
3.2.3 <i>Leishmaniasis visceral (LV)</i>	12
3.3 Tratamiento contra la leishmaniasis cutánea.....	13
3.3.1 Antimonio pentavalente.....	15
3.3.2 Mecanismo de acción del antimonio pentavalente	15
3.4 Resistencia al Antimonio.....	16
3.4.1 Transportadores tipo ABC (ATP-binding Cassette)	18
3.4.2 Acuaporinas	20
3.5 Factores del hospedero que pueden contribuir a la pérdida de susceptibilidad de <i>Leishmania</i> a antimoniales	22
3.5.1 Transportadores tipo ABC (ATP-binding cassette).....	22
3.5.2 Metalotioneinas.....	24
3.5.3 Glutación.....	27
3.6 Fármacos experimentales en el tratamiento de la leishmaniasis	29

3.6.1	Cúrcuma	29
3.6.2	Elacridar	30
3.6.3	Apigenin	31
4.	ANTECEDENTES	32
5.	ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	37
5.1	Diseño del estudio	37
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	40
6.1	Población del estudio	40
6.2	Consideraciones Éticas	41
6.3	Cultivo celular y diferenciación de macrófagos de la línea celular THP-1 ..	42
6.4	Aislamiento de monocitos de sangre periférica y diferenciación en cultivo	42
6.5	Cepas clínicas y líneas control de laboratorio sensible y resistente de <i>Leishmania (V) panamensis</i>	44
6.6	Determinación de susceptibilidad al antimonio de meglumina	44
6.7	Infección <i>in vitro</i> de macrófagos primarios y de la línea celular THP1 y exposición a AM.	45
6.8	Ensayos de combinación de fármacos	46
6.9	Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)	47
6.10	Cuantificación de carga parasitaria	47
6.11	Cuantificación intracelular de antimonio	50
6.12	Detección de ROS intracelular por citometría de flujo	50
6.13	Manejo de datos y análisis estadístico	51
7.	RESULTADOS OBJETIVO No. 1	53
7.1	La susceptibilidad de <i>L. (V) panamensis</i> al antimonio de meglumina contribuye a la modulación diferencial de determinantes farmacológicos en macrófagos humanos.	53
7.1.1	La expresión de MT2A en macrófagos de la línea celular THP-1 es inhibida durante la infección con cepas de <i>Leishmania (V) panamensis</i> resistentes al antimonio de meglumina.	53

7.1.2 La infección de macrófagos humanos con cepas de <i>L. (V) panamensis</i> sensibles o resistentes no confiere acumulación diferencial del AM a nivel intracelular.	59
7.1.3 Expresión génica de moléculas involucradas en el metabolismo del glutatión en macrófagos primarios de pacientes con leishmaniasis cutánea activa.	60
7.1.4 La expresión génica de quemoquinas y citoquinas en macrófagos humanos primarios es modulada diferencialmente por el fenotipo de susceptibilidad de <i>L. (V) panamensis</i> al AM.	63
8. RESULTADOS OBJETIVO No. 2	67
8.1 Inhibidores de determinantes farmacológicos en combinación con el antimonio de meglumina reducen la supervivencia intracelular de <i>L. (V) panamensis</i>.	67
8.1.1 La combinación de AM y elacridar o apigenin no potencia la muerte intracelular de <i>L. (V) panamensis</i>	67
8.1.2 El pre tratamiento durante 24 horas con curcumin seguido de AM reduce en más del 50% la supervivencia intracelular de <i>L. (V) panamensis</i> resistente al AM.	71
8.1.3 La disminución en la supervivencia intracelular de cepas de <i>L.(V) panamensis</i> resistente, tras el pre tratamiento con curcumin puede estar mediada por muerte celular secundaria a la generación de ROS intracelular. ..	75
9. DISCUSIÓN	80
10. CONCLUSIONES	93
11. BIBLIOGRAFÍA	94
12. ANEXOS	111

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Muestras pareadas de macrófagos y cepas de <i>L (V) panamensis</i> aisladas de los pacientes con leishmaniasis cutánea activa.	43
Tabla 2. Cepas clínicas utilizadas en el tamizaje de expresión génica en macrófagos THP-1.....	45
Tabla 3. Genes evaluados en los experimentos de expresión génica.....	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia de leishmaniasis cutánea por 100.000 habitantes, Américas 2013.....	8
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Leishmania spp.</i>	10
Figura 3. Espectro de manifestaciones clínicas de la infección con <i>Leishmania spp.</i>	13
Figura 4. Mecanismos clásicos de resistencia en <i>Leishmania spp.</i>	21
Figura 5. Estructura de la metalotioneina. Residuos de cisteína en los dominios α y β de unión a metales.....	25
Figura 6 . Estrategia experimental objetivo 1.	38
Figura 7. Estrategia experimental objetivo 2.....	39
Figura 8. . El fenotipo de susceptibilidad de <i>L. (V) panamensis</i> contribuye a la expresión diferencial de moléculas involucradas en el transporte y metabolismo del antimonio de meglumina en macrófagos.	55
Figura 9. Modulación de la expresión de genes involucrados en transporte y acumulación de AM en macrófagos primarios.	58
Figura 10. Concentración intracelular total de antimonio en macrófagos THP-1 infectados con cepas de <i>L. (V) panamensis</i> sensibles y resistentes al AM.....	60
Figura 11. La infección con cepas sensibles y resistentes al AM no modula diferencialmente la expresión génica de enzimas de la vida del glutatión.	62
Figura 12. La infección <i>in vitro</i> con <i>L. (V) panamensis</i> a macrófagos primarios de pacientes con leishmaniasis cutánea activa, induce la sobre expresión de citoquinas y quemoquinas determinantes durante la respuesta inmune a patógenos	65
Figura 13. Evaluación de citotoxicidad de curcumin, elacridar y apigenin en macrófagos THP-1.....	69
Figura 14. Supervivencia intracelular de <i>L. (V) panamensis</i> bajo el efecto de la combinación de AM e inhibidores de transportadores tipo ABC: elacridar y apigenin.	70
Figura 15. Supervivencia intracelular de <i>L. (V) panamensis</i> bajo el efecto de la combinación entre AM y curcumin como inhibidor de determinantes farmacológicos.	73
Figura 16. Concentración intracelular de antimonio en macrófagos THP-1 tratados con curcumin 10 μ M.	74
Figura 17. El efecto antileishmanial observado en la combinación de AM y curcumin no es resultado de la inducción de la enzima <i>iNOS</i>	76
Figura 18. Curcumin por sí solo y en combinación con el antimonio de meglumina induce la producción de ROS en macrófagos humanos THP-1.....	78
Figura 19. Efecto de la modulación de macrófagos humanos por cepas de <i>L (V) panamensis</i> resistentes y sensibles al antimonio.	86

Figura 20. Efecto de curcumin como antileishmanial en el macrófago infectado con <i>L. (V) panamensis</i>	92
--	----

LISTA DE ANEXOS

ANEXO 1. Expresión génica de transportadores de membrana y enzimas del metabolismo del tripanotión en promastigotes y amastigotes intracelulares de líneas control de laboratorio y cepas clínicas de <i>L (V) panamensis</i>	111
ANEXO 2. Participación en el 13er Congreso Internacional del Colegio Nacional de Bacteriología CNB-Colombia. Santiago de Cali Septiembre 2013. Modalidad Poster #66.....	113
ANEXO 3. Participación en el II Congreso Colombiano de Biología Computacional y Bioinformática. Manizales, Septiembre 2013. Modalidad Presentación oral.	116
ANEXO 4. Participación en el 1er Congreso de Bioquímica y Biología Molecular C2B2 Universidad Nacional Bogotá Colombia, Junio 2014. Modalidad Poster # 52S1.	119
ANEXO 5. Participación en el manuscrito:	122
ANEXO 6. Asistencia al “ZIBI Summer School 2015 on Host-Pathogen interplay” en el Instituto Max Planck en Berlín Alemania Junio-Julio 2015. Beca completa: DAAD fellowship to ZIBI Summer School of Host-Pathogen Interplay.	123
ANEXO 7. Aprobación del Comité Institucional de Ética de Investigaciones en Humanos (CIEIH)-CIDEIM.....	124

ABREVIATURAS

SIVIGILA: Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública

LC: Leishmaniasis cutánea

LMC: Leishmaniasis mucocutánea

LV: Leishmaniasis visceral

LCD: Leishmaniasis cutánea difusa

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida

RNA: Ácido ribonucleico

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

ATP: Adenosín trifosfato

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

qRT-PCR: PCR cuantitativa en tiempo real

ICP-MS: Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente

PBS: Solución salina fosfato

AM: Antimoniato de meglumina

Sb^V: Antimonio pentavalente

Sb^{III}: Antimonio trivalente

PMA: Phorbol myristate acetate

MHOM: Acrónimo usado para nombrar los aislados clínicos provenientes de humanos

PBMCs: Células mononucleares de sangre periférica

THP-1: Línea celular de monocitos humanos

TBP: “TATA box binding protein” Proteína de unión a la casa TATA

7SLRNA: Componente integral de la partícula de reconocimiento de la señal de la señal, un complejo de ribonucleoproteína de seis polipéptidos y un RNA que media la translocación de proteína en el retículo endoplásmico

GAPDH: Gen Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

γGCS: γGlutamilcistein Sintetasa

BSO: Buthionine Sulfoximine

DFMO: Difluorometil Ornitina

ODC: Ornitina Decarboxilasa

TSH: Tripanotión

TDR1: Reductasa dependiente de grupos tiol

GSH: Glutatión

IFN-γ: Interferón gamma

TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa

IL-1: Interleuquina 1

IL-1α: Interleuquina 1 alfa

IL-1β: Interleuquina 1 beta

ABC: ATP-binding Cassette

TMD: Dominios transmembranales

NBD: Dominios de unión a nucleótido

PF: Paquete flagelar

MDR: Multidrogo resistencia

ABCB6: ATP-binding Cassette familia B subfamilia 6

ABCB1: ATP-binding Cassette familia B subfamilia 1

ABCC1: ATP-binding Cassette familia C subfamilia 1

MRP1: Proteína de multi resistencia 1

Pgp: Glicoproteína-P

AQPs: Acuaporinas

AQP-1: Acuaporina 1

AQP-9: Acuaporina 9

MT2A: Metalotioneina 2A

GRS: Glutación reductasa

GST: Glutación transferasas

GSTM3: Glutación transferasa citosólica 3

MGST2: Glutación transferasa microsomal 2

1. INTRODUCCIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La leishmaniasis cutánea es una enfermedad que afecta a miles de personas en Colombia, según el Sistema Nacional de Vigilancia en Salud Pública (SIVIGILA) entre el 2010 y el 2015 se reportaron 59.020 nuevos casos en el país. El control de esta enfermedad depende de la detección de casos y de una quimioterapia basada en sales de antimonio pentavalente, que por más de 70 años han sido los fármacos de primera línea recomendados por la Organización Mundial de la Salud para el control de la enfermedad (1) .

Desde hace unos años los niveles de resistencia a estos fármacos antileishmaniales van en ascenso (2,3) y esta resistencia es un factor que contribuye con la falla terapéutica. Los mecanismos de resistencia descritos se basan en características inherentes al parásito como expresión de bombas de eflujo de drogas e inadecuada activación del fármaco (4). Sin embargo, la resistencia es un evento multifactorial y durante la infección intracelular, la célula hospedera puede contribuir en la actividad diferencial de los fármacos antileishmaniales (5).

En un estudio de nuestro grupo que exploró el papel de los macrófagos, principal célula hospedera de *Leishmania spp* , en la actividad de antileishmaniales, se encontró que los niveles de expresión génica del transportador de membrana *ABCB6* en macrófagos humanos presentaba una correlación inversa con la supervivencia intracelular de *Leishmania (V) panamensis* (5). *ABCB6* presente tanto en la membrana plasmática como en el fagolisosoma, participa en el transporte activo y acumulación del antimonio siendo determinante para la sobrevivencia del parásito intracelular (5–7). Este estudio describió la importancia de la célula hospedera en procesos de transporte, metabolismo y acumulación del antimonio y su impacto en la supervivencia intracelular del parásito.

Por otra parte, se ha demostrado que el fenotipo de susceptibilidad del parásito a los fármacos antileishmaniales puede contribuir en la modulación diferencial de la célula hospedera, alterando así la exposición del parásito intracelular a los medicamentos; en un modelo de leishmaniasis visceral, se encontró que la infección con cepas de *Leishmania donovani* resistentes a antimoniales, indujo la expresión génica de transportadores de membrana en el macrófago como *MRP1* y *P-gp*, involucrados en procesos de eflujo del fármaco, disminuyendo la acumulación intracelular de la droga y permitiendo una mayor supervivencia intracelular del parásito (8).

Sin duda alguna la célula hospedera es un componente muy importante durante la infección con *Leishmania spp*; la capacidad del parásito de modificar el ambiente celular que habita, puede promover la pérdida de susceptibilidad, la cual había sido concebida como una característica única del parásito.

Por otro lado con unas estrategias de control vectorial insostenibles y en ausencia de una vacuna, dependemos de la quimioterapia disponible para el control de la enfermedad. Sin embargo esta estrategia ha sido desafiada por la resistencia y la falla terapéutica. Por esta razón los esfuerzos en la actualidad van encaminados a la optimización y mejora de los tratamientos disponibles.

Entre estas estrategias se encuentran las combinaciones de fármacos de primera y segunda línea junto con el uso de inmunomoduladores, antibióticos, anti fúngicos y hasta el uso de análogos de nucleósidos (9). Sin embargo, la mayoría de estas estrategias van dirigidas a causar un daño directo al patógeno y no se ha obtenido el éxito esperado; incluso se ha reportado resistencia *in vitro* a combinaciones de anfotericina con antimoniales, miltefosine y paramomicina, (10). Estos datos sugieren que

alternativas terapéuticas dirigidas al hospedero podrían representar novedosas estrategias para promover la eliminación del patógeno, disminuyendo el riesgo de emergencia de la resistencia.

Este proyecto se enfoca en el entendimiento de la interacción entre *Leishmania* y su célula hospedera canónica, el macrófago, en la susceptibilidad al antimonio de meglumina, fármaco de primera línea en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea en Colombia. Este conocimiento permitirá guiar el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas al hospedero. Exploramos el uso de fármacos inhibidores de bombas de eflujo presentes en la célula hospedera, a fin de promover la eliminación del parásito intracelular y la reversión de la resistencia.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la interacción entre *Leishmania (V) panamensis* y macrófagos humanos en la susceptibilidad y resistencia al antimonio de meglumina y la reversión de la resistencia mediante co-terapias dirigidas al hospedero.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Determinar el efecto de la susceptibilidad de *Leishmania (V) panamensis* al antimonio de meglumina, en la modulación de la expresión génica de transportadores tipo ABC y enzimas involucradas en el metabolismo del fármaco en macrófagos humanos.

Indicadores:

- Niveles de expresión génica de transportadores y enzimas de macrófagos humanos tras la infección con cepas resistentes o susceptibles al antimonio de meglumina, cuantificados.
- Concentración intracelular de antimonio en macrófagos humanos tras la infección con cepas resistentes o susceptibles al antimonio de meglumina, cuantificada.

2.2.2 Determinar si inhibidores farmacológicos de transportadores tipo *ABC* en macrófagos humanos en combinación con antimonio de meglumina reducen la supervivencia intracelular de *Leishmania (V) panamensis*.

Indicadores:

- Supervivencia intracelular de *Leishmania (V) panamensis* durante la exposición de macrófagos humanos a inhibidores de bombas de eflujo y antimonio de meglumina, evaluada.
- Concentración intracelular de antimonio en macrófagos pre tratados con inhibidores de bombas de eflujo, cuantificadas.

3. MARCO TEÓRICO

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria causada por protozoarios intracelulares del género *Leishmania spp*. Esta enfermedad es transmitida por la picadura de insectos vectores de los géneros *Lutzomia spp* en las Américas y *Phlebotomus spp* en el viejo mundo. Existen alrededor de 20 especies de *Leishmania spp* patogénicas para el humano y 30 especies diferentes de vectores para su transmisión (11,12). Esta enfermedad se caracteriza por manifestaciones clínicas muy diversas, desde lesiones en piel conocida como leishmaniasis cutánea (LC), lesiones en mucosas bucofaríngea y nasofaríngea conocida como leishmaniasis mucocutánea (LMC) y daño en órganos intra-abdominales o leishmaniasis visceral (LV), también conocida como *Kala-azar*.

Se estima que se presentan de 1 a 1.5 millones de casos nuevos de leishmaniasis cutánea cada año y existen aproximadamente 350 millones de personas en el mundo en riesgo de padecer alguna de las formas clínicas de la enfermedad (11,13).

La leishmaniasis cutánea tiene una amplia distribución geográfica, afecta a personas en más de 80 países en el mundo de los cuales más del 60% son países en vías de desarrollo. La LC es endémica en el nuevo mundo, desde México y Centro América hasta la zona norte de Sur América (Fig.1). Las poblaciones más afectadas en nuestro país son los habitantes de zonas rurales, militares y grupos armados insurgentes (14).

En Colombia durante los años 2005 y 2009 se reportó un promedio anual de 17.420 casos de LC, resultando en una incidencia total acumulada entre 48.800 y 80.100 casos totales, siendo el segundo país con mayor reporte después de Brasil (15); para el año 2013 se observó una reducción en el

número de casos en un 19.2% gracias a la organización de los servicios de salud, la correcta implementación de los sistemas de vigilancia y estrategias de control ambiental (16). Según el Sistema de Vigilancia Epidemiológica Nacional SIVIGILA para el año 2015 se reportaron 8113 de LC en Colombia (17), siendo aún una de las enfermedades que más afectan a la población rural y de bajos recursos. Los departamentos con mayor reporte de casos son Antioquia, Meta, Nariño, Tolima, Santander, Choco, Bolívar y Guaviare (17). Sin embargo, la falta de notificación de casos a las instituciones reguladoras de salud nacional, la dificultad en el acceso a servicios de salud y errores en el diagnóstico de la enfermedad, no han permitido conocer la prevalencia e incidencia real de la LC en nuestro país.

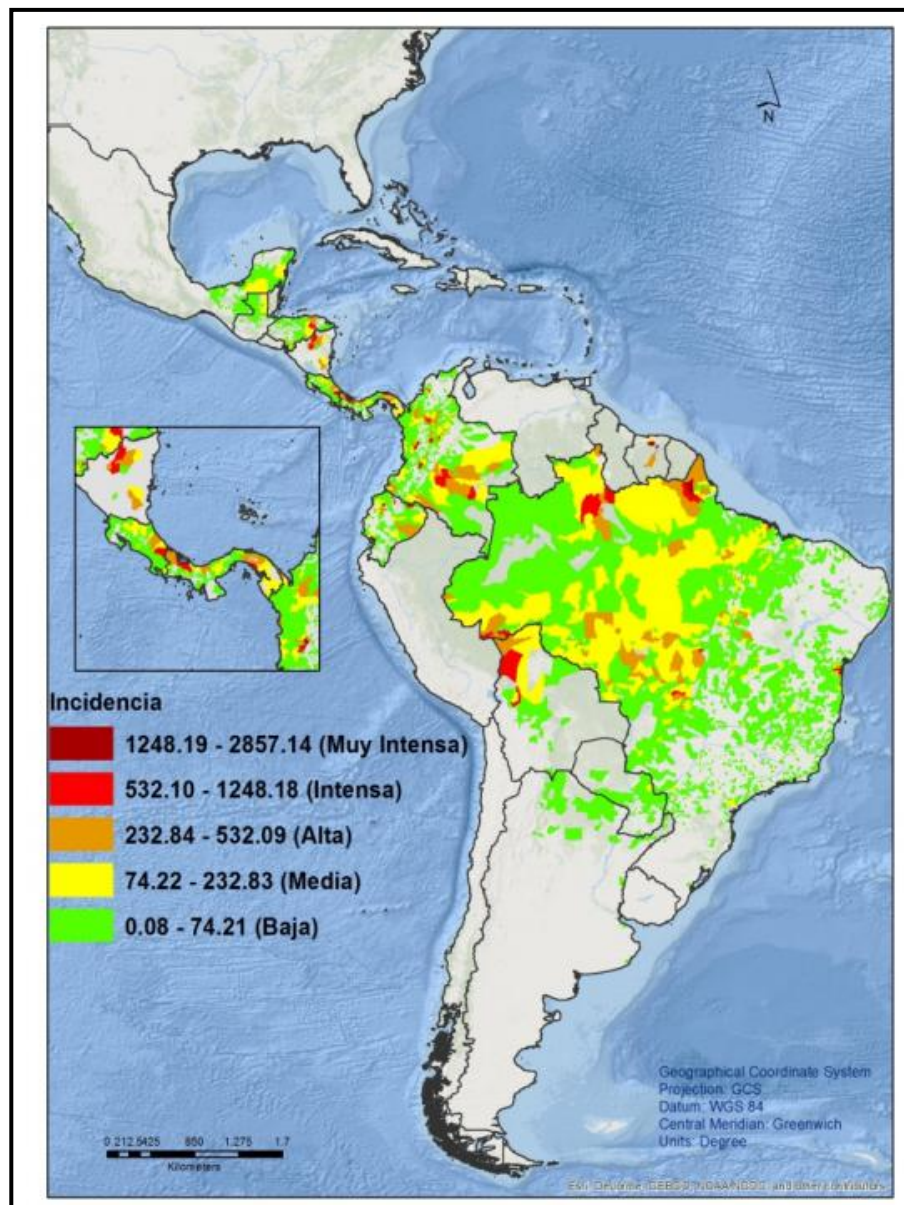


Figura 1. Incidencia de leishmaniasis cutánea por 100.000 habitantes, Américas 2013. Fuente:

Tomado del Informe epidemiológico de las Américas, Organización mundial de la salud OMS, Informe Leishmaniasis N° 3 Julio de (2015).

3.1 Ciclo de vida

Leishmania spp presenta un ciclo digenético con dos estadios básicos: la forma de promastigote que se desarrolla en el intestino del vector, el cual cuenta con un flagelo y mide entre 10 y 20 μm y la forma de amastigote aflagelar intracelular en hospederos vertebrados con una medida de 2.5 a 5 μm de diámetro (12). El ciclo de vida comienza cuando vectores hembra libres de infección se alimentan con la sangre de un individuo parasitado y durante ésta ingesta son adquiridas las células que contienen los amastigotes (Fig.2 (1)) Estos amastigotes en el intestino del vector se transforman en promastigotes procíclicos (Fig.2 (2)) los que luego conforman la población de promastigotes metacíclicos que migran a la probóscide del vector y son transferidos durante la picadura a un hospedero mamífero vertebrado (Fig.2 (3)).

Los promastigotes metacíclicos libres en el hospedero humano pueden ser eliminados por el sistema inmune innato, sin embargo algunos se pueden unir a receptores de macrófagos para ser reconocidos y fagocitados (Fig.2 (4)) (18). Una vez en el macrófago, son engolfados dando lugar a la formación del fagosoma donde se establecerá la infección (Fig.2 (5)). Luego estos promastigotes pierden el flagelo y se transforman en amastigotes, se reproducirán activamente por fisión binaria hasta alcanzar una alta densidad parasitaria (Fig.2 (6)). Las células infectadas se rompen fácilmente y los amastigotes libres pueden infectar nuevas células como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, o ser ingeridos en una nueva picadura por un vector y de esta forma se da continuidad al ciclo (Fig.2 (7)) (12,19).

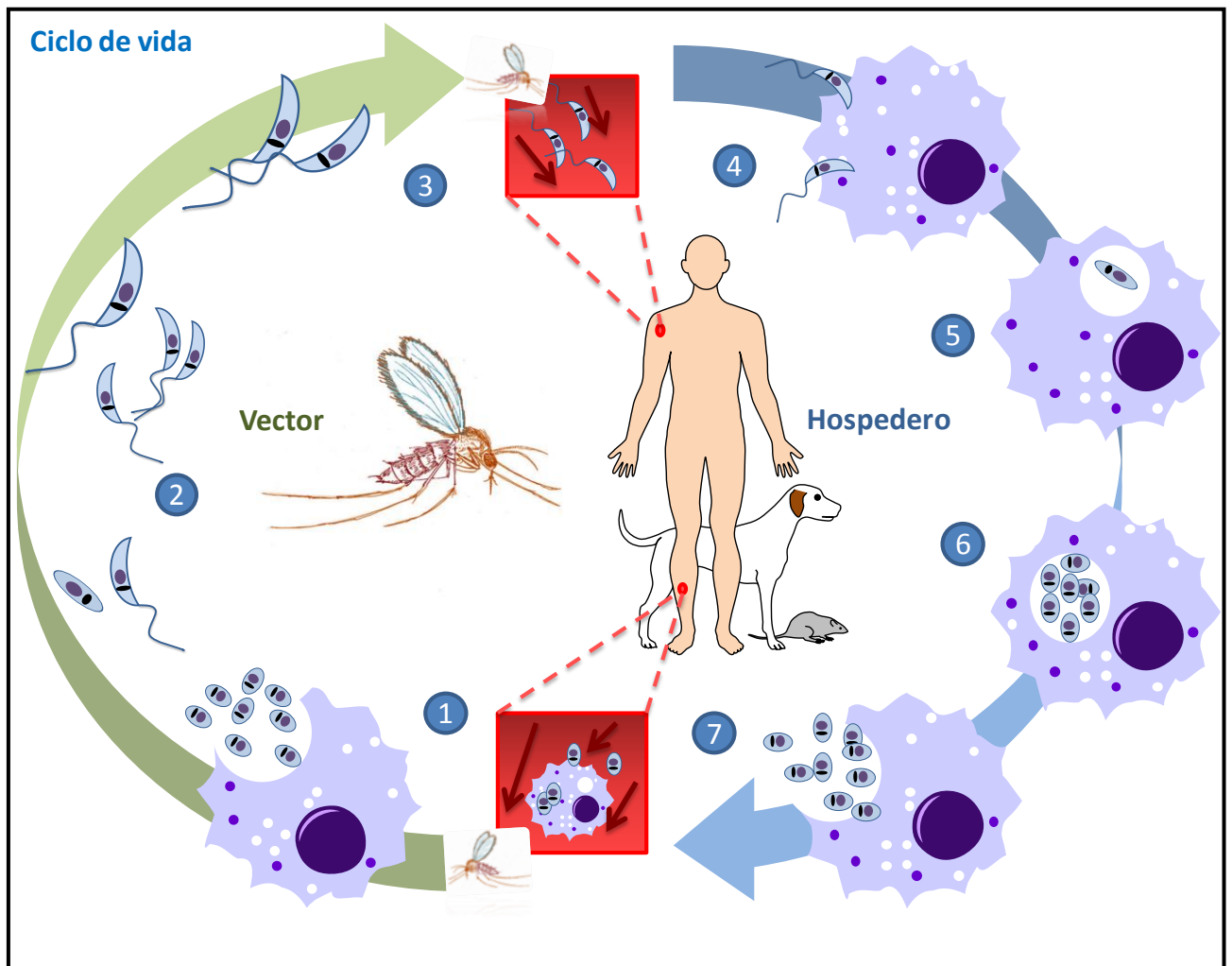


Figura 2.Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

3.2 Manifestaciones clínicas

La leishmaniasis presenta un amplio espectro clínico, desde formas asintomáticas sin signos ni síntomas y sintomáticas con lesiones con cura espontánea hasta lesiones en órganos internos que pueden causar la muerte. Las manifestaciones clínicas de la enfermedad son variables y dependen no solo del estado inmunológico del hospedero sino también de factores del parásito como la especie infectante y el tropismo preferencial que manifiestan en el hospedero como viscerotropismo, dermatropismo y mucotropismo (12).

3.2.1 Leishmaniasis cutánea (LC)

La LC es la infección con mayor distribución a nivel mundial cuyos principales agentes causantes en América Latina son especies del subgénero *Viannia* (*L. (V) panamensis*, *L. (V) braziliensis*, *L. (V) guyanensis*), y del complejo *L. mexicana*. En el continente asiático y África Sub-Sahariana las especies más prevalentes son miembros del subgénero *Leishmania* como *L. major* y *L. tropica*. En Colombia las especies que principalmente causan LC son *L. (V) panamensis* en un 54-80% de los casos reportados, seguido por *L. (V) braziliensis* en un 10-30% y *L. (V) guyanensis* en un 1-3% (20).

La presentación clínica de la LC puede variar desde pequeñas pápulas con cura espontánea, hasta desarrollar lesiones ulcerativas con aspecto redondeado, depresión central limpia, granular y con bordes elevados eritematosos bien definidos, lo que se conoce como la lesión típica de LC (Fig.3A). Cuando las lesiones adquieren cronicidad de meses a años se observan cicatrices atróficas o pueden persistir como placas o nódulos (21,22). Algunos pacientes pueden desarrollar más de una lesión y en

algunos casos presentar linfadenopatias en cadena, similar a las observadas en otras patologías como la esporotricosis (22). La leishmaniasis cutánea es relativamente benigna aunque se pueden presentar cuadros severos como la leishmaniasis cutánea difusa (LCD) causada principalmente por *L.amazonensis* y *L.aethiopica*.

3.2.2 Leishmaniasis mucocutánea (LMC)

La LMC puede ser causada principalmente por la especie *L (V) braziliensis* y en algunos casos por *L (V) panamensis*, *L (V) guyanensis* y *L (V) amazonensis*, siendo la forma menos común de leishmaniasis tegumentaria. Aproximadamente el 90% de los casos se presentan en Brasil, Bolivia y Perú (23). Esta forma de la enfermedad suele ser clínicamente evidente con el paso de los años, puede deberse a la persistencia del parásito tras una LC inicial o a lesiones que han recibido un inadecuado tratamiento (24). Inicialmente se observan lesiones de piel de nariz y de la mucosa oral, los síntomas nasales van desde dificultad respiratoria hasta sangrado (Fig.3B). Si no se recibe tratamiento a tiempo, las lesiones pueden progresar a destrucción ulcerativa de la mucosa orofaríngea, como la perforación del septo nasal (24).

3.2.3 Leishmaniasis visceral (LV)

La leishmaniasis visceral también llamada *Kala azar*, es endémica en India y en África Oriental, usualmente es producida por las especies *L. donovani* y *L. infantum* y es fatal en ausencia de tratamiento (21,25). Se caracteriza por episodios irregulares de fiebre, pérdida de peso, hepatoesplenomegalia y anemia (23) (Fig.3C-D). Esta enfermedad puede tener un desenlace agudo,

sub agudo o crónico; luego de meses y hasta años de periodo de incubación, la infección asintomática puede manifestarse clínicamente por compromiso en el sistema inmune del hospedero, entre otros por enfermedades como el VIH/SIDA (24).



Figura 3. Espectro de manifestaciones clínicas de la infección con *Leishmania spp.*

A) Leishmaniasis cutánea, **B)** Leishmaniasis mucocutánea, **C-D)** Leishmaniasis visceral. **Fuente:** (A-B) Archivo fotográfico CIDEIM, (C-D) Leishmaniasis visceral. CDC 2015 URL: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/disease.html>.

3.3 Tratamiento contra la leishmaniasis cutánea

Desde 1940 el tratamiento de primera línea frente a la LC en el mundo han sido los compuestos de antimonio pentavalente, el antimoniato de meglumina (Glucantime®) y el estibogluconato de sodio (Pentostam®) (22). Estos tratamientos convencionales se han visto desafiados por fallas al tratamiento, resistencia emergente (26) y la generación de fuertes efectos secundarios por su alta toxicidad (27) . Algunos de los efectos adversos observados son: mialgias, artralgias, dolor de cabeza, anorexia y fiebre. También se pueden

presentar cuadros de pancreatitis aguda y cambios electrocardiográficos que pueden causar la muerte (27–29).

Existen otros fármacos sistémicos de segunda línea frente a la enfermedad como la Hexadecylphosphocholine (Miltefosine) aprobado en para su uso vía oral desde el 2002 para la LV y en Colombia desde el 2005 para la LC, indicado en los casos que no sea posible suministrar la terapia antimonial recomendada (30,31). También como medicamentos de segunda línea frente a la leishmaniasis cutánea en Colombia, se tiene la Pentamidina y Anfotericina B que presentan restricciones para su uso por su alto costo y toxicidad (32).

Existen tratamientos locales frente a la LC como la termoterapia y crioterapia, indicada en lesiones pequeñas y en algunos casos en combinación con los fármacos de primera línea (33,34). Estas terapias pueden ser convenientes en los establecimientos de atención primaria de salud y en donde el acceso a la terapia convencional sea restringido. Los pacientes tratados con calor no tienen efectos adversos considerables, pero algunos pueden desarrollar celulitis locales y quemaduras superficiales cerca de la zona intervenida. A pesar de tener estas opciones en el tratamiento no reemplazan la terapia recomendada para la enfermedad, ya que sus niveles de efectividad no han sido rigurosamente comparados para diferentes tipos de lesión ni especies en ensayos clínicos controlados (29,35) .

A continuación se describen los mecanismos de acción y características farmacológicas de las sales de antimonio, el tratamiento de primera línea para la LC en Colombia.

3.3.1 Antimonio pentavalente

Las características químicas de los dos compuestos con antimonio disponibles para el tratamiento de la LC son muy similares (Glucantime® y Pentostam®), sin embargo la toxicidad y eficacia depende de la concentración de Sb^{V} en el compuesto. El antimoniato de meglumina (Glucantime®) contiene 81 mg/ml de Sb^{V} , su presentación farmacológica es en ampollas por 5 ml y su administración se puede ejecutar por vía intramuscular, intravenosa y por infusión. Los antimoniales se distribuyen en altas concentraciones en plasma, hígado y bazo; su vida media es de 8 horas en adultos y 5 horas en niños, siendo un fármaco de absorción rápida. La excreción se lleva a cabo por vía renal en un 80% a las 6 horas de suministrado y en un 100% a las 24-76 horas (28).

La administración de la dosis recomendada para LC es 20 mg/kg/por día con un total máximo de 20 días de tratamiento. En algunos casos se puede extender hasta por 28 días, solo si hay sospecha de falla al tratamiento o una manifestación más severa de la enfermedad como LMC o LCD (28,29,36).

La respuesta al tratamiento depende de varios factores, como la especie del parásito, la ubicación geográfica, el perfil inmunológico del individuo afectado y la relación del parásito con sus vectores, reservorios y hospederos (28) .

3.3.2 Mecanismo de acción del antimonio pentavalente

El Sb^{V} es una prodroga que necesita ser activada a su forma trivalente (Sb^{III}) para poder ejercer su actividad antileishmanial (37). El sitio principal de activación, en el macrófago o en el parásito, se desconoce. Sin embargo puede ocurrir en ambos a través de procesos de óxido-reducción ejecutados por residuos de cisteína , glicil-cisteínas y el glutatión en el mamífero

hospedero y del tripanotión (TSH) en *Leishmania spp* (38,39). En el parásito la reducción de Sb^V a Sb^{III} ocurre en ambos estadios del ciclo de vida, siendo mayor en la fase de amastigote (38). La reacción de activación no enzimática del fármaco involucra una reducción de grupos tiol presentes en el TSH, homólogo del glutatión en *Leishmania spp*.

Para que se forme el TSH se requieren dos enzimas importantes, la γ Glutamylcystein Sintetasa (γ GCS) codificada por el gen *gsh1* y la Ornitina Decarboxilasa codificada por el gen *odc* (40) . El TSH es un conjugado de dos moléculas de glutatión junto a espermidina y participa en procesos de óxido reducción, protege a las células de las especies reactivas de oxígeno, metales pesados y algunos xenobióticos (39,41,42). Existe también otro tipo de activación del fármaco, una vía enzimática liderada por una reductasa dependiente de grupos tiol (TDR1), que cataliza la conversión de Sb^V a Sb^{III} usando el glutatión como agente reductor (41).

El antimonio en su forma reducida a Sb^{III} , actúa inhibiendo la biosíntesis macromolecular en amastigotes, perturbando el metabolismo energético tras la inhibición de la glicólisis y la β oxidación de los ácidos grasos (9,43–45). También se ha descrito que el antimonio puede inducir muerte celular por apoptosis, por fragmentación del DNA y alteración en la homeostasis del calcio, con señales de externalización de fosfolípidos como la fosfatidilserina (46,47). Otro mecanismo de acción del antimonio es la inhibición de la tripanotión reductasa, enzima esencial de la vía del TSH (42).

3.4 Resistencia al Antimonio

Los primeros casos de resistencia a los antimoniales se presentaron en la región de Bihar en India, en donde se identificaron más del 50% en fallas al tratamiento en leishmaniasis visceral (9,48–50). En Colombia también se han

reportado casos de resistencia al antimonio de meglumina, presentándose los mayores niveles de tolerancia a los antimoniales en zonas de alta transmisión de la enfermedad (51) . Los niveles de susceptibilidad también pueden variar entre especies y aun dentro de cepas de la misma especie (3,51). La resistencia en general es un evento que involucra múltiples factores, no solo características intrínsecas del parásito (2,48) sino también el efecto de los procesos metabólicos y el estado inmunológico del hospedero (9,50).

La resistencia en el parásito puede ser intrínseca o adquirida por exposición a dosis inadecuadas del medicamento (3). Los principales mecanismos involucrados en el desarrollo de un fenotipo de resistencia a los fármacos antimoniales, van dirigidos a (i) modificaciones en la activación de la droga de su forma activa a una inactiva; (ii) aumento de eflujo y/o disminución en la internalización del fármaco; (iii) desarrollo de vías alternativas a las inhibidas por el medicamento; (iv) competencia por sustratos en las enzimas reductoras; (v) disminución de los productos requeridos para las inhibiciones; (vi) adaptación fisiológica del parásito; (vii) mutaciones espontáneas y polimorfismos asociados a resistencia; y (viii) cambios en la expresión génica, entre otros (52).

Los parásitos al encontrarse en un ambiente intracelular que constantemente intentará eliminarlo, ya sea por la respuesta inmune del hospedero o por la presión ejercida por el tratamiento, pueden desarrollar estrategias para combatir el efecto microbicida de los fármacos. Algunos de los mecanismos de resistencia a antimoniales desarrollados por *Leishmania spp* han sido el eflujo del antimonio, secuestro del fármaco a través de transportadores de membrana tipo ABC y una reducida internalización del fármaco mediado por acuaporinas (53,54).

3.4.1 Transportadores tipo ABC (ATP-binding Cassette)

Miembros de las familias de transportadores ABC (ATP-Binding Cassette) los cuales usan la unión de ATP como energía para transportar los diferentes sustratos a través de las membranas, existen en muchos organismos tanto eucariotas como procariotas (55). La estructura de estos transportadores está conformada por dos dominios hidrofóbicos transmembranales (TMD) encargados del transporte del sustrato y dos dominios citoplasmáticos, responsables de la unión de nucleótidos para su respectiva hidrólisis (NBD) concluyendo en una conformación (TMD+NBD)². Existen algunos transportadores denominados “half transporters” o medios transportadores, haciendo referencia a su conformación no dimérica habitual, sino monomérica, con un solo dominio TMD y un solo dominio NBD. En los dominios NBD se encuentra una secuencia de aminoácidos conservados (LSGGQ) que le confiere la característica firma molecular de transportador ABC (56,57). Con 42 miembros de la familia ABC, *Leishmania spp* es el protozooario con mayor cantidad de transportadores de éste tipo (58–60).

Estos 42 transportadores están divididos en 8 familias, 7 se comparten como ortólogos con la clasificación en el humano y van desde la familia ABCA hasta la ABCH. (60,61). Los transportadores de la familia ABCA están involucrados en el transporte, regulación y rescate de lípidos como el colesterol, esfingolípidos y fosfolípidos, importantes en los cambios estructurales en el ciclo de vida del parásito. Los genes más estudiados de esta familia son el *abca2* y *abca3*, localizados en el paquete flagelar (PF) del parásito y en vesículas internas (62,63). La sobre expresión del gen *abca2* incrementa la actividad vesicular y exocítica en parásitos de *L. tropica*, aunque su relación con resistencia a antileishmaniales no ha sido establecida, mientras que el *abca3* si tiene reporte de asociación a este fenotipo por su participación en el eflujo del antimonio (61,64,65).

La familia *ABCC/MRP* es la segunda familia con más transportadores descritos en *Leishmania spp*, 8 en total. El primer gen descrito fue el *abcc3/mrpa/pgpa* del cual se ha propuesto que confiere resistencia por secuestrar un conjugado de antimonio con grupos tiol en vesículas intracelulares (60,61). Durante la reducción del Sb^{V} a Sb^{III} , se forma un conjugado de TSH + Sb^{III} , el cual es capturado por *ABCC3/MRPA*, evitando así que el fármaco pueda realizar su función leishmanicida. Este secuestro se lleva a cabo en membranas intracelulares cerca del paquete flagelar, considerada la zona de mayor transporte por endocitosis y exocitosis.

La sobre expresión de las enzimas γ Glutamylcystein Sintetasa y Ornitina Descarboxilasa pueden fortalecer el fenotipo de resistencia en el parásito, mediante la generación de altos niveles de TSH, dando la posibilidad de conformación de muchos conjugados de tiol y antimonio, que podrán ser secuestradas por el transportador *ABCC3/MRPA*. Se han descrito inhibidores de la enzima γ Glutamylcystein Sintetasa, el Buthionine Sulfoximine (BSO) y la Difluorometil Ornitina (DFMO) que reducen los niveles de TSH en los parásitos con fenotipo de resistencia (40,59,66). Luego del secuestro del metal por el *ABCC3/MRPA* se presenta un fenómeno de eflujo del conjugado hacia el exterior de la célula, este mecanismo se presume es realizado por otro transportador de la familia *ABCC/MRP* (59).

La familia *ABCG* tiene la particularidad de ser “half transporters”. Están localizados en la membrana plasmática y cerca al paquete flagelar, están involucrados en el transporte de fosfolípidos, fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y análogos de la fosfatidilcolina. Como los parásitos tienen una alta demanda lipídica durante su ciclo de vida, es común la sobre expresión de genes de las familias *ABCA* y *ABCG* (60,67,68) .

3.4.2 Acuaporinas

Las acuagliceroporinas o AQP_s son canales integrados a la membrana para el transporte de glicerol, urea y agua, sin emplear el uso de hidrólisis de ATP para su transporte; se han descrito 5 miembros de esta familia en *Leishmania spp*, que adicional al transporte de solutos, regulan el volumen de líquido en las células y la osmotaxis. También participan en la internalización de Sb^{III} y su expresión es mayor en amastigotes que en promastigotes (54). Bajos niveles en la expresión del gen *aqp1*, confieren resistencia a antimoniales por disminución en la internalización de la droga al interior del parásito. La sobre expresión del gen revierte el fenotipo de resistencia, permitiendo el ingreso de altas concentraciones de Sb^{III} dentro de la célula favoreciendo la muerte parasitaria eficientemente (54,69).

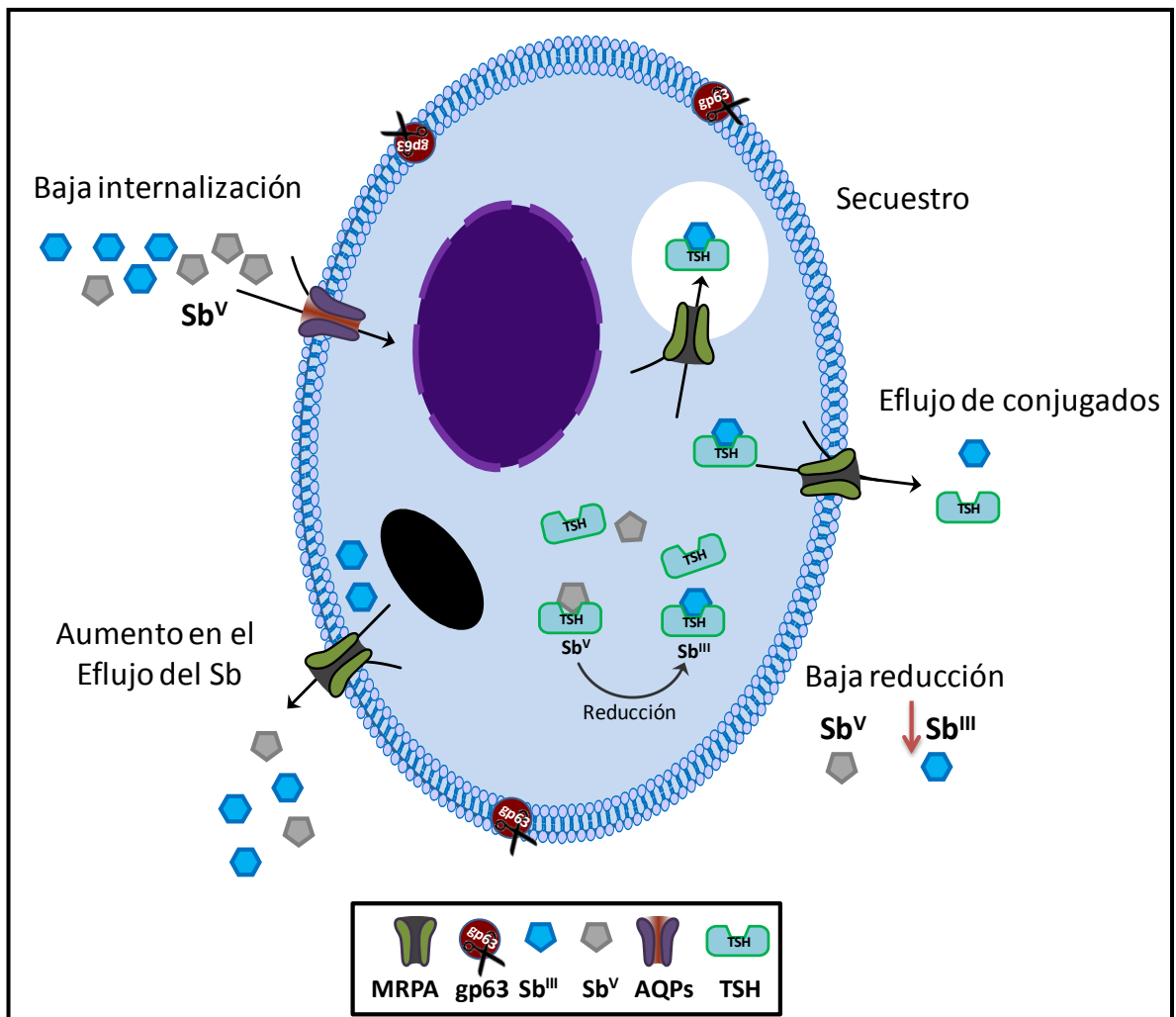


Figura 4. Mecanismos clásicos de resistencia en *Leishmania spp.*

3.5 Factores del hospedero que pueden contribuir a la pérdida de susceptibilidad de *Leishmania* a antimoniales

Aspectos como el estado inmunológico del hospedero y alteraciones en la farmacocinética del antimonio, como el metabolismo y la excreción, pueden afectar la eficacia de la droga (9). Al igual que el parásito algunas moléculas en el hospedero humano pueden estar involucradas en el transporte, acumulación y activación del antimonio, participando en la pérdida de susceptibilidad a los antileishmaniales (5); algunas de estas moléculas son los transportadores tipo ABC, las metalotioneinas y enzimas de la vía del metabolismo del glutatión.

3.5.1 Transportadores tipo ABC (ATP-binding cassette)

Los transportadores tipo ABC son determinantes en el mantenimiento de gradientes electro-químicos en las células utilizando la energía de la hidrólisis del ATP para transportar moléculas en una dirección no favorable termodinámicamente (55,70,71). La estructura de estos transportadores en el hospedero humano es igual a la descrita anteriormente para el parásito, contando con dos dominios TMD y dos NBD, y otros como los “half transporters” (72–74).

En el genoma humano se han encontrado 48 genes que codifican para transportadores de membrana tipo ABC. Hacen parte de 7 familias que van de ABCA hasta la ABCG y participan en el transporte de lípidos, xenobióticos, leucotrienos, azúcares y conjugados con el glutatión, entre otros. También se han asociado con resistencia a múltiples drogas, presentación antigénica, homeostasis del hierro y regulación de canales iónicos (75–77), entre otros. Mutaciones en estas proteínas se han asociado con alteraciones en la función, transporte y respuesta a fármacos; algunos de

los desórdenes clínicos asociados a alteraciones funcionales de transportadores tipo ABC son: la discromatosis hereditaria , fibrosis quística, hipercolesterolemia y resistencia al tratamiento contra el cáncer de mama y de colon , entre otros (75,78–80). Tres transportadores ABC en células humanas, *ABCB1*, *ABCC1* y *ABCB6* han sido involucrados en mecanismos de transporte y detoxificación de compuestos antileishmaniales. A continuación se describen estos tres transportadores.

ABCB1 también llamado *Pgp* es uno de los transportadores más estudiados por su rol en la defensa contra xenobióticos, eflujo de cationes orgánicos, carbohidratos, antibióticos, polisacáridos, proteínas y múltiples fármacos. El eflujo de drogas desde compartimentos intracelulares como vesículas, hasta el exterior celular, influencia procesos de absorción, distribución, y eliminación de las drogas. Esto lo ha catalogado como uno de los transportadores asociados a multidrogo resistencia o (MDR) (78,81). Se han reportado al menos 1630 polimorfismos en el gen de *abcb1/pgp*, algunos como el SNP *C3435T* inducen fármaco resistencia gracias al aumento en el eflujo de la droga (82).

El *ABCC1/MRP1* es un transportador también asociado a multidrogo resistencia por eflujo de xenobióticos, especialmente en el tratamiento contra el cáncer. Se expresa principalmente en el lado basolateral de las membranas epiteliales de pulmón, testículo, riñón, hígado, músculo y en células mononucleares. Tiene un gran número de sustratos, desde conjugados de glutatión con diferentes drogas, glucurónidos, y colorantes (82). Se han descrito 23 SNPs para este gen y algunos como el *G1299T* con un cambio Arg433Ser, alteran el transporte de sustancias endógenas y genera resistencia celular a anti cancerígenos como el doxorubicin (82,83) .

El transportador *ABCB6* es una proteína de 842 aminoácidos conformada por un solo dominio TMD y un domino NBD. Este “half transporter”, se ha

encontrado en el exterior de la membrana mitocondrial, en vesículas intracelulares y en la membrana plasmática (6,7,84–86). Este transportador tiene una participación importante en la síntesis del grupo Heme, traslocando el coproporfirinogeno III (CPIII) desde el citoplasma al interior de la mitocondria (84,87,88). Entre otras funciones, el *ABCB6* se ha asociado a proliferación y crecimiento celular y también se ha reportado su participación en el transporte de algunos metales como el arsénico y antimonio (5,84).

3.5.2 Metalotioneinas

Las metalotioneinas pertenecen a un grupo de proteínas intracelulares de bajo peso molecular, implicadas en la detoxificación y homeostasis de metales. Desde su descubrimiento en 1957 por Margoshes y Vallee en células de la corteza de riñón de caballo (89), han sido estudiadas e identificadas en diferentes organismos incluyendo procariotas, plantas, invertebrados y vertebrados.

Su estructura primaria es rica en cisteína y no posee aminoácidos aromáticos. El sitio de unión a metales consiste en 20 residuos de cisteína yuxtapuestos con lisinas y argininas (Cys-X-Cys, Cys-Cys-X-Cys-Cys, Cys-X-Cys-Cys) organizados en dos dominios ricos en grupos tiol llamados α y β (Fig.5). Estos dominios están separados por zonas libres de cisteínas llamados espaciadores. Los grupos tiol presentes en las cisteínas pueden unir metales como el zinc u otros con mayor afinidad como Sb, Pb, Cu, Cd, Hg y Ag (89,90).

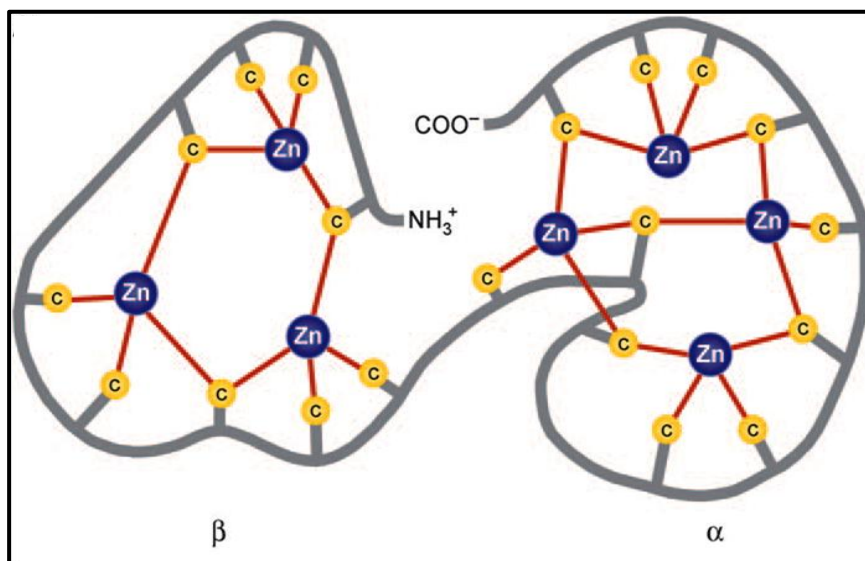


Figura 5. Estructura de la metalotioneína. Residuos de cisteína en los dominios α y β de unión a metales. Fuente: Stephen G. Bell et al. 2009 (91).

Esta proteína se localiza principalmente en citoplasma y organelas como las mitocondrias, regulando procesos de respiración celular, óxido reducción y permeabilidad de la membrana (92). También se han reportado en lisosomas y en el núcleo celular con el fin de proteger el DNA de las especies reactivas del oxígeno, evitar la apoptosis y controlar la transcripción de genes de moléculas detoxificantes, que pueden participar en el transporte y acumulación de xenobióticos en los diferentes estados del ciclo celular (93–95).

Cuatro isoformas principales se han identificado en mamíferos (*MT-1* a *MT-4*). Se han descrito 11 genes diferentes para *MT-1* (A,B,E,F,G,H,I,J,K,L y X) mientras que para las otras isoformas corresponde un solo gen (*MT-2 A* , *MT-3*, y *MT-4*). La función específica, el rol de estas isoformas y sus interacciones moleculares aún no se han esclarecido (89) . Sin embargo las

metalotioneinas se han asociado principalmente al control, transporte y secuestro de metales como el zinc (96), importante en procesos de proliferación celular, respuesta inmune (97), interacciones proteína-proteína, activación de factores de transcripción y función mitocondrial, también participa de la regulación del metabolismo energético, angiogénesis, ciclo celular y apoptosis (98–100).

También se ha descrito su papel en la resistencia a drogas con conformación a base de metales especialmente en enfermedades como el cáncer. La sobreexpresión de las metalotioneinas favorece la protección ante los eventos oxidativos en la célula y muchos de los fármacos anticancerígenos son altamente tóxicos, por lo tanto esta proteína une y elimina los fármacos evitando que ejerzan su actividad anticancerígena (101,102). Altos niveles de MT2A se asocian con mal pronóstico terapéutico en cáncer de mama, riñón, pulmones nasofaringe, ovario y próstata (103).

La transcripción de los genes de metalotioneinas está regulada por diferentes estímulos, como la endotelina *ET-1*, la administración de metales pesados como Zn, Cu, Cd, Hg que inducen la biosíntesis de *MT-1* y de *MT-2* a través del estímulo al factor de transcripción *MTF1*, este factor de transcripción es el único mediador responsable de la expresión de las metalotioneinas en respuesta a metales (104,105).

Las metalotioneinas cooperan con el glutatión en el mantenimiento y control de los procesos de óxido reducción celular ante la exposición a metales (106,107). Las metalotioneinas acumulan y liberan zinc según sea necesario en la célula; este compuesto influencia el sistema inmune incrementando la actividad de citoquinas pro inflamatorias como *IL-1* e *IL-6* y de enzimas como la DNA polimerasa, RNA polimerasa y la protein kinasa. Ésta última estimula la producción de óxido nítrico (NO) en la célula, lo que promueve la liberación del zinc en las metalotioneinas durante el estrés oxidativo (99,100).

3.5.3 Glutación

El glutatión (*GSH*) es un tripéptido de glutamato, cisteína y glicina (*L-γ-glutamyl-L-cysteinyl-glycine*) considerado como un potente agente reductor en las células. Su forma reducida (*GSH*) y su forma oxidada (*GSSG*) se encuentran en equilibrio gracias a la enzima glutatión reductasa (*GR*) que reduce el *GSSG* para obtener nuevamente moléculas de *GSH* que tienen gran importancia en el control redox a nivel intracelular (108).

La síntesis del glutatión se lleva a cabo en el citoplasma y consta de dos etapas catalizadas por las enzimas γGlutamylcystein synthetase (*γGLCL*) y la glutatión sintetasa (*GLS*); Posterior a su síntesis es redistribuido a diferentes organelas celulares, como retículo endoplásmico, núcleo y mitocondrias donde constituye un 10-15% del *GSH* total (108). El glutatión es consumido en reacciones de oxidación, conjugación e hidrólisis y sus niveles intracelulares dependen del consumo, producción y transporte, eventos controlados a nivel transcripcional, traduccional y postraduccional. Este compuesto también participa como reserva de cisteína para la célula, tiene un papel importante en transporte y acumulación de óxido nítrico y participa en el metabolismo de leucotrienos, prostaglandinas y estrógenos (108). También es importante en la maduración de proteínas, activa factores de transcripción involucrados en las vías de óxido reducción celular y detoxifica gran cantidad de xenobióticos (108).

Gracias a sus propiedades antioxidantes, este compuesto es considerado como un posible blanco terapéutico tanto para inducir protección celular frente a radicales de oxígeno y sustancias tóxicas, como para inhibir su actividad antioxidante frente a fármacos, que contengan compuestos que normalmente serían detoxificados por las células, como es el caso de los anticancerígenos y antimoniales. El *BSO* es uno de los más potentes inhibidores del *GSH* y en la actualidad se han implementado nuevas

aproximaciones en la regulación de la transcripción de los genes, de las enzimas de la síntesis o de las glutatión-S-transferasas (*GST*) que catalizan la conjugación del *GSH* con compuestos electrofílicos que contengan carbón, nitrógeno y átomos de azufre. Estos compuestos pueden ser agentes carcinogénicos, genotóxicos y xenobióticos (108,109) .

Las glutatión transferasas citosólicas se encuentran divididas en 7 familias, las A (alpha α), M (mu μ), P (pi π), S (sigma σ), T (theta θ), O (omega ω) y Z (zetha ζ) y están involucradas en el biosíntesis de leucotrienos, prostaglandinas, testosterona y progesterona; también participan de la degradación de la tirosina y son importantes para la conjugación, reducción e isomerización de diferentes reacciones (110). Las *GST* unen covalente y no covalentemente sustratos hidrofóbicos lo que contribuye al transporte, secuestro y disposición de xenobióticos y algunas hormonas. En este trabajo de investigación se evaluó la expresión génica de la transferasa citosólica *GSTM3* y la transferasa microsomal *MGST2*, con el fin de evaluar su participación en la detoxificación del antimonio.

Las *GST* microsomales o *MAPEG* están involucradas en la producción de eicosanoides. Se han descrito seis transferasas microsomales en humanos y han sido organizadas en tres grupos así: La (*MGST2*), la (*LTC₄S*) o leucotrieno sintasa y la transferasa que conjuga *GSH* con leucotrieno *A₄* llamada (*FLAP*), hacen parte del grupo I. Para el grupo II solo se tiene la *MGST3*, y finalmente las *MGST1* y *PGES1* conforman el grupo IV. Estas enzimas no solo participan de la vía del *GSH* sino que también tienen actividad proinflamatoria (109).

3.6 Fármacos experimentales en el tratamiento de la leishmaniasis

A pesar de que se han descrito múltiples aproximaciones a una vacuna contra la leishmaniasis, como la aplicación de parásitos atenuados o muertos, péptidos sintéticos o recombinantes, vacunas de DNA, y antígenos no proteicos (111,112), no existe una vacuna disponible para la prevención de la leishmaniasis. En vista de limitaciones en el tratamiento, se ha identificado la necesidad de encontrar nuevos compuestos o combinaciones de fármacos, con el fin de mejorar la terapéutica actual. Algunos de los fármacos empleados en esta nueva búsqueda de tratamiento alternativo, son compuestos utilizados en el tratamiento contra el cáncer como el elacridar y productos naturales como la cúrcuma y los flavonoides (113). Estos últimos son sustancias derivadas de componentes de la dieta como las plantas y raíces, empleadas en para combatir diferentes enfermedades (114–116).

3.6.1 Cúrcuma

La *Curcuma longa* es una planta adaptada a zonas cálidas y húmedas, especialmente del sudeste asiático. Los rizomas de esta planta contienen unos compuestos fenólicos llamados curcuminoides, entre los que están: curcumin (diferuloymetano), demetoxicurcumin y el bisdemetoxicurcumin, a los cuales se les han atribuido un sin número de propiedades curativas (115).

Curcumin es el estado purificado o refinado de la cúrcuma y es el polifenol de menor peso molecular, constituyendo entre un 2 a un 8% del total de la cúrcuma. Se le han descrito múltiples propiedades tales como antioxidante, anti inflamatoria, protege contra el cáncer y tiene potenciales propiedades quimioterapéuticas (114). Éste polifenol no es estable a pH básico, su degradación en pH ácidos es más lenta y tiene un comportamiento muy

estable en presencia de suero fetal bovino, lo cual es muy importante durante la experimentación celular *in vitro* (115,117).

La absorción principalmente se lleva a cabo por el sistema gastrointestinal ya que es suministrada frecuentemente por vía oral, pero también se puede aplicar por vía tópica o como droga sistémica por vía endovenosa. Tiene un metabolismo de primer paso muy rápido lo que influye en su baja distribución y bio-disponibilidad. En el plasma se pueden encontrar niveles en el orden los nanogramos y su excreción se realiza por vía intestinal en las heces y también por vía renal (117).

La cúrcuma y sus polifenoles no solo han sido ampliamente utilizados como compuestos anti oxidantes, sino también como inhibidores de transportadores tipo ABC (118,119). El compuesto curcumin se une a los canales de eflujo de estos transportadores evitando que los fármacos suministrados sean expulsados de la célula y sean aprovechados terapéuticamente (120); por este mecanismo de acción y a su actividad anti inflamatoria, este compuesto ha sido seleccionado como una potencial quimioterapia en tratamientos contra el cáncer (121).

3.6.2 Elacridar

El elacridar (GF120918) es un compuesto químico derivado de la acridina carboxamida que funciona como bio-potenciador, está dirigido a tumores sólidos multi-resistentes y es considerado un potente fármaco inhibidor de tercera generación de transportadores de eflujo como el *ABCB1/Pgp* y *ABCG2/BCRP*. La inhibición del *Pgp* resulta en un incremento de la biodisponibilidad plasmática de las drogas co-administradas, siendo mejor aprovechadas y ejecutando su actividad principal más rápido y con mayor magnitud, de esta manera se puede revertir el fenotipo de resistencia

(122,123). Ha sido comprobado durante ensayos clínicos que la co-administración de elacridar con fármacos como el topotecan, paclitaxel y el docetaxel, permite una mejor disponibilidad de los anticancerígenos revirtiendo la resistencia de cáncer de piel, de pulmón, cerebro y cuello en humanos (124,125).

3.6.3 Apigenin

El apigenin es un flavonoide natural derivado de frutas y vegetales como los guisantes, calabazas, pimientos, guayaba, apio, acelga y de algunas plantas como la *Salvia officinalis* y de flores de camomila (126). Este compuesto posee efecto antioxidante, participa del secuestro de radicales libres y presenta actividad anti inflamatoria y antiviral. Apigenin induce la apoptosis celular por vía de activación dependiente de p53 e induce la expresión de la caspasa 3 por la vía del Fas ligando (*Fas/Apo-1*). También disminuye los niveles de expresión de *Bcl-2*, inhibe el receptor de estrógenos *ER α* e inhibe las protein kinasas de las células resistentes contra fármacos anticancerígenos (126).

Los flavonoides como el apigenin disminuyen los niveles celulares de agentes antioxidantes como el glutatión y también bloquean los transportadores tipo ABC como *Pgp* y *MDR1* involucrados en resistencia a drogas contra el cáncer (127). El suministro de apigenin en co-terapia con fármacos anti cancerígenos, ha permitido un mejor aprovechamiento de los tratamientos contra el cáncer y mejorar el pronóstico terapéutico de los pacientes (128).

4. ANTECEDENTES

La resistencia a los fármacos antileishmaniales se refiere a la capacidad del parásito de perpetuar su replicación y persistencia en el hospedero, a pesar de la presión con el medicamento al que generalmente es vulnerable. Este fenómeno compromete la prevención, los tratamientos convencionales se tornan ineficaces, la infección persiste y esto incrementa el riesgo de transmisión, lo cual constituye una amenaza a la salud pública.

La resistencia es un evento natural, puede ocurrir cuando los parásitos se reproducen bajo presión del sistema inmune del hospedero o por la utilización inadecuada del medicamento. Con frecuencia este evento se le ha atribuido al parásito y a la susceptibilidad intrínseca a los antileishmaniales, sin embargo la supervivencia intracelular de *Leishmania spp* se puede alterar por procesos de transporte y acumulación del fármaco por la maquinaria celular del hospedero.

Diferentes grupos de investigación han estudiado los mecanismos por los que *Leishmania spp* de forma intrínseca puede desarrollar un fenotipo de resistencia. El mecanismo más explorado ha sido la expresión génica de transportadores tipo ABC que participan en el eflujo de los antimoniales como el *ABCC3/MRPA/PgpA* (67,129) y la poca internalización del fármaco por parte de *AQP-1* (54,130). Para que el antimonio pueda llegar hasta el compartimento donde se encuentra el parásito, debe atravesar la membrana plasmática y fagolisosomal de la célula hospedera, y finalmente el antimonio debe ingresar al interior del parásito. Este último paso es llevado a cabo principalmente por las acuagliceroporinas (AQPs) presentes en la membrana del parásito. Se ha reportado que una baja expresión génica de *AQP-1* confiere resistencia por disminución en la internalización del fármaco, mientras que aumentos en la expresión de este gen revierte el fenotipo de resistencia al antimonial (54).

Se concluye que luego de ingresar al parásito, el antimonio puede ser conjugado con moléculas del control redox, ser secuestrado y expulsado al exterior celular. La transfección de genes asociados al eflujo y secuestro del antimonio como el *ABCC3*, confiere resistencia a cepas de *Leishmania spp* previamente sensibles a la droga (131). Este mecanismo se ha vinculado también a la sobre producción de *TSH*, el cual se une al antimonio formando un conjugado que posteriormente es secuestrado por el *ABCC3*, disminuyendo la disponibilidad del fármaco libre y favoreciendo la supervivencia intracelular del parásito (66,131–133).

Estas investigaciones se han llevado a cabo principalmente con líneas resistentes y susceptibles de control de laboratorio y no con cepas clínicas. En investigaciones realizadas por nuestro grupo de investigación hemos evidenciado que los perfiles de expresión génica de determinantes farmacológicos como los transportadores de membrana y algunas enzimas metabólicas, son diferentes en ambos tipos de cepas (Anexo 1.). La expresión génica en las cepas clínicas se puede ver influenciada por factores a los que no han estado expuestas las cepas de control, esto limita la correlación de lo que se está observando *in vitro* con lo que está ocurriendo *in vivo*. Según lo anterior, la selección de un modelo de experimentación es determinante al momento de buscar biomarcadores de respuesta farmacológica y de resistencia a los antimoniales.

Ahora bien, la célula hospedera y sus componentes celulares también pueden contribuir a la supervivencia intracelular de *Leishmania spp*. Nuestro grupo demostró recientemente que los mecanismos de regulación de exposición al antimonio en el macrófago, tienen un impacto en la supervivencia del parásito. En este estudio se evidenció que altos niveles de expresión del transportador *ABCB6* y la metalotioneína 2 A (*MT2A*) facilitaba la disminución en la supervivencia intracelular del parásito (5).

A su vez, *Leishmania spp* puede modular el ambiente intracelular de la célula hospedera con el fin de sobrevivir y perpetuar la infección. Un estudio ejecutado en la India demostró que macrófagos infectados *in vitro* con cepas clínicas resistentes a los antimoniales, modulaban la expresión génica de los transportadores *MRP1* y *Pgp* en macrófagos humanos. Estas cepas resistentes de *L. donovani* inducían una sobre expresión de estos transportadores en monocitos humanos, resultando en poca acumulación intracelular del antimonio, lo cual favorecía la supervivencia de *Leishmania* y su replicación intracelular. El suministro de fármacos inhibidores de transportadores de eflujo del hospedero, como la Lovastatina revirtieron el fenotipo de resistencia observado en macrófagos humanos tras la infección con cepas resistentes. (134).

La gran mayoría de los mecanismos de acción de los tratamientos antileishmaniales van dirigidos a alterar los procesos metabólicos del parásito, dejando a un lado la célula hospedera y su participación en la disposición del fármaco. No obstante, la célula hospedera puede alterar la exposición del parasito intracelular a la droga.

En enfermedades como el cáncer donde también se presenta resistencia a los medicamentos por las células tumorales, han optado por dirigir terapias que no solo tengan una acción antitumoral sino que también puedan modular moléculas involucradas en el transporte y acumulación de los fármacos en estas células como *Pgp*, *BCRP* y *MRP1* (72,75,113).

El verapamilo y la ciclosporina A son algunos de los fármacos de primera generación que se han estudiado en la modulación del transporte de medicamentos en el cáncer, a pesar de su buen desempeño en el bloqueo de *MDR1* y mejorar la biodisponibilidad de fármacos anticancerígenos son muy tóxicos y generan fuertes efectos adversos (113,135).

Otros inhibidores de transportadores de eflujo de tercera generación como el elacridar, al ser suministrado en combinación con anticancerígenos como el doxorubicin, vincristine y ritonavir revierte la resistencia en carcinoma de colon, cáncer de pulmón, ovario, mama, próstata y cáncer gástrico; esto gracias al bloqueo de los canales de eflujo, fomentando mayor internalización y acumulación del anticancerígeno principal, sin causar fuertes efectos adversos en los pacientes (136,137).

De compuestos naturales como la cúrcuma y los flavonoides también se han descrito actividad moduladora de los transportadores asociados a multi resistencia; se ha reportado que no solo bloqueando los transportadores de eflujo inhiben la viabilidad celular, sino que también de forma sinérgica promueven señales de regulación de la transducción y transcripción celular (116,126). De igual forma curcumin potente inhibidor de transportadores como *BCRP*, *Pgp* y *MDR*, puede incrementar los niveles en plasma de fármacos como el sulphasalzine suministrado a pacientes con cáncer de mama limitando el crecimiento tumoral, previniendo la tumorigénesis y evitando la metástasis (121,138).

Considerando las propiedades antimicrobianas de curcumin y apigenin, a nivel *in vitro* se han empleado como agentes antileishmaniales (139–141). Se ha reportado que curcumin en promastigotes de *L.major*, *L. tropica* y *L. infantum* tiene un potencial efecto anti proliferativo a un IC50 de 5.3 μ M (142) y otros compuestos polifenólicos derivados de la cúrcuma como el demethoxycurcumin y el bisdemethoxycurcumin también presentan fuerte actividad antileishmanial con poca toxicidad en las células del hospedero (143). Se ha reportado también que curcumin disminuye los niveles de *TSH* en el parásito y de *GSH* en las células hospederas lo que permite una mayor vulnerabilidad de los parásitos a la muerte por los radicales de oxígeno (144).

El apigenin también utilizado como antileishmanial ha logrado reducir la carga parasitaria de *L. amazonensis* a través de la sobre producción de especies reactivas de oxígeno (141) .

Estos compuestos han sido dirigidos a eliminar el parásito directamente mientras que su empleo como moduladores de la célula hospedera con fines microbicidas no había sido explorado. En este estudio buscamos identificar una potencial co-terapia que promueva la muerte parasitaria eficiente mediante la modulación de procesos de transporte y metabolismo de la célula hospedera, con el fin de optimizar el uso de los antileishmaniales disponibles.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

5.1 Diseño del estudio

Este es un estudio descriptivo, diseñado para conocer el impacto de la interacción entre *Leishmania (V) panamensis* y macrófagos humanos en la susceptibilidad y resistencia al antimonio de meglumina (AM). Asimismo con el fin de mejorar y optimizar los tratamientos antileishmaniales, se busca revertir el fenotipo de resistencia al AM mediante co-terapias dirigidas al hospedero en busca de promover la acumulación intracelular del fármaco.

Se evaluó mediante ensayos *in vitro* si macrófagos humanos de la línea celular THP-1, tras la infección con cepas clínicas y líneas de laboratorio resistentes o sensibles al AM, expresan diferencialmente genes asociados al transporte, acumulación y metabolismo de la droga. La confirmación de estos hallazgos se llevó a cabo en ensayos *in vitro* en macrófagos humanos primarios, aislados de individuos con leishmaniasis cutánea activa, diagnosticada y confirmada por el equipo clínico del Centro internacional de entrenamiento e investigaciones médicas, CIDEIM. La expresión génica de transportadores y enzimas metabólicas se determinó por la metodología de qRT-PCR. Los datos de expresión fueron normalizados con el gen constitutivo (*gapdh*) y los niveles de expresión relativa se definieron por el método del $\Delta\Delta C_t$ para todos los experimentos.

Para evaluar el efecto de moduladores de transportadores tipo ABC en la célula hospedera y con el fin de potenciar la actividad del AM, se determinaron los niveles de citotoxicidad de curcumin, elacridar y apigenin en células THP-1. Posterior a la selección de las dosis sub-citotóxicas se hizo la evaluación de supervivencia intracelular de *Leishmania* en presencia del AM y estos compuestos. Luego se determinó la concentración intracelular de antimonio por ICP-MS (Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente). La supervivencia intracelular de *Leishmania spp* se evaluó por la metodología de qRT-PCR del transcrito del gen *7SLRNA*.

Figura 6 . Estrategia experimental objetivo 1.

Evaluación de expresión génica de determinantes farmacológicos en macrófagos humanos posterior a la infección con cepas de *L (V) panamensis* resistentes o sensibles al AM .

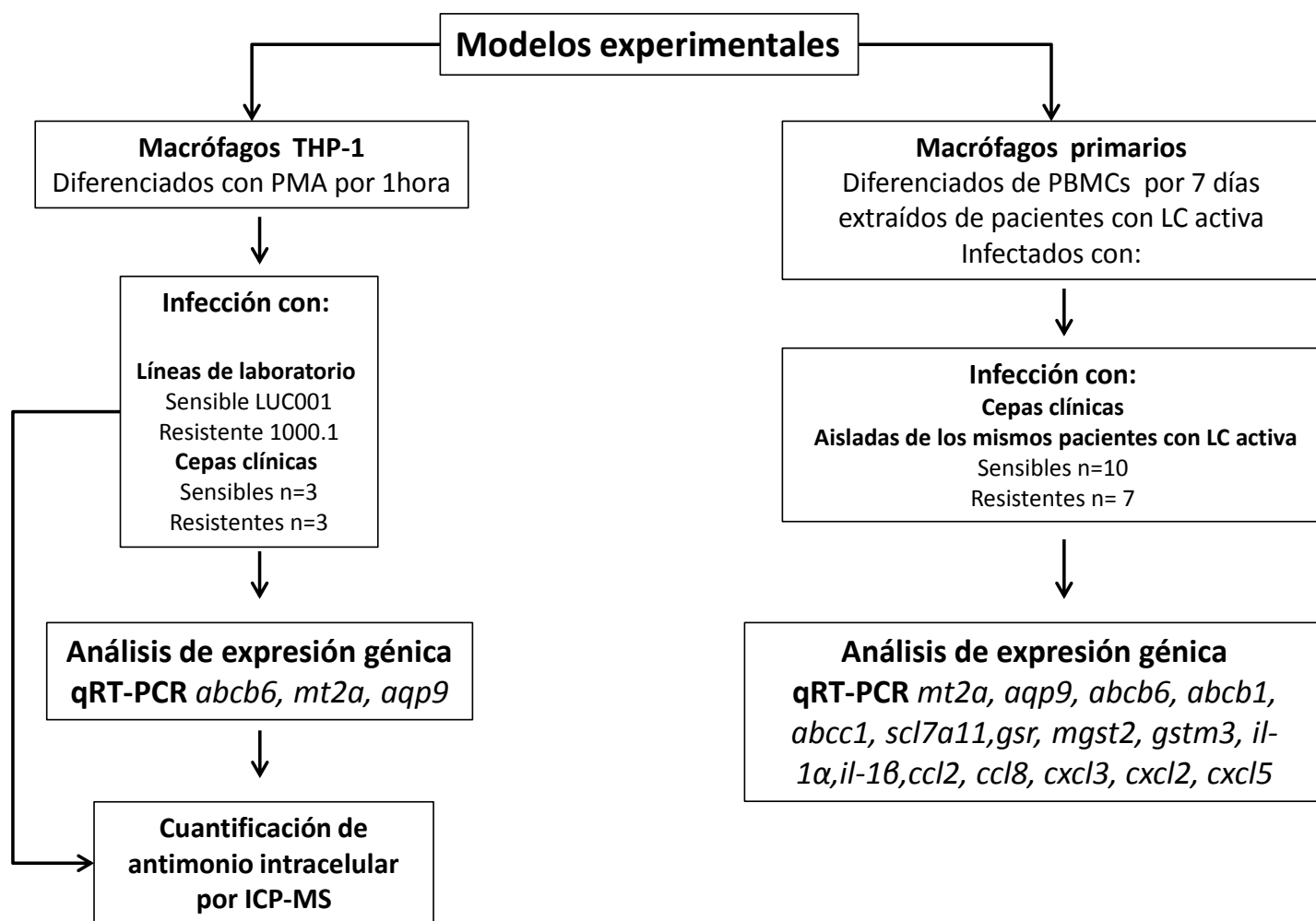
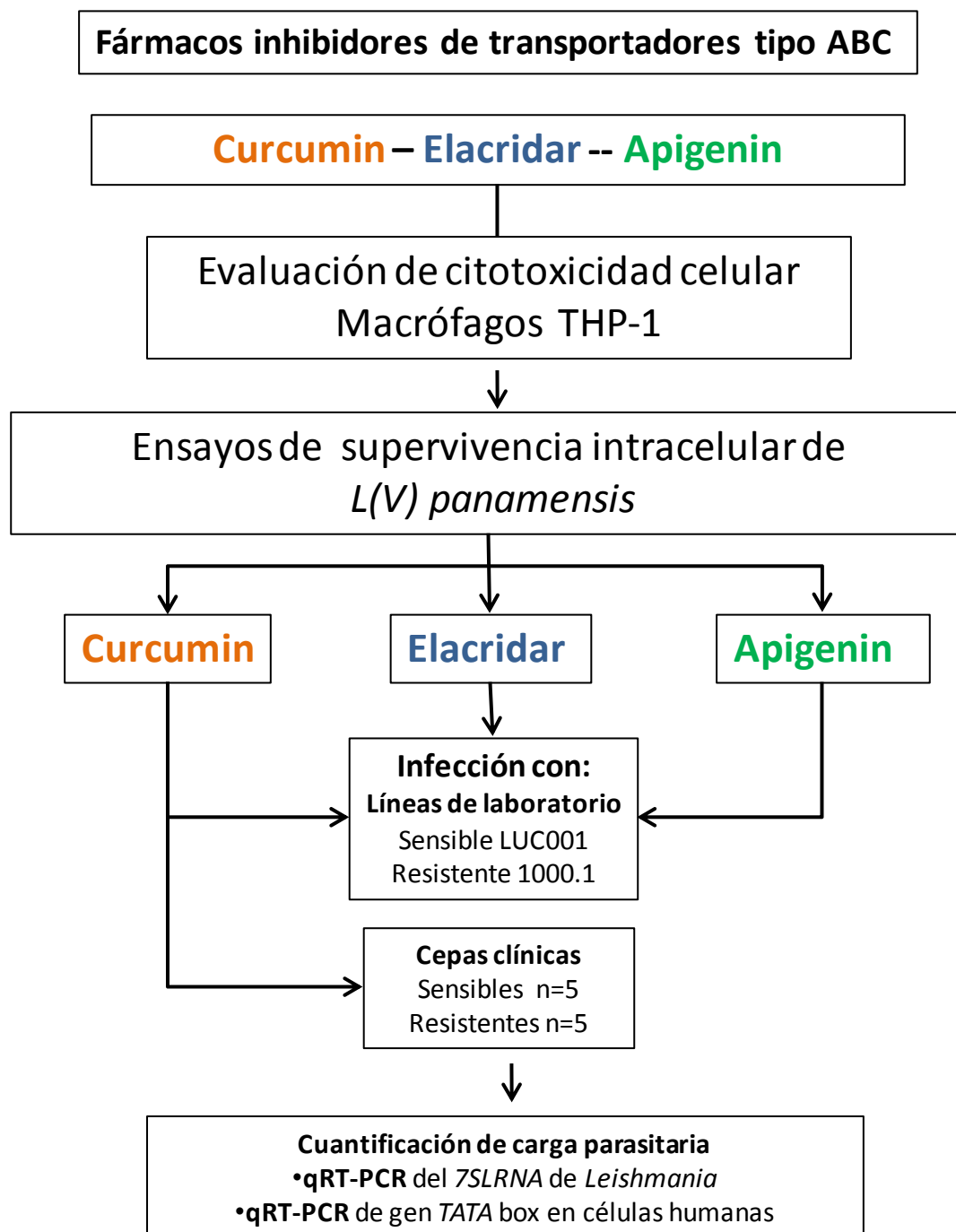


Figura 7. Estrategia experimental objetivo 2.

Ensayos de supervivencia intracelular de *L (V) panamensis* en macrófagos humanos durante la exposición a inhibidores de bombas de eflujo.



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Población del estudio

La población de este proyecto está conformada por 17 pacientes con leishmaniasis cutánea activa, hombres y mujeres de cualquier etnia, entre 18 y 60 años, con prueba de VIH negativa y mujeres con prueba de embarazo negativa. Estas muestras se seleccionaron teniendo en cuenta el fenotipo de susceptibilidad de la cepa de *Leishmania spp* aislada de la lesión por la cual consultaron los mismos pacientes (7 resistentes y 10 susceptibles). El reclutamiento de los individuos se llevó a cabo tanto en la sede de CIDEIM con sede en Santiago de Cali y en la IPS de CIDEIM ubicada en el municipio de Tumaco en el departamento de Nariño.

Criterios de inclusión

- 1) Pacientes con leishmaniasis cutánea activa
- 2) Edad entre 18 y 60 años
- 3) Prueba de VIH negativa
- 4) En caso de mujeres, prueba de embarazo negativa
- 5) Niveles de hemoglobina >11mg/dl para mujeres y >12mg/dl hombres
- 6) Participación voluntaria en el estudio
- 7) Aceptación del proceso de consentimiento informado con firma del formato

Criterios de exclusión

- 1) Mujeres en estado de embarazo o lactancia
- 2) Prueba de VIH positiva
- 3) Enfermedades inmunosupresoras
- 4) Fármaco terapia con medicamentos inmunosupresores

6.2 Consideraciones Éticas

La inclusión de los pacientes participantes de éste proyecto se realizó en el marco del proyecto : “*Macrophage drug transport and metabolism in the outcome of antileishmanial therapy*” cuyo código de aval por el Comité Institucional de Ética de Investigaciones en Humanos de CIDEIM (CIEIH) es 1209, con la más reciente aprobación del 01 de junio de 2015, en conformidad con las pautas éticas nacionales (Ministerio de Salud Nacional Resolución No. 008430 de Octubre de 1993) e internacionales (Declaración de Helsinki de 1964 con su última versión de 2013).

A cada posible participante se le comunicaron los objetivos, riesgos y beneficios del estudio. Adicionalmente se le hizo entrega del consentimiento informado que cada participante leyó, entendió y firmó voluntariamente.

Para la ejecución de este proyecto de investigación se utilizaron las siguientes muestras:

- 100 ml de sangre de voluntarios con leishmaniasis cutánea activa reclutados tanto en la sede de CIDEIM Cali como en Tumaco (n=17).
- Cepas clínicas de *L. (V) panamensis* aisladas de pacientes con leishmaniasis cutánea activa, (n=7) con fenotipo de resistencia y (n=10) susceptibles al AM. La susceptibilidad de estas cepas fue determinada por el BioBanco institucional mediante tamizaje farmacológico.

6.3 Cultivo celular y diferenciación de macrófagos de la línea celular THP-1

Monocitos de la línea celular (THP-1 ATCC®) derivados de leucemia monocítica aguda, se cultivaron en medio de cultivo RPMI 1640 (1X) (Gibco) con 1% de Penicilina 100U/ml / Estreptomicina 100µg/ml (Sigma) y suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco). Cada dos días se realizó conteo celular por hematocitómetro para confirmar que la confluencia celular del cultivo, no superara el millón de células por mililitro con el fin de mantener la viabilidad celular.

Para los ensayos de infección *in vitro*, monocitos THP-1 fueron estimulados para su diferenciación a macrófagos durante una hora por estimulación con 300ng/ml de PMA (Sigma-Aldrich), para cada 1×10^6 células/ml en medio RPMI con 10% de SFB (medio completo). Posteriormente las células fueron lavadas con PBS y sembradas en placas de 6 pozos con medio RPMI completo, e incubadas durante 24 horas a 37°C con 5% CO₂. Este procedimiento fue empleado tanto para los ensayos de expresión génica como para los ensayos de supervivencia intracelular con los fármacos moduladores.

6.4 Aislamiento de monocitos de sangre periférica y diferenciación en cultivo

Células mononucleares de sangre periférica fueron aisladas de la muestra de 100ml de sangre venosa, extraída de los pacientes participantes del estudio (Tabla 1). La separación de los mononucleares se dio mediante centrifugación usando un gradiente de Ficoll-Histopaque®-1077 (Sigma-Aldrich) durante 30 min a 450g. Diez millones de mononucleares fueron sembrados en placas de 6 pozos con medio RPMI sin suero fetal bovino por 2 horas para permitir la adhesión de las células a la placa. Posteriormente se

hicieron lavados con PBS para retirar las células no adherentes y se dejaron en incubación por 7 días en medio RPMI con 20% de SFB a 37°C con 5% CO₂. Durante ese tiempo los mononucleares se diferenciaron a macrófagos primarios, para luego ser utilizados en los experimentos de expresión génica.

Tabla 1. Muestras pareadas de macrófagos y cepas de *L (V) panamensis* aisladas de los pacientes con leishmaniasis cutánea activa.

Código de Muestra PBMCs	Nombre de la cepa	Fenotipo de susceptibilidad	Porcentaje de reducción de infección a 32µg/ml de AM
MT1001	MHOM/COL/13/12088	Susceptible	93%
MT1008	MHOM/COL/14/12205	Indeterminado	39%
MT1003	MHOM/COL/13/12162	Susceptible	92%
MT1007	MHOM/COL/14/12189	Resistente	0%
MT1004	MHOM/COL/13/12146	Resistente	21%
MT1006	MHOM/COL/13/12169	Susceptible	89%
MT1010	MHOM/COL/14/12218	Resistente	0%
MT2013	MHOM/COL/14/11024	Susceptible	58%
MT2022	MHOM/COL/14/11153	Susceptible	95%
MT1017	MHOM/COL/14/12268	Susceptible	92%
MT1025	MHOM/COL/14/12351	Susceptible	97%
MT1011	MHOM/COL/14/12224	Susceptible	98%
MT1009	MHOM/COL/14/12213	Susceptible	99%
MT1013	MHOM/COL/14/12249	Susceptible	96%
MT1034	MHOM/COL/15/12444	Resistente	21%
MT2033	MHOM/COL/15/12371	Indeterminado	35%
MT2031	MHOM/COL/15/12353	Indeterminado	40%

6.5 Cepas clínicas y líneas control de laboratorio sensible y resistente de *Leishmania (V) panamensis*

En este estudio se emplearon dos grupos diferentes de cepas clínicas: el primero conformado por las cepas aisladas de las lesiones de los pacientes con LC participantes en este estudio, sensibles (n=10) y resistentes e indeterminadas (n=7) (Tabla 1). El segundo grupo contiene cepas clínicas criopreservadas en el BioBanco institucional, empleadas en el tamizaje inicial de expresión génica en el modelo THP-1 y en los ensayos de supervivencia intracelular de *Leishmania* con el uso de los fármacos inhibidores (Tabla 2). Adicionalmente se evaluaron las líneas de control de *L. (V) panamensis* sensible *MHOM/COL/03/3594/LUC001* y resistente *MHOM/COL/86/1166-1000.1* al AM.

Los promastigotes fueron descongelados en medio de cultivo bifásico de agar sangre (Senekjie) y PBS, se cultivaron durante 4 días, para luego ser propagados en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB a 25°C. La especie fue determinada por inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales (145) e isoenzimas (14). La línea de control resistente *MHOM/COL/86/1166-1000.1* fue cultivada en presencia de 1000 $\mu\text{moles/L}$ de antimonio trivalente (Sb^{III}), para mantener su fenotipo de resistencia.

6.6 Determinación de susceptibilidad al antimoniato de meglumina

El fenotipo de susceptibilidad de las cepas fue determinado por personal de CIDEIM mediante la evaluación *in vitro* de la reducción de la carga de amastigotes intracelulares por exposición a la concentración máxima de AM alcanzada en plasma de pacientes tratados con Glucantime (32 $\mu\text{g/ml}$ de Sb^{V}). Con base en los resultados las cepas se clasificaron como: susceptibles con valores de reducción de carga parasitaria entre 100 y 45%,

indeterminado de 45 a 35% y resistente con valores inferiores a 35% en la reducción (146).

Tabla 2. Cepas clínicas utilizadas en el tamizaje de expresión génica en macrófagos THP-1.

<i>Susceptibilidad a Antimoniato de meglumina Glucantime®</i>			
<u>Cepas resistentes</u>		<u>Cepas susceptibles</u>	
<i>Código de la cepa</i>	<i>Porcentaje de reducción</i>	<i>Código de la cepa</i>	<i>Porcentaje de reducción</i>
<i>MHOM/COL/85/2452</i>	0%	<i>MHOM/COL/85/2363</i>	80%
<i>MHOM/COL/84/2183</i>	0%	<i>MHOM/COL/85/2420</i>	88%
<i>MHOM/COL/85/1131</i>	0%	<i>MHOM/COL/05/3951</i>	93%
<i>MHOM/COL/03/3783</i>	0%	<i>MHOM/COL/86/2476</i>	87%
<i>MHOM/COL/85/2472</i>	3%	<i>MHOM/COL/85/2411</i>	95%
<i>MHOM/COL/84/2198</i>	0%	<i>MHOM/COL/85/2375</i>	93%
<i>MHOM/COL/84/2169</i>	0%	<i>MHOM/COL/85/2272</i>	94%
<i>MHOM/COL/85/2504</i>	0%	<i>MHOM/COL/05/8295</i>	85%
<i>MHOM/COL/84/2189</i>	25%		

6.7 Infección *in vitro* de macrófagos primarios y de la línea celular THP1 y exposición a AM.

Los promastigotes se cultivaron por 6 días en medio RPMI completo, para la obtención de parásitos infectivos en fase estacionaria. Se contabilizaron los promastigotes por hematocitómetro, calculando el volumen necesario para la infección a una proporción 10:1 (parásitos: macrófago). Luego se trataron por una hora con 10% de suero AB+ humano (inactivado a 56°C por 30min (Hemolife) a 34°C para permitir la opsonización de los parásitos por las inmunoglobulinas y las moléculas del complemento. Posteriormente los macrófagos fueron infectados con los promastigotes opsonizados por 2 horas

a 34°C con 5% de CO₂. Después de este tiempo se hizo un lavado con DPBS (Gibco) para retirar los parásitos que no fueron internalizados y se dejó en incubación por 24 horas a 34°C con 5% de CO₂.

Posterior a las 24 horas de infección, los macrófagos fueron expuestos al AM (donación del Centro Médico Militar Walter Reed de los Estados Unidos) en RPMI completo con la concentración de antimonio establecida para cada estrategia experimental (4-32 µg/ml). La exposición continúa con AM prosiguió por los tiempos descritos para cada experimento (entre 24 h y 48 h) a 34°C con 5% de CO₂.

6.8 Ensayos de combinación de fármacos

Para definir la concentración sub citotóxica de los compuestos Curcumin C7727-500MG (Sigma), Elacridar SML0486-10MG (Sigma) y Apigenin A3145-25MG (Sigma), se evaluaron en células THP-1 durante 24 y 48 horas las siguientes concentraciones: Curcumin (0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 25, 50 µM); Elacridar (0.05, 0.1, 0.5, 1, 2.5, 5, 10, 20µM) y Apigenin (1,10, 25, 50, 100, 150, 200 µM). La viabilidad de los macrófagos fue determinada por la metodología de MTT (147). Una vez definidas las dosis sub citotóxicas de cada modulador, se realizaron los ensayos de supervivencia intracelular de *L. (V) panamensis* en combinación con AM.

Luego de la infección de los macrófagos con las cepas resistentes y susceptibles, se suministró la combinación planteada entre el AM (32 µg/ml) y cada modulador descrito de la siguiente forma: pre tratamiento por 24 horas con el fármaco modulador con posterior exposición por 24 horas a 32 µg/ml AM.

6.9 Extracción de RNA, síntesis de cDNA y PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR)

Los macrófagos fueron recolectados y preservados en TRIzol® Reagent (Ambion by Life technologies) y conservados a -80°C hasta su procesamiento. La extracción del RNA se realizó por el método orgánico. El RNA proveniente de macrófagos primarios fue posteriormente limpiado usando el RNeasy Mini Kit (Qiagen) y tratamiento con DNase I (Qiagen). La calidad y la cantidad de RNA fueron cuantificadas utilizando el Espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 V3 3.0.

La síntesis de la copia de DNA (cDNA) se llevó a cabo usando el kit de síntesis de cDNA High capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystem). La concentración RNA fue homogenizada para todas las muestras en cada experimento, dejando una concentración máxima por reacción de 2 µg. El cDNA se diluyó 1:2 en agua libre de RNAsas/DNAsas y se conservó bajo refrigeración a -15°C hasta su uso.

Se evaluó la expresión de un panel de genes de transportadores, enzimas metabólicas, citoquinas y el gen normalizador (*gapdh*) en macrófagos (Tabla 3) usando sondas Taqman® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem). Los niveles de expresión relativa se definieron por el método del $\Delta\Delta C_t$ para todos los experimentos. La amplificación y medición en tiempo real se realizó en un CFX96 Real Time System C1000 Thermal cycler (BIORAD).

6.10 Cuantificación de carga parasitaria

Para estimar la carga parasitaria de los experimentos de supervivencia intracelular de *Leishmania* se empleó el agente intercalante SYBR® Green

PCR Master Mix (Applied Biosystem) con los cebadores TRY7SL.For.1 (5'-TGCTCTGTAACTTCGGGGGCT-3') y TRY7SL.Rev.1 (5'-GGCTGCTCCGTYNCCGGCCTGACCC-3') que amplifican 179 pares de bases del gen 7SLRNA de *Leishmania* (148) . Para realizar la cuantificación comparativa de carga parasitaria se utilizó como gen normalizador humano la proteína de unión a la caja TATA (TBP). La amplificación de TBP se realizó con los siguientes cebadores hTBP-Q Forward (5'-CACGAACCACGGCACTGATT-3') y el hTBP-Q Reverse (5'-TTTTCTTGCCAGTCTGGA-3') donados por el Dr. David Gregory de Harvard University). Los datos de carga parasitaria fueron reportados como número de parásitos/1000 células mamíferas.

Para determinar el límite de detección de la carga parasitaria como marcador de supervivencia intracelular de *Leishmania*, se realizó una curva estándar con la línea LUC001 de diluciones seriadas (1:10) de cDNA, partiendo de una concentración inicial de 1×10^7 hasta 1×10^{-2} . Del mismo modo para el gen normalizador TBP, se hizo una curva estándar con monocitos de la línea celular THP-1 con diluciones seriadas del cDNA 1:10 desde 1×10^7 hasta 1×10^{-2} .

Tabla 3. Genes evaluados en los experimentos de expresión génica.

Nombre del gen	ID de la Sonda
<i>ABCB1</i>	Hs00184500_m1
<i>ABCC1</i>	Hs01561510_m1
<i>ABCB6</i>	Hs01039213_m1
<i>MT2A</i>	Hs01591333_g1
<i>AQP9</i>	Hs01035887_m1
<i>SLC7A11</i>	Hs00204928_m1
<i>GSR</i>	Hs00167317_m1
<i>MGST2</i>	Hs00182064_m1
<i>GSTM3</i>	Hs00356079_m1
<i>CCL2</i>	Hs00234140_m1
<i>CCL8</i>	Hs00271615_m1
<i>IL-1α</i>	Hs00174092_m1
<i>IL-1β</i>	Hs01555410_m1
<i>CXCL2</i>	Hs00601975_m1
<i>CXCL3</i>	Hs00171061_m1
<i>CXCL5</i>	Hs00171085_m1
<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1
<i>iNOS</i>	Hs01075529_m1

6.11 Cuantificación intracelular de antimonio

Macrófagos de la línea celular THP-1 fueron infectados por 24 horas con cepas resistentes y sensibles de *Leishmania (V) panamensis*, unas recibieron pre tratamiento por 24 horas con 10 μ M de curcumin, seguido de exposición a 16, 24 y 32 μ g/ml de AM durante 24 horas y las otras solamente fueron expuestas al antimonial durante 24 horas. Luego de la exposición a la droga, los macrófagos fueron lavados con PBS para remover las trazas de antimonio extracelular. Las células fueron recolectadas y diluidas en 100 μ l de ácido nítrico y almacenadas a -80°C hasta su procesamiento.

Las concentraciones intracelulares de antimonio fueron medidas por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS) en una plataforma ICAP 6300 (Thermo Scientific) en colaboración del Dr. Dan Zilberstein en Technion Israel Institute of Technology.

Los cálculos se basaron en una curva de calibración con rangos desde 0.5 a 5 μ g/ml de antimonio y cada concentración fue normalizada con el total de células presente en cada muestra. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

6.12 Detección de ROS intracelular por citometría de flujo

Monocitos de la línea celular THP-1 fueron diferenciados a macrófagos con PMA y 24 horas después tratados con 10 μ M de curcumin y 32 μ g/ml de AM por una hora a 37°C con 5% de CO₂; al pasar este tiempo se adiciona el reactivo CellROX® Green Flow Cytometry Assay Kit (Life Technologies). Esta sonda colorante luego de su oxidación, genera en el interior celular, una fuerte señal de fluorescencia detectada por citometría, permitiendo la medición de ROS intracelular en células vivas. Las células fueron lavadas en PBS y luego centrifugadas a 1500rpm por 5 minutos, se suspendieron en 500

µl de Buffer FACS para la lectura en un citómetro BD Accuri C6. El análisis de los resultados se hizo con el software FLOWJO v10.1r5.

6.13 Manejo de datos y análisis estadístico

Los datos numéricos (Cts) que se obtuvieron durante la cuantificación de la expresión génica con el software Bio-Rad CFX Manager, fueron normalizados con el gen constitutivo *gapdh*. Se definieron los niveles de expresión relativa por el método de $\Delta\Delta C_t$ y serán registrados en Microsoft Office Excel. Los valores numéricos de la cuantificación intracelular de antimonio (µg/ml) por ICP-MS, se calcularon con una curva de calibración con rangos desde 0.5 a 5 µg/ml de antimonio, esta información también fue registrada en archivos de Microsoft Office Excel.

La hipótesis de normalidad de los datos se evaluó mediante la prueba Shapiro-Wilk, en los casos en que se rechace la hipótesis nula de esta prueba se utilizó la mediana como medida de tendencia central y el rango como medida de dispersión, mientras que si se cumple la normalidad los datos estos fueron representados con el promedio como medida de tendencia central y el error estándar como medida de dispersión. Las variables se representaron mediante gráficas de puntos, barras y de líneas estratificadas por el tipo de cepa infectante en cada experimento (resistente o sensible al AM).

Se realizó un análisis de varianza para determinar las diferencias en el efecto de la infección con cepas sensibles y resistentes al AM. Si los datos no seguían una distribución normal se aplicó la prueba Kruskal-Wallis y se evaluó la prueba de comparación múltiple de Dunn's, para conocer entre cuales de los tratamientos se encontraron las diferencias.

En los casos en que fuera necesario se realizó una regresión no lineal para la identificación de datos atípicos (Outliers) con la metodología ROUT “**Robust**

regression and **Outliers removal**” , se retiraron los puntos seleccionados por el programa estadístico y se realizó nuevamente el análisis. Todas las hipótesis del estudio fueron consideradas con un nivel de significancia de 0.05.

El análisis estadístico se realizó en el programa GraphPad Prism (GraphPad Software, versión 6.05).

7. RESULTADOS OBJETIVO No. 1

7.1 La susceptibilidad de *L. (V) panamensis* al antimonio de meglumina contribuye a la modulación diferencial de determinantes farmacológicos en macrófagos humanos.

Leishmania es un parásito intracelular y el papel de la célula hospedera en el desarrollo del fenotipo de resistencia al AM se desconoce; en este proyecto evaluamos la capacidad de cepas resistentes o sensibles al AM, de alterar la respuesta del macrófago.

7.1.1 La expresión de MT2A en macrófagos de la línea celular THP-1 es inhibida durante la infección con cepas de *Leishmania (V) panamensis* resistentes al antimonio de meglumina.

Se determinaron los niveles de expresión de los genes *aqp9*, *abcb6* y *mt2a*, moléculas involucradas en el transporte y metabolismo de compuestos antimoniales, en monocitos de la línea celular THP-1 diferenciados a macrófagos mediante la estimulación con PMA. Se comparó el efecto del nivel de susceptibilidad al antimonio de meglumina (AM) de las líneas control y cepas clínicas de *L. (V) panamensis*, en la modulación de la expresión de estas moléculas.

Los resultados muestran que la exposición de macrófagos THP-1 a 32 µg/ml de AM, en ausencia de infección, inducen la expresión de los genes *mt2a* y *abcb6* en comparación con el control sin estímulo (Fig. 8A-B puntos azules).

Durante las infecciones con las líneas control de *L. (V) panamensis* y posterior exposición al AM, los niveles de expresión de *mt2a* inducidos por la

línea resistente (LUC1000.1) fueron significativamente menores en comparación con los niveles inducidos por la línea sensible (LUC001) (Fig.8A). En los genes *abcb6* y *aqp9*, aunque no se observa un comportamiento diferencial significativo entre la infección con la línea sensible y resistente, se evidencia una tendencia a menor expresión con las líneas resistentes.

Para corroborar estos hallazgos, realizamos infecciones de células THP-1 con cepas clínicas de *L. (V) panamensis*, resistentes o sensibles al AM. La infección por sí sola no moduló significativamente la expresión de los genes evaluados; sin embargo, la infección seguida de la exposición a la droga promueve mayores niveles de expresión de los genes *mt2a* y *aqp9* (Fig.8B triángulos negros). La comparación de los niveles de expresión de *mt2a* entre la infección con las cepas sensibles y resistentes seguida de la exposición al fármaco, no muestra un comportamiento diferencial (Fig.8B MT2A triángulos negros), a diferencia de los resultados encontrados con las líneas resistente y sensible al AM (Fig.8A MT2A). Evidenciamos una alta variación en los datos en línea con la variabilidad natural de diferentes aislamientos clínicos. No se observó expresión diferencial significativa en los genes *abcb6* y *aqp9* durante la infección con cepas clínicas.

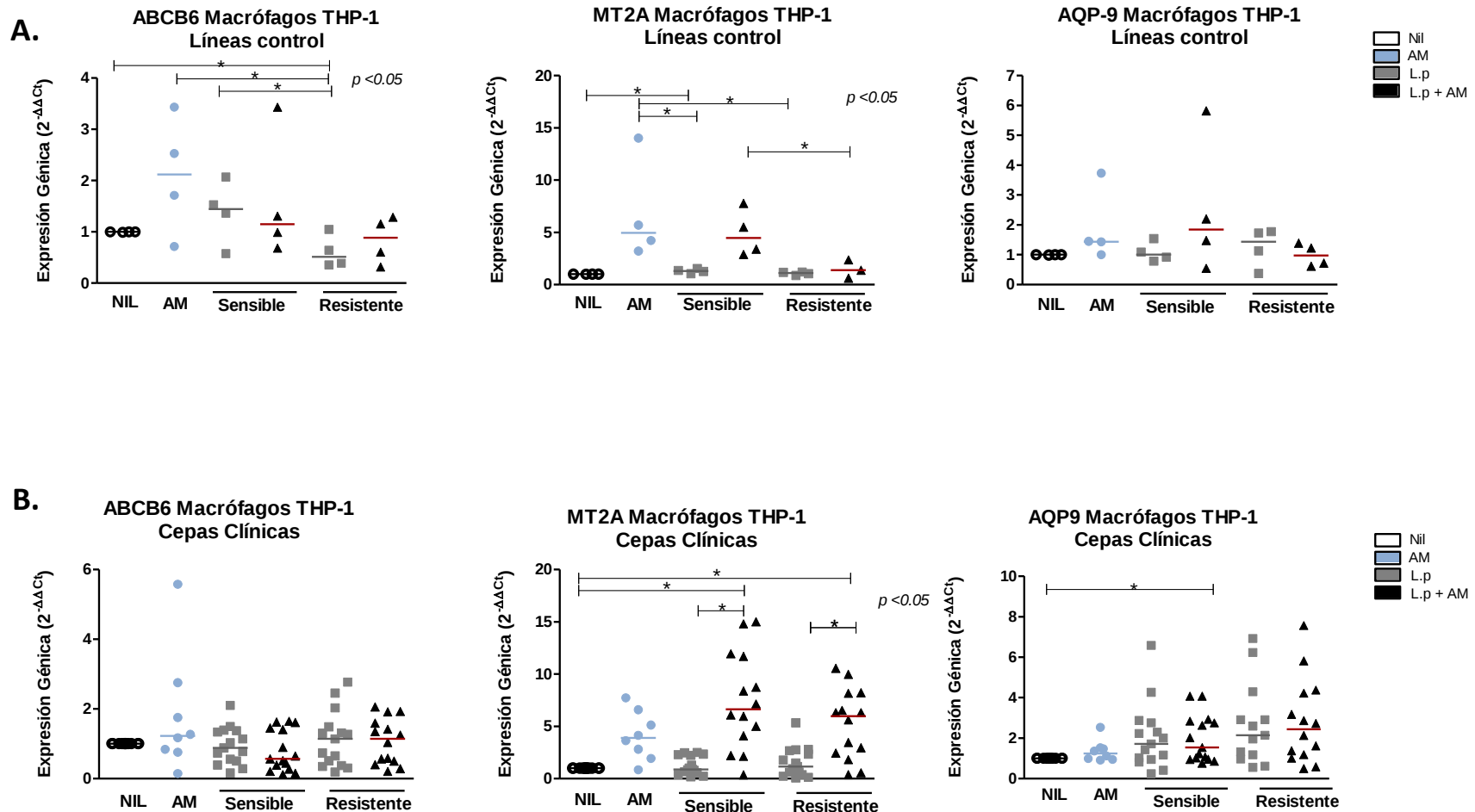


Figura 8. . El fenotipo de susceptibilidad de *L. (V) panamensis* contribuye a la expresión diferencial de moléculas involucradas en el transporte y metabolismo del antimoniato de meglumina en macrófagos.

Niveles de expresión génica de **A)** *abcb6*, *mt2a* y *aqp9*, en THP-1 tras la infección con líneas de control de *L. (V) panamensis* sensibles (LUC001) y resistentes al AM (LUC1000.1). Se reportan 4 réplicas experimentales. El análisis estadístico se realizó con la prueba T de Student. **B)** Niveles de expresión de *abcb6*, *mt2a* y *aqp9* en THP-1 inducidos tras la infección con cepas clínicas de *L. (V) panamensis* resistentes (n=3) y sensibles al AM (n=3). Se reportan 5 réplicas biológicas representadas por la mediana como medida de tendencia central. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA para datos no paramétricos (Kruskal-Wallis). Los asteriscos indican un valor de $p < 0.05$.

Evaluamos el impacto de la infección con cepas de divergente susceptibilidad en la expresión génica de la célula hospedera, bajo un modelo experimental novedoso implementado por nuestro grupo con el fin de recrear con mayor precisión la infección natural. Macrófagos primarios derivados de PBMCs de pacientes con LC activa fueron infectados *ex vivo* con las cepas de *Leishmania spp* aisladas de las lesiones originales por las cuales consultaron los pacientes; es decir cada ensayo se llevó a cabo con los macrófagos y parásitos propios de cada participante. La tipificación de especie y perfil de susceptibilidad al AM de las cepas, fue evaluado mediante tamizaje farmacológico (146). Se evaluó la expresión de los genes *mt2a*, *abcb6* y *aqp9* y la de otros transportadores potencialmente involucrados en el transporte del AM, como *abcb1*, *abcc1* y *slc7a11*.

En concordancia con los resultados anteriores, la exposición de los macrófagos primarios a 32 µg/ml de AM induce la sobre-expresión de *mt2a* y *abcb6*; también se observa un aumento en la expresión del gen *slc7a11* (Fig.9).

La infección por sí sola no modula significativamente la expresión de los genes *abcb6*, *mt2a*, *aqp9*, *abcb1* y *abcc1* (Fig.9A-E); mientras que en *slc7a11* se observa una tendencia a mayores niveles de expresión de este gen durante la infección con cepas resistentes al AM (Fig.9F). En contraste la expresión de *mt2a* fue menor durante la infección con cepas resistentes seguida de exposición al AM (Fig.9B). Este comportamiento es consistente con las evaluaciones anteriores, demostrando la clara inhibición por *L. (V) panamensis* resistente en la expresión de ésta molécula en la célula hospedera.

Menor expresión de *mt2a* en el contexto de infección con cepas resistentes podría sugerir menor secuestro o acumulación intracelular del fármaco, promoviendo menor exposición del parásito al AM. Estos resultados

muestran una potencial participación de la célula hospedera en la supervivencia intracelular de *Leishmania* durante la exposición a AM y sugieren que la modulación de la expresión de determinantes farmacológicos en macrófagos puede contribuir al fenotipo de resistencia de *L. (V) panamensis*.

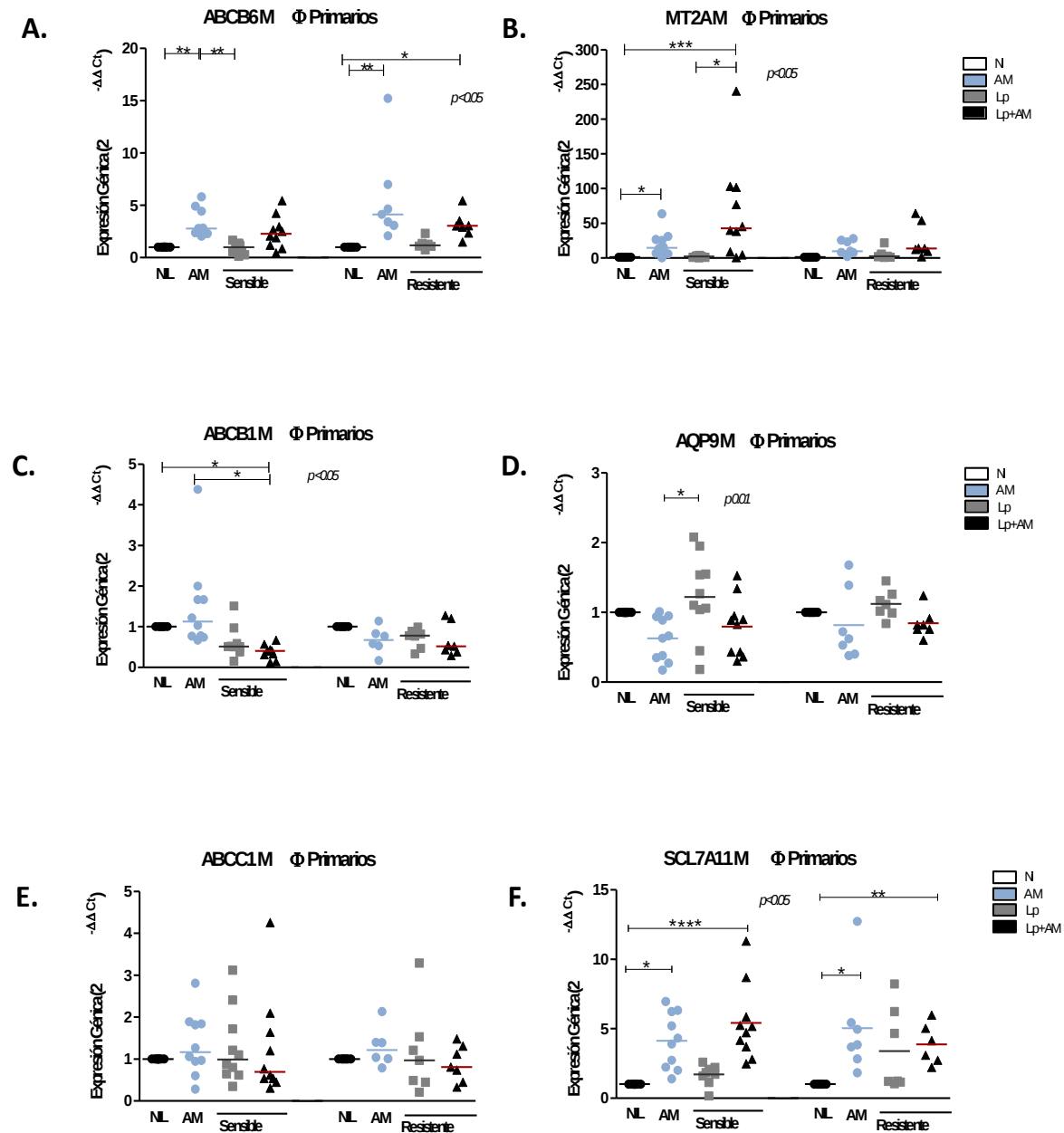


Figura 9. Modulación de la expresión de genes involucrados en transporte y acumulación de AM en macrófagos primarios.

Niveles de expresión génica de **A) *abcb6***, **B) *mt2a***, **C) *abcb1*** **D) *aqp9*** **E) *abcc1*** **F) *slc7a11***, en macrófagos primarios aislados de pacientes con LC, infectados con las cepas clínicas de *L. (V) panamensis*, sensibles (n=10) y resistentes al AM (n=7) aisladas de los mismos pacientes (cuadros grises), la exposición a 32 μ g/ml de AM durante 24 h está representada por los puntos azules y finalmente una condición de infección por 24 h con posterior exposición al AM (triángulos negros). Los datos son representados por la mediana. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA para datos no paramétricos (Kruskal-Wallis) con post test de Dunn's. Los asteriscos indican un valor de $p < 0.05$.

7.1.2 La infección de macrófagos humanos con cepas de *L. (V) panamensis* sensibles o resistentes no confiere acumulación diferencial del AM a nivel intracelular.

Evaluamos si la infección con cepas de *L. (V) panamensis* con diferente susceptibilidad al AM y por ende si la modulación diferencial de MT2A en macrófagos humanos, se correlaciona con variaciones en la concentración intracelular (intra-macrófago) de antimonio. Por espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), en colaboración con el Dr. Dan Zilberstein, se determinaron los niveles intracelulares de antimonio durante infecciones con líneas de control resistente y sensible al AM, en experimentos de dosis respuesta de 16, 32 y 64 µg/ml de AM. Aunque la acumulación intracelular de antimonio es dosis dependiente no se encontraron diferencias en la concentración intracelular del fármaco tras la infección con cepas sensibles y resistentes al AM (Fig.10).

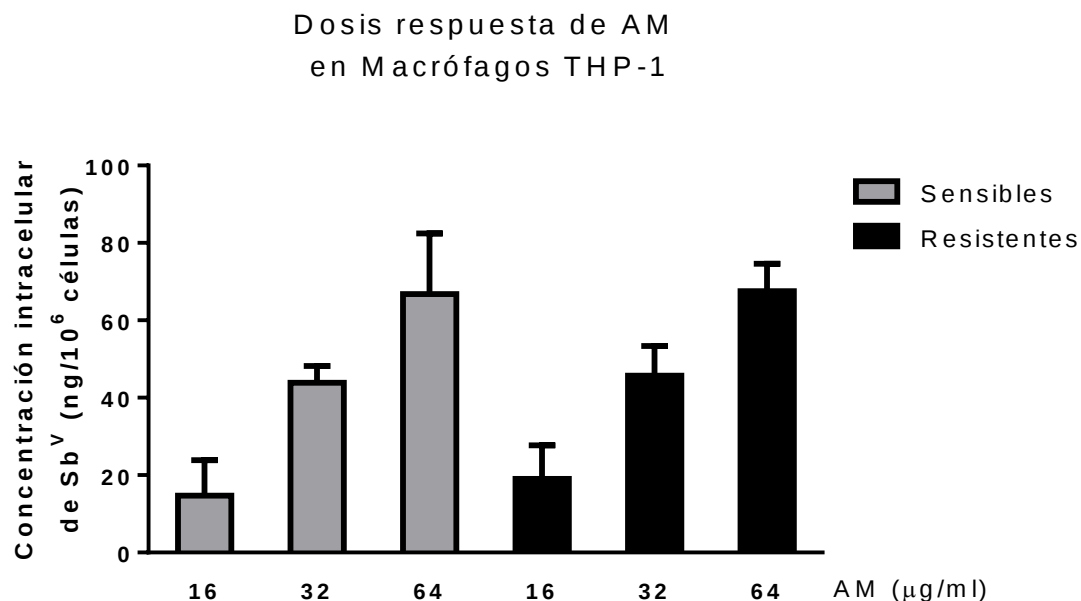


Figura 10. Concentración intracelular total de antimonio en macrófagos THP-1 infectados con cepas de *L. (V) panamensis* sensibles y resistentes al AM. Dosis respuesta de 16, 32 y 64 µg/ml de AM durante la infección con líneas resistentes (LUC1000.1) o sensibles (LUC001) al AM. Los datos de concentración del antimonio obtenidos en el ICP-MS fueron normalizados de acuerdo al número de células presentes en cada experimento. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicado. Se reporta el promedio ± error estándar.

7.1.3 Expresión génica de moléculas involucradas en el metabolismo del glutatión en macrófagos primarios de pacientes con leishmaniasis cutánea activa.

El glutatión es un potente agente reductor que participa en el control de procesos de óxido-reducción al interior celular. Con el fin de evaluar la participación del glutatión en la resistencia o susceptibilidad del parásito intracelular al AM, evaluamos la expresión de enzimas involucradas en el

metabolismo de esta molécula. La Glutación-S-reductasa (GSR) encargada de mantener el glutatión reducido y las Glutación transferasas (GSTM3 y MGST2) pueden promover la muerte parasitaria mediando la activación del antimonio Sb^V a Sb^{III} y la conjugación del glutatión a sustratos hidrofóbicos, lo que contribuye al transporte, secuestro y disposición de xenobióticos(108). Los macrófagos derivados de PBMCs de pacientes con LC, fueron infectados con las cepas aisladas de los mismos pacientes cuyos niveles de susceptibilidad al AM eran conocidos, como previamente se describió.

Encontramos que la exposición a AM induce la expresión de *gsr* y *gstm3* en macrófagos primarios (Fig.11 A,C). Los niveles de *mgst2* durante la infección y exposición a la droga, no presentaron diferencias significativas entre los grupos de análisis, sin embargo se observa que la infección independiente del fenotipo de susceptibilidad, inhibe la expresión de *mgst2* (Fig.11B). Ésta enzima está involucrada en la producción de importantes mediadores inflamatorios como leucotrienos y prostaglandina E (110), su inhibición podría debilitar la respuesta inflamatoria favoreciendo la supervivencia intracelular del parásito.

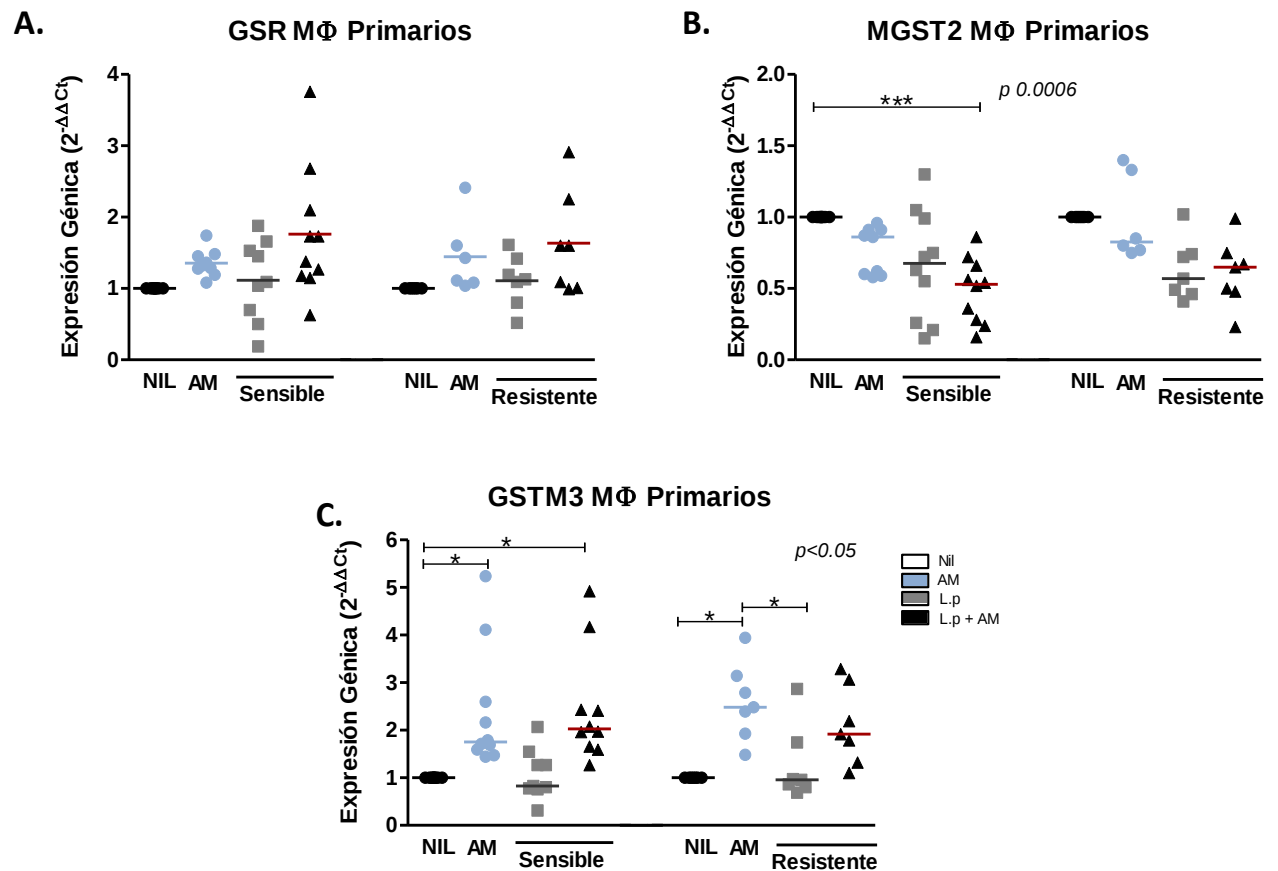


Figura 11. La infección con cepas sensibles y resistentes al AM no modula diferencialmente la expresión génica de enzimas de la vida del glutatión.

Niveles de expresión génica de A) *gsr*, B) *mgst2* C) *gstm3* en macrófagos primarios aislados de pacientes con LC, infectados con las cepas clínicas de *L. (V) panamensis*, sensibles (n=10) y resistentes al AM (n=7) aisladas de los mismos pacientes (cuadros grises), la exposición a 32 μ g/ml de AM durante 24 h está representada por los puntos azules y finalmente una condición de infección por 24 h con posterior exposición al AM (triángulos negros). Los datos son representados por la mediana. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA para datos no paramétricos (Kruskall-Wallis) con post test de Dunn's. Los asteriscos indican un valor de $p < 0.05$.

7.1.4 La expresión génica de quemoquinas y citoquinas en macrófagos humanos primarios es modulada diferencialmente por el fenotipo de susceptibilidad de *L. (V) panamensis* al AM.

Según las observaciones anteriores, de un panel de moléculas involucradas en el transporte y metabolismo de la célula hospedera, solo MT2A presentó modulación diferencial durante la infección con cepas de *L. (V) panamensis* con diferente fenotipo de susceptibilidad al AM. Al evaluar la concentración intracelular del antimonio no se observaron diferencias en la acumulación de la droga, por lo tanto el impacto de la expresión de MT2A en la supervivencia intracelular de *Leishmania*, puede ser el resultado de la modulación de mecanismos microbicidas de la respuesta inflamatoria del hospedero mediado por su actividad en la homeostasis del Zn intracelular y por ende en la regulación de la expresión génica de moléculas dependientes de factores de transcripción sensibles al Zn como *NF-κB*.

Se determinaron los niveles de expresión de los genes, *cxcl2*, *cxcl5*, *cxcl3*, *ccl2*, *ccl8*, *IL-1β* e *IL-1α*, en macrófagos primarios diferenciados de PBMCs, infectados con cepas clínicas de *L(V) panamensis* resistentes o sensibles al AM; esto con el fin de comparar el efecto del nivel de susceptibilidad al AM, en la modulación de la expresión de citoquinas y quemoquinas relevantes durante la infección con *Leishmania spp* y la respuesta inflamatoria en macrófagos humanos (149).

Se encontraron tendencias a la inducción de los genes *cxcl3* y *cxcl2* ante la exposición al AM (Fig.12 A, C). Como se ha descrito anteriormente, la infección por si sola induce la expresión de los genes de quemoquinas (*cxcl3*, *cxcl5*, *cxcl2*, *ccl2* y *ccl8*) que reclutan y activan monocitos, neutrófilos, células dendríticas y otras células determinantes en la respuesta inmune a patógenos (Fig.12A-E cuadros grises). También se observa la inducción de los genes codificantes para la *IL-1β* y la *IL-1α*, citoquinas mediadoras de la respuesta inflamatoria, proliferación, diferenciación celular y apoptosis (Fig.12F,G).

Al analizar la expresión génica por grupo de cepas infectantes sensibles o resistentes al AM, notamos que la infección con *L. (V) panamensis* sensible induce la expresión de *il-1 α* e *il-1 β* , en contraste a la poca inducción de estos genes durante la infección con cepas resistentes al AM (Fig.12 F, G). Por el contrario, la inducción en la expresión de *cxc/3* muestra diferencias estadísticamente significativas durante la infección con cepas resistentes seguida de exposición al fármaco, en comparación con la infección con cepas sensibles. La represión de la expresión de estos genes podría favorecer la sobrevivencia intracelular de parásitos fármaco resistentes.

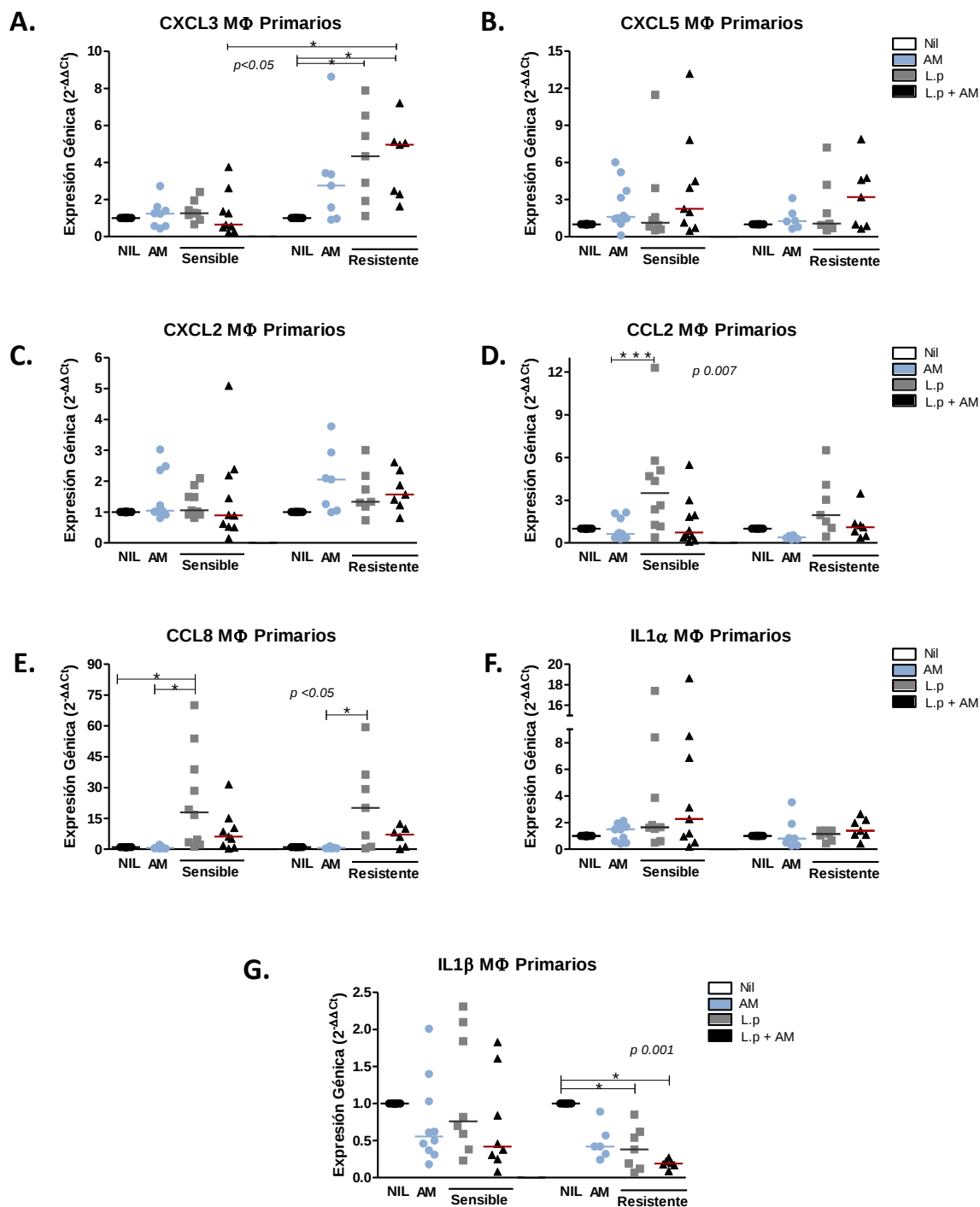


Figura 12. La infección *in vitro* con *L. (V) panamensis* a macrófagos primarios de pacientes con leishmaniasis cutánea activa, induce la sobre expresión de citoquinas y quemoquinas determinantes durante la respuesta inmune a patógenos. Niveles de expresión génica de A) *cxcl3*, B) *cxcl5*, C) *cxcl2*, D) *ccl2*, E) *ccl8*, F) *il-1 α* G) *il-1 β* en macrófagos primarios aislados de pacientes con LC, infectados con las cepas clínicas de *L. (V) panamensis*, sensibles (n=10) y resistentes al AM (n=7) aisladas de los mismos pacientes (cuadros grises), la exposición a 32 μ g/ml de AM durante 24 h está representada por los puntos azules y finalmente una condición de infección por 24 h con posterior exposición al AM (triángulos negros). Los datos son representados por la mediana. El análisis estadístico se realizó con la prueba ANOVA para datos no paramétricos (Kruskall –Wallis) con post test de Dunn's. Los asteriscos indican un valor de $p < 0.05$.

Resumen de hallazgos:

- El antimonio de meglumina induce la expresión de los genes *mt2a*, *abcb6*, *gsr* y *gstm3* relacionados con la detoxificación de xenobióticos.
- La infección con cepas de *L. (V) panamensis* resistentes al AM, inhibe la expresión de los genes *mt2a*, *il-1 α* e *il-1 β* .
- El fenotipo de susceptibilidad de *L. (V) panamensis* al AM, no altera la acumulación intracelular de antimonio en macrófagos humanos.

8. RESULTADOS OBJETIVO No. 2

El uso de fármacos moduladores de transportadores ABC permite un mejor aprovechamiento de las drogas al revertir la resistencia en enfermedades como el cáncer (150,151). En vista de las dificultades en el tratamiento de la LC, buscamos identificar co-terapias que optimicen la eficacia de los medicamentos actualmente disponibles. Con el uso de inhibidores de transportadores tipo ABC pretendemos modular el transporte y acumulación del AM en la célula hospedera, promoviendo la eliminación parasitaria y con el potencial de revertir el fenotipo de resistencia al AM en cepas de *L. (V) panamensis*.

8.1 Inhibidores de determinantes farmacológicos en combinación con el antimonio de meglumina reducen la supervivencia intracelular de *L. (V) panamensis*.

Se evaluó la citotoxicidad de curcumin, elacridar y apigenin en macrófagos THP-1 diferenciados con PMA. La viabilidad celular fue determinada por la reacción de MTT, a las 24 horas (Fig. 13A) y 48 horas de exposición (Fig. 13B). El resultado de las tres réplicas experimentales permitió seleccionar las dosis sub citotóxicas para cada inhibidor siendo: curcumin 10 μ M, elacridar 2.5 μ M y apigenin 10 μ M.

8.1.1 La combinación de AM y elacridar o apigenin no potencia la muerte intracelular de *L. (V) panamensis*.

El elacridar y el apigenin empleados en la terapia contra el cáncer, han sido reportados como importantes inhibidores de transportadores tipo ABC (124,126,152,153). Al bloquear los canales de eflujo en la célula, permiten la acumulación de la terapia anti cancerígena, favoreciendo la muerte celular y en algunos casos revirtiendo fenotipo de resistencia. Para evaluar el efecto de los fármacos moduladores de transportadores de membrana tipo ABC, en la supervivencia intracelular de *L. (V) panamensis*, se utilizaron macrófagos THP-1

diferenciados e infectados *in vitro* con *L. (V) panamensis* resistentes (LUC1000.1) y sensibles al AM (LUC001). Posterior a la infección, los macrófagos fueron expuestos a la dosis seleccionada de cada inhibidor seguida de una dosis estándar de 32 µg/ml de AM.

La exposición *in vitro* individual de elacridar o apigenin y la combinación con el antimonial, no promueve la disminución de la supervivencia intracelular de *L. (V) panamensis*. Por el contrario se observa un aumento en la carga parasitaria durante la exposición combinada de estos inhibidores con el AM, tal vez por la presencia de algún efecto cito-estimulador (Fig.14).

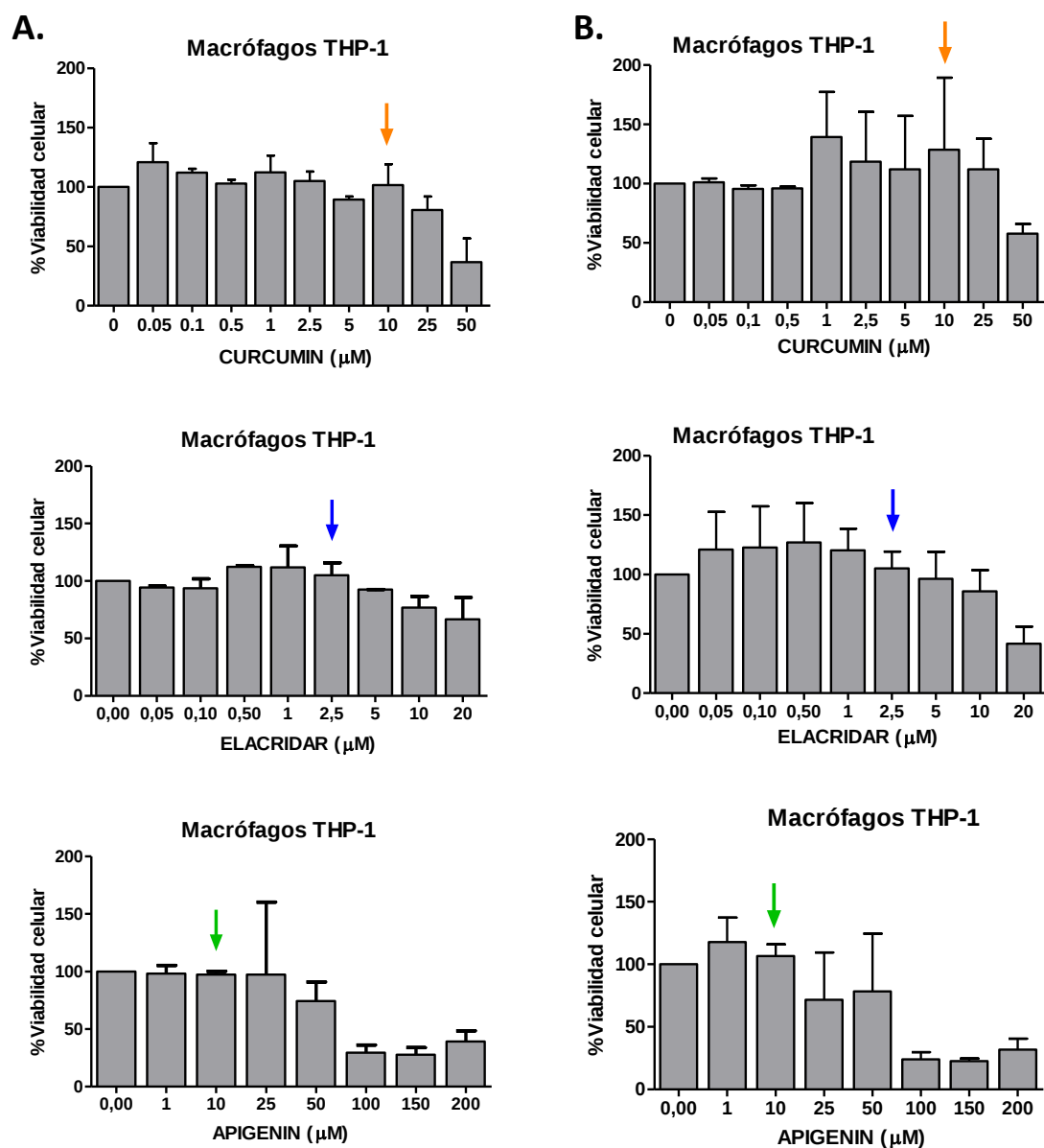


Figura 13. Evaluación de citotoxicidad de curcumin, elacridar y apigenin en macrófagos THP-1. Porcentaje de viabilidad de macrófagos THP-1 evaluados mediante la reacción de MTT, tras la exposición a diferentes dosis de los inhibidores curcumin, elacridar y apigenin. Las evaluaciones se realizaron a las 24 horas (panel A) y 48 horas de exposición a los inhibidores (panel B). La viabilidad a cada fármaco fue evaluada por triplicado y se muestra como porcentaje de viabilidad con relación al control sin inhibidor. Se representan los datos como promedio $\pm$ error estándar.

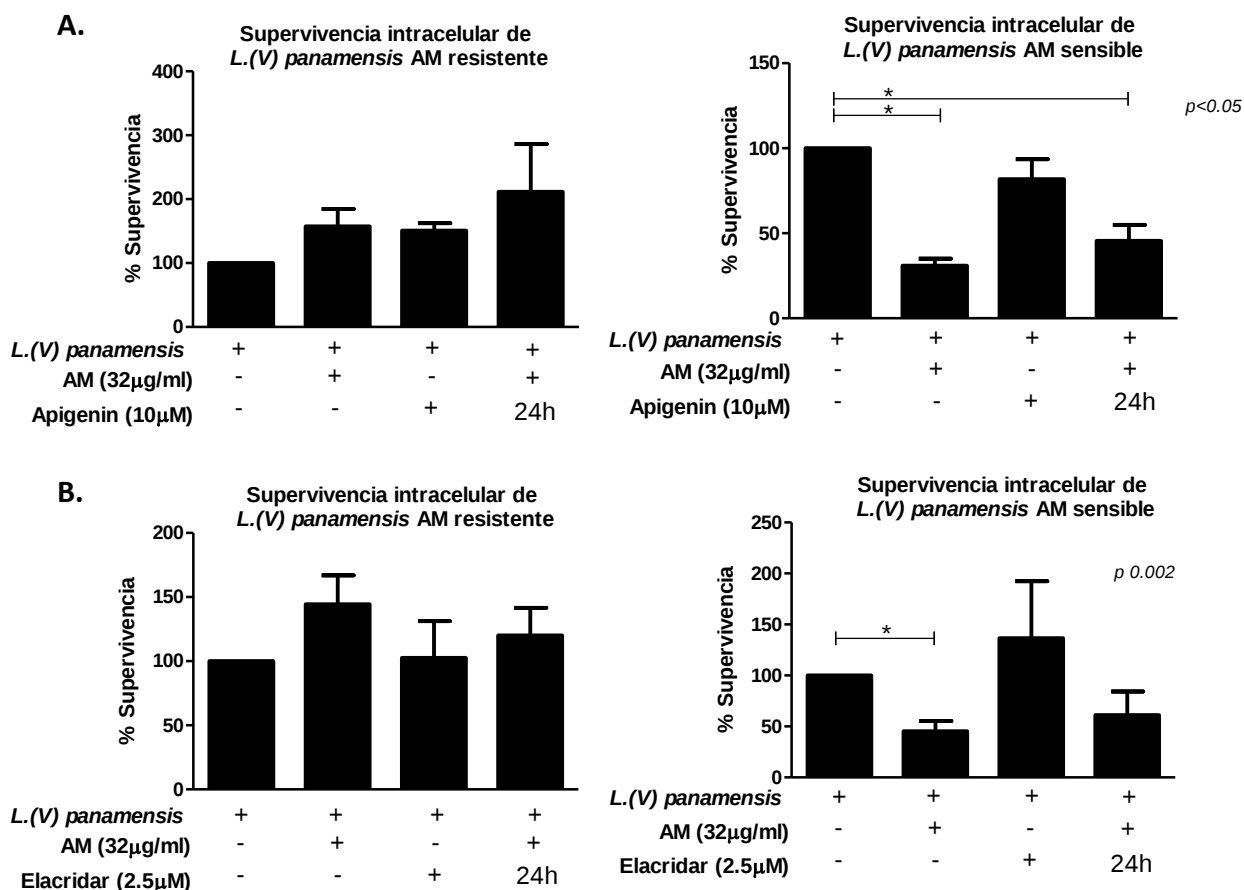


Figura 14. Supervivencia intracelular de *L. (V) panamensis* bajo el efecto de la combinación de AM e inhibidores de transportadores tipo ABC: apigenin y elacridar. Porcentaje de supervivencia intracelular de *L. (V) panamensis* resistente y sensible al AM en macrófagos THP-1 durante la exposición al antimonio en combinación con **A)** apigenin 10 µM **B)** elacridar 2.5 µM. Las cargas parasitarias fueron evaluadas por qRT-PCR del gen *7SLRNA*. Los resultados son el valor promedio $\pm$ error estándar de tres réplicas biológicas.

8.1.2 El pre tratamiento durante 24 horas con curcumin seguido de AM reduce en más del 50% la supervivencia intracelular de *L. (V) panamensis* resistente al AM.

El uso individual de curcumin no generó impacto en la supervivencia intracelular de *L. (V) panamensis*. Por el contrario, la combinación de pre tratamiento durante 24 horas con curcumin 10 μ M seguida de exposición a AM por 24 horas, redujo significativamente en más de un 50% la supervivencia intracelular de *L. (V) panamensis* resistente tanto en líneas control como en cepas clínicas (Fig.15B).

El empleo de curcumin como inhibidor de transportadores tipo ABC, indicaría bloqueo del eflujo del fármaco, permitiendo mayor acumulación y exposición intracelular de los parásitos al AM, facilitando la reducción en la supervivencia intracelular de las cepas resistentes de *L. (V) panamensis*.

Para comprobar esto se cuantificó la concentración intracelular de antimonio, en un experimento de dosis respuesta de AM en combinación con curcumin. Macrófagos THP-1 fueron expuestos *in vitro* a curcumin 10 μ M por 24 horas, seguido del tratamiento a diferentes dosis del AM (Fig. 16A Línea naranja). No se encontraron diferencias en la acumulación intracelular del antimonio en macrófagos pre tratados o no con curcumin (Fig.16A).

Teniendo en cuenta que estos experimentos se realizaron en células sin infección se evaluó el efecto de curcumin sobre la acumulación intracelular del antimonio en macrófagos infectados con líneas control resistente y sensible al AM. No se observó acumulación diferencial del antimonio durante el tratamiento con el inhibidor curcumin en comparación con células tratadas solo con AM (Fig.16B).

Estos hallazgos sugieren que el efecto antileishmanial observado en el pre tratamiento por 24 horas con curcumin sobre la disminución de la

supervivencia intracelular de *L. (V) panamensis* resistente, no se debe a mayor acumulación intracelular del fármaco, indicando que otras funciones del macrófago, con potencial microbicida, son moduladas por este compuesto.

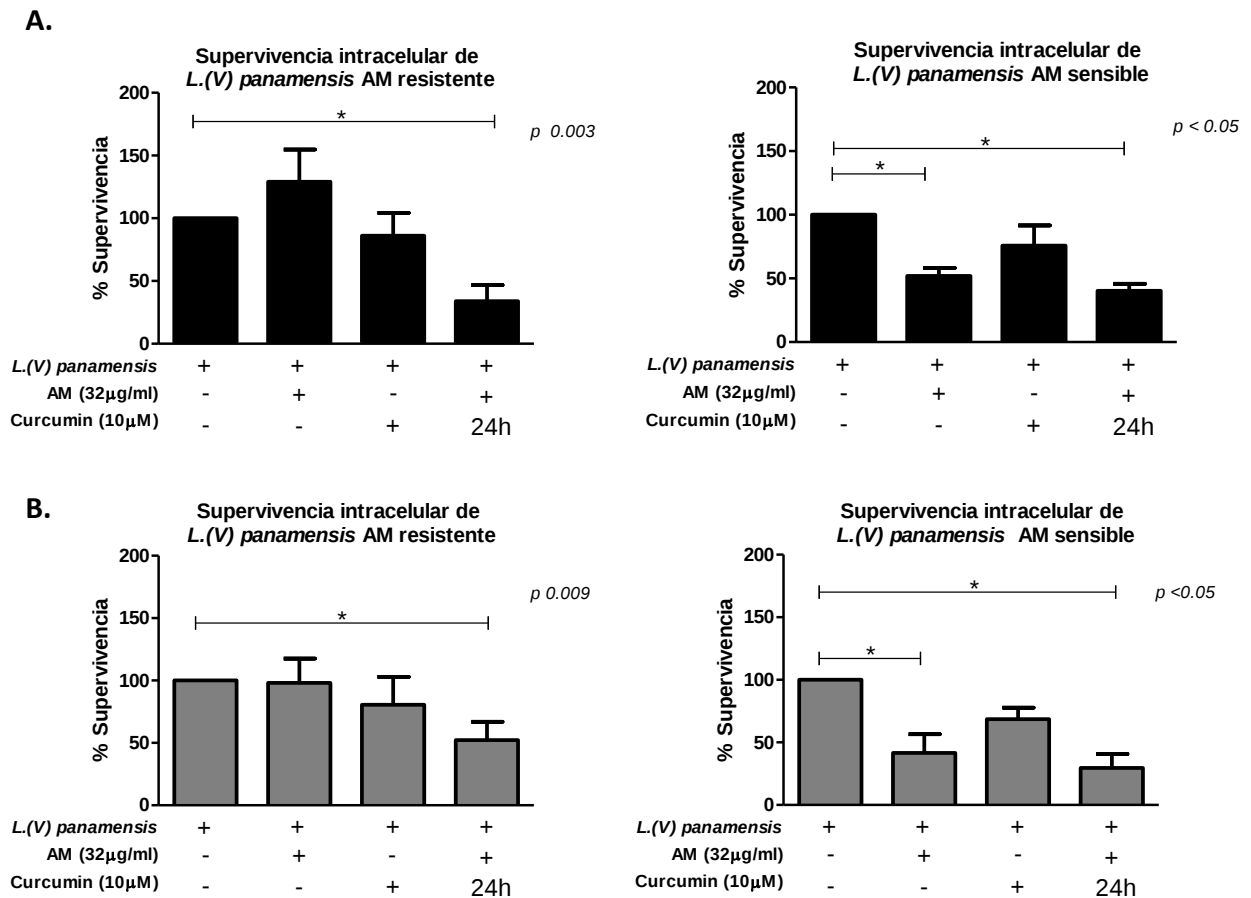


Figura 15. Supervivencia intracelular de *L.(V) panamensis* bajo el efecto de la combinación entre AM y curcumin como inhibidor de determinantes farmacológicos. Porcentaje de supervivencia intracelular de *L (V) panamensis* en macrófagos THP-1 durante la exposición a curcumin a 10 µM y AM 32 µg/ml. Las cargas parasitarias fueron evaluadas por qRT-PCR del gen *7SLRNA* en 4 réplicas experimentales. **A)** Infección con líneas control resistente LUC1000.1 y sensible LUC001. **B)** Infección con cepas clínicas de *L. (V) panamensis* resistentes (n=4) y sensibles al AM (n=4) aisladas de pacientes con leishmaniasis cutánea activa. Los datos son representados por el promedio ± error estándar.

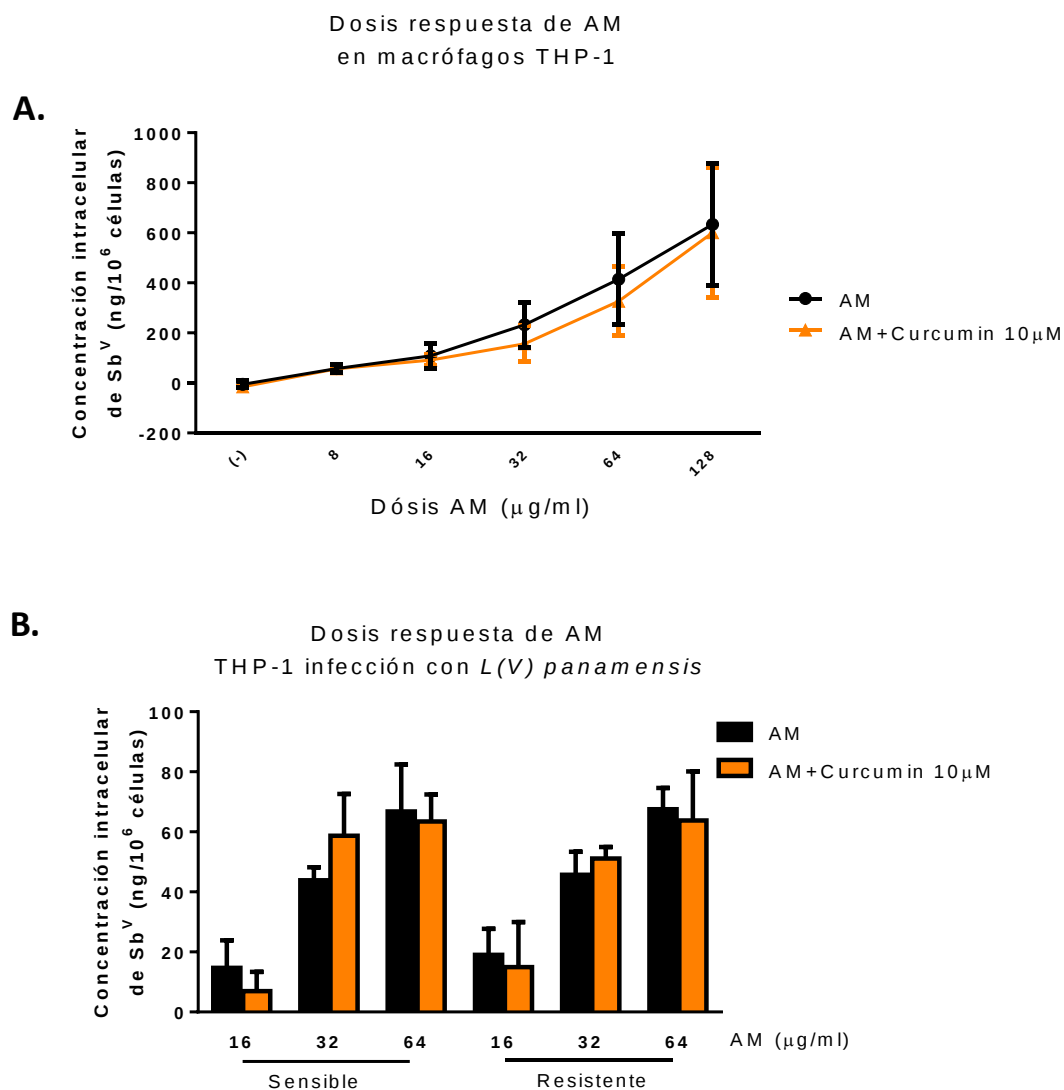


Figura 16. Concentración intracelular de antimonio en macrófagos THP-1 tratados con curcumin 10 µM.

A) Concentración intracelular de antimonio en un ensayo de dosis respuesta de 8, 16, 32, 64 y 128 µg/ml de AM en macrófagos THP-1 en presencia y ausencia de curcumin 10 µM **B)** Dosis respuesta de AM en macrófagos THP-1 infectados con las líneas resistente (LUC1000.1) y sensible al AM (LUC001), pre tratados por 24 h con curcumin 10 µM. La cantidad intracelular de antimonio fue normalizada de acuerdo al número de células presentes en cada experimento. Los ensayos se llevaron a cabo por triplicad .Se reporta el promedio ± error estándar.

8.1.3 La disminución en la supervivencia intracelular de cepas de *L.(V) panamensis* resistente, tras el pre tratamiento con curcumin puede estar mediada por muerte celular secundaria a la generación de ROS intracelular.

En la búsqueda de mecanismos que expliquen el efecto antileishmanial de la combinación de curcumin y el antimonio de meglumina sobre cepas resistentes al AM, exploramos dos potenciales mecanismos causantes de muerte parasitaria: 1) la producción de óxido nítrico y 2) la producción de radicales oxidativos (ROS).

El óxido nítrico (NO) es un potente agente microbicida producido por macrófagos activados durante la respuesta inmune ante una infección; su producción es proporcional a la cantidad de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (*iNOS*) (154). Se evaluaron los niveles de expresión del gen codificante para la enzima *iNOS* por qRT-PCR. Los resultados muestran que no hay claras diferencias en la expresión del gen *iNOS* durante el tratamiento con curcumin en las infecciones con cepas resistentes o sensibles al AM; sugiriendo que la disminución en la supervivencia intracelular de *L.(V) panamensis* no resulta de la inducción de producción de NO al interior celular (Fig. 17).

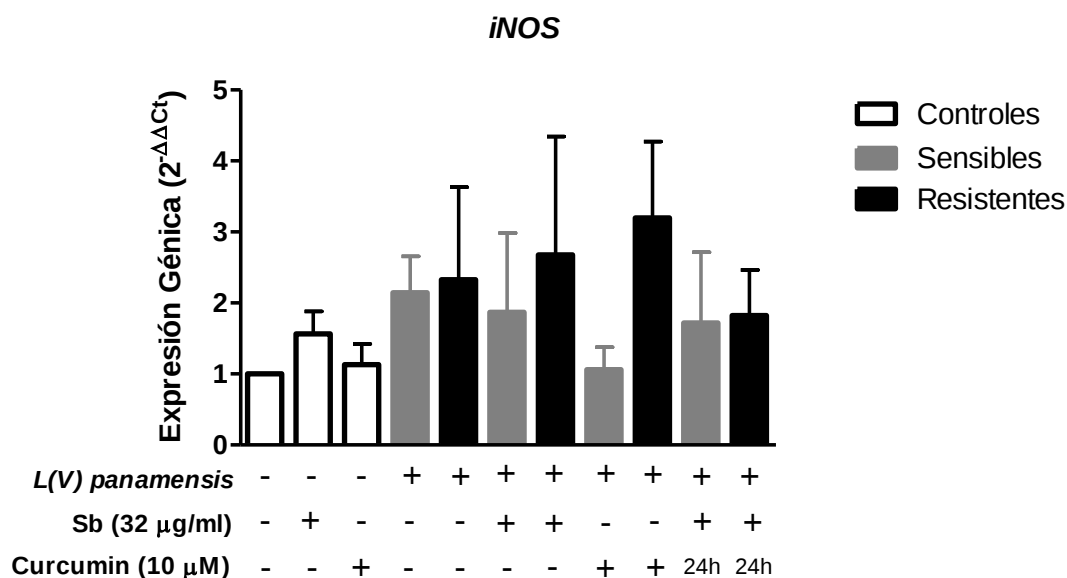


Figura 17. El efecto antileishmanial observado en la combinación de AM y curcumin no es resultado de la inducción de la enzima *iNOS*.

Los Niveles de expresión de *iNOS* se midieron en células THP-1 infectadas con *L (V) panamensis* resistentes y sensibles al AM y expuestas a AM (32 μg/ml) y curcumin (10 μM). Se determinaron los niveles de *iNOS* por qRT-PCR en 4 réplicas experimentales. En negro se observa la expresión de *iNOS* durante la infección con la línea sensible y en gris durante la infección con la línea resistente al AM. Se muestra el promedio ± error estándar.

La producción de ROS durante el tratamiento con curcumin y su efecto citotóxico en promastigotes (estadio extracelular) de *Leishmania donovani* ya ha sido reportado por otros autores (140). Evaluamos si la inducción de ROS en macrófagos THP-1, expuestos a curcumin y a AM contribuye a la muerte intracelular de amastigotes de *L. (V) panamensis* resistentes al AM.

Curcumin induce fuertemente la producción de ROS en macrófagos THP-1, en comparación con el control sin estímulo (Fig.18), mientras que la exposición a AM por sí sola induce en menor intensidad la producción de ROS. Estos hallazgos sugieren que la caída en la carga parasitaria de parásitos resistentes de *L. (V) panamensis*, con la combinación de curcumin y AM, puede ser el resultado de la inducción de la producción de especies reactivas de oxígeno a nivel intracelular.

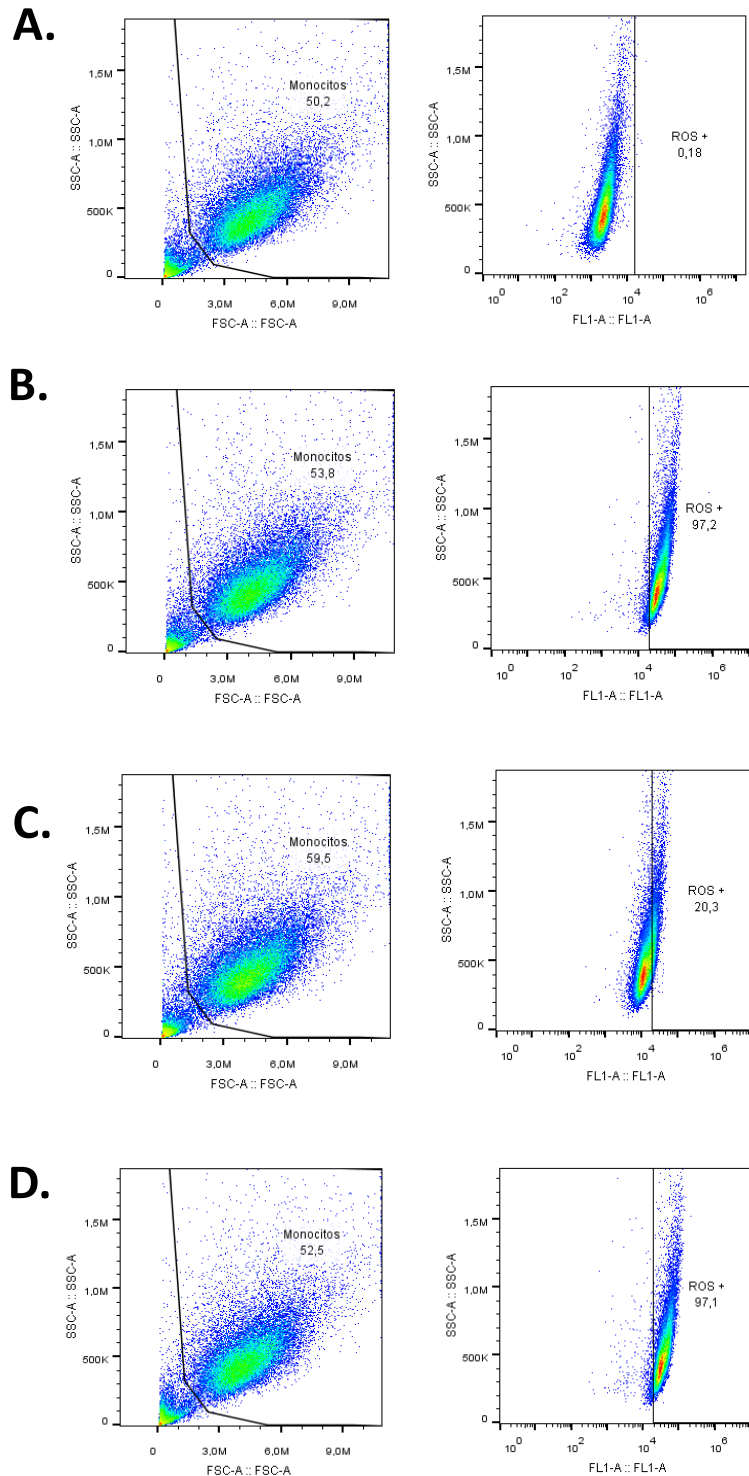


Figura 18. Curcumin por sí solo y en combinación con el antimonio de meglumina induce la producción de ROS en macrófagos humanos THP-1. Detección de ROS por citometría de flujo con el kit de fluorescencia (*CellROX Green*). Panel izquierdo: población de macrófagos. Panel derecho: población positiva para ROS intracelular. A) Control sin estímulo, B) Exposición a curcumin 10 μ M, C) Tratamiento con AM 32 μ g/ml D) Combinación de exposición a curcumin 10 μ M seguida de AM 32 μ g/ml.

Resumen de hallazgos:

- La exposición a los fármacos elacridar o apigenin en combinación con el AM, no promueven mayor eliminación intracelular de *L. (V) panamensis*.
- El pre tratamiento con curcumin seguido de la exposición al AM, favorece la disminución de la supervivencia intracelular de cepas de *L. (V) panamensis* resistente al AM.
- La menor supervivencia intracelular de *Leishmania* tras la exposición a la combinación de curcumin y AM, puede estar siendo mediada por la producción de ROS intracelular.

9. DISCUSIÓN

Una de las características que determina la supervivencia intracelular de *Leishmania spp* durante la exposición a drogas es la susceptibilidad a los fármacos antileishmaniales. Se ha reportado que diferencias en la expresión génica de transportadores y algunas enzimas del metabolismo del tripanotión, están asociadas al fenotipo de resistencia a los antimoniales en *L.donovani* (40,133). En clones generados en laboratorio de *L.donovani*, *L. tropica* y *L. infantum*, los niveles de expresión del transportador de eflujo y secuestro ABCC3 tienden a ser mayores en parásitos resistentes (62,131); mientras que los niveles de expresión del canal de internalización de antimonio AQP1 en *L.donovani* tienden a ser mayores en las cepas sensibles al AM (155).

Estos estudios emplean con frecuencia líneas de parásitos fármaco-resistentes generados en laboratorio por presión de droga, y se ha encontrado que el comportamiento entre las cepas de laboratorio y las cepas aisladas de los pacientes es diferente, esto puede limitar la correlación entre lo que se está observando *in vitro* con lo que ocurre *in vivo*, apoyando la selección de un modelo de experimentación más adecuado al momento de estudiar la susceptibilidad de *Leishmania* a los antimoniales (66,156). El modelo experimental utilizado en este proyecto, es un modelo novedoso y nos permitió recrear *ex vivo* la infección de macrófagos primarios de pacientes con LC, con cepas resistentes o sensibles de *L. (V) panamensis* aisladas de las lesiones por la que consultaron los mismos pacientes participantes del estudio. Este modelo de infección permitió identificar candidatos moleculares con participación en la respuesta inmune y farmacológica del hospedero, con potencial impacto en la supervivencia intracelular de *Leishmania*.

En un estudio comparativo de expresión génica de transportadores realizado en nuestro grupo, entre líneas control y cepas clínicas de *L (V) panamensis*, se demostró que la expresión de los transportadores *ABCC3* y *AQP1* coincidía con lo reportado en la literatura con clones seleccionados en laboratorio, sin embargo esta expresión no fue similar a la determinada en las cepas clínicas (Anexo 1). El transportador *ABCA2* fue el único transportador que presentó diferencias estadísticamente significativas en las cepas clínicas resistentes, en comparación con las cepas sensibles al AM (Anexo 1). Este transportador asociado a procesos de eflujo y detoxificación de xenobióticos podría estar participando activamente en el transporte y acumulación del fármaco, favoreciendo así la supervivencia intracelular de *Leishmania spp* (64,65). Esto ejemplifica la divergencia en el comportamiento de cepas clínicas y aquellas seleccionadas *in vitro* y apoya la evaluación y estudio de mecanismos de resistencia en cepas clínicas.

También se ha reportado que la droga y su actividad antileishmanial son dependientes de las células hospederas; fármacos como el estibogluconato de sodio, demostraron tener una mayor actividad antileishmanial en PBMCs infectados con *L.donovani*, que en las infecciones ejecutadas en macrófagos THP-1 (157).

Por tanto, la susceptibilidad intrínseca al medicamento no es la única característica que puede determinar la supervivencia intracelular del parásito, diferencias entre las especies (51) y hasta el modelo empleado de experimentación se deben tener en cuenta al momento de explorar los mecanismos que determinan la farmaco-resistencia (158). Teniendo en cuenta que *Leishmania spp* habita células del sistema fagocítico mononuclear como los macrófagos, hemos explorado si la célula hospedera participa en la distribución y acumulación del antimonio intracelular y su impacto en la actividad antileishmanial de los medicamentos.

En un estudio realizado por nuestro grupo se encontró que los niveles de expresión génica del transportador de membrana *ABCB6* y la metalotioneína 2A (*MT2A*) en macrófagos humanos, presentaban una correlación inversa con la supervivencia intracelular de parásitos sensibles de *Leishmania* (*V*) *panamensis* (5). A mayores niveles de expresión de estas moléculas se evidenció una menor supervivencia intracelular del parásito. *ABCB6* puede participar en el transporte intrafagosomal del fármaco, mientras que altos niveles de *MT2A* pueden estar promoviendo la acumulación y secuestro intracelular del antimonio (5) .

En este proyecto identificamos que el fenotipo de susceptibilidad de *L. (V) panamensis* al AM, contribuye a la modulación diferencial de *MT2A* en macrófagos humanos. Tanto en el modelo THP-1 de infección con líneas de *Leishmania* sensibles y resistentes, como en el modelo de infección de los macrófagos primarios con las cepas clínicas propias de cada paciente, se encontró que la expresión de *MT2A* tras la infección con cepas resistentes de *L. (V) panamensis*, era significativamente menor a la expresada durante la infección con cepas sensibles al AM. Esta molécula cuya función principal es la homeostasis de metales (159) podría participar en la acumulación y secuestro de la droga, por unión del antimonio a los residuos de cisteína. A menores niveles de *MT2A*, menor acumulación de antimonio y por tanto mayor supervivencia intracelular de los parásitos resistentes al AM. Sin embargo, encontramos que la modulación diferencial de esta molécula no altera la concentración intracelular del antimonio, sugiriendo que otro mecanismo independiente de la acumulación de antimoniales podría impactar la supervivencia intracelular del parásito.

Las metalotioneínas pueden ser transportadas a compartimentos intracelulares como fagolisosoma y el núcleo celular, con el fin de proteger a la célula del estrés oxidativo causado por xenobióticos (93,94). Si moléculas

de *MT2A* cargadas con antimonio, son dirigidas al fagolisosoma de una célula infectada con *Leishmania spp*, podrían liberar el antimonio al interior del fagolisosoma y permitir mayor exposición del parásito al fármaco, lo que favorecería la muerte parasitaria.

Por otra parte, la estructura primaria de las metalotioneinas está conformada por múltiples residuos de cisteína y se ha descrito que éste aminoácido tiene una fuerte actividad para reducir el Sb^V a Sb^{III} incluso mayor a la reducción generada por el glutatión (39); las metalotioneinas con sus residuos de cisteína podrían promover la reducción del antimonio y a su forma trivalente (39). Aunque no se encontraron diferencias en la concentración total intracelular de antimonio, se desconocen los niveles específicos de Sb^V y Sb^{III} ; potencialmente la alteración de la proporción de antimonio reducido intracelularmente por las metalotioneinas, es suficiente para impactar la supervivencia intracelular de *L (V) panamensis*.

A parte de unir metales pesados durante los procesos de detoxificación, las metalotioneinas son los principales reservorios de zinc a nivel intracelular (91), del cual depende la estabilización y conformación de múltiples factores de transcripción como *NF- κ B* (160) que regulan citoquinas pro inflamatorias como *IL-1 β* , *IL-6* y *TNF- α* . El zinc tiene un gran impacto tanto en la respuesta inmune innata como en la respuesta inmune adaptativa (161–163); este metal posee actividad quimio atrayente de porlimorfonucleares (PMN) durante procesos de infección (164), participa en la cascada de señalización de la formación y maduración de fagosomas (165,166), regula la producción de especies reactivas de oxígeno por NADPH (167) y promueve la producción de citoquinas pro inflamatorias como *IL-1 β* , *IL-6* y *TNF- α* , tras la activación de factores de transcripción como *NF κ B* (168,169).

La diferencia en la expresión de las metalotioneinas tiene un impacto en las concentraciones de zinc al interior celular (170); a mayores niveles de metalotioneinas, mayor concentración de zinc disponible para la activación de la respuesta inmune del hospedero (97) . En nuestros resultados identificamos una menor inducción de las metalotioneinas durante la infección con cepas resistentes de *L (V) panamensis*, lo que podría sugerir una menor inducción de procesos inflamatorios y de activación celular, potencialmente favoreciendo la supervivencia intracelular del parásito. De esta forma evaluamos los niveles de expresión de un panel de quemoquinas y citoquinas durante la infección con cepas resistentes y sensibles al AM, encontrando menores niveles de expresión de la *IL-1 β* durante la infección con cepas resistentes.

La expresión de las metalotioneinas depende tanto de la estimulación con metales y activación de factores de transcripción como el *MTF-1* (171,172) como de la regulación por glucocorticoides (173–176), interferones (177,178) y citoquinas como la *IL-1*, (179). La *IL-1* induce la biosíntesis de *MT2A* durante la respuesta inflamatoria aguda, para proteger la célula y minimizar el daño causado por radicales libres (179,180), xenobióticos y compuestos como el antimonio que pueden alterar la homeostasis de la célula. Si menores niveles de *IL-1 β* son la causa o el efecto de cambios en la expresión de *MT2A* está aún por explorar.

Un aspecto en común entre *MT2A* e *IL-1 β* , es su relación con la vía de señalización *NF κ B*. Este complejo proteico coordina la expresión de una gran variedad de genes de regulación de la respuesta inmune (181) y se ha reportado que *Leishmania spp* puede clivar este complejo mediante la metaloproteasa *GP63* (182–184). Aunque no lo hemos demostrado en este estudio, se podría especular que la expresión o función diferencial de *GP63* según el fenotipo de susceptibilidad de *Leishmania* al AM podría mediar la

activación o inactivación de *NFκB* como un mecanismo central de regulación diferencial de *IL-1β* y *MT2A*.

Otros patógenos como el virus del Papiloma (185); *Yersinia spp* (186) y *Toxoplasma gondii* (187) han desarrollado mecanismos similares de modulación en la célula hospedera y la inactivación del complejo *NFκB*, con el propósito de sobrevivir intracelularmente y perpetuar la infección.

La modulación del nicho intracelular no solo va dirigida con fines inhibitorios sino también a la sobre estimulación de moléculas involucradas en el transporte del fármaco. Investigaciones realizadas en el modelo de leishmaniasis visceral, han demostrado que la inducción de la expresión de *ABCC1/MRP1* en macrófagos humanos durante la infección con cepas de *L.donovani* resistentes, reduce la acumulación del antimonio a nivel intracelular y evita la exposición del parásito al fármaco (134).

Estos mismo autores, reportaron que el mecanismo de inducción de *ABCC1* era mediado por *IL-10* (156) y el esclarecimiento de una población de linfocitos T reguladores secretores de *IL-10* y *TGF-β*, lo que favorece la supervivencia de *Leishmania spp* (188). Del mismo modo se ha reportado que parásitos de *L. donovani* resistentes al flavonoide baicalein, estimulan la vía transcripcional *ARE-Nrf2*, importante en la regulación de la expresión génica de proteínas mediadoras de la detoxificación a xenobióticos, como la expresión de *MRP2* en la célula hospedera (189).

Estos reportes y nuestros hallazgos ejemplifican como la influencia de múltiples factores tanto intrínsecos al parásito como la célula hospedera, y el “cross-talk” de la respuesta inflamatoria con el metabolismo y transporte de fármacos, pueden modular la actividad antileishmanial de los mismos.

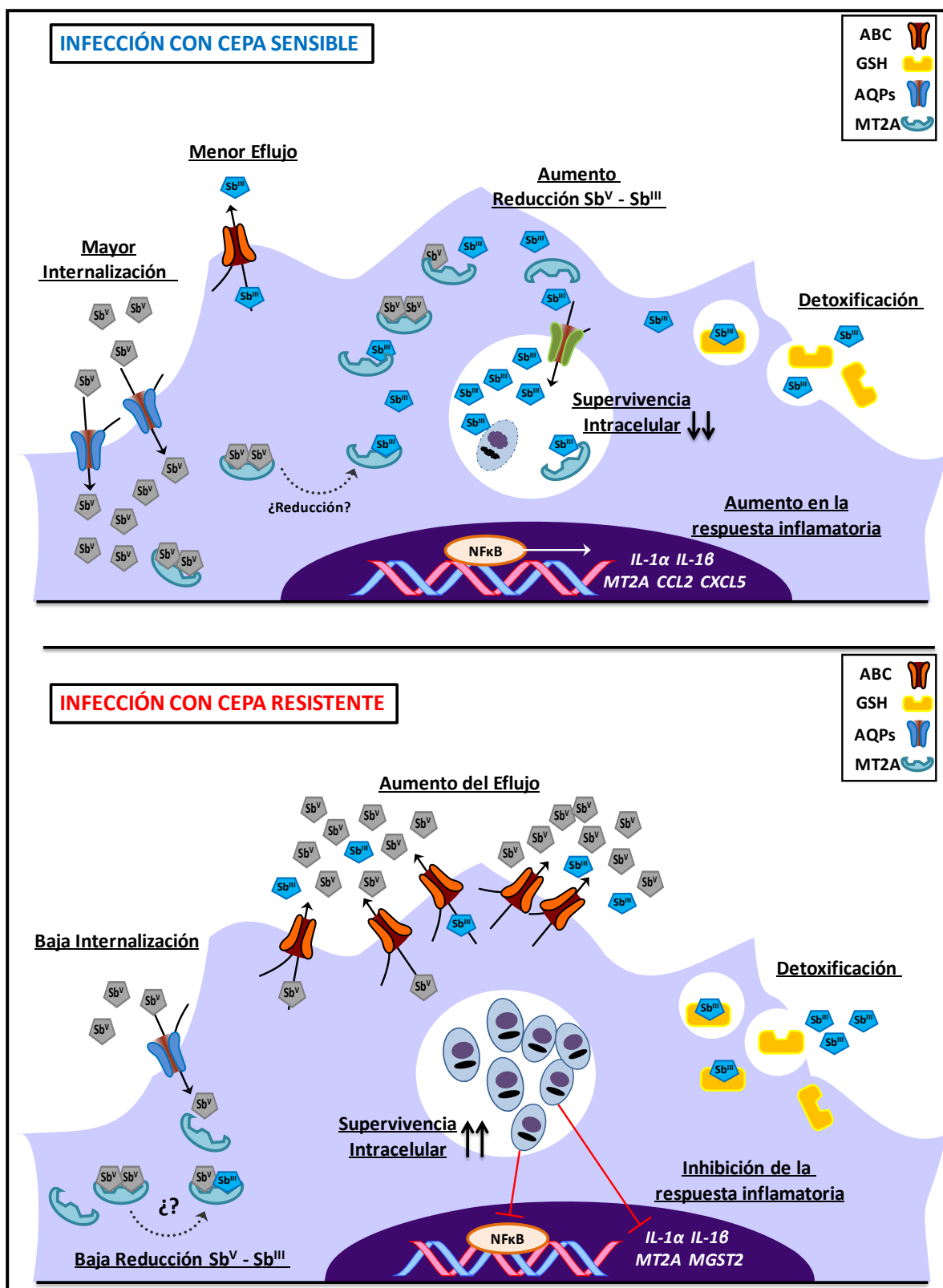


Figura 19. Efecto de la modulación de macrófagos humanos por cepas de *L (V) panamensis* resistentes y sensibles al antimonio.

Las estrategias farmacológicas modernas deben ir encaminadas no solo a intervenir moléculas blanco en los parásitos, sino también tener en cuenta al hospedero que tiene gran importancia en la distribución y efecto de la droga durante la infección. En vista de todos los retos a los que se ve sometida la terapia antileishmanial se busca identificar estrategias para optimizar las terapias mediante combinaciones entre fármacos empleados en otras patologías, compuestos naturales y las drogas de primera línea frente a la leishmaniasis (190,191). El desarrollo de combinaciones de antimoniales con miltefosina, anfotericina B, paramomicina y hasta novedosas vías de administración son algunas de las estrategias abordadas (192,193).

Investigaciones en el campo de la farmacología molecular de antimicrobianos y anti cancerígenos, han demostrado que la modulación de transportadores de membrana tiene un impacto sustancial en la acumulación intracelular de la droga y en los efectos farmacológicos de ésta (194). Compuestos como curcumin, elacridar y apigenin se han empleado en enfermedades como el cáncer (123,126,195), dirigidos a la modulación de transportadores responsables del eflujo de fármacos anti cancerígenos, con el fin de revertir la salida de la droga y evitar la resistencia (75,196). Nuestra investigación se ha beneficiado de ese conocimiento y exploramos aplicar estos conceptos al tratamiento contra la leishmaniasis cutánea.

En este estudio demostramos que curcumin en combinación con el antimonio de meglumina reducen la supervivencia intracelular de *L. (V) panamensis* resistente. La exposición individual al compuesto curcumin no promueve reducción en la supervivencia intracelular del parásito. Sin embargo el pre tratamiento durante 24 horas con curcumin seguido del AM, redujo en más de un 50% la supervivencia intracelular de *L. (V) panamensis* resistente. Con éste compuesto en combinación con el AM, se logró revertir

el fenotipo de resistencia del parásito mediante la modulación de la célula hospedera.

Ras et al, han reportado el efecto antileishmanial dosis dependiente de curcumin sobre líneas control de *L.donovani* (140). Otros reportes han demostrado el poder antileishmanial de curcumin en promastigotes de *L. tropica* , *L.major* y *L. infantum* (142,197) , sin embargo durante estos estudios no se tuvo en cuenta el fenotipo de susceptibilidad de las cepas y las evaluaciones se llevaron a cabo en la forma extracelular de promastigote. Se ha reportado que tanto el perfil de expresión génica como la expresión de las proteínas es diferente para cada estadio celular de *Leishmania* (158). Adicionalmente en ese estudio la actividad principal de curcumin iba dirigida contra el parásito y no como modulador de la célula hospedera.

Nuestros hallazgos demuestran la efectividad de curcumin sobre cepas del nuevo mundo con fenotipo de resistencia. También hemos demostrado que la combinación de curcumin con antimonio, es efectiva en la reducción de cargas parasitarias durante infecciones in vitro con cepas clínicas resistentes a AM.

A pesar de los reportes sobre curcumin como un efectivo agente inhibidor de transportadores de eflujo (120), no evidenciamos diferencias en la acumulación intracelular del antimonio. No obstante hemos encontrado que el tratamiento con este compuesto induce fuertemente la producción de ROS intracelular en los macrófagos humanos. Se ha reportado previamente la inducción de muerte celular por apoptosis de promastigotes de *L.donovani*, posterior a la generación de ROS en el parásito (140), en la misma media nuestros hallazgos postulan que la generación de ROS puede darse no solo en el parásito sino también en la célula hospedera favoreciendo la muerte parasitaria.

La cúrcuma posee múltiples propiedades antiinflamatorias, antioxidantes, anti cancerígenas y antimicrobianas (118,198–200). Sin embargo todas estas funciones se ven condicionadas a las dosis empleadas del compuesto y los diferentes modelos celulares en los que se ha evaluado (117,138). Curcumin al igual que otros antioxidantes biológicos pueden generar un ambiente pro oxidante si son suministrados en presencia de metales (201), estos estados de oxidación generan la degradación del DNA lo que conduce a la muerte de la célula; la combinación de curcumin con el AM en nuestros experimentos generó mayor muerte parasitaria de cepas resistentes al AM, que la exposición individual a estos compuestos, lo que podría sugerir que el efecto microbicida observado pudo ser mediado por aumento en la oxidación al interior celular. También se ha dicho que la formación de estas especies reactivas de oxígeno posterior al tratamiento con curcumin, pueden oxidar agentes antioxidantes como el glutatión alterando el balance oxido redox celular (201).

Aunque no es claro cuál es el mecanismo por el cual curcumin promueve la muerte parasitaria de *L(V) panamensis* resistente al AM, su efecto en la reversión del fenotipo de resistencia le convierte en un potencial candidato para futuras investigaciones como co-terapia para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.

Los fármacos elacridar y el apigenin no mostraron actividad en la reducción en la supervivencia intracelular de *L. (V) panamensis*. Se ha reportado que el compuesto apigenin tiene un efecto antileishmanial mediado por la generación de ROS; esto se ha comprobado tanto en la forma de promastigote como en amastigotes intracelulares de *Leishmania amazonensis* (141,202,203). En nuestro estudio no se observó ningún efecto antiparasitario sobre *L(V) panamensis*, ni suministrado individualmente ni en combinación con el AM.

El objetivo de uso de apigenin en el presente proyecto iba dirigido a modular los transportadores de membrana en la célula hospedera con el fin de aumentar la concentración intracelular de AM, por ende la dosis empleada de apigenin, se seleccionó de acuerdo a los niveles de citotoxicidad en el modelo experimental de macrófagos humanos THP-1. Según Fonseca-Silva et al 2015, el tratamiento durante 24 horas con 96 μ M de apigenin inhibió en un 75% la proliferación de promastigotes de *L.amazonensis* (141), mientras que la concentración sub citotóxica para macrófagos en nuestro estudio fue de 10 μ M. Recientemente se ha reportado el uso de este compuesto como antileishmanial *in vivo*; ratones BALB/c fueron infectados con cepas de *L.amazonensis* y tratados con el compuesto apigenin vía oral, demostrando que la bio disponibilidad del fármaco logró reducir las cargas parasitarias sin alterar los marcadores plasmáticos de toxicidad (202).

En contraste con los reportes anteriores, el efecto que observamos durante el tratamiento con apigenin, fue la estimulación en el crecimiento de las cepas de *L(V) panamensis*. Apigenin se ha asociado con la depleción del glutatión intracelular por transportadores como *MRP1* (127,204); conjugados entre el antimonio y el glutatión podrían ser expulsados de la célula hospedera por este mecanismo, evitando la exposición intracelular del parásito a la droga, favoreciendo la supervivencia y replicación de *L(V) panamensis*.

En cuanto al fármaco elacridar se ha reportado que puede revertir el fenotipo de resistencia al miltefosine en parásitos de *L.tropica* , mediante la inhibición del transportador *LtrMDR1* en el parásito (205). Sin embargo el uso como modulador de moléculas en la célula hospedera durante las infecciones con *Leishmania (V) panamensis*, no había sido descrito hasta el presente estudio. Aunque este compuesto tiene una fuerte actividad inhibitoria de transportadores de eflujo, no observamos ningún efecto adictivo a la actividad de AM durante las evaluaciones de supervivencia intracelular de *L*

(V) *panamensis*. De igual forma que en los experimentos con apigenin, observamos un aumento en la población parasitaria y se desconoce el mecanismo por el cual este fenómeno se presenta.

El empleo de fármacos dirigidos a la modulación de la célula hospedera y a la eliminación del parásito, pueden prevenir el desarrollo de resistencia al fármaco convencional , facilitando el aprovechamiento de las drogas disponibles y la formulación de nuevas combinaciones terapéuticas que representen menor citotoxicidad y generen menores efectos adversos en los pacientes.

En conjunto, los resultados de nuestro estudio permitieron identificar que el fenotipo de susceptibilidad de las cepas de *Leishmania (V) panamensis* puede diferencialmente regular procesos de la respuesta inflamatoria y mecanismos de transporte, metabolismo y acumulación en la célula hospedera. La capacidad de modulación del nicho intracelular puede ser catalogada como un nuevo mecanismo de resistencia a los fármacos antileishmaniales. En línea con estas observaciones, evidenciamos que la resistencia puede ser revertida mediante el uso de co-terapias dirigidas al hospedero.

A futuro buscamos esclarecer los posibles mecanismos por los cuales las cepas de *L. (V) panamensis* resistentes al AM pueden modular el nicho intracelular para sobrevivir y los mecanismos que gobiernan la reversión de resistencia durante la exposición a la combinación de curcumin y el AM.

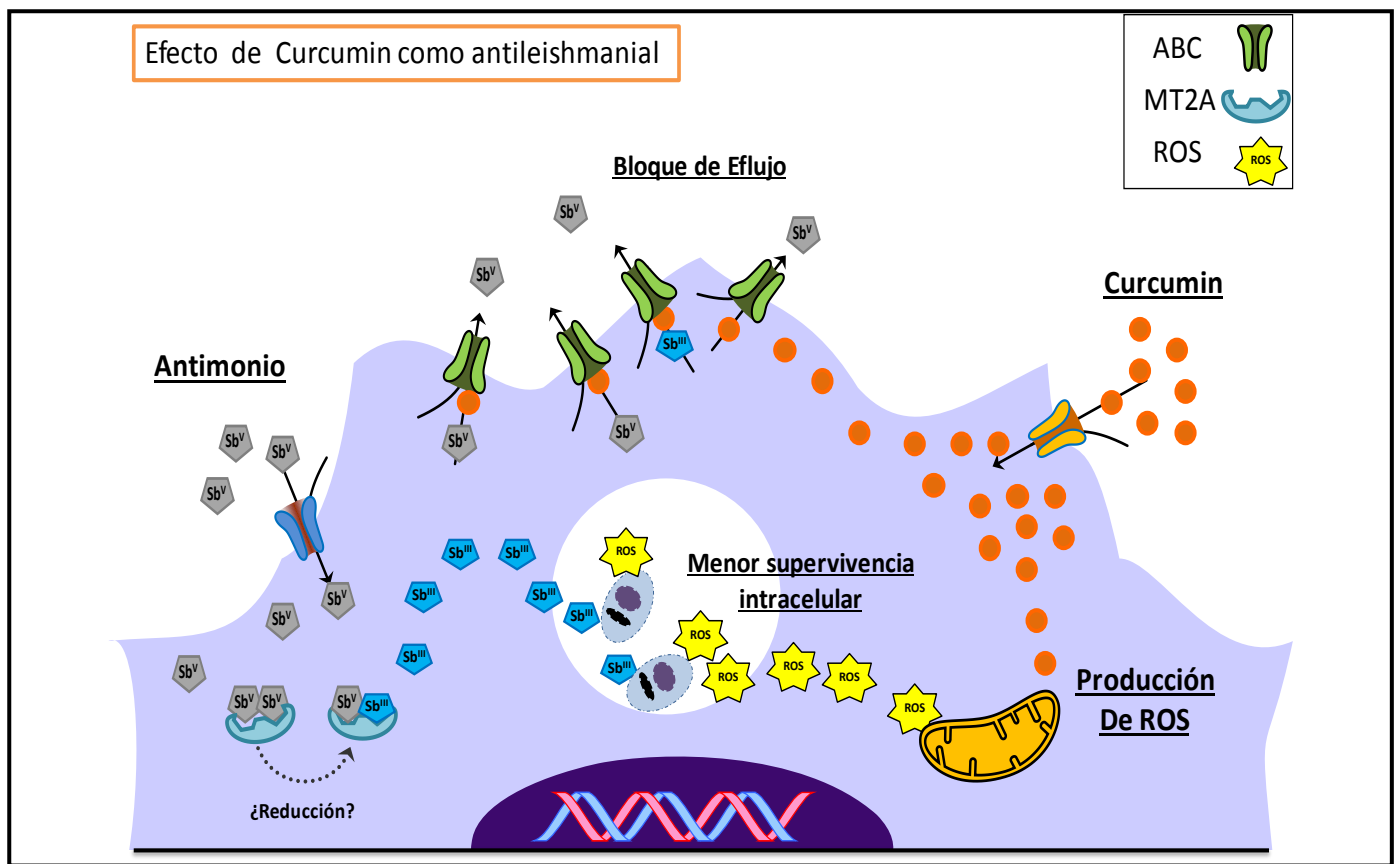


Figura 20. Efecto de curcumin como antileishmanial en el macrófago infectado con *L* (V) *panamensis*.

10. CONCLUSIONES

En este estudio se evidenció que el fenotipo de susceptibilidad de *L. (V) panamensis* al AM contribuye a la modulación diferencial de moléculas con potencial función en el metabolismo y acumulación de la droga como *MT2A* y de la respuesta inmune del hospedero como *IL-1 β* .

La actividad de fármacos antileishmaniales está influenciada por factores intrínsecos del parásito y de la célula hospedera. Por lo tanto, el diseño de modernas estrategias farmacológicas debe ir dirigidas no solo a moléculas blanco en los microorganismos, sino también a la modulación del hospedero para favorecer la eliminación parasitaria.

La combinación de curcumin con el AM logró revertir parcialmente el fenotipo de resistencia de líneas de laboratorio y de cepas clínicas de *L. (V) panamensis*, demostrando su potencial uso como co-terapia para la leishmaniasis cutánea.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. World Health Organization. Tech Rep Ser. The Leishmaniasis. Report of a WHO Expert Committee. 1984.
2. Lira R, Sundar S, Makharia a, Kenney R, Gam a, Saraiva E, et al. Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. J Infect Dis. 1999;180(2):564–7.
3. Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M, Saravia NG. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. J Infect Dis. 2006;193(10):1375–83.
4. Ouellette M, Drummelsmith J, Papadopoulos B. Leishmaniasis: Drugs in the clinic, resistance and new developments. Drug Resist Updat. 2004;7(4-5):257–66.
5. Gómez MA, Navas A, Márquez R, Rojas LJ, Vargas DA, Blanco VM, et al. *Leishmania panamensis* infection and antimonial drugs modulate expression of macrophage drug transporters and metabolizing enzymes: Impact on intracellular parasite survival. J Antimicrob Chemother. 2014;69(1):139–49.
6. Jalil YA, Ritz V, Jakimenko A, Schmitz-Salue C, Siebert H, Awuah D, et al. Vesicular localization of the rat ATP-binding cassette half-transporter *rAbcb6*. Am J Physiol Cell Physiol. 2008;294(2):C579–90.
7. Paterson JK, Shukla S, Black CM, Tachiwada T, Garfield S, Wincovitch S, et al. Human *ABCB6* localizes to both the outer mitochondrial membrane and the plasma membrane. Biochemistry. 2007;46(33):9443–52.
8. Basu JM, Mookerjee A, Banerjee R, Saha M, Singh S, Naskar K, et al. Inhibition of ABC transporters abolishes antimony resistance in *Leishmania* infection. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(3):1080–93.
9. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug Resistance in Leishmaniasis. Society. 2006;19(1).
10. García-Hernández R, Gómez-Pérez V, Castanys S, Gamarro F. Fitness of *Leishmania donovani* Parasites Resistant to Drug Combinations. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(4):e0003704.
11. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 2004;27(5):305–18.
12. Bañuls A-L, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the Leishmaniasis: A

Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. 2007;1–458.

13. Desjeux P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2001;95(3):239–43.
14. Saravia NG, Segura I, Holguin AF, Santrich C, Valderrama L, Ocampo C. Epidemiologic, genetic, and clinical associations among phenotypically distinct populations of *Leishmania (Viannia)* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;59(1):86–94.
15. Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* 2012;7(5).
16. Organización panamericana de la salud. Informe Leishmaniasis N°1; Leishmaniasis - Informe epidemiológico de las Américas. 2013;1–4.
17. Instituto Nacional De Salud/ SIVIGILA. Vigilancia Rutinaria por Eventos Departamental a Semana 52 2015. Vigilancia y Análisis de Riesgo en Salud Pública. 2015.
18. Belkaid Y, Mendez S, Lira R, Milon G, Sacks D. A Natural Model of *Leishmania major* Infection Reveals a Prolonged Silent" Phase of Parasite Amplification in the Skin Before the Onset of Lesion Formation and Immunity. *J Immunol.* 2000;(165):969–77.
19. Laskay T, Van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* 2003;11(5):210–4.
20. Rodríguez-Barraquer I, Góngora R, Prager M, Pacheco R, Montero LM, Navas A, et al. Etiologic agent of an epidemic of cutaneous leishmaniasis in Tolima, Colombia. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;78(2):276–82.
21. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 2005;366(9496):1561–77.
22. Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet.* 1999;354(9185):1191–9.
23. WHO. Leishmaniasis. Nota Descriptiva. 2015. p. 375.
24. (CDC) C for DC and P. Parasites - Leishmaniasis. Resources for Health Professionals. 2015. p. Disease.
25. Goto H, Lindoso J a L. Immunity and immunosuppression in experimental visceral leishmaniasis. *Brazilian J Med Biol Res.* 2004;37(4):615–23.
26. Aït-Oudhia K, Gazanion E, Vergnes B, Oury B, Sereno D. *Leishmania*

- antimony resistance: what we know what we can learn from the field. *Parasitol Res.* 2011;109(5):1225–32.
27. Sundar S, Chakravarty J. Antimony Toxicity. *Int J Environ Res Public Health.* 2010;7(12):4267–77.
 28. Organización Paramericana de la Salud. Leishmaniasis en las Américas. Recomendaciones para el tratamiento. OPS. 2013. 60 p.
 29. Sundar S, Chakravarty J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother.* 2013;14(1):53–63.
 30. Soto J, Toledo J, Vega J, Berman J. Short report: Efficacy of pentavalent antimony for treatment of Colombian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72(4):421–2.
 31. Vélez I, López L, Sánchez X, Mestra L, Rojas C, Rodríguez E. Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 2010;83(2):351–6.
 32. Alvar J, Croft S, Olliaro P. Chemotherapy in the Treatment and Control of Leishmaniasis. 2006;61(05):223–74.
 33. Reithinger R, Mohsen M, Wahid M, Bismullah M, Quinnell RJ, Davies CR, et al. Efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in Kabul, Afghanistan: a randomized, controlled trial. *Clin Infect Dis.* 2005;40(8):1148–55.
 34. Organización Mundial de la Salud. OMS. Centro de especialistas. Control de la leishmaniasis. Ser Inf técnicos. 2010;949.
 35. González U, Pinart M, Reveiz L, Rengifo-Pardo M, Tweed J, Macaya A, et al. Designing and Reporting Clinical Trials on Treatments for Cutaneous Leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 2010;51(4):409–19.
 36. Mitropoulos P, Konidas P, Durkin-Konidas M. New World cutaneous leishmaniasis: Updated review of current and future diagnosis and treatment. *J Am Acad Dermatol.* Elsevier Inc; 2010;63(2):309–22.
 37. Frézard F, Demicheli C, Ferreira CS, Costa M a P. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(3):913–6.
 38. Roberts WL, Berman JD, Rainey PM. In vitro antileishmanial properties of tri- and pentavalent antimonial preparations. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39(6):1234–9.
 39. Dos Santos Ferreira C, Silveira Martins P, Demicheli C, Brochu C, Ouellette M, Frézard F. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): A comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *BioMetals.* 2003;16(3):441–6.

40. Mukherjee A, Padmanabhan PK, Singh S, Roy G, Girard I, Chatterjee M, et al. Role of ABC transporter *MRPA*, γ -glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother*. 2007;59(2):204–11.
41. Shaked-Mishan P, Ulrich N, Ephros M, Zilberstein D. Novel Intracellular SbV Reducing Activity Correlates with Antimony Susceptibility in *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*. 2001;276(6):3971–6.
42. Cunningham ML, Fairlamb a. H. Trypanothione reductase from *Leishmania donovani* - Purification, characterisation and inhibition by trivalent antimonials. *Eur J Biochem*. 1995;230(2):460–8.
43. Berman JD, Gallalee J V, Best JM. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem Pharmacol*. 1987;36(2):197–201.
44. Berman JD, Waddel D, Hanson BD. Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1985;27(6):916–20.
45. Berman JD, Gallalee J V, Best JM, Hill T. Uptake, distribution, and oxidation of fatty acids by *Leishmania mexicana* amastigotes. *J Parasitol*. 1987;73(3):555–60.
46. Sereno D, Holzmüller P, Mangot I, Cuny G, Ouassiss A, Lemesre J-L. Antimonial-Mediated DNA Fragmentation in *Leishmania infantum* Amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45(7):2064–9.
47. Sudhandiran G, Shaha C. Antimonial-induced Increase in Intracellular Ca²⁺ through Non-selective Cation Channels in the Host and the Parasite Is Responsible for Apoptosis of Intracellular *Leishmania donovani* Amastigotes. *J Biol Chem*. 2003;278(27):25120–32.
48. Dube A, Singh N, Sundar S, Singh N. Refractoriness to the treatment of sodium stibogluconate in Indian kala-azar field isolates persist in in vitro and in vivo experimental models. *Parasitol Res*. 2005;96:216–23.
49. Bora D. Epidemiology of visceral leishmaniasis in India. *Natl Med J India*. 1999;12(2):62–8.
50. Croft SL. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. *Trop Med Int Health*. 2001;6(11):899–905.
51. Fernández OL, Diaz-Toro Y, Ovalle C, Valderrama L, Muvdi S, Rodríguez I, et al. Miltefosine and Antimonial Drug Susceptibility of *Leishmania Viannia* Species and Populations in Regions of High Transmission in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(5).

52. Singh N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. Indian J Med Res. 2006;123(March):411–22.
53. Ouellette M, Légaré D. ABC Proteins [Internet]. ABC Proteins. Elsevier; 2003 [cited 2015 Jul 28]. 317-333 p.
54. Mandal S, Maharjan M, Singh S, Chatterjee M, Madhubala R. Assessing aquaglyceroporin gene status and expression profile in antimony-susceptible and -resistant clinical isolates of *Leishmania donovani* from India. J Antimicrob Chemother. 2010;65(3):496–507.
55. Rees DC, Johnson E, Lewinson O. ABC transporters: the power to change. Nat Rev Mol Cell Biol. 2009;10(3):218–27.
56. López-Marqués RL, Poulsen LR, Bailly A, Geisler M, Pomorski TG, Palmgren MG. Structure and mechanism of ATP-dependent phospholipid transporters. Biochim Biophys Acta. Elsevier B.V.; 2014;
57. Schneider E, Hunke S. ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolysing subunits/domains. FEMS Microbiol Rev. 1998;22:22 (1): 1–20.
58. Pérez-Victoria JM, Torres APTC, Gamarro F, Castanys S. ABC transporters in the protozoan parasite *Leishmania*. Int Microbiol. 2001;4(3):159–66.
59. Légaré D, Cayer S, Singh AK, Richard D, Papadopolou B, Ouellette M. ABC proteins of *Leishmania*. J Bioenerg Biomembr. 2001;33(6):469–74.
60. Sauvage V, Aubert D, Escotte-Binet S, Villena I. The role of ATP-binding cassette (ABC) proteins in protozoan parasites. Mol Biochem Parasitol. 2009;167(2):81–94.
61. Leprohon P, Légaré D, Girard I, Papadopolou B, Ouellette M. Modulation of *Leishmania* ABC protein gene expression through life stages and among drug-resistant parasites. Eukaryot Cell. 2006;5(10):1713–25.
62. Parodi-Talice A, Araújo JM, Torres C, Pérez-Victoria JM, Gamarro F, Castanys S. The overexpression of a new ABC transporter in *Leishmania* is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity. Biochim Biophys Acta - Biomembr. 2003;1612(2):195–207.
63. Obonaga R, Fernández OL, Valderrama L, Rubiano LC, Castro MDM, Barrera MC, et al. Treatment failure and miltefosine susceptibility in dermal leishmaniasis caused by *leishmania* subgenus *viannia* species. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(1):144–52.
64. Araújo-Santos JM, Parodi-Talice A, Castanys S, Gamarro F. The

- overexpression of an intracellular ABCA-like transporter alters phospholipid trafficking in *Leishmania*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;330(1):349–55.
65. Torres C, Pérez-Victoria FJ, Parodi-Talice A, Castanys S, Gamarro F. Characterization of an ABCA-like transporter involved in vesicular trafficking in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol*. 2004;54(3):632–46.
 66. Goyeneche-Patino DA, Valderrama L, Walker J, Saravia NG. Antimony Resistance and Trypanothione in Experimentally Selected and Clinical Strains of *Leishmania panamensis*. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2008;52(12):4503–6.
 67. Leprohon P, Légaré D, Ouellette M. Intracellular localization of the ABCC proteins of *Leishmania* and their role in resistance to antimonials. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009;53(6):2646–9.
 68. Campos-Salinas J, Cabello-Donayre M, García-Hernández R, Pérez-Victoria I, Castanys S, Gamarro F, et al. A new ATP-binding cassette protein is involved in intracellular haem trafficking in *Leishmania*. *Mol Microbiol*. 2011;79(6):1430–44.
 69. Decuypere S, Rijal S, Yardley V, De Doncker S, Laurent T, Khanal B, et al. Gene expression analysis of the mechanism of natural Sb (V) resistance in *Leishmania donovani* isolates from Nepal. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(11):4616.
 70. Saurin W, Hofnung M, Dassa E. Getting in or out: Early segregation between importers and exporters in the evolution of ATP-binding cassette (ABC) transporters. *J Mol Evol*. 1999;48(1):22–41.
 71. Nigam SK. What do drug transporters really do? *Nat Rev Drug Discov*. Nature Publishing Group; 2014;14(1):29–44.
 72. Fletcher JI, Haber M, Henderson MJ, Norris MD. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer*. Nature Publishing Group; 2010;10(2):147–56.
 73. Allikmets R, Gerrard B, Hutchinson a, Dean M. Characterization of the human ABC superfamily: isolation and mapping of 21 new genes using the expressed sequence tags database. *Hum Mol Genet*. 1996;5(10):1649–55.
 74. Vasiliou V, Vasiliou K, Nebert DW. Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family. *Hum Genomics*. 2009;3(3):281–90.
 75. Szakács G, Paterson JK, Ludwig J a, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(3):219–34.

76. Coleman J a., Quazi F, Molday RS. Mammalian *P4-ATPases* and *ABC* transporters and their role in phospholipid transport. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Biol Lipids*. Elsevier B.V.; 2013;1831(3):555–74.
77. Moitra K, Dean M. Evolution of *ABC* transporters by gene duplication and their role in human disease. *Biol Chem*. 2011;392(July 2010):29–37.
78. Bruhn O, Cascorbi I. Polymorphisms of the drug *ABCC2* and *ABCC3* and their impact on drug bioavailability and clinical relevance. 2014;1–18.
79. Zhang C, Li D, Zhang J, Chen X, Huang M, Archacki S, et al. Mutations in *ABCB6* cause dyschromatosis universalis hereditaria. *J Invest Dermatol*. Nature Publishing Group; 2013;133(9):2221–8.
80. Westerterp M, Bochem AE, Yvan-Charvet L, Murphy AJ, Wang N, Tall AR. ATP-binding cassette transporters, atherosclerosis, and inflammation. *Circ Res*. 2014;114(1):157–70.
81. Sarkadi B, Homolya L, Szakács G, Váradi A. Human multidrug resistance *ABCB* and *ABCG* transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev*. 2006;86(4):1179–236.
82. Silverton L, Dean M, Moitra K. Variation and evolution of the *ABC* transporter genes *ABCB1*, *ABCC1*, *ABCG2*, *ABCG5* and *ABCG8*: implication for pharmacogenetics and disease. *Drug Metabol Drug Interact*. 2011;26(4):169–79.
83. Porro A, Haber M, Diolaiti D, Iraci N, Henderson M, Gherardi S, et al. Direct and coordinate regulation of ATP-binding cassette transporter genes by *Myc* factors generates specific transcription signatures that significantly affect the chemoresistance phenotype of cancer cells. *J Biol Chem*. 2010;285(25):19532–43.
84. Chavan H, Oruganti M, Krishnamurthy P. The ATP-binding cassette transporter *ABCB6* is induced by arsenic and protects against arsenic cytotoxicity. *Toxicol Sci*. 2011;120(2):519–28.
85. Tsuchida M, Emi Y, Kida Y, Sakaguchi M. Human *ABC* transporter isoform B6 (*ABCB6*) localizes primarily in the Golgi apparatus. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;369(2):369–75.
86. Della Valle MC, Sleat DE, Zheng H, Moore DF, Jadot M, Lobel P. Classification of subcellular location by comparative proteomic analysis of native and density-shifted lysosomes. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10(4):M110.006403.
87. Chavan H, Khan MMT, Tegos G, Krishnamurthy P. Efficient purification and reconstitution of ATP binding cassette transporter B6 (*ABCB6*) for

- functional and structural studies. *J Biol Chem*. 2013;288(31):22658–69.
88. Krishnamurthy PC, Du G, Fukuda Y, Sun D, Sampath J, Mercer KE, et al. Identification of a mammalian mitochondrial porphyrin transporter. *Nature*. 2006;443(7111):586–9.
 89. Babula P, Masarik M, Adam V, Eckschlager T, Stiborova M, Trnkova L, et al. Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics*. 2012;4(8):739.
 90. Nielson KB, Atkin CL, Winge DR. Distinct metal-binding configurations in metallothionein. *J Biol Chem*. 1985;260(9):5342–50.
 91. Bell SG, Vallee BL. The Metallothionein/thionein system: An oxidoreductive metabolic zinc link. *ChemBioChem*. 2009;10(1):55–62.
 92. Sabolić I, Breljak D, Škarica M, Herak-Kramberger CM. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *BioMetals* [Internet]. 2010;23(5):897–926.
 93. Takahashi Y, Ogra Y, Suzuki KT. Nuclear trafficking of metallothionein requires oxidation of a cytosolic partner. *J Cell Physiol*. 2005;202(2):563–9.
 94. Futakawa N, Kondoh M, Ueda S, Higashimoto M, Takiguchi M, Suzuki S, et al. Involvement of oxidative stress in the synthesis of metallothionein induced by mitochondrial inhibitors. *Biol Pharm Bull*. 2006;29(10):2016–20.
 95. Lee S-J, Koh J-Y. Roles of zinc and metallothionein-3 in oxidative stress-induced lysosomal dysfunction, cell death, and autophagy in neurons and astrocytes. *Mol Brain*. BioMed Central Ltd; 2010;3(1):30.
 96. Murakami M, Hirano T. Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling. 2008;99(8):1515–22.
 97. Haase H, Rink L. Functional Significance of Zinc-Related Signaling Pathways in Immune Cells. 2009;
 98. Maret W. Molecular aspects of human cellular zinc homeostasis: Redox control of zinc potentials and zinc signals. *BioMetals*. 2009;22(1):149–57.
 99. Mocchegiani E, Muzzioli M, Giacconi R. Zinc and immunoresistance to infection in aging: New biological tools. *Trends Pharmacol Sci*. 2000;21(June):205–8.
 100. Rink L, Haase H. Zinc homeostasis and immunity. *Trends Immunol*. 2007;28(1):1–4.
 101. Lazo JS, Kuo SM, Woo ES, Pitt BR. The protein thiol metallothionein as

- an antioxidant and protectant against antineoplastic drugs. *Chem Biol Interact* [Internet]. 1998;111-112:255–62.
102. Suzuki T, Ohata S, Togawa T, Himeno S, Tanabe S, February R, et al. Arsenic accumulation decreased in metallothionein. 2007;32(3):321–8.
 103. Thirumoorthy N, Shyam Sunder a, Manisenthil Kumar K, Senthil Kumar M, Ganesh G, Chatterjee M. A review of Metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J Surg Oncol* [Internet]. BioMed Central Ltd; 2011;9(1):54.
 104. Bourdineaud J-P, Baudrimont M, Gonzalez P, Moreau J-L. Challenging the model for induction of metallothionein gene expression. *Biochimie* [Internet]. 2006;88(11):1787–92.
 105. Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. Cellular and Molecular Life Sciences Metallothionein : The multipurpose protein. 2002;59:627–47.
 106. Nakagawa I, Suzuki M, Imura N, Naganuma A. Involvement of oxidative stress in paraquat-induced metallothionein synthesis under glutathione depletion. *Free Radic Biol Med*. 1998;24(9):1390–5.
 107. Yoshida M, Saegusa Y, Fukuda A, Akama Y, Owada S. Measurement of radical-scavenging ability in hepatic metallothionein of rat using in vivo electron spin resonance spectroscopy. *Toxicology*. 2005;213(1-2):74–80.
 108. Lushchak VI. Glutathione Homeostasis and Functions: Potential Targets for Medical Interventions. *J Amino Acids*. 2012;2012:1–26.
 109. Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione Transferases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2005;45(1):51–88.
 110. Pajaud J, Kumar S, Rauch C, Morel F, Aninat C. Regulation of signal transduction by glutathione transferases. *Int J Hepatol* [Internet]. 2012;2012:137676.
 111. Handman E. Leishmaniasis : Current Status of Vaccine Development
Leishmaniasis : Current Status of Vaccine Development. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(2):229–43.
 112. Coler RN, Reed SG. Second-generation vaccines against leishmaniasis. *Trends Parasitol* [Internet]. 2005;21(5):244–9.
 113. Akhtar N, Ahad A, Khar RK, Jaggi M, Aqil M, Iqbal Z, et al. The emerging role of *P-glycoprotein* inhibitors in drug delivery: a patent review. *Expert Opin Ther Pat* [Internet]. 2011;21(4):561–76.
 114. Duvoix A, Blasius R, Delhalle S, Schnekenburger M, Morceau F, Henry E, et al. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin. *Cancer Lett*. 2005;223:181–90.

115. Sharma R a., Gescher a. J, Steward WP. Curcumin: The story so far. *Eur J Cancer*. 2005;41:1955–68.
116. Ruela-de-Sousa RR, Fuhler GM, Blom N, Ferreira C V, Aoyama H, Peppelenbosch MP. Cytotoxicity of apigenin on leukemia cell lines: implications for prevention and therapy. *Cell Death Dis* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010;1(1):e19.
117. Goel A, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. *Biochem Pharmacol*. 2008;75:787–809.
118. Maheshwari RK, Singh AK, Gaddipati J, Srimal RC. Multiple biological activities of curcumin: A short review. *Life Sci* [Internet]. Elsevier B.V.; 2006;78(18):2081–7.
119. Zhang X, Chen Q, Wang Y, Peng W, Cai H. Effects of curcumin on ion channels and transporters. *Front Physiol*. 2014;5 MAR(March):1–6.
120. Limtrakul P. Curcumin as chemosensitizer. *Adv Exp Med Biol*. 2007;595:269–300.
121. Kusuvara H, Furuie H, Inano A, Sunagawa A, Yamada S, Wu C, et al. Pharmacokinetic interaction study of sulphasalazine in healthy subjects and the impact of curcumin as an in vivo inhibitor of *BCRP*. *Br J Pharmacol*. 2012;166:1793–803.
122. Sato H, Siddig S, Uzu M, Suzuki S, Nomura Y, Kashiba T, et al. Elacridar enhances the cytotoxic effects of sunitinib and prevents multidrug resistance in renal carcinoma cells. *Eur J Pharmacol*. Elsevier; 2015;746:258–66.
123. De Bruin M, Miyake K, Litman T, Robey R, Bates SE. Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR. *Cancer Lett*. 1999;146(2):117–26.
124. Shukla S, Wu C-P, Ambudkar S V. Development of inhibitors of ATP-binding cassette drug transporters: present status and challenges. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008;4(2):205–23.
125. Kuppens IELM, Witteveen EO, Jewell RC, Radema S a., Paul EM, Mangum SG, et al. A phase I, randomized, open-label, parallel-cohort, dose-finding study of elacridar (GF120918) and oral topotecan in cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2007;13(11):3276–85.
126. Saeed M, Kadioglu O, Khalid H, Sugimoto Y, Efferth T. Activity of the dietary flavonoid, apigenin, against multidrug-resistant tumor cells as determined by pharmacogenomics and molecular docking. *J Nutr Biochem*. Elsevier Inc.; 2015;26(1):44–56.
127. Kachadourian R. Flavonoid-induced glutathione depletion: Potencial

- implications for cancer treatment. *Free Radic Biol Med*. 2014;41(1):65–76.
128. Middleton E, Kandaswami C, Theoharides TC. The Effects of Plant Flavonoids on Mammalian Cells : Implications for Inflammation , Heart Disease ,. 2000;52(4):673–751.
 129. Ouellette M, Légaré D, Papadopoulou B. Multidrug Resistance and ABC Transporters in Parasitic Protozoa. *J Mol Microbiol Biotechnol* [Internet]. 2001;3(2):201–6.
 130. Moreira DS, Monte Neto RL, Andrade JM, Santi AMM, Reis PG, Frézard F, et al. Molecular characterization of the *MRPA* transporter and antimony uptake in four New World *Leishmania spp.* susceptible and resistant to antimony. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* [Internet]. Australian Society for Parasitology; 2013;3:143–53.
 131. El Fadili K, Messier N, Leprohon P, Roy G, Guimond C, Trudel N, et al. Role of the ABC transporter *MRPA* (*PGPA*) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(5):1988–93.
 132. Leandro C, Campino L. Leishmaniasis: Efflux pumps and chemoresistance. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;22(3):352–7.
 133. Rai S, Bhaskar, Goel SK, Nath Dwivedi U, Sundar S, Goyal N. Role of Efflux Pumps and Intracellular Thiols in Natural Antimony Resistant Isolates of *Leishmania donovani*. *PLoS One*. 2013;8(9):1–16.
 134. Mookerjee Basu J, Mookerjee A, Banerjee R, Saha M, Singh S, Naskar K, et al. Inhibition of ABC transporters abolishes antimony resistance in *Leishmania* Infection. *Antimicrob Agents Chemother* [Internet]. 2008;52(3):1080–93.
 135. Pluchino KM, Hall MD, Goldsborough AS, Callaghan R, Gottesman MM. Resistance. 2013;15:98–105.
 136. Hyafil F, Vergely C, Du Vignaud P, Grand-Perret T. In vitro and in vivo reversal of multidrug resistance by GF120918, an acridonecarboxamide derivative. *Cancer Res*. 1993;53(18):4595–602.
 137. Hendrikx JJ, Lagas JS, Wagenaar E, Rosing H, Schellens JH, Beijnen JH, et al. Oral co-administration of elacridar and ritonavir enhances plasma levels of oral paclitaxel and docetaxel without affecting relative brain accumulation. *Br J Cancer* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;110(11):2669–76.
 138. Gupta SC, Kismali G, Aggarwal BB. Curcumin, a component of turmeric: From farm to pharmacy. *BioFactors* [Internet]. 2013;39(1):2–13.

139. Changtam C, de Koning HP, Ibrahim H, Sajid MS, Gould MK, Suksamrarn A. Curcuminoid analogs with potent activity against *Trypanosoma and Leishmania species*. Eur J Med Chem [Internet]. Elsevier Masson SAS; 2010;45(3):941–56.
140. Das R, Roy A, Dutta N, Majumder HK. Reactive oxygen species and imbalance of calcium homeostasis contributes to curcumin induced programmed cell death in *Leishmania donovani*. Apoptosis. 2008;13:867–82.
141. Fonseca-Silva F, Canto-Cavaleiro MM, Menna-Barreto RFS, Almeida-Amaral EE. Effect of Apigenin on *Leishmania amazonensis* Is Associated with Reactive Oxygen Species Production Followed by Mitochondrial Dysfunction. J Nat Prod [Internet]. 2015;78(4):880–4.
142. Saleheen D, Ali SA, Ashfaq K, Siddiqui A Al, Agha A, Yasinzai MM. Latent activity of curcumin against leishmaniasis in vitro. Biol Pharm Bull. 2002;25(3):386–9.
143. Montesino N, Kaiser M, Brun R, Schmidt T. Search for Antiprotozoal Activity in Herbal Medicinal Preparations; New Natural Leads against Neglected Tropical Diseases. Molecules [Internet]. 2015;20:14118–38.
144. Alkhaldi AAM, Creek DJ, Ibrahim H, Kim D, Quashie NB, Burgess KE, et al. Potent Trypanocidal Curcumin Analogs Bearing a Monoenone Linker Motif Act on *Trypanosoma brucei* by Forming an Adduct with Trypanothione s. 2015;
145. Saravia NG, Weigle K, Navas C, Segura I, Valderrama L, Valencia AZ, et al. Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of *Leishmania Viannia* in Colombia. Am J Trop Med Hyg. 2002;66(6):738–44.
146. Fernandez O, Diaz-Toro Y, Valderrama L, Ovalle C, Valderrama M, Castillo H, et al. Novel Approach to In Vitro Drug Susceptibility Assessment of Clinical Strains of *Leishmania spp*. J Clin Microbiol. 2012;50(7):2207–11.
147. Riss TL, Niles AL, Minor L. Cell Viability Assays Assay Guidance Manual. Assay Guid Man. 2004;1–23.
148. Romero I, Téllez J, Suárez Y, Cardona M, Figueroa R, Zelazny A, et al. Viability and Burden of *Leishmania* in Extralesional Sites during Human Dermal Leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis [Internet]. 2010;4(9):e819.
149. Navas A, Vargas DA, Freudzon M, McMahon-Pratt D, Saravia NG, Gómez MA. Chronicity of dermal leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis* is associated with parasite-mediated induction of chemokine gene expression. Infect Immun [Internet]. 2014;82(7):2872–80.

150. Zinzi L, Capparelli E, Cantore M, Contino M, Leopoldo M, Colabufo NA. Small and Innovative Molecules as New Strategy to Revert MDR. *Front Oncol* [Internet]. 2014;4(January):2.
151. Jr DJS. New uses for old drugs. *Nature*. 2007;448(August):645–6.
152. Lee CH. Multi-Drug Resistance in Cancer. 2010;596. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-60761-416-6>
153. Wu CP, Calcagno AM, Hladky SB, Ambudkar S V., Barrand M a. Modulatory effects of plant phenols on human multidrug-resistance proteins 1, 4 and 5 (ABCC1, 4 and 5). *FEBS J*. 2005;272(18):4725–40.
154. Stuehr DJ. Mammalian nitric oxide synthases. 1999;1411.
155. Ashutosh, Sundar S, Goyal N. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J Med Microbiol*. 2007;56(PART 2):143–53.
156. Mukherjee B, Mukhopadhyay R, Bannerjee B, Chowdhury S, Mukherjee S, Naskar K, et al. Antimony-resistant but not antimony-sensitive *Leishmania donovani* up-regulates host *IL-10* to overexpress multidrug-resistant protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013;110(7):E575–82.
157. Seifert K, Escobar P, Croft SL. In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(3):508–11.
158. Leifso K, Cohen-Freue G, Dogra N, Murray A, McMaster WR. Genomic and proteomic expression analysis of *Leishmania* promastigote and amastigote life stages: The *Leishmania* genome is constitutively expressed. *Mol Biochem Parasitol* [Internet]. 2007;152(1):35–46.
159. Ruttkay-Nedecky B, Nejdli L, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Eckschlager T, et al. The Role of Metallothionein in Oxidative Stress. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2013;14(3):6044–66.
160. Formigari A, Irato P, Santon A. Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: Biochemical and cytochemical aspects. *Comp Biochem Physiol Part C Toxicol Pharmacol* [Internet]. 2007;146(4):443–59.
161. Bonaventura P, Benedetti G, Albaredo F, Miossec P. Zinc and its role in immunity and inflammation. *Autoimmun Rev*. 2014;11(008):9.
162. Dona MSÆCMÆA. Zinc : a multipurpose trace element. *Arch Toxicol*. 2006;80:1–9.
163. Prasad AS. Effects of Zinc Deficiency on Th1 and Th2 Cytokine Shifts. *J Infect Dis*. 2000;182:62–8.

164. Klaus-Helge Ibs and Lothar Rink. Zinc-Altered Immune Function. *J Nutr.* 2003;133:1452–6.
165. Simonsen A, Lippe R, Gaullier J, Brech A, Callaghan J, Toh B, et al. EEA1 links PI(3)K function to *Rab5* regulation of endosome fusion. *Nature.* 1998;394(JULY):2–6.
166. Merithew E, Stone C, Eathiraj S, Lambright DG. Determinants of *Rab5* Interaction with the N Terminus of Early Endosome Antigen 1 *. *J Biol Chem.* 2003;278(10):8494–500.
167. Mayer LS, Uciechowski P, Schwerdtle T, Rink L. Differential impact of zinc deficiency on phagocytosis, oxidative burst, and production of pro-inflammatory cytokines by human monocytes. *Metallomics.* 2014;6:1288–95.
168. Zalewska M. The role of metallothionein interaction with other proteins. *Proteomics.* 2014;14(11):1343–56.
169. Summersgill H, England H, Lawrence CB, Luheshi NM, Pahle J, Mendes P, et al. Zinc depletion regulates the processing and secretion of *IL-1β*. *Cell Death Dis* [Internet]. Nature Publishing Group; 2014;5(1):e1040–9.
170. Haase H, Maret W. Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin / insulin-like growth factor-1 signaling. 2003;291:289–98.
171. Andrews GK. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol.* 2000;59(99):95–104.
172. Laity JH, Andrews GK. Understanding the mechanisms of zinc-sensing by metal-response element binding transcription factor-1 (*MTF-1*). *Arch Biochem Biophys.* 2007;463:201–10.
173. Sato S, Shirakawa H, Tomita S, Tohkin M, Gonzalez FJ, Komai M. The aryl hydrocarbon receptor and glucocorticoid receptor interact to activate human metallothionein 2A. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. Elsevier Inc.; 2013;273(1):90–9.
174. Gonc AMI. Glucocorticoids regulate metallothionein-1 / 2 expression in rat choroid plexus : effects on apoptosis. 2013;41–51.
175. Shock H, Demoor JM, Kennette WA, Collins OM, Koropatnick J. Zinc-Metallothionein Levels Are Correlated with Enhanced Glucocorticoid Responsiveness in Mouse Cells Exposed. 2001;76:67–76.
176. Manzano JI, García-Hernández R, Castanys S, Gamarro F. A new ABC half-transporter in *Leishmania major* is involved in resistance to

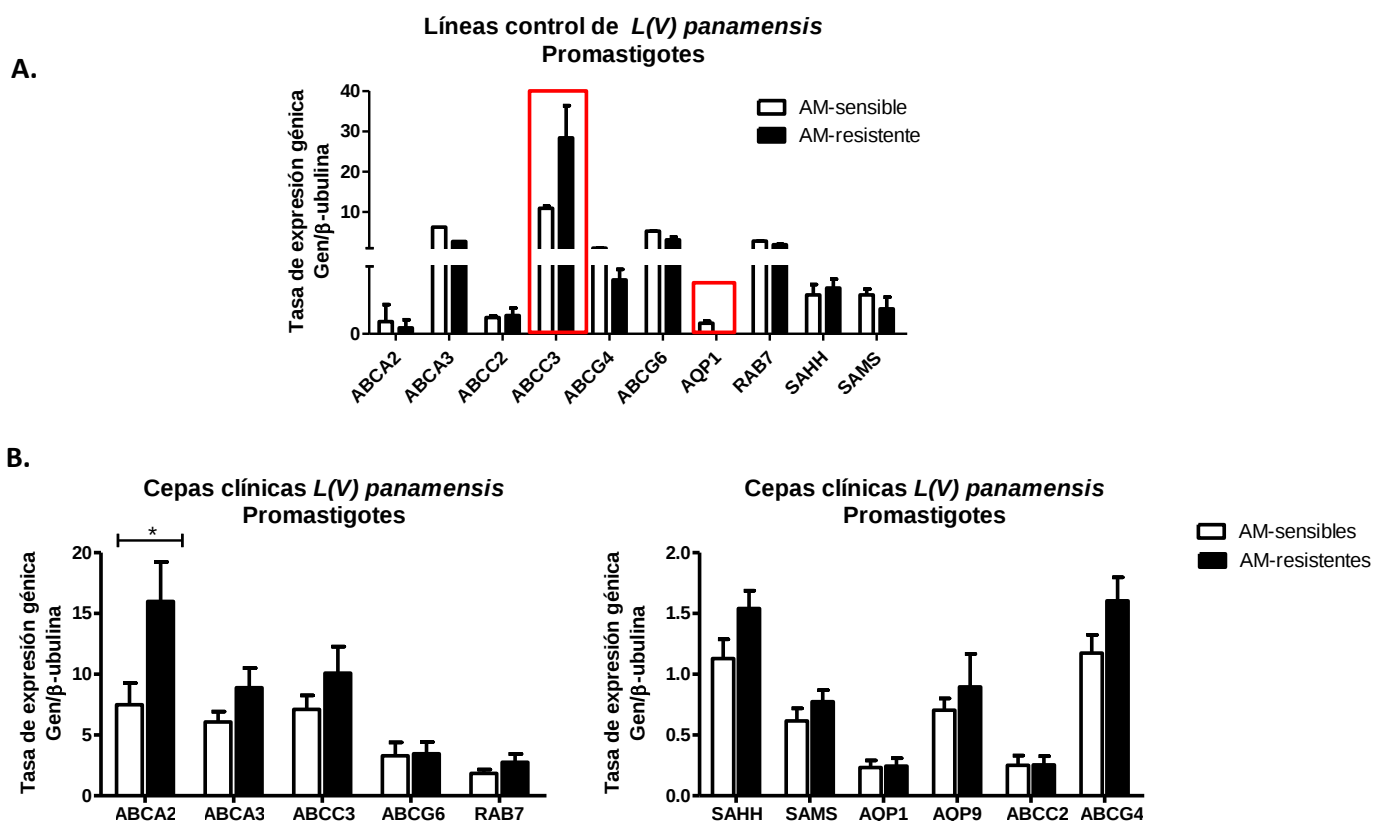
- antimony. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(8):3719–30.
177. Sciavolino PJ. Regulation of metallothionein gene expression by TNF- α AND IFN- γ in human. 1995;7(3):242–50.
 178. Friedman RL, Stark GR. alpha-Interferon-induced transcription of HLA and metallothionein genes containing homologous upstream sequences. *Nature*. 1985;314(6012):637–9.
 179. Karin M, Imbra RJ, Heguy a, Wong G. Interleukin 1 regulates human metallothionein gene expression. *Mol Cell Biol*. 1985;5(10):2866–9.
 180. Sato M, Kondoh M. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *The Tohoku journal of experimental medicine*. 2002. p. 9–22.
 181. Li Q, Verma IM, Pines NT. NF- κ B regulation in the immune system. 2002;2(October).
 182. Gregory DJ, Godbout M, Contreras I, Forget G, Olivier M. A novel form of NF- κ B is induced by *Leishmania* infection: Involvement in macrophage gene expression. *Eur J Immunol*. 2008;38(4):1071–81.
 183. Frommel TO, Button LL, Fujikura Y, McMaster WR. The major surface glycoprotein (GP63) is present in both life stages of *Leishmania*. 1990;38:25–32.
 184. Gregory DJ, Whitcombe LA, Olivier M. Role of Host Protein Tyrosine Phosphatase SHP-1 in *Leishmania donovani* -Induced Inhibition of Nitric Oxide Production. 2006;74(11):6272–9.
 185. Papers JBC, Doi M, Spitkovsky D, Hehner SP, Hofmann TG, Mo A. The Human *Papillomavirus* Oncoprotein E7 Attenuates NF- κ B Activation by Targeting the I κ B Kinase Complex *. 2002;277(28):25576–82.
 186. Zhou H, Monack DM, Kayagaki N, Wertz I, Yin J, Wolf B, et al. *Yersinia* virulence factor YopJ acts as a deubiquitinase to inhibit NF- κ B activation. 2005;202(10):1327–32.
 187. Molestina RE, Sinai AP. Detection of a novel parasite kinase activity at the *Toxoplasma gondii* parasitophorous vacuole membrane capable of phosphorylating host I κ B a. 2005;7:351–62.
 188. Guha R, Das S, Ghosh J, Sundar S, Dujardin JC, Roy S. Antimony Resistant *Leishmania donovani* but Not Sensitive Ones Drives Greater Frequency of Potent T- Regulatory Cells upon Interaction with Human PBMCs: Role of *IL-10* and *TGF- β* in Early Immune Response. 2014;8(7).
 189. Chowdhury S, Mukhopadhyay R, Saha S, Mishra A, Sengupta S, Roy S, et al. Flavone-resistant leishmania donovani overexpresses *LdMRP2*

- transporter in the parasite and activates host *MRP2* on macrophages to circumvent the flavone-mediated cell death. *J Biol Chem*. 2014;289(23):16129–47.
190. Yasinzai M, Khan M, Nadhman A, Shahnaz G. Drug resistance in leishmaniasis: current drug-delivery systems and future perspectives. *Future Med Chem [Internet]*. 2013;5(15):1877–88.
 191. Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pac J Trop Med [Internet]*. Hainan Medical College; 2012;5(6):485–97.
 192. Monzote L. Antileishmanial Patents Antileishmanial Current Drugs and Relevant Patents. 2011;(CI):1–26.
 193. Rama M. A comprehensive review of patented antileishmanial agents. *Pharm Pat Anal Futur Sci*. 2015;4(October 2010):37–56.
 194. Collu F, Cascella M. Multidrug Resistance and Efflux Pumps: Insights from Molecular Dynamics Simulations. *Curr Top Med Chem [Internet]*. 2013;13(24):3165–83.
 195. Chearwae W, Shukla S, Limtrakul P, Ambudkar S V. Modulation of the function of the multidrug resistance-linked ATP-binding cassette transporter *ABCG2* by the cancer chemopreventive agent curcumin. *Mol Cancer Ther*. 2006;5:1995–2006.
 196. Rickardson L, Fryknäs M, Dhar S, Lövborg H, Gullbo J, Rydåker M, et al. Identification of molecular mechanisms for cellular drug resistance by combining drug activity and gene expression profiles. *Br J Cancer*. 2005;93(4):483–92.
 197. Koide TK, Ose MN, Gihara YO, Abu YY, Hta NO. Leishmanicidal Effect of Curcumin in Vitro. 2002;25(January):131–3.
 198. Sun D, Zhuang X, Xiang X, Liu Y, Zhang S, Liu C, et al. A novel nanoparticle drug delivery system: the anti-inflammatory activity of curcumin is enhanced when encapsulated in exosomes. *Mol Ther [Internet]*. Nature Publishing Group; 2010;18(9):1606–14.
 199. Sharma G, Kar S, Basu Ball W, Ghosh K, Das PK. The curative effect of fucoidan on visceral leishmaniasis is mediated by activation of MAP kinases through specific protein kinase C isoforms. *Cell Mol Immunol [Internet]*. Nature Publishing Group; 2014;11(3):263–74.
 200. Zhang W, Tan TMC, Lim LY. Impact of curcumin-induced changes in P-glycoprotein and CYP3A expression on the pharmacokinetics of peroral celiprolol and midazolam in rats. *Drug Metab Dispos*. 2007;35(1):110–5.

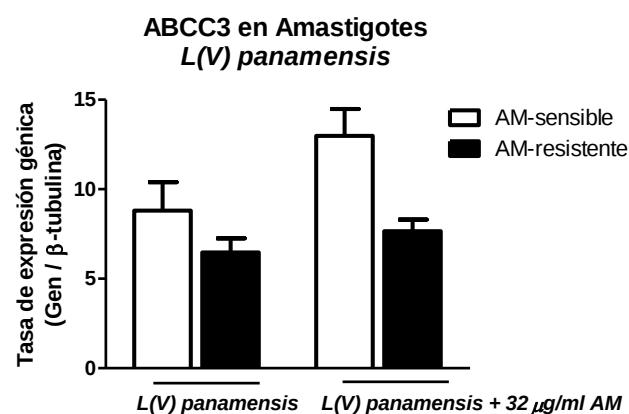
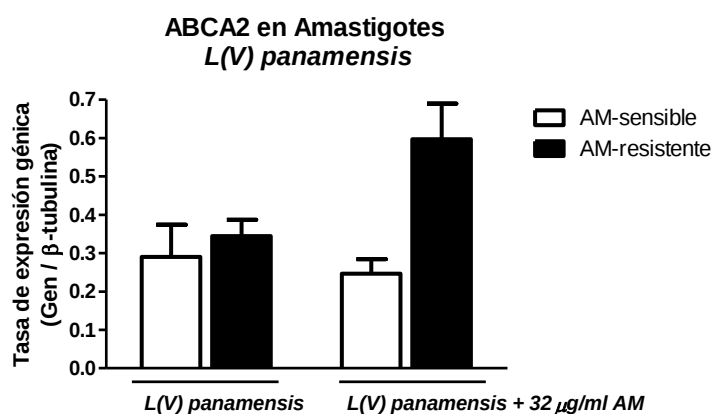
201. Ahsan H, Parveen N, Khan NU. Pro-oxidant , anti-oxidant and cleavage activities on DNA of curcumin and its derivatives demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. 1999;121:161–75.
202. Fonseca-Silva F, Inacio JDF, Canto-Cavalheiro MM, Menna-Barreto RFS, Almeida-Amaral EE. Oral Efficacy of Apigenin against Cutaneous Leishmaniasis: Involvement of Reactive Oxygen Species and Autophagy as a Mechanism of Action. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(2):e0004442.
203. Fonseca-silva F, Inacio JDF, Canto-cavalheiro MM, Almeida-amaral EE. Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction Contribute to Quercetin Induced Death in *Leishmania amazonensis*. 2011;6(2).
204. Cole SPC, Deeley RG. Transport of glutathione and glutathione conjugates by MRP1. Trends Pharmacol Sci [Internet]. 2006;27(8):438–46.
205. Perez-Victoria JM, Corte F, Parodi-talice A, Bavchvarov BI, Pe FJ, Mun F, et al. Combination of Suboptimal Doses of Inhibitors Targeting Different Domains of LtrMDR1 Efficiently Overcomes Resistance of *Leishmania spp* . to Miltefosine by Inhibiting Drug Efflux. 2006;50(9):3102–10.

12. ANEXOS

ANEXO 1. Expresión génica de transportadores de membrana y enzimas del metabolismo del tripanotión en promastigotes y amastigotes intracelulares de líneas control de laboratorio y cepas clínicas de *L (V) panamensis*.



Panel de expresión génica de transportadores tipo ABC, Acuaporinas y Enzimas del metabolismo del tripanotión. A) Expresión génica de líneas control de laboratorio de *L (V) panamensis* resistente y sensible a antimonio de meglumina (AM). **B)** Expresión génica de cepas clínicas de *L (V) panamensis* resistentes y sensibles a AM, se representa el promedio $\pm$ error estándar.



Expresión génica de ABCA2 y ABCC3 en amastigotes de *L (V) panamensis*. Macrófagos THP-1 fueron infectados con cepas clínicas resistentes y sensibles al AM por 24 horas con posterior exposición a 32 μ g/ml de AM. Se cuantifica la expresión de los genes *abca2* y *abcc3* por qRT-PCR. Se representa el promedio $\pm$ error estándar.

ANEXO 2. Participación en el 13er Congreso Internacional del Colegio Nacional de Bacteriología CNB-Colombia. Santiago de Cali Septiembre 2013. Modalidad Poster #66.

Expresión génica de transportadores abc y determinantes de resistencia en aislamientos clínicos de *Leishmania (Viannia)*.

Barrera Maria Claudia *¹, Fernandez Olga ¹, Saravia Nancy ¹, Gómez María Adelaida ¹

¹Centro Internacional de Entrenamiento e investigaciones Médicas (CIDEIM)
Cali, Colombia

*mflaquer@cideim.org.co

Entre los mecanismos de resistencia experimental a antileishmaniales se destaca la sobre-expresión de transportadores de membrana y enzimas metabólicas [1,2]. Sin embargo, la asociación de la expresión individual de estos genes con el fenotipo de susceptibilidad en cepas clínicas no ha sido exitosa. El objetivo de este proyecto fue identificar perfiles de expresión génica como marcadores de susceptibilidad a Glucantime® y Miltefosine en aislamientos clínicos de *Leishmania Viannia*, mediante el análisis de expresión de un panel de transportadores ABC y enzimas del metabolismo de la cisteína.

Se evaluaron 31 cepas aisladas de pacientes con leishmaniasis tegumentaria. Los niveles de susceptibilidad in vitro a Glucantime® y Miltefosine como amastigotes intracelulares se evaluaron mediante IC50 [3]. Los niveles absolutos de expresión de 10 transportadores y 4 enzimas metabólicas en promastigotes en fase logarítmica se cuantificaron por qRT-PCR. En conjunto, cepas resistentes a Glucantime® (n=10) presentaron un

patrón de sobre-expresión de *abca2*, *abca3*, *abcc3*, *abcg4*, *sams* y *sahh* comparado con los aislamientos sensibles (n=9). En los aislamientos resistentes a Miltefosine (n=6) se observó sobre-expresión del gen *abcc3* y a menor escala *abcg4* y *Lbmt*.

La sobreexpresión de *abcc3*, *sams* y *sahh* en aislamientos resistentes a antimoniales coincide con previos hallazgos en cepas de *Leishmania* resistentes generadas en laboratorio [4]. En conclusión, identificamos nuevos candidatos con potencial asociación al fenotipo de resistencia a antileishmaniales. Sin embargo, la resistencia es la manifestación de múltiples factores, por lo cual el análisis multivariado del perfil de expresión podría ser una herramienta de mayor poder para definir marcadores de susceptibilidad.

Expresión génica de transportadores ABC y determinantes de resistencia en cepas clínicas de *Leishmania Viannia*.

María Claudia Barrera^{1*}, Olga Fernandez¹, Nancy Gore Saravia¹, María Adelaida Gómez¹.

¹ Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM), Cali, Colombia.

*mflaquer@cideim.org.co



RESUMEN

Entre los mecanismos de resistencia experimental a antileishmaniales, se destaca la sobre-expresión de genes de transportadores de membrana y enzimas metabólicas. La localización subcelular de algunos transportadores, alrededor del paquete flagelar (PF), zona de mayor tráfico de sustancias, se ha relacionado con un papel en el eflujo y secuestro de estos fármacos. Sin embargo, la asociación de la expresión individual de estos genes con el fenotipo de susceptibilidad en cepas clínicas no ha sido exitosa.

El objetivo de este proyecto fue identificar perfiles de expresión génica como marcadores de susceptibilidad a Glucantime® y miltefosina en cepas clínicas de *Leishmania Viannia*, mediante el análisis de expresión génica de un panel de transportadores ABC y enzimas del metabolismo de la cisteína.

Se evaluaron 31 cepas de *L. V. panamensis* aisladas de pacientes con leishmaniasis cutánea. Los niveles de susceptibilidad in vitro a Glucantime® y miltefosina como amastigotes intracelulares se evaluaron mediante un ensayo de tamización estandarizado. Los niveles absolutos de expresión de 10 transportadores y 4 enzimas metabólicas en promastigotes en fase logarítmica se cuantificaron por qRT-PCR. Las cepas resistentes a Glucantime® (n=10) presentaron un patrón de sobre-expresión para el gen *abca2* y para los genes *abca3* y *abcc3* una tendencia a la sobre-expresión comparado con los aislamientos sensibles (n=9). En miltefosina no se observó expresión diferencial significativa.

La tendencia a la sobre-expresión de *abcc3* en cepas clínicas experimentalmente seleccionadas como resistentes a antimoniales concuerda con previos hallazgos en cepas de *Leishmania spp.* resistentes generadas en laboratorio. En conclusión, identificamos nuevos candidatos con potencial asociación al fenotipo de resistencia en *L. V. panamensis*. Teniendo en cuenta que la resistencia es multifactorial, análisis multivariado del perfil de expresión de transportadores ABC y enzimas metabólicas puede ser una herramienta de mayor poder para definir marcadores de susceptibilidad a antileishmaniales.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

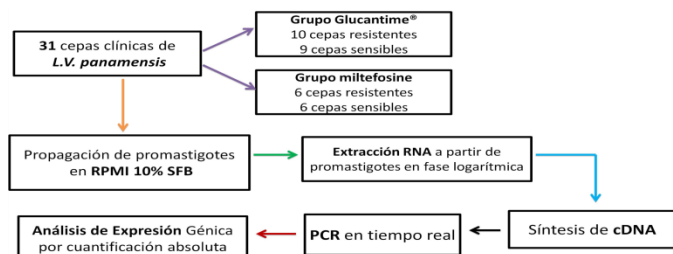


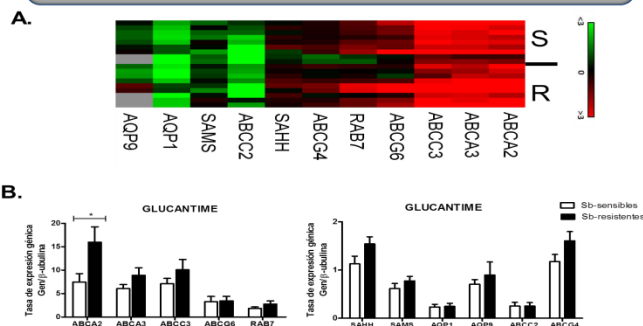
Tabla 1. Niveles de susceptibilidad a Glucantime® y miltefosina de cepas clínicas de *Leishmania V. panamensis*

Susceptibilidad a Glucantime®				Susceptibilidad a miltefosina			
Cepas resistentes		Cepas sensibles		Cepas resistentes		Cepas sensibles	
Código	% de reducción	Código	% de reducción	Código	% de reducción	Código	% de reducción
2198	0%	2496	96%	3768	8%	5415	82%
2168	0%	2476	88%	3784	23%	5263	95%
2452	0%	2363	80%	5264	19%	5675	95%
2169	0%	2348	78%	5261	6%	8573	97%
2472	3%	2420	88%	8113	12%	8190	95%
2183	0%	2423	98%	1A007	7%	5498	93%
1131	0%	2277	95%	-	-	-	-
5033r	5%	3951s	93%	-	-	-	-
3783r	0%	5035s	97%	-	-	-	-
3832r	0%	-	-	-	-	-	-

Tabla 1. Cepas de *L. V. panamensis* obtenidas de aislamientos clínicos de pacientes con lesiones de leishmaniasis cutánea. El análisis de susceptibilidad de las cepas se evaluó mediante un ensayo in vitro de supervivencia de amastigotes intracelulares. Los resultados se expresaron como porcentaje de reducción de carga parasitaria tras la exposición a 32µg/ml de antimonio de meglumina (Glucantime®) o 16µM de miltefosina.

RESULTADOS

La sobre-expresión de los genes *abca2* y a menor escala *abca3* y *abcc3* está relacionada con el fenotipo de resistencia a Glucantime®.



No se observó diferencias significativas en los niveles de expresión génica en las cepas resistentes y sensibles a miltefosina.

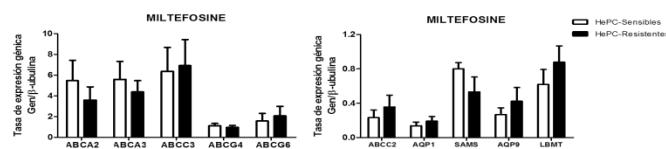


Figura 2. Patrón de expresión de genes de transportadores ABC y determinantes metabólicos en aislamientos clínicos de *L.V. panamensis*, resistentes o susceptibles a miltefosina. En el panel de la derecha se observan los genes con mayores niveles de expresión y en panel de la izquierda los genes con los menores niveles de expresión. (HePC: Hexadecilfosfolina; miltefosina).

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La evaluación de los niveles de expresión génica de transportadores ABC y enzimas metabólicas en cepas clínicas de *L.V. panamensis*, evidenció que la sobre-expresión de *abca2* y a menor escala *abca3* y *abcc3* se relaciona con la resistencia a antimoniales, estos hallazgos coinciden con lo publicado por otros autores.

Los transportadores *abca2*, *abca3* y *abcc3* se ubican en la región del paquete flagelar (PF) de *Leishmania spp.* La sobre expresión de transportadores en el PF se ha asociado a la resistencia a fármacos antileishmaniales mediante secuestro y eflujo.

A diferencia de lo reportado en la literatura, de cepas generadas en laboratorio de otras especies, no se observó expresión diferencial en los genes *aqp1* y *aqp9* en las cepas clínicas resistentes a antimoniales.

Para el grupo de miltefosina no se evidenció expresión diferencial de los genes evaluados en relación a la susceptibilidad.

Las variaciones en los niveles de expresión influyen la susceptibilidad de las cepas. Sin embargo los patrones de sobre-expresión génica por si solos no confieren un fenotipo de resistencia, ya que este fenotipo es la manifestación de múltiples factores. Como procesos metabólicos en la célula hospedera que puedan modular la respuesta frente a los fármacos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por COLCIENCIAS contrato # 222951928930. Agradecemos a NIH Fogarty, D43 TW000559, Vector/Host-Parasite Interface of Leishmaniasis in Colombia por apoyar el entrenamiento en investigación de María Claudia Barrera.

ANEXO 3. Participación en el II Congreso Colombiano de Biología Computacional y Bioinformática. Manizales, Septiembre 2013. Modalidad Presentación oral.

Gene expression profiling of membrane transporters and metabolic enzymes in clinical strains of *Leishmania panamensis* and its relation with resistance to meglumine antimoniate.

María Claudia Barrera ^{*1}, Austin Weiss ², Olga Fernández ¹, María Adelaida Gómez ¹

¹Centro Internacional de Entrenamiento e investigaciones Médicas (CIDEIM) Cali, Colombia, ²Yale University New Haven EE.UU
^{*}mflaquer@cideim.org.co

Introduction: More than a decade of research on laboratory generated drug-resistant *Leishmania* strains has revealed mechanisms of experimental resistance to antimonials based on intracellular drug detoxification, sequestration and efflux, and altered activation of pentavalent antimonials (Sb^{V}) to the bioactive trivalent form (Sb^{III}). These functions have been associated to the over-expression of ATP-Binding Cassette (ABC) membrane transporters and metabolic enzymes through mechanisms of gene amplification in Sb^{III} -resistant *Leishmania*. However, the relationship between the expression level of these genes with the susceptibility phenotype of field isolates has not been successfully established. The aim of this project was to evaluate the relationship between the gene expression profile of a panel of 6 ABC transporters, 2 aquaporin channels and 2 metabolic enzymes and the susceptibility phenotype to meglumine antimoniate in clinical *Leishmania panamensis* strains.

Methods: Nineteen strains isolated from patients with cutaneous leishmaniasis were evaluated. In vitro susceptibility to meglumine antimoniate was evaluated as intracellular amastigotes and expressed as EC₅₀ values. The gene expression levels of 6 ABC transporters (ABCA2, ABCA3, ABCC2, ABCC3, ABCG4, ABCG6), 2 aquaporin channels (AQP-1 and AQP-9) and two metabolic enzymes (SAMS and SAHH), were quantified by qRT-PCR in logarithmic phase promastigotes. Genetic diversity was assessed by microsatellite genotyping. Multivariate analysis was performed using Tanagra software.

Results: Overall Sb-resistant strains (n=10) present a pattern of over-expression of *abca2*, *abca3*, *abcc3*, *abcg4*, *abcg6*, *sams* and *sahh* compared to susceptible strains (n=9). Sb-resistant *L.V.panamensis* expressed significantly more *abca2* compared to Sb-susceptible strains. The expression of *abca2* was positively correlated to the expression of *abca3*, *abcc3*, *abcg4* y *abcg6*. However, the expression of the transcriptionally co-regulated genes *abcc2* and *abcc3* was not correlated. Genetic diversity analysis allowed discrimination of Sb-resistant and Sb-susceptible clusters.

Discussion: Through a gene expression profiling strategy we have identified new gene candidates with potential association to the susceptibility phenotype to antimonial drugs in clinical strains of *L. panamensis*. Drug-resistance is the manifestation of multiple factors, thus, the expression levels of a multi-marker gene panel may more accurately represent the association between phenotype and genotype. The positive correlation between *abca2* gene expression and four other ABC transporters, despite no correlation between the expression of *abcc2* and *abcc3* which are transcriptionally co-regulated, suggests that both transcriptional and post-transcriptional co-regulation networks are operating in the context of transporter gene expression and drug susceptibility. Over-expression of *abcc3*, *sams* and *sahh*

in Sb-resistant strains is consistent with the mechanism of resistance identified in laboratory generated Sb-resistant *Leishmania*.

ANEXO 4. Participación en el 1er Congreso de Bioquímica y Biología Molecular C2B2 Universidad Nacional Bogotá Colombia, Junio 2014. Modalidad Poster # 52S1.

La susceptibilidad de *Leishmania panamensis* al antimonio de meglumina contribuye a la modulación diferencial de determinantes farmacológicos en macrófagos humanos

María Claudia Barrera ^{*1}, Laura Jimena Rojas ¹, María Adelaida Gómez ¹

**¹Centro Internacional de Entrenamiento e investigaciones Médicas
(CIDEIM) Cali, Colombia**

****mflaquer@cideim.org.co***

Introducción: Por más de dos décadas mecanismos de resistencia de *Leishmania* a fármacos han sido investigados, especialmente aquellos que involucran el transporte y metabolismo mediado por transportadores tipo ABC y acuaporinas, y enzimas metabólicas de la vía del tripanotión. *Leishmania* es un parásito intracelular, sin embargo, la participación de la célula hospedera en la susceptibilidad de *Leishmania* a los fármacos ha sido poco explorada. Resultados de nuestras investigaciones han demostrado que la expresión diferencial de transportadores y enzimas metabólicas en macrófagos humanos altera la supervivencia intracelular de *Leishmania* tras la exposición al fármaco. El objetivo de este estudio fue establecer la contribución de la susceptibilidad de *L. panamensis* al antimonio de meglumina (AM) en la modulación de la expresión de determinantes farmacológicos en macrófagos humanos.

Métodos: Monocitos humanos de la línea celular THP-1 fueron diferenciados a macrófagos mediante estimulación con PMA. Los macrófagos fueron infectados por 24h con cepas clínicas de *L. panamensis* susceptibles (*L. panamensis*-S; n=3) y resistentes a AM (*L. panamensis*-R; n=3). Los

macrófagos infectados fueron expuestos a 32µg/ml AM por 24h adicionales. La expresión génica del transportador ABCB6, acuaporina-9 (AQP-9), y metalotioneina2A (MT2A) fueron evaluados por qRT-PCR. Los datos fueron normalizados con la expresión de GAPDH. Los niveles de expresión relativa se definieron por el método $\Delta\Delta C_t$ y el análisis estadístico se llevó a cabo con el software GraphPad.

Resultados: La exposición de macrófagos humanos a AM induce fuertemente la expresión de *abcb6*, *aqp-9* y *mt2a*. Aunque la infección con *L. panamensis* por sí sola no modula significativamente la expresión de estos genes, la infección seguida de la exposición a AM promueve mayores niveles de expresión de *mt2a*, *abcb6* y *aqp-9* en THP-1. Los niveles de expresión de *abcb6* y *aqp-9*, inducidos por la infección con *L. panamensis*-R, fueron significativamente superiores a los inducidos durante la infección con *L. panamensis*-S. En contraste, la expresión de *mt2a* fue significativamente menor durante la infección con *L. panamensis*-R.

Discusión: Nuestros resultados evidencian que el nivel de susceptibilidad de *L. panamensis* a AM contribuye a la modulación diferencial de la expresión de *abcb6*, *aqp-9* y *mt2a* en macrófagos humanos. Mayores niveles de expresión de *abcb6* y *aqp-9*, inducidos por la infección con *L. panamensis*-R, podrían relacionarse con mayor eflujo y menor internalización del fármaco, respectivamente, contribuyendo a menor exposición del parásito intracelular al AM y al fenotipo de resistencia. Por su parte, menor expresión de *mt2a* en el contexto de infección con *L. panamensis*-R podría sugerir menor secuestro/acumulación intracelular del fármaco, promoviendo menor exposición del parásito intracelular. Estos resultados sugieren una participación importante de la célula hospedera en la definición del fenotipo de resistencia de *Leishmania* a AM.

La susceptibilidad de *Leishmania panamensis* al antimonio de meglumina contribuye a la modulación diferencial de determinantes farmacológicos en macrófagos humanos.

María Claudia Barrera^{1*}, Laura Rojas¹, María Adelaida Gómez¹.

¹ Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas (CIDEIM), Cali, Colombia.

*mflaquer@cideim.org.co



RESUMEN

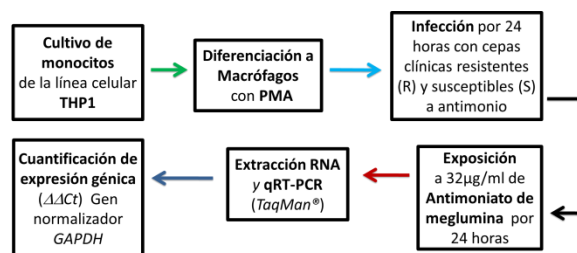
Por más de dos décadas mecanismos de resistencia de *Leishmania* a fármacos han sido investigados, especialmente aquellos que involucran el transporte y metabolismo mediado por transportadores tipo ABC y acuaporinas, y enzimas metabólicas de la vía del tripanotión. *Leishmania* es un parásito intracelular, sin embargo, la participación de la célula hospedera en la susceptibilidad de *Leishmania spp* a los fármacos ha sido poco explorada. Resultados de nuestras investigaciones han demostrado que la expresión diferencial de transportadores y enzimas metabólicas en macrófagos humanos altera la supervivencia intracelular de *Leishmania spp* tras la exposición al fármaco. El objetivo de este estudio fue establecer la contribución de la susceptibilidad de *L. panamensis* al antimonio de meglumina (AM) en la modulación de la expresión de determinantes farmacológicos en macrófagos humanos.

Monocitos humanos de la línea celular THP-1 fueron diferenciados a macrófagos mediante estimulación con PMA. Los macrófagos fueron infectados por 24h con cepas clínicas de *L. panamensis* susceptibles (*L. panamensis*-S; n=3) y resistentes a AM (*L. panamensis*-R; n=3). Los macrófagos infectados fueron expuestos a 32µg/ml AM por 24h adicionales. La expresión génica del transportador ABCB6, acuaporina-9 (AQP-9), y metalotioneina2A (MT2A) fueron evaluados por qRT-PCR. Los datos fueron normalizados con la expresión de GAPDH. Los niveles de expresión relativa se definieron por el método $\Delta\Delta Ct$ y el análisis estadístico se llevó a cabo con el software GraphPad.

La exposición de macrófagos humanos a AM induce fuertemente la expresión de *abcb6*, *aqp-9* y *mt2a*. Aunque la infección con *L. panamensis* por sí sola no modula significativamente la expresión de éstos genes, la infección seguida de la exposición a AM promueve mayores niveles de expresión de *mt2a*, *abcb6* y *aqp-9* en THP-1. Los niveles de expresión de *abcb6* y *aqp-9*, inducidos por la infección con *L. panamensis*-R, fueron superiores a los inducidos durante la infección con *L. panamensis*-S. En contraste, la expresión de *mt2a* fue significativamente menor durante la infección con *L. panamensis*-R.

Nuestros resultados evidencian que el nivel de susceptibilidad de *L. panamensis* a AM contribuye a la modulación diferencial de la expresión de *abcb6*, *aqp-9* y *mt2a* en macrófagos humanos. Mayores niveles de expresión de *abcb6* y *aqp-9*, inducidos por la infección con *L. panamensis*-R, podrían relacionarse con mayor eflujo y menor internalización del fármaco, respectivamente, contribuyendo a menor exposición del parásito intracelular al AM y al fenotipo de resistencia. Por su parte, menor expresión de *mt2a* en el contexto de infección con *L. panamensis*-R podría sugerir menor secuestro o acumulación intracelular del fármaco, promoviendo menor exposición del parásito intracelular. Estos resultados sugieren una participación importante de la célula hospedera en la definición del fenotipo de resistencia de *Leishmania spp* a AM.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



RESULTADOS

La susceptibilidad de *Leishmania panamensis* a antimonio de meglumina contribuye a la modulación diferencial de la expresión génica de determinantes farmacológicos en macrófagos THP1.

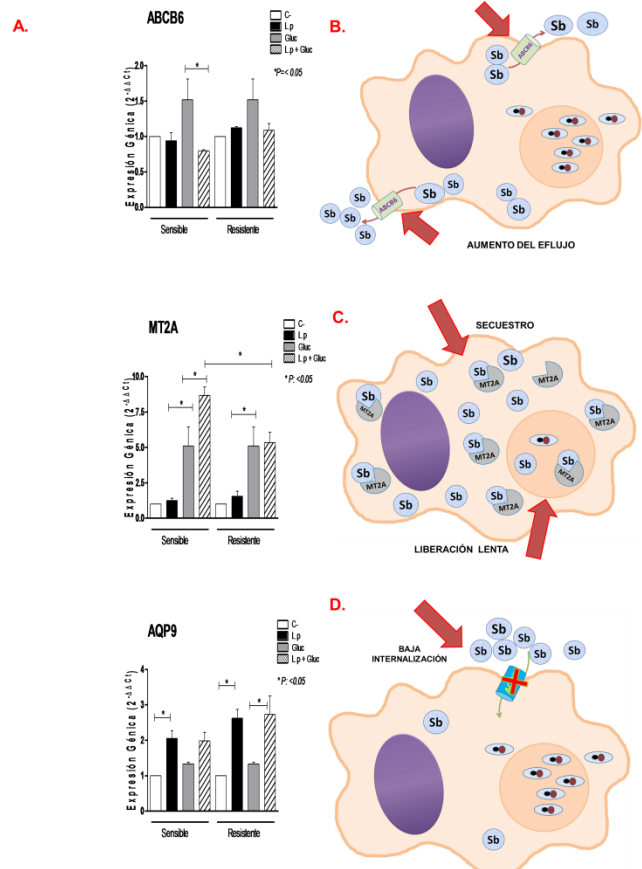


Fig.1 A) Análisis de expresión génica de *abcb6*, *mt2a* y *aqp9*. La exposición de macrófagos humanos a antimonio de meglumina induce la expresión de *abcb6*, *mt2a* y *aqp9*. La infección con *L. panamensis*-R induce significativamente la expresión de *aqp9* en los macrófagos THP1. Sin embargo, la infección con *L. panamensis*-R seguida de exposición a la droga induce la expresión para los genes *abcb6* y *aqp9*, en contraste con la inducción de *mt2a* mediado por la infección con *L. panamensis*-S. **B-D)** Modelos funcionales: **B)** *Abcb6*: el aumento de eflujo favorece supervivencia intracelular del parásito por disminución en la exposición a la droga. **C)** *Mt2a*: secuestro o acumulación intracelular del antimonio de meglumina con liberación paulatina favorece la muerte parasitaria. **D)** *Aqp9*: disminución en la internalización del medicamento promueve supervivencia intracelular de *Leishmania panamensis*.

DISCUSIÓN

- La susceptibilidad de *L. panamensis* al antimonio de meglumina influye en el patrón de expresión de determinantes farmacológicos en la célula hospedera.
- La inducción de *abcb6* y *aqp9* por la infección con *L. panamensis*-R puede contribuir con mayor eflujo y menor internalización del fármaco, respectivamente, disminuyendo la exposición del parásito intracelular al AM y a la presencia de un fenotipo de resistencia.
- La menor expresión de *mt2a* durante la infección con *L. panamensis*-R podría sugerir menor secuestro o acumulación intracelular del fármaco lo que conlleva a menor exposición del parásito intracelular al antimonio.
- Estos resultados sugieren una participación importante de la célula hospedera en la definición del fenotipo de resistencia de *Leishmania spp*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por COLCIENCIAS contrato No. 4102013 Código 2229056933302 Proyecto Farmacogenómica de la respuesta al tratamiento de la Leishmaniasis cutánea en Colombia y por NIH/NIAD Award Number R01AI104823 Proyecto Macrophage drug transport and metabolism in the outcome of antileishmanial therapy. Este contenido es responsabilidad de los autores y no necesariamente representa una opinión oficial del Instituto Nacional de Salud Norteamericano. Agradecemos también a todo el personal del BioBanco de cepas Institucional de CIDEIM y de la unidad de Bioquímica y Biología Molecular por su colaboración durante el proyecto.

ANEXO 5. Participación en el manuscrito:

“Treatment failure and miltefosine susceptibility in dermal leishmaniasis caused by *Leishmania Viannia* species” Ricardo Obonaga, Olga Fernandez, Liliana Valderrama, Luisa Rubiano, María del Mar Castro, María Claudia Barrera, Nancy Saravia, María Adelaida Gomez. Antimicrob. Agents Chemother. 2014, 58(1):144. DOI: 10.1128/AAC.01023-13.

En prensa desde Octubre 2013, Revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy.

ANEXO 6. Asistencia al “ZIBI Summer School 2015 on Host-Pathogen interplay” en el Instituto Max Planck en Berlin Alemania Junio-Julio 2015. Beca completa: DAAD fellowship to ZIBI Summer School of Host-Pathogen Interplay.

Max Planck Institute - Humboldt Universität Zu Berlin, Alemania

Única representante por Colombia.

ANEXO 7. Aprobación del Comité Institucional de Ética de Investigaciones en Humanos (CIEIH)-CIDEIM.