

TESIS DOCTORAL

Nuevas estrategias para el tratamiento de la
leishmaniasis: mecanismo de acción de lípidos
antitumorales, interacción hospedero-parásito, y su
posible utilidad terapéutica

Janny Alexander Villa Pulgarín

Director de Tesis
Faustino Mollinedo García

Centro de Investigación de Cáncer - CSIC

Universidad de Salamanca

Salamanca, 2014



Dr. **Faustino Mollinedo García**, Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y miembro del Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer de la Universidad de Salamanca,

CERTIFICA:

Que la memoria **“Nuevas estrategias para el tratamiento de la leishmaniasis: mecanismo de acción de lípidos antitumorales, interacción hospedero-parásito, y su posible utilidad terapéutica”**, presentada por **Janny Alexander Villa Pulgarín**, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer y reúne, a su juicio, originalidad y contenidos suficientes para que sea presentada ante el tribunal correspondiente y optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

Y para que así conste, a efectos legales, expide el presente certificado en Salamanca, a 7 de Abril de 2014.

Firmado: Dr. Faustino Mollinedo Garcia

A mi Familia
Especialmente a mi abuela Herminia†
y al amor expresado en una princesa de nombre Manuela

Índice

Abreviaturas

1	Introducción.....	1
1.1	Leishmaniasis: generalidades de la enfermedad y descripción del agente etiológico	1
1.1.1	Leishmaniasis	1
1.1.2	Taxonomía de <i>Leishmania</i>	2
1.2	Morfología y ciclo de vida.....	3
1.2.1	Morfología.....	3
1.2.2	Ciclo de vida	4
1.3	Establecimiento de la infección	6
1.4	Respuesta inmune.....	9
1.5	Tratamiento.....	11
1.6	Biología del parásito	14
1.7	Microdominios lipídicos rafts de membrana	19
1.8	Mitocondria de trypanosomátidos	22
1.8.1	Blancos mitocondriales.....	24
1.9	Muerte celular programada	28
1.9.1	Apoptosis.....	28
1.9.2	Autofagia.....	32
1.10	MCP en eucariotes unicelulares	33
1.10.1	MCP en <i>Leishmania</i>	34
1.11	Interacción hospedero-parásito y su utilidad en el tratamiento farmacológico de leishmaniasis	36
1.11.1	Regulación de las vías apoptóticas en la célula infectada.....	37
1.11.2	Regulación de las vías autofágicas en la célula infectada	39
1.12	Mecanismo de acción de los ATLs	41
2	Objetivos	47
3	Materiales y Métodos	49
3.1	Células y condiciones de cultivo	49
3.2	Sustancias químicas	49
3.3	Preparación de Compuestos	50
3.4	Tratamientos	50
3.5	Generación de macrófagos derivados de médula ósea	51
3.6	Ensayo de incorporación de edelfosina	51
3.7	Ensayo de viabilidad de macrófagos	51
3.8	Determinación de anión superóxido	52
3.9	Medición de óxido nítrico	52
3.10	Ensayo de INF- γ	52
3.11	Análisis del contenido de ADN por citometría de flujo	52
3.12	Medición del potencial de membrana mitocondrial y producción de especies reactivas de oxígeno	53
3.13	Tinción con Naranja de Acridina	53
3.14	Infección de macrófagos y evaluación de carga parasitaria	53

3.15	Evaluación de la susceptibilidad in vivo a edelfosina de <i>L. panamensis</i> en el modelo de hámster	54
3.16	Evaluación de la carga parasitaria por dilución límite	55
3.17	Ensayo TUNEL.....	55
3.18	Localización de edelfosina por microscopia de fluorescencia	56
3.19	Ruptura de los microdominios lipídicos raft	56
3.20	Aislamiento de los microdominios lipídicos raft.....	56
3.21	Electroforesis en gel bidireccional	57
3.22	Digestión trípica de proteínas	58
3.23	Determinación de la masa de los péptidos trípticos e identificación de proteínas.....	58
3.24	Transfección de macrófagos J774	59
3.25	Análisis estadístico	60
4	Resultados.....	61
4.1	Acción antiparasitaria de alquilfosfolípidos o éter lípidos antitumorales	61
4.1.1	Células tumorales vs parásitos de <i>Leishmania spp.</i>	61
4.1.2	Comparación de la actividad antileishmania y antitumoral de ATLS ..	62
4.1.3	Actividad de la edelfosina en promastigotes de <i>L. panamensis</i>	63
4.1.4	Inducción de autofagia en <i>L. panamensis</i> por edelfosina	64
4.1.5	Análisis de la fragmentación de ADN inducido por edelfosina	66
4.1.6	Acumulación de edelfosina y muerte de los amastigotes intracelulares de <i>L. panamensis</i>	67
4.1.7	Actividad de los diferentes ATLS en parásitos residentes en macrófagos derivados de médula ósea.	69
4.1.8	Actividad de edelfosina en hámsters infectados con <i>L. panamensis</i>	70
4.1.9	Efecto de edelfosina en las propiedades inflamatorias del macrófago ..	72
4.1.10	Localización subcelular de la edelfosina	75
4.1.11	Papel de la mitocondria en la actividad antileishmania y antitumoral de la edelfosina	76
4.1.12	Efecto de la CsA en la muerte inducida por edelfosina	78
4.1.13	Papel de las especies reactivas de oxígeno en la muerte inducida por edelfosina.....	79
4.1.14	Evaluación del papel de Ca^{2+} citosólico en la muerte inducida por edelfosina.....	80
4.1.15	Edelfosina disminuye los niveles de ATP en <i>L. panamensis</i>	82
4.1.16	Efecto de los inhibidores de la cadena respiratoria en la muerte inducida por edelfosina.....	83
4.1.17	Papel de los microdominios de membrana <i>Lipid Raft</i> en la acción antiparasitaria de la edelfosina.	84
4.1.18	Efecto de la edelfosina en la composición proteica de los <i>lipid rafts</i>	85
4.1.19	Efecto de la inhibición de la F_0F_1 -ATP sintasa en la muerte inducida por edelfosina.....	91
4.2	Espisulosina en promastigotes de <i>L. panamensis</i>	95
4.2.1	ES-285 posee una alta actividad citotóxica contra parásitos de <i>Leishmania</i>	95
4.2.2	Efecto del ES-285 en la morfología y viabilidad de promastigotes de <i>L. panamensis</i> y <i>L. infantum</i>	95
4.2.3	ES-285 induce degradación de ADN en promastigotes de <i>Leishmania spp.</i>	97

4.2.4	Mitocondria en la muerte inducida por ES-285.....	98
4.2.5	Efecto de la CsA en la muerte inducida por edelfosina.....	99
4.2.6	Papel de ROS en la muerte inducida por ES-285.	100
4.2.7	ES-285 disminuye los niveles de ATP en parásitos	101
4.2.8	Evaluación del Ca ²⁺ en la muerte inducida por ES-285	102
4.2.9	Efectos de los inhibidores de la cadena respiratoria en la muerte inducida por ES-285.....	104
4.2.10	Proteínas de la familia Bcl-2 regulan la muerte inducida por ES-285 .	105
4.2.11	ES-285 inhibe la actividad de esfingosina kinasa (SK) en promastigotes de <i>L. panamensis</i>	106
4.2.12	Acción de ES-285 en amastigotes intracelulares de <i>Leishmania</i>	107
4.3	Interacción hospedero-parasito y su implicación en el tratamiento farmacológico de leishmaniasis.....	109
4.3.1	<i>L. panamensis</i> inhibe la muerte en macrófagos y neutrófilos	110
4.3.2	<i>L. panamensis</i> inhibe la apoptosis inducida por Actinomicina D	112
4.3.3	<i>L. panamensis</i> induce autofagia en macrófagos J774	113
4.3.4	La inhibición de autofagia disminuye la carga parasitaria	114
4.3.5	<i>L. panamensis</i> activa PKR y su principal sustrato eIF2 α	116
5	Discusión	119
5.1	Acción antiparasitaria de alquilfosfolípidos o éter lípidos antitumorales...	120
5.2	Acción de episulosina (ES-285) en promastigotes de <i>L. panamensis</i>	125
5.3	Interacción hospedero-parásito y su implicación en el tratamiento farmacológico de leishmaniasis.....	131
6	Conclusiones	139
7	Agradecimientos.....	141
8	Bibliografía.....	145

Abreviaturas

A

AIF *Apoptosis-inducing factor*
APAF-1 *Apoptosis protease-activating factor-1*
Atg *Autophagy (related gene)*
ATL *antitumor lipid*
ATP *Adenosine triphosphate*

B

Bad *Bcl-2-associated death promoter*
BAPTA *1,2-bis(o-aminophenoxy)ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid*
Bid *BH3 interacting domain death agonist*

C

CCCP *Carbonil cianuro m-clorofenilhidrazona*
CMA *Chaperone-mediated autophagy*
CsA *Ciclosporina A*
CTxB *Cholera toxin B subunit*

D

DAPK1 *Death-associated protein kinase 1*
DD *Death domain*
DS *Desviación estándar*
DHE *Dihidroetidina*
DIC *Microscopia de Nomarski o diferencial de contraste de interferencia*
DiOC *Ioduro de 3,3'-dihexiloxocarbocianina*
DISC *Death-inducing signaling complex*
DHA *Dihidroacetona*
DMSO *Dimetilsulfoxido*
DRM *Detergent-resistant membranes*

E

EDLF *Edelfosina*
EDTA *Ethylene-diamine tetraacetic acid*
EGTA *Ethylene glycol tetraacetic acid*

eIF2 α *Eukaryotic initiation factor 2 α*
ETC *Electron transport chain*
Eth *Etidio*
ES-285 *Espisulosina*
ES *Error estándar*

F

FAD+ *Falvin adenine dinucleotide*
FADD *Fas-associated death domain-containing protein*
FasL *Fas ligando*

G

GFP *Green fluorescent protein*
GPI *Glicosil inositol fosfolípido*
GM1 *Gangliosido M1*
GPI *Glicosil fosfatidil inositol*
GP63 *Glicoproteína 63*
GR *Glutación reductasa*
GSH *Glutación*
GTP *Guanosine triphosphate*

H

HRI *Heme-regulated eIF2 alpha kinase*
HTRA2 *High temperature requirement protein A2*

I

IAP *Inhibitor of apoptosis family of proteins*
IFN *Interferón*
IMS *Intermembrane space*
IP *Ioduro de propidio*

J

JK *Jurkat*
JNK *c-Jun N-terminal kinase*

L

LPC *Lysophosphatidylcholine*

LPG Lipofosfoglicano

M

MALDI *Matrix-assisted laser desorption/ionization*
M-CSF *Macrophage colony-stimulating factor*
MDC Monodansilcadaverina
MDMO Macrófagos derivados de médula ósea
MOMP *Mitochondria outer membrane permeabilization*
MVB *Multivesicular body*
mTOR *Mammalian target of rapamycin*
MVT *Multivesicular tubule*
MS Espectometria de masas
M β CD Metil β -ciclodextrina

N

NAD+ *Nicotinamide adenine dinucleotide*
NCCD *Nomenclature committee on cell death*
NK *Natural killer*
NO *Nitric oxide*
NOS *Nitric oxide synthase*

O

OVA Orgánulos vesiculares ácidos

P

PC *Phosphatidylcholine*
PE *Phosphatidylethanolamine*
PFA Paraformaldehído
PGK *Phosphatidylglycerate kinase*
PPG *Proteophosphoglycane*
PTPc *Permeability transition pore complex*
PS *Phosphatidylserine*
 $\Delta\psi_m$ Potencial de membrana mitocondrial

R

REDOX *Reduction-oxidation*
ROS *Reactive oxygen species*

S

S1P *Sphingosine 1 phosphate*

T

TLR *Toll like receptor*
TNF *Tumor necrosis factor*
TOF *Time of flight*
TRAIL *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*
TUNEL *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling*

1 Introducción

Con la idea de describir los aspectos que han ayudado a comprender la leishmaniasis, en la introducción de la presente tesis se expondrán algunas características biológicas del parásito, posteriormente se realizará una descripción de los aspectos epidemiológicos e inmunopatológicos que caracterizan la enfermedad. Además se hará una descripción de los medicamentos y mecanismos de control utilizados. Posteriormente se describirán los mecanismos de muerte celular programada conocidos en metazoos para concluir con los mecanismos de muerte descritos en *Leishmania* y su relevancia en la patogénesis de la enfermedad. Finalmente se realizará una descripción de la interacción hospedero-parásito y su papel en la regulación de procesos de muerte celular.

1.1 Leishmaniasis: generalidades de la enfermedad y descripción del agente etiológico

1.1.1 Leishmaniasis

La Leishmaniasis comprende un grupo de enfermedades causadas por parásitos protozoos del género *Leishmania* (1), transmitidas por la picadura de un insecto vector hematófago. Este complejo grupo de enfermedades dependiendo de la especie de *Leishmania* infectante y del sistema inmune del hospedador, puede causar desde lesiones cutáneas ulcerativas, lesiones mucocutáneas desfigurantes, hasta una forma visceral que puede causar la muerte.

Hasta hace poco, el impacto en la salud pública de la leishmaniasis fue subestimado. Durante los últimos 10 años, las regiones endémicas se han extendido y se ha producido un fuerte incremento en el número de casos registrados de la enfermedad. Las leishmaniasis aparecen en regiones tropicales y subtropicales de 98 países de diversos contextos geográficos en todos los continentes excepto en la Antártida, con una prevalencia mundial que sobrepasa los 20 millones de enfermos, y se estima que la incidencia oscila entre 1.5 millones de casos nuevos por año para la leishmaniasis

cutánea y 500.000 nuevos casos para la visceral. Además, un número importante de casos no se registran, ya que la notificación de la enfermedad sólo es obligatoria en 32 de los 98 países afectados (<http://www.who.int/tdr/svc/diseases/leishmaniasis>). La población en riesgo se eleva a 350 millones de personas (2, 3). Actualmente cobra especial interés el hecho de que no todas las personas infectadas por *Leishmania* manifiestan la enfermedad, y algunas sólo la desarrollan en condiciones de inmunosupresión. En este sentido, presenta gran importancia la coinfección de *Leishmania*-VIH, la cual está emergiendo, especialmente en el sur de Europa, donde un 25-70% de los casos de leishmaniasis visceral están relacionados con la inmunosupresión (4, 5).

1.1.2 Taxonomía de *Leishmania*

Son parásitos protozoos pertenecientes a la familia *Trypanosomatidae*. Esta pertenece al orden Kinetoplástida y se caracteriza por la presencia de una región donde se concentra el ácido desoxirribonucleico (ADN) mitocondrial, denominada kinetoplasto, localizada en la única mitocondria que presentan estos parásitos. Aunque los patógenos pertenecientes al grupo de los tripanosomátidos presentan una organización genómica y estructuras celulares similares y todos están sometidos a cambios morfológicos durante sus ciclos de vida, las distintas especies causan enfermedades humanas diversas y son transmitidas por insectos vectores diferentes. Actualmente son conocidas unas 30 especies de *Leishmania*, de las cuales, unas 20 pueden causar enfermedad en humanos (Figura 1) (6).

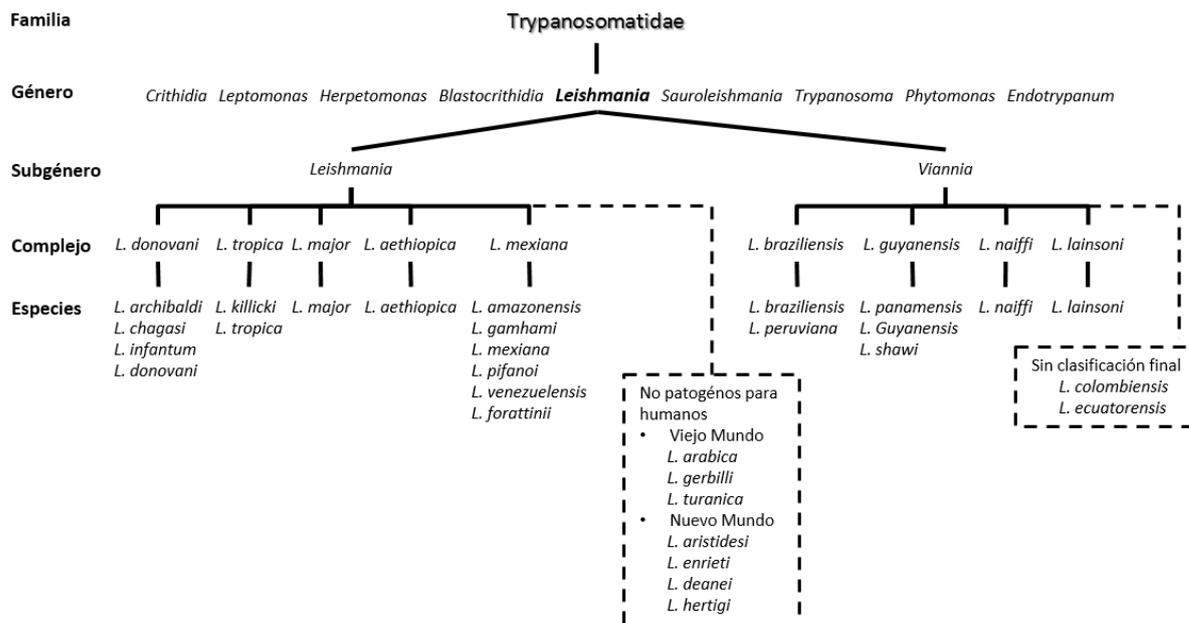


Figura 1. Taxonomía de *Leishmania*, WHO 2010 (7).

1.2 Morfología y ciclo de vida

1.2.1 Morfología

Su morfología está determinada por un ciclo de vida muy complejo, es digenético, el parásito está expuesto a ambientes extracelulares en su hospedador invertebrado y ambientes intracelulares en su hospedador vertebrado. Presenta dos formas, promastigote y amastigote, que son morfológica y bioquímicamente distintas. La forma extracelular, el promastigote, se desarrolla en el intestino del hospedero invertebrado, y constituye la forma infectiva para el hospedero vertebrado. Visto al microscopio electrónico muestra un núcleo central, ribosomas, retículo endoplasmático, aparato de Golgi, una única mitocondria y el kinetoplasto que aparece como un cuerpo electrodensito en la zona anterior. La forma amastigote, no flagelada e intracelular, se replica en los macrófagos del hospedador vertebrado. Estas formas presentan un núcleo central y un kinetoplasto alargado, pudiéndose apreciar la existencia de bolsillo flagelar y un flagelo muy corto, que no sobresale de la bolsa flagelar (Figura 2).

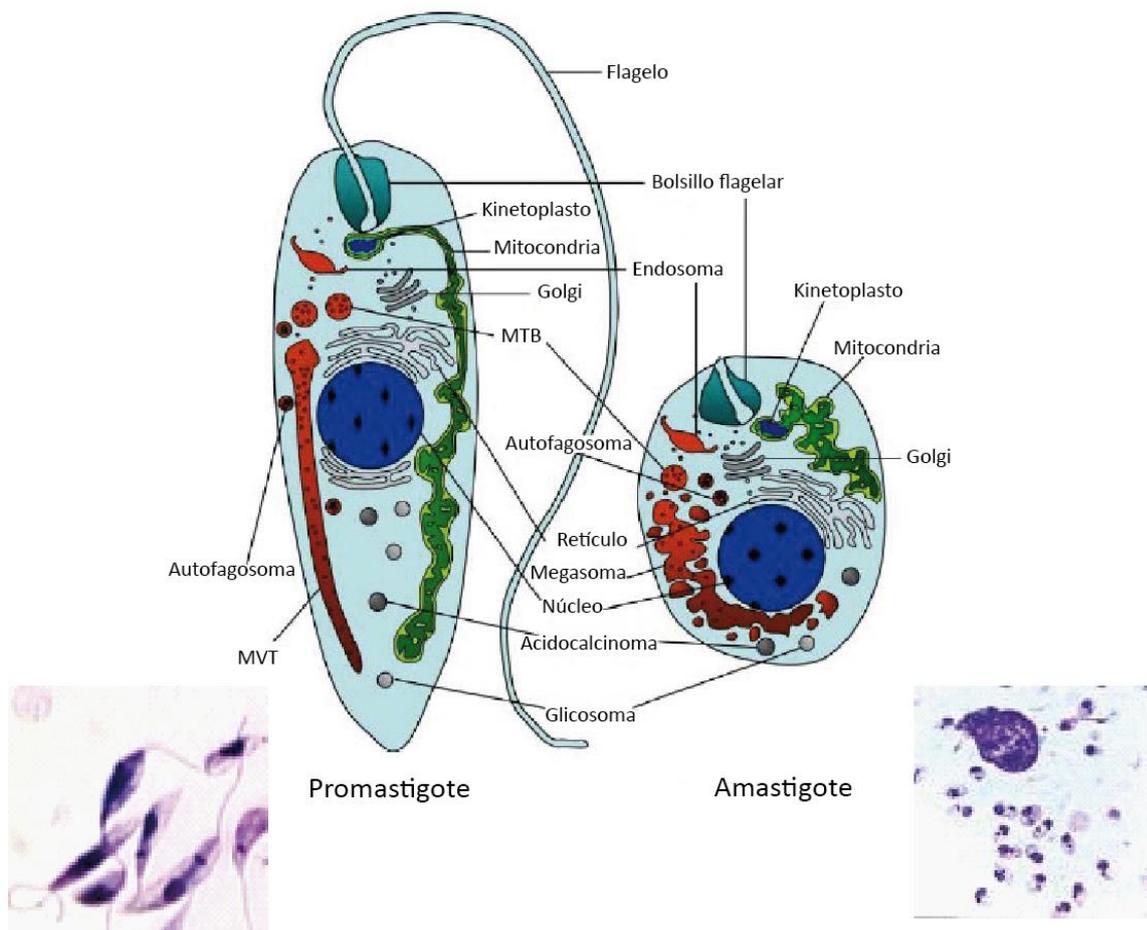


Figura 2. Morfología de las formas parasitarias. El promastigote (izquierda), forma extracelular, es alargado, flagelado de 15 a 30 μm ; mientras que el amastigote (derecha), forma intracelular, es redondeado de 2 a 6 μm . Representación esquemática de los principales orgánulos intracelulares de *Leishmania* en sus diferentes formas parasitarias. El bolsillo flagelar marca el extremo anterior del parásito. MVT; Tubulo multivesicular, MVB; cuerpos multivesiculares. Figura adaptada de Besteiro *et al*, 2007 (8).

1.2.2 Ciclo de vida

Su ciclo comienza cuando el parásito es transmitido por la picadura del insecto vector. Éste cuando se alimenta de un hospedero vertebrado inyecta con su saliva la forma infectiva de promastigote metacíclicos. Estos son fagocitados por las células del linaje monocito/macrófago e incluidas en una vacuola parasitófora, donde se diferencian a su forma amastigote y se multiplican. Aunque el macrófago es considerado su célula hospedera canónica, los neutrófilos (9-11) y fibroblastos (12) también han sido descritos como células que albergan *Leishmania*. Los amastigotes de *Leishmania*, se multiplican por fisión binaria dentro de la vacuola parasitófora, hasta que el macrófago

es lisado, liberando multitud de amastigotes que proceden a infectar nuevas células, amplificando la infección, desencadenando el daño tisular y provocando la patología. Aunque no son claros los mecanismos que causan el movimiento del parásito del área de la infección a otros sitios del cuerpo (como bazo, hígado, medula ósea o mucosas), se sugiere que las células infectadas pueden actuar como vehículos de difusión del parásito (13).

El ciclo continúa cuando el insecto vector ingiere sangre de un hospedero parasitado. Así, el insecto adquiere células infectadas con amastigotes. Dentro del intestino del vector, los amastigotes se diferencian en promastigotes procíclicos al cabo de 12-28 horas después de la alimentación del insecto. Después, estos migran y se adhieren a las paredes del intestino del vector, donde se dividen como formas procíclicas, altamente replicativas y poco infecciosas. Adherido al epitelio intestinal del vector, el parásito sufre un proceso de diferenciación que le permitirá migrar al aparato picador del vector, liberarse del epitelio del insecto y resistir a las condiciones adversas a las que se enfrentará cuando se encuentre en el tejido del hospedero mamífero. Este proceso de diferenciación es conocido como metacicloogénesis y la forma resultante de dicho proceso se denomina promastigote metacíclico, el cual posee una alta capacidad infectiva (14). La metacicloogénesis implica cambios bioquímicos y moleculares implicados en la interacción hospedero-parásito, incluyendo el lipofosfoglicano (LPG) y la principal proteasa, la glicoproteína superficie GP63 (15). Una vez terminada la metacicloogénesis, los promastigotes diferenciados se desprenden del epitelio intestinal del vector y migran hacia el aparato picador donde permanecerán hasta ser inoculados al mamífero con la siguiente ingesta de sangre (Figura 3).

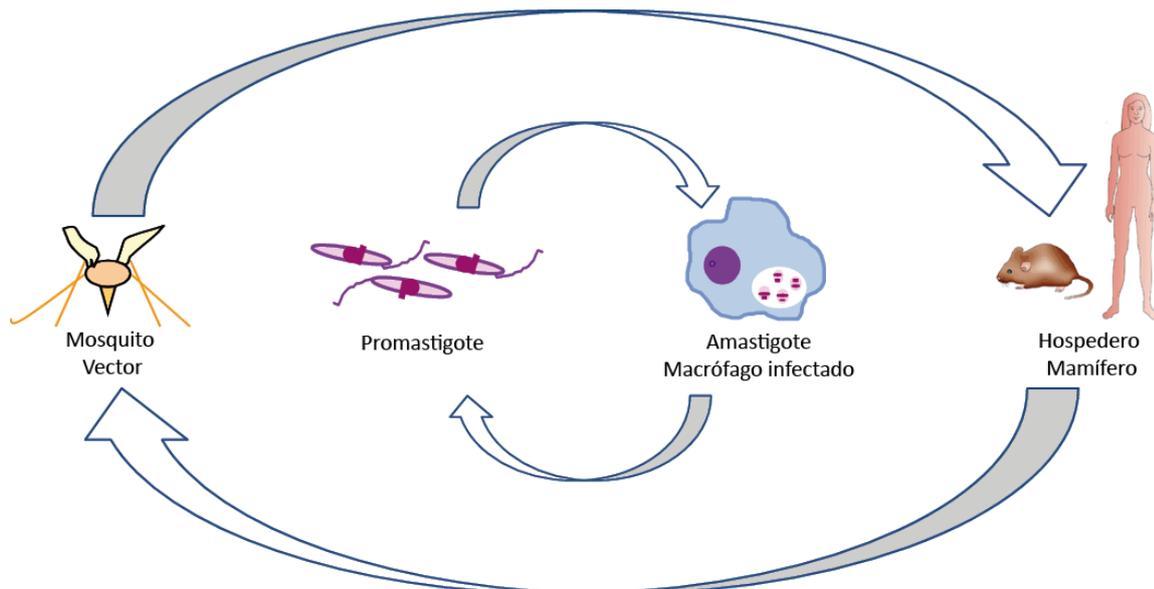


Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania*. Los promastigotes metacíclicos son inoculados con la picadura del vector infectado. Luego, en el tejido del mamífero estos promastigotes son fagocitados por macrófagos tisulares. Dentro del macrófago, los promastigotes se diferencian a su forma amastigote la cual puede proliferar en el mamífero. La replicación de los amastigotes lleva a la lisis del macrófago, permitiendo la liberación de los amastigotes que, posteriormente, podrán infectar más macrófagos y amplificar así la infección. Cuando la hembra del flebótomo se alimenta del mamífero parasitado puede ingerir amastigotes, produciendo la infección del vector. Dentro del intestino del vector, los amastigotes se diferencian a promastigotes procíclicos que se replican y se adhieren al epitelio intestinal. Posteriormente, los promastigotes procíclicos se diferencian a promastigotes metacíclicos a través del proceso conocido como metaciclogénesis. Este proceso les permitirá liberarse del epitelio intestinal y migrar al aparato picador para ser inoculados con la siguiente ingesta de la hembra del flebótomo.

1.3 Establecimiento de la infección

Después que los promastigotes se introducen en el torrente sanguíneo del hospedero vertebrado, se deben cumplir varias premisas para que se lleve a cabo el establecimiento de la infección como son: la acción de factores de virulencia sobre el macrófago y la interacción del parásito con la respuesta inmune del hospedero. Para ello los promastigotes metacíclicos, inoculados por el insecto, deben ser capaces de interactuar y penetrar en los macrófagos, así como evitar su destrucción eludiendo la respuesta inmunológica innata desencadenada ante su presencia (16). La primera barrera que debe superar *Leishmania* es el sistema del complemento, sin embargo, este parásito no solo es capaz de resistir la lisis del complemento, sino que utiliza algunos de sus componentes para conseguir la entrada en los macrófagos. Su resistencia a la lisis se debe a las modificaciones que sufren las moléculas de LPG en estas formas del parásito; así, esta densa cubierta presente en las formas metacíclicas impide la penetración del complejo de ataque a membrana C5-C9 (17). Por otro lado, en los parásitos metacíclicos

existe una elevada expresión de GP63 que también inhibe la lisis mediada por el complemento, al cortar C3b en la forma inactiva C3bi (18).

La principal célula hospedadora de *Leishmania* son los macrófagos, que cumplen un doble papel en la infección cursada por el parásito. Por un lado, el establecimiento de la infección depende de que el parásito sea fagocitado por los macrófagos, y por otra parte, el macrófago es la principal célula implicada en su destrucción. La interacción del parásito con el macrófago está mediada por un gran número de receptores. Tanto el LPG (19), como la GP63 (20) permiten que la proteína C3 del complemento se una a la superficie del parásito y que sea reconocida por receptores del complemento presentes en los macrófagos, favoreciendo así la opsonización del parásito. Los parásitos opsonizados entran al macrófago por endocitosis, esto es posible en parte gracias a la acción de la GP63 que degrada la proteína C3b (forma activa de la proteína C3) del complemento, transformándola en C3bi y previniendo de esta forma la lisis del parásito (21). La activación de complemento favorece la liberación de las anafilotoxinas C3a y C5a, que son potentes agentes quimiotácticos para los neutrófilos y monocitos.

La vía a través de la cual *Leishmania* entra en el macrófago se denomina fagocitosis mediada por receptores. La superficie de los promastigotes está recubierta por el glicocalix, compuesto por proteínas de anclaje a glicofosfatidilinositol (GPI) y glicolípidos en general, entre los que se encuentran mayoritariamente el LPG. Se ha demostrado que el LPG juega un papel fundamental en la infección de los macrófagos (22), aunque el resto de los componentes también han demostrado influir en la virulencia de los promastigotes sobre las células hospedadoras, estando implicados en la adhesión de los parásitos a la membrana plasmática del macrófago (23, 24). Sin embargo, existe otro mecanismo mediante el cual el parásito llega al interior del macrófago, el cual radica en la fagocitosis de neutrófilos que previamente habían fagocitado a los promastigotes (25) (Figura 4). Cuando el mosquito pica, crea una pequeña herida, lo que provoca el inicio de una respuesta inflamatoria local y el reclutamiento de neutrófilos y monocitos (26). Además los promastigotes inducen en los macrófagos la secreción de MCP-1 y CXCL1, los cuales son agentes quimioatrayentes de monocitos y neutrófilos, respectivamente. Esto ocasiona una rápida invasión de neutrófilos por los promastigotes, iniciando así el proceso infeccioso. En este mecanismo se ha visto que juega un papel importante la

presencia de parásitos apoptóticos, de tal forma que se inhiben los mecanismos de respuesta antimicrobianos del neutrófilo así como la respuesta inflamatoria (27). Al cabo de 2-4 días, estos neutrófilos infectados por *Leishmanias* vivas en gránulos citoplásmicos (28) se vuelven apoptóticos exponiendo en su superficie moléculas como fosfatidilserina (PS), lo que facilita el reconocimiento por los macrófagos quienes acaban fagocitándolos. El neutrófilo en este caso actuaría como un “Caballo de Troya”, permitiendo así la entrada de los parásitos en los macrófagos sin que se inicie una respuesta microbicida (29). Otro estudio sostiene que el neutrófilo infectado no es fagocitado sino que libera al parásito para que éste penetre en el macrófago (30). Una vez en el interior del macrófago, *Leishmania* se protege de su degradación en el fagolisosoma, inhibiendo mecanismos de defensa tales como la señalización celular y la producción de enzimas hidrolíticas, citoquinas y metabolitos tóxicos (16). Además, se ha demostrado su resistencia a formas reactivas de oxígeno (31, 32) (Figura 4).

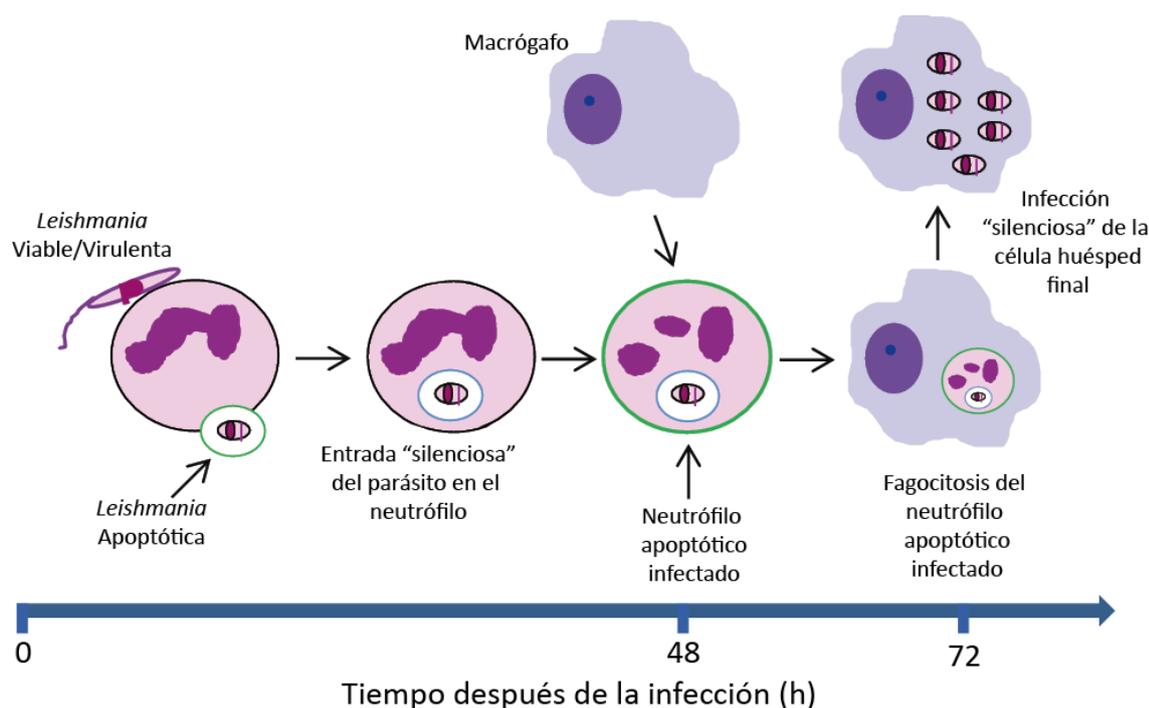


Figura 4. Primeras etapas de la infección con *Leishmania*. 1. El inóculo virulento de promastigotes de *Leishmania* se compone de dos poblaciones, parásitos viables y apoptóticos. El contacto del neutrófilo con los parásitos muertos, lleva a silenciar las funciones del neutrófilo y, en consecuencia, los promastigotes no apoptóticos sobreviven en el neutrófilo. 2. La infección retrasa la apoptosis del neutrófilo, volviéndose apoptótico aproximadamente a las 48 h después de la infección. 3. Los monocitos/macrófagos migran al sitio de la infección. 4. Los neutrófilos infectados apoptóticos son fagocitados por los macrófagos. 5. La fagocitosis de los neutrófilos apoptóticos ejerce un efecto de silenciamiento sobre las funciones del macrófago y, en consecuencia, los parásitos sobreviven dentro del macrófago. Tomado de Laskay *et al.* 2008 (29).

Los promastigotes de *Leishmania* son capaces de retener GTPasas de la familia Rho en la membrana del fagosoma, con el consiguiente reclutamiento de moléculas de F-actina en la membrana perifagosomal, lo cual evita la fusión endosoma-lisosoma, evitando la maduración de este (33). Sin embargo, una vez diferenciadas a formas amastigotas, o en el caso de infecciones por estas formas, la vacuola parasitófora adquiere características de comportamiento endosomal/lisosomal, repleta de enzimas hidrolíticas y un pH ácido. El parásito posee mecanismos para adaptarse gracias a varias características, como actividad proteasa capaz de destruir enzimas del huésped con capacidad microbicida y un incremento de la actividad reguladora del pH intracelular. Además, se reconoce que la formación y maduración de la vacuola parasitófora es un proceso dinámico que implica un intercambio continuo de metabolitos y macromoléculas entre parásito y hospedero (22). Se ha descrito que macromoléculas y metabolitos de bajo peso molecular, necesarios para el desarrollo de los amastigotes, llegan a la vacuola parasitófora a través de la fusión de endosomas, fagosomas y autofagosomas o bien pueden ser transportados a través de la membrana de la vacuola (23). Se postula que el tropismo de estos parásitos hacia los macrófagos está relacionado con los complejos requerimientos metabólicos de las formas amastigotes, para las cuales el medio rico en aminoácidos del fagolisosoma permitiría su desarrollo intracelular (22).

1.4 Respuesta inmune

Las infecciones por *Leishmania* generalmente inducen una respuesta inmune muy compleja que varía según la especie de *Leishmania* implicada en el proceso infeccioso, la forma clínica de la enfermedad y la cronicidad de la misma, lo que genera un espectro de respuestas inmunes que incluyen desde mecanismos de inmunidad innata, como reacciones inflamatorias, y mecanismos de inmunidad específica mediados por células o por anticuerpos. Sin embargo, los diferentes mecanismos de respuestas inmunes implicados durante la infección por *Leishmania* no siempre aparecen ni se desarrollan simultáneamente.

En el comienzo de la respuesta inmune a *Leishmania*, los receptores tipo Toll (TLR del inglés "*Toll-like receptor*"), presentes en macrófagos, células dendríticas y asesinas

naturales (NK del inglés *natural killer*) reconocen moléculas presentes en la superficie del parásito, como el LPG, e inducen la producción de citoquinas proinflamatorias como el TNF- α , IFN- γ e IL-12, así como moléculas coestimuladoras (34). Las células dendríticas también fagocitan parásitos para realizar la presentación antigénica, y debido a su capacidad de migrar desde el sitio de la infección hasta los nódulos linfáticos, éstas son consideradas las principales transportadoras de antígenos del parásito al ganglio linfático donde estimulan células T. La activación de los linfocitos T, puede llevar a la diferenciación tanto de células T CD4 tipo 1 (Th1) o de tipo 2 (Th2). Este tipo de células se distinguen según el tipo de citoquinas que secretan; las Th1 secretan citoquinas activadoras de inmunidad mediada por células, como IFN- γ , mientras que las células Th2 secretan citoquinas como IL-4, que promueven la respuesta humoral, mediada por anticuerpos.

Tal como se conoce en el modelo murino de infección con *L. major*, la respuesta Th1 es el elemento clave para prevenir la infección por *Leishmania* (35). En ratones C57BL/6 resistentes a la enfermedad se desarrolla una respuesta tipo Th1 con producción de IFN- γ , esta secreción activa los macrófagos y los estimula a producir óxido nítrico (NO), mediante la inducción de la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS). El IFN- γ también regula los niveles de expresión de receptores de superficie como el receptor de manosa y el receptor CR3 (34), que son los receptores que el macrófago utiliza para la internalización del parásito. Además, el TNF- α y la IL-12 sinergizan con el IFN- γ para activar la iNOS. Esto provoca la activación del macrófago y favorece la muerte del parásito (34, 35). Los ratones BALB/c susceptibles desarrollan una respuesta tipo Th2 con secreción de IL-4, IL-5 además de IL-10 que provoca la activación de linfocitos B con la formación de anticuerpos, principalmente IgG, que son incapaces de contrarrestar al parásito intracelular por lo que la enfermedad se disemina. Las células Th2 activan la arginasa 1 en los macrófagos con la consecuente degradación de L-arginina en L-ornitina y urea (36). Esto al final reduce la disponibilidad de arginina para la síntesis de NO y aumenta la concentración de poliaminas, que son nutrientes esenciales para el crecimiento intracelular del parásito (37). También la IL-4 disminuye la expresión de la subunidad β 2 de los receptores de la IL-12 en células Th1 potencialmente protectoras. Como resultado, los parásitos no son eliminados y además se aseguran nutrientes para

favorecer su crecimiento (35). En la Figura 5, se ilustran los diferentes componentes del sistema inmune que participan en la resolución de la infección o en el desarrollo de la enfermedad (Figura 5).

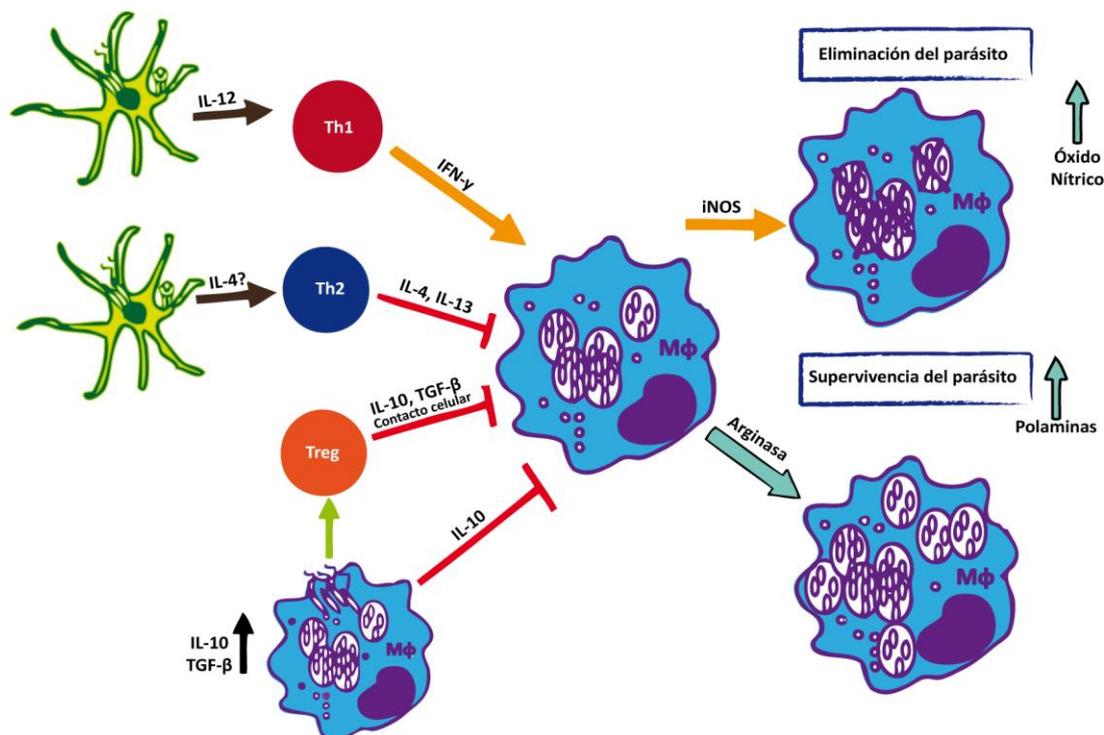


Figura 5. Respuesta inmune frente a *Leishmania*. Después de la infección, las células dendríticas infectadas pueden producir IL-12, citoquina crítica para el desarrollo de células CD4⁺ productoras de IFN- γ (Th1). El IFN- γ activa los macrófagos infectados, aumentando iNOS, la cual ayuda a la producción de NO y radicales libres, que son importantes en la eliminación del parásito intracelular. Por otro lado, la producción de IL-4 conlleva al desarrollo de células CD4⁺ productoras de IL-4 e IL-13 (Th2), conduciendo al aumento de la actividad arginasa, activación alternativa del macrófago y producción de poliaminas, que favorecen la proliferación intracelular de *Leishmania*. Además, las células T reguladoras naturales y macrófagos infectados también producen algunas citoquinas inmunoreguladoras, como la IL-10 y el TGF- β , que desactivan el macrófago evitando la muerte del parásito. Adaptado de Liu *et al*, 2012 (35).

1.5 Tratamiento

Enfermedades infecciosas tales como malaria, tripanosomiasis y leishmaniasis son clasificadas por la OMS como “enfermedades abandonadas”, porque han sido completamente olvidadas por los gobiernos y la industria farmacéutica. Además, el tratamiento de la leishmaniasis es complicado debido a las diferentes especies de *Leishmania* y a la variedad de manifestaciones clínicas existentes. Al no existir una vacuna eficiente frente a estas enfermedades, el tratamiento farmacológico se convierte en la principal herramienta para combatir las. Al día de hoy, existen cerca de 25 compuestos que muestran efecto anti-*Leishmania*, pero sólo unos pocos de ellos se

encuentran clasificados como sustancias válidas para tratamiento en humanos. Además, los compuestos disponibles en la actualidad aparte de ser pocos, tienen serias limitaciones, debido a la falta de supervisión de los enfermos en las zonas de transmisión, la pérdida de eficacia, toxicidad y efectos secundarios, así como a su alto coste. Por otro lado es bien conocido el desarrollo de resistencias a las distintas quimioterapias. A pesar de todo, la situación actual de la quimioterapia frente a la leishmaniasis es más alentadora de lo que venía siendo en las décadas pasadas, debido a la existencia de nuevos fármacos en distintas fases de desarrollo.

Antimoniales: El antimonio pentavalente ha sido el compuesto de primera línea para la leishmaniasis desde hace 80 años (Pentostan®, Neotibosan® y Glucantime®). Es una pro-droga, la cual requiere ser reducida a su forma activa trivalente. Su administración es vía parenteral en dosis de 20 mg/kg/día durante 10 a 30 días. Su mecanismo de acción no se conoce por completo, pero se sabe que inhibe la tripanotión reductasa, la oxidación de los ácidos grasos, así como la formación de ATP y GTP (38). Son bastante tóxicos, cuyos efectos secundarios pueden llegar a ser mortales (3 al 6%), pudiendo provocar arritmias cardíacas y pancreatitis aguda. A esto hay que añadir el desarrollo de resistencias reportado en los últimos años.

Anfotericina B: Ha venido usándose como el fármaco de segunda línea, conocido comercialmente como Fungizone®. Es un antibiótico poliénico y fungicida de amplio espectro. La posología es de 1 mg/kg/día durante 20 días (38). Es selectivo frente a hongos, *Leishmania* y *Tripanosoma*, debido a su gran afinidad por ergosterol (predominante en estos microorganismos). La anfotericina B se agrega y forma canales en la membrana del parásito provocando la pérdida de iones y solutos intracelulares, llevándolo finalmente a la muerte. Entre sus efectos secundarios se encuentran la fiebre, resfriado, dolor de huesos y a largo plazo puede causar hipopotasemia o nefrotoxicidad. La anfotericina B liposomal (AmBisome®), ha mejorado su actividad y ha reducido los efectos secundarios, siendo considerada como el mejor fármaco para leishmaniasis visceral, y es usada como el tratamiento de primera línea en Europa y Estados Unidos, caso que no es posible en los países en desarrollo debido a su costo elevado (39).

Pentamidina: Es uno de los fármacos utilizados como segunda opción si los antimoniales no son efectivos, siendo comercializado como lomidine®. Su mecanismo

de acción parece implicar la inhibición de la síntesis del DNA, y afecta la morfología del kinetoplasto y el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) (40). Su administración es parenteral y la aparición de resistencia es muy rápida, por lo cual su uso se ha visto disminuido (38).

Paramomicina: Es un antibiótico aminoglucósido también conocido como aminosidina. Se presenta como una alternativa eficaz, segura y económica. Se ha utilizado en ensayos clínicos de fase III, administrado por vía parenteral en el tratamiento de la leishmaniasis visceral (14-16 mg/kg/día por 3 semanas), y de forma tópica o parenteral en la forma cutánea. Aunque este fármaco posee una gran actividad frente a patógenos (41), algunas cepas de *Leishmania* en zonas de África se han mostrado resistentes a este fármaco. En lo que respecta a su toxicidad se han observado algunos casos de signos subclínicos de ototoxicidad y nefrotoxicidad.

Azoles: Es uno de los fungicidas que se han utilizado en ensayos clínicos. Inhiben la síntesis del ergosterol al inhibir el citocromo P450. Así, compuestos como ketoconazol, itraconazol y el fluconazol, han despertado gran interés como leishmanicidas. El problema reside en que los amastigotes son capaces de captar esteroides, como colesterol del macrófago, disminuyendo así drásticamente su efectividad (42).

Alopurinol: Es utilizado en el tratamiento de la gota. Es un análogo de purinas e interfiere con la síntesis de RNA. Es utilizado principalmente en leishmaniasis canina, ya que en humanos los resultados no han sido tan eficaces. Este compuesto se ha utilizado en combinación con antimoniales o anfotericina B.

Sitamaquina: Es una 8-aminoquinoleína, con amplio espectro de actividad frente a protozoos (43). Su uso se ha visto limitado por problemas de toxicidad hematológica. Su mecanismo de acción es desconocido, aunque se sabe que su localización dentro del parásito es en los acidocalcisomas (44).

Alquifosfolípidos: Los denominados lípidos sintéticos antitumorales (ATLs, *antitumor lipids*) o análogos alquifosfolípidos, que fueron sintetizados como análogos metabólicamente estables de la lisofosfatidilcolina (LPC), constituyen una prometedora familia de compuestos con actividad antitumoral y antiparasitaria, que a diferencia de la mayoría de los antitumorales utilizados en clínica no tiene como diana el ADN, sino que actúan al nivel de la membrana celular (45, 46). Los ATLs pueden clasificarse en dos

grandes categorías: a) fosfolípidos alquiléter, conocidos colectivamente como éter lípidos antitumorales o análogos de alquil-lisofosfolípidos, de los que su prototipo es la edelfosina; y b) alquilfosfocolinas, de las que su prototipo es la miltefosina (45, 46).

La miltefosina ha demostrado hasta el momento ser el más eficaz ATL tanto en promastigotes como en amastigotes (47, 48), y es el único ATL que se comercializa como fármaco leishmanicida con una alta efectividad en leishmaniasis visceral como cutánea. Sin embargo, resultados recientes han demostrado que la edelfosina también posee una significativa actividad frente distintas especies de *Leishmania* (49). Aunque el mecanismo de acción de los ATLs en parásitos todavía permanece por ser elucidado, se ha reportado que el metabolismo lipídico (50) y la mitocondria (51) se ven afectados.

A pesar de años de investigación invertidos, el desarrollo de una vacuna efectiva contra estos parásitos sigue siendo un objetivo por cumplir. Por lo cual, el manejo clínico de estas enfermedades en la actualidad se basa en la quimioterapia. Sin embargo, los fármacos convencionales están lejos de satisfacer la demanda actual de las poblaciones endémicas debido a su alto costo, toxicidad y generación de resistencia, lo que conlleva a la necesidad urgente de identificar y desarrollar nuevas alternativas terapéuticas. Ante la urgencia de encontrar nuevos fármacos, se vienen estudiando nuevos compuestos o fármacos utilizados frente a otras patologías, los cuales han mostrado tener efecto leishmanicida. Así mismo, la terapia combinatoria utilizando fármacos disponibles con potencial actividad sinérgica se postula como la primera opción para retrasar el desarrollo de resistencias, disminuir las dosis y el tiempo de tratamiento, y aumentar la actividad antiparasitaria, con el consiguiente beneficio para el enfermo y la reducción del coste directo de la enfermedad.

1.6 Biología del parásito

La identificación de nuevos agentes requiere un gran conocimiento acerca de la biología del parásito a nivel molecular y bioquímico. Los grandes avances en genómica y proteómica, junto con las herramientas bioinformáticas han generado información detallada de interés biológico en general. Los parásitos protozoos son también de interés desde el punto de vista de la biología celular, ya que poseen estructuras y

orgánulos citoplasmáticos especiales. Diferentes estudios han revelado que existen vías metabólicas únicas en estos orgánulos, presentan peculiaridades moleculares y bioquímicas que las diferencian del resto de organismos eucariotas, abriendo así posibilidades para la identificación de nuevas dianas terapéuticas y nuevos compuestos farmacológicos (52, 53).

Varias de las características más notables del parásito *Leishmania* se describen a continuación:

- a) El genoma se encuentra completamente secuenciado para las especies de *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. major*, *L. mexicana* y *L. tarentolae* (*Leishmania* Genome Network, www.genedb.org, *Kinetoplastid Genomisc Resource*, www.tritrydb.org). Este es un organismo diploide, en donde las especies del “Viejo Mundo” tienen 36 pares de cromosomas (54), mientras que las especies del “Nuevo Mundo” tienen entre 34-35 pares de cromosomas, con los cromosomas 8 y 29, y 20 y 36 fusionados en *L. mexicana*, y 20 y 34 en *L. braziliensis* (54).
- b) Poseen un orgánulo llamado kinetoplasto en el que se concentra todo el ADN de su única mitocondria localizado cerca del flagelo. El kinetoplasto está compuesto por una red altamente organizada de miles de círculos concatenados y aplanados que constituyen entre el 10 y 15 % del ADN del parásito. Estos círculos se pueden dividir en maxicírculos (35–50 kb) en donde se codifican las subunidades de los complejos respiratorios de la mitocondria, y minicírculos (0.8–1.6 kb) que codifican los pequeños ARNs indispensables para la corrección del RNA. Esta estructura está localizada dentro de la matriz mitocondrial y se encuentra unida a la base del flagelo (55).
- c) En tripanosomátidos, en general, la transcripción de los genes es policistrónica, generándose unos RNAs inmaduros que contienen más de un gen, al igual que ocurre en organismos procariotas. Hasta el momento, no se han descrito promotores para RNA polimerasa II, aunque el parásito posee homólogos de las tres RNA polimerasas nucleares (I, II y III) de eucariotes superiores. La transcripción parece ser iniciada en las zonas que separan las agrupaciones de genes, a las que se denomina regiones *switch*, generándose transcritos de enorme tamaño que contienen la información de decenas o cientos de genes. Los policistrones deben ser procesados

para generar los transcritos maduros individuales y funcionales. Durante el procesamiento de los policistrones a mRNAs maduros deben ocurrir dos pasos prioritarios: el primero es la adición de un exón de aproximadamente 20 nucleótidos común a todos los mRNA que codifican para proteínas, al que se denomina mini-exón; y el segundo paso es la poliadenilación. La transferencia del mini-exón al mRNA en el procesamiento ocurre mediante un mecanismo de *trans-splicing*, durante el cual el mini-exón es donado por otro RNA conocido como RNA líder (slRNA), cuyo gen se encuentra repetido unas 200 veces en el genoma. La adición de la cola de poli-A en el extremo 3' del RNA se realiza de forma simultánea al *trans-splicing*. Ambos procesos están acoplados, de manera que el *trans-splicing* de un mRNA se produce de forma simultánea con la poliadenilación del mensajero que le antecede en el policistrón (56, 57).

- d) La mayoría de RNAs mitocondriales tienen un proceso denominado edición de RNA mitocondrial o RNA *editing*. Este es un procesamiento post-transcripcional durante el cual la secuencia del RNA mensajero se modifica, insertando y eliminando nucleótidos de uracilo. Se crean así codones de iniciación y terminación, así como la secuencia que codifica la proteína a traducir. En este proceso está implicado además de los RNAs guía un complejo multiproteico denominado editosoma el cual cataliza los diferentes pasos que componen el mecanismo de edición (58).
- e) La *Leishmania* al desarrollarse en dos ambientes totalmente diferentes durante su ciclo de vida, posee diferencias en el metabolismo de los dos estadios. Los promastigotes, quienes se desarrollan en el intestino del mosquito, utilizan aminoácidos y azúcares como fuente principal de energía en condiciones aeróbicas, y su medio óptimo es a 25-27°C y pH 7. Los amastigotes proliferan en el interior de los fagolisosomas de los macrófagos del hospedero vertebrado a 37°C y pH 4.5, en donde su principal fuente de energía son los ácidos grasos de cadena larga, metabolizándose por β -oxidación hasta CO₂ y agua. A pesar de estas diferencias, sus diferentes estadios comparten características metabólicas que difieren de las de su hospedero vertebrado, lo que es de gran interés al permitir seleccionar dianas farmacológicas exclusivas del parásito en el diseño de nuevos tratamientos (59).

- f) En *Leishmania*, al igual que en otros protozoos existen orgánulos exclusivos de estos parásitos como lo son el glicosoma y los acidocalcisomas, convirtiéndolos en posibles dianas terapéuticas (60). Los glicosomas son los equivalentes a peroxisomas del resto de organismos. Son organelas formadas por una membrana simple que engloba una matriz electrodensa de proteínas. Estos contienen las enzimas necesarias para realizar la glucólisis, que catalizan la fermentación de glucosa a succinato (61). Además, se encuentran enzimas implicadas en la ruta de la pentosa fosfato, la β -oxidación de ácidos grasos, la recuperación de purinas o en la biosíntesis de pirimidinas, de éter-lípidos y escualeno (62). Esta compartimentación capacita a estos organismos para adaptarse y superar rápida y eficientemente nuevas condiciones, como los cortos periodos de anaerobiosis. En este parásito, la generación neta de ATP por la glicólisis se produce en el citoplasma por parte de la piruvato kinasa, ya que el ATP generado dentro del glicosoma por la fosfoglicerato kinasa (PGK del inglés *phosphoglycerate kinase*) se consume en la fosforilación de la glucosa y la fructosa 6 fosfato. Los acidocalcisomas son orgánulos electrodensos con una alta concentración de fósforo (pirofosfato y polifosfato) complejados con Ca^{2+} , constituyendo la principal fuente de almacenamiento de Ca^{2+} . En *Leishmania*, este orgánulo también participa en el mantenimiento del pH intracelular, en la osmoregulación (63), y también se ha relacionado con la virulencia del parásito (64).
- g) Otra característica destacable que presentan los parásitos protozoarios es que no son capaces de sintetizar purinas *de novo*, por lo que dependen de la incorporación de purinas preformadas. Los nucleósidos o nucleobases purínicos presentes en el hospedador son utilizados como fuente de purinas por el parásito. Esta incorporación es mediada por transportadores de nucleósidos o nucleobases localizados en la membrana plasmática del parásito, los cuales proporcionan rutas de penetración específicas de sustrato (65). En cambio, sí que pueden sintetizar las pirimidinas usando rutas metabólicas similares a las de los humanos (66).
- h) Los tripanosomátidos contienen tripanotión como principal fuente de poder reductor en el metabolismo redox, en lugar del glutatión como el resto de organismos (67). El tripanotión se encuentra formado por dos moléculas de glutatión (GSH) unidas con una de espermidina, que junto con la tripanotión reductasa y el

sistema peroxidasa dependiente de tripanotión cumplen el papel de defensa frente al estrés oxidativo y el mantenimiento adecuado del balance redox. Así mismo, para el control de los intermediarios reactivos de oxígeno (ROS), el parásito cuenta con varias superóxido dismutasas localizadas en diferentes compartimentos celulares (68, 69). El sistema reductor del tripanotión sustituye muchas funciones de los sistemas GSH/Glutation reductasa (GR) y tiorredoxina presentes en otros organismos, por lo que es imprescindible para la supervivencia de estos protozoos. La ausencia del sistema tripanotión/tripantotión reductasa (TryR) en mamíferos, la falta de redundancia funcional dentro del sistema de tioles del parásito y la exposición de *Leishmania* al estrés oxidativo, convierten a los componentes de este metabolismo en atractivas dianas terapéuticas para el tratamiento de enfermedades producidas por este parásito.

- i) La respiración a nivel mitocondrial es similar a la de eucariotas superiores y, al igual que ellos, posee un ciclo de Krebs completo que funciona en ambos estadios del parásito (70). A pesar de ello, existen algunas diferencias significativas, entre las que se incluyen la presencia de un complejo mitocondrial I atípico y la ausencia de NADH oxidasas alternativas (AOX) presentes en otros trypanosomátidos (71, 72).
- j) La superficie celular de *Leishmania* presenta una cubierta externa cuyas principales macromoléculas en la forma promastigote son lipofosfoglicanos (LPG), glicoproteínas y proteofosfoglicanos (PPG), todas ellas ancladas a glicosilfosfatidilinositol (GPI), y una familia de glicolípidos GPI libres, llamados glicoinositolfosfolípidos (GIPLs) (73) (Figura 6). La tasa de biosíntesis de moléculas ancladas a GPI varía marcadamente en los diferentes estadios del desarrollo, siendo mayor y más rápida en promastigotes en división y menor en fase estacionaria y en amastigotes. Los amastigotes expresan niveles bajos, o casi indetectables de LPG y disminuye la expresión de GPI, como la GP63. En cambio, los niveles de expresión de GPI libres continúan siendo altos, de tal forma que son el principal componente de la superficie del amastigote (74).

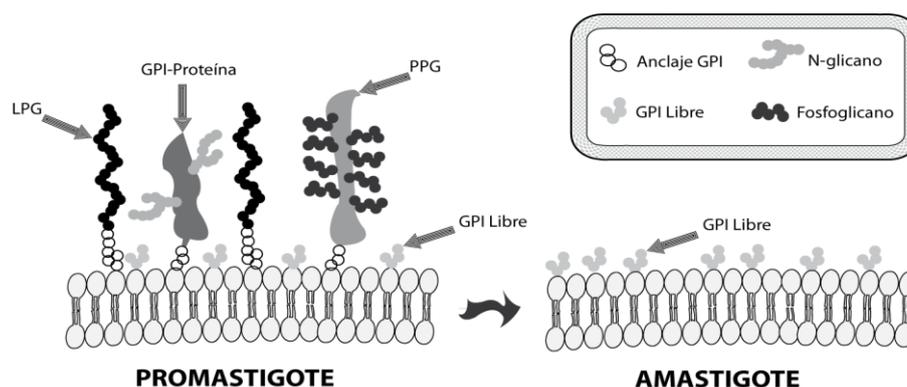


Figura 6. Composición de la superficie de promastigotes y amastigotes de *Leishmania*. LPG, lipofosfoglicano; GPI, glicosilfosfatidilinositol; PPG, proteofosfoglicano. Tomado de Ilgoutz *et al*, 2001 (75).

Una característica de la composición de las membranas de *Leishmania* es que el principal esteroles tanto en la forma promastigote como amastigote es el ergosterol (ergosta-7,7,24-trien-3 β -ol), en contraste con lo que sucede en mamíferos donde el principal esteroles es el colesterol (42). Las enzimas implicadas en su síntesis son blancos potenciales de fármacos. Otro grupo de esteroides que encontramos en *Leishmania* son del tipo estigmasta, que usualmente representan el 5 % de los esteroides totales en la forma promastigote, pero que en la forma amastigote intracelular pueden alcanzar hasta el 20 %, sugiriendo que pueden beneficiar de alguna manera al parásito cuando se encuentra en el macrófago. También encontramos colesterol (menos del 10% del total de esteroides), el cual puede derivar tanto del medio de cultivo como del huésped animal. Igualmente, *Leishmania* posee una ruta de biosíntesis de esteroides similar a la que encontramos en hongos, y su crecimiento es susceptible a inhibidores de biosíntesis de esteroides, como por ejemplo a inhibidores de la 12—desmetilasa y de la esteroles 24-metiltransferasa (76). Sin embargo, se ha descrito que *Leishmania* es capaz de sobrevivir con una gran alteración en su perfil de esteroides, y que también tiene capacidad de utilizar y metabolizar esteroides del huésped (42).

1.7 Microdominios lipídicos rafts de membrana

La membrana plasmática aloja muchas moléculas implicadas en diferentes vías de señalización celular, tales como glicero- y esfingo-lípidos, proteínas (receptores, quinasas, etc), que interactúan con diferentes estímulos para su activación y llevan a diferentes respuestas celulares (77). Actualmente se sabe que la membrana celular es

un medio importante para la transducción de señales y activación de vías de señalización tanto de supervivencia y proliferación como de muerte celular (78-80). En la última década, varios trabajos han demostrado que los lípidos no se encuentran distribuidos al azar, dando lugar a teorías que sugieren que la membrana plasmática es irregular, con segmentos de diferentes estructura y función, y que pueden variar en su composición (77). Desde la década de 1950 (Palade, 1953 y Yamada, 1955) se han demostrado estructuras estables en la membrana plasmática (81, 82). En la actualidad se conocen como microdominios lipídicos *rafts* de membrana que permiten interacciones proteína-lípido y proteína-proteína. Estos dominios se caracterizan por tener una composición proteica y lípido específica, donde se encuentra principalmente colesterol, (glico) esfingolípidos, fosfolípidos y proteínas transmembrana (receptores y proteínas de señalización), con un alto grado de saturación en sus cadenas de ácidos grasos (Figura 7) (77, 83). Estos componentes proporcionan su rigidez a la membrana, llevándolas a ser resistentes a la solubilización por detergentes no iónicos, permitiendo así su separación y aislamiento del resto de la membrana plasmática utilizando gradientes de densidad de sacarosa para su caracterización (84). Este método es ampliamente utilizado para el aislamiento y análisis de los lípidos *rafts* y sus proteínas asociadas en diferentes tipos de células (10, 85-91). Estos dominios también son conocidos como membranas resistentes a detergentes o DRMs (del inglés *detergent resistant membranes*).

Existen dos tipos de lípidos *rafts* que se diferencian principalmente por su composición. Los *rafts* planos, que se encuentran continuos con la membrana plasmática y no presentan ninguna característica morfológica. Y los caveola, que además de poseer los componentes característicos de los lípidos *rafts*, contienen caveolina. Esta proteína hace que este microdominio forme invaginaciones confiriendo una morfología específica (Figura 7).

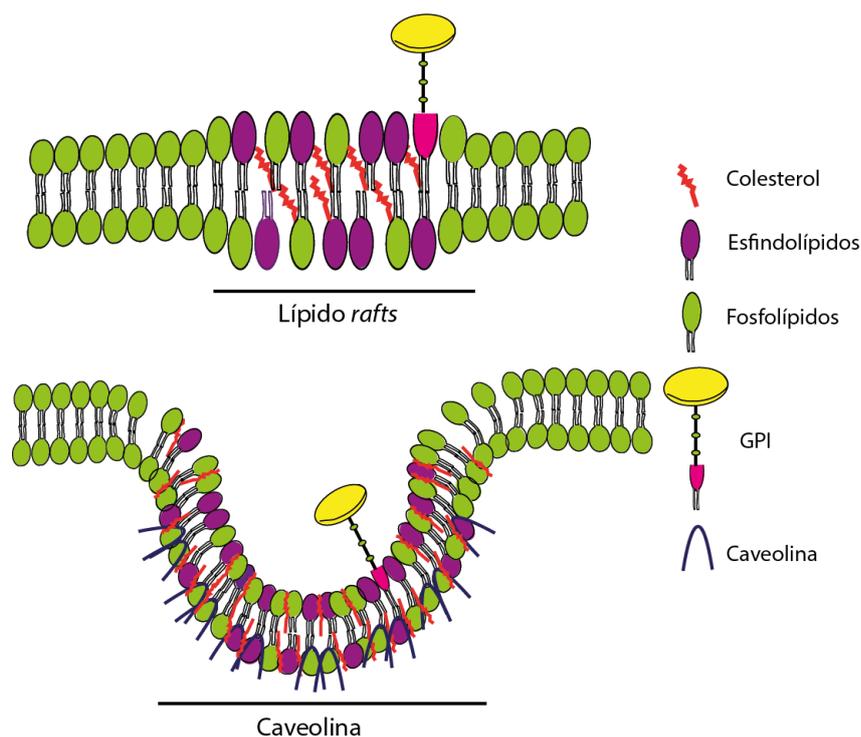


Figura 7. Microdominios lipídicos rafts de membrana. (A) Esquema clásico de lípidos rafts. Estos son ricos en colesterol y esfingolípidos y poseen proteínas tales como GPI de anclaje. El gangliosido GM1 es un marcador de este microdominio. (B) Esquema de lípidos rafts caveolina. Estos microdominios forman invaginaciones llamadas caveolas. La caveolina es un marcador de la estructura caveola.

El mecanismo principal de reclutación de proteínas a los lípidos rafts es la unión de grupos GPI o por modificación lipídica como es el caso de la palmitoilación. Estos grupos lipídicos son adicionados a los polipeptidos solubles en el lumen del retículo endoplasmico promoviendo la unión a los lípidos rafts (92). Las proteínas de anclaje GPI actúan como transductores intermedios para muchos receptores celulares.

Los microdominios lipídicos rafts han sido implicados en procesos celulares tan diversos como transducción de señales, apoptosis, organización del citoesqueleto, organización de proteínas durante la exocitosis y la endocitosis, tráfico de colesterol, etc., y se ha sugerido que son el punto de entrada de una amplia variedad de microorganismos, tomando así gran importancia en la interacción patógeno-hospedero (77).

Existen varias vías de señalización en las que los lípidos rafts tienen un papel fundamental, entre ellas se encuentra la vía extrínseca de la apoptosis (10, 90, 93), y la activación de los receptores tirosina quinasa que inducen la activación de la vía de PI3K/Akt (91), rutas fundamentales en la homeostasis celular.

Los lípidos *rafts* se han descrito principalmente en el buen funcionamiento de las vías de supervivencia, sin embargo desde el 2001 se ha descrito la implicación de los lípidos *rafts* en la regulación directa de la apoptosis actuando como dominios de membrana donde se recluta el receptor de muerte Fas/CD95 (88). Estudios posteriores han demostrado que los lípidos *rafts* sirven como andamiajes para el reclutamiento de receptores de muerte y proteínas de señalización “*downstream*” facilitando la formación del complejo DISC y la activación de la señalización apoptótica (10, 46, 85-87, 90, 91, 93). Además, el reclutamiento y la activación de Fas/CD95 en lípidos *rafts* puede ser independiente de su ligando natural (FasL) (79, 85, 88), y puede ser regulado farmacológicamente, por lo que se abre una nueva opción terapéutica para la regulación de la muerte celular.

Se ha descrito que las especies de kinetoplastidos, incluyendo a *Leishmania spp.*, *Trypanosoma spp.*, poseen altos niveles de moléculas GPI de anclaje, que forman una capa densa y homogénea que protege la superficie del parásito. Dentro de estas en *Leishmania* se incluyen la GP63 (11) y los glicoconjugados, LPG y glicoinositol fosfolípidos (94). En la membrana plasmática de *Leishmania*, al igual que sucede en eucariotas superiores, existen subgrupos específicos de proteínas y glicolípidos que están organizados en microdominios, además se ha demostrado la existencia de DRMs, lo cual es un indicativo de la existencia de lípidos *rafts* (94, 95). En *Leishmania*, se han definido como microdominios enriquecidos en esfingolípidos, esterol (ergosterol) y moléculas ancladas a GPI (95). Se ha descrito que estos microdominios tienen un papel importante en la diferenciación de los promastigotes a su forma infectiva metacíclica, en la resistencia al sistema del complemento del huésped, y en la invasión del macrófago (96).

1.8 Mitocondria de trypanosomátidos

Una de las organelas más interesantes y de vital importancia para la supervivencia del parásito es la mitocondria, la cual es blanco de múltiples fármacos. En la última década ha tomado mucha fuerza la investigación en esta organela, debido a la cantidad de hallazgos sobre su estructura y función en diferentes modelos biológicos (97). Estudios experimentales acerca del mecanismo de acción de un gran número de antiparasitarios sugiere que la mitocondria debe ser considerada como el blanco

farmacológico más importante del parásito. La característica especial de este patógeno es que contienen una mitocondria típica como un único orgánulo en comparación con células de mamífero que poseen cientos a miles de mitocondrias. Por lo tanto, el funcionamiento apropiado de esta única mitocondria en parásitos protozoarios es más importante que en mamíferos, quien debido a sus numerosas mitocondrias garantiza una compensación en daños funcionales. Sin embargo, para los organismos con una sola mitocondria no existe tal opción y la supervivencia depende del funcionamiento correcto de este orgánulo único (98).

Su ultraestructura es bastante peculiar en comparación con organismos multicelulares, con respecto a la densidad de la matriz, así como al número y forma de las crestas. Su fina estructura mitocondrial puede variar dependiendo del género y especie del parásito, pero generalmente la mitocondria se distribuye en ramas de microtúbulos. Este orgánulo es llamado kinetoplasto, el cual posee todo el ADN de esta única mitocondria y se encuentra localizado cerca del flagelo, estando compuesto por una red altamente organizada de miles de círculos concatenados y aplanados que constituyen entre el 10 y 15 % del DNA del parásito. Como se mencionó anteriormente, estos círculos se pueden dividir en maxicírculos (35–50 kb) en donde se codifican las subunidades de los complejos respiratorios de la mitocondria, y minicírculos (0.8–1.6 kb) que codifican los pequeños RNAs indispensables para la corrección del RNA. Esta estructura está localizada dentro de la matriz mitocondrial y se encuentra unida a la base del flagelo (55).

En su mayoría, las proteínas mitocondriales son codificadas en el núcleo, sintetizadas en el citosol y después de la traducción importadas a la mitocondria. Los maxicírculos corresponden al 10% del DNA mitocondrial. La cantidad de proteínas codificadas en la mitocondria es pequeña (cerca de 18) y la expresión de estas proteínas requiere traducción mitocondrial, lo cual es diferente a otros organismos. Entre las proteínas conocidas hasta el momento cabe citar: citocromo *b*, la subunidad I-III de la citocromo oxidasa, subunidad 6 de adenosina trifosfato sintasa, unidad 6 de la NADH deshidrogenasa, una proteína ribosomal y 5 fragmentos de lectura abierta cuya función es desconocida. El otro 90 % corresponde a los minicírculos, que tienen secuencias heterogéneas y codifican para la mayoría de los transcritos cortos (99).

La adaptación metabólica a los diferentes procesos biológicos y bioquímicos durante su ciclo de vida, indica claramente la presencia de pasos metabólicos específicos de cada estado morfológico, lo cual se ve reflejado en las diferentes susceptibilidades del parásito a múltiples fármacos en sus dos estadios (99).

1.8.1 Blancos mitocondriales

En vista de las diferencias en estructura y función de la mitocondria de tripanosomátidos con la mitocondria de mamíferos, a continuación se describen más en detalle estas diferencias de los tripanosomátidos, ya que se convierten en blanco de nuevos fármacos.

1.8.1.1 Cadena transportadora de electrones

La cadena transportadora de electrones (ETC; *electron transport chain*) en mamíferos está compuesta de 4 complejos en la membrana mitocondrial interna: complejo I, NADH deshidrogenasa o ubiquinona deshidrogenasa; complejo II, succinato-ubiquinona oxidoreductasa; complejo III, (complejo citocromo bc_1) ubiquinol:citocromo c oxidoreductasa; complejo IV, citocromo c oxidasa. La ubiquinona (coenzima Q) y citocromo c funcionan como portadores de electrones entre los complejos (99). Los complejos I, III y IV funcionan como bombas de protones generando un gradiente electroquímico de protones que dirige la síntesis de ATP. El gradiente de protones producido por el transporte de electrones es utilizado por la F_0F_1 -ATPasa (complejo V) para devolver los protones a la matriz mitocondrial y generar ATP, que acopla los procesos de respiración y fosforilación oxidativa (100).

En *Leishmania*, la ETC tiene particularidades que la convierten en un blanco prometedor. Uno de ellos es un complejo I que es insensible a la rotenona, si bien este es un tema controvertido ya que algunos autores evidencian su presencia en *L. tropica* y *L. mexicana* (71), y otros sostienen que la enzima correspondiente en mamíferos al complejo I sensible a rotenona, puede estar ausente o no muy activa en *L. donovani*, lo que hace al parásito insensible a la rotenona (99). Estudios bioquímicos sugieren la existencia del complejo II en protozoos. Debido a que el parásito tiene limitaciones en el transporte de electrones entre los complejos I-III, el succinato es el donador primario de

electrones. Sin embargo este puede ser reciclado desde el fumarato por la fumarato reductasa. Esta enzima no se encuentra en mamíferos, por lo que se convierte potencialmente en un blanco de fármacos contra estos parásitos (99). La secuencia de amino ácidos del complejo III muestra diferencias en la ubiquinona, en comparación con la proteína del mamífero, convirtiéndolo en otro punto de interés para fármacos antiprotozoos. El complejo IV está compuesto por más de 14 subunidades, de las cuales 3 se encuentran codificadas en la mitocondria y el resto se encuentran codificadas en el núcleo (99). La citocromo *c* oxidasa que se encuentra codificada en el núcleo, tiene un papel relevante en la función mitocondrial, y se correlaciona con el estado infeccioso de tripanosomátidos (Figura 8). En la mitocondria de *Leishmania* hay una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (GPDH) dependiente de dinucleótido de flavina-adenina (FAD⁺) (que cataliza la oxidación del glicerol-3-fosfato, proveniente del glicosoma, a deshidroxiacetona fosfato) que contribuye a la reducción de la ubiquinona (99). A su vez se observó que esta GPDH dependiente de FAD⁺ contribuye al balance redox del glicosoma, permitiendo de esta manera incrementar la eficiencia de la glucólisis, ya que evita la necesidad de una fermentación del succinato glicosomal, y permite la utilización del glicerol como fuente de carbono (Figura 8) (99).

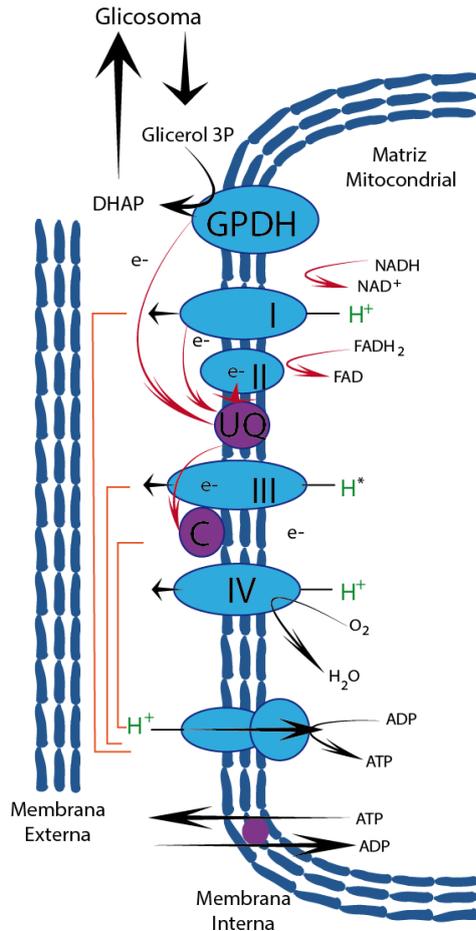


Figura 8. Cadena respiratoria en *Leishmania*. Estos parásitos tienen una cadena de transporte de electrones convencional, que comprende los complejos I, II y III y un complejo IV el citocromo *c*, carecen de una oxidasa alternativa que está presente en otros tripanosomátidos. Estos complejos reoxidan NADH y succinato y generan un gradiente de protones que es usado por la F₀F₁-ATP sintasa {Saunders, 2010 #1635}. Abreviaturas: DHAP, dihidroxiacetona; GPDH, glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; UQ, ubiquinona; C, citocromo *c*.

1.8.1.2 Ácidos grasos y síntesis de esteroides

La síntesis de ácidos grasos en tripanosomátidos es esencial para su supervivencia y es diferente de la observada en eucariotas superiores (101). El análisis del genoma de tripanosomátidos que se completó recientemente indica que estos parásitos son capaces de producir ácidos grasos (99). En otros organismos se ha demostrado que esta vía de síntesis de ácidos grasos es importante para una eficiente respiración, aunque la relación directa aún se desconoce. *Leishmania* produce esteroides relacionados con ergosterol por una vía biosintética similar a la que opera en hongos patógenos y son susceptibles a inhibidores de la biosíntesis de esterol.

1.8.1.3 Potencial de membrana mitocondrial

Aunque el $\Delta\psi_m$ no es en sí una proteína blanco única, sino más bien una función mitocondrial, el mantener el adecuado $\Delta\psi_m$ es esencial para la supervivencia celular (102). Los cambios en el $\Delta\psi_m$ pueden tener distintas consecuencias, su aumento puede

bloquear la síntesis de ATP, mientras que su disminución puede inhibir la ETC, estimular el desacoplamiento de proteínas y permeabilizar la membrana interna. Como se mencionó anteriormente, el principal componente de la función mitocondrial es el buen funcionamiento de la ETC. Inhibidores del complejo II y III causan en *Leishmania* pérdida del $\Delta\psi_m$, como se observa en la mitocondria de mamíferos (98, 99). Sin embargo, la rotenona, inhibidor del complejo I en mamíferos, causa hiperpolarización en *Leishmania*, a pesar de que estos protozoos poseen NADH insensible a la rotenona, la cual no está implicada en la translocación de protones para la acumulación del $\Delta\psi_m$ (98), sugiriendo esto una actividad alternativa para la rotenona en *Leishmania*.

1.8.1.4 Especies reactivas de oxígeno

El mal funcionamiento de la ETC puede llevar a una liberación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS; *reactive oxygen species*). La desviación de electrones desde los complejos mitocondriales es la principal fuente endógena de formación de ROS. En tripanosomátidos se ha relacionado la producción de ROS con la inhibición del complejo II, mientras que en eucariotas superiores los mayores productores de ROS son los complejos I y III (99), marcando así una gran diferencia entre mamíferos y tripanosomátidos.

1.8.1.5 Muerte apoptótica

Además del papel bioenergético, biosintético y metabólico de la mitocondria en el funcionamiento celular, su papel en la regulación apoptótica es actualmente uno de los principales temas de investigación. El mecanismo molecular asociado con la muerte celular programada (MCP) está bien descrito en mamíferos. Actualmente, se han descrito mecanismos de MCP en parásitos, pero estos aún no se comprenden totalmente. Se han descrito algunos pasos de cómo la mitocondria de protozoos está involucrada en la muerte apoptótica, así como en la pérdida del $\Delta\psi_m$ y de ATP, incremento en H_2O_2 y producción del radical superóxido, aumento de los niveles de Ca^{2+} intracelular, y en evidencias morfológicas de cambios apoptóticos. En *Leishmania*, la mitocondria como blanco se encuentra ampliamente estudiada, y los resultados han demostrado la importancia de esta organela para la supervivencia del parásito y existen

evidencias que muestran como algunos fármacos utilizados como tratamiento de segunda línea, tienen la mitocondria como diana terapéutica (99).

1.9 Muerte celular programada

La muerte celular programada (MCP) es, por definición, justo lo opuesto a las formas de muerte accidental. En este proceso, la célula participa activamente y de forma experimental se puede detener por mecanismos diferentes a la eliminación del estímulo que la induce. Generalmente, la muerte se induce dentro del proceso de desarrollo del organismo e involucra la participación de genes suicidas. A pesar del conocimiento de las vías moleculares que regulan y ejecutan la muerte celular, y que muchos ensayos bioquímicos para la evaluación de estos fenómenos son hoy en día rutinarios en muchos laboratorios, la comunidad científica apenas define una clasificación de las diferentes formas de muerte celular, que se base en criterios bioquímicos en lugar de la clasificación usada en los últimos años que esta basada fundamentalmente en características morfológicas. Sin embargo, la revista *CELL DEATH AND DIFFERENTIATION*, especializada en muerte celular, creo el comité de nomenclatura de la muerte celular (NCCD; *Nomenclature Committee on Cell Death*). Este comité ha publicado recomendaciones en tres ocasiones 2005, 2009 y 2012. En ellas, se unifican criterios para la definición de los distintos tipos de MCP y se propone la terminología que debe ser utilizada. En su última edición el NCCD resalta la importancia de incluir una nueva clasificación de la muerte celular, basándose en características bioquímicas medibles (103).

A continuación se describen las generalidades del funcionamiento molecular de dos de los mecanismos de MCP más estudiados, a saber: a) apoptosis, que sería la representación más moderna y refinada del suicidio celular; b) muerte celular programada autofágica, un mecanismo mucho más primitivo y descrito en eucariotas a lo largo de toda la escala evolutiva desde la levadura hasta el hombre.

1.9.1 Apoptosis

El término apoptosis fue descrito por primera vez por el patólogo australiano John F.R. Kerr y sus colaboradores Andrew H. Wyllie y Alastair en 1972, definiéndola como un

proceso de cambios morfológicos específicos, con el fin de eliminar células no deseadas (104). La apoptosis juega un papel fundamental en muchos procesos biológicos que acontecen en organismos pluricelulares. Los cambios morfológicos característicos incluyen: redondeo celular, reducción del volumen celular, condensación de cromatina nuclear (picnosis), formación de procesos de *blebbing* (burbujeo) en la membrana plasmática, manteniéndose la integridad de la membrana plasmática hasta las fases finales del proceso. Entre los cambios bioquímicos se incluyen la fragmentación del ADN nuclear, debido a la activación de endonucleasas específicas que lo rompen en fragmentos múltiples de 180-200 pares de bases, y la activación de caspasas que conduce a la aparición de productos proteolíticos de proteínas parcialmente digeridas. Los análisis bioquímicos, como la fragmentación nuclear en fragmentos múltiples de 180-200 pares de bases, no deben ser empleados como un medio exclusivo para definir la apoptosis, ya que este tipo de muerte celular puede ocurrir sin la fragmentación del ADN en múltiples de 180-200 pares de bases. Así mismo, la presencia de caspasas proteolíticamente activas o de sus sustratos no es suficiente para definir una muerte por apoptosis. Sin embargo, la medición de estos dos parámetros es muy útil para la evaluación de apoptosis. Por lo tanto lo ideal es utilizar estos procesos, junto con otros parámetros adicionales de distintas clases de muerte para definir mejor el tipo de muerte celular (105).

Hay que resaltar que el término apoptosis, posee una gran diversidad bioquímica. Existen varios tipos de apoptosis que, aunque son morfológicamente similares, se pueden activar a través de diferentes rutas bioquímicas (inducción de apoptosis por la vía intrínseca o extrínseca, con o sin la participación de la mitocondria) (103).

1.9.1.1 Inducción de apoptosis por la vía extrínseca

Este término se utiliza en la muerte celular apoptótica inducida por señales de estrés extracelular, que son detectadas y transmitidas por receptores transmembrana, denominados receptores de muerte (103). La apoptosis extrínseca se inicia por la unión a un receptor de muerte de ligandos de muerte, tales como: FasL/CD95L, TNF α y ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (*TRAIL*, *TNF-related apoptosis inducing ligand*). Estos ligandos se unen a receptores de la superfamilia de receptores de TNF, cuyos miembros poseen un dominio citoplasmático denominado dominio de muerte

(DD, *death domain*) y un dominio extracelular rico en cisteínas. A pesar de que se han reportado varios ligandos y receptores de muerte, la secuencia de eventos que definen la fase extrínseca de la apoptosis esta mejor caracterizada con los modelos FasL(CD95L)/Fas(CD95) y TNF α /TNFR1 (106).

Tras la unión de FasL, las colas citoplasmáticas de Fas (también denominado CD95, un receptor de muerte prototipo) reclutan proteínas adaptadoras, como FADD (*Fas-Associated Protein with Death Domain*) a través de la interacción entre los dominios de muerte presentes en Fas y FADD, y que posteriormente inducen el reclutamiento de caspasa-8 o caspasa-10. Esta plataforma supramolecular, que ha sido denominada complejo de señalización inductor de muerte (DISC; *death-inducing signaling complex*), controla la activación de la caspasa-8. La caspasa-8 directamente puede activar la vía de las caspasas, por mediación de la maduración proteolítica de la caspasa-3 (células llamadas tipo I), o a través de estimular la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP; *mitochondrial outer membrane permeabilization*) por medio de la activación proteolítica de Bid (*BH3-interacting domain death*) (células tipo II) (103). La apoptosis extrínseca también puede activarse por receptores como DCC o UNC5B, quienes transmiten la señal de muerte en ausencia de ligando (netrina-1). En este caso la señalización proapoptótica es a través del ensamblaje de DRAL y TUCAN (ó MLRP1), que incluye la activación de la caspasa 9 o la activación de DAPK1 (*death-associated protein kinase 1*) por la proteína UNC5B unida a fosfatasa 2A (PP2A), respectivamente. DAPK1 puede mediar la activación directa de las caspasas ejecutoras o favorecer MOMP (103).

1.9.1.2 Inducción de apoptosis por la vía intrínseca, dependiente e independiente de caspasas

La muerte apoptótica puede ser activada por un exceso de estrés intracelular, que incluye daño en el ADN, estrés oxidativo, aumento de Ca²⁺ citosólico, excitotoxicidad (relacionada con la sobre-estimulación del receptor del glutamato en el sistema nervioso), acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico (RE) y muchas otras. Aunque las cascadas de señalización que dirigen la apoptosis intrínseca son altamente heterogéneas en cuanto a los estímulos que la inician, todas ellas se

encuentran conectadas a un mecanismo de control basado en la mitocondria. Continuamente, junto con la cascada de señalización pro-apoptótica, los mecanismos anti-apoptóticos también están involucrados, intentando controlar el estrés celular. De esta manera, ambas señales coinciden en las membranas mitocondriales, llevando a la permeabilización cuando las señales pro-muerte predominan sobre las señales protectoras (103).

Cuando estas señales de muerte prevalecen, ocurre la MOMP y esto lleva a la pérdida del $\Delta\psi_m$, la detención de la síntesis de ATP mitocondrial y transporte dependiente del $\Delta\psi_m$. Además, se desacopla la cadena respiratoria, lo que lleva al aumento de ROS y las proteínas que se encuentran normalmente en el espacio intermembrana mitocondrial (IMS: *intermembrane space*) son liberadas al citosol. Entre ellas, el citocromo *c* unido a la proteína adaptadora citoplasmática APAF1 y dATP conforman el apoptosoma, un complejo multiproteico que desencadena la cascada proteolítica de la caspasa-9, que posteriormente activa la caspasa-3. La proteína inhibidora de apoptosis (IAP) con bajo pI (DIABLO, también conocida como SMAC; *second mitochondria-derived activator of caspases*) y la proteína HTRA2 (*high temperature requirement protein A2*) facilitan la activación de caspasas por secuestro y degradación de varios miembros de la familia de las IAPs. Por el contrario, el factor inductor de apoptosis (AIF, *apoptosis-inducing factor*) y la endonucleasa G (Endo G) actúan independientemente de las caspasas trasladándose al núcleo y regulando en gran medida la fragmentación del ADN. La proteína HTRA2 también contribuye a la apoptosis independiente de caspasas, mediante la degradación de muchos sustratos celulares (incluyendo proteínas del citoesqueleto) (107).

La mitocondria juega un papel crucial tanto en la vía intrínseca como la extrínseca, ya que contiene los factores pro-muerte clave como son el citocromo *c*, HTRA2/Omi y SMAC/DIABLO, además de AIF y EndoG. Los tres primeros implicados en la regulación de la muerte mediada por caspasas, mientras que AIF y EndoG operan en mecanismos de muerte independientes de caspasas. La salida de estos factores está regulada por proteínas de la familia Bcl-2, mediante un proceso para el que se han descrito dos mecanismos. Según el primero de ellos, los miembros proapoptóticos multidominio como Bax, pueden inducir la permeabilización de la membrana externa de

la mitocondria, sin afectar la integridad de la interna, permitiendo la salida de los factores pro-muerte. De acuerdo con el segundo, estos mismos miembros pro-apoptóticos pueden promover la salida de Ca^{+2} del retículo endoplasmático gracias a su capacidad para permeabilizar membranas, facilitando la apertura de PTPC (*permeability transition pore complex*) mitocondrial por los altos niveles citoplasmáticos de este catión, permitiendo así la salida de los factores pro-apoptóticos contenidos en la mitocondria. Los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 regulan la supervivencia al bloquear, por interacciones proteína-proteína, la actividad de los miembros pro-apoptóticos (103). Recientemente se describió una nueva forma de regulación de la apoptosis por la proteína anti-apoptótica Bcl-X_L. Se ha demostrado que esta proteína interacciona con INSP3R, que es el canal de calcio del retículo endoplasmático, regulando la salida de este catión del retículo, por lo tanto controlando así los niveles de Ca^{2+} intracelular y la supervivencia celular (108).

1.9.2 Autofagia

La autofagia, que es literalmente comerse a sí mismo, es un proceso catabólico que involucra la degradación de componentes a través de la degradación lisosomal, también es útil para el reciclaje de proteínas de larga vida y de organelas enteras, para el mantenimiento de la homeostasis celular. Este proceso está bien conservado en todos los eucariotas y se ha identificado morfológicamente en plantas, levaduras y animales. La autofagia puede ser estimulada por diferentes situaciones de estrés tales como, disminución de nutrientes, estrés oxidativo e infecciones intracelulares (109). La autofagia puede ser clasificada en tres tipos diferentes; macroautofagia, microautofagia y autofagia mediada por chaperonas (CMA, *chaperone-mediated autophagy*). El término de muerte celular autofágica ha sido ampliamente utilizado cuando se presenta una gran vacuolización citoplasmática, que normalmente (aunque no siempre) indica aumento del flujo autofágico (103). La macroautofagia involucra un reordenamiento de membranas, que implica la fusión de estructuras vacuolares con los lisosomas. Esta se inicia con la formación de la llamada membrana de aislamiento. Esta membrana puede secuestrar componentes citosólico, formando una vacuola con los componentes secuestrados denominado autofagosoma, que luego se fusionara con los lisosomas

(110). El autofagosoma es una estructura que se fusiona con el lisosoma liberando el contenido intravesicular para su degradación por las proteasas lisosomales. El resultado es la liberación de moléculas al citosol para la re-síntesis de diferentes componentes celulares. En muchos casos, la autofagia es una respuesta citoprotectora activada por las células que están muriendo con la idea de superar la situación de estrés, sin embargo también puede provocar una aceleración en lugar de prevenir la muerte celular (111).

La autofagia fue descubierta en células de mamíferos, sin embargo es un proceso que se encuentra ampliamente estudiado en levaduras (112). Fueron los trabajos en estos últimos los que permitieron identificar los genes codificantes de las proteínas involucradas en la autofagia (proteínas Atg) (113). Las proteínas Atg participan en la inducción de autofagia, en la formación expansión y maduración de autofagosomas (109). Muchas quinasas regulan la autofagia, la más caracterizada es la proteína de mamífero blanco de rapamicina (mTOR del inglés *Target of rapamycin*), quien regula negativamente la vía autofágica. mTOR es una serina/treonina quinasa la cual es activada en respuesta a los aminoácidos y a la vía PI3K de clase I (109).

La formación del autofagosoma se cree que está promovida por interacciones proteína-proteína y proteína-lípido. El primer sistema es una interacción covalente Atg5-Atg12 asociado de manera no covalente con Atg16 para formar la enzima E3 (114), dirigiendo la formación del segundo conjugado proteína-lípido. El segundo sistema generado, por la lipidación de la proteína asociada a microtubulos LC3B-I (LC3: *light chain 3* o Atg8), dando lugar a la proteína LC3B-II, la cual incorpora fosfatidiletanolamina en su región C terminal, lo que le permite asociarse y ayudar en el crecimiento de la membrana autofágica. Dentro de este autofagosoma se pueden atrapar organelas como mitocondrias o partes del retículo endoplásmico (103).

1.10 MCP en eucariotes unicelulares

En organismos multicelulares, son obvios los beneficios evolutivos que trae el poseer sistemas genéticamente codificados con el fin de eliminar de manera segura y oportuna las células no deseadas, pero no es tan claro como estos sistemas pueden funcionar en organismos unicelulares. Sin embargo, en 1990 se reportó que parásitos protozoarios, como *Leishmania* y *Trypanosoma spp.*, sufrían un tipo de muerte celular

con características apoptóticas de mamíferos. A partir de allí, se ha generado un gran número de investigaciones enfocadas en los procesos de muerte celular regulada en parásitos protozoarios. Todo esto ha llevado a la generación de una gran masa bibliográfica que describe diversos tipos de muerte celular en protozoos, muchos de ellos utilizando técnicas desarrolladas para detectar apoptosis en células de eucariotas superiores. Esto ha llevado a aceptar la muerte celular programada en protozoarios como algo comprobado. Sin embargo, a pesar de las múltiples caracterizaciones bioquímicas y morfológicas de muerte en protozoarios, hasta el momento no se han demostrado de manera convincente las vías moleculares que actúan en la muerte de protozoos. Por lo cual algunos autores afirman que la muerte celular en protozoarios no es más que un proceso de muerte accidental o de necrosis no regulada (115).

Los parásitos protozoos tienen un ciclo de vida unidireccional con múltiples fases que involucran estadios replicativos y no replicativos. Una de las características del ciclo de vida es la gran variedad de eventos de diferenciación requeridos para la adaptación de estos parásitos a los diferentes ambientes que se enfrentan. Esta complejidad es lo que lleva a pensar que la MCP funciona con el fin de limitar la proliferación, virulencia y patogénesis, promoviendo así la transmisión del parásito. En *Leishmania*, el estadio virulento que son los promastigotes metacíclicos no-replicativos son inoculados por la picadura del mosquito vector, pero si estos no son transmitidos al hospedero, entran en senescencia y muerte celular. Por otra parte, varios trabajos han demostrado que el inoculo virulento de *L. major* contiene una mezcla de parásitos vivos y parásitos muertos (o muriendo) y que esos parásitos muertos inducen silenciamiento del macrófago mediada por TGF- β , promoviendo así la supervivencia de los parásitos viables (116).

1.10.1 MCP en Leishmania

Actualmente se realizan muchos estudios *in vitro* en parásitos protozoarios, con el fin de estudiar el efecto sobre *Leishmania* de distintos fármacos, o de diferentes condiciones de estrés (choque térmico, privación de nutrientes, etc.), lo que ha permitido observar, utilizando una gran variedad de ensayos morfológicos y bioquímicos de la apoptosis de mamíferos, que la muerte del parásito muestra características típicas de apoptosis (117). Actualmente, se han reportado tratamientos con fármacos en varias

especies de *Leishmania spp.*, donde se ha descrito disminución del volumen celular, condensación del ADN, externalización de fosfatidilcolina, aumento de Ca^{2+} citosólico y de ROS, fragmentación del ADN, inducción de actividad tipo caspasas y liberación del citocromo *c* (117). También se ha reportado la translocación de la endonucleasa G. La acción leishmanicida de muchos fármacos es mediada por la despolarización de la membrana mitocondrial, debido a alteraciones en el funcionamiento de la cadena respiratoria. De igual manera se ha observado una estrecha relación entre la pérdida de $\Delta\psi_m$, el aumento de Ca^{2+} citosólico y la producción de ROS (118).

La maquinaria de muerte autofágica está altamente conservada en parásitos protozoarios. En *Leishmania spp.*, es mucha la evidencia molecular que confirma la existencia de vías autofágicas funcionales (8, 119). A nivel mecanístico, las vías de autofagia son similares a las de otros eucariotes. En *Leishmania spp.*, se ha demostrado la formación del autofagosoma en la membrana mitocondrial y que este proceso requiere de proteínas relacionadas con la autofagia (120). Al igual que otros organismos biológicos, los protozoarios entran en autofagia en respuesta a la ausencia de nutrientes. Sin embargo, es importante destacar, que la autofagia también influye directamente en la virulencia del parásito ya que media la remodelación celular durante la diferenciación y crecimiento en *Leishmania spp.* y *T. cruzi*, manteniendo la función mitocondrial en *L. major* y *T. Gondii* (8, 119, 120).

La evidencia actual parece indicar que los mecanismos de muerte celular programada, tradicionalmente considerados exclusivos de metazoos, aparecieron en las primeras formas de vida eucariótica y en la actualidad parecen permanecer funcionales, aunque con ciertas adaptaciones/particularidades en los protozoos. Los parásitos del género *Leishmania*, según el estímulo de muerte que reciban, son capaces de desarrollar un patrón de muerte con características apoptóticas, autofágicas o necróticas. Estos eventos son regulados y desencadenados por mecanismos moleculares que se encuentran particularmente conservados entre estos parásitos y los eucariotas superiores. Si bien se han postulado distintas hipótesis sobre la posible significación biológica de la apoptosis en parásitos (117, 121), parece claro que la posibilidad de inducir una respuesta apoptótica en parásitos puede constituir una nueva diana terapéutica en el tratamiento de las enfermedades parasitarias. La identificación y

caracterización de la maquinaria apoptótica en parásitos esta por elucidar. Sin embargo, el kinetoplasto presente en los protozoos tripanosomátidos juega un papel muy importante en la muerte de estos parásitos (122, 123).

1.11 Interacción hospedero-parásito y su utilidad en el tratamiento farmacológico de leishmaniasis

En la actualidad el aumento de microorganismos resistentes a los fármacos antimicrobianos existentes progresa a gran velocidad, siendo más rápido que la incorporación de nuevos tratamientos. Por lo tanto, los trabajos en investigación de nuevos tratamientos anti-infecciosos se han concentrado en la posibilidad de agregar un adyuvante terapéutico al agente anti-microbiano, cuyo blanco de acción sea un sitio temporal en el hospedero (124), actuando en combinación con el agente antimicrobiano. De esta forma, si un medicamento no actúa directamente sobre el patógeno, este no podrá generar la resistencia basada en los mecanismos conocidos, tales como la sobre-expresión, mutación o cambios en la proteína blanco, ó en una mala absorción, retención o no activación del fármaco. Por lo cual surge la necesidad de estudiar la interacción del agente infeccioso con su hospedero para identificar y seleccionar los factores esenciales para la entrada, supervivencia y multiplicación del patógeno (125). De esta manera, la regulación del destino de la célula hospedera ha emergido como un arma importante en la patogénesis de múltiples patógenos intracelulares. Dentro de la compleja interacción entre el patógeno intracelular y su hospedero, se está investigando en los últimos años como miembros de los principales patógenos manipulan la supervivencia de la célula huésped, ya sea promoviéndola o inhibiéndola para su conveniencia (126). Al infectarse una célula huésped, se inducen una serie de señales de estrés, que pueden conducir a la activación de un proceso apoptótico (126) o autofágico (127, 128), los cuales ayudan a eliminar las células infectadas limitando la diseminación del parásito. Sin embargo, estos patógenos intracelulares han desarrollado diferentes estrategias para sobrevivir.

1.11.1 Regulación de las vías apoptóticas en la célula infectada

En la compleja interacción entre un parásito intracelular y su hospedero, se ha descrito que los parásitos tienen la capacidad de manipular la supervivencia de su célula hospedera, ya sea promoviéndola o inhibiéndola para su propia conveniencia (Figura 9). La simple infección por un patógeno intracelular puede representar una señal de estrés suficiente para iniciar un proceso apoptótico en la célula hospedera, lo que proporciona un mecanismo para eliminar las células infectadas y restringir la diseminación del parásito. Sin embargo, debido a que estos agentes infecciosos dependen de metabolitos de su huésped, estos dependen en gran medida de la viabilidad de la célula huésped.

Leishmania no solo inhibe la apoptosis espontánea de los neutrófilos, quien es la primera célula en llegar al sitio de la infección, incrementando así su vida útil y asegurándose un lugar seguro durante las primeras horas de infección. Sino que también tiene la capacidad de inhibir la muerte del macrófago, su principal célula huésped (126). Los neutrófilos son los primeros leucocitos en llegar al sitio de la infección para fagocitar el parásito. Es de resaltar que normalmente los neutrófilos tienen un período de vida corto y mueren rápidamente por apoptosis (129). Sin embargo, *Leishmania* es capaz de inhibir la apoptosis espontánea de los neutrófilos (30, 126), incrementando así su vida útil y proporcionando un lugar seguro para los parásitos durante los primeros días de infección. Aunque los mecanismos por los cuales los parásitos inhiben la apoptosis del neutrófilo son desconocidos, se ha descrito la reducción de la actividad caspasa-3 (126).

Moore y Matlasewski en 1994 describieron en macrófagos derivados de médula ósea (MDMO) de ratones BALB/c que la infección con *L. donovani* o el tratamiento con el LPG, la molécula de superficie más abundante del promastigote, inhiben la apoptosis inducida *in vitro* por privación de M-CSF, a través de la secreción de citoquinas, principalmente TNF α . De esta manera se propuso que el aumento de la viabilidad de la célula hospedera podría facilitar la propagación de la infección, aumentando el número de macrófagos infectados circulantes que pueden ser captados por los vectores (130). Posteriormente se reportaron resultados similares en MDMO infectados con *L. major*, donde además se demostró que este proceso no depende del background genético de la célula hospedera. Este trabajo se realizó en ratones resistentes C57BL/6 y ratones susceptibles BALB/c a la infección por *L. major*, demostrándose la capacidad de *L. major*

a retrasar la muerte celular en macrófagos de ambos ratones (131). Igualmente se mostró que la transcripción de genes anti-apoptóticos mediada por NF- κ B no era necesaria para la inhibición de apoptosis por *L. major* (131). Ruhland *et al.* (132), reportaron que la resistencia a la apoptosis de las células RAW 264.7 mediada por *Leishmania* es dependiente de la vía de señalización PI3K/PKB, que da como resultado la fosforilación y el secuestro de Bad. Este proceso fue independiente de la señalización de NF- κ B y p38 MAPK (132). Otros trabajos reforzaron el posible papel del LPG como mediador en la inhibición de muerte por *Leishmania* en células U-937, a través de la inhibición de la ruta PKC- δ (protein kinase C delta) (133). Sin embargo, recientemente se reportó que los fosfoglicanos, y no sólo el LPG, son los responsables de la inhibición de apoptosis (134). Posiblemente, los fosfoglicanos en la superficie de *Leishmania* son funcionalmente redundantes y la pérdida de uno puede ser compensada por la acción de los otros. De todas maneras, siguiendo la diferenciación del promastigote a su forma intracelular amastigote, en la que los fosfoglicanos prácticamente están ausentes en la superficie del amastigotes (73), se podría sugerir que el papel de los fosfoglicanos en la inhibición de apoptosis de la célula hospedera podría estar restringido a los estadios tempranos de la infección. También se ha demostrado que la infección con promastigotes (135) o amastigotes (136) de *L. mexicana* puede inhibir la apoptosis inducida por camptotecina en la célula dendrítica, otra población celular blanco de la infección por *Leishmania*.

La infección con *Leishmania* en macrófagos también lleva a la inhibición de mTOR, conduciendo a una inhibición global de la traducción (137). Aparte de su participación en el control de la traducción de proteínas, mTOR también se encuentra asociada a la regulación de la autofagia y, dependiendo del estímulo, con actividades anti- y pro-apoptóticas. Como la inhibición de mTOR es un estímulo autofágico muy conocido y ya que la autofagia actúa en muchos casos en respuesta de estrés evitando la muerte celular, es posible que la inducción de autofagia en células infectadas con *Leishmania* (126) sea el resultado de la inhibición de mTOR, como una estrategia anti-apoptótica alternativa.

A pesar de esto, los factores que permiten a estas especies de *Leishmania* controlar la muerte de su célula huésped, aún son desconocidos. También se desconoce

si la regulación de la apoptosis de la célula hospedera puede jugar un papel importante en la patogénesis de *Leishmania*.

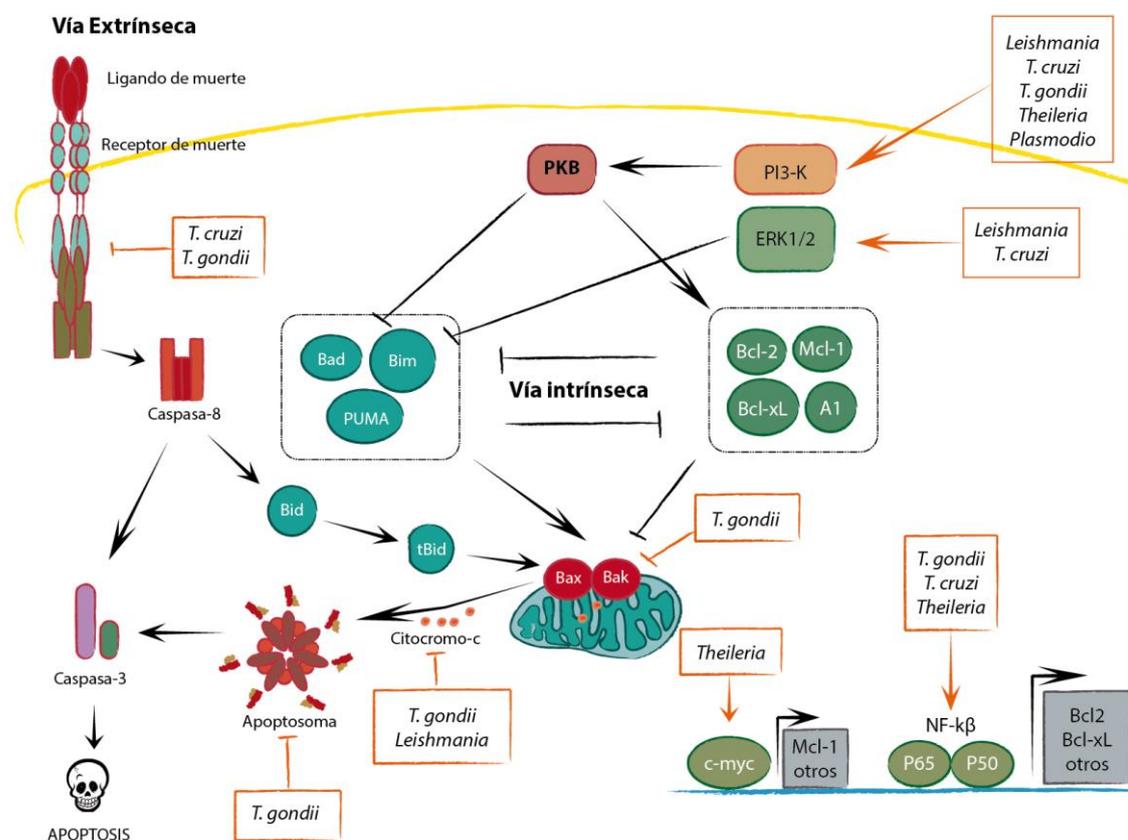


Figura 9. Visión general de las vías apoptóticas en mamíferos y los puntos de interferencia de los parásitos intracelulares. Los protozoos intracelulares han desarrollado estrategias que les permiten intervenir en varios niveles la señalización apoptótica, para regular la supervivencia celular, y eludir la cascada apoptótica. Adaptado de Rodrigues, V. *et al* 2012 (126).

1.11.2 Regulación de las vías autofágicas en la célula infectada

La capacidad de virus, bacterias y parásitos de tener acceso al interior de la célula eucariota ha generado presiones selectivas para el desarrollo de un mecanismo efectivo para defenderse de estos microbios. En este contexto, la autofagia ha evolucionado como un mecanismo de defensa en infecciones mediante la eliminación de patógenos intracelulares (xenofagia) (138). Además, la autofagia también ayuda a organizar la respuesta inmune sistémica al funcionar como un regulador de la inmunidad innata, la inmunidad adaptativa y la inflamación. Sin embargo la relación entre los patógenos y la autofagia es mucho más compleja, algunos microorganismos intracelulares se conocen como reguladores de autofagia de su célula hospedera con el fin de favorecer su

multiplicación intracelular (128, 139). Además de bloquear las vías de autofagia, muchos microorganismos han desarrollado mecanismos para utilizar la autofagia del hospedero para su beneficio. Algunos de los beneficios conocidos de la inducción de autofagia para microorganismos son: la promoción de la replicación viral o la morfogénesis a través de la maquinaria autofágica, la protección de bacterias de la vía endosomal a través de la utilización de autofagosomas como nicho de protección intracelular, y el aumento de la supervivencia o replicación de bacterias, hongos o parásitos mediante el suministro de nutrientes generados en la autofagia (138). A pesar de que muchas publicaciones demuestran estas ideas, aun no se conoce completamente la importancia de estos mecanismos para la patogénesis, y no hay ninguna evidencia donde la ausencia de genes autofágicos en el huésped atenúe completamente alguna de estas enfermedades (Figura 10).

Se ha descrito la inducción de autofagia en la célula hospedera por el parásito *Toxoplasma gondii* (128). En infecciones con *Chlamidia* también se ha observado que la inducción de autofagia ayuda a su multiplicación (139). En *Leishmania*, quien vive y prolifera dentro de vacuolas parasitóforas (PV), existen pocos estudios que demuestren una asociación entre el parásito y la autofagia, sin embargo se ha asociado la presencia de autofagia con la replicación del parásito. Uno de los primeros estudios sugería que *L. mexicana* adquiere macromoléculas de la célula huésped a través del mecanismo de autofagia (140). Pinheiro *et al.* (2009) mostraron que la inducción de la autofagia altera la carga parasitaria (141). Mitroulis *et al.* (142) detectaron autofagia en la médula ósea tomada de un paciente con leishmaniasis visceral, y Cyrino *et al.* (127) demostraron inducción de autofagia *in vitro* e *in vivo*, y corroboraron que la modulación de la autofagia en el macrófago altera la infección por *L. amazonensis*.

También se ha demostrado que *Leishmania* promueve su supervivencia a través de la inhibición de la síntesis de proteínas del macrófago. La proteasa GP63 de *Leishmania* inactiva la señalización de mTOR, en donde 4E-BP1 juega un papel principal. La actividad de la 4E-BP1 es controlada a través de su fosforilación por mTOR. El mecanismo descrito involucra la activación de 4E-BP1/2 por la inactivación de la ruta de mTOR, llevando finalmente a la inhibición de la traducción. Esto le da gran importancia a la señalización por mTOR en la respuesta inmune innata frente a *Leishmania*. Del mismo

modo, la activación farmacológica de 4E-BP1 con rapamicina, aumenta dramáticamente la replicación del parásito. La delección genética de esta proteína disminuye la carga parasitaria en macrófagos *ex vivo* y reduce la susceptibilidad a la leishmaniasis cutánea *in vivo* (137). Estos datos sugieren que el mecanismo de supervivencia *Leishmania* activa 4E-BPs, conllevando a la inhibición de la traducción en la célula hospedera. Estos hallazgos resaltan la posibilidad de utilizar agentes que bloqueen 4E-BP como un ayudante terapéutico para el tratamiento de la leishmaniasis o de otras enfermedades parasitarias. Además, hace de vital importancia conocer los mecanismos por los cuales el parásito regula los procesos vitales del macrófago con el fin de encontrar posibles adyuvantes terapéuticos.

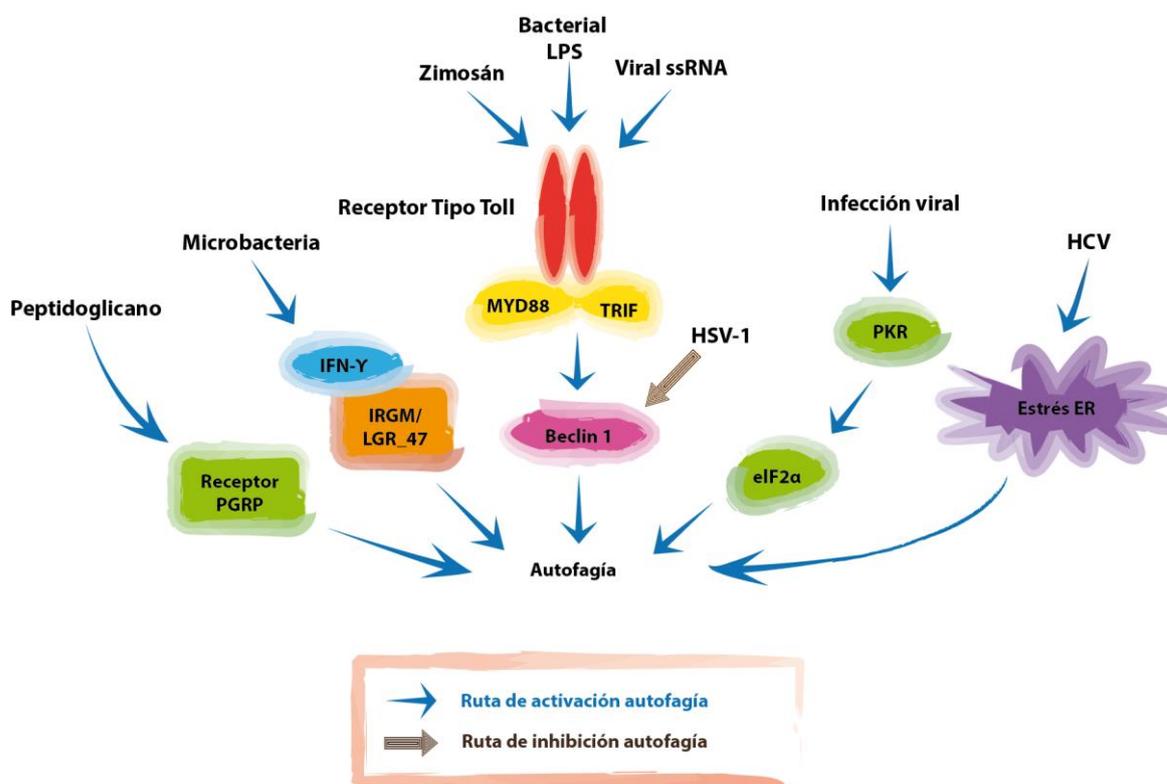


Figura 10. Diferentes mecanismos de regulación de la autofagia del hospedero por patógenos intracelulares. La autofagia tiene un papel importante en la eliminación de patógenos, pero estos han desarrollado estrategias para escapar de los efectos microbicidas de la autofagia, al parecer la autofagia inducida por patógenos es por vías independientes de mTOR. Tomado de He, 2009. (143).

1.12 Mecanismo de acción de los ATLS

El interés por los ATLS como agente quimioterapéutico surgió a raíz del trabajo de Munder y colaboradores (144), donde estudiaban el efecto de la LPC en los macrófagos. La LPC posee una vida media muy corta, ya que es rápidamente

transformada a PC o en glicerofosfocolina por acción de las esterasas. En la búsqueda de una vida media más larga se sintetizaron análogos de la LPC metabólicamente más estables. Estos se realizaron reemplazando los enlaces éster de las posiciones C1 y C2 del glicerol por enlaces éter evitando, de este modo, que fueran metabolizados por la acción de las esterasas (45, 145).

Los ATLS son compuestos de origen sintético con estructura similar a los fosfolípidos. Se conocen dos grupos principales cuya diferencia radica en la presencia o ausencia de la cadena principal del glicerol. Los alquil-eter-fosfolípidos o ATLS de primera generación, se les refiere como éter lípidos antitumorales o análogos alquil-lisofosfolípidos, los cuales tienen un enlace éter en la cadena principal de glicerol del fosfolípido. En este grupo se encuentra el 1-*O*-octadecil-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina (ET-18-OCH₃), conocido como edelfosina, que es el compuesto prototipo (45). El otro grupo son las alquilfosfocolinas o ATLS de segunda generación, quienes carecen de la cadena principal del glicerol y está formado por una larga cadena simple de alcohol esterificada en la fase fosfatídica. En este grupo se encuentra la hexadecilfosfocolina, mejor conocido como la miltefosina. Igualmente se han sintetizado diferentes análogos que muestran una prometedora actividad antitumoral. Entre estos se incluyen el octadecil-(*N,N*-dimetil-piperidinio-4-il)-fosfato, conocido como perifosina y la erucilfosfocolina. Las estructuras químicas de estos compuestos se muestran en la Figura 11.

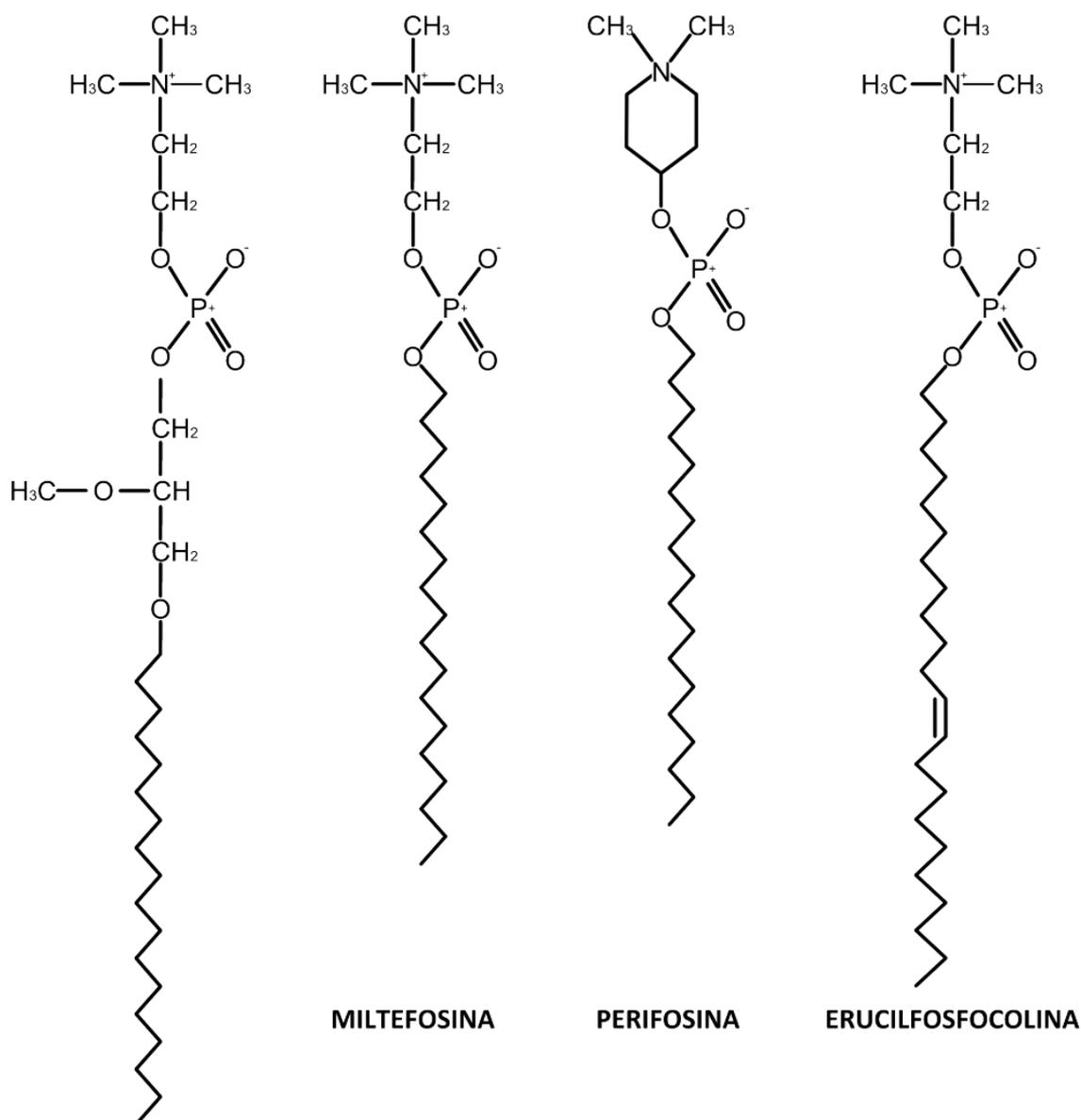


Figura 11. Estructuras químicas de ATLs.

La edelfosina es el compuesto con mayor actividad antitumoral por lo que rápidamente se convirtió en el ATL de referencia (45). La actividad antitumoral de la edelfosina está basada fundamentalmente en dos mecanismos que se potencian mutuamente: por un lado, la edelfosina potencia la actividad antitumoral de los macrófagos; y por otro lado, ejerce un efecto citostático y citotóxico directo sobre las células tumorales. El hecho de que una misma molécula sea capaz de estimular las células del sistema inmunitario a la vez que induce de manera directa la destrucción de las células cancerígenas, hacen de este ATL una molécula potencialmente efectiva con

perspectivas muy prometedoras. Adicionalmente se ha descrito que la edelfosina posee actividad antimetastásica y antiangiogénica; no obstante, numerosas publicaciones afirman que la principal causa de su actividad antitumoral es su capacidad de inducir apoptosis directa y selectivamente en las células cancerígenas (45, 46, 146).

Aunque se ha considerado que los ATLs actúan de forma similar, ciertas diferencias parecen emerger entre los distintos tipos de familias de ATLs. La edelfosina induce apoptosis de forma selectiva en células tumorales (146), a través de un nuevo mecanismo de acción que implica la activación intracelular del receptor de muerte Fas/CD95, mediante su reclutamiento y concentración en los denominados dominios de membrana lípidos *rafts* (85, 88). La edelfosina, actuando a través de este mecanismo, parece ser particularmente eficaz frente a malignidades hematológicas (88, 147, 148). En tumores sólidos parece actuar vía un mecanismo diferente que implica la activación de la apoptosis a través del retículo endoplásmico (149, 150). Por otra parte, aunque el proceso de apoptosis se inicie a través de distintos mecanismos, la mitocondria es fundamental en la inducción de apoptosis por edelfosina (93, 147, 149, 151) y la sobreexpresión de Bcl-2 o Bcl-X_L bloquea la muerte inducida por edelfosina (146, 147, 149).

Los datos obtenidos hasta el momento indican que la edelfosina induce la muerte de las células tumorales a través de la activación directa de la maquinaria apoptótica y de esta forma podría considerarse como un buen inductor de apoptosis en distintos sistemas. En este sentido, la edelfosina induce muerte celular también en levaduras (152-155), en parte a través de una modificación de la composición proteica de los dominios de membrana lípidos *rafts* (154, 156).

El primer estudio mostrando la actividad antiprotozoaria de estos compuestos fue frente a *L. donovani* (157). Posteriormente, muchos estudios han mostrado que los ATLs son citotóxicos para promastigotes y amastigotes de diferentes cepas de *Leishmania* (47, 49) y otras especies de parásitos protozoos. Aunque el mecanismo de acción de la miltefosina en *Leishmania* no es del todo conocido, se ha demostrado que induce la muerte por un proceso similar a la apoptosis y se ha demostrado que ésta afecta el metabolismo lipídico, causando disminución de la fosfatidilcolina (PC) en membrana y aumento de la fosfatidiletanolamina (PE), sugiriéndose una inactivación

parcial de la PE-N-metiltransferasa (158). También se observó disminución del contenido de esteroides alquilados e incremento del colesterol. Recientemente también se ha demostrado que la miltefosina inhibe la citocromo *c* oxidasa, disminuyendo así el potencial de membrana mitocondria (159, 160). En cualquier caso, al final la miltefosina induce la muerte del parásito por un proceso similar a apoptosis (161, 162).

La perifosina es otro ATL con una actividad significativa tanto en células tumorales como en parásitos de *Leishmania spp.* Este compuesto causa arresto del ciclo celular con inducción de p21, p53 o inhibición de la ruta de señalización de la proteína Akt (163), habiendo sido este último mecanismo de inhibición de Akt extendido a edelfosina (91).

En la literatura se encuentra descrito que la edelfosina puede inducir apoptosis no solo en líneas humanas de origen tumoral, sino en parásitos de *Leishmania* por un mecanismo que involucra la caída del potencial de membrana mitocondrial, y la degradación del ADN; asimismo, se conoce que la sobreexpresión de la proteína Bcl-2 puede revertir estos eventos y prevenir la apoptosis en estos dos modelos biológicos (160, 164). Igualmente en nuestro laboratorio se demostró que la edelfosina puede inducir en *L. infantum* un proceso de muerte similar a apoptosis que además, puede ser regulado por la expresión heteróloga de las proteínas humanas Hrk y Bcl-X_L, encontrándose una pronunciada susceptibilidad al fármaco por parte de los parásitos que expresan la proteína proapoptótica Hrk y un discreto efecto protector de la proteína antiapoptótica Bcl-X_L (160).

2. Objetivos

En este proyecto se quiso extrapolar el conocimiento adquirido sobre la inducción de apoptosis en células tumorales de la edelfosina a su acción antiparasitaria, dadas las recientes evidencias que sugieren la existencia del proceso de apoptosis en estos organismos, aunque no está caracterizado. Por otra parte, dado que los dominios de membrana lípidos *rafts* parecen actuar como una nueva diana terapéutica para inducir apoptosis (85-88, 165), se pretendió extrapolar este proceso a la terapia antiparasitaria. Además, en este trabajo se evalúa la actividad antiparasitaria de otra molécula lipídica antitumoral adicional, la espisulosina (ES-285), estudiándose sus mecanismos de acción. Adicionalmente se estudian los factores del hospedero que el parásito aprovecha para establecer la infección y así encontrar nuevos blancos terapéuticos que sean de utilidad para una terapia combinada. Los objetivos concretos que se abordan se indican a continuación:

- 2.1. Comparar la actividad antiparasitaria de edelfosina y análogos *in vitro* contra diferentes cepas de *Leishmania spp.*
- 2.2. Evaluar la actividad antiparasitaria de la edelfosina en un modelo experimental *in vivo* de infección con *L. panamensis*
- 2.3. Identificar los mecanismos involucrados en la acción antiparasitaria de edelfosina en *L. panamensis* y comparar con los mecanismos descritos en células tumorales.
- 2.4. Describir el papel de los microdominios de membrana lípidos *rafts* y la mitocondria en la acción antiparasitaria de edelfosina en *L. panamensis*.
- 2.5. Evaluación y caracterización del efecto antiparasitario de la espisulosina (ES-285) en *Leishmania spp.* y determinar la capacidad de las proteínas Bcl-2, Bcl-X_L y Hrk para modular el proceso de muerte inducido por este compuesto.
- 2.6. Identificar los aspectos del hospedero que el parásito utiliza para establecer su infección, los cuales pueden convertirse en blancos terapéuticos en una terapia combinada.

3. Materiales y Métodos

3.1. Células y condiciones de cultivo

En este trabajo se utilizaron las siguientes cepas de *Leishmania spp.*: *L. donovani* (MHOM/IN/80/DD8), *L. panamensis* (MHOM/CO/87/UA140) y *L. panamensis*-GFP (Dr. Iván D. Vélez, Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales -PECET-, Medellín, Colombia); *L. major* LV39 (MRHO/SU/59/P) (Dr. Indrid. Müller, Imperial College London, Londres, RU); *L. braziliensis* (MHOM/PE/95/LQ2) (Dr. Basilio Valladares, Universidad de La Laguna, Tenerife); *L. infantum* (MCAN/ES/96/BCN150) y *L. infantum*-Bcl-X_L (Dr. Antonio Jiménez Ruiz, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid). Los parásitos en su forma promastigote fueron cultivados en medio RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsband, CA, EE.UU.) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina a 26°C. Para los distintos tratamientos, los promastigotes fueron utilizados en fase logarítmica a una concentración de 2 x 10⁶ parásitos/ml a 26°C. Los promastigotes en su fase estacionaria de crecimiento se obtuvieron después de 6 días de incubación de los parásitos con un inóculo de 1 x 10⁶ parásitos/ml. Los amastigotes axénicos se obtuvieron como se describió previamente (49). Las líneas celulares cancerosas humanas Jurkat (leucemia linfocítica aguda de células T), HL-60 (leucemia aguda mielocítica), M144 (mieloma múltiple), HeLa (carcinoma epitelial de cervix), y la línea de macrófagos de ratón J774 fueron cultivadas en RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomina a 37°C en aire humificado al 95% y 5% CO₂. La infección de macrófagos J774 y el posterior cultivo de las células infectadas se llevó a cabo a 34°C.

3.2. Sustancias químicas

Los compuestos utilizados en este trabajo se enumeran a continuación: edelfosina (Inkeysa, Barcelona); miltefosina (Calbiochem, Cambridge, MA, EE.UU.); perifosina y erucilfosfocolina (Zentaris, Frankfurt, Alemania); espisulosina (ES-285) (Dr. José Luis Abad, Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC), CSIC, Barcelona). Rotenona,

malonato, antimicina A, azida, oligomicina y CCCP fueron de Sigma (St. Louis, MO, EE.UU.). Los demás compuestos fueron de Sigma o Merck.

3.3. Preparación de Compuestos

Edelfosina, miltefosina, perifosina y erucilfosfocolina se disolvieron en medio de cultivo RPMI completo (conteniendo 10% SFB, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina) hasta una concentración final de 1 mM. A continuación, la solución fue incubada 45 min a 50°C, esterilizada mediante filtración, y mantenida a 4°C hasta su posterior uso. El ES-285 fue disuelto en dimetilsulfóxido (DMSO) en una solución stock de 1 mM y almacenado a -20°C hasta su uso.

3.4. Tratamientos

Para realizar los tratamientos de *Leishmania spp.* con edelfosina (1-*O*-octadecil-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina) se preparó una solución stock de 1 mM como se describió en el apartado anterior y se almacenó a 4°C hasta su uso. Los tratamientos fueron realizados en placas de cultivo de 6, 12, 24 y 96 pocillos dependiendo del tipo de experimento. Los parásitos tratados se incubaron a 26°C con tiempos de incubación variables. La ciclosporina A (CspA; 10 µg/ml en tampón fosfato salino PBS) se adicionó 30 minutos antes del tratamiento. La N-acetyl-L-cisteína (NAC; 10 mM en PBS) y el glutatión (GSH; 10 mM en PBS) fueron adicionados al medio de cultivo 2 horas antes de iniciar el tratamiento con la edelfosina. La metil-β-ciclodextrina (MβCD; 2,5 mg/ml en medio RPMI sin SFB) se adicionó 40 minutos antes del tratamiento.

Para estudiar el papel de la cadena respiratoria mitocondrial, los parásitos y las células se incubaron con los siguientes inhibidores: rotenona 10 µM, malonato 5 mM, TTFA (tenoiltrifluoroacetona) 250 µM, antimicina A 10 µM, azida sódica 1,5 mM, oligomicina 10 µM, piceatannol 5 µM, y CCCP 100 µM. Los inhibidores fueron disueltos en su respectivo vehículo adecuado: DMSO (rotenona, antimicina A, CCCP), etanol (TTFA, oligomicina, piceatannol) y agua destilada (malonato, azida sódica). La concentración de los inhibidores fue seleccionada de acuerdo a procedimientos descritos previamente. Estos inhibidores fueron adicionados 1 hora antes del tratamiento con edelfosina.

3.5. Generación de macrófagos derivados de médula ósea

Los macrófagos murinos derivados de medula ósea (MDMO), se obtuvieron del fémur de ratones CBF1. Los fémures fueron lavados y la suspensión de células fue cultivada como se ha descrito previamente (166) en bolsas de teflón hidrófobas, en medio DMEM con 10% SFB, 5% suero de caballo, 2 mM L-glutamina, 60 mM 2-mercaptoetanol, 1 mM piruvado sódico, 1% aminoácidos no esenciales, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomina, y sobrenadante de fibroblastos L929 a una concentración final de 15% (v/v), como fuente de M-CSF (*macrophage-colony stimulating factor*). Las células L929 producen grandes cantidades de M-CSF, factor de crecimiento capaz de estimular la proliferación y diferenciación de los macrófagos.

Para obtener los MDMO de ratones tratados con edelfosina, se administró la edelfosina a 5 mg/kg de peso, diariamente durante 13 días in 100 µl de PBS, posteriormente se prepararon los MDMO tal como se describe arriba. No se observó pérdida de peso, ni ningún efecto secundario después del tratamiento con edelfosina.

3.6. Ensayo de incorporación de edelfosina

10⁶ macrófagos ó 2 x10⁶ promastigotes de *Leishmania* fueron incubados con 10 µM edelfosina + 0,05 µCi/ml [³H]-edelfosina (Amersham Buchler, Braunschweig, Alemania) durante 1 h en RPMI 1640, 10% SFB. Tras 5 lavados con PBS conteniendo 2% (p/v) de albúmina sérica bovina (BSA), se procedió a la sedimentación y posterior lisis celular con líquido de centelleo, y a la cuantificación de la radiactividad incorporada a las células mediante la utilización de un contador de centelleo. La actividad específica de [³H]-edelfosina era 42 Ci/mmol.

3.7. Ensayo de viabilidad de macrófagos

La viabilidad de los macrófagos fue medida usando el reactivo de proliferación celular WST-1 (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza). 10⁵ macrófagos después del tiempo indicado, fueron incubados durante 2 h a 37°C con 10 µl de WST-1 en 0.2 ml de medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de SFB en placas de 96 pocillos y posteriormente se midió la absorbancia a 440 nm.

3.8. Determinación de anión superóxido

Para medir la producción de anión superóxido, se utilizaron 2×10^5 células en 0,2 ml de HEPES-DMEM sin indicador de pH con lucigenina 125 mM a 37°C. La reacción se comenzó por la adición de 50 μg de zymosan, y la medición se realizó por quimioluminiscencia dependiente de lucigenina utilizando el equipo Microlumat LB96P (Berthold Technologies, Wildbad, Alemania).

3.9. Medición de óxido nítrico

La producción de óxido nítrico se realizó por el ensayo de nitritos, con el reactivo de Griess. Los macrófagos de ratones tratados con edelfosina fueron incubados en ausencia (control negativo), o en presencia de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de LPS (proveniente de *S. Abortus equi*, gentilmente proporcionado por Dr. Chris Galanos (Max-Planck-Institut, Freiburg, Alemania)). El sobrenadante de los cultivos se mezcló con 100 μl de sulfanilamida 1%, N-(1-naftil) etilendiamina 0.1% y H_3PO_4 2.5%. La absorbancia se midió a 540 nm en un lector de microplacas (Molecular Devices, Ismaning, Alemania).

3.10. Ensayo de INF- γ

La cantidad de INF- γ se determinó por medio de un kit comercial de Elisa-sandwich (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) (Pharmingen, San Diego, CA, EE.UU.) de acuerdo con las instrucciones del kit.

3.11. Análisis del contenido de ADN por citometría de flujo

2×10^6 promastigotes ó amastigotes axémicos de *Leishmania spp.*, ó 10^6 células Jurkat, fueron tratadas con los diferentes ATLs por los tiempos indicados. Después del tratamiento las células fueron centrifugadas y resuspendidas en etanol al 70%, y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Después de la incubación, los parásitos fueron centrifugados, y resuspendidos en 400 μL de PBS conteniendo 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNAsa y 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de ioduro de propidio, e incubados durante 1 h a temperatura ambiente e inmediatamente se procedió a analizar su fluorescencia por citometría de flujo utilizando el canal FL2 (λ : 570 nm). La cuantificación de las células hipodiploides fue

monitoreada como el porcentaje de células en la región subG₀/G₁ en el análisis del ciclo celular.

3.12. Medición del potencial de membrana mitocondrial y producción de especies reactivas de oxígeno

Los cambios en el potencial de membrana mitocondrial de los parásitos en respuesta a los tratamientos fue determinado utilizando DiOC₆ (3,3'-dihexyloxacarboyanine-iodide, fluorescencia verde; Molecular Probes, Leiden, Países Bajos) y para determinar ROS se utilizó DHE (ó HE, dihydroethidium, fluorescencia roja después de su oxidación; Sigma) (151). En resumen, 2 x 10⁶ parásitos de *Leishmania* y 10⁶ células Jurkat después del tratamiento fueron centrifugadas, lavadas con PBS y resuspendidas en 400 µL de PBS conteniendo DiOC₆ 20 nM y de HE 2 µM. Tras una incubación a temperatura ambiente durante 20 min, las muestras se analizaron inmediatamente por citometría de flujo (Becton Dickinson FACSCalibur).

3.13. Tinción con Naranja de Acridina

La tinción de parásitos con naranja de acridina se ha llevado a cabo según las instrucciones del fabricante (*Acridine Orange Staining Solution – Life Technologies*). En células teñidas con naranja de acridina, el citoplasma y nucléolo emiten fluorescencia verde y rojo tenue, mientras que los compartimientos ácidos emiten una fluorescencia de color rojo brillante. La intensidad de la fluorescencia roja es proporcional al grado de acidez (167). La solución de naranja de acridina se agregó a las células en cultivo a una concentración final de 2.5 mg/ml. Después de 10 min, las células fueron centrifugadas a 1200 rpm durante 8 min y lavadas dos veces con PBS. Los parásitos fueron analizados por citometría de flujo en FACSCalibur (Becton Dickinson) usando el software FlowJo.

3.14. Infección de macrófagos y evaluación de carga parasitaria

MDMO o la línea celular de macrófagos J774, cultivados con RPMI 1640, fueron incubados durante 4 h con promastigotes en fase estacionaria de *L. (v). panamensis* (rango de infección 1:10 macrófago/parásito). Posteriormente, se retiró el sobrenadante, y la monocapa de células fue lavada con PBS e incubada con medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB durante el tiempo indicado para cada experimento.

La edelfosina y los diferentes ATLS se adicionaron a una concentración de 10 μ M justo después de lavar la monocapa de macrófagos infectados. La carga parasitaria se determinó por el ensayo de dilución limitante previamente descrito (168). En otros ensayos, los macrófagos se cultivaron en cubreobjetos insertados en placas de cultivo y se infectaron con promastigotes en fase estacionaria de *L. panamensis*-GFP (del inglés *green fluorescent protein*) (*Lp*-GFP). Después de 24 h, los cubreobjetos fueron lavados y se analizó el rango de macrófagos infectados con amastigotes utilizando un microscopio de fluorescencia. Las muestras se fijaron con 1% formaldehído, y se analizaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan 2 (Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Alemania) (40X de magnificación). Los resultados se muestran como porcentaje de células infectadas y como el número de parásitos por macrófago, después de contar 200 macrófagos.

3.15. Evaluación de la susceptibilidad *in vivo* a edelfosina de *L. panamensis* en el modelo de hámster

Los procedimientos con animales en este trabajo cumplieron con las directrices españolas (Real Decreto RD1201/05) y de la Unión Europea (Directiva Europea 2010/63/UE) sobre la experimentación con animales para la protección y el uso humanitario de animales de laboratorio. Estos experimentos se llevaron a cabo en el Servicio de Experimentación Animal de la Universidad de Salamanca (Registro número: PAE/SA/001). Los procedimientos fueron aprobados por el comité de ética de la Universidad de Salamanca (Aprobación de protocolo número: 48531).

Se emplearon 14 hámster dorados machos (*Mesocricetus auratus*) de 4 semanas de edad, endogámicos con un peso promedio de 120 gramos (Charles River Laboratories, Lyon, Francia), mantenidos en una instalación libre de patógenos y manipulados según las directrices institucionales, con ciclos de 12/12 luz/oscuridad a una temperatura de 22°C. Todos los animales recibieron dieta estándar y agua *ad libitum*. Los hámsters fueron divididos en dos grupos, grupo control y grupo tratamiento. Cada grupo se inoculó en la nariz vía intradérmica con 1×10^6 promastigotes de fase estacionaria, en un volumen de 50 μ l de PBS. Estos animales fueron anestesiados previamente con Forane® por vía inhalatoria. Después del inóculo se esperó a que la inflamación o lesión fuese evidente en los dos grupos. Transcurrido este tiempo se trataron los animales con 20

mg/kg peso al día de edelfosina disuelta en agua, con una aguja de alimentación oral, durante 28 días. La evaluación clínica se realizó midiendo el tamaño de la nariz después del desarrollo de la lesión, cada 8 días durante el tratamiento, comenzándose las medidas un día después del tratamiento, con un calibrador digital según se ha descrito previamente (169). El sacrificio de los animales en el punto final del experimento se realizó utilizando CO₂.

3.16. Evaluación de la carga parasitaria por dilución límite

Tras el sacrificio de los animales se determinó la carga parasitaria presente en la nariz después del tratamiento, mediante el ensayo de dilución límite. Para ello se tomó una biopsia de la nariz con un bisturí estéril, previa desinfección de la nariz con gasa estéril y etanol al 70%. El tejido recuperado se pesó en forma aséptica, luego se mantuvo en PBS suplementado con antibiótico (penicilina-estreptomicina 100 U/ml-100 µg/ml) durante una noche a 4°C, para eliminar la flora microbiana presente. Al cabo de este tiempo se homogenizó el fragmento de tejido en 1 ml de PBS empleando un macerador manual de vidrio estéril. Este homogenizado se diluyó (0,1 mg/ml) en medio de cultivo Schneider®, y a partir de esta suspensión se hicieron diluciones seriadas por triplicado en placas de 96 pocillos que contenían medio bifásico Novy-MacNeal-Nicolle (NNN). Las placas se incubaron a 26°C durante 20 días y se examinaron semanalmente en un microscopio invertido (Nikon-TS 100), evaluando la presencia de promastigotes viables. La dilución más alta en la que se observó crecimiento del parásito se consideró como el recíproco de la concentración de parásitos por 0,1 mg de tejido. La carga total parasitaria se calculó teniendo en cuenta el peso del órgano infectado.

3.17. Ensayo TUNEL

Para corroborar la fragmentación del ADN *in situ* se empleó la técnica TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*), utilizando el kit “DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System” (Promega, Madison, WI, EE.UU.), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los parásitos fueron puestos en un portaobjetos recubierto con una película de poli-L-lisina y fijados con paraformaldehído (PFA) al 4%, durante 20 min. Posteriormente los parásitos se permeabilizaron con Triton X-100 0.2%, durante 20 min, y se incubaron con las soluciones indicadas en el kit (0.3 nM FITC-dUTP,

3 nM dATP, 50 nM CoCl₂, 5 unidades TdT, 1x Reaction Buffer). Finalmente se adicionó yoduro de propidio y se incubó durante 10 min. Este último tiñe el ADN de todas las células con fluorescencia roja, mientras que el nucleótido dUTP marcado con fluoresceína se incorpora solo en los extremos 3'-OH del ADN fragmentado, dando lugar a una fluorescencia verde. Las muestras se visualizaron en un microscopio confocal Zeiss LSM510 (Oberkochen, Alemania).

3.18. Localización de edelfosina por microscopia de fluorescencia

Promastigotes de *L. panamensis* y células HeLa fueron incubados con el análogo fluorescente de edelfosina (*all-(E)-1-O-(15'-phenylpentadeca-8',10',12',14'-tetraenyl)-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine (PTE-ET)*) 10 μM, cedido por los Drs. Francisco Amat-Guerri y A. Ulises Acuña (Consejo Superior de Investigaciones Científicas -CSIC-, Madrid) (85, 170). Posteriormente las células fueron incubadas con 100 nM de MitoTracker (Molecular Probes, Carlsbad, California, USA) durante 20 min, para la coloración de las mitocondrias. La colocalización fue analizada usando un microscopio de fluorescencia (Axioplan 2; Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Germany) adaptado con una cámara digital (ORCA-ER-1394; Hamamatsu).

3.19. Ruptura de los microdominios lipídicos *raft*

Los parásitos fueron incubados en medio libre de suero con 2.5 mg/ml de methyl-β-cyclodextrin (MβCD) durante 40 min a 26°C. Después del tratamiento, los parásitos fueron lavados con PBS y resuspendidos en medio completo antes de adicionar la edelfosina.

3.20. Aislamiento de los microdominios lipídicos *raft*

Se procedió al aislamiento y separación de los lípidos *rafts* mediante lisis celular en detergente no iónico y posterior centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa según se ha descrito previamente (88). Para ello, 10⁸ parásitos fueron lavados con PBS frío e incubados durante 1 hora en hielo con 1,5 ml de 1% Triton X-100 en TNEV (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM ortovanadato de sodio) conteniendo 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) como inhibidor de proteasas. Seguidamente, el lisado de parásitos se homogenizó mediante 15 pases a través de un

homogeneizador de tejidos tipo Potter-Elvehjem. Los núcleos fueron eliminados centrifugando 8 min a 1000 rpm. A continuación 1 ml del sobrenadante se pasó a un tubo de centrífuga Beckman 14 x 95-mm (Beckman Instruments, CA, EE.UU.) y se mezcló con 1 ml de sacarosa al 85% en TNEV. Sobre esto se añadieron 6 ml de sacarosa al 35% en TNEV y finalmente se pusieron 3,5 ml de sacarosa al 5% en TNEV. Las muestras fueron centrifugadas en un rotor SW40 durante 18 horas a 38000 rpm a 4°C en una ultracentrífuga Beckman optima LE-80k (Beckman Instruments), y la centrifugación se detuvo en ausencia de freno para evitar la distorsión del gradiente formado. Después de la centrifugación se recogieron fracciones de 1 ml comenzando desde la superficie del gradiente (fracción 1) hasta el fondo del mismo (fracción 12).

Para determinar la localización de los lípidos *raft* en el gradiente discontinuo de sacarosa, se sometieron 25 µl de cada fracción a una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE y posterior *Western-blot*. Después del bloqueo de la membrana durante 1 hora en TBS (50 mM Tris-HCL, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20) con 5% de leche desnatada en polvo, las membranas fueron incubadas 1 hora a temperatura ambiente con la subunidad B de la toxina colérica conjugada a peroxidasa de rabano (CTx B-HRP) (Sigma), para la detección del gangliosido G_{M1} presente en los microdominios lipídicos *raft*.

3.21. Electroforesis en gel bidireccional

Las fracciones enriquecidas con los microdominios lipídicos *rafts* (fracciones 3 a la 6 del gradiente de sacarosa), fueron precipitadas con metanol/cloroformo, y resuspendidas en buffer de rehidratación (Urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, DTT 50 mM, TCEP 5 mM, DeStreak 15 mg y buffer IPG 0.5%). Posteriormente 100 µg de proteína fueron aplicadas en tiras de 13 cm IPG (del inglés *Immobiline DryStrip gels*) con un gradiente de pH no lineal de 3 a 10 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). El isoelectroenfoque se realizó a 50 V durante 12 h, 500 V por 1 h, 1000 V por 1 h, un gradiente de voltaje entre 1000 y 8000 V por 1 h, y finalmente 5 h hasta que el voltaje llegue a 35000 V. Después, las tiras fueron tratadas con buffer de equilibrio SDS (*sodium dodecylsulfate*) (Tris-HCl 375 mM pH 8.8, urea 6 M, glicerol 20%, SDS 2%) más ditiotreitól (DTT) 2% durante 15 min para la desnaturalización de las proteínas, tras lo cual se trataron con buffer de equilibrio más iodoacetamida 2,5%, para la alquilación de

proteínas. La segunda dimensión de la electroforesis se realizó en geles de SDS-poliacrilamida al 10% (SDS-PAGE). Las proteínas fueron teñidas con Sypro Ruby (Molecular Probes, Eugene, OR, EE.UU.) según las indicaciones del fabricante, y los geles fueron escaneados utilizando un lector de fluorescencia Fuji FLA-3000.

3.22. Digestión trípica de proteínas

Las proteínas de interés fueron extraídas de forma automática con el recolector de puntos Proteineer (Bruker Daltonics). La digestión fue realizada como se ha descrito previamente (171), con pequeñas variaciones. La coloración con Sypro Ruby fue lavada con agua y se deshidrató con acetonitrilo al 100%. A continuación, fueron tratadas con DTT 10 mM en 25 mM de bicarbonato de amonio a 56°C y después con iodoacetamida 55 mM en 50 mM de bicarbonato de amonio a temperatura ambiente. Después las piezas de gel se lavaron con acetonitrilo al 100% y bicarbonato de amonio 20 mM. La tripsina porcina modificada, a una concentración final de 6 ng/ μ l en bicarbonato de amonio 20 mM (Promega, Madison, WI), se añadió a las piezas de gel secas y se incubaron a 37°C por 16 h. Los péptidos trípticos se recuperaron y se secaron al vacío, luego fueron resuspendidos en ácido trifluoroacético 0.15 y acetonitrilo al 50% en un volumen de extracción final de 5 μ l.

3.23. Determinación de la masa de los péptidos trípticos e identificación de proteínas

El análisis de las huellas peptídicas se realizó en un espectrómetro de masas Bruker Ultraflex MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization time-offlight) (Bremen, Alemania). 5 μ l de la solución base (ácido 2,5-dihidroxibenzoico 5 g/l en acetonitrilo acuoso 33% más ácido trifluoroacético 0.1%) fue cargada en placas AnchorChip™ de 400 μ m de diámetro (Bruker Analytic GmbH, Bremen, Alemania), y se adicionó 1 μ l de la solución de extracción del péptido y se dejó secar a temperatura ambiente. El rango de masas de adquisición fue fijado a 600-4000 Da. El equipo fue calibrado empleando señales de masas protonadas con una mezcla de péptidos de calibración estándar (Bruker Peptide Calibration Standard #206196, Bruker Daltonics) con un rango de 1000 a 3200 m/z, y posteriormente cada espectro se calibra internamente con señales seleccionadas derivadas de la autoproteólisis de la tripsina

(842.510-y 2211.105-Da péptidos) para llegar a una típica precisión de las mediciones de masa de ± 30 ppm.

Cada espectro se analizó en el programa FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics), usando los siguientes parámetros: umbral de señal de ruido de 1, algoritmo de Savitzky-Golay regular, algoritmo tangencial para la sustracción línea de base y el algoritmo de centroide para la asignación de pico monoisotópico. En todos los casos la resolución fue mayor de 9,000. Todos los contaminantes conocidos (autoproteolisis de tripsina y picos conocidos de queratina) fueron excluidos durante el proceso. Los picos generados se analizaron en el servidor Mascot (versión 2.2, febrero de 2007; *Electroforesis*, 20 (18), 3551-67, 1999), utilizando el programa Bio Tools 3.1 (Bruker Daltonics) y realizando la búsqueda en la base de datos MSDB (31 de agosto de 2006; 3.239.079 secuencias).

Los parámetros de la búsqueda se establecieron de la siguiente manera: la búsqueda se restringió a otros eucariotes (69482 secuencias), digestión con tripsina, exactitud de masa de 100 ppm, masas monoisotopicas MH+, modificación fija carbamidometil cisteína, y modificación variable oxidación de metionina. Las puntuaciones MOWSE con un valor superior a 61 fueron considerados como significativos ($p < 0,05$).

3.24. Transfección de macrófagos J774

Los macrófagos fueron cultivados en placas de 6 pocillos en medio OptiMEM® (Invitrogen), a una concentración de 200.000 células/ml para el silenciamiento del gen PKR (sc-36364) de Santa cruz Biothenology para cada pocillo de células, se diluyeron 50 nM de siRNA en 25 μ l de medio OptiMEM® (Invitrogen). A continuación, se diluyo 1 μ L Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) en 25 μ l de OptiMEM®, durante 5 min a temperatura ambiente, después del tiempo de incubación se añadió la dilución del siRNA a la Lipofectamine™ y se incubo durante 30 min. La mezcla se añadió a cada pocillo y se dejó incubar durante 4 h. Transcurrido el tiempo se retiró el sobrenadante y se adiciono medio OptiMEM® y se dejaron a 37°C durante toda la noche.

3.25. Análisis estadístico

Los datos se muestran como valores medios \pm desviación estándar (D.S.). Se evaluaron las diferencias estadísticas entre grupos utilizando la prueba *t* de *Student*. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo.

4. Resultados

4.1. Acción antiparasitaria de alquilfosfolípidos o éter lípidos antitumorales

4.1.1. Células tumorales vs parásitos de *Leishmania spp.*

A pesar del escaso conocimiento de la maquinaria de muerte celular en parásitos, se han postulado distintas hipótesis sobre la significancia biológica de la apoptosis en estos microorganismos (117, 121). Sin embargo, inducir una respuesta apoptótica puede ser una nueva diana terapéutica en el tratamiento de las enfermedades parasitarias. Estos parásitos, según el estímulo de muerte que reciban, son capaces de desarrollar un patrón de muerte con características apoptóticas, autofágicas o necróticas. Estos procesos de muerte son eventos regulados y desencadenados por mecanismos moleculares que pudieran estar parcialmente conservados entre estos parásitos y los eucariotas superiores.

La edelfosina, que se ha considerado como el prototipo estándar de ATLs, induce apoptosis de forma selectiva en células tumorales y en cultivos primarios de células procedentes de tumores de pacientes con cáncer (146, 151). Los datos obtenidos hasta el momento indican que la edelfosina induce la muerte a través de la activación directa de la maquinaria apoptótica por un mecanismo de acción que implica los dominios de membrana lípidos *rafts* (10, 85, 88, 147). En tumores sólidos parece actuar por un mecanismo diferente que implica la activación de la apoptosis a través del retículo endoplásmico (149, 150). A pesar de que este proceso de apoptosis mediado por ATLs se inicia a través de distintos mecanismos, se ha demostrado que la mitocondria juega un papel fundamental en la inducción de apoptosis por edelfosina (93, 147, 149, 150, 164, 172, 173). De esta forma, la edelfosina podría considerarse como un buen inductor de apoptosis en distintos sistemas biológicos. Además, la edelfosina también induce muerte en parásitos de *Leishmania* (49). Evidencias indirectas sugieren que el metabolismo lipídico (50) y la mitocondria (51) pueden estar implicados. Sin embargo, el tipo de muerte y el mecanismo de acción aún no están claros. Debido al constante aumento de

moléculas reportadas que inducen muerte con características apoptóticas en *Leishmania*, decidimos extrapolar los conocimientos adquiridos sobre la edelfosina en la inducción de apoptosis en células tumorales a su acción antiparasitaria. Para ello como modelo de células tumorales utilizamos varias líneas celulares cancerosas humanas, incluyendo Jurkat, MM144 y HeLa y varias cepas de parásitos de *Leishmania* causantes de leishmaniasis cutánea y visceral.

4.1.2. Comparación de la actividad antileishmania y antitumoral de los ATLs

Como primera aproximación al estudio de la muerte inducida por la ATLs en promastigotes de diferentes géneros de *Leishmania spp.*, se comparó el efecto de los análogos edelfosina, miltefosina, perifosina y erucilfosfocolina en la apoptosis de parásitos de *Leishmania* y algunas células tumorales. El contenido de ADN se evaluó por citometría de flujo y las células se incubaron durante 24 horas con 10 μ M de los diferentes alquilfosfolípidos, una concentración conocida previamente como farmacológicamente relevante (10, 174). La muerte inducida en parásitos de *Leishmania spp.*, se comparó con los resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio en células tumorales (147, 149), así como con las células tumorales arriba indicadas. La actividad antiparasitaria de los diferentes ATLs se observó que seguía el siguiente patrón de potencia anti-*Leishmania*; edelfosina > miltefosina \geq perifosina > erucilfosfocolina (Figura 12A), mientras que la actividad antitumoral fue edelfosina > perifosina > miltefosina \cong erucilfosfocolina (Figura 12B).

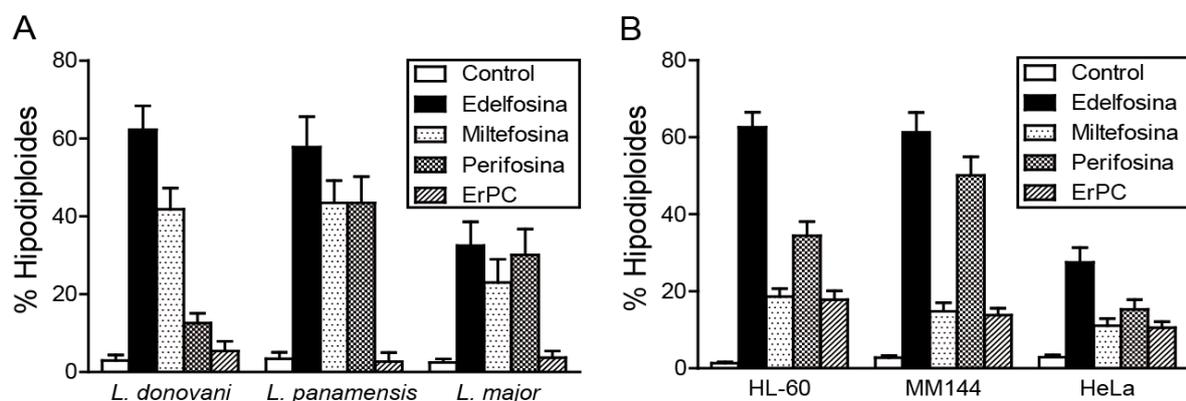


Figura 12. Edelfosina es el ATL más potente en inducir muerte celular con características de apoptosis en *Leishmania* y células tumorales. Parásitos de *Leishmania* y células tumorales tratadas con 10 μ M de los ATLs indicados durante 24 horas. Representación esquemática de la cuantificación relativa por citometría de flujo de células hipodiploides en (A) promastigotes de *Leishmania* y (B) células tumorales. Los porcentajes de células corresponden al promedio de tres experimentos independientes \pm D.S.

La edelfosina fue el ATL más activo frente a distintas líneas celulares cancerosas humanas y fue igual de efectivo contra cepas de *Leishmania* de diferentes subgéneros, *L. (Leishmania) donovani* causante de leishmaniasis visceral y *L. (Viannia) panamensis* causante de leishmaniasis cutánea (Figura 1A). La diferencia en la acción citotóxica de edelfosina vs. miltefosina fue mayor en células tumorales que en promastigotes de *Leishmania*, lo que sugiere que hay procesos comunes y diferentes involucrados en el mecanismo de acción de estas dos moléculas.

4.1.3. Actividad de la edelfosina en promastigotes de *L. panamensis*

Los resultados anteriores nos llevaron a profundizar en el mecanismo de muerte inducido por la edelfosina en parásitos de *Leishmania* para lo cual escogimos *L. panamensis*, cepa causante de un gran número de infecciones en países de América del Sur, principalmente Colombia y Brasil, la cual mostró una alta sensibilidad a edelfosina. En principio, se determinó el tiempo en el cual la edelfosina empezaba a inducir muerte celular en promastigotes de *L. panamensis* en fase logarítmica. Se determinaron los cambios morfológicos, basados en los siguientes parámetros:

1. Observación de la morfología y motilidad del parásito utilizando microscopía óptica.
2. Cambios en la dispersión de luz del láser del citómetro de flujo teniendo en cuenta la dispersión frontal de la luz FSC (*forward scatter*) y dispersión lateral SSC (*side scatter*).

Con tal fin se trataron promastigotes de *L. panamensis* con 10 μ M de edelfosina y se evaluaron a diferentes intervalos de tiempo. Los parásitos después de ser tratados con edelfosina fueron teñidos posteriormente con naranja de acridina (NA). Este fluorocromo ha sido ampliamente utilizado, entre otras aplicaciones, como un marcador de apoptosis en diferentes tipos de células incluyendo protozoos (175). NA se acumula en orgánulos vesiculares ácidos (OVA), tales como lisosomas y autofagosomas, dando lugar a una fluorescencia de color rojo. Por otra parte, también se observa una fluorescencia verde al intercalarse con el ADN. En este sentido, la NA se ha utilizado como herramienta poderosa para monitorear cambios fisiológicos celulares (175).

En la observación microscópica de promastigotes de *L. panamensis* después del

tratamiento con edelfosina encontramos alteraciones en la morfología y movilidad celular después de 3 horas de incubación. Primero se observa una pérdida de la movilidad del parásito seguida de una pérdida del volumen celular convirtiéndose en una forma redondeada y finalmente se observa pérdida del flagelo (Figura 13A).

El estudio de la morfología por citometría de flujo evidenció la pérdida del volumen celular, ya que se observa la aparición de dos poblaciones celulares a medida que aumenta el tiempo de incubación con edelfosina, debido a la diferente capacidad de dispersar la luz del láser del citómetro. Se observa una subpoblación que conserva las características similares a los parásitos no tratados, y aparece otra subpoblación con una reducción en su valor FSC (Figura 13B), sugiriendo una alteración en la forma y/o volumen celular, disminuyendo el tamaño celular, de forma similar a la observada en eucariotas en la MCP.

En el análisis de la coloración con NA se pueden distinguir diferentes patrones de tinción (Figura 13C). En los parásitos control se observa una fluorescencia verde brillante uniforme (núcleo y kinetoplasto) y un verde difuso suave en el citosol. Así mismo, se observan vesículas rojas fluorescentes que corresponden a lisosomas y otros compartimientos ácidos (Figura 13C y D). A medida que pasa el tiempo de incubación con edelfosina, este perfil de coloración va cambiando considerablemente, los parásitos de *L. panamensis* muestran un aumento en las vesículas rojas marcadas, mientras que la fluorescencia verde brillante del núcleo y kinetoplasto va disminuyendo (Figura 13C y D).

4.1.4. Inducción de autofagia en *L. panamensis* por edelfosina

El aumento en la fluorescencia roja en los parásitos marcados con NA es debido posiblemente a un aumento de los lisosomas u otros compartimientos ácidos como autofagosomas. De esta manera, esto podría indicar que la edelfosina puede estar induciendo efectos autofágicos. Para confirmarlo, los promastigotes de *L. panamensis* tratados con edelfosina fueron posteriormente teñidos con monodansilcadaverina (MDC), el cual es un compuesto autofluorescente que tiñe específicamente los autofagolisosomas (vacuolas autofágicas) y ya ha sido probado en parásitos (176, 177). Se determinó el porcentaje de células MDC positivas en el grupo control y en los parásitos tratados con 10 μ M de edelfosina, visualizándose las células por microscopia de fluorescencia. Como se observa en la Figura 14 en los parásitos tratados con

edelfosina, el número de parásitos positivos para MDC fue significativamente mayor que en los parásitos control (figura 14A y B). Este resultado sugiere que la edelfosina induce la formación de vacuolas autofágicas en *L. panamensis*.

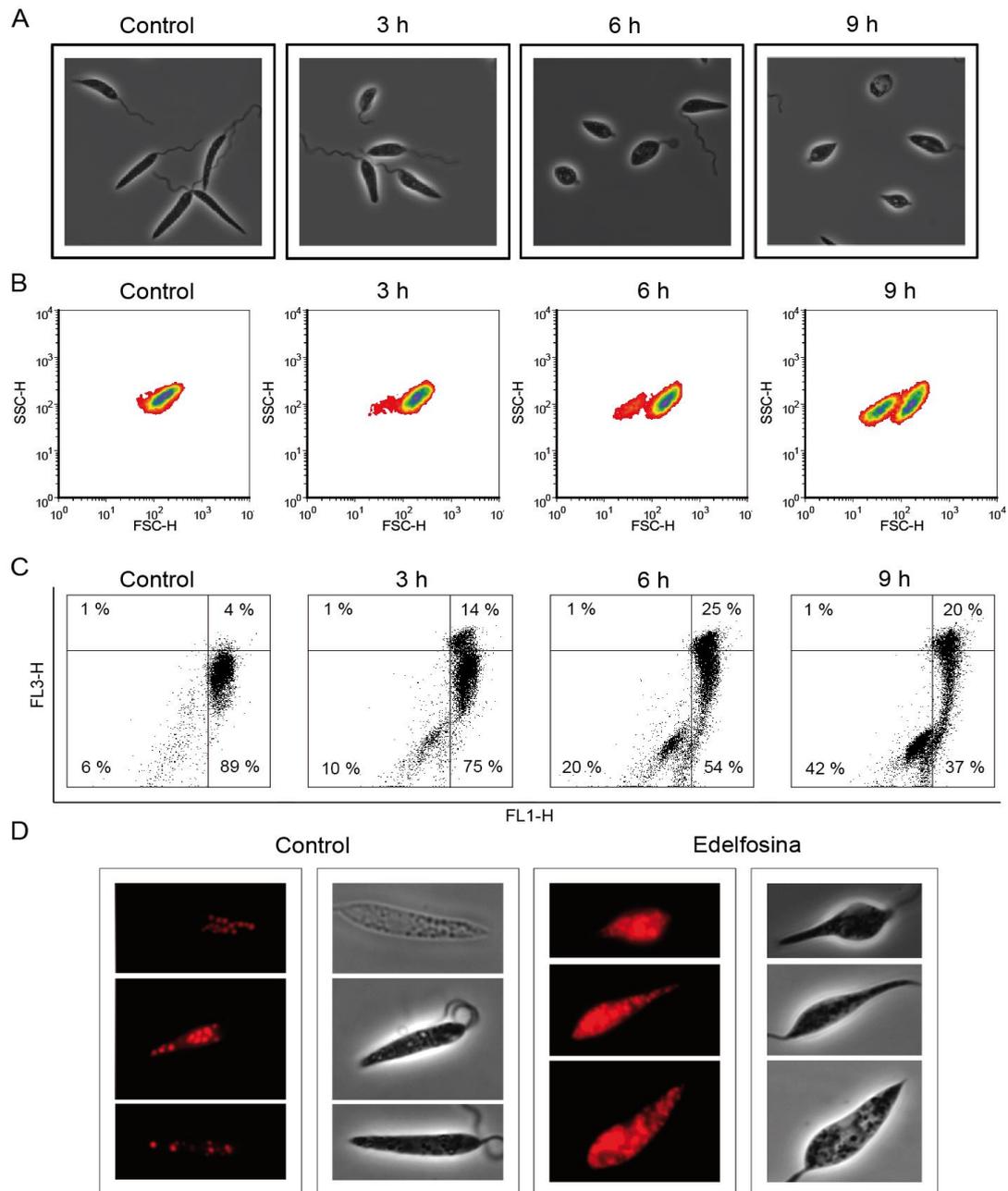


Figura 13. Cambios en la morfología celular de promastigotes de *L. panamensis* tras el tratamiento con edelfosina. Promastigotes en fase logarítmica de crecimiento tratados con 10 μ M de edelfosina y evaluados a las 3, 6 y 9 horas. Como control se tienen parásitos sin tratar. (A) Fotografías en contraste de fase para evaluar los cambios en la morfología celular. (B) Histogramas biparamétricos (SSC vs. FSC) que muestran la capacidad de dispersar la luz láser del citómetro en parásitos sin tratar (control) y tratados con edelfosina. (C) Histograma biparamétrico (FL3 vs. FL1) que representa la tinción con NA. FL1-H, fluorescencia verde (núcleo y kinetoplasto) y FL3-H, fluorescencia roja (OVA). Se indican los porcentajes de parásitos en cada una de los cuadrantes. (D) Fotos de microscopía de fluorescencia en donde se indican la fluorescencia roja (OVA) en parásitos control y tratados con edelfosina. Los resultados mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

endonucleasa, generados durante el proceso apoptótico. Como se observa en la Figura 15C, primero se observa degradación del ADN mitocondrial a las 6 horas de tratamiento y posteriormente a las 9 horas se observa degradación del ADN nucleico y mitocondrial. Estos resultados nos muestran que el proceso de muerte celular comienza con daños a nivel mitocondrial, indicando que la mitocondria podría jugar un papel importante en la muerte inducida por edelfosina.

4.1.6. Acumulación de edelfosina y muerte de los amastigotes intracelulares de *L. panamensis*.

Los parásitos de *Leishmania* son intracelulares obligados de células del sistema mononuclear fagocítico, por lo tanto analizamos la localización de la edelfosina en macrófagos J774 infectados con *L. panamensis*. Para ello utilizamos un análogo fluorescente (fluorescencia azul) de edelfosina PTE-ET que se ha utilizado para analizar la localización subcelular de la edelfosina (10, 85, 87, 89, 150). La incubación de macrófagos J774 con PTE-ET confirma que la edelfosina es incorporada por la célula hospedera. El PTE-ET fue localizado principalmente alrededor del núcleo que podría relacionarse con la acumulación de este éter lípido en el retículo endoplásmico de células tumorales como ya está reportado (149, 150). Sin embargo, cuando los macrófagos fueron infectados con *L. panamensis* expresando una proteína verde fluorescente (*Lp*-GFP), la localización de la edelfosina se concentró en los parásitos que se encontraban dentro del macrófago, independientemente de que el tratamiento con PTE-ET fuera con macrófagos previamente infectados con parásitos o en macrófagos intactos e infectados posteriormente al tratamiento con PTE-ET (Figura 16A). De esta forma, se observó una preferencia de la edelfosina en acumularse en los parásitos de *Leishmania*, lo que sugiere que la acción de este éter lípido es debida a una interacción directa con el parásito.

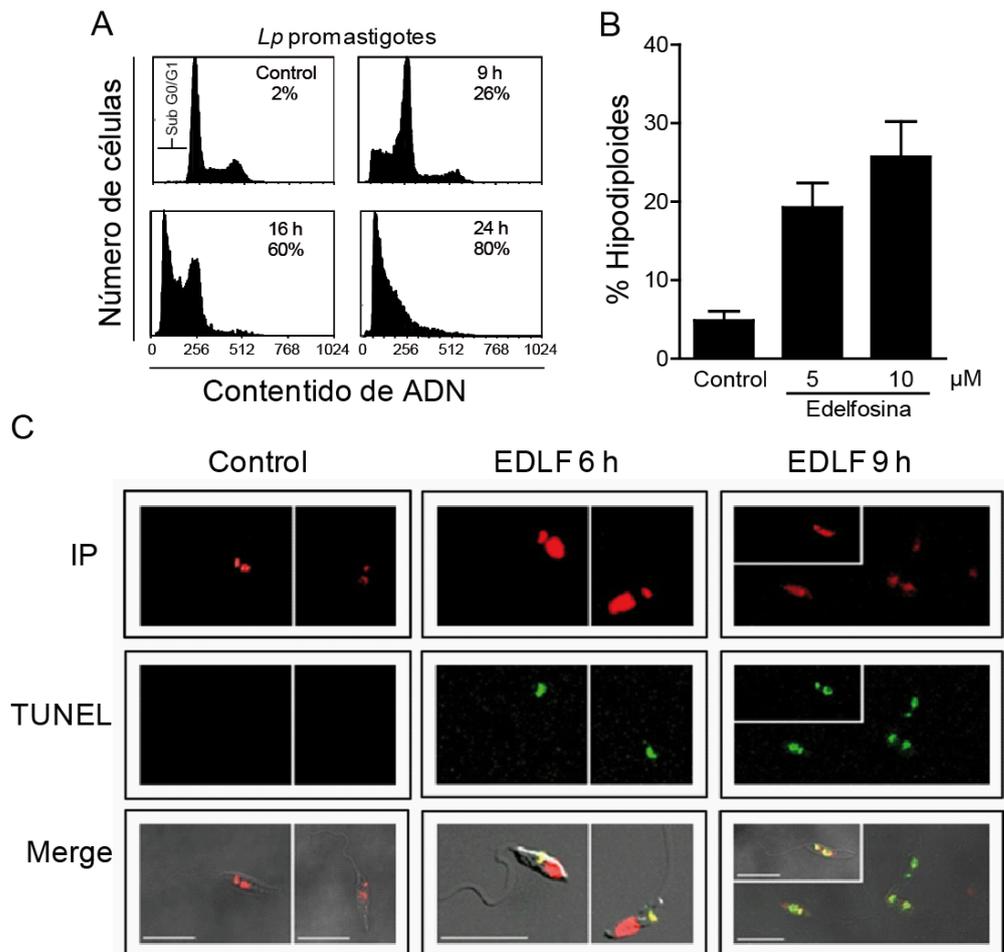


Figura 15. Efecto de la edelfosina en la fragmentación del ADN de *L. panamensis*. (A) *Time-course* de apoptosis inducida por 10 μM de edelfosina (EDLF). Parásitos control sin tratar fueron analizados en paralelo. Los porcentajes de células con un contenido sub-G₀/G₁ de DNA, que representan las células una muerte celular con características apoptóticas, se indican en cada histograma. (B) Inducción de muerte en amastigotes axénicos de *L. panamensis* tratados con las concentraciones indicadas de edelfosina durante 16 horas. Los porcentajes de parásitos corresponden al promedio de tres experimentos independientes ± D.S. (C) Promastigotes de *L. panamensis* control y tratados con 10 μM de edelfosina durante 6 y 9 h, teñidos con ioduro de propidio (IP) y ensayados por TUNEL para el análisis por microscopía confocal. El solapamiento (*Merge*) de los paneles de IP y TUNEL muestra los orgánulos conteniendo ADN, con ADN fragmentado en amarillo. La imagen del contraste de fases (*DIC: differential interference contrast*) fue incluido en el panel *Merge* para resaltar la morfología del parásito y facilitar la identificación del kinetoplasto. Los resultados mostrados son representativos de al menos tres experimentos independientes.

Así mismo, se evaluó el efecto de la edelfosina en macrófagos J774 infectados con parásitos *Lp*-GFP. Los macrófagos fueron infectados con *Lp*-GFP a una proporción 10:1 (parásito: célula) y posteriormente tratados con 10 μM edelfosina durante 24 horas. Después del tiempo de incubación se comparó el porcentaje de células infectadas entre el control sin tratar, macrófagos infectados con *Lp*-GFP y el tratamiento, macrófagos infectados con *Lp*-GFP y tratados con edelfosina, nuestros resultados mostraron una reducción significativa del número de macrófagos

infectados, los macrófagos sin tratamiento mostraron un 67% de infección, mientras que los macrófagos tratados con edelfosina solo mostraron un 35% de infección (Figura 16B). Así mismo se determinó el número de parásitos en cada macrófago, cuantificados por microscopia de fluorescencia, donde se observó que los macrófagos sin tratamiento poseían en promedio más de 5 parásitos por macrófago, mientras los macrófagos tratados con edelfosina en promedio tenían menos de dos parásitos (Figura 16C).

4.1.7. Actividad de los diferentes ATLs en parásitos residentes en macrófagos derivados de medula ósea.

Posteriormente se analizó el efecto de los ATLs en macrófagos murinos derivados de medula ósea infectados con *L. major*. Los macrófagos infectados fueron tratados con los diferentes ATLs a 10 μ M durante 72 horas, y luego se evaluó la carga parasitaria por el ensayo de dilución límite. Como se muestra en la Figura 16D, la edelfosina es el ATL más potente en eliminar amastigotes intracelulares de *L. major* en comparación con miltefosina, perifosina y erucilfosfocolina. La actividad leishmanicida de la edelfosina se encuentra estrictamente ligada a su estructura molecular, ya que el análogo inactivo ET-18-OH, en el que el grupo metoxi del C2 fue remplazado por un grupo OH (1-*O*-octadecyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine) (146, 178), era incapaz de eliminar los parásitos de *Leishmania* (Figura 16D).

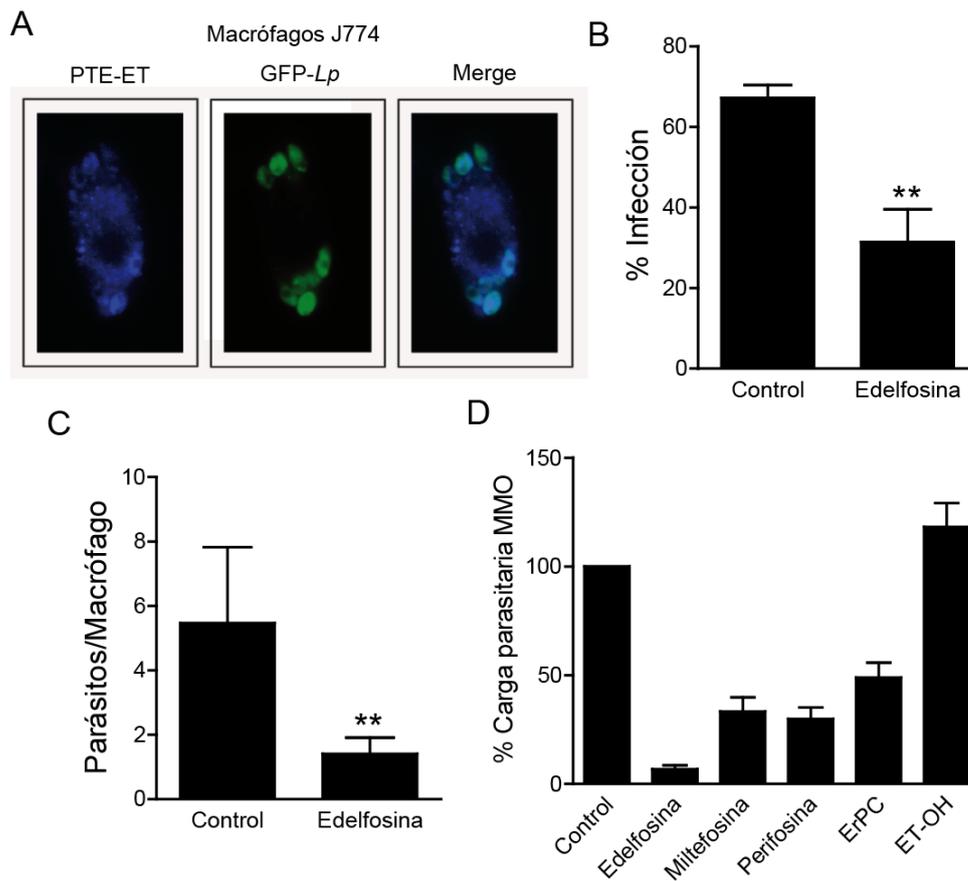


Figura 16. Acumulación de edelfosina y muerte de amastigotes intracelulares. (A) Macrófagos J774 infectados con *Lp*-GFP y posteriormente incubados 1 h con 10 μ M de PTE-ET fueron analizados por microscopía de fluorescencia. Tras la incubación de macrófagos J774 infectados con *Lp*-GFP, e incubados durante 24 horas con 10 μ M edelfosina, se determinó el porcentaje de infección (B) y el número de parásitos por macrófago (C). Las fotos son representativas de por lo menos tres experimentos independientes. (D) MDMO de ratón infectados con *L. major* y posteriormente tratados con 10 μ M de los diferentes ATs. La carga parasitaria se midió por dilución límite después de 3 días de incubación. Los porcentajes corresponden al promedio de por lo menos tres experimentos independientes \pm D.S. ** $p < 0.01$.

4.1.8. Actividad de edelfosina en hámsters infectados con *L. panamensis*

Recientemente, se ha demostrado una potente actividad antitumoral de la edelfosina *in vivo* administrada por vía oral en diferentes modelos xenograft en ratones SCID (10, 148, 149). De igual forma, en este trabajo encontramos que el tratamiento vía oral de edelfosina es también efectivo para eliminar la infección por *Leishmania* en hámster infectados con *L. panamensis* (Figura 17A-C). Se utilizaron hámster para el ensayo *in vivo* ya que estos animales están ampliamente reportados como el mejor modelo para reproducir las características clínico-patológicas de la leishmaniasis humana por *L. panamensis*, siendo superior al modelo con ratones (179-181). Un

millón de promastigotes de *L. panamensis* en fase estacionaria fueron inoculados en la nariz de 14 hámster como modelo de leishmaniasis cutánea. A continuación, los animales fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos iguales, grupo control tratados con el vehículo (agua) y grupo de tratamiento con edelfosina. El seguimiento de la inflamación de la nariz se realizó mediante mediciones con un calibrador. La progresión de la enfermedad (grupo control) condujo a una gran inflamación y finalmente ulceración de la nariz. Sin embargo, la administración vía oral de edelfosina (20 mg/kg de peso al día) durante 28 días mostró disminución de la inflamación nasal (Figura 17A), así como disminución de la carga parasitaria en el sitio de la infección (Figura 17B). El efecto de la edelfosina en la inflamación nasal se hizo evidente después de 8 días de tratamiento (Figura 17A). La carga parasitaria, medida bajo la técnica de dilución limitante, mostró una disminución estadísticamente significativa después del tratamiento por vía oral con edelfosina (Figura 17B). Igualmente el tratamiento con edelfosina mostró una gran mejoría de los signos de la leishmaniasis cutánea, disminución de la inflamación, llevando al animal a un aspecto morfológico prácticamente normal, eliminando cualquier marca de inflamación ó ulceración (Figura 17C).

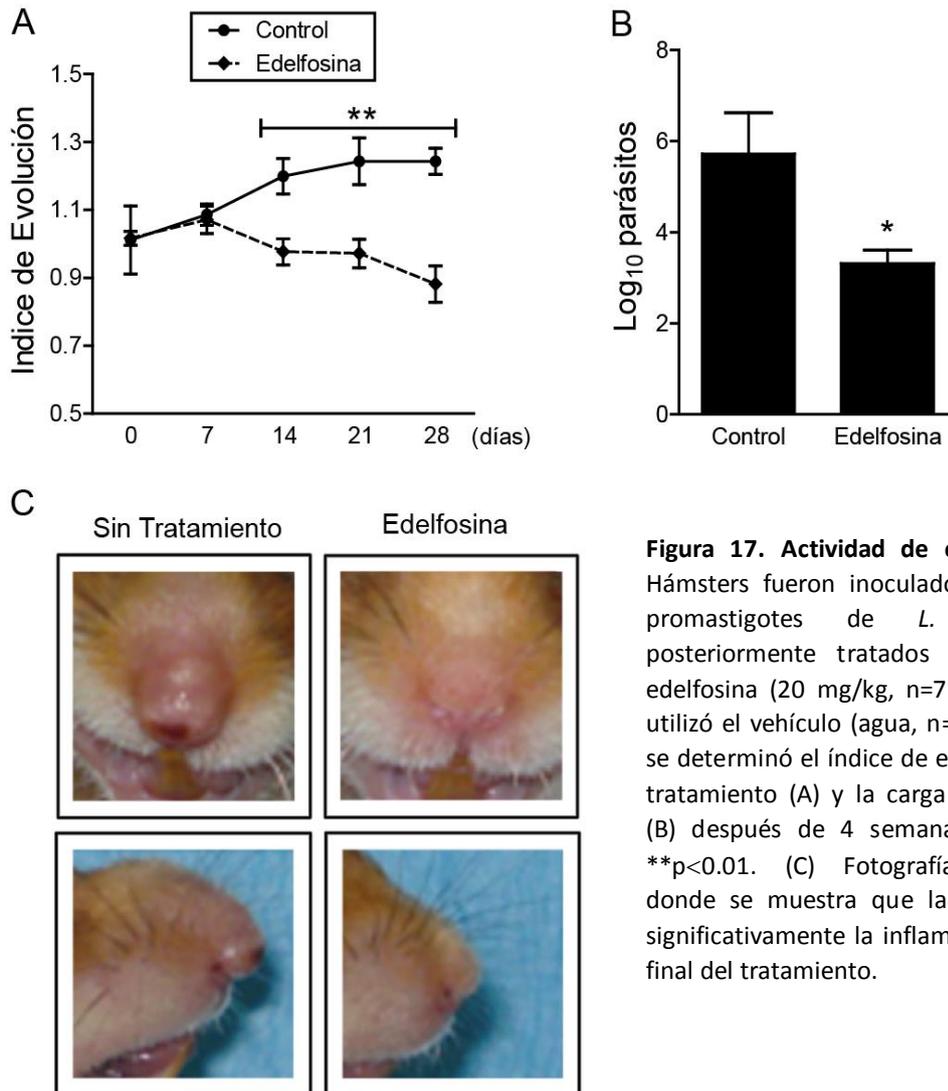


Figura 17. Actividad de edelfosina *in vivo*. Hámsters fueron inoculados en la nariz con promastigotes de *L. panamensis* y posteriormente tratados por vía oral con edelfosina (20 mg/kg, n=7). Como control se utilizó el vehículo (agua, n=7). Posteriormente se determinó el índice de evolución durante el tratamiento (A) y la carga parasitaria medida (B) después de 4 semanas de tratamiento. **p<0.01. (C) Fotografías representativas donde se muestra que la edelfosina reduce significativamente la inflamación de la nariz al final del tratamiento.

4.1.9. Efecto de la edelfosina en las propiedades inflamatorias del macrófago

Debido a que los amastigotes de *Leishmania* residen y se dividen en los macrófagos del hospedero mamífero, evaluamos si estos son capaces de incorporar una cantidad farmacológicamente relevante de edelfosina. Datos previos de nuestro laboratorio indican que la edelfosina es incorporada preferentemente por células tumorales, mientras que las células normales tales como linfocitos, neutrófilos, hepatocitos y fibroblastos incorporan una cantidad más pequeña de este éter lípido (85, 151, 182). Utilizando MDMO, encontramos que estos incorporan grandes cantidades de edelfosina, incluso niveles más altos que la línea celular tumoral de ratón RAW 309 Cr.1 (Figura 18A). Sin embargo, a pesar de que ambos tipos de células,

la línea celular RAW 309 y los MDMO, incorporan grandes cantidades de éter lípido, la edelfosina induce la muerte de la línea celular RAW 309 Cr.1, pero no en los MDMO (Figura 18B). Además, se observó que la edelfosina bloquea la denominada explosión respiratoria (*respiratory burst*), con la generación de ROS inducida por el zymosan en MDMO (Figura 18C). Por otro lado, MDMO de ratones que fueron tratados por vía oral con edelfosina (5 mg/kg de peso al día) durante dos semanas, mostraron una pérdida en la capacidad de producir anión superóxido, óxido nítrico e INF- γ inducido por IL-12 + IL-18 en comparación con los MDMO de los ratones que fueron tratados simplemente con agua (Figura 18D-F). Estos datos sugieren que el tratamiento con edelfosina puede disminuir las propiedades pro-inflamatorias de los macrófagos. Así, nuestros datos indican que la edelfosina es incorporada a altas concentraciones por macrófagos normales igual a lo que ocurre en células tumorales, pero a pesar de que la viabilidad del macrófago no se ve afectada, su capacidad de activar mediadores de inflamación está disminuida. Estos datos incluyendo la acumulación preferente de edelfosina en los parásitos residentes en macrófagos, sugieren una acción directa de la edelfosina sobre los parásitos de *Leishmania* y no a través de la formación de moléculas antiparasitarias derivadas del macrófago.

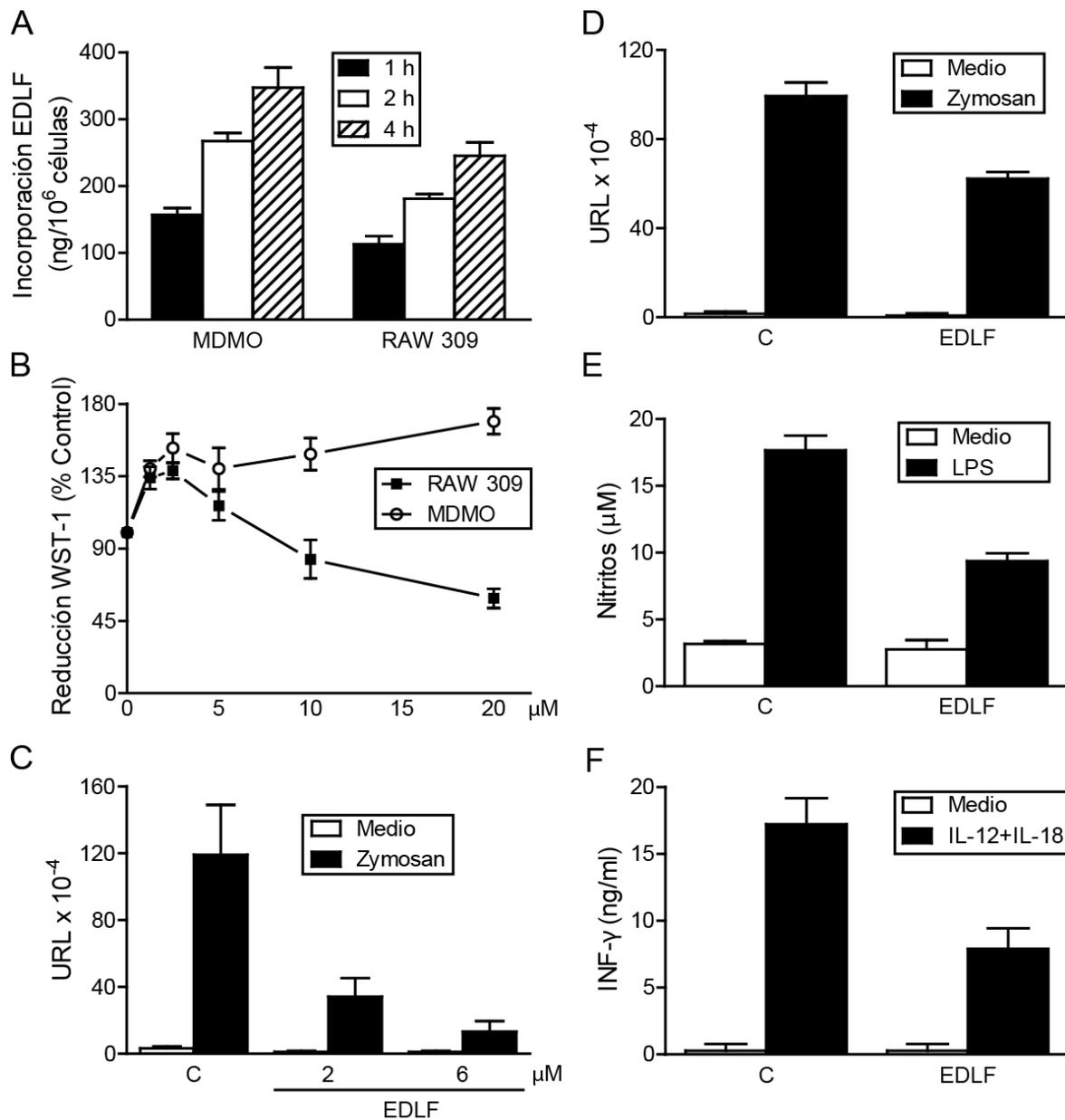


Figura 18. Edelfosina es incorporada por macrófagos e inhibe sus propiedades inflamatorias. (A) Incorporación de edelfosina en MDMO y en la línea de macrófago tumoral RAW 309 de ratón. 10⁶ células fueron incubadas con 10 μM de edelfosina (conteniendo 0.05 μCi de [³H]edelfosina) durante el tiempo indicado para medir la incorporación del ATL. (B) la edelfosina es citotóxica en la línea celular RW 309 pero no para los MDMO. 2x10⁶ células fueron incubadas durante 24 h en ausencia o presencia de edelfosina, posteriormente se analizó la viabilidad por el método WST-1. (C) La edelfosina inhibe la producción de anión superóxido en MDMO. El anión superóxido fue medido por quimioluminiscencia (Unidades Relativas de Luz, URL) en células control sin tratar y tratadas con edelfosina que habían sido previamente incubadas con medio o con zymosan para inducir una explosión respiratoria. (D-F) MDMO de ratones tratados con edelfosina mostraron disminución en la capacidad de generar mediadores inflamatorios. MDMO de animales control (sin tratar) y tratados vía oral con edelfosina fueron evaluados en su capacidad de generar anión superóxido inducido por el zymosan (D), óxido nítrico inducido por LPS (E), e INF-γ inducido por IL-12+IL-18 (F). Las células incubadas solo con medio fueron analizadas en paralelo como control negativo de cada ensayo. Los datos muestran medias ± D.S. de 5 análisis independientes.

4.1.10. Localización subcelular de la edelfosina

Según los resultados descritos en los apartados anteriores la edelfosina ataca directamente los parásitos y promueve una muerte celular con características apoptóticas. En tumores, la edelfosina activa directamente la maquinaria apoptótica, afectando procesos biológicos localizados en diferentes estructuras subcelulares, dependiendo del tipo celular. En leucemias perturba la organización de los dominios de membrana lípidos *rafts* (85, 88, 147, 183) mientras que en tumores sólidos actúa por un mecanismo que implica la activación de la apoptosis a través del retículo endoplásmico (149, 172).

A continuación se analizó la localización subcelular de la edelfosina en promastigotes de *L. panamensis* en comparación con células tumorales. Para ello usamos el análogo fluorescente de la edelfosina PTE-ET, el cual conserva la capacidad de inducir apoptosis en células tumorales (10, 85, 89, 150, 170) y en parásitos de *Leishmania* (184). En ensayos realizados en nuestro laboratorio se observó anteriormente que el PTE-ET podía inducir muerte celular en diferentes líneas celulares, y se consiguió bloquear la incorporación del análogo fluorescente al añadir simultáneamente edelfosina normal (85, 150), asumiendo así que el PTE-ET es un análogo fiable para ser utilizado como herramienta para visualizar la localización subcelular del compuesto *in situ* en parásitos de *Leishmania*. Utilizando un compuesto fluorescente MitoTracker (Molecular Probes, Eugene, OP, USA) un marcador específico de las mitocondrias, observamos una co-localización del PTE-ET principalmente en las mitocondrias de *L. panamensis* (Figura 19A). De igual forma, se encontró que el PTE-ET co-localiza con MitoTracker en células tumorales HeLa (Figura 19B). Estas observaciones sugieren que la mitocondria participa activamente en la actividad antiparasitaria y antitumoral de la edelfosina.

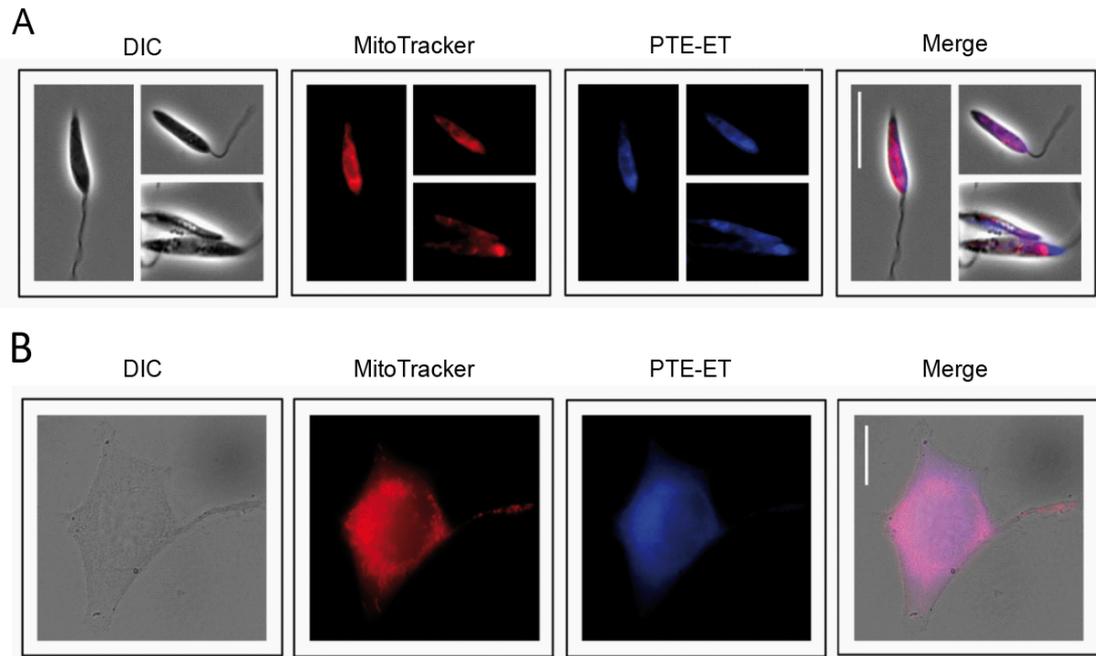


Figura 19. Localización subcelular de la edelfosina. La edelfosina se acumula principalmente en la mitocondria en *Leishmania* y células tumorales. (A) Promastigotes de *L. panamensis* y (B) células HeLa se incubaron con 10 μM de PTE-ET (fluorescencia azul) durante 1 h, y con 100 nM de MitoTracker (Rojo fluorescente) durante 20 min para teñir las mitocondrias. Posteriormente las muestras fueron analizadas por microscopía de fluorescencia. Las áreas de colocalización entre la mitocondria y el PTE-ET se muestran en el panel *Merge* en color púrpura. También se muestra la imagen de contraste de fase (DIC; *Differential Interference Contrast*). Las imágenes son representativas de tres experimentos independientes. Barra, 20 μm .

4.1.11. Papel de la mitocondria en la actividad antileishmania y antitumoral de la edelfosina

La muerte celular programada conlleva una serie de cambios bioquímicos y morfológicos que tienen como principal regulador la mitocondria. Para evaluar el papel de la mitocondria en el tratamiento con edelfosina, realizamos un *time-course* de los cambios en el $\Delta\psi_m$ y en la producción de ROS en promastigotes logarítmicos de *L. panamensis*. Los promastigotes de *L. panamensis* fueron tratados con 10 μM de edelfosina y evaluados a las 6, 9 y 12 horas. Para ello se realizó una doble tinción para determinar el $\Delta\psi_m$, mediante el empleo de DiOC₆ (fluorescencia verde), un compuesto catiónico que se acumula en la mitocondria en función de su potencial, y para analizar la producción de ROS con DHE (un compuesto no fluorescente) que se convierte en etidio (Eth; fluorescencia roja) después de su oxidación. Como se observa en la Figura 20A, en un análisis biparamétrico los parásitos no tratados mostraron un alto $\Delta\psi_m$ (DiOC₆^{Alto}) y bajos niveles del radical superóxido (DHE^{Bajo}), valores que fueron tomados como datos de referencia. Transcurridas 6 horas de tratamiento con edelfosina se

observan parásitos con una leve caída del $\Delta\psi_m$ ($\text{DiOC}_6^{\text{Bajo}}$) y un 21% aumento de ROS (DHE^{Alto}). A las 9 horas de tratamiento se observa un 35% de los parásitos con caída del $\Delta\psi_m$ ($\text{DiOC}_6^{\text{Bajo}}$) y aumento de ROS (DHE^{Alto}), efecto que aumenta a las 12 horas donde más del 50% de los parásitos presentan este fenómeno (Figura 20A). Estos eventos parecen ser los primeros en acontecer en la célula, lo que sugiere que los fenómenos que ocurren en la mitocondria son muy relevantes para el proceso de muerte inducido por edelfosina. El aumento en la oxidación de la DHE implica una mayor producción del anión superóxido que, paulatinamente podría estar llevando a la célula a estrés oxidativo. En experimentos paralelos se observó que los cambios en la producción de ROS y en la pérdida del $\Delta\psi_m$ son previos a la degradación del ADN.

El DHE es una sonda que tiene la capacidad de atravesar las membranas biológicas y después de su oxidación por el anión superóxido se producen cationes fluorescentes de etidio y 2-OH-etidio que son impermeables a las membranas biológicas, de tal manera que estos dos derivados se quedan atrapados en el compartimento donde se generan y se intercalan con los ácidos nucleicos de dicho compartimento. Por ello, con el objetivo de determinar el compartimento donde se estaba acumulando la sonda oxidada, de forma que nos permitiera determinar el lugar donde se estaba generando el anión superóxido, analizamos por microscopia de fluorescencia parásitos de *L. panamensis* tratados durante 30 min con edelfosina. Los parásitos de *L. panamensis* fueron teñidos con la sonda DHE y con Hoechst 33342, que nos permite visualizar los núcleos y los kinetoplastos (DNA mitocondrial). En análisis microscópico observamos que la edelfosina a tiempos cortos de incubación induce oxidación de la sonda DHE principalmente en el kinetoplasto (Figura 20B).

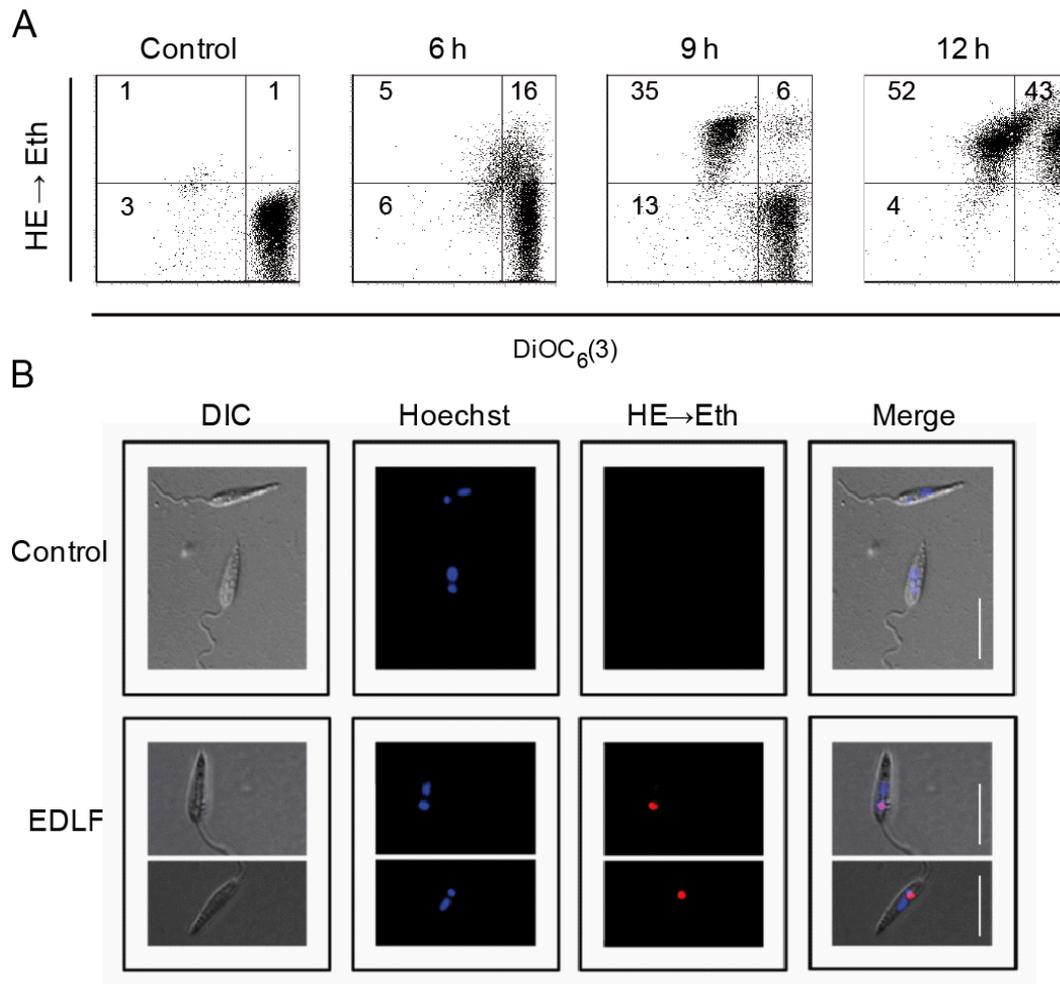


Figura 20. Papel de la mitocondria y la producción de ROS en la muerte inducida por edelfosina. (A) Promastigotes de *L. panamensis* control sin tratar y tratados con edelfosina 10 μ M durante 6, 9 y 12 h se analizaron para evaluar la pérdida del $\Delta\psi_m$ (DiOC₆(3)) y la producción de ROS (HE→Eth) por citometría de flujo. (B) Promastigotes de *L. panamensis* control y tratados con edelfosina 10 μ M (EDLF) durante 1 h, fueron incubados con 2 μ M de HE y 10 μ g/ml de Hoechst 33342, y posteriormente analizados por microscopia de fluorescencia. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes.

4.1.12. Efecto de la CsA en la muerte inducida por edelfosina

Algunos compuestos que estabilizan la membrana mitocondrial son útiles para la inhibición de la muerte celular. La CsA se utiliza como un inhibidor del poro de permeabilidad mitocondrial (PPM), actuando a concentraciones micromolares (185, 186). En muchos modelos celulares la inhibición por CsA de la apertura del PPM tiene un efecto protector de muerte, posiblemente al impedir la salida de factores pro-muerte de la mitocondria. En nuestro laboratorio se había descrito que el tratamiento de células tumorales con CsA tiene un efecto inhibitor de la muerte inducida por edelfosina (164). Continuando con la comparación entre parásitos y células tumorales,

promastigotes de *L. panamensis* se pre-incubaron con 10 $\mu\text{g/ml}$ CsA durante 1 hora y posteriormente se adicionaron 10 μM de edelfosina durante 12 h. Los resultados obtenidos indicaron que la CsA inhibe significativamente la muerte celular inducida por edelfosina en promastigotes de *L. panamensis* (Figura 21A-C). Datos publicados por nuestro laboratorio han mostrado la importancia de la mitocondria en la apoptosis inducida por edelfosina en células tumorales (147, 164), mediada principalmente por la pérdida del $\Delta\psi_m$ y la liberación del citocromo *c*. En nuestros ensayos encontramos que la CsA inhibe la apoptosis inducida por edelfosina en la línea celular humana Jurkat (leucemia linfocítica T aguda) (Figura 21B-D). Así, la pérdida del $\Delta\psi_m$ actúa como un mediador principal en la muerte inducida por edelfosina en parásitos de *Leishmania* y células tumorales humanas.

4.1.13. Papel de las especies reactivas de oxígeno en la muerte inducida por edelfosina

En vista de los claros resultados en cuanto a la producción de ROS después del tratamiento con edelfosina, evaluamos el papel del estrés oxidativo en la muerte inducida por edelfosina. La producción de ROS durante la primera fase de la apoptosis está regulada por el aumento en la síntesis de equivalentes reductores como el glutatión (GSH). El tratamiento con antioxidantes ayuda al control de los ROS por parte del sistema de control redox de la célula. El glutatión (GSH) y la N-acetilcisteína (NAC) son antioxidantes ampliamente usados a nivel celular. Estos pueden fortalecer el sistema redox de la célula por lo menos en dos formas: la primera, involucra el aumento directo de los niveles intracelulares de tioles; y la segunda, se basa en su capacidad para neutralizar el superóxido, ya que son capaces de reaccionar directamente con este radical. El sistema redox de *Leishmania*, a diferencia del sistema de mamíferos, no basa el control del estrés oxidativo en el GSH. El GSH y la NAC pueden entrar en la vía de síntesis del tripanotión, incrementando los niveles de este tiol intracelular. Basados en esto, evaluamos si los antioxidantes GSH y NAC tenían un papel protector en la muerte inducida por edelfosina. La muerte celular en parásitos de *L. panamensis* y en células Jurkat fue evaluado por la pérdida del $\Delta\psi_m$ y por el porcentaje de hipodiploidia. Aquí encontramos que tanto los parásitos como las células tumorales pre-tratadas con GSH y NAC eran protegidas de la muerte inducida por

edelfosina (Figura 21B-D). Estos resultados indican que el estrés oxidativo es un importante, aunque probablemente no exclusivo, factor determinante en la acción citotóxica de la edelfosina.

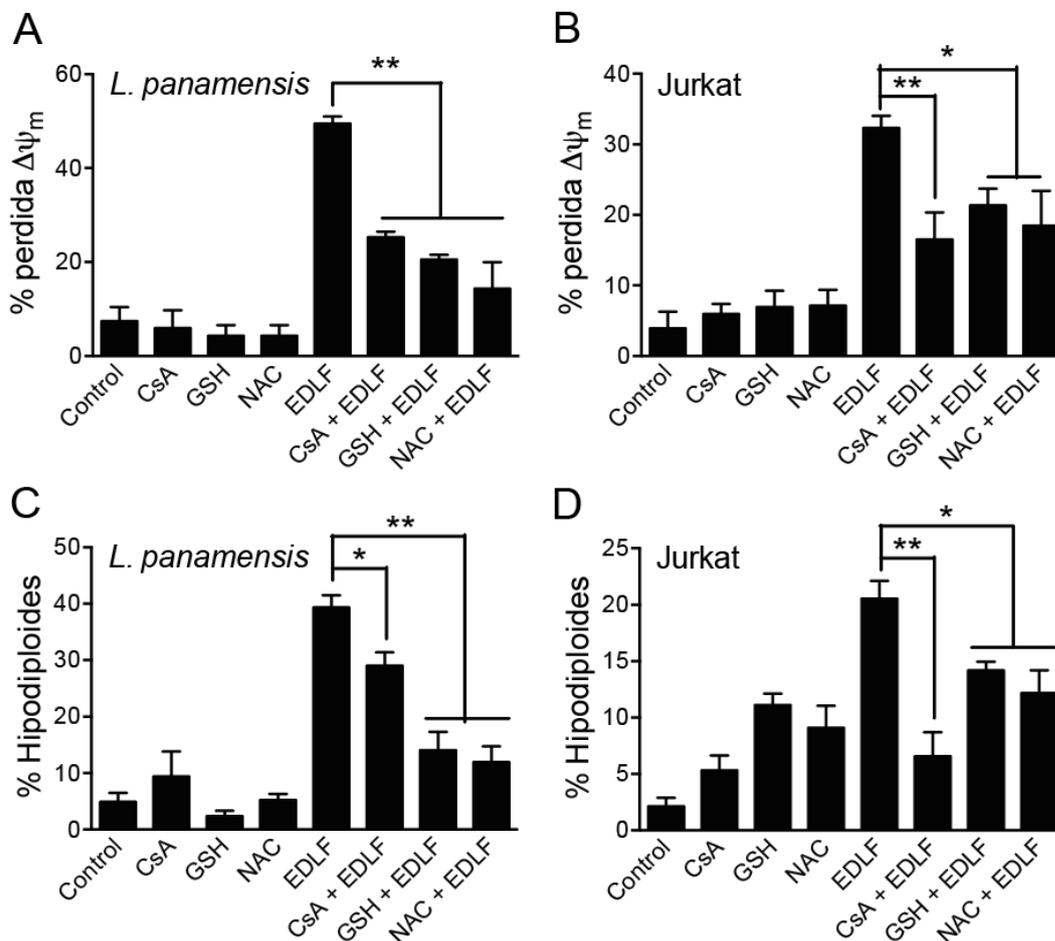


Figura 21. Papel de la mitocondria y la producción de ROS en la muerte inducida por edelfosina. Promastigotes de *L. panamensis* (A y C) y células Jurkat (B y C) fueron preincubados con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CsA durante 1 h, o con 10 mM NAC o GSH durante 2 h, y posteriormente incubados con edelfosina 10 μM durante 12 h. Después del tratamiento se analizó la pérdida del $\Delta\psi_m$ (A y B) y el número de células hipodiploides (B y C) por citometría de flujo. En paralelo se analizaron células control. La gráfica representa los valores medios \pm D.S de tres experimentos independientes. (*) $P < 0.05$. (**), $P < 0.01$.

4.1.14. Evaluación del papel de Ca^{2+} citosólico en la muerte inducida por edelfosina

La disfunción mitocondrial puede darse debido a un cambio en la homeostasis de cationes provocada por los altos niveles de ROS. En este sentido, se ha reportado en *L. donovani* que la pérdida del $\Delta\psi_m$ puede estar provocada por el estrés oxidativo mediante el aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólico (187). El aumento en los niveles de Ca^{2+} , puede conducir a estrés citotóxico y disparar la muerte celular. Resultados previos en nuestro laboratorio indican que la edelfosina altera la homeostasis celular

de Ca^{2+} en células derivadas de tumores sólidos (150). Teniendo en cuenta la importancia de los niveles de calcio en la inducción de muerte celular, evaluamos la concentración de Ca^{2+} citosólico a diferentes intervalos de tiempo de promastigotes de *L. panamensis* control vs parásitos tratados con edelfosina. Los parásitos fueron marcados con el indicador de Ca^{2+} FLUO-4. Aquí encontramos que los parásitos control mantienen bajos niveles de Ca^{2+} citosólico en condiciones normales de cultivo, mientras que los parásitos tratados con edelfosina muestran un aumento progresivo en el tiempo del Ca^{2+} citosólico a partir de la primera hora de tratamiento (Figura 22A). A continuación, se determinó si el aumento observado en el Ca^{2+} citoplasmático era debido a la liberación de este catión de compartimentos intracelulares o a su entrada desde el medio extracelular a través de la apertura de un canal de calcio de la membrana plasmática. Así se realizó el mismo experimento que se describió arriba, pero en presencia del quelante de Ca^{2+} intracelular Bapta-AM y en ausencia de Ca^{2+} extracelular debido a la presencia de EGTA en el medio. Nuestros resultados muestran que en los parásitos incubados en presencia de EGTA se inhiben ampliamente los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos inducidos por edelfosina, caso contrario ocurre con los quelantes intracelulares que no inhibieron de forma estadísticamente significativa el aumento de Ca^{2+} citosólico en presencia de edelfosina (Figura 22B), lo que podría sugerir que el origen del Ca^{2+} intracelular puede ser del medio extracelular por alguna alteración en los canales de Ca^{2+} . Igualmente para evaluar si este aumento en los niveles de Ca^{2+} participa activamente en la inducción de muerte por edelfosina, evaluamos el porcentaje de células hipodiploides de parásitos preincubados con EGTA, Bapta-AM y posteriormente tratados con edelfosina. Nuestros datos indican que la muerte inducida con edelfosina era inhibida en parásitos tratados con EGTA. Así mismo, se observa inhibición de muerte en los parásitos tratados con los quelantes intracelulares, si bien en una menor proporción (Figura 22C), apoyando que en su mayor parte el origen del Ca^{2+} intracelular es la presencia de Ca^{2+} en el medio. Por lo tanto, el mecanismo molecular de la muerte inducida por edelfosina puede implicar una alteración en los canales de Ca^{2+} , que conlleva a un aumento de Ca^{2+} intracelular y posteriormente un desbalance a nivel mitocondrial produciendo ROS y causando la pérdida del $\Delta\psi_m$, y la posterior salida al espacio citoplasmático de proteínas proapoptóticas, como el citocromo c.

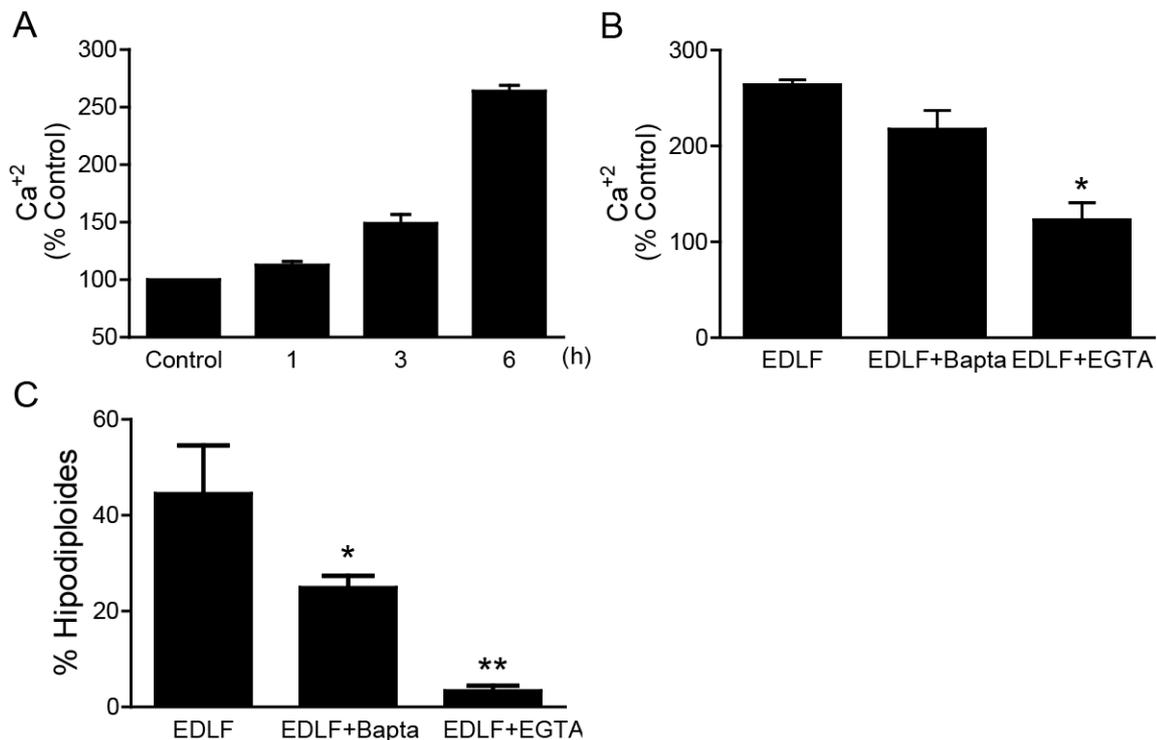


Figura 22. Medición de Ca^{2+} intracelular usando FLUO-4 como indicador. (A) Promastigotes de *L. panamensis* se trataron con edelfosina $10 \mu\text{M}$, y posteriormente se analizó el contenido de Ca^{2+} intracelular a las 1, 3 y 6 horas de tratamiento. (B) Contenido de Ca^{2+} citosólico y (C) porcentaje de parásitos hipodiploides en promastigotes de *L. panamensis* preincubados con Bapta y EGTA, y posteriormente tratados con $10 \mu\text{M}$ edelfosina (EDLF) durante 6 h. Las gráficas representan las medias \pm D.S. de tres experimentos independientes. (*) $P < 0.05$. (**) $P < 0.01$.

4.1.15. Edelfosina disminuye los niveles de ATP en parásitos de *L. panamensis*

Debido a que la pérdida de la integridad mitocondrial puede alterar la producción de ATP, y con el fin de conocer más profundamente los procesos metabólicos afectados en la acción antiparasitaria de la edelfosina, se estudió el estado bioenergético de promastigotes de *L. panamensis* tratados con edelfosina. Basados en el ensayo de luciferina/luciferasa observamos que la edelfosina es capaz de reducir los niveles de ATP celular después de 3 horas de tratamiento. Como control se utilizó el CCCP, uno de los inhibidores de la fosforilación oxidativa más utilizados (97) (Figura 23A).

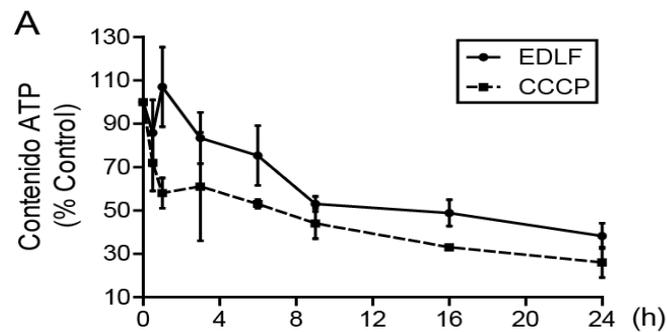


Figura 23. Medición de ATP intracelular. (A) Promastigotes de *L. panamensis* tratados con 10 μ M de edelfosina y evaluados a diferentes intervalos de tiempo hasta las 24 horas. Los cambios en el ATP intracelular fueron evaluados por bioluminiscencia y los datos fueron normalizados con respecto al control. La gráfica representa las medias \pm E.S. de tres experimentos independientes.

4.1.16. Efecto de los inhibidores de la cadena respiratoria en la muerte inducida por edelfosina.

Como hemos comentado en secciones anteriores, la producción de ROS inducida por edelfosina causa la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial y posteriormente la muerte celular. Ya que estudios previos indican que la cadena respiratoria está involucrada en la producción de ROS inducida por ATLs en la línea celular U87MG (glioblastoma) (188), nosotros evaluamos si la cadena respiratoria mitocondrial estaba implicada en la producción de ROS inducida por edelfosina en parásitos y células tumorales. Para ello utilizamos los siguientes inhibidores de la cadena transportadora de electrones: rotenona (inhibidor del complejo I); malonato (inhibidor complejo II); antimicina A (inhibidor del complejo III); azida sódica (inhibidor del complejo IV); y oligomicina (clásico inhibidor de la F_0F_1 -ATP sintasa mitocondrial). Como control se utilizó el CCCP, uno de los inhibidores de la fosforilación oxidativa más utilizados (97). En todos los experimentos los inhibidores se añadieron 1 hora antes del tratamiento, y posteriormente las células se incubaron durante 9 horas con la edelfosina. Posteriormente se evaluó la generación de ROS por citometría de flujo. Nuestros resultados muestran que la mayoría de los inhibidores de la cadena respiratoria no afectan a la producción de ROS inducida por edelfosina en *L. panamensis* ni en células tumorales de manera significativa (Figura 24A-B). La incubación con CCCP, que desacopla la fosforilación oxidativa mediante el transporte de protones a través de la membrana mitocondrial, provocando la pérdida del $\Delta\psi_m$, no solo llevó a la generación de ROS en parásitos de *L. panamensis* y en células Jurkat, sino que aumentó la producción de ROS inducida por edelfosina (Figura 24A-B). La única

excepción fue la oligomicina, el inhibidor específico del canal de protones (fracción F_0) de la F_0F_1 -ATP sintasa y consecuentemente un inhibidor de la fosforilación oxidativa y de la cadena transportadora de electrones (189). Este inhibidor del complejo V reduce significativamente la producción de ROS inducida por edelfosina tanto en *L. panamensis* como en células Jurkat. Comparando el tratamiento con edelfosina sola, el co-tratamiento con oligomicina causó una reducción significativa de más del 50% de los niveles del ROS inducidos por edelfosina. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que la F_0F_1 -ATP sintasa, especialmente la fracción F_0 , desempeña un papel importante en la producción de ROS inducida por edelfosina, tanto en *Leishmania* como en las células tumorales, proceso que finalmente conduce a la muerte celular. En estos ensayos se utilizó una concentración 10 veces más baja de oligomicina (1 μ M) en *L. panamensis* que la utilizada en células Jurkat (10 μ M), debido a que los parásitos resultaron ser más sensibles al tratamiento con oligomicina.

4.1.17. Papel de los microdominios de membrana *Lipid Raft* en la acción antiparasitaria de la edelfosina.

Estudios previos han indicado una alta afinidad de los ATLs por los esteroides (190, 191). En nuestro laboratorio se viene estudiando el papel de los microdominios de membrana lípidos *rafts* en la muerte celular y especialmente en la muerte inducida por edelfosina (10, 85, 87, 90, 147, 148, 183). Dentro de los resultados obtenidos se ha encontrado que la edelfosina se acumula en dichos microdominios en células leucémicas (85, 87), y que la ruptura de los lípidos *rafts* por la eliminación de colesterol con la metil- β -ciclodextrina (M β CD) inhibe la incorporación y la actividad antitumoral de la edelfosina (87, 88, 147). En este sentido, y en vista de la existencia de microdominios lipídicos *rafts* en *Leishmania spp.* (96), quisimos evaluar el papel de estos dominios de membrana en la muerte inducida por edelfosina en *L. panamensis*. Para ello, promastigotes de *L. panamenis* fueron tratados con 2,5 mg/ml de M β CD durante 40 min y posteriormente con edelfosina durante 9 horas. Transcurrido este tiempo, evaluamos las células hipodiploides por citometría de flujo. Como se observa en la figura 25A, los resultados nos muestran que la preincubación de promastigotes de *L. panamensis* con M β CD inhibe significativamente la muerte inducida por edelfosina (Figura 25A). M β CD elimina el colesterol de membrana y así disgrega los

dominios *rafts*. En vista de estos resultados nos planteamos si esta diferencia podría ser consecuencia de un efecto en la incorporación de la edelfosina. Para ello, utilizamos edelfosina marcada con tritio, y observamos que las cantidades incorporadas en los promastigotes eran menores en el grupo de parásitos tratados con M β CD (Figura 25B). Estos resultados sugieren que, al igual que en las células tumorales, los lípidos *rafts* parecen jugar un papel importante en la muerte inducida por edelfosina en parásitos de *Leishmania*.

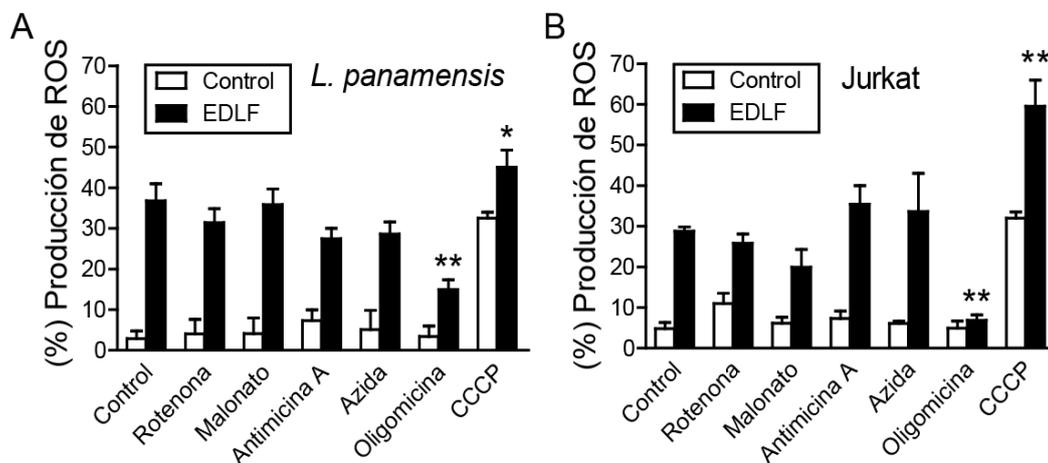


Figura 24. Efecto de los inhibidores de la cadena respiratoria en la producción de ROS. (A) Promastigotes de *L. panamensis* y (B) células Jurkat preincubadas con rotenona 10 μ M, malonato 5 mM, antimomicina A 10 μ M, azida sódica 1,5 mM, oligomicina 1 y 10 μ M (*L. panamensis* y Jurkat, respectivamente), y CCCP 50 μ M, y posteriormente incubados con edelfosina durante 9 h, se analizaron por citometría de flujo para determinar la producción de ROS, utilizando la sonda DHE. Los datos representan las medias \pm D.S. de tres experimentos independientes. (**) $P < 0.01$.

4.1.18. Efecto de la edelfosina en la composición proteica de los *lipid rafts*

En nuestro laboratorio se ha demostrado que la actividad de la edelfosina es dependiente de la redistribución y reorganización de la composición proteica y lipídica de los lípidos *rafts* (86, 88, 147, 154, 156). Además, el reclutamiento del receptor de muerte Fas a los microdominios lipídicos *rafts* de membrana, junto con otras proteínas asociadas con señalización de la muerte celular, juega un papel importante en la inducción de apoptosis por edelfosina (10, 86, 87). Quisimos entonces analizar el contenido proteico de los lípidos *rafts* de *L. panamensis* después del tratamiento con edelfosina. Debido a las semejanzas encontradas aquí entre los mecanismos de acción de la edelfosina en parásitos y células tumorales, donde se implica a los lípidos *raft*, continuamos con el aislamiento de estos microdominios de membrana basándonos en

su insolubilidad en detergentes no iónicos como el Triton X-100 y en su baja densidad, la cual permite separarlos por flotabilidad en gradientes discontinuos de sacarosa. Posteriormente se analizaron las distintas fracciones obtenidas del gradiente por *Western-blot* para determinar la posición de los lípidos *rafts* mediante la presencia del gangliósido GM1, utilizando la subunidad B de la toxina colérica (CTx-B) conjugada a peroxidasa de rábano (HRP-CTx), la cual se une al oligosacárido del ganliósido GM1 (192), que se encuentra principalmente en los *rafts* (193). Como se puede observar en la Figura 25C, las fracciones superiores del gradiente de sacarosa (fracciones 4-6) se encuentran enriquecidas en el gangliósido GM1, lo que indica que dichas fracciones contienen los lípidos *rafts* de parásitos de *L. panamensis* (Figura 25C). Igualmente, mediante técnicas de *Western-blot* utilizando anticuerpos específicos, se ha reportado en nuestro laboratorio en células Jurkat que la proteína Fas, junto con otras moléculas de señalización apoptótica como JNK y FADD, eran movilizadas a los lípidos *raft* después del tratamiento con edelfosina(87), aunque curiosamente este reclutamiento no se detectaba en células HeLa. Con el fin de evaluar los contenidos proteicos de estas fracciones realizamos una electroforesis con 20 µl de cada de una de estas fracciones y fueron visualizadas por coloración con Comassie. Como podemos observar en la figura 25 C, hay un aumento en el contenido proteico de los lípidos *rafts* de aquellos parásitos tratados con edelfosina, en comparación con los parásitos control. En vista de estos antecedentes y debido a la falta de anticuerpos contra proteínas de parásitos de *Leishmania*, realizamos electroforesis bidimensional para la identificación por MALDI-TOF de las proteínas presentes en los lípidos *rafts* aislados en el gradiente de sacarosa de parásitos control y tratados con edelfosina. Como primera aproximación del estudio proteómico de los lípidos *rafts* en los parásitos de *Leishmania*, las fracciones 4-6 (donde se encontraban los lípidos *rafts*) del gradiente de sacarosa, tanto de parásitos de *L. panamensis* no tratados como de parásitos tratados con edelfosina, fueron sometidas a electroforesis en gel bidimensional (2D SDS-PAGE) y posteriormente las proteínas fueron visualizadas con la tinción *Sypro Ruby Protein Gel Staining* (Invitrogen). En la imagen de los lípidos *rafts* de parásitos control se pudieron identificar 11 proteínas y en los parásitos tratados con edelfosina se identificaron un total de 24 proteínas con diferentes pesos moleculares, evidenciando así un cambio en la composición proteica de los lípidos *rafts* y especialmente un reclutamiento de

proteínas en los *rafts* después del tratamiento con edelfosina (Figura 26A y B). Posteriormente estas proteínas fueron extraídas de forma automática (Bruker Daltonics) para el análisis por espectrometría de masas tándem MS/MS.

Actualmente, el número de secuencias de proteínas de *Leishmania* existentes en las bases de datos es bastante reducido y existe una versión de nucleótidos disponibles en GeneDB, pero se encuentra todavía en revisión. Por lo tanto, se identificaron las proteínas en función de todas las secuencias conocidas para las especies de *Leishmania* en la base de datos MCBInr (http://www.matrixscience.com/search_form_select.html), estrategia que se ha aplicado con éxito en publicaciones con otras especies de *Leishmania* que no tienen un genoma completamente secuenciado (194). Para obtener resultados más fiables sólo se utilizaron las proteínas homólogas a *Leishmania*.

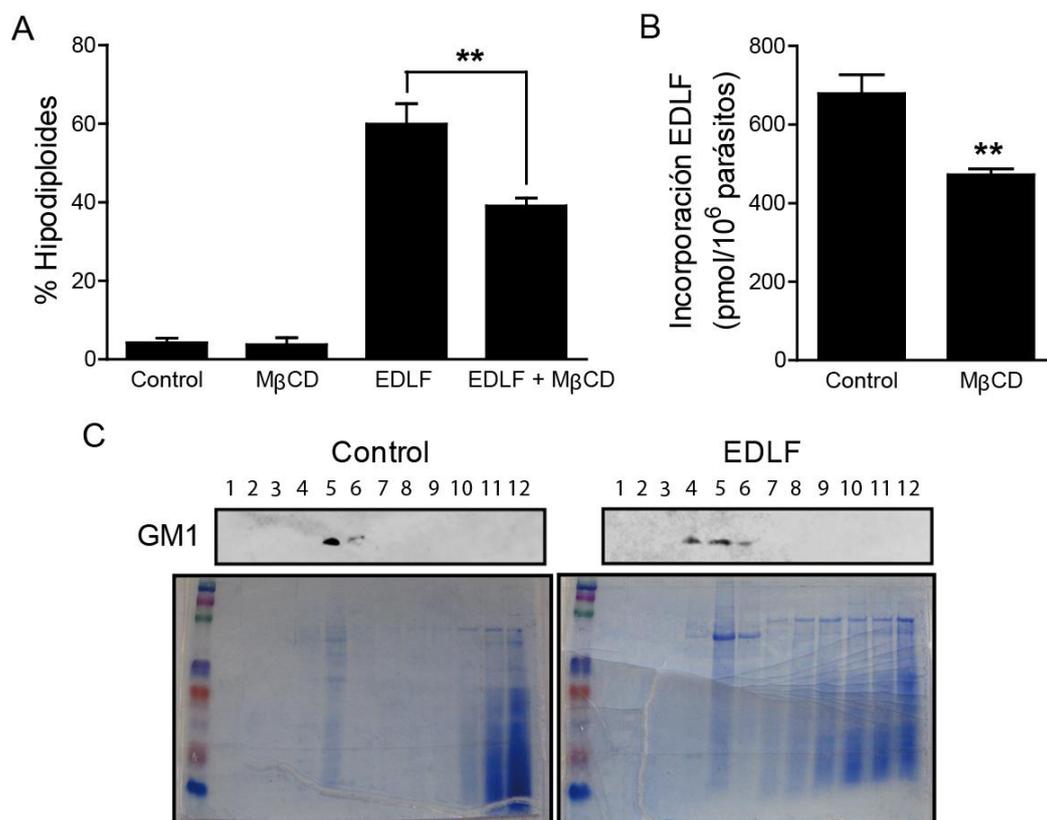


Figura 25. Papel de los lípidos *rafts* en *L. panamensis*. (A) Promastigotes de *L. panamensis* control sin tratar y pretratados con M β CD, e incubados con 10 μ M de edelfosina durante 24 h, se evaluaron para determinar el porcentaje de células hipodiploides por citometría de flujo. (B) Promastigotes de *L. panamensis* control y pretratados con M β CD se incubaron con 10 μ M [³H]edelfosina durante 1 h, y posteriormente se analizó la incorporación del éter lípido en los parásitos. (C) Promastigotes de *L. panamensis* control y tratados con 10 μ M edelfosina durante 9 h se lisaron y ultracentrifugaron en un gradiente discontinuo de sacarosa. Al final se recolectaron 12 fracciones individuales, y determinó por *Western Blot* la localización de GM1, también se realizó una coloración con comassie. Los datos son representativos de al menos tres experimentos independientes. (*) $P < 0.05$. (**) $P < 0.01$.

Las proteínas con las que se encontró homología con proteínas de otros organismos no se consideraron en este análisis, debido a la existencia de componentes péptidicos y masas que no están bien conservados entre especies (195). Los parámetros utilizados para considerar fiable la identificación de una proteína por MALDI-TOF fueron el número de péptidos encontrados, el de cobertura, la puntuación MOWSE y las masas, un Score de más de 60 se consideraba como fiable. Los resultados se encuentran en las Tablas 1 y 2 (*L. panamensis* sin tratamiento -Tabla 1- y tratados con edelfosina -Tabla 2). Entre las proteínas ubicuas, se encuentra un gran número de proteínas hipotéticas además de proteínas como la subunidad β de la ATP sintasa, metalopeptidasas y proteínas *stomatin-like*. Mientras que en los parásitos tratados con edelfosina, además de estas proteínas se encuentran algunas más identificadas como hipotéticas y otras pertenecientes a la cadena respiratoria de electrones como la subunidad IV de la citocromo oxidasa, la proteína de Reiske, aspartato carbamoiltransferasa, el factor de iniciación eucariótico 4, prohibitina, GTPasas de la familia Ran y la proteína de choque térmico hsp70.

Además de estas proteínas se observó el aumento de la subunidad β de la FOF1-ATP sintasa. En este sentido es interesante mencionar en células *Jurkat* también se había observado un enriquecimiento de los lípidos *rafts* con la subunidad β de la ATPasa mitocondrial después del tratamiento con edelfosina (Gajate, C. and Mollinedo, F., observaciones no publicadas; Figura 27). Como se puede observar en la Figura 27, las células tratadas con edelfosina muestran un aumento en la proteína mencionada (Figura 27A y B). Estos resultados apoyan la participación de la mitocondria en la actividad antileishmanicida y antitumoral de la edelfosina.

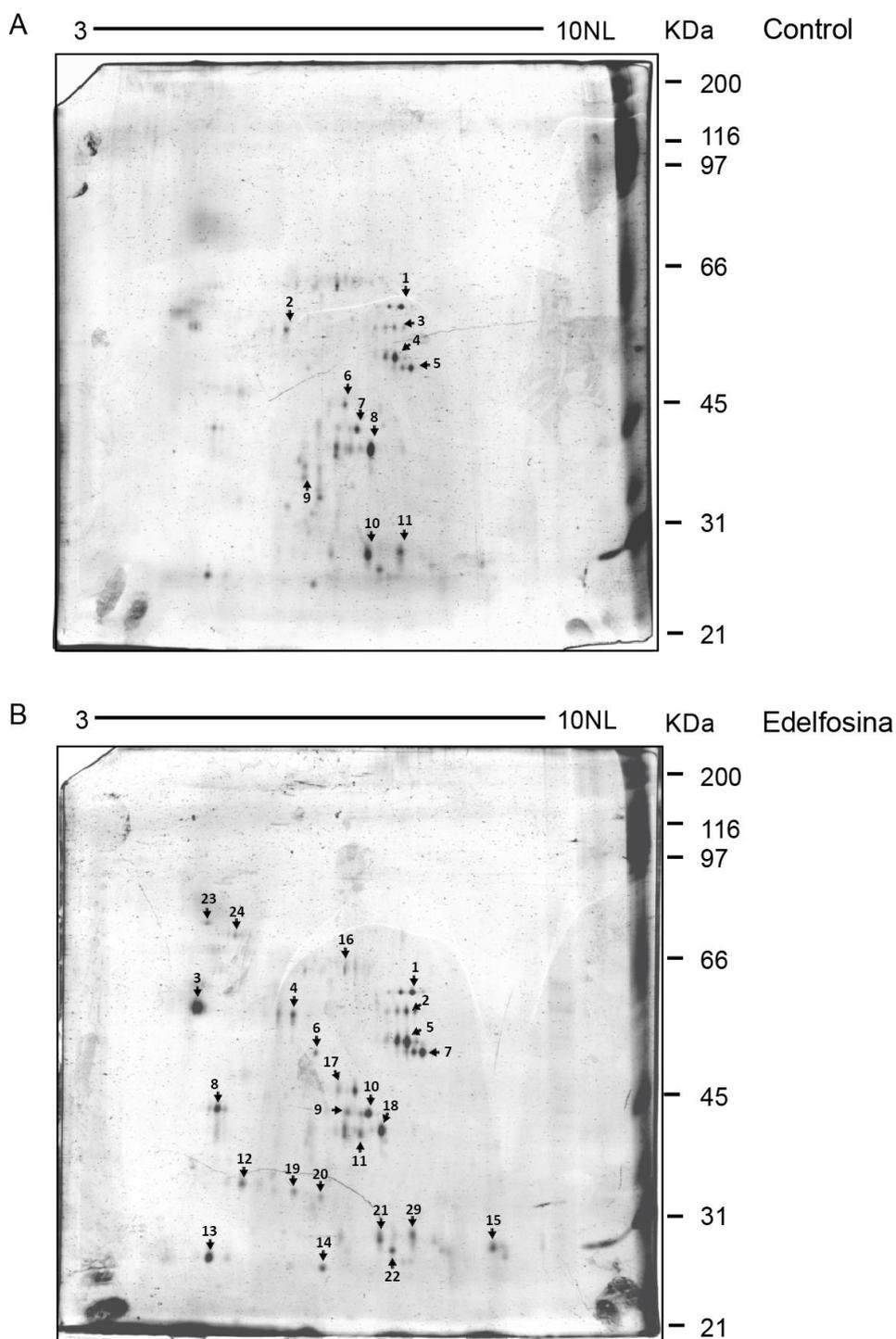


Figura 26. Identificación proteómica de lípidos rafts. Proteínas de lípidos rafts de promastigotes de *L. panamensis* (A) control y (B) tratados con edelfosina 10 μ M durante 9 h fueron sometidas a análisis proteómico. La fracción correspondiente a los lípidos rafts (enriquecidas en GM1) se sometió a electroforesis de dos dimensiones y posteriormente a análisis por MALDI-TOF. Los números de cada spot presente en la figura se refieren a la identificación de las proteínas en las Tablas 1 y 2.

Tabla 1. Lipid rafts *L. panamensis* control

Spot	Protein	Swiss-Pro Accession	MOWSE score	Sequence corevage (%)	Specie	Masas
1	Hypothetical protein	gi 73536660	211	46	<i>Leishmania major</i>	53485
2	Vacuolar ATP synthase subunit B	gi 146092411	175	46	<i>Leishmania infantum</i>	55894
3	Metallo- peptidase, clan me, family m16	gi 146080890	135	31	<i>Leishmania infantum</i>	58149
4	Metallo-peptidase, Clan ME, Family M6	gi 146100801	252	51	<i>Leishmania infantum</i>	55009
5	Metallo-peptidase, Clan ME, Family M16; mitochondrial processing peptidase alpha subunit	gi 157868830	149	53	<i>Leishmania major</i>	51605
6	Hypothetical protein	gi 157869118	80	20	<i>Leishmania major</i>	46704
7	Conserved hypothetical protein	gi 146078040	155	49	<i>Leishmania infantum</i>	42248
8	Stomatin-like protein	gi 157864068	211	50	<i>Leishmania major</i>	39895
9	Hypothetical protein	gi 71664758	38	19	<i>Trypanosoma Cruzi</i>	39895
10	Hypothetical protein	gi 157869874	189	57	<i>Leishmania major</i>	27653
11	Hypothetical protein	gi 71404916	40	17	<i>Trypanosoma Cruzi</i>	39895

Tabla 2. Lipid rafts *L. panamensis* 10 μ M edelfosina

Spot	Protein	Swiss-Pro Accession	MOWSE score	Sequence corevage (%)	Specie	Masas
1	Hypothetical protein	gi 73536660	211	46	<i>Leishmania major</i>	53485
2	Metallo- peptidase, clan me, family m16	gi 146080890	135	31	<i>Leishmania infantum</i>	58149
3	ATPase beta subunit	gi 157870644	325	67	<i>Leishmania major</i>	56541
4	Vacuolar ATP synthase subunit B	gi 146092411	175	46	<i>Leishmania infantum</i>	55894
5	Metallo-peptidase, Clan ME, Family M6	gi 146100801	252	51	<i>Leishmania infantum</i>	55009
6	Putative eukaryotic initiation factor 4a	gi 146075141	144	40	<i>Leishmania infantum</i>	45356
7	Metallo-peptidase, Clan ME, Family M16; mitochondrial processing peptidase alpha subunit	gi 157868830	149	53	<i>Leishmania major</i>	51605
2	Cytochrome c oxidase subunit IV	gi 339897208	189	58	<i>Leishmania infantum</i>	39800
9	Hypothetical protein	gi 157864861	108	37	<i>Leishmania major</i>	42247
10	Conserved hypothetical	gi 146078040	155	49	<i>Leishmania</i>	42248

	protein				<i>infantum</i>	
11	Hypothetical protein	gi 157864861	168	31	<i>Leishmania major</i>	42247
12	Reiske iron-sulfur protein precursor	gi 72547588	146	39	<i>Leishmania major</i>	34062
13	Hypothetical protein	gi 157877954	208	62	<i>Leishmania major</i>	29038
14	Hypothetical protein	gi 157869874	189	57	<i>Leishmania major</i>	27653
15	Prohibitin	gi 157867379	266	63	<i>Leishmania major</i>	30423
16	Hypothetical protein	gi 146094784	59	40	<i>Leishmania infantum</i>	19061
17	Hypothetical protein	gi 157869118	86	20	<i>Leishmania major</i>	46704
18	Stomatin-like protein	gi 157864068	197	61	<i>Leishmania major</i>	39895
19	Hypothetical protein	gi 157867436	107	23	<i>Leishmania major</i>	36505
20	Hypothetical protein	gi 348673389	79	51	<i>Leishmania major</i>	23820
21	Hypothetical protein	gi 157877606	48	20	<i>Leishmania major</i>	98792
22	Hypothetical protein	gi 322501366	43	10	<i>Leishmania donovani</i>	10425 0
23	conserved hypothetical protein	gi 146104814	53	15	<i>Leishmania infantum</i>	11467 4
24	putative heat-shock protein hsp70	gi 339898755	92	27	<i>Leishmania infantum</i>	68643

* Las proteínas en negrita indican aquellas que no estaban presentes en el control y se identificaron después del tratamiento con edelfosina.

4.1.19. Efecto de la inhibición de la F₀F₁-ATP sintasa en la muerte inducida por edelfosina

Con el fin de entender qué papel juega la F₀F₁-ATP sintasa en el mecanismo de acción de la edelfosina, utilizamos dos inhibidores ampliamente conocidos de esta proteína. Como mostramos anteriormente, los inhibidores y desacoplantes de la cadena respiratoria mitocondrial probados no modifican la producción de ROS inducida por edelfosina en parásitos de *L. panamensis*, ni en células Jurkat. La única excepción fue la oligomicina. Este inhibidor del complejo V redujo significativamente la producción de ROS inducidos por edelfosina en ambos modelos celulares, *L. panamensis* y células Jurkat. Posteriormente comparando parásitos y células tumorales tratados con edelfosina, el co-tratamiento con oligomicina conlleva a una reducción significativa en el número de células con pérdida del $\Delta\Psi_m$ y degradación de ADN

(Figura 28A y B). La oligomicina sola, a concentraciones de 1 μM en *L. panamensis* y 10 μM en células Jurkat, no mostró ningún efecto en parásitos o células tumorales.

Además se ensayó el efecto de piceatannol, otro inhibidor específico de esta enzima mitocondrial. En comparación con la oligomicina, cuyo blanco es directamente la membrana mitocondrial en el complejo F_0 , el piceatannol tiene como blanco la matriz mitocondrial donde se encuentra el complejo F_1 , por lo tanto inhibe la ATP sintasa por un mecanismo completamente diferente a la oligomicina. Al contrario que con la oligomicina, encontramos que el piceatannol no inhibió la producción de ROS, la pérdida del $\Delta\Psi_m$, ni la fragmentación del ADN inducida por edelfosina.

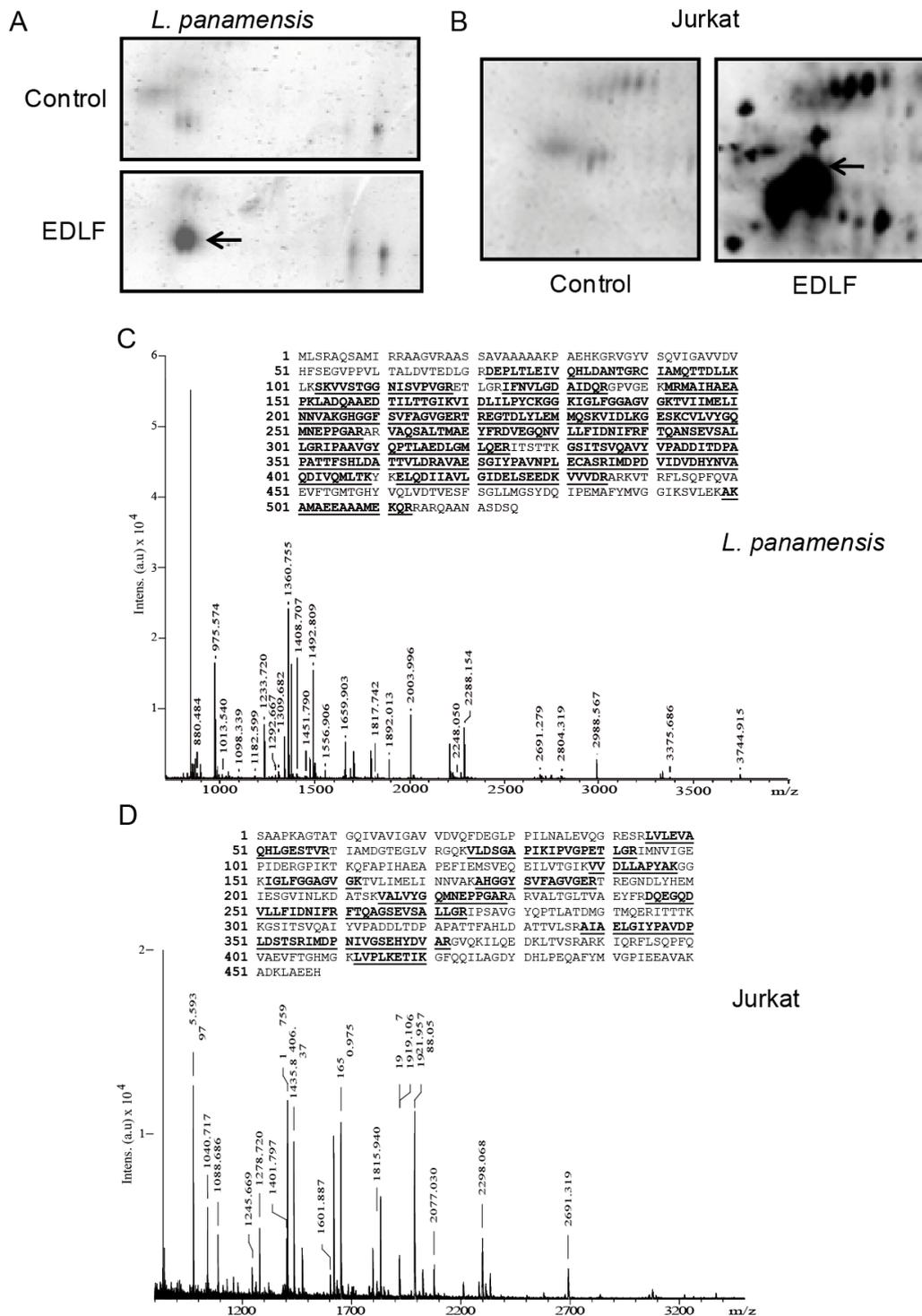


Figura 27. Reclutamiento de F₀F₁ ATP-sintasa en los lípidos rafts después del tratamiento con edelfosina. Localización de la proteína F₀F₁-ATP sintasa en lípidos rafts de (A) promastigotes de *L. panamensis* y (B) células Jurkat después de ser tratados con edelfosina. La posición de la F₀F₁-ATP sintasa mitocondrial se indica con una flecha. Espectro de masas del spot correspondiente al péptido de F₀F₁-ATP sintasa en (C) promastigotes de *L. panamensis* y (D) células Jurkat. El valor de las masas (m/z) y la posición putativa de los aminoácidos también se indican. En el recuadro se muestran la secuencia de la F₀F₁-ATP sintasa y en negra los péptidos utilizados para su identificación.

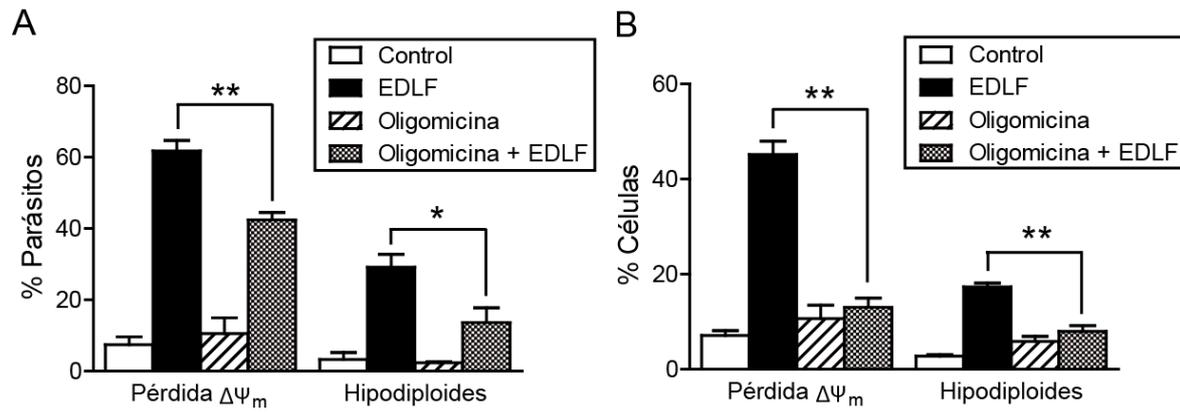


Figura 28. Papel de la F_0F_1 -ATP sintasa en la muerte inducida por edelfosina. (A) Promastigotes de *L. panamensis* y (B) células Jurkat fueron preincubados con oligomicina durante 1 hora y posteriormente se trataron con 10 μ M edelfosina durante 9 h. Finalmente se analizó la pérdida del $\Delta\Psi_m$ y el porcentaje de células hipodiploides por citometría de flujo. Los datos muestran las medias \pm E.S. de 3 experimentos independientes. (*) $P < 0.05$. (**) $P < 0.01$.

4.2. Espisulosina en promastigotes de *L. panamensis*

Espisulosina, también conocido como ES-285 ((2S, 3R)-2-amino-3-octadecanol), es un análogo de la esfingosina (Figura 29A). ES-285 es un aminoalcohol aislado de un molusco del océano Atlántico, *Spisula polynyma*, por Rinehart y colaboradores (196). ES-285 muestra actividad citotóxica *in vitro* contra diversas líneas celulares derivados de tumores humanos, incluyendo modelos de hepatoma, tumor renal y prostático (197-199).

Los esfingolípidos de membrana son una importante fuente de moléculas involucradas en la señalización celular. En los últimos años, ha cobrado interés el metabolito esfingosina 1 fosfato (S1P, del inglés *sphingosine 1 phosphate*), derivado de la fosforilación de la esfingosina por la enzima esfingosina quinasa (SK). Este fosfolípido participa en la regulación de diversos procesos celulares, tales como: proliferación, apoptosis, arquitectura del citoesqueleto, quimiotaxis, adhesión celular, excitación neuronal y homeostasis de Ca²⁺. Resultados previos han demostrado la existencia de al menos dos actividades SK en el parásito *L. mexicana*.

4.2.1. ES-285 posee una alta actividad citotóxica contra parásitos de *Leishmania sp.*

Como primera aproximación al estudio de la actividad citotóxica del compuesto ES-285, se analizó el crecimiento de promastigotes de *Leishmania spp.* en presencia de diferentes concentraciones de ES-285, y se calculó la IC₅₀ por medio del ensayo de proliferación celular XTT. Hemos encontrado que la ES-285 induce la muerte del parásito a dosis nanomolares, 600 nM para *L. infantum* y 630 nM para *L. panamensis*. Estos resultados indican una alta sensibilidad de promastigotes de *Leishmania sp.* Lo que convierte al ES-285 en un agente terapéutico prometedor contra estas infecciones.

4.2.2. Efecto del ES-285 en la morfología y viabilidad de promastigotes de *L. panamensis* y *L. infantum*.

Para demostrar el efecto del ES-285 en promastigotes de *L. panamensis* y *L. infantum* se evaluó la viabilidad celular incubando los parásitos con 1 µM de ES-285 y analizando a las 3, 6 y 9 horas de incubación los siguientes parámetros:

1. Observación de la morfología y motilidad del parásito utilizando microscopía óptica.
2. Cambios en la dispersión de luz del láser del citómetro de flujo teniendo en cuenta la dispersión frontal (FSC, *forward scatter*) y dispersión lateral (SSC, *side scatter*) de la luz.
3. Incorporación del yoduro de propidio (IP)

Los cambios morfológicos causados por ES-285 fueron evaluados en promastigotes de *L. panamensis* y *L. infantum* tratados con 1 μ M ES-285 a diferentes intervalos de tiempo. En el análisis microscópico se observó una pérdida de movilidad y cambios en su forma desde la primera hora de tratamiento, volviéndolos redondeados y perdiendo posteriormente su flagelo (Figura 29B).

En el análisis por citometría de flujo se logra comprobar una pérdida del volumen celular a partir de la primera hora de tratamiento, haciéndose evidente la aparición de una segunda población con un valor de FSC reducido, lo que indicaría un menor tamaño celular. Al analizar estas poblaciones en un histograma biparamétrico de FSC vs. IP se observa una subpoblación que conserva las características similares a los parásitos no tratados, y aparece otra subpoblación con una reducción en su valor FSC, la cual es la misma población permeable al yoduro de propidio. En la primera hora se observa un 15% de parásitos permeables al IP y este porcentaje va aumentando con el tiempo de incubación, llegando a ser del 60% a las 9 horas. Estos resultados sugirieron una alteración en la forma y/o volumen celular, y alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática, lo que indica un proceso de muerte celular irreversible (Figura 29C y D).

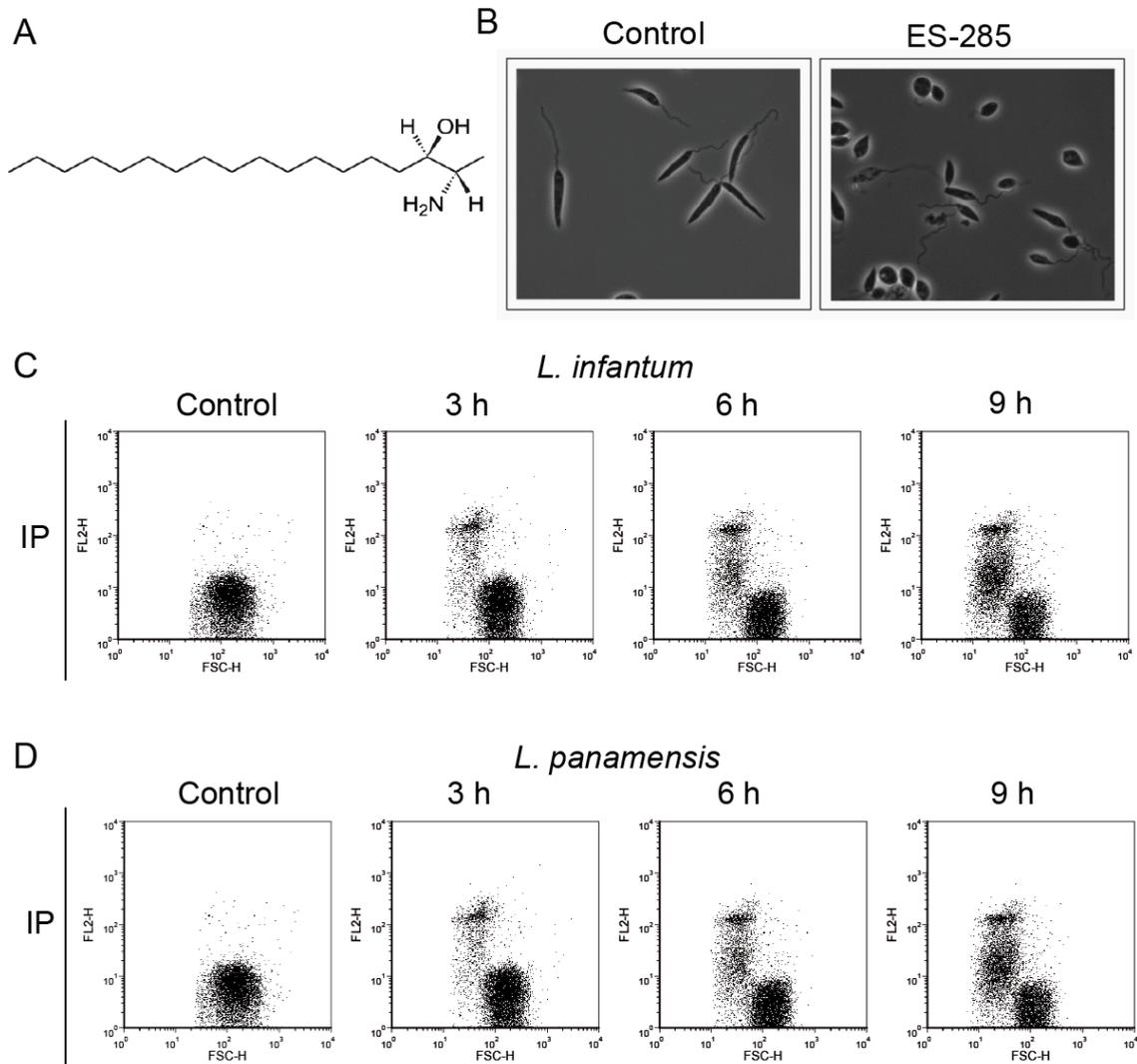


Figura 29. Cambios morfológicos en la muerte inducida por ES-285 en promastigotes de *Leishmania spp.* (A) Promastigotes de *L. panamensis* después de ser tratados con 1 μ M ES-285 durante 1 hora. Fotografías tomadas mediante contraste de interferencia diferencial (DIC). Promastigotes de *L. infantum* y *L. panamensis* tratados con 1 μ M ES-285 y evaluados a las 3, 6 y 9 horas de incubación. Los parásitos fueron teñidos con yoduro de propidio (IP) y analizados por citometría de flujo. Se representan histogramas biparamétricos que muestran la capacidad de dispersar la luz del laser del citómetro y la incorporación de IP en parásitos de (A) *L. infantum* y (B) *L. panamensis* control no tratados y tratados con ES-285 a los tiempos indicados. Datos representativos de 3 experimentos independientes.

4.2.3. ES-285 induce degradación de ADN en promastigotes de *Leishmania spp.*

Posteriormente se determinó si ES-285 tenía la capacidad de inducir la muerte de *Leishmania* con características apoptóticas. Con este objetivo se analizó el contenido relativo del ADN por citometría de flujo en parásitos tratados con 1 μ M ES-285 durante 3, 6, 9, 16 y 24 horas de tratamiento (Figura 30). Los resultados indican que el ES-285 induce fragmentación del ADN, el cual se puede detectar a partir de las 6 horas de tratamiento. En los resultados se observa que a las 6 horas ya existen un 23 % para *L.*

panamensis y 11 % para *L. infantum* de parásitos hipodiploides, y se observa un aumento paulatino de esta población. Sobre las 24 h se observa un porcentaje de parásitos hipodiploides del 80 % para *L. panamensis* y del 50 % para *L. infantum* (Figura 30A). A pesar de que ambas cepas son sensibles al ES-285, estos resultados indican que *L. panamensis*, causante de una leishmaniosis cutánea, presenta una mayor sensibilidad a ES-285 que *L. infantum*, causante principalmente de leishmaniosis visceral (Figura 30B). Estos resultados indican que la espisulosina puede causar una muerte celular de tipo apoptótico en promastigotes de *Leishmania spp.*

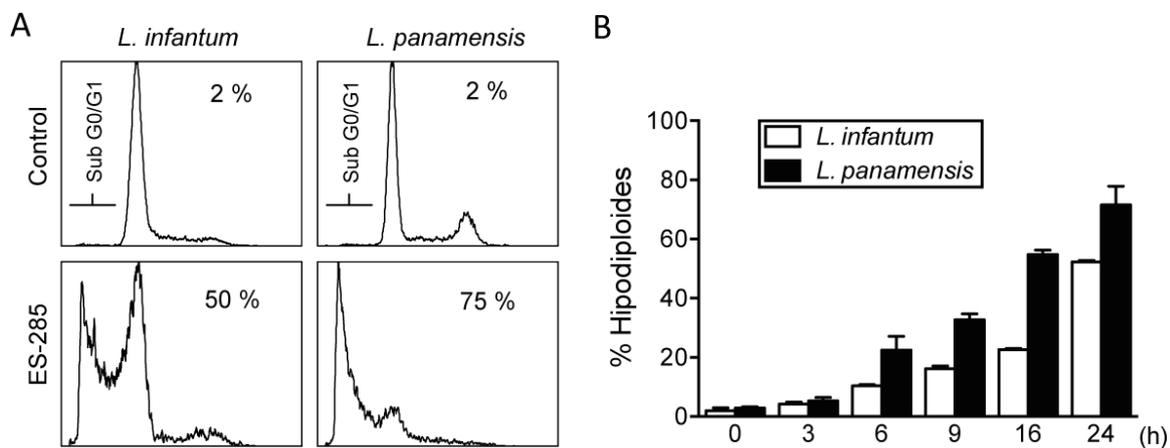


Figura 30. Degradación del ADN en promastigotes de *L. infantum* y *L. panamensis* tratados con ES-285. (A) Histogramas monoparamétricos representando el contenido relativo de ADN en las diferentes fases del ciclo celular de parásitos logarítmicos de *L. infantum* y *L. panamensis* tratados con 1 μ M ES-285 durante 24 h. El marcador que se muestra como Sub-G₀/G₁, indica la subpoblación de parásitos hipodiploides. (B) Representación esquemática de la cuantificación relativa por citometría de flujo de parásitos hipodiploides tratados durante 3, 6, 9, 16 y 24 h con 1 μ M ES-285. La gráfica es representativa de 3 experimentos independientes. Los porcentajes representan la media \pm E.S. de 3 experimentos independientes.

4.2.4. Mitocondria en la muerte inducida por ES-285

Con el fin de evaluar el papel de la mitocondria en la muerte inducida por ES-285, se realizó un *time course* de los cambios en el $\Delta\psi_m$ y la producción de ROS en promastigotes de *L. panamensis* y *L. infantum* tratados con ES-285. Los parásitos fueron tratados con 1 μ M ES-285 y se evaluaron al cabo de 1, 3, 6, 9, 16 y 24 horas de incubación. Para ello se realizó una doble tinción con DiOC₆(3) y DHE. El análisis biparamétrico mostró que el tratamiento con ES-285 causa pérdida del $\Delta\psi_m$ y aumento de ROS. Como se observa en la Figura 31, en un análisis biparamétrico las células sin tratar muestran una alta fluorescencia de DiOC₆(3) (DiOC₆(3)^{Alto}) y bajos niveles del

radical superóxido (DHE^{Bajo}), por lo tanto en la gráfica se observan pocos parásitos con pérdida del $\Delta\Psi_m$ y niveles casi indetectables de ROS. Estos datos fueron tomados como valores de referencia. El tratamiento con ES-285 después de la primera hora de tratamiento causó en los parásitos una caída del $\Delta\Psi_m$ ($\text{DiOC}_6(3)^{\text{Bajo}}$) del 20% para *L. infantum* y del 32% para *L. panamensis*, y un aumento leve en los ROS (DHE^{Alto}), del 8% para *L. infantum* y del 12% para *L. panamensis*. Estos eventos se ven aumentados paulatinamente a medida que se incrementa el tiempo de incubación. Estos datos sugieren que la mitocondria podría estar involucrada en la muerte inducida por ES-285 en parásitos de *Leishmania spp.* (Figura 31A y B).

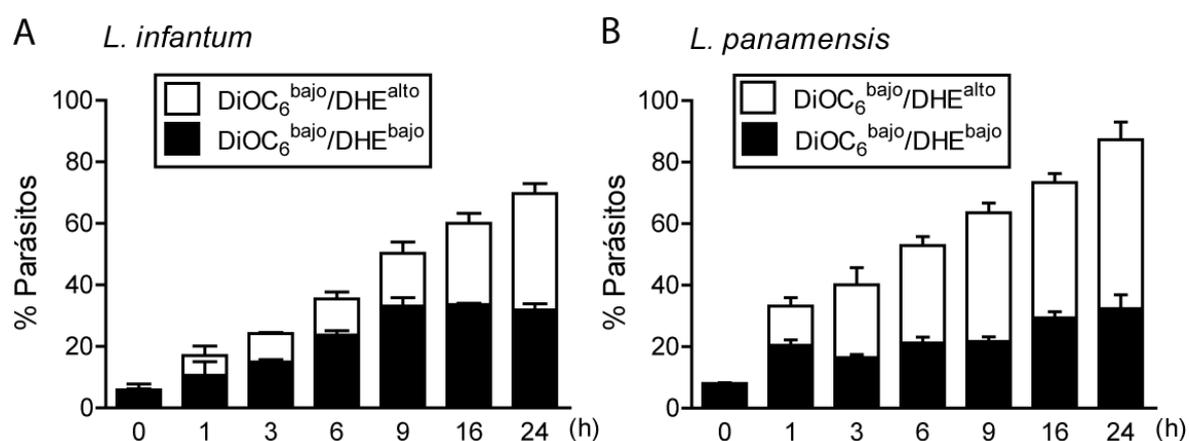


Figura 31. Papel de la mitocondria y la producción de ROS en la muerte inducida por ES-285. Promastigotes de *L. infantum* (A) y *L. panamensis* (B) fueron tratados con $1 \mu\text{M}$ ES-285 durante 1, 3, 6, 9, 16, y 24 h. Posteriormente se evaluó la pérdida del $\Delta\Psi_m$ ($\text{DiOC}_6(3)$) y la producción de ROS ($\text{HE} \rightarrow \text{Eth}$) por citometría de flujo. La gráfica representa la media \pm D.S. de tres experimentos independientes.

4.2.5. Efecto de la CsA en la muerte inducida por edelfosina

Como mencionamos en el capítulo anterior, la CsA se utiliza ampliamente como inhibidor por excelencia del PPM, habiendo sido ampliamente reportado como protector de la muerte celular inducida por diferentes compuestos proapoptóticos. Con el fin de comprobar la participación de la mitocondria en la muerte inducida por ES-285, pretratamos promastigotes logarítmicos de *L. panamensis* y *L. infantum* con $10 \mu\text{g/ml}$ de CsA durante 1 hora, y posteriormente se adicionó $1 \mu\text{M}$ ES-285 durante 6 horas. En los resultados se observa que la CsA inhibe significativamente la muerte inducida por ES285 en parásitos de *Leishmania spp.* (Figura 32). De esta manera se pudo comprobar que la pérdida del $\Delta\Psi_m$ es un mediador principal en la muerte inducida por ES-285 en parásitos de *Leishmania spp.*

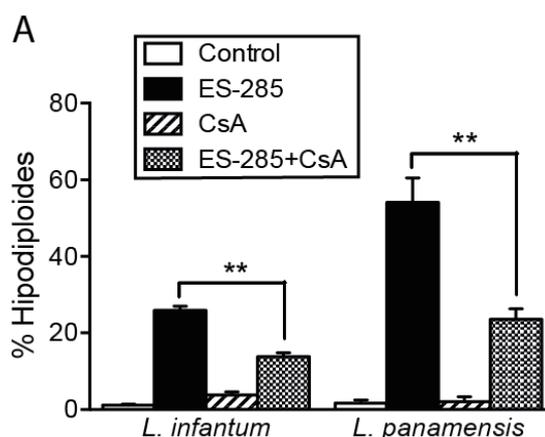


Figura 32. Promastigotes de *L. infantum* y *L. panamensis* fueron preincubados con 10 $\mu\text{g/ml}$ de CsA durante 1 h (A), y posteriormente incubados con 1 μM ES-285 durante 9 h. Después del tratamiento se analizó el número de células hipodiploides por citometría de flujo; en paralelo se analizaron células control. La gráfica representa la media \pm D.S. de tres experimentos independientes. (**) $P < 0.01$.

4.2.6. Papel de ROS en la muerte inducida por ES-285.

En vista de los claros resultados en cuanto a la producción de ROS después del tratamiento con ES-285, se evaluó el papel del estrés oxidativo en la muerte inducida por este compuesto. La producción de ROS durante la primera fase de la apoptosis está regulada por el aumento en la síntesis de equivalentes reductores como el GSH. El tratamiento con antioxidantes ayuda al control de los ROS por parte del sistema de control redox de la célula. El GSH y la NAC son antioxidantes ampliamente usados a nivel celular. Como se indicó en el capítulo anterior, estos pueden fortalecer el sistema redox de la célula por lo menos en dos formas: la primera, involucra el aumento directo de los niveles intracelulares de tioles; y la segunda, se basa en su capacidad para neutralizar el superóxido, ya que son capaces de reaccionar directamente con este radical. El sistema redox de *Leishmania*, a diferencia del sistema de mamíferos, no basa el control del estrés oxidativo en el GSH, sin embargo el GSH y la NAC pueden entrar en la vía de síntesis del tripanotión, incrementando los niveles de este tiol intracelular. Así, se evaluó si los antioxidantes GSH y NAC tenían un papel protector en la muerte inducida por ES-285. La muerte celular en parásitos de *L. panamensis* y *L. infantum* se determinó por la pérdida del $\Delta\psi_m$ y por el porcentaje de hipodiploidia. Se encontró que los parásitos pretratados con GSH y NAC resultaban protegidos de la muerte inducida por ES-285 (Figura 33). Estos resultados indican que el estrés oxidativo es un importante, aunque probablemente no exclusivo, factor determinante en la acción citotóxica del ES-285.

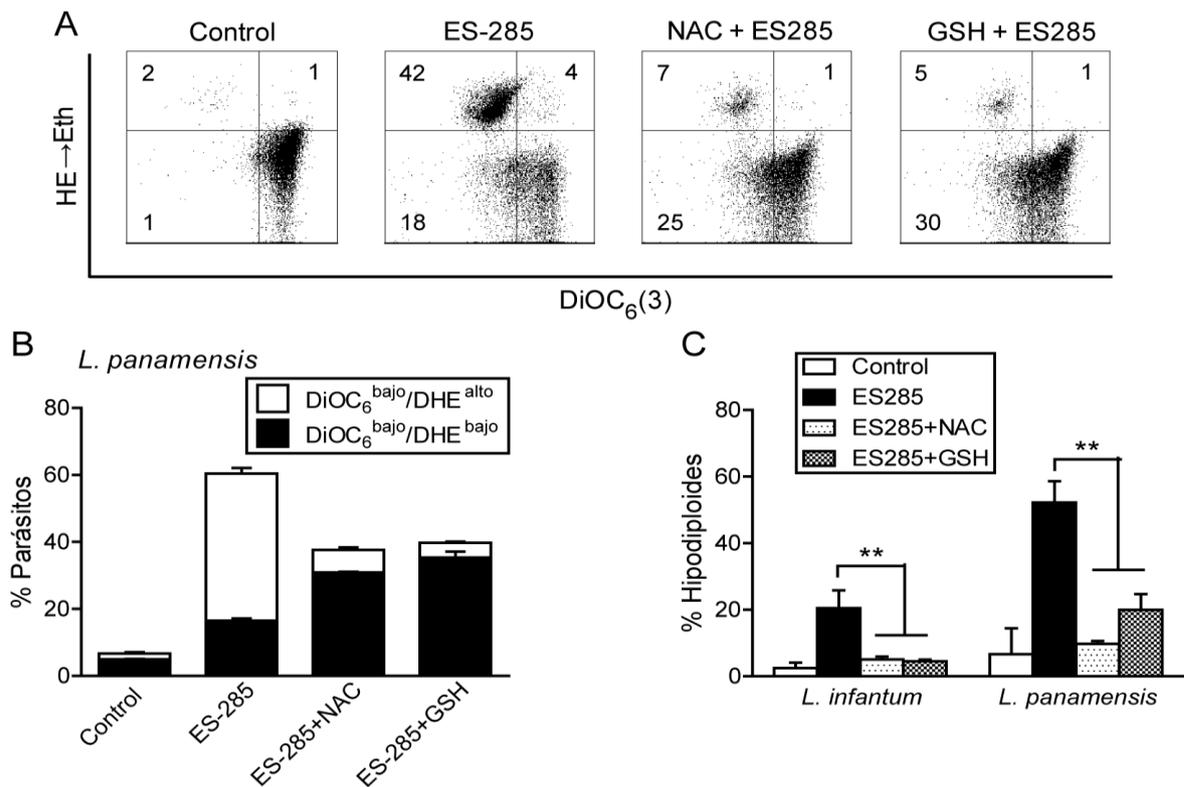


Figura 33. Promastigotes de *L. infantum* y *L. panamensis* fueron preincubados con 10 mM de NAC o GSH durante 2 h, y posteriormente incubados con 1 μ M ES-285 durante 9 h. Después del tratamiento se analizó la pérdida de $\Delta\psi_m$ medida por DiOC₆(3) y la generación de ROS (HE→Eth) (A,B), y el número de células hipodiploides (C) por citometría de flujo. En paralelo se analizaron células control sin tratar. La gráfica representa la media \pm D.S. de tres experimentos independientes. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$.

4.2.7. ES-285 disminuye los niveles de ATP en parásitos

Con el fin de conocer mejor los procesos metabólicos afectados en la acción antiparasitaria del ES-285, hemos estudiado el estado bioenergético de promastigotes de *L. panamensis* después del tratamiento con ES-285. Para ello se realizó la cuantificación del ATP intracelular basándonos en el ensayo de luciferina/luciferasa. Los resultados mostraron que el ES-285 reduce los niveles de ATP desde las primeras horas de tratamiento (Figura 34).

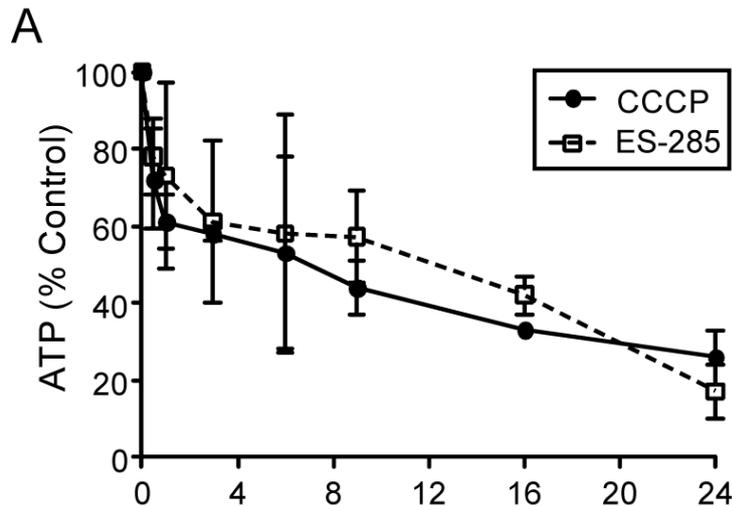


Figura 34. Medición de ATP intracelular. (A) Promastigotes de *L. panamensis* tratados con 1 μ M de ES-285 y evaluados a diferentes intervalos de tiempo hasta las 24 horas. Los cambios en el ATP intracelular fueron monitoreados por bioluminiscencia y los datos fueron normalizados con respecto al control. La gráfica representa las medias \pm D.S. de tres experimentos independientes.

4.2.8. Evaluación del Ca^{2+} en la muerte inducida por ES-285

Cambios en el $\Delta\psi_m$ están relacionados con un incremento del Ca^{2+} citosólico. Como vimos en el capítulo anterior, en *Leishmania spp.* el Ca^{2+} está involucrado en la muerte inducida por diferentes compuestos citotóxicos. Con el objetivo de evaluar la participación del Ca^{2+} en la muerte inducida por ES-285 evaluamos la concentración de Ca^{2+} intracelular en promastigotes de *L. panamensis* tratados con 1 μ M ES-285. Los parásitos fueron marcados con el indicador de Ca^{2+} FLUO-4. Los resultados mostraron un aumento progresivo en el tiempo del Ca^{2+} citosólico a partir de los primeros minutos de tratamiento en aquellos parásitos tratados con ES-285 (Figura 35A).

A continuación, con el fin de determinar si el aumento observado en el Ca^{2+} citoplasmático era debido a la liberación de este catión de compartimentos intracelulares, o por el contrario a su entrada desde el medio extracelular a través de la apertura de un canal de calcio de la membrana plasmática, se realizó el mismo experimento, pero en presencia del quelante de Ca^{2+} intracelular Bapta-AM y en ausencia de Ca^{2+} extracelular debido a la presencia de EGTA. Nuestros resultados muestran que en los parásitos incubados en presencia de EGTA se inhiben ampliamente los niveles de Ca^{2+} citoplasmáticos inducidos por edelfosina, mientras que con Bapta-AM, quelante intracelular se observa una inhibición menos amplia del aumento de Ca^{2+} citosólico inducido por ES-285 (Figura 35B y C). Estos resultados indican que el Ca^{2+}

intracelular procede mayoritariamente del medio extracelular por alguna alteración en los canales de Ca^{2+} . Posteriormente con el fin de evaluar si este aumento en los niveles de Ca^{2+} participa activamente en la inducción de muerte por ES-285, evaluamos el porcentaje de parásitos hipodiploides preincubados con EGTA o Bapta-AM, y posteriormente tratados con ES-285. Nuestros datos indican que la muerte inducida con ES-285 puede verse ampliamente inhibida en parásitos tratados con EGTA, igualmente se observa inhibición de muerte en los parásitos tratados con el quelante intracelular, pero en menor proporción (Figura 35D), confirmando así, que el origen del Ca^{2+} intracelular es la presencia de Ca^{2+} en el medio. Por lo tanto, el mecanismo molecular de la muerte inducida por ES-285 puede implicar un efecto en los canales de Ca^{2+} o en la membrana plasmática, que conlleva a un aumento de Ca^{2+} intracelular y posteriormente un desbalance a nivel mitocondrial produciendo ROS y causando la pérdida del $\Delta\psi_m$.

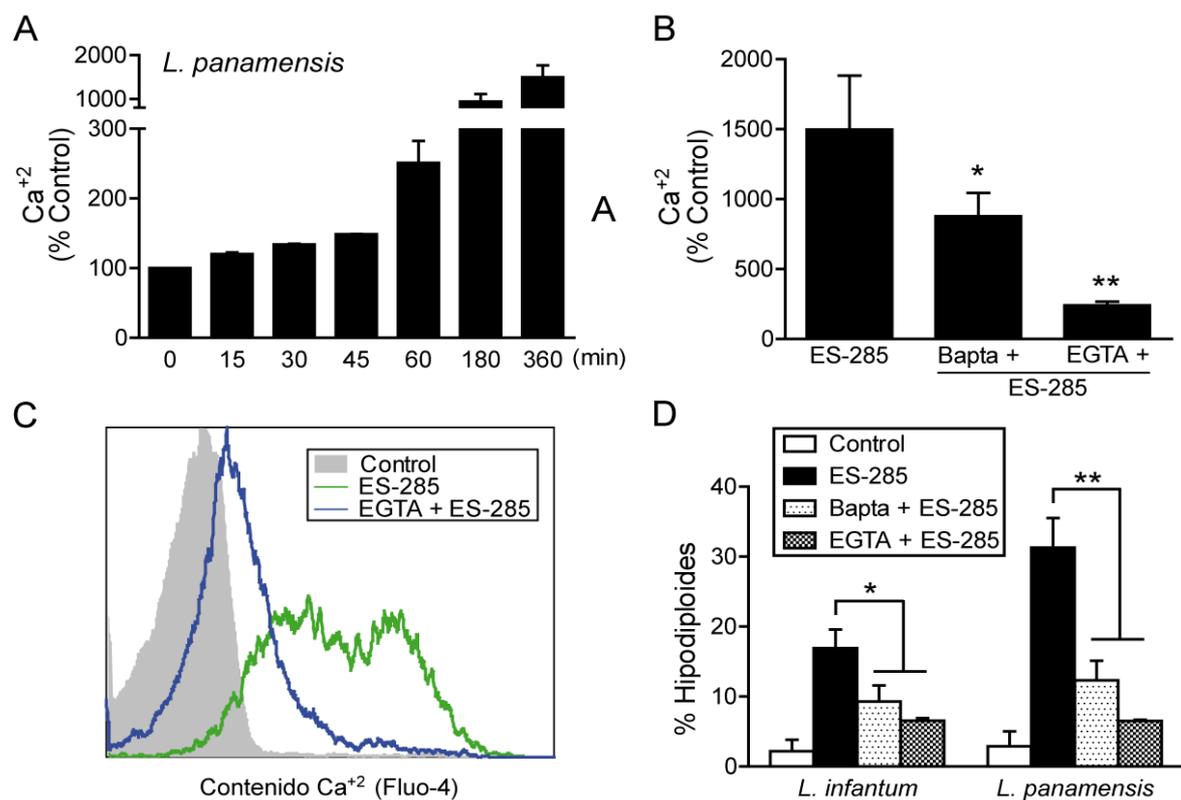


Figura 35. Medición de Ca^{2+} intracelular usando FLUO-4 como indicador. (A) Promastigotes de *L. panamensis* se trataron con $1 \mu\text{M}$ ES-285, y posteriormente se analizó el contenido de Ca^{2+} intracelular desde los 15 min hasta las 6 horas de tratamiento. (B y C) Contenido de Ca^{2+} intracelular, y (D) porcentaje de células hipodiploides de promastigotes de *L. panamensis* preincubados con Bapta y EGTA y posteriormente tratados con edelfosina $10 \mu\text{M}$ por 6 h. Las gráficas representan las medias \pm D.S. de tres experimentos independientes. (*) $P < 0.05$, (**) $P < 0.01$.

4.2.9. Efectos de los inhibidores de la cadena respiratoria en la muerte inducida por ES-285

Como los resultados anteriores sugerían que la mitocondria participaba activamente en la muerte inducida por ES-285, quisimos evaluar el papel de la cadena respiratoria mitocondrial en la producción de ROS inducida por ES-285, utilizando los siguientes inhibidores de la cadena transportadora de electrones: rotenona (inhibidor del complejo I), malonato (inhibidor complejo II), antimicina A (inhibidor del complejo III), azida sódica (inhibidor del complejo IV), oligomicina y piceatannol, dos clásicos inhibidores de la F_0F_1 -ATP sintasa mitocondrial. Oligomicina bloquea el canal de protones (la fracción F_0) de la ATP sintasa y el piceatannol inhibe el componente catalítico de la enzima, la fracción F_1 , por lo tanto estos dos compuestos actúan inhibiendo la ATP sintasa por mecanismos completamente diferentes. Como control se utilizó el CCCP uno de los inhibidores más utilizados de la fosforilación oxidativa (97). En todos los experimentos los inhibidores se añadieron 1 hora antes del tratamiento, y posteriormente las células se incubaron durante 9 horas con ES-285. Tras el tratamiento, se evaluó por citometría de flujo la generación de ROS. El tratamiento con la rotenona aumento la producción de superóxido, dato que se correlaciona con la reportada resistencia del complejo I del parásito a este inhibidor, que a bajas concentraciones micromolares favorece la hiperpolarización mitocondrial. El malonato, inhibidor del complejo II, indujo a una marcada reducción en la producción del superóxido así como en el porcentaje de células hipodiploides, sugiriendo que este complejo se comporta como el mayor productor de este radical en la muerte inducida por ES-285 (Figura 36). En diferentes modelos celulares de eucariotas, se ha demostrado que la hiperpolarización mitocondrial lleva a la producción de ROS y que la reducción del $\Delta\psi_m$ con desacoplantes de la fosforilación oxidativa lleva a una reducción en la producción de éstos (200). Nosotros quisimos evaluar si el inductor de la generación de ROS era la hiperpolarización mitocondrial o si por el contrario era la aceleración en la respiración. Los promastigotes de *L. panamensis* fueron pretratados con el desacoplante CCCP y posteriormente tratados con ES-285. En nuestros resultados no se observó una disminución en la producción de ROS, por el contrario, este pretratamiento estimuló la producción de superóxido con este desacoplante.

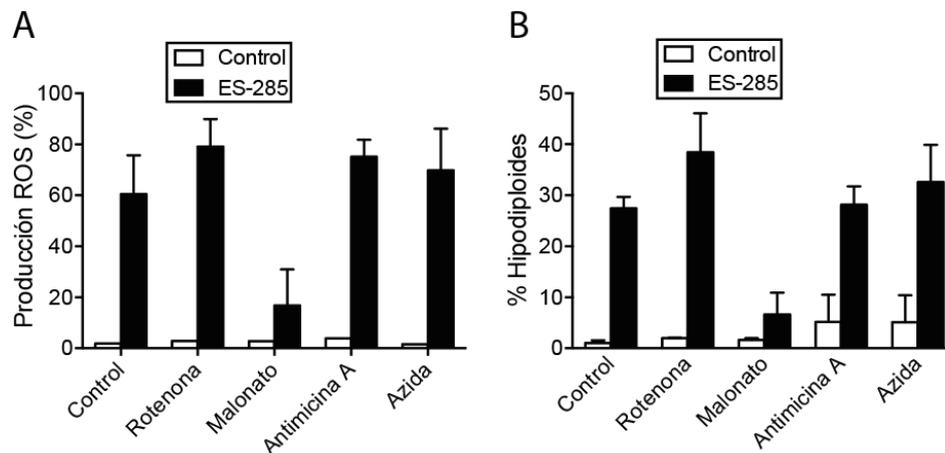


Figura 36. Efecto de los inhibidores de la cadena respiratoria en la producción de ROS. Promastigotes de *L. panamensis* preincubadas con rotenona 10 μ M, malonato 5 mM, antimicina A 10 μ M, azida sódica 1,5 mM, y posteriormente incubados con 1 μ M ES-285 durante 6 h, se analizaron por citometría de flujo para determinar la producción de ROS (A) y el porcentaje de hipodiploides (B). Los datos representan las medias \pm D.S. de tres experimentos independientes.

4.2.10. Proteínas de la familia Bcl-2 regulan la muerte inducida por ES-285

En vista de la capacidad de la proteína antiapoptótica humana Bcl-X_L para regular la muerte inducida por edelfosina en *Leishmania* (160, 201), quisimos determinar si el proceso de muerte inducido por ES-285 podía ser regulado por esta proteína antiapoptótica o por la proteína proapoptótica humana Hrk. Para ello utilizamos las cepas de *L. infantum* transfectadas con un vector pX63-Neo conteniendo la secuencia Bcl-X_L y la secuencia Hrk de humanos, gentilmente donados por el Dr. Antonio Jimenez (Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, de la Universidad de Alcalá). Los resultados muestran que estas proteínas pueden regular la muerte inducida por ES-285. Los parásitos transfectados con Bcl-X_L muestran un efecto protector, que aunque es discreto es estadísticamente significativo, mientras que el proapoptótico Hrk no presenta ningún efecto pro-muerte (Figura 37)

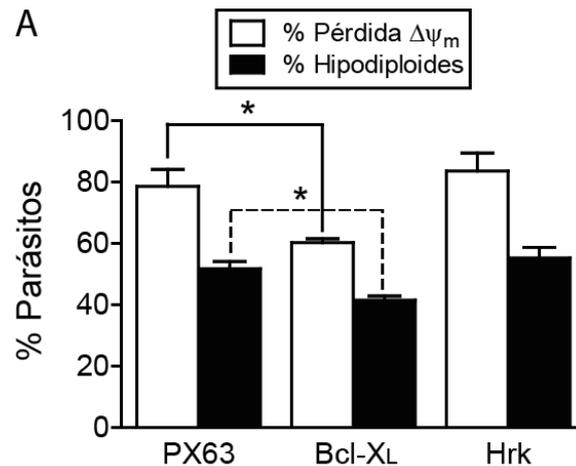


Figura 37. Efecto de la expresión de las proteínas BclX_L y Hrk en la muerte inducida por ES-285. (A) Los parásitos transfectados con el vector vacío (pX63), o con Bcl-X_L o Hrk fueron tratadas con 1 μ M de ES-285 y se determinó el porcentaje de parásitos con pérdida del $\Delta\Psi_m$ y el porcentaje de parásitos hipodiploides. Los datos representan las medias \pm D.S. de tres experimentos independientes. (*) $P < 0.05$.

4.2.11. ES-285 inhibe la actividad de esfingosina quinasa (SK) en promastigotes de *L. panamensis*

El compuesto ES-285 comparte algunas analogías estructurales con la esfingosina y otros lípidos bioactivos. En la última década ha quedado firmemente establecida la importancia de la ceramida, la esfingosina y la esfingosina-1-fosfato (S1P) en el control del destino celular. La ceramida está implicada en los procesos de diferenciación, senescencia y muerte celular. La S1P en cambio, promueve la proliferación y supervivencia celular (202). La depuración celular de todos los esfingolípidos requiere la transformación final a S1P. Por lo tanto, la actividad esfingosina quinasa (SK), enzima responsable de la fosforilación de esfingosina para formar S1P, inicia la única vía bioquímica degradativa de eliminación de ceramida de la célula (202). Este mecanismo le otorga a la SK gran importancia como herramienta de salida celular de todos los esfingolípidos. Las funciones antagónicas ejercidas por la ceramida y esfingosina por un lado y la S1P por el otro, son de particular importancia en la biología de los esfingolípidos. Los efectos antagónicos de estos mediadores esfingolípidos dio origen al concepto de biostato ceramida/S1P y se postula que es la relación de sus concentraciones y no el valor absoluto de cada uno de ellas la que determina el destino celular (203).

En base a estos antecedentes, y con el fin de entender el mecanismo molecular por el cual actúa el ES-285, se evaluó la actividad SK, ya que su inhibición podría inducir

un aumento en los niveles de ceramida y evitar la conversión en S1P, lo que podría llevar a una célula a morir. Para esto se utilizaron promastigotes logarítmicos de *L. panamensis* tratados a la 1, 3, 6 y 9 horas con 1 μ M ES-285. Posteriormente los parásitos fueron lisados y se analizó la actividad esfingosina kinasa. El ensayo de actividad kinasa consiste en la cuantificación del ATP restante de la reacción de SK, por lo tanto la luminiscencia es inversamente proporcional a la actividad esfingosina kinasa. Como se observa en la Figura 38, desde la primera hora de tratamiento se observa un aumento en la luminiscencia, el cual aumenta a medida que se pasa el tiempo de incubación, lo que indica que el compuesto ES-285 inhibe la actividad esfingosina quinasa de promastigotes de *L. panamensis* (Figura 38)

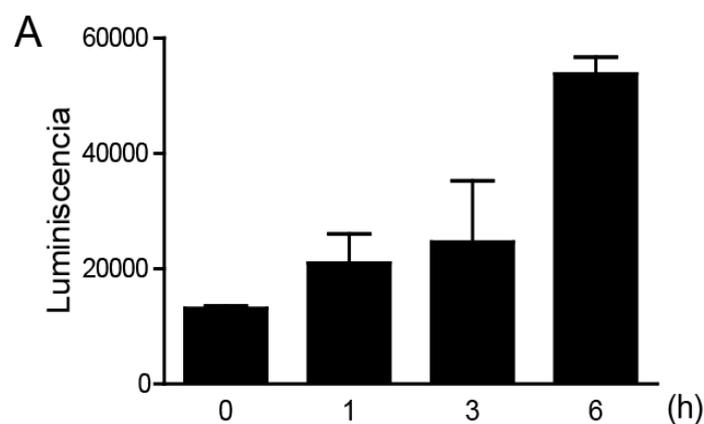


Figura 38. Actividad SK. (A) Promastigotes de *L. panamensis* tratados con 1 μ M de ES-285 y evaluados a diferentes intervalos de tiempo hasta las 6 horas de incubación. La actividad SK se determinó con el kit *Sphingosine Kinase Activity Assay echelon®*. La grafica representa las medias \pm D.S. de tres experimentos independientes.

4.2.12. Acción de ES-285 en amastigotes intracelulares de *Leishmania*.

Los parásitos de *Leishmania* son intracelulares obligados de células del sistema mononuclear fagocítico. Para evaluar el efecto de ES-285 en macrófagos J774, hemos infectado estos macrófagos con parásitos *Lp*-GFP. De tal manera que determinando la existencia o no de fluorescencia emitida por la GFP podemos determinar la relación entre macrófagos infectados y no infectados con *Lp*-GFP. Los macrófagos fueron infectados con *Lp*-GFP a una proporción 10:1 (parásito: célula) y posteriormente tratados con 1 y 2 μ M de ES-285 durante 24 horas. Después del tiempo de incubación los macrófagos se analizaron por citometría de flujo y se comparó el porcentaje de

células infectadas entre el control, macrófagos infectados con *Lp*-GFP y el tratamiento, macrófagos infectados con *Lp*-GFP y tratados con ES-285 (Figura 39A), para lo cual se analizaron los macrófagos en un histograma monoparamétrico en el canal FL-1. Como se observa en la gráfica, el tratamiento con ES-285 induce una disminución de más del 50 % de macrófagos infectados, indicando así una disminución importante en el número de parásitos dentro del macrófago.

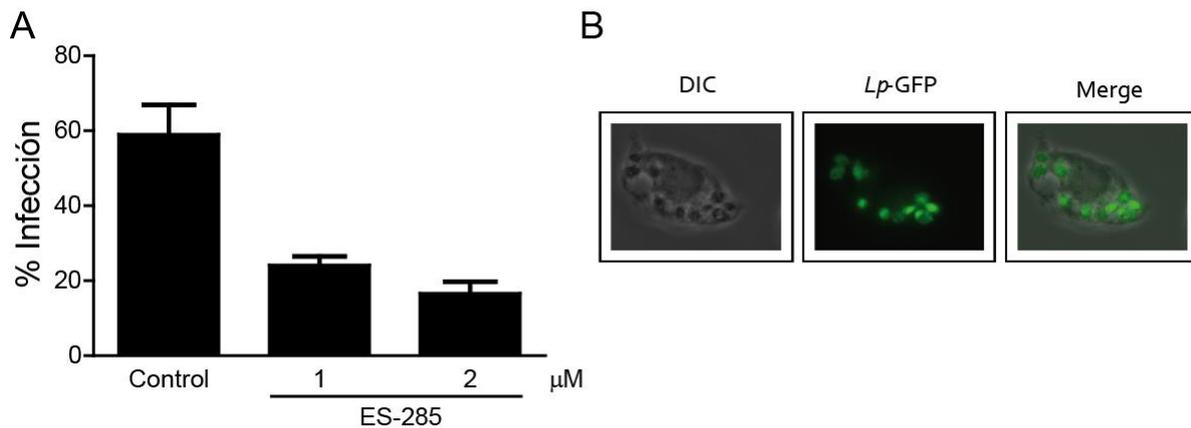


Figura 39. Efecto del ES-285 en la infección *in vitro* de macrófagos murinos J774 con promastigotes de *L. panamensis*. (A) Macrófagos J774 fueron infectados con promastigotes de *Lp*-GFP en una proporción macrófago vs. amastigotes 1:10 y tratados con ES-285 (1 y 2 μ M). Los macrófagos fueron analizados por citometría de flujo en el canal FL-1. (B) En la figura se observan las imágenes obtenidas mediante contraste de fase diferencial (DIC) y la fluorescencia de la EGFP de un grupo de macrófagos infectados con *Lp*-GFP. Los porcentajes representan la media y E.S. de por lo menos tres experimentos independientes.

4.3. Interacción hospedero-parasito y su implicación en el tratamiento farmacológico de leishmaniasis.

En una época en la cual el aumento en la resistencia a los agentes anti-infecciosos es más rápida que la incorporación de nuevos tratamientos, la investigación se ha centrado en la posibilidad de agregar un adyuvante al agente infeccioso, cuyo blanco sean los factores del hospedero que los patógenos regulan para su propagación (124). Si un medicamento no actúa sobre el patógeno, este no puede generar resistencia basada en los mecanismos conocidos, incluyendo: sobre-expresión, mutación o cambios de la proteína blanco, no activación, mala absorción o retención de la droga. Para encontrar estos blancos surge la necesidad de estudiar la interacción del agente infeccioso con el hospedero para identificar y seleccionar los factores esenciales para la entrada, supervivencia y multiplicación del patógeno (125). De esta manera, la regulación del destino de la célula hospedera ha emergido como un arma importante en la patogénesis de múltiples microorganismos intracelulares. Dentro de la compleja interacción entre el patógeno intracelular y su hospedero, se viene hablando en los últimos años que miembros de los principales patógenos manipulan la supervivencia de la célula huésped, ya sea promoviéndola o inhibiéndola para su conveniencia (126). Al entrar a su célula huésped e infectarla, los parásitos despiertan una serie de señales de estrés, tales como la activación de un proceso apoptótico (126) o autofágico (127, 128), los cuales ayudan a eliminar las células infectadas limitando la diseminación del parásito. Sin embargo, estos patógenos intracelulares han desarrollado diferentes estrategias para sobrevivir.

La apoptosis, un proceso de muerte celular programada, tiene como un papel principal mantener la homeostasis celular y la eliminación de células dañadas. Es usado por el hospedero para el control de células infectadas y así evita la diseminación del parásito. *Leishmania* no solo inhibe la apoptosis espontánea de los neutrófilos, que constituyen las primeras células en llegar al sitio de la infección, incrementando así su vida útil y asegurándose un lugar seguro durante las primeras horas de infección, sino que también tiene la capacidad de inhibir la muerte celular inducida en macrófagos, su principal célula huésped (126).

La autofagia es un proceso celular conservado responsable del reciclaje de organelas dañadas y proteínas mal plegadas con el fin de mantener la homeostasis celular en células normales y en condiciones de estrés (110). La autofagia aumenta la supervivencia

celular y actúa como un mecanismo de defensa en infecciones, contribuyendo a la inmunidad, mediante la eliminación de patógenos intracelulares (xenofagia) (138). Sin embargo, la relación entre los patógenos y la autofagia es mucho más compleja. Algunos parásitos intracelulares se conocen como inductores de autofagia de su célula hospedera con el fin de favorecer su multiplicación intracelular (127, 128). La autofagia puede ser activada vía eIF2 α , ya que este factor de elongación es importante para la conversión de LC3-I a LC3-II (120). La vía eIF2 α puede ser activada por estrés de RE a través de PERK o por infecciones virales a través de la proteína quinasa dependiente de ARN de doble cadena (PKR, del inglés *protein kinase R*) (143). Esta PKR es importante en muchos procesos celulares, incluyendo la respuesta antiviral, apoptosis, autofagia, activación de factores de transcripción y en la respuesta inflamatoria (204). Es clave en la respuesta inmune contra infecciones virales debido a la inhibición de síntesis de proteínas por medio de la fosforilación de eIF2 α . En *Leishmania* existen pocos estudios que asocian el parásito con la inducción de autofagia en la célula hospedera. Sin embargo, se ha descrito que la infección por *L. amazonensis* induce autofagia en el huésped y que este proceso es importante para la progresión de la infección (141, 142, 205). Además se ha demostrado que la activación de PKR es uno de los mecanismos de supervivencia activados por *L. amazonensis* (204, 206)

En este capítulo, se investigó el papel de la apoptosis, autofagia y la activación de la vía PKR en el establecimiento de la infección por *L. panamensis*, con el fin de encontrar nuevos blancos terapéuticos en el hospedero para controlar la infección causada por *Leishmania*. Conocer los factores del huésped que el parásito aprovecha para establecer su infección puede ser de gran interés para identificar potentes blancos terapéuticos que pueden ser de gran utilidad en la terapia combinatoria.

4.3.1 *L. panamensis* inhibe la muerte en macrófagos y neutrófilos

Para sobrevivir, todos los tipos celulares dependen de una constante inhibición de la MCP, la cual es inducida por factores de supervivencia provistos por otras células (207). Así, las células pueden sufrir apoptosis espontánea cuando se privan de factores de supervivencia. Las líneas celulares, como los macrófagos murinos J774, necesitan del SFB que provee los factores para su desarrollo y multiplicación celular y experimentan apoptosis tras la retirada de este. Las células que permanecen en cultivo sin SFB

presentan una muerte del 30 % a las 48 horas de incubación, mostrando características típicas de apoptosis como fragmentación de ADN. Cuando estas células fueron infectadas *in vitro* con promastigotes de *L. panamensis* (rango de infección 10:1 parásito: célula), se observa un efecto preventivo en donde sólo el 12% de los macrófagos sufren apoptosis (Figura 40A).

Aunque los macrófagos son la principal célula hospedera de los parásitos de *Leishmania*, los neutrófilos son capaces de internalizar promastigotes de *Leishmania*. Se sabe bien que después de la infección y de comenzar los procesos inflamatorios locales, los neutrófilos son reclutados en las primeras horas al sitio de la infección, seguidos por los macrófagos 2 o 3 días después (207). Por lo tanto, después de su reclutamiento los neutrófilos internalizan parásitos y les proporcionan a estos los medios para su supervivencia antes de la llegada del macrófago, actuando así como un “Caballo de Troya” y facilitando la infección de los parásitos de *Leishmania* (208). Los neutrófilos son células caracterizadas por tener una vida corta, solo están de 6 a 10 h en circulación, y poco después sufren una muerte con características apoptóticas, por lo que no se habían considerado como células hospederas de *Leishmania*. Sin embargo, ya que varios patógenos han mostrado capacidad de inhibir esta apoptosis y así lograr tener un mejor índice de infección, también, se está estudiando el papel del neutrófilo en las infecciones por *Leishmania* (208, 209). Así, se evaluó la apoptosis de neutrófilos de sangre periférica cultivados *in vitro* en ausencia y presencia de promastigotes de *L. panamensis*, después de 16 y 24 horas de incubación. Los neutrófilos sufren apoptosis espontánea, y en nuestros resultados vimos que a las 16 horas de incubación muestran un 60% de apoptosis, mientras que los neutrófilos infectados con promastigotes de *L. panamensis* solo un 15% de neutrófilos muestran apoptosis. Lo que sugiere que los neutrófilos juegan un papel importante en las infecciones por *Leishmania* y que el aumentar la vida media del neutrófilo puede ser una estrategia del parásito para facilitar su infección en el macrófago (Figura 40B).

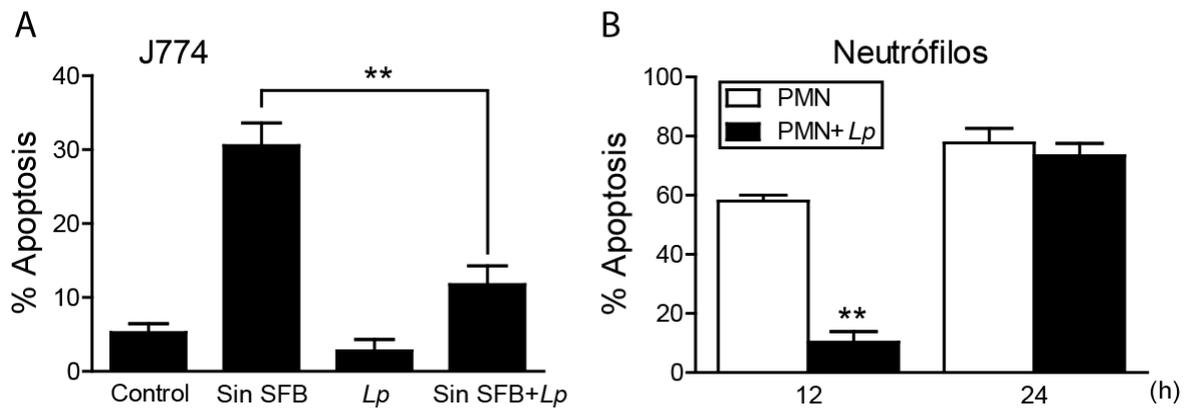


Figura 40. La infección con *L. panamensis* inhibe la apoptosis de macrófagos J774 y prolonga la vida de neutrófilos. Representación esquemática de la muerte celular de (A) macrófagos J774 infectados con *L. panamensis* (Control sin infección) durante 4 horas, posteriormente se lavaron y se incubaron con y sin SFB durante 72 horas. (B) Neutrófilos infectados con *L. panamensis* a una proporción de 5:1 (parasito: célula) (control sin infección), en medio RPMI-1640 a 34°C, 5% CO₂. La grafica representa la media y D.S. de tres experimentos independientes. (**) $P < 0.01$.

4.3.2 *L. panamensis* inhibe la apoptosis inducida por Actinomicina D

Se ha demostrado previamente que varias cepas de *Leishmania* pueden inhibir la apoptosis en macrófagos, inducida por diferentes compuestos, tales como actinomicina D (133, 210), camptotecina (210), estaurosporina (131) y cicloheximida (134). En vista que todos estos ensayos han sido reportados en parásitos del complejo *Leishmania*, aquí hemos utilizado una cepa del complejo *Viannia*. Para evaluar el efecto de *L. panamensis* en la apoptosis inducida en macrófagos J774 se utilizó la actinomicina D como inductor de apoptosis. Los macrófagos fueron infectados durante 4 h con promastigotes de *L. panamensis* antes del tratamiento con actinomicina D, y después se incubaron durante 24 h. La apoptosis se evaluó por citometría de flujo calculando la hipodiploidia, el $\Delta\psi_m$ con DiOC₆(3) y la producción de anión superóxido con DHE. Por colorimetría y *Western blott* se evaluaron las caspasas. Las células no infectadas y tratadas con actinomicina D muestran un 32% de células hipodiploides, mientras que aquellos macrófagos infectados y posteriormente tratados con Actinomicina D muestran sólo un 20 % de células hipodiploides (Figura 41A). Así mismo, los macrófagos infectados antes del tratamiento con actinomicina D muestran una reducción de más del 50% en la pérdida de $\Delta\psi_m$ y en la producción de ROS (Figura 41B), lo que demuestra que la infección por *L. panamensis* inhibe la apoptosis inducida por actinomicina D.

En el ensayo colorimétrico, se evaluaron las caspasas iniciadoras 8 y 9, y la caspasa efectora 3. En los macrófagos J774 tratados con actinomicina D se observa activación de las caspasas, 3, 8 y 9, y en las células J774 infectadas con promastigotes de *L. panamensis* y posteriormente tratadas con actinomicina D esta activación se ve disminuida (Figura 41C). De igual forma, ensayos de *Western blot* también indican que la activación de las caspasas 3 y 7 tras la incubación de macrófagos con actinomicina D se ve disminuida en macrófagos previamente infectados con *L. panamensis* (Figura 41D)

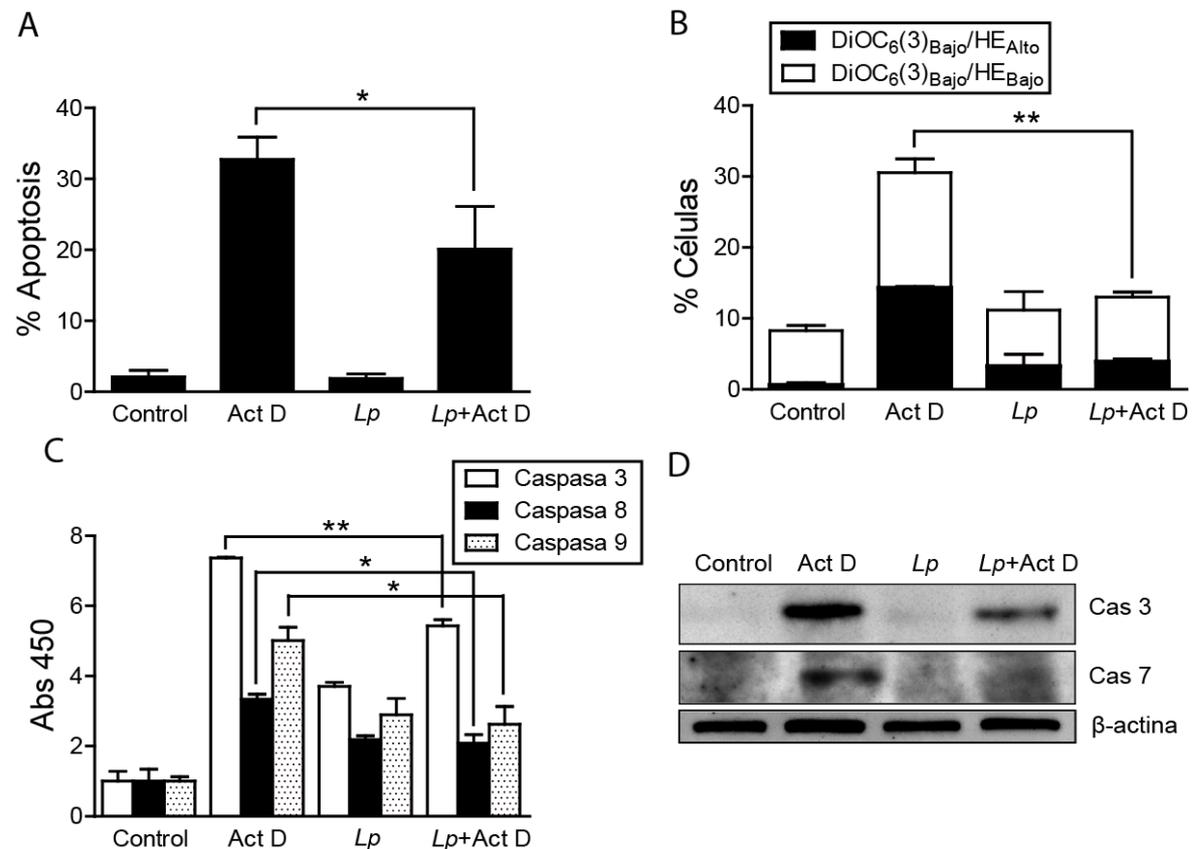


Figura 41. La infección de macrófagos J774 con *L. panamensis* inhibe la apoptosis inducida por actinomicina D. Los macrófagos fueron infectados con promastigotes de *L. panamensis* en una proporción de 10:1 (parásito: célula), y después de 4 horas los parásitos libres fueron lavados. Posteriormente se trataron con 10 μ M actinomicina D durante 24 h. Pasadas las 24 h, se analizó la muerte por citometría de flujo evaluando el (A) células hipodiploides y (B) pérdida del $\Delta\psi_m$. (C) Igualmente se analizó por un ensayo colorimétrico la actividad de las caspasas 3, 8 y 9. (D) análisis por *Western blot* con anti-caspasa 3 y 7. La gráfica representa la media y D.S. de tres experimentos independientes. (*) $P < 0.05$. (**) $P < 0.01$.

4.3.3 *L. panamensis* induce autofagia en macrófagos J774

La autofagia actúa como un mecanismo de inmunidad innata y adaptativa contra virus y bacterias intracelulares. Sin embargo, los organismos infecciosos han desarrollado estrategias para utilizar la autofagia en su propio beneficio. Así, se ha

descrito la inducción *in vivo* de la maquinaria autofágica en un paciente infectado con *L. donovani* (142). Además, la inducción de autofagia ha sido relacionada con el aumento de la carga parasitaria en macrófagos infectados con *L. amazonensis* (141, 205). Aquí, hemos observado un incremento de células positivas para MDC después de la infección de macrófagos J774 con promastigotes de *L. panamensis* (Figura 42A y B), lo que podría sugerir un aumento de autofagia. Estos resultados se vieron confirmados tras la conversión de LC3B-I a LC3B-II detectada por *Western blot* (Figura 42C), y por la detección de LC3B-II vesicular por microscopia de fluorescencia (Figura 42D) tras la infección de J774 con *L. panamensis*.

4.3.4 La inhibición de autofagia disminuye la carga parasitaria

Los resultados anteriores sugerían la inducción de autofagia en macrófagos infectados con *L. panamensis*. A continuación se quiso evaluar si esta autofagia era importante para la división intracelular de parásitos de *L. panamensis*. Para ello se utilizó wortmanina como un clásico inhibidor de autofagia. Se infectaron macrófagos J774 durante 4 horas con *L. panamensis* (10:1 parásito: célula) y después se trataron con wortmanina durante 24 horas, tras lo cual se evaluó la carga parasitaria por el ensayo de dilución límite. Como control se utilizaron macrófagos infectados sin tratar con wortmanina. Como se observa en la Figura 43A, el tratamiento con wortmanina inhibió en más del 50% la multiplicación parasitaria (Figura 43A). Estos resultados fueron confirmados mediante el uso de *L. panamensis* transfectadas con una proteína GFP (*Lp*-GFP) que pueden usarse para evaluar la replicación intracelular de estos parásitos mediante citometría de flujo (211). Los macrófagos fueron infectados durante 4 horas con parásitos *Lp*-GFP, posteriormente el sobrenadante fue retirado y se adicionó medio nuevo como control y medio con wortmanina. La fluorescencia de los macrófagos fue monitoreada cada 2 horas hasta las 24 horas. Como se observa la Figura 43B, los macrófagos tratados con wortmanina tienen una disminución en la intensidad media de fluorescencia, indicando una menor multiplicación del parásito (Figura 43B). Adicionalmente, estos macrófagos fueron incubados durante 24 horas más; pasado este tiempo los macrófagos fueron evaluados por citometría de flujo, donde se evaluó el porcentaje de macrófagos GFP positivos (GFP+) (Figura 43B). El número de macrófagos GFP+ del control fue del 60 % mientras que en los macrófagos tratados con wortmanina

se redujo al 40 % (Figura 43C). Finalmente, por microscopia de fluorescencia se encontró una reducción en el número de parásitos en cada macrófago (contando 100 macrófagos infectados por tratamiento) (Figura 43D). Estos resultados indican una disminución en la replicación del parásito en presencia de un inhibidor de autofagia.

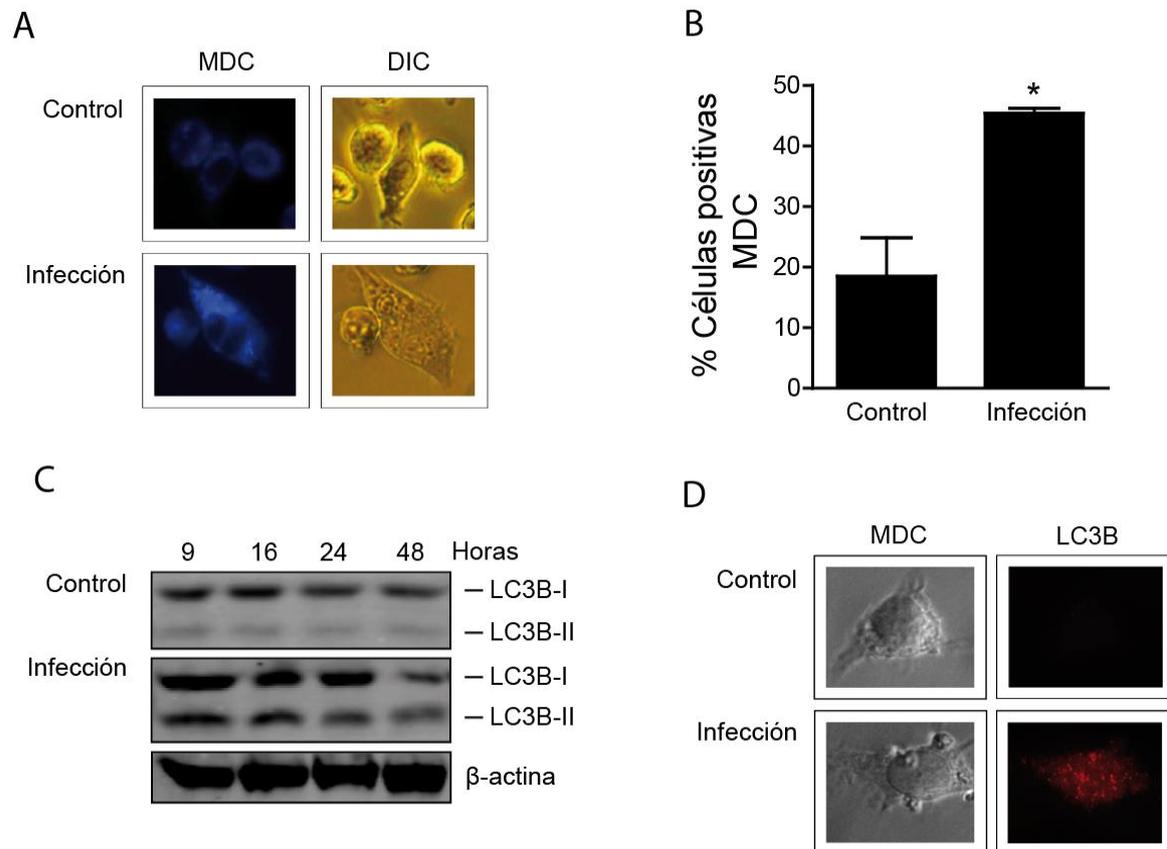


Figura 42. Inducción de autofagia de *L. panamensis* en macrófagos J774. Los macrófagos J774 fueron infectados con *L. panamensis* (10:1 parásito: célula) y a las 6 horas se colorearon con MDC (A). (B) El porcentaje de células positivas para MDC se determinó después de contar 200 macrófagos. Además, se analizó la conversión de LC3B-I a LC3B-II por *Western blot* tras los tiempos indicados post-infección (C) y por microscopia de fluorescencia tras 9 horas de infección (D). La gráfica representa la media \pm E.S. de tres experimentos independientes. (*) $P < 0.05$.

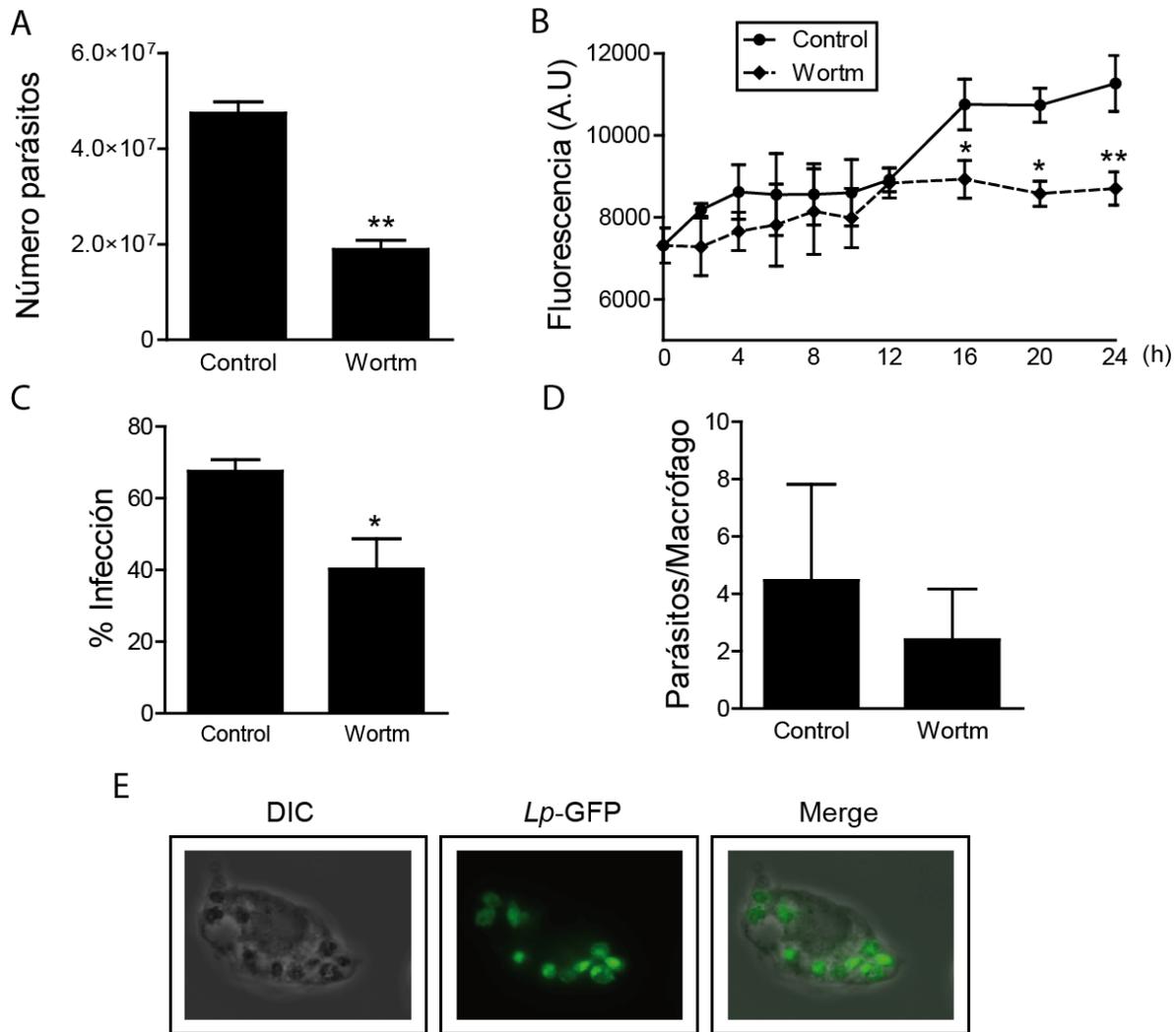


Figura 43. Wortmanina reduce la infección por *L. panamensis*. El tratamiento con wortmanina (Wortm) de macrófagos infectados con *L. panamensis* reduce la multiplicación del parásito, (A) carga parasitaria, (B) IMF de macrófagos infectados con *Lp-GFP* e incubados a 34°C. La fluorescencia fue medida en equipo FLUOstar OPTIMA (C) porcentaje de células infectadas y (D) número de parásitos por célula. (E) foto representativa de macrófagos infectados con *Lp-GFP*. La gráfica representa la media y E.S. de tres experimentos independientes. (*) $P < 0.05$. (**) $P < 0.01$.

4.3.5 *L. panamensis* activa PKR y su principal sustrato eIF2 α

Para determinar el papel de PKR en la infección por *L. panamensis*, evaluamos si esta cepa es capaz de inducir la activación de esta quinasa, mediante el análisis de la fosforilación de PKR por *Western blot*. Nuestros resultados mostraron que, en las primeras horas de infección, *L. panamensis* induce la fosforilación de PKR (Figura 44A), así como también se observa la fosforilación de su principal sustrato, eIF2 α (Figura 44A). Estos datos sugieren que *L. panamensis* induce a la activación de PKR y ésta podría ser la vía de inducción de autofagia.

Para evaluar el papel de PKR en la regulación de la infección por *L. panamensis*, transfectamos células J774 con PKR siRNA, utilizando como control macrófagos transfectados con el vector vacío. Estas células fueron infectadas con promastigotes de *L. panamensis* durante 48 horas y posteriormente se evaluó la carga parasitaria. Como se observa en la Figura 44B, la carga parasitaria se redujo significativamente en las células J774 en las que se silenció PKR (Figura 44B), indicando que la señalización por PKR activada después de la infección con *L. panamensis* se requiere para la multiplicación del parásito en el macrófago.

Poly(I:C), un clásico activador de PKR (212) y 2-aminopurina (2-AP), un inhibidor farmacológico de PKR (206), también fueron usados para evaluar el papel de PKR en la infección por *Leishmania*. Macrófagos J774 fueron infectados durante 4 horas con promastigotes de *L. panamensis* y posteriormente fueron tratados con 25 µg/ml de Poly(I:C) y 2 mM 2-AP, e incubados por 48 horas (Figura 44C). Los resultados muestran que la Poly(I:C) aumenta el número de parásitos, mientras que el tratamiento con 2-AP reduce la proliferación de *L. panamensis*. Estos datos refuerzan los resultados en donde la activación de PKR promueve un incremento en la proliferación intracelular de estos parásitos en los macrófagos J774.

En vista de que estos datos abren la posibilidad de que un inhibidor de la autofagia o de la activación de PKR podría potenciar la inmunidad del hospedero al servir como adyuvante al tratamiento de la leishmaniasis, se analizó si la wortmanina y la 2-AP potenciaban la acción antiparasitaria de edelfosina observada en esta tesis. Para ello se infectaron macrófagos J774 con promastigotes de *Lp*-GFP durante 4 horas, y posteriormente se realizó una combinación de tratamientos de edelfosina con los inhibidores wortmanina y 2-AP. Los resultados muestran que estos dos inhibidores wortmanina y 2-AP disminuyen la fluorescencia de los macrófagos infectados sin tratar o tratados sólo con edelfosina, indicando que la combinación de edelfosina con wortmanina o 2-AP disminuye significativamente la replicación de *Leishmania* (Figura 45A). Estos resultados sugieren que las vías autofágicas y la PKR pueden constituir nuevas dianas para el control farmacológico de leishmaniasis.

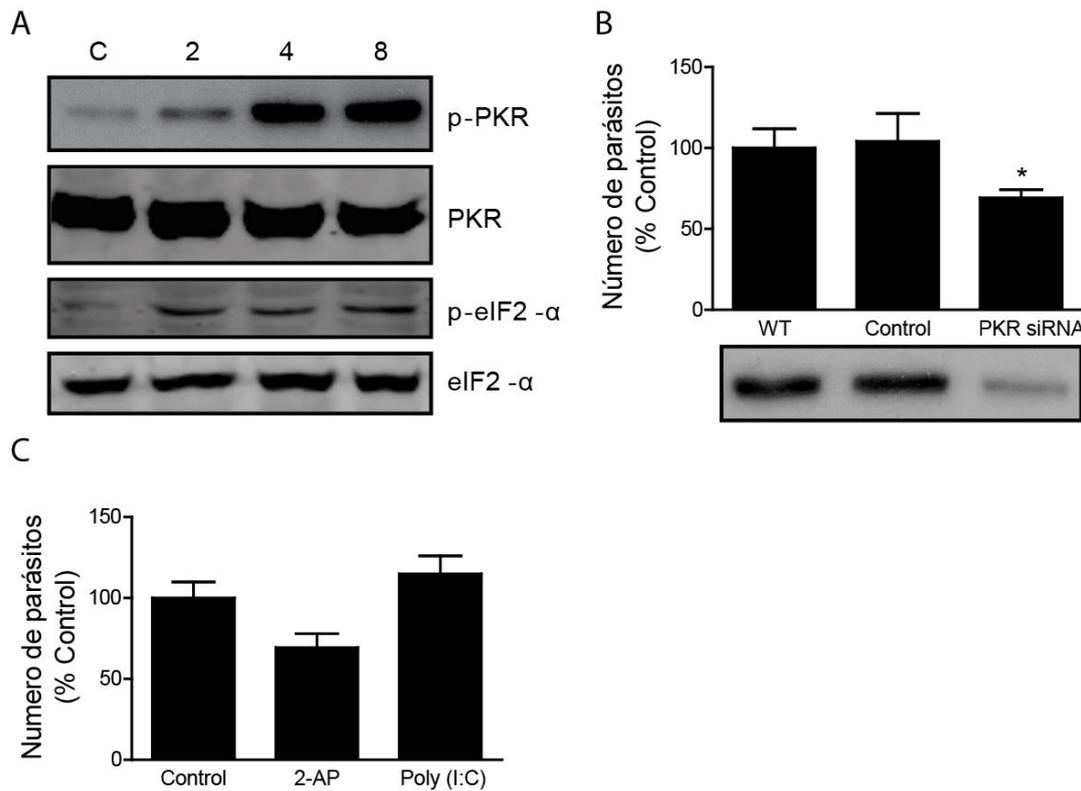


Figura 44. PKR es requerida para la infección por *L. panamensis*. (A) extracto total de proteínas de macrófagos J774 infectados con promastigotes de *L. panamensis* (10:1 parásito/célula) a los tiempos indicados en la gráfica. Se realizó *Western blot* con los anticuerpos específicos para las proteínas PKR y eIF2 α (total y fosforilada). (B) Porcentaje de infección en macrófagos transfectados con PKR siRNA, como control se utilizaron macrófagos sin transfectar y transfectados con el vector vacío. (C) Porcentaje de infección en macrófagos infectados y tratados con 2-AP y Poly(I:C). La gráfica representa la media y D.S. de tres experimentos independientes. (*) $P < 0.05$.

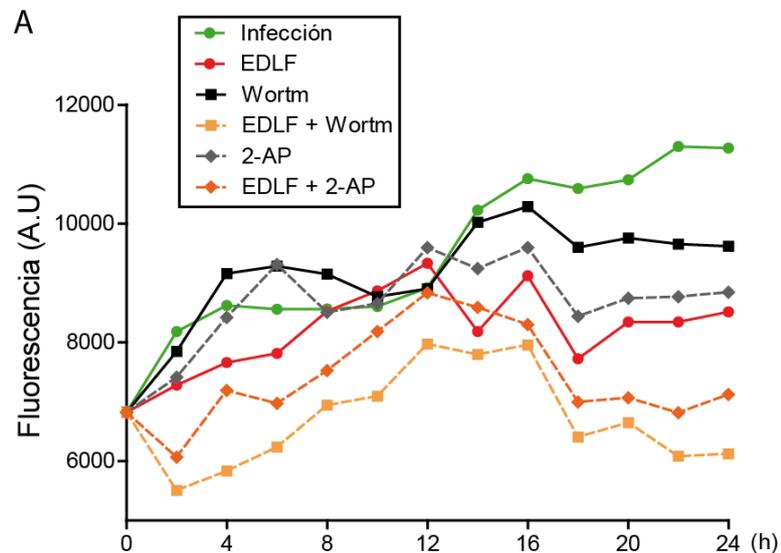


Figura 45. La wortmanina y la 2-AP potencial la actividad leishmanicida de la edelfosina en macrófagos. Los macrófagos fueron infectados con promastigotes de *L. panamensis* (10:1 parásito/célula) durante 4 horas, posteriormente los parásitos libres fueron lavados y los macrófagos fueron cultivados a 34°C con los diferentes tratamientos. Cada dos horas se midió la intensidad media de fluorescencia en el equipo FLUOstar OPTIMA, hasta las 48 horas.

5 Discusión

Nunca en la historia de la humanidad se ha tenido un arsenal tecnológico tan sofisticado para el tratamiento de las enfermedades, sin embargo, todavía existe un vacío para su repercusión en la salud de la población. No obstante, los impresionantes avances científicos de los últimos años, parecen estar iluminando la esperanza para el desarrollo de tratamientos tan necesitados y hasta ahora, tan elusivos. Los datos de la OMS muestran que las enfermedades tropicales olvidadas (NTD, del inglés *Neglected Tropical Diseases*) afectan a 1.000 millones de personas, una sexta parte de la población mundial, produciendo 550.000 muertes al año, y representando uno de los mayores retos que enfrenta la ciencia y la salud pública. Dentro de las NTD, las enfermedades producidas por agentes de la familia *Trypanosomatidae*, y que se concentran principalmente en las regiones rurales más pobres del planeta, son unas de las que poseen índices de mortalidad más altos. *Leishmania*, es la responsable de los distintos tipos de leishmaniasis, las cuales son endémicas en 98 países distribuidos en África, sur de Asia y Latinoamérica. Las terapias actuales para la leishmaniasis están lejos de ser satisfactorias, son escasas, tóxicas, y en su mayoría con décadas de antigüedad, lo que unido a la mala praxis ha originado la aparición de parásitos resistentes, por lo cual es necesario encontrar nuevas dianas y enfoques terapéuticos. La identificación de nuevos agentes requiere la comprensión de la biología del parásito tanto a nivel celular como bioquímico y molecular. Actualmente los avances en genómica y proteómica, unidos a las herramientas bioinformáticas han generado una gran cantidad de información nueva de interés biológico en general.

A pesar de todo esto, la aparición de nuevos fármacos para el tratamiento de las NTD se encuentra prácticamente cerrada. El problema no es por falta de recursos en la investigación básica, que es de alta calidad, sino del proceso de convertir los resultados de estas investigaciones en tratamientos, lo cual es un proceso largo y costoso, que desalienta a las empresas farmacéuticas a invertir en el desarrollo de fármacos para estas enfermedades. En la actualidad, la terapia combinada es una de las soluciones factibles para combatir estas enfermedades, ya que se podría mejorar la eficacia de los fármacos, disminuir su toxicidad, evitar la generación de resistencias y disminuir tiempos

y costos del tratamiento. El principal objetivo de esta tesis se basa en la necesidad de desarrollar nuevos tratamientos seguros, eficaces y económicos contra las distintas formas de leishmaniasis.

5.1 Acción antiparasitaria de alquilfosfolípidos o éter lípidos antitumorales

Los ATLS, principalmente desarrollados como agentes antitumorales, han demostrado tener una potente actividad leishmanicida, sin embargo su mecanismo de acción aún no se entiende por completo (45, 46, 78, 213). Los datos que reportamos en este trabajo indican que los ATLS, y principalmente su prototipo la edelfosina, son una prometedora droga contra parásitos de *Leishmania spp.* y contra células tumorales. Además los resultados aquí mostrados indican que la edelfosina actúa a través de procesos comunes en su acción destructora tanto en los parásitos como en las células tumorales. La edelfosina es un potente agente anti-*Leishmania* tanto en promastigotes como en amastigotes de *Leishmania* induciendo un proceso de apoptosis-like con degradación del ADN. Además, en un modelo *in vivo* en hamster, el tratamiento oral con edelfosina mostró una potente actividad anti- *Leishmania* (49).

En nuestros experimentos encontramos que la edelfosina también puede matar los amastigotes intracelulares sin afectar la célula hospedera. De los resultados obtenidos en esta tesis podemos destacar varias acciones importantes de la edelfosina sobre los macrófagos, tales como:

- a) los MDMO incorporan la edelfosina en grandes cantidades, sin embargo al contrario de las células tumorales, los macrófagos no se mueren
- b) la edelfosina se acumula en los amastigotes de *Leishmania* dentro del macrófago
- c) el tratamiento con edelfosina, *in vitro* e *in vivo*, reduce la capacidad pro-inflamatoria del macrófago

Nuestros datos sobre la incorporación de la edelfosina en macrófagos normales, constituye la primera evidencia de la incorporación de edelfosina por células normales a una concentración similar al rango tóxico para células tumorales. Estos hallazgos son de gran importancia en *Leishmania*, debido a que el macrófago es su principal célula hospedera. Además, la capacidad de edelfosina de disminuir la respuesta inflamatoria (166) es de gran relevancia en las infecciones por *Leishmania*, ya que gran parte de la

destrucción del tejido en la leishmaniasis es debido a la severa respuesta inflamatoria en el sitio de la infección (214). En este sentido, existen evidencias donde se ha indicado *in vitro* e *in vivo* que la edelfosina posee propiedades anti-inflamatorias, mediadas probablemente a través de su efecto sobre la molécula de adhesión L-selectina de los neutrófilos, evitando así la extravasación del neutrófilo (166).

Los parásitos protozoos son de gran interés desde el punto de vista de la biología celular, ya que poseen estructuras y orgánulos citoplasmáticos especiales (99). Diferentes estudios han mostrado que existen vías metabólicas únicas en estos orgánulos abriendo así nuevas posibilidades para la identificación de nuevas dianas farmacológicas (99). Uno de los orgánulos más fascinantes y de vital importancia para la supervivencia de *Leishmania* es su mitocondria, siendo ésta el blanco de varios fármacos (99). En este trabajo hemos decidido conocer el papel de la mitocondria en la muerte inducida por edelfosina, ya que en la última década se ha dado un gran impulso en la investigación mitocondrial debido a la diversidad de hallazgos en su estructura y función tanto en protozoos como en células tumorales de mamíferos (99). En nuestros experimentos hemos encontrado que la edelfosina se acumula en la mitocondria tanto de parásitos de *Leishmania* como en células tumorales, lo que conlleva a la pérdida del $\Delta\psi_m$. Estos resultados coinciden con varios estudios en donde se muestra la localización de diferentes análogos fluorescentes de la edelfosina en la mitocondria de células tumorales (93, 215). Evaluando el ADN hemos visto que la edelfosina primero induce fragmentación del ADN del kinetoplasto a las 3 horas de tratamiento, seguido por la fragmentación del ADN nuclear, que comienza después de las 6 horas de tratamiento, lo cual sugiere una fuerte participación de la mitocondria en la actividad leishmanicida de la edelfosina. Estos datos, coinciden con resultados anteriores donde inhibidores de la pérdida del $\Delta\psi_m$, como la CsA ó la sobre-expresión de Bcl-X_L o Bcl-2, bloquean la muerte inducida por edelfosina en *Leishmania* y en células tumorales (146, 147, 160, 164). Además, los datos aquí reportados indican que la generación de ROS participa en la muerte inducida por edelfosina. Este éter lípido causa un gran aumento en la producción de ROS, pero el tratamiento con los antioxidantes NAC y GSH no solo bloqueó la producción de ROS, sino que también inhibió la pérdida del $\Delta\psi_m$ y la fragmentación del ADN, convirtiendo a ROS como una señal necesaria para la muerte inducida por edelfosina. NAC y GSH son antioxidantes ampliamente usados a nivel celular. Ambos

fortalecen el sistema redox de la célula por lo menos en dos formas: la primera, involucra el aumento directo de los niveles de tioles; y la segunda, se basa en su capacidad para neutralizar el anión superóxido, ya que son capaces de reaccionar directamente con este radical. Como ya hemos mencionado, el sistema redox de *Leishmania* es diferente al de mamíferos, ya que no basa el control del estrés oxidativo en el GSH, sino en el tripanotión. Los antioxidantes arriba mencionados pueden afectar a la vía del tripanotión, incrementando los niveles de este tiol intracelular.

Por otra parte, analizando la influencia de la edelfosina sobre el metabolismo energético de *Leishmania*, hemos encontrado que este éter lípido induce una caída rápida de los niveles de ATP libre en el parásito. Esta disminución puede deberse bien a un efecto del éter lípido a nivel de la síntesis de ATP, o a una salida del ATP del parásito debido a una alteración de la membrana plasmática. Para evaluar el efecto de este compuesto en la membrana plasmática hemos utilizado la sonda fluorescente SYTOX Green que requiere de lesiones grandes de la membrana plasmática para poder atravesarla y unirse a los ácidos nucleicos intracelulares. El resultado mostró que no hay acumulación de la sonda en los parásitos superior al 10 % después del tratamiento con edelfosina, descartando que el mecanismo de acción de este compuesto involucre daños en la membrana plasmática, sugiriendo que esto pueda deberse a un efecto sobre la síntesis de ATP.

En diversos sistemas biológicos, se ha descrito que el mayor productor del radical superóxido es la mitocondria como consecuencia del transporte de electrones. En los mamíferos se conoce como mayores productores de superóxido a los complejos mitocondriales I y III. En *Leishmania*, la participación de los diferentes complejos en la formación de este radical es desconocida. Sin embargo, *Leishmania* se clasifica dentro del grupo de tripanosomátidos, donde la producción de ATP se da principalmente por la fosforilación oxidativa. En vista de que una de las causas de la producción de ROS mitocondrial es la disfunción de la cadena respiratoria (98), nosotros quisimos explorar la procedencia de los ROS. Con el fin de conocer si la cadena respiratoria mitocondrial influía en la generación de ROS y en la inducción de la muerte por edelfosina, en este trabajo hemos utilizado los siguientes inhibidores de la cadena respiratoria: rotenona (inhibidor del complejo I), malonato (inhibidor del complejo II), antimicina A (inhibidor del complejo III), azida (inhibidor del complejo IV), y CCCP, un desacoplante de la

fosforilación oxidativa (97). Nuestros resultados muestran que el uso del inhibidor del complejo I (rotenona) induce un aumento en la producción de superóxido, lo que coincide con algunos estudios previos, donde el uso de este inhibidor en *Leishmania* lleva a la hiperpolarización mitocondrial (98), efecto contrario al esperado en los sistemas respiratorios de metazoos y que concuerda con la existencia de un complejo I atípico en parásitos, ya mencionado en esta tesis. Los inhibidores arriba indicados no afectaron ni a la producción de ROS inducida por edelfosina, ni a la pérdida del $\Delta\psi_m$ y la subsecuente activación de la vía apoptótica mitocondrial. Estos resultados sugieren que la cadena respiratoria no participa en la generación de ROS y no tiene un papel importante en la muerte inducida por edelfosina. Estos datos coinciden con otros estudios donde se mostró que la cadena respiratoria no se requiere durante la apoptosis en levaduras y en algunas células de mamífero (216). Sin embargo, caso contrario ocurrió con la oligomicina, un inhibidor del complejo V de la cadena respiratoria. La oligomicina inhibe la subunidad F_0 de la proteína mitocondrial F_0F_1 -ATP sintasa (complejo V), lo cual no solo evitó la producción de ROS, sino que también inhibió la pérdida $\Delta\psi_m$ y la fragmentación del ADN inducida por edelfosina tanto en *Leishmania* como en células tumorales. En *Leishmania*, se ha demostrado la existencia de la F_0F_1 -ATP sintasa sensible a la oligomicina y responsable de la fosforilación oxidativa (123). La F_0F_1 -ATP sintasa en *Leishmania spp.* consta de dos componentes oligómeros F_0 y F_1 . F_0 es una proteína integral de membrana que contiene el canal de protones y comprende algunas subunidades codificadas por el ADN nuclear y dos subunidades codificadas por el ADNm (217). F_1 es una proteína de membrana periférica que contiene los sitios activos de ATP sintasa, y se compone de 5 subunidades (α_3 , β_3 , γ , δ , ϵ) (217). En *Leishmania*, la síntesis de ATP requiere la participación tanto de la F_0 como de la F_1 . Con el fin de conocer más a fondo el papel de la F_0F_1 -ATP sintasa, hemos evaluado los efectos de la oligomicina, inhibidor de la subunidad F_0 . La oligomicina inhibe todos los efectos apoptóticos inducidos por la edelfosina, indicando que la subunidad F_0 es requerida para la acción pro-apoptótica de la edelfosina. Estos hallazgos dan un papel relevante a la F_0F_1 -ATP sintasa en la inducción de apoptosis en ambos sistemas biológicos, señalando a esta enzima como un importante blanco terapéutico en el tratamiento de la leishmaniasis y el cáncer.

Como ya hemos mencionado la respiración mitocondrial se da a través de la ETC, la cual contiene cinco complejos situados en la membrana mitocondrial interna. La F_0F_1 -ATP sintasa, el complejo V de la cadena respiratoria, es la responsable de la fosforilación oxidativa, la cual es el último paso de la ETC. La F_0F_1 -ATP sintasa puede catalizar tanto la síntesis como la hidrólisis de ATP. Cuando hay gradiente de protones, la enzima cataliza la síntesis de ATP, y cuando no hay gradiente muestra la actividad de la F_0F_1 -ATP sintasa. El mecanismo por el cual la F_0F_1 -ATP sintasa contribuye a la muerte inducida por edelfosina aún es desconocido. Esta enzima reside en la membrana mitocondrial interna y puede bombear protones en ambas direcciones, ella transporta protones al interior de la matriz mitocondrial a partir de un gradiente de protones generado durante la ETC y produce ATP, o puede bombear protones de la matriz mitocondrial hacia fuera consumiendo ATP. Debido a que la edelfosina afecta la organización lipídica, haciendo las membranas más fluidas (190), podemos sugerir que la edelfosina hace la membrana externa mitocondrial más porosa, causando una disipación más rápida del gradiente de protones que de costumbre a través de la fuga de iones H^+ desde el espacio intermembranal al citosol. Como consecuencia, la F_0F_1 -ATP sintasa podría actuar en forma inversa, gastando ATP y causando alcalinización de la matriz por extrusión de protones. Se ha demostrado que la alcalinización de la matriz lleva a la apertura del poro de permeabilidad mitocondrial (218), lo que podría indicar que la F_0F_1 -ATP sintasa puede facilitar la muerte por este mecanismo. Este mismo proceso ha sido propuesto para el efecto de la oligomicina en la inhibición de la apoptosis inducida por Bax en levaduras y células de mamíferos (216).

Por otra parte, se ha reportado que la edelfosina actúa sobre los lípidos *rafts* en células leucémicas humanas (10, 85-88, 147) y las recientes evidencias sugieren una conexión entre la membrana celular y la mitocondria en la acción citotóxica de la edelfosina (87, 93). En este trabajo, hemos encontrado la participación de los lípidos *rafts* en la actividad leishmanicida de la edelfosina. Además, el tratamiento con el éter lípido llevó a un reclutamiento de la proteína mitocondrial F_0F_1 -ATP sintasa dentro de estos microdominios tanto en promastigotes de *Leishmania* como en células tumorales. Estos resultados concuerdan con la identificación de los lípidos *rafts* en parásitos de *Leishmania* (95, 96), y con la reducción de la acción de la miltefosina contra *L. donovani* por la depleción de los esteroides de membrana (219).

Estos hallazgos indican que la actividad leishmanicida y antitumoral de la edelfosina poseen mecanismos moleculares similares, donde están principalmente involucrados la mitocondria y los lípidos *rafts*. Por lo tanto, nuestros estudios permiten dar una explicación molecular de como un compuesto antitumoral como la edelfosina actúa como un agente antiparasitario. Nuestros datos resaltan el papel de la F₀F₁-ATP sintasa en la muerte inducida por edelfosina tanto en *Leishmania* como en células tumorales, y su reclutamiento en los lípidos *rafts* sugiere que esta enzima actúa como un enlace entre los procesos que ocurren tanto en la membrana *rafts* como en la mitocondria. Aquí también resaltamos que los lípidos *rafts* y la mitocondria actúan como mediadores importantes en la regulación de la muerte celular, lo que los convierte en dianas para intervenciones terapéuticas en leishmaniasis y en cáncer, abriendo nuevas vías para el tratamiento de estas enfermedades.

5.2 Acción de episulosina en promastigotes de *L. panamensis*

Como es bien sabido, el océano cubre el 70% de la superficie del planeta y la biodiversidad en su seno es muy superior a la existente en la tierra, estimándose que contiene un gran porcentaje de la biosfera. Pese a ello, los océanos están todavía casi inexplorados desde el punto de vista de la búsqueda de nuevos compuestos químicos, y actualmente se conocen solamente unos 11.000 compuestos marinos frente a unos 155.000 de origen terrestre. Estos productos naturales de origen marino poseen con frecuencia estructuras y mecanismos de acción biológica originales, que los hacen sumamente interesantes como modelos para la búsqueda de nuevos fármacos.

El aislamiento de nuevas moléculas de fuentes naturales que poseen actividad anti-proliferativa abre la posibilidad a estos compuestos de ser una ayuda terapéutica para el tratamiento de enfermedades, ya sea por su acción directa o por ser fuente de nuevas estructuras. Además, estos compuestos pueden ayudar a caracterizar nuevas rutas citotóxicas. Compuestos con base esfingoide se han descrito con una potente actividad anti-proliferativa en muchas líneas celulares (220). El compuesto denominado episulosina (ES-285) fue purificado de la almeja *Mactromeris polynima* del ártico norte, cuya estructura es 2S,3R-2-amino-3-octanodecanol (199), compartiendo algunas analogías con la esfingosina y otros lípidos bioactivos. Dado que episulosina (ES-285) es capaz de inducir muerte celular en diversas células tumorales (197-199, 221), y

siguiendo la filosofía abordada en el capítulo anterior, en la que se analizaba si ciertos antitumorales podían presentar actividad leishmanicida, estudiamos la posible acción antiparasitaria de dicho análogo de la esfingosina. De esta forma, hemos incorporado el ES-285 en nuestros estudios, con el fin de evaluar su posible actividad leishmanicida y de discernir el mecanismo por el cual esta molécula actúa, lo que podría proporcionar información de gran utilidad para una futura aplicación clínica de este tipo de drogas en la leishmaniasis.

Los datos descritos en este trabajo demuestran que el ES-285 tiene una potente actividad leishmanicida en promastigotes de *Leishmania spp.*, tanto en una cepa causante de leishmaniasis cutánea (*L. panamensis*; IC₅₀, 630 nM) como en una causante de leishmaniasis visceral (*L. infantum*; IC₅₀, 600 nM). Los resultados aquí descritos constituyen el primer estudio conocido donde se demuestra la actividad antileishmania de ES-285. Los cambios morfológicos observados, como redondeamiento de los parásitos y acortamiento del flagelo, se observaron desde las primeras horas de tratamiento. Además, en el análisis por citometría de flujo se ha comprobado que aquellos parásitos que permitían la entrada del IP eran aquellos que perdían volumen celular. La entrada del IP podría deberse a la pérdida del potencial de membrana plasmática o a la apertura de poros que permiten la entrada de este colorante.

La degradación del ADN es una característica evidenciada en *Leishmania* ante prácticamente todos los estímulos de muerte estudiados hasta el momento, incluyendo a inductores de muerte que en células eucariotas superiores llevan a una muerte por necrosis, como lo son dosis milimolares de H₂O₂ o daños estructurales en la membrana plasmática como los que genera la anfotericina B (105). En este trabajo hemos observado que después de 6 horas de tratamiento, el ES-285 causa degradación de ADN, observada por el incremento de una población de parásitos hipodipliodes (población Sub-G1). Los resultados descritos en esta tesis indican que la degradación de ADN iniciada por el ES-285 acontece después del incremento de la permeabilidad de la membrana plasmática. La inducción de una respuesta apoptótica-*like* por el ES-285 en *L. panamensis* podría sugerir que este compuesto puede constituir una alternativa terapéutica contra estas infecciones. Por lo tanto es importante conocer como esta molécula actúa, ya que puede brindarnos información valiosa para una futura aplicación clínica de este tipo de compuestos.

Los parásitos protozoos como *Leishmania*, a diferencia de la gran mayoría de los organismos, tienen una sola mitocondria, por lo cual el buen funcionamiento de esta organela es vital para la supervivencia de este parásito (117). La mitocondria es el sitio donde se localiza la cadena respiratoria; además, es el lugar donde se genera la mayoría del ATP para mantener la viabilidad celular. Así mismo, mantener apropiadamente el $\Delta\psi_m$ es esencial para la supervivencia celular, por lo cual su estudio y su relación con la muerte celular es de gran interés. En este trabajo hemos observado varios eventos desencadenados por el ES-285 a nivel mitocondrial, los cuales pueden ser claves para la muerte de los promastigotes de *L. panamensis*. El ES-285 causa una pérdida temprana del $\Delta\psi_m$, producción de radicales libres y una caída en el ATP citoplasmático. Muchos estudios indican que el poro de permeabilidad transitoria (PPT) tiene un papel importante en la regulación de la actividad mitocondrial, siendo su apertura y el reequilibrio de iones entre la matriz mitocondrial y el espacio inter-membrana los responsables de la pérdida del $\Delta\psi_m$ (107, 186). En muchos modelos celulares, la inhibición de la apertura del PTP con CsA tiene un efecto protector en las células, impidiendo la salida de posibles factores pro-muerte de la mitocondria. En nuestro trabajo encontramos que el pretratamiento con CsA de promastigotes de *L. panamensis* fue capaz de inhibir no solo la pérdida del $\Delta\psi_m$, sino también la aparición de parásitos hipodiploides después del tratamiento con ES-285. En consecuencia, la apertura del PPT, está involucrada en la muerte inducida por el ES-285. Esta observación, coincide con los modelos vigentes de muerte apoptótica, donde se indica que la apertura del PPT de la mitocondria es la responsable de la pérdida del gradiente electroquímico.

Por otra parte, los resultados obtenidos en esta tesis podrían sugerir que tanto el radical anión superóxido como el Ca^{+2} podrían estar participando activamente en el proceso de despolarización arriba indicado, como consecuencia del daño estructural en el PPT, que de esta manera quedaría abierto de forma permanente, permitiendo el tráfico de iones y de proteínas. Otra característica observada durante las primeras horas de incubación de los parásitos con el ES-285 fue una gran producción de ROS, los cuales aumentan progresivamente durante el tratamiento, lo que indicaría que la célula estaría sufriendo un estrés oxidativo.

El empleo de antioxidantes permitió evaluar la relevancia de la generación de ROS en la toxicidad celular. La inhibición de estrés oxidativo, mediante antioxidantes como el NAC y GSH, evitó la toxicidad inducida por ES-285, lo que indica que el estrés oxidativo es un importante, aunque probablemente no exclusivo, factor determinante en la acción citotóxica del ES-285. NAC y el GSH son antioxidantes ampliamente usados a nivel celular. Como se ha indicado en el capítulo anterior, ambos fortalecen el sistema redox de la célula por lo menos en dos formas: la primera, involucra el aumento directo de los niveles de tioles; y la segunda, se basa en su capacidad para neutralizar el anión superóxido, ya que son capaces de reaccionar directamente con este radical. Como ya lo hemos mencionado, el sistema redox de *Leishmania* difiere del de mamíferos, ya que no basa el control del estrés oxidativo en el GSH, sino en el tripanotión, y estos antioxidantes pueden entrar en la vía del tripanotión, incrementando los niveles de este tiol intracelular.

La alteración del $\Delta\psi_m$ y el aumento en los niveles de ROS son característicos dentro de una cascada de eventos que se producen cuando se desencadena un proceso de muerte apoptótica. La alteración de la homeostasis del calcio es otro evento típico dentro de esta cascada y a su vez está íntimamente ligada a la generación de ROS y a la disfunción mitocondrial (118). Esto nos llevó a estudiar el efecto del ES-285 en los niveles de Ca^{2+} citosólico en promastigotes de *Leishmania*. El aumento en los niveles de Ca^{2+} citosólico, debido a un incremento tanto del influjo de Ca^{2+} extracelular como a la liberación de Ca^{2+} al citosol a partir de reservorios intracelulares, principalmente retículo endoplásmico, acidocalcisomas y mitocondria (222), puede ser letal para la célula. En este trabajo comprobamos que el ES-285 induce un aumento en los niveles de Ca^{2+} citosólico desde los primeros minutos de tratamiento. El uso de quelantes de Ca^{2+} , Bapta-AM (quelantes del calcio intracelular) y EGTA en el medio (quelante de Ca^{2+} extracelular), nos permitió discriminar la procedencia del Ca^{2+} . Nuestros resultados mostraron que los parásitos captan Ca^{2+} del medio extracelular dado que la suplementación del cultivo con EGTA redujo el aumento de los niveles de Ca^{2+} inducidos por el ES-285. De la misma forma, la suplementación con EGTA redujo la mortalidad de los parásitos después del tratamiento con ES-285, por lo tanto, el mecanismo molecular de muerte inducido por ES-285 puede implicar un daño en los canales de Ca^{2+} , que conlleve al aumento del Ca^{2+} intracelular.

En estudios sobre los mecanismos de acción de varios compuestos con actividad leishmanicida, se ha descrito anteriormente que estos tres eventos: alteración del $\Delta\Psi_m$, ROS y Ca^{2+} citosólico, pueden suceder en diferente orden (122, 187, 223); por lo que hacen falta experimentos adicionales para evaluar como cada uno de ellos influye en la aparición de los otros. En *Leishmania* se ha descrito que la aparición de estos tres eventos moleculares es un indicador de la activación en el parásito de un proceso de muerte similar a la apoptosis (98, 122). Además, uno de los procesos observados en un proceso apoptótico es la degradación de la cromatina, reflejada en el aumento de células hipodiploides. Esto sumado al estudio del $\Delta\Psi_m$, ROS y Ca^{2+} citosólico, nos permite concluir que el ES-285 induce muerte en *Leishmania* mediante un proceso similar a la apoptosis.

Analizando la influencia del ES-285 sobre el metabolismo energético de *Leishmania*, hemos encontrado una rápida caída de los niveles de ATP libre en el parásito. Como lo hemos mencionado anteriormente, una disminución del ATP celular puede ser debido a la inhibición de la síntesis de ATP, o pérdida del ATP dentro del parásito por la existencia de poros en la membrana plasmática.

Como se indicó en el capítulo anterior, se ha visto que el mayor productor del radical superóxido es la mitocondria como consecuencia del transporte de electrones. En los mamíferos se conoce como mayores productores de superóxido a los complejos mitocondriales I y III, mientras que en *Leishmania* la participación de los diferentes complejos en la formación de este radical es desconocida. Sin embargo, *Leishmania* se clasifica dentro del grupo de tripanosomátidos donde la producción de ATP se da principalmente por la fosforilación oxidativa. Nuestros resultados muestran que el uso del inhibidor del complejo I (rotenona) induce un aumento de la producción de anión superóxido, esto coincide con algunos estudios donde el uso de este inhibidor en *Leishmania* lleva a la hiperpolarización mitocondrial (98), efecto contrario al esperado en los sistemas respiratorios de metazoos y que concuerda con la existencia de un complejo I atípico en parásitos, ya mencionado en esta tesis. El uso del inhibidor del complejo II (malonato), reduce de manera significativa la producción de este radical inducida por el ES-285, lo que nos lleva a concluir que su producción es de origen mitocondrial, implicando específicamente al complejo II mitocondrial. En *Leishmania*, quienes aportan electrones a la ubiquinona para que esta los traslade al complejo III, son; el complejo II

quien utiliza el succinato como sustrato y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa dependiente de FAD⁺ (FAD-GPDH) cuyo sustrato es el α -glicerofosfato. Cabe indicar que el complejo II ya se ha descrito anteriormente como blanco de acción de otros compuestos leishmanicidas como son la fenil fenalenonas, bifosfonato derivado de benzofenona, y tenoil-trifluoro-acetona (98, 159, 224). Igualmente observamos, que al igual que el bloqueo del aumento del Ca²⁺ citosólico, la inhibición del complejo II con el malonato reduce significativamente la muerte inducida por ES-285. Es de resaltar que al igual que con los antioxidantes y con los quelantes de Ca²⁺, la inhibición de estrés oxidativo correlaciona muy bien con la inhibición de la toxicidad celular, confirmando que los ROS median la toxicidad del ES-285.

La bioactividad del ES-285 puede ser debida a su similitud con la esfingosina. Este podría competir con la esfingosina para los sitios de unión o afectar a la formación de esfingolípidos tales como esfingomielinas, ceramidas o gangliósidos. En cualquier caso, el ES-285 puede afectar a funciones celulares controladas por estos compuestos. Los esfingolípidos y sus derivados, como la ceramida, la esfingosina y sus derivados fosforilados, ceramida-1-fosfato y S1P, están implicados en la regulación del crecimiento y la diferenciación celular, además regulan la homeostasis del Ca²⁺ intracelular.

Es de particular importancia en la biología de los esfingolípidos las funciones antagónicas que ejercen la ceramida y la esfingosina por un lado y la S1P por el otro. Los dos primeros median la muerte celular, mientras que la S1P promueve supervivencia y proliferación celular, inhibiendo la muerte celular. Esto da origen al llamado reóstato esfingolípido el cual propone que los niveles relativos de estos lípidos son determinantes en el destino celular (203). De esta manera, la regulación de los niveles de S1P, esfingosina y ceramina es crucial para la decisión de morir o sobrevivir de la célula. Una de las enzimas claves en convertir la esfingosina en S1P es la esfingosina quinasa (SK). La SK fosforila esfingosina para dar S1P, consecuentemente es una reguladora crucial del balance ceramida-esfingosina/S1P (225). Este hecho convierte a la SK en una enzima clave del metabolismo de los esfingolípidos. Al cumplir una función dual modulando los niveles de ceramida y S1P, no sólo produce un mensajero pro-proliferativo, anti-apoptótico, S1P, sino que disminuye los niveles intracelulares de los mensajeros pro-apoptóticos ceramida y esfingosina. Por lo tanto su inhibición está asociada al aumento de los niveles de ceramida o esfingosina, ambos mediadores esfingolípídicos que

inducen la vía mitocondrial de apoptosis (226, 227). Durante las últimas décadas diversos compuestos farmacológicos que inhiben a la SK han sido sintetizados o aislados de fuentes naturales, principalmente de hongos; siendo los derivados de la esfingosina los más utilizados. Nuestros resultados mostraron inhibición de la actividad SK en promastigotes de *L. panamensis* desde las primeras horas del tratamiento con ES-285. Estos resultados podrían sugerir que ES-285 puede estar induciendo muerte celular a través de la inhibición del paso de esfingosina a S1P, conduciendo a una acumulación de esfingosina y ceramida. Así, esta enzima podría ser una diana terapéutica para encontrar nuevas terapias antiparasitarias. La SK ha sido considerada recientemente como una diana terapéutica en el tratamiento del cáncer (228, 229). De esta forma, la inhibición de SK observada en este trabajo podría representar una nueva y prometedora estrategia contra la leishmaniasis.

Cabe destacar que en *Leishmania* se han reportado varios esfingolípidos, dentro de los cuales el más predominante es el inositolfosforil ceramida. Esto sugiere la existencia de una vía completa y funcional de esfingolípidos en *Leishmania*. Así mismo, se ha descrito la expresión de varios genes de la vía de la síntesis de novó de esfingolípidos, como la palmitoil tranferasa (SPT1/SPT2), ceramida sintasa (LAG/CERS) e inositolfosforil ceramida sintasa (IPCS1) (230), así como de la vía degradativa, como la esfingosina quinasa 1-P liasa (SPL), y se ha observado que *Leishmania* codifica otros homólogos como la IPC fosfolipasa C ISC1 (Lmj08.0200) y esfingosina kinasa (LmjF26.0710).

Además, en este trabajo también demostramos que el ES-285 inhibe el crecimiento de parásitos al interior del macrófago, a concentraciones no letales para estos últimos. Los resultados presentados en esta tesis sugieren que el ES-285 puede representar una alternativa efectiva para el tratamiento de la *leishmaniasis*.

5.3 Interacción hospedero-parásito y su implicación en el tratamiento farmacológico de leishmaniasis.

La interacción hospedero-parásito se establece mediante un sistema complejo que permite la eliminación del parásito o su perpetuación en el hospedero. Esta relación depende del parásito y sus mecanismos de evasión ante la defensa del hospedero y de la respuesta del organismo parasitado frente a la agresión. En los mamíferos, el sistema

inmune provee protección por dos mecanismos que se correlacionan: la inmunidad innata y la adaptativa. La inmunidad innata es la primera línea de defensa contra microorganismos invasores, la cual está mediada por macrófagos, células dendríticas y neutrófilos. En *Leishmania* los macrófagos son su principal célula hospedera, siendo indispensables para la supervivencia, replicación y diferenciación del parásito. Después de la infección inicial, tanto los neutrófilos como los macrófagos son reclutados al sitio de infección y su interacción con los parásitos influye significativamente en el desarrollo de la infección (35).

Muchos microorganismos intracelulares tienen la capacidad inhibir la muerte apoptótica, entre estos microorganismos cabe citar a *Chlamydia trachomatis* (231), *Escherichia Coli* (232), *Mycobacterium tuberculosis* (233), *Toxoplasma gondii* (234), *Plasmodium berghei* (235). Aunque la importancia de este fenómeno es muy especulativa, el hecho de que muchos microorganismos proporcionen esta propiedad a su célula hospedera sugiere que puede responder a un hecho con importancia evolutiva. En este trabajo hemos observado que *L. panamensis* inhibe la muerte de su célula hospedera, ya sea en el macrófago, donde inhibió tanto la apoptosis inducida por falta de nutrientes en el medio, como también en el neutrófilo al que aumento su vida media, la cual en condiciones normales sin infección es muy corta sufriendo apoptosis espontánea a las pocas horas de incubación *in vitro*. Además, la infección por *Leishmania* inhibió la apoptosis de macrófagos inducida por el tratamiento con actinomicina D. En este trabajo se evaluó la muerte celular a través del contenido de ADN por citometría de flujo con IP y a través de la pérdida del $\Delta\Psi_m$. Además, hemos evaluado la actividad caspasa después de la incubación con actinomicina D, evaluando las caspasas 3, 8 y 9 por colorimetría y las caspasas 3 y 7 por *Western blot*, observándose que la actinomicina D induce actividad caspasa. En contraste, cuando los macrófagos se infectaron con promastigotes de *L. panamensis*, la actividad caspasa disminuye, tanto determinada por densitometría como por *Western blot*.

Estos resultados coinciden con observaciones previas, en las cuales la infección con promastigotes de *L. major*, *L. donovani* o *L. amazonensis* inhibe la apoptosis en macrófagos y otras células hospederas (131-133, 207, 236). La infección con promastigotes de *L. major* inhibe la apoptosis espontánea de los neutrófilos (207), y la infección con promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* inhibe la apoptosis de células

dendríticas (135, 136). Se sabe que los neutrófilos son reclutados al sitio de la infección y estos son muy eficientes para internalizar parásitos. Como los neutrófilos son fagocitos de vida corta, se cree que estos sirven como hospederos intermediarios, comportándose como *Caballos de Troya*, ya que son usados por los parásitos para entrar de forma silenciosa en los macrófagos, evitando así la activación de estos (35). La célula dendrítica, otra célula que hospeda *Leishmania*, es requerida para la persistencia y propagación de estos parásitos, por lo que la inhibición de apoptosis en estas células tiene importantes implicaciones para la patogénesis de estos parásitos.

Los microorganismos intracelulares poseen una gran cantidad de estrategias para asegurar su supervivencia. Sin embargo, la inhibición de la apoptosis parece ser un mecanismo común en bacterias, virus y parásitos intracelulares obligados. Su completa dependencia de metabolismo de su célula huésped para su propagación les ha obligado a desarrollar estrategias con el fin de bloquear el suicidio de su célula hospedera y así asegurar el suministro continuo de nutrientes. El mecanismo por el cual estos microorganismos proporcionan dichas protecciones es motivo de muchas investigaciones, pero cada organismo intracelular posee características especiales en la interacción con su célula hospedera, por lo cual cada uno puede poseer un mecanismo diferente para proporcionar esta resistencia a la apoptosis. Las diferencias moleculares de la apoptosis espontánea y la apoptosis inducida dan a entender que estos agentes infecciosos pueden utilizar más de un mecanismo para lograr inhibir la muerte de su célula huésped. Se ha publicado que *Leishmania* inhibe la maquinaria apoptótica de su célula hospedera a través del mayor componente de su superficie, el LPG (130). Sin embargo, recientemente se ha sugerido que todos los fosfoglicanos y no solo el LPG son los responsables de la inhibición de la apoptosis (134).

En macrófagos se ha descrito que la activación de la ruta de señalización PI3K/Akt es una vía importante utilizada por los parásitos para asegurar la supervivencia prolongada de su célula huésped (132). Aunque la infección con *Leishmania* lleva a la activación de varias vías inhibitorias de apoptosis en macrófagos, como NF- κ B, p38 MAPK y PI3K, sólo la activación de PI3K es necesaria para la inhibición de la apoptosis mediada por *L. major* (132). Es conocida la gran relación que hay entre la vía de señalización PI3K/Akt y la prevención de la fragmentación del ADN. Esta vía no solo regula eventos inflamatorios, como la producción de citoquinas, sino que también puede inducir proteínas anti-

apoptóticas tales como Bcl-X_L, o regular la actividad de las moléculas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, que tienen un papel importante en la liberación del citocromo c de la mitocondria (237, 238).

La infección en *Leishmania* también inhibe en el macrófago la quinasa mTOR, conduciendo a una inhibición de la traducción en la célula hospedera (239). Además de su papel en el control de la traducción de proteínas, mTOR está asociada con la regulación de la autofagia y dependiendo del tipo celular también se asocia con acciones anti y pro-apoptóticas. Como la inhibición de mTOR es un estímulo autofágico bien conocido, y dado que la autofagia en muchos casos es una respuesta de estrés que evita la muerte celular, es posible que la inducción de autofagia en la célula infectada con *Leishmania* (142) sea el resultado de la inhibición de mTOR, representando así una estrategia anti-apoptótica alternativa; si bien esto aún no se ha comprobado formalmente. Recientemente, se ha descrito que la autofagia tiene un papel muy importante en los mecanismos de inmunidad innata (138, 240).

Es claro que la autofagia es un proceso fundamental en la regulación de patógenos intracelulares, sin embargo la relación entre los patógenos y la autofagia es demasiado compleja. Ejemplo de ello es la inducción de autofagia por parásitos intracelulares como *T. gondii* (128), virus como hepatitis C (241, 242) y bacterias como *Coxiella* (243), que puede ser necesaria para establecer su infección.

En este trabajo demostramos que la infección con *L. panamensis* induce autofagia en macrófagos J774. Un incremento en la tinción con MDC por microscopía de fluorescencia y en la proteína LC3B-II por *western blot* fue detectado en cultivos celulares después de pocas horas de infección con *L. panamensis*. Estos métodos son ampliamente usados para evaluar autofagia en diferentes tipos celulares (127). La proteína LC3B existe en dos formas, como una proteína citosólica sin procesar (LC3B-I) y después de la inducción de autofagia, como una proteína con modificación lipídica unida a membrana (LC3B-II) (127). Los anticuerpos anti-LC3B-II por inmunoblot ha sido usados para demostrar autofagia en diferentes cultivos celulares, por ejemplo en células tumorales (244, 245), en macrófagos infectados con *Helicobacter pylori* (246), y células HeLa infectadas con *T. gondii* (128). En *Leishmania*, se desconoce si la autofagia en los macrófagos es un mecanismo de defensa contra *Leishmania* o por el contrario tiene una acción patogénica.

En *Leishmania* se ha descrito anteriormente que la inducción de la maquinaria autofágica en macrófagos con rapamicina aumenta la carga parasitaria de *L. amazonensis* (141), pero sin demostrar si existía activación de autofagia después de la infección con *Leishmania*. Posteriormente se reportó un caso clínico donde se detectó autofagia en médula ósea de un paciente con leishmaniasis visceral por *L. donovani*, en el que después del tratamiento se evidenció desaparición de las células autofágicas (142), convirtiéndose en el primer trabajo de la inducción de autofagia durante la infección natural por *Leishmania*. Recientemente, Cyrino *et al.* (127) demostraron que la infección con *L. amazonensis* induce autofagia en un cultivo de macrófagos. Usando *western blot*, detectaron la proteína LC3B-II en un cultivo *in vitro* de macrófagos con un alto índice de infección. Estos macrófagos fueron observados por microscopía electrónica, detectándose estructuras típicas de autofagosomas. El incremento en autofagia también se vió apoyado mediante el uso de Lysotraker. Por otra parte, este grupo de investigación también observó la proteína LC3B-II en lesiones de ratones BALB/c (141). Además, el uso de inhibidores de la autofagia, como 3-metiladenina y wortmanina, redujo el índice de infección, mientras que inductores, como la rapamicina, no alteró la tasa de infección en macrófagos cultivados (141). En esta tesis, nosotros también encontramos que el pre-tratamiento de macrófagos con wortmanina disminuye el índice de infección con *L. panamensis*. La razón por la cual la inducción de autofagia no altera la carga parasitaria en los macrófagos infectados puede ser que estos por si solos inducen en el macrófago la autofagia suficiente para mantener su tasa de replicación. El papel de la autofagia puede ser proporcionar los nutrientes para el parásito (246). En este sentido, *L. mexicana* adquiere macromoléculas del citosol del macrófago vía autofagia (140). Todos estos datos son de gran interés para entender el papel de la inducción de autofagia por *Leishmania*, y su importancia en el desarrollo de la enfermedad.

La inducción de autofagia depende de una segunda vía que se activa por las proteínas PKR y eIF2 α . La quinasa PKR fosforila eIF2 α , que conduce a la inhibición de la síntesis de proteínas, estimulando autofagia. Aunque los mecanismos de inducción de autofagia a través de la fosforilación de eIF2 α no se conocen completamente, su relación con la vía mTOR puede tener algún papel (37). Existen tres quinasas identificadas en mamíferos, que son activadas en condiciones de estrés: HRI (*heme-*

regulated eIF-2 alpha kinase, EIF2AK1), cuya actividad se induce por bajos niveles del grupo hemo; PKR (*EIF2AK2*), que lleva a la fosforilación de eIF2 α en respuesta a ARN de doble cadena; y PERK (*EIF2AK3*), que es un sensor de estrés del retículo endoplásmico (37).

En este trabajo nosotros encontramos que *L. panamensis* induce la fosforilación de PKR y su principal sustrato eIF2 α en macrófagos J774 pocas horas después de la infección. Además cuando pre-incubamos las células con 2-AP, un inhibidor farmacológico de la PKR, se observó una disminución en la proliferación intracelular de *L. panamensis*. Por el contrario el uso de un ARN de doble cadena sintético Poly(I:C) incrementó la proliferación intracelular de *L. panamensis* en macrófagos J774. De igual forma, en macrófagos tratados con ARN de interferencia para PKR se observó una disminución de la proliferación intracelular de *L. panamensis*. El papel de la PKR en las infecciones por *Leishmania* parece depender de la especie específica, ya que se han observado resultados similares en *L. amazonensis* y *L. chagasi* (204, 206), pero no en infecciones por *L. major* (247).

Se ha demostrado en trabajos con micobacterias la participación de PKR en la expresión de citoquinas y el control del crecimiento bacteriano (125, 248), indicando que la PKR es más que una proteína antiviral cuando actúa en la inmunidad innata. El hecho de que ratones transfectados con la proteína antiviral E3L, con capacidad de inhibir PKR, se convierten en ratones más susceptibles para infecciones con *L. major* (247), apoya un posible papel de esta quinasa en la regulación de la infección por *Leishmania*. Nuestros datos, incluyendo la inhibición farmacológica como su silenciamiento génico, implican a la actividad enzimática de PKR en la modulación de la infección por *Leishmania*. La activación de PKR, debido a su fosforilación, posiblemente proporciona moléculas adicionales capaces de ser fosforiladas en respuesta a estímulos presentes en el sitio de la infección como mecanismo de adaptación parasitaria, con el fin de regular la respuesta de la célula hospedera.

El potencial de PKR como una diana terapéutica es sugerido en muchas enfermedades, dentro de las que se incluyen la neurodegeneración, obesidad, diabetes e influenza. Además es de resaltar que el mayor grado de apoptosis de macrófagos de ratones deficientes en PKR infectados con *M. tuberculosis*, es un hallazgo importante que puede contribuir sustancialmente en el control de la infección por estas bacterias

(249). PKR tiene diferentes efectos en la respuesta apoptótica y en la activación de diferentes células. Se han reportado pocos inhibidores de PKR, y estos aún no están caracterizados farmacológicamente para poder llevar a cabo ensayos en modelos animales. Sin embargo, nuestros resultados y trabajos previos (249) sugieren que inhibir la vía de activación de PKR puede ser una alternativa para evaluar una eficiente terapia antiparasitaria. Así mismo, la inhibición de PKR podría ser utilizada en una terapia combinada donde se tenga como diana al parásito *Leishmania*, más un adyuvante cuyo blanco fuese una proteína temporal dentro del hospedero, en este caso la fosforilación de PKR.

En el primer capítulo de este trabajo hemos demostrado que la edelfosina posee una gran actividad antileishmania *in vitro* e *in vivo*, convirtiéndose en un prometedor tratamiento para la leishmaniasis. Con esta idea analizamos si la combinación de un inhibidor de autofagia como es la wortmanina, o un inhibidor de PKR como 2-AP, con edelfosina a dosis subóptimas, podría mejorar la actividad anti-*Leishmania* de este éter lípido. Nuestros resultados indicaron que el tratamiento combinado tanto con la wortmanina como con la 2-AP incrementó la actividad antiparasitaria de la edelfosina, inhibiendo la multiplicación intracelular del parásito, y permitiendo bajar la concentración de edelfosina requerida para inducir la muerte intracelular de *Leishmania*. Estos datos sugieren que la combinación de edelfosina con wortmanina o 2-AP, puede convertirse en una nueva estrategia para el tratamiento de la leishmaniasis.

Se debe tener en cuenta que además de generar un ambiente que permite la proliferación del parásito, PKR también puede inducir la expresión de iNOS y por lo tanto la producción de ON por una vía dependiente de Poly(I:C) (206). El papel del ON en el control del crecimiento de *leishmania* es ampliamente conocido, sin embargo se ha descrito que la producción de ON dependiente de la vía de PKR, es inhibida por *L. amazonensis* (206). Se sabe además que la inhibición de la expresión de iNOS y la producción de ON por *L. amazonensis* es a través de un mecanismo dependiente de NF- κ B, además este efecto es dependiente de la producción de la citoquina supresora IL-10 (250). La activación por PKR ha sido demostrada con diferentes estímulos pro-inflamatorios como LPS, INF γ , IL-1 β y TNF α , además del ARN de doble cadena (206). Basado en esto, se podría pensar que la activación de PKR en la infección por *Leishmania* podría ser debido a la IL-1 β , TNF α o al mismo parásito.

Anteriormente se ha reportado que la proteína clásica antiviral PKR puede regular la infección por *Leishmania* (204, 206), por lo que nuestros datos confirman estos datos previos, siendo los primeros datos conocidos con *L. panamensis*. Los resultados descritos en esta tesis constituyen la primera evidencia conocida de una terapia combinada en la que se conjugan un fármaco cuya diana es el parásito, como la edelfosina, y una diana de la célula hospedera, con el fin de favorecer la eliminación del parásito. Nuestros resultados proporcionan nueva información con respecto a la interacción de los macrófagos y *Leishmania*, sugiriendo que la vía autofágica y la proteína quinasa PKR pueden constituir nuevas dianas terapéuticas en el control farmacológico de la leishmaniasis a través de una terapia combinada.

6. Conclusiones

- 6.1** La edelfosina es el ATL con mayor actividad citotóxica en parásitos de *Leishmania* spp., y en células tumorales causando un tipo de muerte similar a la apoptosis. La edelfosina causa autofagia en promastigotes de *L. panamensis*, e induce muerte celular de los amastigotes intracelulares sin afectar la célula hospedera.
- 6.2** La edelfosina es incorporada por macrófagos normales, sin embargo al contrario de las células tumorales, los macrófagos no transformados no sufren muerte celular. La edelfosina se acumula en los amastigotes dentro del macrófago, y el tratamiento con edelfosina, *in vitro* e *in vivo*, reduce la capacidad pro-inflamatoria del macrófago.
- 6.3** La edelfosina se acumula en la mitocondria de parásitos y células tumorales, llevando a una disfunción de la mitocondria que conduce a la muerte celular por un mecanismo similar a la apoptosis. La respuesta apoptótica inducida por edelfosina en *Leishmania* causa la pérdida del $\Delta\psi_m$ e induce la producción de ROS de origen mitocondrial. Estos procesos son vitales para la muerte inducida por edelfosina.
- 6.4** La edelfosina induce muerte en parásitos de *Leishmania* por un mecanismo dependiente de lípidos *rafts*, que implica el reclutamiento y funcionamiento de la proteína F_0F_1 -ATP sintasa.
- 6.5** ES-285 posee una potente actividad leishmanicida, causando la muerte por un mecanismo similar a la apoptosis, el cual esta mediado por estrés oxidativo, niveles de Ca^{2+} intracelular y el complejo II de la ETC. La muerte inducida por ES-285 es regulada por la expresión de las proteínas humanas Bcl- X_L y Hrk.
- 6.6** ES-285 inhibe la actividad SK en promastigotes de *L. panamensis*, lo que podría sugerir que ES-285 induce muerte celular a través de la inhibición del paso de esfingosina a S1P, aumentando así los niveles de ceramida o esfingosina que promueven muerte celular.

- 6.7** *L. panamensis* inhibe apoptosis en macrófagos J774, a través de la inducción de autofagia en la célula hospedera vía la activación de PKR. La inducción de autofagia y la activación de PKR en macrófagos J774 facilita la infección por *L. panamensis*.
- 6.8** El inhibidor de autofagia wortmanina y el inhibidor de PKR potencian la acción anti-*Leishmania* de la edelfosina contra amastigotes intracelulares, lo que podría sugerir una posible terapia combinada en el tratamiento de la leishmaniasis.

7 Agradecimientos

Volviendo atrás y recordando quien estaba en mi vida; a los que habéis llegado después, bienvenidos; a los que sólo habéis estado de paso, hasta luego; a los que ya no estáis, se os echa de menos; y sobre todo, a los que seguís a mi lado, muchas gracias...

Al Dr. Faustino Mollinedo, director de esta tesis, por ser un verdadero ejemplo del quehacer científico, por enseñarme a través del ejemplo que esto no es una profesión sino un estilo de vida. Por recibirme en su laboratorio y permitirme colaborar en sus múltiples proyectos de investigación.

A la empresa Apointech S.L y al programa Torres Quevedo por financiarme durante parte de este trabajo.

Al Dr. Iván Darío Vélez del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) de la Universidad de Antioquia en Colombia, por ser el responsable de mi llegada a salamanca.

Al Dr. José Robinson Ramírez del Grupo de Inmunomodulación de la UdeA, por dejar siempre las puertas abiertas del laboratorio, por tus enseñanzas día a día y por ser un gran ejemplo de disciplina y curiosidad científica. Igualmente a todos los chicos del GIM, por recibirme tan bien.

A todos mis compañeros del Laboratorio 6 del CIC (la ONU), a todas esas personas que tuve el gusto de conocer allí a lo largo de estos años y a todos aquellos con quienes compartí pipetas.

A Rubén, el gran compañero de guerra durante gran parte del doctorado, por tu ayuda en el labo, y sobre todo, fuera de él. A Rosúla, por tu amistad y sobre todo por sacarnos del labo y embarcarnos en el mundo del Ultimate. A Mariana, por tu infinita nobleza, por dar todo por los demás sin esperar nada a cambio y sobre todo por abrirnos las puertas de tu hermosa Portugal. Don Álvaro que sería de nosotros sin tu paz, gracias por todo lo que se aprende de ti, por los comentarios certeros en el momento preciso para sacarnos

unas risas, y enseñarnos que siempre se puede sacar algo bueno de las cosas. Ximena, mi rola favorita, por siempre dar ánimos en los momentos bajos y sobre todo por esas tardes de cocina tropical. Ana Catarina, por poner siempre ese punto de alegría, por tu excesiva sinceridad y esa risa contagiosa que consiguió muchas veces animarnos. Vero, que llegaste cargada de energía y alegría gracias por tu enorme sonrisa. Aleja, por tus ánimos y por endulzarnos siempre con los sabores de tu tierra. Sara, por ser la dulzura del laboratorio, la armonía en pasta.

Como olvidarme de mi buenos vecinos de todo el CIC, a Vera, Alicia, Botet, Badahó y Joana, Sami, chicos muchas gracias por hacer parte del mejor equipo de Últimate español Qui-me-ra. A Cris, Yure, Laura y Triana, chicas sabéis que sois únicas, siempre es importante encontrarse una sonrisa cuando vas por el pasillo, pero sobre todo por esas buenas noches de bailes y copas.

A Diego Mancipe, Carlos Rojas, Edward, Jhorman, que bueno encontrarse con buenas personas como ustedes, gracias por las noches de futbol y sobre todo por esas noches de guaros en los inviernos salmantinos.

A todos ustedes chicos gracias por ser ese pilar sobre el que me he apoyado en los momentos de flaqueo, quiero agradecerles sus enseñanzas, la ayuda prestada, permitirme tener un buen ambiente de vida y trabajo, por compartir, tanto dentro como fuera del laboratorio, gracias por convertir mi sala en un espacio multicultural y mi cocina en un paraíso gastronómico, Os quiero a todos.

Gracias a todos los que hacen, hicieron y haran parte del equipo de Últimate Quimera, gracias de nuevo por convertirme en su entrenador, por ser esa bombona de oxigeno que necesitaba, por darme el privilegio de viajar por España, conocer tanta gente bella y hermosas ciudades, gracias al Ultimate frisbey, este panchito siempre los recordara.

A mis amigos de Medellín, los INDIOS, que sí que sí que este INDIO por fin se hará Doctor, gracias parceros porque siempre sentí su apoyo, por guardar el lugar en el equipo para este gordito, a todos mil y mil gracias por esos buenos aguardientes en mis vacaciones, gracias por esa finca en el peñol, por los miercoles de futbol que terminaban

a las 6 de la mañana, sencillamente gracias por siempre estar ahí, por hacerme barra desde Colombia y sobre todo por seguir siendo mis amigos.

Mona, que te puedo decir, usted es mi super amiga, la conexión que tengo con usted es una cosa impresionante, yo se que usted me entiende. Gracias por apoyarme siempre, por estar siempre ahí, por los momentos de confianzas y por todos tus consejos.

Finalizando, pero con diferencia lo mas importante para mi, este doctorado hubiera sido imposible sin la ayuda de mi familia. Gracias a mi tia Elisa, que siempre esta pendiente de nosotros desde Venezuela, a mis 3 hermosas brujas, Patri, Leydi y Cami, con su cariño y admiración me han llenado de motivación. A la Rana, mil y mil gracias por ser nuestro pilar, por llenar de armonía nuestra familia y por tu inagotable ayuda, sería imposible sin contar contigo. A Sindy , te adoro hermanita, gracias por soportar a este hermano tan pesado y sobre todo gracias por tu ayuda para poner mas presentable este trabajo.

A Marleny y Jhon, mis padres, los que siempre habeis estado y estareis. Se que, como yo, han pasado buenos y malos momentos a lo largo de mi ausencia, pero tal como me lo han enseñado, puedo lograr las cosas que me proponga con paciencia y dedicación, creo que este trabajo es muestra de ello. En serio, sin su apoyo esta tesis no habría tenido sentido y por eso, les agradezco la fe que siempre han tenido en mi, aunque en ocasiones parecia que iba sin rumbo, los amo.

Y finalmente a ti, Eliza. Tu apoyo incondicional. La vida, por definición, es un complemento de la felicidad del alma y del intelecto. Tu eres ese complemento. Contigo disfruto la vida. Gracias por tu infinita paciencia, pero sobre todo, gracias por tu amor. Gracias por darme la felicidad más grande de mi vida, Manuela.

Por seis años inolvidables, por las muchas alegrías, por los pocos sinsabores, por el privilegio de vivir en un momumento, gracias Salamanca, estoy en deuda contigo...

8 Bibliografía

1. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005 Oct 29-Nov 4;366(9496):1561-77.
2. Alvar J, Yactayo S, Bern C. Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol*. 2006 Dec;22(12):552-7.
3. Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2004 Sep;27(5):305-18.
4. Cruz I, Nieto J, Moreno J, Canavate C, Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections in the second decade. *Indian J Med Res*. 2006 Mar;123(3):357-88.
5. Desjeux P, Alvar J. Leishmania/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol*. 2003 Oct;97 Suppl 1:3-15.
6. Shaw JJ. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994 Jul-Sep;89(3):471-8.
7. WHO. Control Of the Leishmaniasis. World Health Organ Tech Rep Ser 949. 2010:1-186.
8. Besteiro S, Williams RA, Coombs GH, Mottram JC. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol*. 2007 Aug;37(10):1063-75.
9. Jaafari MR, Ghafarian A, Farrokh-Gisour A, Samiei A, Kheiri MT, Mahboudi F, et al. Immune response and protection assay of recombinant major surface glycoprotein of *Leishmania* (rgp63) reconstituted with liposomes in BALB/c mice. *Vaccine*. 2006 Jul 17;24(29-30):5708-17.
10. Mollinedo F, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Estella-Hermoso de Mendoza A, Villa-Pulgarin JA, Campanero MA, et al. Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. *Oncogene*. 2010 Jul 1;29(26):3748-57.
11. Yao C, Donelson JE, Wilson ME. The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Molecular and biochemical parasitology*. 2003 Nov;132(1):1-16.
12. Nandan D, Reiner NE. *Leishmania donovani* engages in regulatory interference by targeting macrophage protein tyrosine phosphatase SHP-1. *Clin Immunol*. 2005 Mar;114(3):266-77.
13. Denis M, Forget A, Pelletier M, Skamene E. Pleiotropic effects of the Bcg gene: III. Respiratory burst in Bcg-congenic macrophages. *Clin Exp Immunol*. 1988 Sep;73(3):370-5.
14. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*. 2006 Sep;22(9):439-45.
15. Canonne-Hergaux F, Calafat J, Richer E, Cellier M, Grinstein S, Borregaard N, et al. Expression and subcellular localization of NRAM1 in human neutrophil granules. *Blood*. 2002 Jul 1;100(1):268-75.
16. Cunningham AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *leishmania*. *Exp Mol Pathol*. 2002 Apr;72(2):132-41.
17. Puentes SM, Da Silva RP, Sacks DL, Hammer CH, Joiner KA. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania* major promastigotes is due to release of C5b-9. *J Immunol*. 1990 Dec 15;145(12):4311-6.
18. Brittingham A, Mosser DM. Exploitation of the complement system by *Leishmania* promastigotes. *Parasitol Today*. 1996 Nov;12(11):444-7.
19. Handman E, Goding JW. The *Leishmania* receptor for macrophages is a lipid-containing glycoconjugate. *EMBO J*. 1985 Feb;4(2):329-36.

20. Russell DG, Wilhelm H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *J Immunol.* 1986 Apr 1;136(7):2613-20.
21. Denkers EY, Butcher BA. Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans. *Trends Parasitol.* 2005 Jan;21(1):35-41.
22. McConville MJ, de Souza D, Saunders E, Likic VA, Naderer T. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. *Trends Parasitol.* 2007 Aug;23(8):368-75.
23. Naderer T, McConville MJ. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiol.* 2008 Feb;10(2):301-8.
24. Suzuki E, Tanaka AK, Toledo MS, Levery SB, Straus AH, Takahashi HK. Trypanosomatid and fungal glycolipids and sphingolipids as infectivity factors and potential targets for development of new therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Mar;1780(3):362-9.
25. van Zandbergen G, Bollinger A, Wenzel A, Kamhawi S, Voll R, Klinger M, et al. *Leishmania* disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Sep 12;103(37):13837-42.
26. Mougneau E, Bihl F, Glaichenhaus N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol Rev.* 2011 Mar;240(1):286-96.
27. Wanderley JL, Moreira ME, Benjamin A, Bonomo AC, Barcinski MA. Mimicry of apoptotic cells by exposing phosphatidylserine participates in the establishment of amastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* in mammalian hosts. *J Immunol.* 2006 Feb 1;176(3):1834-9.
28. Mollinedo F, Janssen H, de la Iglesia-Vicente J, Villa-Pulgarin JA, Calafat J. Selective fusion of azurophilic granules with *Leishmania*-containing phagosomes in human neutrophils. *J Biol Chem.* 2010 Nov 5;285(45):34528-36.
29. Laskay T, van Zandbergen G, Solbach W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology.* 2008;213(3-4):183-91.
30. Charmoy M, Auderset F, Allenbach C, Tacchini-Cottier F. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:719361.
31. Giudice A, Camada I, Leopoldo PT, Pereira JM, Riley LW, Wilson ME, et al. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect Dis.* 2007;7:7.
32. Mukbel RM, Patten C, Jr., Gibson K, Ghosh M, Petersen C, Jones DE. Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Apr;76(4):669-75.
33. Bogdan C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. *Cell Microbiol.* 2008 Jun;10(6):1221-34.
34. Hernandez-Ruiz J, Becker I. [CD8+ cytotoxic lymphocytes in cutaneous leishmaniasis]. *Salud Publica Mex.* 2006 Sep-Oct;48(5):430-9.
35. Liu D, Uzonna JE. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:83.
36. Kropf P, Fuentes JM, Fahrnich E, Arpa L, Herath S, Weber V, et al. Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo. *Faseb Journal.* 2005 Apr;19(6):1000-+.

37. Kloft N, Neukirch C, Bobkiewicz W, Veerachato G, Busch T, von Hoven G, et al. Pro-autophagic signal induction by bacterial pore-forming toxins. *Med Microbiol Immunol*. 2010 Nov;199(4):299-309.
38. Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother*. 2004 Dec;10(6):307-15.
39. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Nov;5(11):873-82.
40. Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AC. Mucosal leishmaniasis . Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop*. 2008 Jan;105(1):1-9.
41. Davidson RN, den Boer M, Ritmeijer K. Paromomycin. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009 Jul;103(7):653-60.
42. Roberts CW, McLeod R, Rice DW, Ginger M, Chance ML, Goad LJ. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Molecular and biochemical parasitology*. 2003 Feb;126(2):129-42.
43. Yeates C. Sitamaquine (GlaxoSmithKline/Walter Reed Army Institute). *Curr Opin Investig Drugs*. 2002 Oct;3(10):1446-52.
44. Lopez-Martin C, Perez-Victoria JM, Carvalho L, Castanys S, Gamarro F. Sitamaquine sensitivity in *Leishmania* species is not mediated by drug accumulation in acidocalcisomes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Nov;52(11):4030-6.
45. Gajate C, Mollinedo F. Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH(3) (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. *Curr Drug Metab*. 2002 Oct;3(5):491-525.
46. Mollinedo F, Gajate C, Martin-Santamaria S, Gago F. ET-18-OCH3 (edelfosine): a selective antitumour lipid targeting apoptosis through intracellular activation of Fas/CD95 death receptor. *Curr Med Chem*. 2004 Dec;11(24):3163-84.
47. Mishra J, Saxena A, Singh S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. . 2007;14(10):1153-69.
48. Berman JJ. Treatment of leishmaniasis with miltefosine: 2008 status. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008 Sep;4(9):1209-16.
49. Varela MR, Villa-Pulgarin JA, Yepes E, Muller I, Modolell M, Munoz DL, et al. In vitro and in vivo efficacy of ether lipid edelfosine against *Leishmania* spp. and SbV-resistant parasites. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(4):e1612.
50. Lux H, Heise N, Klenner T, Hart D, Opperdoes FR. Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in *Leishmania*. *Molecular and biochemical parasitology*. 2000 Nov;111(1):1-14.
51. Santa-Rita RM, Henriques-Pons A, Barbosa HS, de Castro SL. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. *J Antimicrob Chemother*. 2004 Oct;54(4):704-10.
52. de Souza W. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. *Curr Pharm Des*. 2008;14(9):822-38.
53. de Souza W. Trypanosomiasis and leishmaniasis "recent development in the chemotherapy of infectious diseases caused by parasitic protozoa". *Curr Pharm Des*. 2008;14(9):821.
54. Britto C, Ravel C, Bastien P, Blaineau C, Pages M, Dedet JP, et al. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. *Gene*. 1998 Nov 5;222(1):107-17.
55. Lukes J, Hashimi H, Zikova A. Unexplained complexity of the mitochondrial genome and transcriptome in kinetoplastid flagellates. *Curr Genet*. 2005 Nov;48(5):277-99.

56. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science*. 2005 Jul 15;309(5733):436-42.
57. Martinez-Calvillo S, Yan S, Nguyen D, Fox M, Stuart K, Myler PJ. Transcription of *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. *Mol Cell*. 2003 May;11(5):1291-9.
58. Stuart KD, Schnauffer A, Ernst NL, Panigrahi AK. Complex management: RNA editing in trypanosomes. *Trends Biochem Sci*. 2005 Feb;30(2):97-105.
59. McConville MJ, Handman E. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. *Int J Parasitol*. 2007 Aug;37(10):1047-51.
60. de Souza W. Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol Res*. 2002 Dec;88(12):1013-25.
61. Michels PA, Bringaud F, Herman M, Hannaert V. Metabolic functions of glycosomes in *trypanosomatids*. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Dec;1763(12):1463-77.
62. Carrero-Lerida J, Perez-Moreno G, Castillo-Acosta VM, Ruiz-Perez LM, Gonzalez-Pacanowska D. Intracellular location of the early steps of the isoprenoid biosynthetic pathway in the *trypanosomatids* *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei*. *Int J Parasitol*. 2009 Feb;39(3):307-14.
63. Docampo R, de Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Mar;3(3):251-61.
64. Lu HG, Zhong L, Chang KP, Docampo R. Intracellular Ca²⁺ pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes. *J Biol Chem*. 1997 Apr 4;272(14):9464-73.
65. Landfear SM, Ullman B, Carter NS, Sanchez MA. Nucleoside and nucleobase transporters in parasitic protozoa. *Eukaryot Cell*. 2004 Apr;3(2):245-54.
66. Carter NS, Yates P, Arendt CS, Boitz JM, Ullman B. Purine and pyrimidine metabolism in *Leishmania*. *Adv Exp Med Biol*. 2008;625:141-54.
67. Krauth-Siegel RL, Comini MA. Redox control in *trypanosomatids*, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Nov;1780(11):1236-48.
68. Paramchuk WJ, Ismail SO, Bhatia A, Gedamu L. Cloning, characterization and overexpression of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Leishmania chagasi*: role in pathogenesis. *Molecular and biochemical parasitology*. 1997 Dec 1;90(1):203-21.
69. Plewes KA, Barr SD, Gedamu L. Iron superoxide dismutases targeted to the glycosomes of *Leishmania chagasi* are important for survival. *Infect Immun*. 2003 Oct;71(10):5910-20.
70. Hannaert V, Bringaud F, Opperdoes FR, Michels PA. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol Dis*. 2003 Oct 28;2(1):11.
71. Bermudez R, Dagger F, D'Aquino JA, Benaim G, Dawidowicz K. Characterization of mitochondrial electron-transfer in *Leishmania mexicana*. *Molecular and biochemical parasitology*. 1997 Dec 1;90(1):43-54.
72. Santhamma KR, Bhaduri A. Characterization of the respiratory chain of *Leishmania donovani* promastigotes. *Molecular and biochemical parasitology*. 1995 Dec;75(1):43-53.
73. Naderer T, Vince JE, McConville MJ. Surface determinants of *Leishmania* parasites and their role in infectivity in the mammalian host. *Curr Mol Med*. 2004 Sep;4(6):649-65.
74. McConville MJ, De Souza DP, Saunders EC, Pyke JS, Naderer T, Ellis MA, et al. Analysis of the *Leishmania* metabolome. *Leishmania After the Genome*, eds Myler, P J, and Fasel, N 2008:75-106.

75. Ilgoutz SC, McConville MJ. Function and assembly of the *Leishmania* surface coat. *Int J Parasitol*. 2001 Jul;31(9):899-908.
76. Lorente SO, Jimenez CJ, Gros L, Yardley V, de Luca-Fradley K, Croft SL, et al. Preparation of transition-state analogues of sterol 24-methyl transferase as potential anti-parasitics. *Bioorg Med Chem*. 2005 Sep 15;13(18):5435-53.
77. Vieira FS, Correa G, Einicker-Lamas M, Coutinho-Silva R. Host-cell lipid rafts: a safe door for micro-organisms. *Biol Cell*. 2010 Jul;102(7):391-407.
78. Gajate C, Mollinedo F. Lipid rafts and Fas/CD95 signaling in cancer chemotherapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*. 2011 Sep;6(3):274-83.
79. George KS, Wu S. Lipid raft: A floating island of death or survival. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2012 Mar 15;259(3):311-9.
80. Nicolson GL. The Fluid-Mosaic Model of Membrane Structure: Still relevant to understanding the structure, function and dynamics of biological membranes after more than 40years. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Nov 1.
81. Palade GE. Fine structure of blood capillaries. *J Applied Phys*. 1953;24:1424-36.
82. Yamada E. The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. *J Biophys Biochem Cytol*. 1955;1:445-58.
83. Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2000 Oct;1(1):31-9.
84. Brown DA, Rose JK. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell*. 1992 Feb 7;68(3):533-44.
85. Gajate C, Del Canto-Janez E, Acuna AU, Amat-Guerri F, Geijo E, Santos-Beneit AM, et al. Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J Exp Med*. 2004 Aug 2;200(3):353-65.
86. Gajate C, Gonzalez-Camacho F, Mollinedo F. Lipid raft connection between extrinsic and intrinsic apoptotic pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Mar 20;380(4):780-4.
87. Gajate C, Gonzalez-Camacho F, Mollinedo F. Involvement of raft aggregates enriched in Fas/CD95 death-inducing signaling complex in the antileukemic action of edelfosine in Jurkat cells. *PLoS One*. 2009;4(4):e5044.
88. Gajate C, Mollinedo F. The antitumor ether lipid ET-18-OCH(3) induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood*. 2001 Dec 15;98(13):3860-3.
89. Mollinedo F, Fernandez M, Hornillos V, Delgado J, Amat-Guerri F, Acuna AU, et al. Involvement of lipid rafts in the localization and dysfunction effect of the antitumor ether phospholipid edelfosine in mitochondria. *Cell Death Dis*. 2:e158.
90. Reis-Sobreiro M, Gajate C, Mollinedo F. Involvement of mitochondria and recruitment of Fas/CD95 signaling in lipid rafts in resveratrol-mediated antimyeloma and antileukemia actions. *Oncogene*. 2009 Sep 10;28(36):3221-34.
91. Reis-Sobreiro M, Roue G, Moros A, Gajate C, de la Iglesia-Vicente J, Colomer D, et al. Lipid raft-mediated Akt signaling as a therapeutic target in mantle cell lymphoma. *Blood Cancer J*. 2013;3:e118.
92. Helms JB, Zurzolo C. Lipids as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. *Traffic*. 2004 Apr;5(4):247-54.
93. Mollinedo F, Fernandez M, Hornillos V, Delgado J, Amat-Guerri F, Acuna AU, et al. Involvement of lipid rafts in the localization and dysfunction effect of the antitumor ether phospholipid edelfosine in mitochondria. *Cell Death Dis*. 2011;2:e158.

94. Denny PW, Goulding D, Ferguson MA, Smith DF. Sphingolipid-free *Leishmania* are defective in membrane trafficking, differentiation and infectivity. *Mol Microbiol.* 2004 Apr;52(2):313-27.
95. Denny PW, Field MC, Smith DF. GPI-anchored proteins and glycoconjugates segregate into lipid rafts in Kinetoplastida. *FEBS Lett.* 2001 Feb 23;491(1-2):148-53.
96. Denny PW, Smith DF. Rafts and sphingolipid biosynthesis in the kinetoplastid parasitic protozoa. *Mol Microbiol.* 2004 Aug;53(3):725-33.
97. Wallace KB, Starkov AA. Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:353-88.
98. Mehta A, Shaha C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J Biol Chem.* 2004;279:11798-813.
99. Fidalgo LM, Gille L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. *Pharm Res.* 2011 Nov;28(11):2758-70.
100. Dey R, Meneses C, Salotra P, Kamhawi S, Nakhasi HL, Duncan R. Characterization of a *Leishmania* stage-specific mitochondrial membrane protein that enhances the activity of cytochrome c oxidase and its role in virulence. *Mol Microbiol.* 2010 Jul;77(2):399-414.
101. Lee SH, Stephens JL, Paul KS, Englund PT. Fatty acid synthesis by elongases in trypanosomes. *Cell.* 2006 Aug 25;126(4):691-9.
102. Gottlieb RA. Mitochondrial signaling in apoptosis: mitochondrial daggers to the breaking heart. *Basic Res Cardiol.* 2003 Jul;98(4):242-9.
103. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ.* 2012 Jan;19(1):107-20.
104. Kerr JFR, Wyllie, A. H., Currie, A. R. Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-ranging Implications in Tissue Kinetics. *British Journal of Cancer.* 1972;26(4):239-57.
105. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000 Oct 12;407(6805):770-6.
106. Mehlen P, Bredesen DE. Dependence receptors: from basic research to drug development. *Sci Signal.* 2011;4(157):mr2.
107. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 2007 Jan;87(1):99-163.
108. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, et al. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol.* 2004 Dec;6(12):1221-8.
109. Kourtis N, Tavernarakis N. Autophagy and cell death in model organisms. *Cell Death Differ.* 2009 Jan;16(1):21-30.
110. Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Nov;8(11):931-7.
111. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, Abrams J, Alnemri ES, Baehrecke EH, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ.* 2009 Jan;16(1):3-11.
112. Huang WP, Klionsky DJ. Autophagy in yeast: a review of the molecular machinery. *Cell Struct Funct.* 2002 Dec;27(6):409-20.
113. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Jr., Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, et al. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell.* 2003 Oct;5(4):539-45.
114. Deretic V, Levine B. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. *Cell Host Microbe.* 2009 Jun 18;5(6):527-49.
115. Proto WR, Coombs GH, Mottram JC. Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental. *Nat Rev Microbiol.* 2013 Jan;11(1):58-66.

116. Wanderley JL, Pinto da Silva LH, Deolindo P, Soong L, Borges VM, Prates DB, et al. Cooperation between apoptotic and viable metacyclics enhances the pathogenesis of Leishmaniasis. *PLoS One*. 2009;4(5):e5733.
117. Shaha C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *Indian J Med Res*. 2006 Mar;123(3):233-44.
118. Smirlis D, Duszenko M, Ruiz AJ, Scoulica E, Bastien P, Fasel N, et al. Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. *Parasit Vectors*. 2010;3:107.
119. Bates PA. Housekeeping by *Leishmania*. *Trends Parasitol*. 2006 Oct;22(10):447-8.
120. Kiel JA. Autophagy in unicellular eukaryotes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2010 Mar 12;365(1541):819-30.
121. Nguewa PA, Fuertes MA, Valladares B, Alonso C, Perez JM. Programmed cell death in trypanosomatids: a way to maximize their biological fitness. *Trends Parasitol*. 2004 Aug;20(8):375-80.
122. Mukherjee SB, Das M, Sudhandiran G, Shaha C. Increase in cytosolic Ca²⁺ levels through the activation of non-selective cation channels induced by oxidative stress causes mitochondrial depolarization leading to apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Biol Chem*. 2002 Jul 5;277(27):24717-27.
123. Sen N, Das BB, Ganguly A, Mukherjee T, Tripathi G, Bandyopadhyay S, et al. Camptothecin induced mitochondrial dysfunction leading to programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *Cell Death Differ*. 2004 Aug;11(8):924-36.
124. Schwegmann A, Brombacher F. Host-directed drug targeting of factors hijacked by pathogens. *Sci Signal*. 2008;1(29):re8.
125. WU K. Improved Control of Tuberculosis and Activation of Macrophages in Mice Lacking Protein Kinase R. *PLoS one*. 2012;7(2):13.
126. Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Ouaisi A, Silvestre R, Estaquier J. Modulation of mammalian apoptotic pathways by intracellular protozoan parasites. *Cell Microbiol*. 2012 Mar;14(3):325-33.
127. Cyrino LT, Araujo AP, Joazeiro PP, Vicente CP, Giorgio S. In vivo and in vitro *Leishmania amazonensis* infection induces autophagy in macrophages. *Tissue Cell*. 2012 Dec;44(6):401-8.
128. Wang Y, Weiss LM, Orlofsky A. Host cell autophagy is induced by *Toxoplasma gondii* and contributes to parasite growth. *J Biol Chem*. 2009 Jan 16;284(3):1694-701.
129. Santos-Beneit AM, Mollinedo F. Expression of genes involved in initiation, regulation, and execution of apoptosis in human neutrophils and during neutrophil differentiation of HL-60 cells. *J Leukoc Biol*. 2000 May;67(5):712-24.
130. Moore KJ, Matlashewski G. Intracellular infection by *Leishmania donovani* inhibits macrophage apoptosis. *J Immunol*. 1994 Mar 15;152(6):2930-7.
131. Akarid K, Arnoult D, Micic-Polianski J, Sif J, Estaquier J, Ameisen JC. Leishmania major-mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. *J Leukoc Biol*. 2004 Jul;76(1):95-103.
132. Ruhland A, Leal N, Kima PE. *Leishmania* promastigotes activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cell Microbiol*. 2007 Jan;9(1):84-96.
133. Lisi S, Sisto M, Acquafredda A, Spinelli R, Schiavone M, Mitolo V, et al. Infection with *Leishmania infantum* Inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. *J Eukaryot Microbiol*. 2005 May-Jun;52(3):211-7.

134. Donovan MJ, Maciuba BZ, Mahan CE, McDowell MA. *Leishmania* infection inhibits cycloheximide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner. *Exp Parasitol*. 2009 Sep;123(1):58-64.
135. Valdes-Reyes L, Argueta J, Moran J, Salaiza N, Hernandez J, Berzunza M, et al. *Leishmania mexicana*: inhibition of camptothecin-induced apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. *Exp Parasitol*. 2009 Mar;121(3):199-207.
136. Gutierrez-Kobeh L, de Oyarzabal E, Argueta J, Wilkins A, Salaiza N, Fernandez E, et al. Inhibition of dendritic cell apoptosis by *Leishmania mexicana* amastigotes. *Parasitol Res*. 2013 Apr;112(4):1755-62.
137. Jaramillo M, Gomez MA, Larsson O, Shio MT, Topisirovic I, Contreras I, et al. *Leishmania* repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. *Cell Host Microbe*. 2011 Apr 21;9(4):331-41.
138. Deretic V. Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunol Rev*. Mar;240(1):92-104.
139. Yasir M, Pachikara ND, Bao X, Pan Z, Fan H. Regulation of *chlamydial* infection by host autophagy and vacuolar ATPase-bearing organelles. *Infect Immun*. 2011 Oct;79(10):4019-28.
140. Schaible UE, Schlesinger PH, Steinberg TH, Mangel WF, Kobayashi T, Russell DG. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania mexicana* acquire macromolecules from the host cell cytosol via two independent routes. *Journal of cell science*. 1999 Mar;112 (Pt 5):681-93.
141. Pinheiro RO, Nunes MP, Pinheiro CS, D'Avila H, Bozza PT, Takiya CM, et al. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of *Leishmania amazonensis* in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. *Microbes Infect*. 2009 Feb;11(2):181-90.
142. Mitroulis I, Kourtzelis I, Papadopoulos VP, Mimidis K, Speletas M, Ritis K. *In vivo* induction of the autophagic machinery in human bone marrow cells during *Leishmania donovani* complex infection. *Parasitol Int*. 2009 Dec;58(4):475-7.
143. He C, Klionsky DJ. Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*. 2009;43:67-93.
144. Munder PG, Modolell M, Ferber E, Fischer H. Phospholipide in quarzgeschaedigten Makrophagen. *Biochem Biophys Res Commun*. 1966;344:310-3.
145. van Blitterswijk WJ, Verheij M. Anticancer mechanisms and clinical application of alkylphospholipids. *Biochim Biophys Acta*. 2013 Mar;1831(3):663-74.
146. Mollinedo F, Fernandez-Luna JL, Gajate C, Martin-Martin B, Benito A, Martinez-Dalmau R, et al. Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH3 (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L). *Cancer Res*. 1997 Apr 1;57(7):1320-8.
147. Gajate C, Mollinedo F. Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood*. 2007 Jan 15;109(2):711-9.
148. Mollinedo F, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Estella-Hermoso de Mendoza A, Villa-Pulgarin JA, de Frias M, et al. In vitro and In vivo selective antitumor activity of Edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts. *Clin Cancer Res*. 2010 Apr 1;16(7):2046-54.
149. Gajate C, Matos-da-Silva M, Dakir el H, Fonteriz RI, Alvarez J, Mollinedo F. Antitumor alkyl-lysophospholipid analog edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. *Oncogene*. 2012 May 24;31(21):2627-39.

150. Nieto-Miguel T, Gajate C, Mollinedo F. Differential targets and subcellular localization of antitumor alkyl-lysophospholipid in leukemic versus solid tumor cells. *J Biol Chem*. 2006 May 26;281(21):14833-40.
151. Gajate C, Fonteriz RI, Cabaner C, Alvarez-Noves G, Alvarez-Rodriguez Y, Modolell M, et al. Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis. *Int J Cancer*. 2000 Mar 1;85(5):674-82.
152. Cuesta-Marban A, Botet J, Czyz O, Cacharro LM, Gajate C, Hornillos V, et al. Drug uptake, lipid rafts, and vesicle trafficking modulate resistance to an anticancer lysophosphatidylcholine analogue in yeast. *J Biol Chem*. 2013 Mar 22;288(12):8405-18.
153. Hanson PK, Malone L, Birchmore JL, Nichols JW. Lem3p is essential for the uptake and potency of alkylphosphocholine drugs, edelfosine and miltefosine. *J Biol Chem*. 2003 Sep 19;278(38):36041-50.
154. Zarembeg V, Gajate C, Cacharro LM, Mollinedo F, McMaster CR. Cytotoxicity of an anti-cancer lysophospholipid through selective modification of lipid raft composition. *J Biol Chem*. 2005 Nov 11;280(45):38047-58.
155. Zhang H, Gajate C, Yu LP, Fang YX, Mollinedo F. Mitochondrial-derived ROS in edelfosine-induced apoptosis in yeasts and tumor cells. *Acta Pharmacol Sin*. 2007 Jun;28(6):888-94.
156. Czyz O, Bitew T, Cuesta-Marban A, McMaster CR, Mollinedo F, Zarembeg V. Alteration of plasma membrane organization by an anticancer lysophosphatidylcholine analogue induces intracellular acidification and internalization of plasma membrane transporters in yeast. *J Biol Chem*. 2013 Mar 22;288(12):8419-32.
157. Croft SL, Seifert K, Duchene M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. *Molecular and biochemical parasitology*. 2003 Feb;126(2):165-72.
158. Rakotomanga M, Blanc S, Gaudin K, Chaminade P, Loiseau PM. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Apr;51(4):1425-30.
159. Luque-Ortega JR, Rivas L. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Apr;51(4):1327-32.
160. Alzate JF, Arias A, Mollinedo F, Rico E, de la Iglesia-Vicente J, Jimenez-Ruiz A. Edelfosine induces an apoptotic process in *Leishmania infantum* that is regulated by the ectopic expression of Bcl-XL and Hrk. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Oct;52(10):3779-82.
161. Paris C, Loiseau PM, Bories C, Breard J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Mar;48(3):852-9.
162. Verma NK, Dey CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Aug;48(8):3010-5.
163. Kondapaka SB, Singh SS, Dasmahapatra GP, Sausville EA, Roy KK. Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation. *Mol Cancer Ther*. 2003 Nov;2(11):1093-103.
164. Gajate C, Santos-Beneit AM, Macho A, Lazaro M, Hernandez-De Rojas A, Modolell M, et al. Involvement of mitochondria and caspase-3 in ET-18-OCH(3)-induced apoptosis of human leukemic cells. *Int J Cancer*. 2000 Apr 15;86(2):208-18.
165. Gajate C, Barasoain I, Andreu JM, Mollinedo F. Induction of apoptosis in leukemic cells by the reversible microtubule-disrupting agent 2-methoxy-5-(2',3',4'-trimethoxyphenyl)-2,4,6-cycloheptatrien-1-one: protection by Bcl-2 and Bcl-X(L) and cell cycle arrest. *Cancer Res*. 2000 May 15;60(10):2651-9.

166. Mollinedo F, Gajate C, Morales AI, del Canto-Janez E, Justies N, Collia F, et al. Novel anti-inflammatory action of edelfosine lacking toxicity with protective effect in experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009 May;329(2):439-49.
167. Myc A, Pizzolo JG, Dygulski K, Melamed MR. Increase in acridine orange (AO) fluorescence intensity of monocytes cultured in plastic tissue culture plates as measured by flow cytometry. *Cytometry*. 1992;13(1):103-7.
168. Henao HH, Osorio Y, Saravia NG, Gomez A, Travi B. [Efficacy and toxicity of pentavalent antimonials (Glucantime and Pentostam) in an American cutaneous leishmaniasis animal model: luminometry application]. *Biomedica*. 2004 Dec;24(4):393-402.
169. Travi BL, Martinez JE, Zea A. Antimonial treatment of hamsters infected with *Leishmania (Viannia) panamensis*: assessment of parasitological cure with different therapeutic schedules. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1993 Sep-Oct;87(5):567-9.
170. Quesada E, Delgado J, Gajate C, Mollinedo F, Acuna AU, Amat-Guerri F. Fluorescent phenylpolyene analogues of the ether phospholipid edelfosine for the selective labeling of cancer cells. *J Med Chem*. 2004 Oct 21;47(22):5333-5.
171. Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*. 1996 Mar 1;68(5):850-8.
172. Nieto-Miguel T, Fonteriz RI, Vay L, Gajate C, Lopez-Hernandez S, Mollinedo F. Endoplasmic reticulum stress in the proapoptotic action of edelfosine in solid tumor cells. *Cancer Res*. 2007 Nov 1;67(21):10368-78.
173. Vrablic AS, Albright CD, Craciunescu CN, Salganik RI, Zeisel SH. Altered mitochondrial function and overgeneration of reactive oxygen species precede the induction of apoptosis by 1-O-octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine in p53-defective hepatocytes. *Faseb J*. 2001 Aug;15(10):1739-44.
174. Estella-Hermoso de Mendoza A, Campanero MA, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Mollinedo F, Blanco-Prieto MJ. Antitumor alkyl ether lipid edelfosine: tissue distribution and pharmacokinetic behavior in healthy and tumor-bearing immunosuppressed mice. *Clin Cancer Res*. 2009 Feb 1;15(3):858-64.
175. Monte Neto RL, Sousa LM, Dias CS, Barbosa Filho JM, Oliveira MR, Figueiredo RC. Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. *Exp Parasitol*. 2011 Jan;127(1):215-21.
176. Bera A, Singh S, Nagaraj R, Vaidya T. Induction of autophagic cell death in *Leishmania donovani* by antimicrobial peptides. *Molecular and biochemical parasitology*. 2003 Mar;127(1):23-35.
177. Munafò DB, Colombo MI. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation. *Journal of cell science*. 2001 Oct;114(Pt 20):3619-29.
178. Gajate C, Santos-Beneit A, Modolell M, Mollinedo F. Involvement of c-Jun NH2-terminal kinase activation and c-Jun in the induction of apoptosis by the ether phospholipid 1-O-octadecyl-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine. *Mol Pharmacol*. 1998 Apr;53(4):602-12.
179. Hommel M, Jaffe CL, Travi B, Milon G. Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann Trop Med Parasitol*. 1995 Dec;89 Suppl 1:55-73.
180. Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol*. 2001 Feb 1;166(3):1912-20.
181. Sack DM, PC. Animal models for the analysis of immune response to leishmaniasis. *Current protocol immunology*. 2001;Chaper 19(Unit 19-12).

182. Cabaner C, Gajate C, Macho A, Munoz E, Modolell M, Mollinedo F. Induction of apoptosis in human mitogen-activated peripheral blood T-lymphocytes by the ether phospholipid ET-18-OCH₃: involvement of the Fas receptor/ligand system. *Br J Pharmacol*. 1999 Jun;127(4):813-25.
183. Mollinedo F, Gajate C. Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: new targets for apoptosis-directed cancer therapy. *Drug Resist Updat*. 2006 Feb-Apr;9(1-2):51-73.
184. Saugar JM, Delgado J, Hornillos V, Luque-Ortega JR, Amat-Guerri F, Acuna AU, et al. Synthesis and biological evaluation of fluorescent leishmanicidal analogues of hexadecylphosphocholine (miltefosine) as probes of antiparasite mechanisms. *J Med Chem*. 2007 Nov 29;50(24):5994-6003.
185. Di Lisa F, Bernardi P. Mitochondrial function as a determinant of recovery or death in cell response to injury. *Mol Cell Biochem*. 1998 Jul;184(1-2):379-91.
186. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Mase B, et al. Inhibitors of permeability transition interfere with the disruption of the mitochondrial transmembrane potential during apoptosis. *FEBS Lett*. 1996 Apr 8;384(1):53-7.
187. 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 Jul;13(7):867-82.
188. Veenman L, Alten J, Linnemannstons K, Shandalov Y, Zeno S, Lakomek M, et al. Potential involvement of FOF1-ATP(synth)ase and reactive oxygen species in apoptosis induction by the antineoplastic agent erucylphosphohomocholine in glioblastoma cell lines : a mechanism for induction of apoptosis via the 18 kDa mitochondrial translocator protein. *Apoptosis*. 2010 Jul;15(7):753-68.
189. Penefsky HS. Mechanism of inhibition of mitochondrial adenosine triphosphatase by dicyclohexylcarbodiimide and oligomycin: relationship to ATP synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985 Mar;82(6):1589-93.
190. Ausili A, Torrecillas A, Aranda FJ, Mollinedo F, Gajate C, Corbalan-Garcia S, et al. Edelfosine is incorporated into rafts and alters their organization. *J Phys Chem B*. 2008 Sep 18;112(37):11643-54.
191. Busto JV, Del Canto-Janez E, Goni FM, Mollinedo F, Alonso A. Combination of the anti-tumour cell ether lipid edelfosine with sterols abolishes haemolytic side effects of the drug. *J Chem Biol*. 2008 Nov;1(1-4):89-94.
192. Schon A, Freire E. Thermodynamics of intersubunit interactions in cholera toxin upon binding to the oligosaccharide portion of its cell surface receptor, ganglioside GM1. *Biochemistry*. 1989 Jun 13;28(12):5019-24.
193. Neufeld EB, Cooney AM, Pitha J, Dawidowicz EA, Dwyer NK, Pentchev PG, et al. Intracellular trafficking of cholesterol monitored with a cyclodextrin. *J Biol Chem*. 1996 Aug 30;271(35):21604-13.
194. Dea-Ayuela MA, Rama-Iniguez S, Bolas-Fernandez F. Proteomic analysis of antigens from *Leishmania infantum* promastigotes. *Proteomics*. 2006 Jul;6(14):4187-94.
195. Lester PJ, Hubbard SJ. Comparative bioinformatic analysis of complete proteomes and protein parameters for cross-species identification in proteomics. *Proteomics*. 2002 Oct;2(10):1392-405.
196. Rinehart KL, Jr., Gloer JB, Wilson GR, Hughes RG, Jr., Li LH, Renis HE, et al. Antiviral and antitumor compounds from tunicates. *Fed Proc*. 1983 Jan;42(1):87-90.
197. Schoffski P, Dumez H, Ruijter R, Miguel-Lillo B, Soto-Matos A, Alfaro V, et al. Spisulosine (ES-285) given as a weekly three-hour intravenous infusion: results of a phase I dose-escalating study in patients with advanced solid malignancies. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011 Dec;68(6):1397-403.

198. Sanchez AM, Malagarie-Cazenave S, Olea N, Vara D, Cuevas C, Diaz-Laviada I. Spisulosine (ES-285) induces prostate tumor PC-3 and LNCaP cell death by de novo synthesis of ceramide and PKCzeta activation. *Eur J Pharmacol.* 2008 Apr 28;584(2-3):237-45.
199. Cuadros R, Montejo de Garcini E, Wandosell F, Faircloth G, Fernandez-Sousa JM, Avila J. The marine compound spisulosine, an inhibitor of cell proliferation, promotes the disassembly of actin stress fibers. *Cancer Lett.* 2000 Apr 28;152(1):23-9.
200. Brookes P. Mitochondrial H(+) leak and ROS generation: an add couple. *Free radical biology & medicine.* 200;1(38):12-23.
201. Alzate JF, Alvarez-Barrientos A, Gonzalez VM, Jimenez-Ruiz A. Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X(L) expression. *Apoptosis.* 2006 Feb;11(2):161-71.
202. Futerman AH, Hannun YA. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* 2004 Aug;5(8):777-82.
203. Maceyka M, Payne, S.G., Milstein, S., Spiegel, S. Spingosine kinase, sphingosine-1-phosphate, and apoptosis. *Biochimistry Biophys Acta.* 2002;1585:193-205.
204. Vivarini Ade C, Pereira Rde M, Teixeira KL, Calegari-Silva TC, Bellio M, Laurenti MD, et al. Human cutaneous leishmaniasis: interferon-dependent expression of double-stranded RNA-dependent protein kinase (PKR) via TLR2. *Faseb J.* 2011 Dec;25(12):4162-73.
205. Cyrino LT AA, Joazeiro PP, Vicente CP, Giorgio S. In vivo and in vitro *Leishmania amazonensis* infection induces autophagy in macrophages. *Tissue Cell.* 2012;44(6):6.
206. Pereira RM, Teixeira KL, Barreto-de-Souza V, Calegari-Silva TC, De-Melo LD, Soares DC, et al. Novel role for the double-stranded RNA-activated protein kinase PKR: modulation of macrophage infection by the protozoan parasite *Leishmania*. *Faseb J.* 2010 Feb;24(2):617-26.
207. Aga E, Katschinski DM, van Zandbergen G, Laufs H, Hansen B, Muller K, et al. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. *J Immunol.* 2002 Jul 15;169(2):898-905.
208. Daboul MW. Role of neutrophils in cutaneous leishmaniasis. *East Mediterr Health J.* 2010 Oct;16(10):1055-8.
209. Tudan C, Fong D, Duronio V, Burt HM, Jackson JK. The inhibition of spontaneous and tumor necrosis factor-alpha induced neutrophil apoptosis by crystals of calcium pyrophosphate dihydrate and monosodium urate monohydrate. *J Rheumatol.* 2000 Oct;27(10):2463-72.
210. Aaron Ruhland NLaPEK. *Leishmania* promastigots activate PI3K/Akt signalling to confer host cell resistance to apoptosis. *Cellular Microbiology.* 2007;10(1111).
211. Varela MR, Munoz DL, Robledo SM, Kolli BK, Dutta S, Chang KP, et al. *Leishmania (Viannia) panamensis*: an in vitro assay using the expression of GFP for screening of antileishmanial drug. *Exp Parasitol.* 2009 Jun;122(2):134-9.
212. Williams BR. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene.* 1999 Nov 1;18(45):6112-20.
213. Mollinedo F. Antitumor ether lipids: proapoptotic agents with multiple therapeutic indications. *Expert Opin Ther Patents.* 2007;17:385-405.
214. Lopez Kostka S, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, von Stebut E. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol.* 2009 Mar 1;182(5):3039-46.
215. Kuerschner L, Richter D, Hannibal-Bach HK, Gaebler A, Shevchenko A, Ejsing CS, et al. Exogenous ether lipids predominantly target mitochondria. *PLoS One.* 2012;7(2):e31342.

216. Matsuyama S, Xu Q, Velours J, Reed JC. The Mitochondrial F₀F₁-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol Cell*. 1998 Feb;1(3):327-36.
217. Roy A, Ganguly A, BoseDasgupta S, Das BB, Pal C, Jaisankar P, et al. Mitochondria-dependent reactive oxygen species-mediated programmed cell death induced by 3,3'-diindolylmethane through inhibition of F₀F₁-ATP synthase in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Mol Pharmacol*. 2008 Nov;74(5):1292-307.
218. Bernardi P. Modulation of the mitochondrial cyclosporin A-sensitive permeability transition pore by the proton electrochemical gradient. Evidence that the pore can be opened by membrane depolarization. *J Biol Chem*. 1992 May 5;267(13):8834-9.
219. Saint-Pierre-Chazalet M, Ben Brahim M, Le Moyec L, Bories C, Rakotomanga M, Loiseau PM. Membrane sterol depletion impairs miltefosine action in wild-type and miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Nov;64(5):993-1001.
220. Pettus BJ, Chalfant CE, Hannun YA. Ceramide in apoptosis: an overview and current perspectives. *Biochim Biophys Acta*. 2002 Dec 30;1585(2-3):114-25.
221. Salcedo M, Cuevas C, Alonso JL, Otero G, Faircloth G, Fernandez-Sousa JM, et al. The marine sphingolipid-derived compound ES 285 triggers an atypical cell death pathway. *Apoptosis*. 2007 Feb;12(2):395-409.
222. Moreno SN, Docampo R. Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr Opin Microbiol*. 2003 Aug;6(4):359-64.
223. Sen N, Das BB, Ganguly A, Mukherjee T, Bandyopadhyay S, Majumder HK. Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*. 2004 Dec 10;279(50):52366-75.
224. Luque-Ortega JR, Reuther, P., RIVAS, L., and Dardonville, C. New benzophenone-derived bisphosphonium salts as leishmanicidal leads targeting mitochondria through inhibition of respiratory complex II. *Journal Medical Chemistry* 2010;53:1788-98.
225. Cuvillier O. Downregulating sphingosine kinase-1 for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2008 Aug;12(8):1009-20.
226. Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, et al. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*. 1996 Jun 27;381(6585):800-3.
227. Bonhoure E, Pchejetski D, Aouali N, Morjani H, Levade T, Kohama T, et al. Overcoming MDR-associated chemoresistance in HL-60 acute myeloid leukemia cells by targeting sphingosine kinase-1. *Leukemia*. 2006 Jan;20(1):95-102.
228. Cuvillier O, Ader I, Bouquerel P, Brizuela L, Malavaud B, Mazerolles C, et al. Activation of sphingosine kinase-1 in cancer: implications for therapeutic targeting. *Curr Mol Pharmacol*. 2010 Jun;3(2):53-65.
229. Pitman MR, Pitson, S. M. Inhibitors of the sphingosine kinase pathway as potential therapeutics. *Curr Cancer Drug Targets* 2010(10):354-67.
230. Zhang K, Bangs JD, Beverley SM. Sphingolipids in parasitic protozoa. *Adv Exp Med Biol*. 2010;688:238-48.
231. Xiao Y ZY, Su H, Zhou Z, Chiao P, Zhong G. NF-kappa B activation is not required for *Chlamydia trachomatis* inhibition of host epithelial cell apoptosis. *Journal of Immunology*. 2005;1(174(3)):1701-8.
232. Sukumaran SK, Selvaraj, S.K., Prasadarao, N.V. Inhibition of apoptosis by *Escherichia Coli* K1 is accompanied by increased expression of BclXL and blockade of mitochondrial cytochrome c release in macrophages. *Infection and Immunity*. 2004;72:6012-22.

233. Park JS, Tamayo, M.H., Gonzalez-Juarrero, M., Orme, I.M., Ordway, D.J. Virulent clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* grow rapidly and induce cellular necrosis but minimal apoptosis in murine macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*. 2006;79:80-6.
234. Nash PB, Purner, M.B., Leon, R.P., Clarke, P., Duke, R.C., Curiel, T.J. *Toxoplasma gondii*-infected cells are resistant to multiple inducers of apoptosis. *Journal of Immunology*. 1998;160:1824-30.
235. van de Sand C, Horstmann, S., Schmidt, A., Sturm, A., Bolte, S., Krueger, A., Lutgehetmann, M., Pollok, J.M., Libert, C., Heussler, V.T. The liver stage of *Plasmodium berghei* inhibits host cell apoptosis. *Molecular Microbiology*. 2005;58:731-42.
236. Moore KJ, Turco SJ, Matlashewski G. *Leishmania donovani* infection enhances macrophage viability in the absence of exogenous growth factor. *J Leukoc Biol*. 1994 Jan;55(1):91-8.
237. Song G, Ouyang, G., Bao, S. The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. 2005;9:59-71.
238. Chen C, Edelstein, L.C., Gelinas, C. The Rel/NF-kappaB family directly activates expression of the apoptosis inhibitor Bcl-X_L. *Molecular and Cellular Biology*. 2000;20:2697-5.
239. Jaramillo M, Gomez MA, Larsson O, Shio MT, Topisirovic I, Contreras I, et al. *Leishmania* repression of host translation through mTOR cleavage is required for parasite survival and infection. *Cell Host Microbe*. 2011 Apr 21;9(4):331-41.
240. Deretic V, Delgado M, Vergne I, Master S, De Haro S, Ponpuak M, et al. Autophagy in immunity against *mycobacterium tuberculosis*: a model system to dissect immunological roles of autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;335:169-88.
241. Ke PY, Chen SS. Autophagy: a novel guardian of HCV against innate immune response. *Autophagy*. 2011 May;7(5):533-5.
242. Ke PY, Chen SS. Activation of the unfolded protein response and autophagy after hepatitis C virus infection suppresses innate antiviral immunity in vitro. *J Clin Invest*. 2011 Jan;121(1):37-56.
243. Gutierrez MG, Vazquez CL, Munafo DB, Zoppino FC, Beron W, Rabinovitch M, et al. Autophagy induction favours the generation and maturation of the *Coxiella*-replicative vacuoles. *Cell Microbiol*. 2005 Jul;7(7):981-93.
244. Shintani T, Klionsky DJ. Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science*. 2004 Nov 5;306(5698):990-5.
245. Sato K, Tsuchihara, K., Fujii, S., Sugiyama, M., Goya, T., Atomi, Y., Ueno, T., Ochiai, A., Esumi, H. Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. *Cancer Research*. 2007;67(20):9677-84.
246. Wang YH, Wu JJ, Lei HY. The autophagic induction in *Helicobacter pylori*-infected macrophage. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2009 Feb;234(2):171-80.
247. Domingo-Gil E, Perez-Jimenez E, Ventoso I, Najera JL, Esteban M. Expression of the E3L gene of vaccinia virus in transgenic mice decreases host resistance to vaccinia virus and *Leishmania major* infections. *J Virol*. 2008 Jan;82(1):254-67.
248. Cheung BK, Lee DC, Li JC, Lau YL, Lau AS. A role for double-stranded RNA-activated protein kinase PKR in *Mycobacterium*-induced cytokine expression. *J Immunol*. 2005 Dec 1;175(11):7218-25.
249. Wu K, Koo J, Jiang X, Chen R, Cohen SN, Nathan C. Improved control of tuberculosis and activation of macrophages in mice lacking protein kinase R. *PLoS One*. 2012;7(2):e30512.
250. Calegari-Silva TC, Pereira RM, De-Melo LD, Saraiva EM, Soares DC, Bellio M, et al. NF-kappaB-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. *Immunol Lett*. 2009 Dec 2;127(1):19-26.