

ADAPTABILIDAD DE *LEISHMANIA* Y SU IMPLICACIÓN EN LA RESISTENCIA A DROGAS (*)

Alicia Ponte-Sucre

RESUMEN

El fracaso terapéutico es un fenómeno multifactorial no siempre vinculado a la resistencia a drogas del parásito infectante. Hay determinantes de flexibilidad en *Leishmania* que condicionan este fracaso y modulan la expresión de la quimioresistencia. Los estudios presentados consolidan el concepto de que la quimioresistencia en *Leishmania* incluye, además del aumento de la expresión de transportadores ABC, alteración de funciones del parásito como la infectividad (fosfatasa ácida y proteína meta-1), el metabolismo intracelular y la fosforilación oxidativa (aminoácidos y carbohidratos fundamentales para la supervivencia), la interacción hospedero-parásito (aglutinación por lectinas, potencial de membrana) y la morfología del organismo. La comprensión de la adaptación asociada al fenotipo quimioresistente es esencial en el desarrollo de herramientas para el control de la enfermedad, especialmente en zonas geográficas donde la resistencia a drogas es un problema clínico común. El objetivo de esta investigación ha sido validar marcadores celulares en parásitos provenientes de pacientes con fracaso terapéutico tratados con drogas clásicas usadas contra la leishmaniasis. Su valor pronóstico para el éxito del tratamiento podría ser esencial en un mundo de quimioresistencia emergente.

ABSTRACT

Therapeutic failure is a multifactorial phenomenon, not always linked to drug resistance from the infecting parasite. In *Leishmania*, determinants of flexibility condition therapeutic failure and may modulate chemo-resistance. Herein I present studies that consolidate the concept that chemo-resistance includes in *Leishmania*, additionally to an increase in the expression of ABC transporters, changes in functions such as parasite infectivity (acid phosphatase and meta-1 expression), intracellular metabolism and oxidative phosphorylation (amino acids and carbohydrates fundamental for parasite survival), host-parasite interaction (lectin agglutination and membrane potential) and organism morphology. The comprehension of the adaptability expressed by chemo-resistance is essential for the development of tools for disease control, especially in geographic zones where drug resistance is a clinical problem. The goal of the herein presented investigation was to validate cellular markers in parasites isolated from patients with chemotherapeutic failure against classical leishmanicidal drugs. Their prognostic value for treatment success might be essential in world with emergent chemo-resistance.

Palabras clave: *Leishmania*, adaptabilidad, fracaso terapéutico, resistencia a drogas, marcadores celulares.

Keywords: *Leishmania*, fitness, therapeutic failure, drug resistance, cellular markers

1. Introducción

Catalogada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como enfermedad infecciosa Categoría I -situación emergente e incontrolada e incluida en la lista de enfermedades tropicales desatendidas, NTD [1]-, la leishmaniasis es endémica en 98 países; 14 millones de personas permanecen infectadas y más de 350 millones se encuentran en riesgo [2]. Alrededor de 1,3 millones de personas contraen la enfermedad anualmente; 300.000 casos corresponden a leishmaniasis visceral (LV, con 90 % de pacientes en Bangladesh, Brasil, Etiopía, India, Nepal y

Sudán) y 1.000.000 corresponden a leishmaniasis tegumentaria (LT, principalmente en Afganistán, Arabia Saudita, Argelia, Bolivia, Brasil, Colombia, Irán, Pakistán, Perú, Siria y Túnez). El estimado de muertes por LV oscila entre 20.000 y 50.000 fallecidos cada año [1]. Estas cifras constituyen la *punta del iceberg*, ya que sólo 40 de los 98 países donde la enfermedad es endémica reportan adecuadamente sus estadísticas sanitarias a la OMS [1].

Los protozoarios del género *Leishmania* producen diversas manifestaciones de la enfermedad. Los síntomas están

(*) Trabajo de Ingreso como requisito parcial para optar a Miembro Correspondiente Nacional de la Academia de Ciencia Físicas, Matemáticas y Naturales.

determinados por factores ligados al hospedero y a la especie infectante [3]. Clínicamente se han descrito dos categorías de la dolencia, ya mencionadas: LV, causada por especies viscerotrópicas, que se desarrollan mejor a temperaturas superiores a 37 °C, y LT, causada por especies dermatotrópicas, adaptadas a temperaturas cercanas a 35 °C; estas últimas crecen preferencialmente en áreas expuestas de la piel y mucosas [4, 5]. En el Nuevo Mundo, la LT se conoce como Leishmaniasis Tegumentaria Americana (LTA) [6], y puede presentarse como: Leishmaniasis Cutánea Localizada (LCL), Leishmaniasis Cutánea Diseminada (LD), Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD) y Leishmaniasis Mucocutánea (LMC) [4, 6, 7]. Una forma poco común de LT frecuente en pacientes de India, Nepal, Sudán y Etiopía, ocurre luego de tratamientos repetidos e ineficaces contra LV. La misma se denomina Leishmaniasis Dérmica Post kala-azar (LDPK), y está asociada a infecciones recurrentes con *L. donovani* [3].

El estatus inmunológico del paciente determina en gran medida el tipo de leishmaniasis que lo afecta. Individuos anérgicos, sin respuesta inmunológica adecuada, desarrollan LCD, con abundancia de parásitos en las lesiones [7]. Personas normérgicas, con reactividad inmunológica normal, suelen desarrollar LCL, benigna y autolimitante; individuos hipérgicos, con hiperreactividad inmunitaria a los parásitos, desarrollan LMC, lesiones amplias, escasa presencia de parásitos y abundante infiltrado celular [8].

La coinfección *Leishmania*-VIH constituye un problema recurrente. Muchos casos están asociados con LV, mas también se reportan casos de LT [9]. Incluso especies de *Leishmania* típicamente dermatotrópicas, producen LV en pacientes portadores del virus [9, 10]. Ambos patógenos actúan sinérgicamente, favoreciendo la infección recíproca; i.e., el lipofosfoglicano de la membrana celular de *L. donovani* induce la transcripción de VIH *in vitro* en células T-infectadas, mediado por el factor nuclear kappaB [10]. Individuos inmunodeficientes son más vulnerables a leishmaniasis y el riesgo de infección por *Leishmania* spp. es 100-1.000 mayor [7].

En Venezuela, el programa de control de leishmaniasis es responsabilidad del Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina (SAIB), ente adscrito al Ministerio del Poder Popular para la Salud con sede en la ciudad de Caracas [11]. El SAIB dirige, a nivel nacional, los Servicios Regionales de Dermatología Sanitaria, destacados en cada entidad federal.

La LV tiene escasa incidencia en Venezuela (0,03 a 0,24 por cada 100.000 habitantes) [12], a pesar del subregistro [13]. El principal foco se ubica en Nueva Esparta, área geográfica donde el ciclo de vida ha podido trazarse para *L. infantum*,

incluyendo al perro como reservorio y a *Lutzomyia longipalpis* como vector [12, 14]. La LT, constituye un problema de salud pública [12]. Para el período 1990-2018, hubo un total de 66.550 casos en las diversas formas clínicas, con una tasa de incidencia anual que varió entre un mínimo de 5,3 por cada 100.000 habitantes (2014) y un máximo de 12,0 por cada 100.000 habitantes (1992). La LT representa el 99,2 % de los casos reportados cada año, de los cuales 98,00 % corresponden a LCL; 1,04 % LMC y 0,22 % LCD [15].

La incidencia de LT por entidad federal se agrupa en cuatro regiones epidemiológicas: una de alta incidencia (Trujillo y Mérida), con tasas superiores a 30 casos por cada 100.000 habitantes; una segunda región de mediana incidencia (Lara, Sucre, Táchira y Cojedes), con tasas de 20 a 30 casos por cada 100.000 habitantes; una tercera región de baja incidencia (Yaracuy, Miranda y Anzoátegui), con tasas de 10 a 20 casos por cada 100.000 habitantes; y finalmente, el resto de las entidades con escasa incidencia y tasas inferiores a 10 por cada 100.000 habitantes (**Figura 1**) [16].

El 17,89 % de la población, que habita en el 26,88 % de las parroquias del país, está en riesgo moderado a alto de contraer la enfermedad, siendo las zonas montañosas las más afectadas [13, 15]. Durante el período 2000-2013 se diagnosticaron 36 casos de coinfección *Leishmania*/VIH. Un 81 % presentó LT, predominantemente LCL y LMC; las entidades federales más afectadas fueron Bolívar (31 %), Anzoátegui (22 %), Lara (14 %) y Aragua (11 %).

Los esquemas terapéuticos contra la leishmaniasis están en constante revisión y se aplican acorde a la forma clínica, número y localización de lesiones, especie de *Leishmania*, ubicación geográfica, disponibilidad de medicamentos, factores relacionados con el paciente y consideraciones de

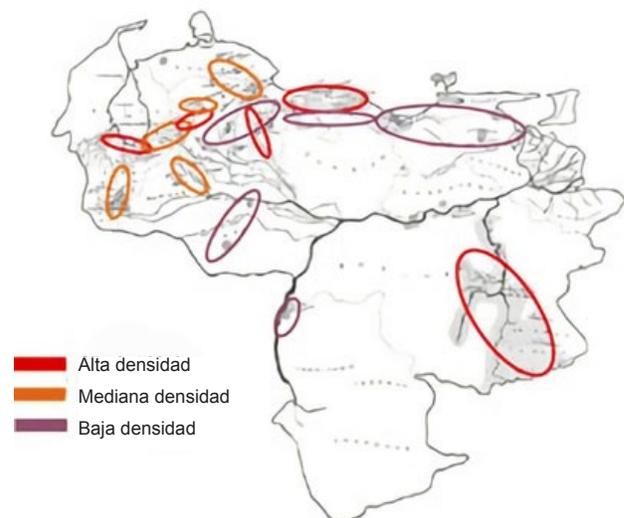


Figura 1. Densidad de distribución de leishmaniasis tegumentaria (LT) en Venezuela.

salud pública [1, 17]. En marzo de 2010, la OMS reunió a un “Comité de Expertos en Leishmaniasis” y revisó las recomendaciones sobre el tratamiento y control publicadas en 1990. Como resultado se publicó “*WHO Technical Report Series, 949 - Control of the Leishmaniasis*” [2], actualizada por la Organización Panamericana de la Salud [17], mediante la guía titulada “Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento”, con los esquemas terapéuticos más efectivos en el Nuevo Mundo.

2. Concepto de adaptabilidad

La adaptabilidad (*fitness* en inglés) de un patógeno involucra procesos biológicos que aseguran su supervivencia, reproducción y transmisión al siguiente hospedero. El tratamiento farmacológico promueve la selección de los organismos más flexibles, capaces de sobrevivir en estas condiciones.

En este contexto el fracaso terapéutico es un fenómeno multifactorial no siempre vinculado exclusivamente a la resistencia a drogas del parásito infectante. Adicionalmente, hay determinantes de flexibilidad en *Leishmania* que pueden condicionar este fracaso y modular la expresión de la quimioresistencia. De allí la importancia de la información clínica detallada sobre el paciente, su estado inmunológico y factores relacionados, que afectan la relación hospedero-parásito, la cinética de la infección, la progresión de la enfermedad y el éxito del tratamiento [18].

En parásitos, el término “pericia” y los cambios fisiológicos asociados son motivo de discusión. Por ejemplo, en los apicomplexa, en aislados de *S. mansoni* con respuesta disminuida al praziquantel, hay menor eficiencia reproductiva y capacidad comprometida de competir con otros aislados. [19] Un escenario similar ocurre en especies de *T. gondii* que expresan una mutación de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) [20].

En *P. chabaudi* se ha descrito que un mutante resistente a pirimetamina crece más lentamente que su progenitor susceptible a la droga, al replicarse en su presencia; se desarrolla más rápido al ser sembrado en ausencia de la droga [21]. Estos datos sugieren la existencia de mutaciones compensatorias que permiten al parásito lograr una vida “exitosa” en circunstancias adversas. Mutaciones compensatorias se han descrito en plasmodio resistentes a cloroquina [21].

En *Leishmania*, la virulencia, fundamental para la supervivencia y la patogénesis de *Leishmania* en el vector y en el mamífero [22], ha sido un marcador por excelencia de la “pericia” del parásito. La virulencia incluye marcadores cuya merma resulta en la pérdida cuantitativa parcial de la infectividad, y otros vinculados al crecimiento y diferenciación

en cultivo [22, 23]. En *Leishmania*, la adaptabilidad ha sido asociada al concepto de muerte celular programada, mecanismo que garantiza la supervivencia del más apto para lograr la transmisión exitosa al próximo hospedero [24]. Se asume que, si la adaptación representa un conflicto que compromete propiedades fisiológicas intrínsecas de supervivencia del parásito, se paga un costo. Sin embargo, como los tripanosomatídeos son expertos en adaptar fácil y rápidamente su metabolismo energético, y abreviar las condiciones de estrés a las que están constantemente sometidos, incluyendo las impuestas por la presión de la droga, la quimioresistencia puede o involucrar un “costo” (detrimento en su “pericia”) o implicar un beneficio para su “pericia”, tal y como explicaremos posteriormente. La adaptabilidad de un organismo como *Leishmania* además depende de factores adicionales a los intrínsecos que incluyen el estatus nutricional del hospedero, su “salud” inmunológica; la existencia de nichos crípticos; y cambios moduladores adicionales [25].

La interacción entre estos determinantes es compleja y su resultado, la capacidad del parásito de ser transmitido exitosamente al nuevo hospedero, es lo que se determina [24]. Esta propiedad se evidencia en la interfase dinámica que mantiene la integridad del organismo y garantiza una estrecha comunicación entre patógeno y hospedero. Las drogas modulan esa interfase ya que su presencia altera dramáticamente el panorama de adaptabilidad, seleccionando subpoblaciones de parásitos que, debido a sus características fisiológicas, sobreviven a la presión de la droga.

3. Fracaso terapéutico vs. resistencia

Dos de las principales quimioterapias contra leishmaniasis han evidenciado en décadas recientes (en el subcontinente Indio y otras áreas endémicas), la disminución de su eficacia efectiva; este hecho resalta la urgente necesidad de reevaluar las indicaciones de terapia a nivel mundial. El fracaso de la terapia, no siempre está vinculado a la resistencia a drogas del parásito infectante, aunque la quimioresistencia es un determinante fundamental del mismo. La **Figura 2** describe brevemente algunos de los parámetros que condicionan el fracaso terapéutico y modulan la quimioresistencia [25-28].

En el panorama que asocia fracaso terapéutico y quimioresistencia, la flexibilidad del parásito y su “pericia” en adaptarse a ambientes retadores juega un rol fundamental. Por ello, la descripción precisa de qué consideramos resistencia a drogas y cómo la identificamos en aislados clínicos es un desafío para el control y tratamiento de la enfermedad [29].

La resistencia a drogas se define como la disminución de la eficacia a los fármacos en una población previamente susceptible a los mismos. Esta definición asume que se

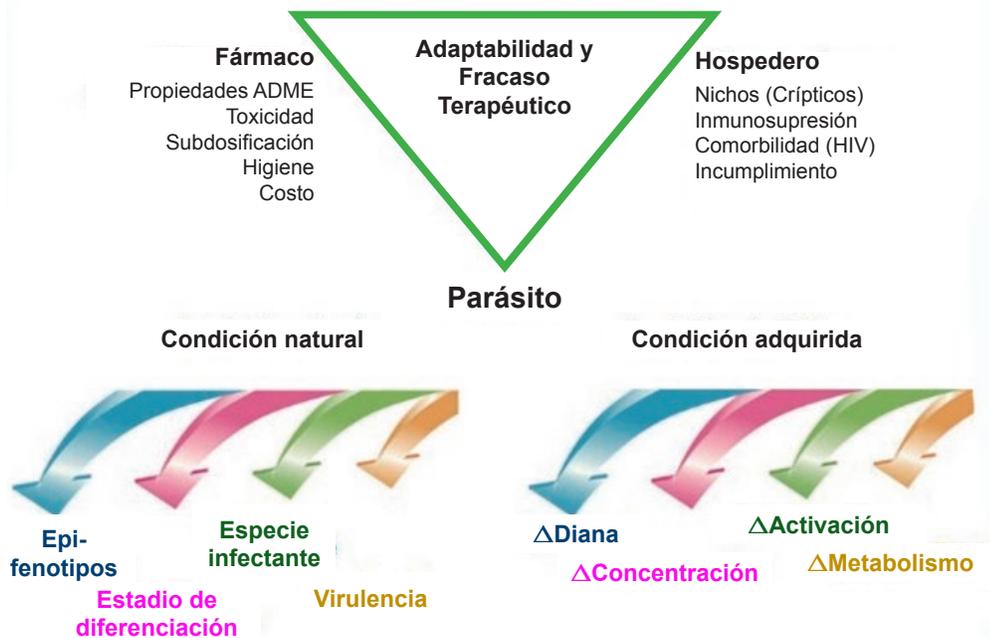


Figura 2. Determinantes de la adaptabilidad de *Leishmania* y su vínculo con fracaso terapéutico. Δ = cambio en la función reseñada. ADME: absorción, distribución, metabolismo y excreción de un fármaco. Tomado de [25]. Reproducido con permiso de la Revista Dermatológica Venezolana.

conoce la susceptibilidad inicial, situación que no siempre se cumple para *Leishmania* [30], parásito en el cual se ha descrito quimioresistencia, natural, como la que presenta *L. (V.) braziliensis* al ketoconazol, y adquirida, promovida por dosis subóptimas de fármacos que seleccionan los parásitos aptos para vivir en condiciones de estrés [31].

Los transportadores ABC (por ATP binding cassette) son proteínas celulares fundamentales cuya función está asociada a la quimioresistencia. Utilizan energía de la hidrólisis del ATP y disminuyen los niveles citoplasmáticos de sus sustratos, entre ellos drogas y fármacos. Dos clases de genes relacionados con transportadores ABC se han identificado en *Leishmania* [30]: uno en el cual los parásitos resistentes presentan amplificación del círculo H, que codifica proteínas de transporte denominadas MRP (por *multidrug resistance associated protein*), diferentes a las P-gp, MDR (por *multidrug resistance*) [32], y otro tipo de genes asociado a la expresión de proteínas de transporte de drogas en células de mamíferos con fenotipo MDR [33].

Adicional a la menor acumulación celular de drogas, mediado por transportadores tipo ABC, hay alteraciones en la permeabilidad de la membrana plasmática que involucran cambios funcionales y bioquímicos. Por ejemplo, *L. mexicana* resistente a anfotericina-B y pentamidina presenta variaciones en los niveles de ácidos grasos saturados, en la fluidez de la membrana [34] y en la actividad de enzimas mitocondriales y la expresión de lipofosfoglicanos [35]. Esto sugiere múltiples mecanismos de quimioresistencia para un tipo de droga, hecho que suscita reacciones cruzadas y sugiere la coexistencia de variados mecanismos de resistencia en la misma célula, actuando sinérgicamente.

En conclusión, debido a su flexibilidad en condiciones de estrés, como es el caso de la presión constante de dosis subóptimas de fármacos, *Leishmania* adapta su metabolismo e infectividad e implementa mecanismos de supervivencia exitosa (i.e., se seleccionan parásitos quimioresistentes). Este proceso se acompaña de cambios fisiológicos como los resumidos en la **Figura 3**, que podrían ser utilizados como herramienta de pronóstico de la terapia a utilizar y, como marcadores de resistencia.

4. Marcadores de resistencia

El método por excelencia para monitorear quimioresistencia en aislados de pacientes es el modelo *in vitro* amastigote-macrófago, técnica laboriosa, que arroja resultados en aproximadamente una semana, tiempo crucial para el paciente. Este hecho, aunado al aumento de la incidencia de casos de leishmaniasis con fracaso terapéutico, urgen a buscar alternativas para identificar si la ineficacia terapéutica se debe a la infección por parásitos quimioresistentes o a causas imputables al hospedero. Es imprescindible entonces identificar marcadores moleculares, fáciles de utilizar en el laboratorio de rutina para guiar la terapia leishmanicida [18, 31]. Los cambios funcionales que ocurren en *Leishmania* asociados a la quimioresistencia, podrían potencialmente ser útiles como marcadores clínicos de infección por aislados resistentes [30, 31].

En el Laboratorio de Fisiología Molecular (LFM) de la Universidad Central de Venezuela se han evaluado fenómenos multifactoriales: genéticos, bioenergéticos y funcionales, cuyos cambios acompañan al fenotipo quimioresistente en modelos de infección. Adicionalmente, se han estandarizado metodologías sencillas y de fácil aplicación, como prueba de concepto de su

utilidad en la identificación de fracaso terapéutico causado por aislados resistentes. En este trabajo se presenta un recuento de lo explorado y su utilidad en este tema.

Primero definiremos operacionalmente la quimioresistencia. Una población de patógenos es quimioresistente cuando su susceptibilidad es menor a un valor determinado de una concentración (X) de una droga específica. Describir la concentración de droga que separa las poblaciones susceptibles de las no susceptibles (punto de corte) es un dilema. Esta(e)-concentración- punto de corte, para ser útil, debe estar fundamentada(o) en evidencias provenientes de múltiples ensayos, preferiblemente en aislados de pacientes. Su finalidad, informar a los médicos para el tratamiento, a los sistemas de salud pública para las políticas públicas, y a los epidemiólogos para definir los patrones y los desplazamientos de la susceptibilidad en el uso de las drogas. La **Figura 4** muestra un flujograma que define la secuencia de ensayos a realizar.

No está claro si los cambios fisiológicos evidenciados en los parásitos son esenciales para la expresión de quimioresistencia, o constituyen epifenómenos no relacionados con la misma. Tampoco lo está si los eventos dependen del parásito o son aspectos inherentes al paciente. Sin embargo, la comprensión de las características que definen a *Leishmania* quimioresistente parece esencial, especialmente en un contexto de investigación multidisciplinaria, transdisciplinaria y traslacional pues constituyen un elemento crucial en la identificación de alternativas terapéuticas, especialmente en escenarios donde la quimioresistencia es un reto constante debido al aumento de casos con fracaso terapéutico.

En el LFM se evaluaron herramientas potencialmente útiles en el laboratorio de rutina para identificar aislados quimioresistentes. Seguidamente se describen estos estudios en especies de referencia, y en tres aislados de pacientes, como prueba de concepto del valor de los mismos.

5. Marcadores evaluados

5.1 Susceptibilidad de *Leishmania* a diferentes compuestos

La susceptibilidad a drogas de los aislados clínicos sería la metodología óptima para predecir el resultado esperado del tratamiento. En este trabajo se incluyó este parámetro como punto de comparación con los otros marcadores a evaluar. Para estandarizar la metodología [27, 36], se utilizaron las especies de referencia de la OMS *L. braziliensis* (LTB300), *L. mexicana* (BEL21) y *L. amazonensis* (LTB0016) que son las que más frecuentemente se identifican en los pacientes en Venezuela. También se incluyó *L. major*, especie del Viejo Mundo causante de LCL como control del ensayo. Como medicamentos se emplearon dos de primera línea contra la leishmaniasis, pentamidina y anfotericina-B y se incluyó glibenclamida, un inhibidor clásico de transportadores ABC. No se utilizó glucantime. Los promastigotes de *Leishmania* son insensibles a este compuesto. Los antimoniales pentavalentes (SbV) son profármacos, requieren una reducción biológica a la forma trivalente (SbIII) para obtener actividad anti-*leishmania* [37]. La GI₅₀ (concentración que causa la inhibición del 50 % del crecimiento celular) se utilizó en lugar del IC₅₀ (concentración que inhibe la actividad biológica en un 50 %) ya que es un

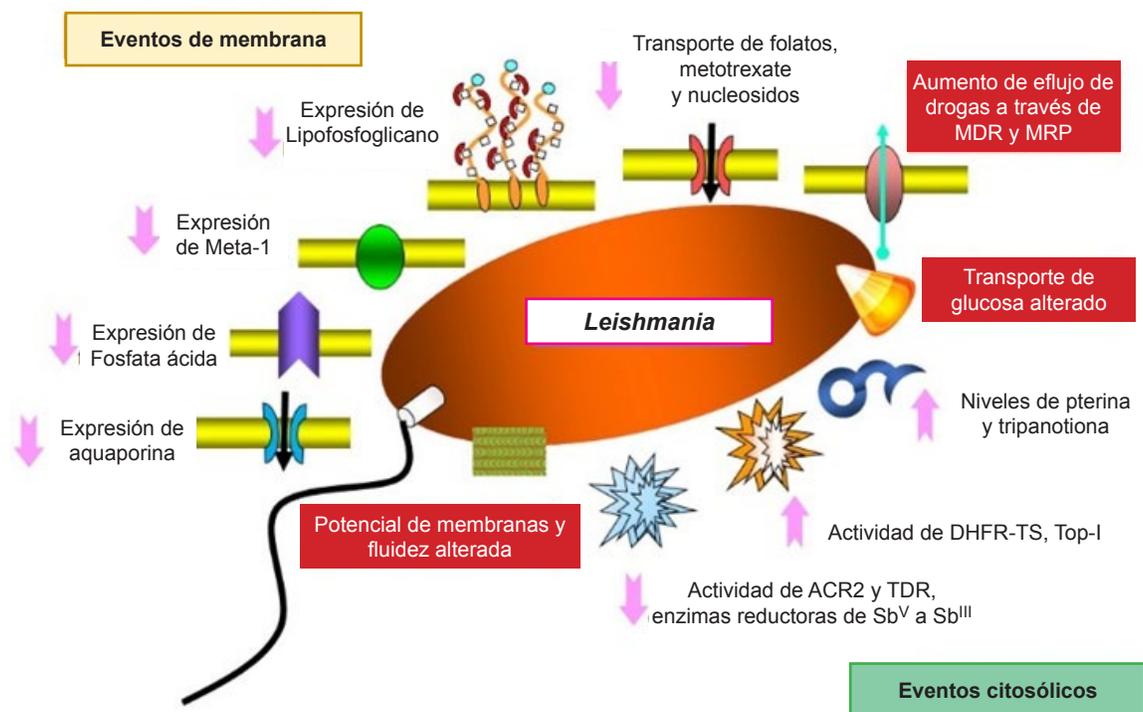


Figura 3. Mecanismos de resistencia en *Leishmania*. DHFR, dihidrofolato reductasa; TS, timidilato sintetasa; Top-I, topoisomerasa-; ACR2, reductasa de antimonio pentavalente; TDR, reductasa dependiente de thioles, modificado de [30]. Reproducido con permiso de Springer Verlag.

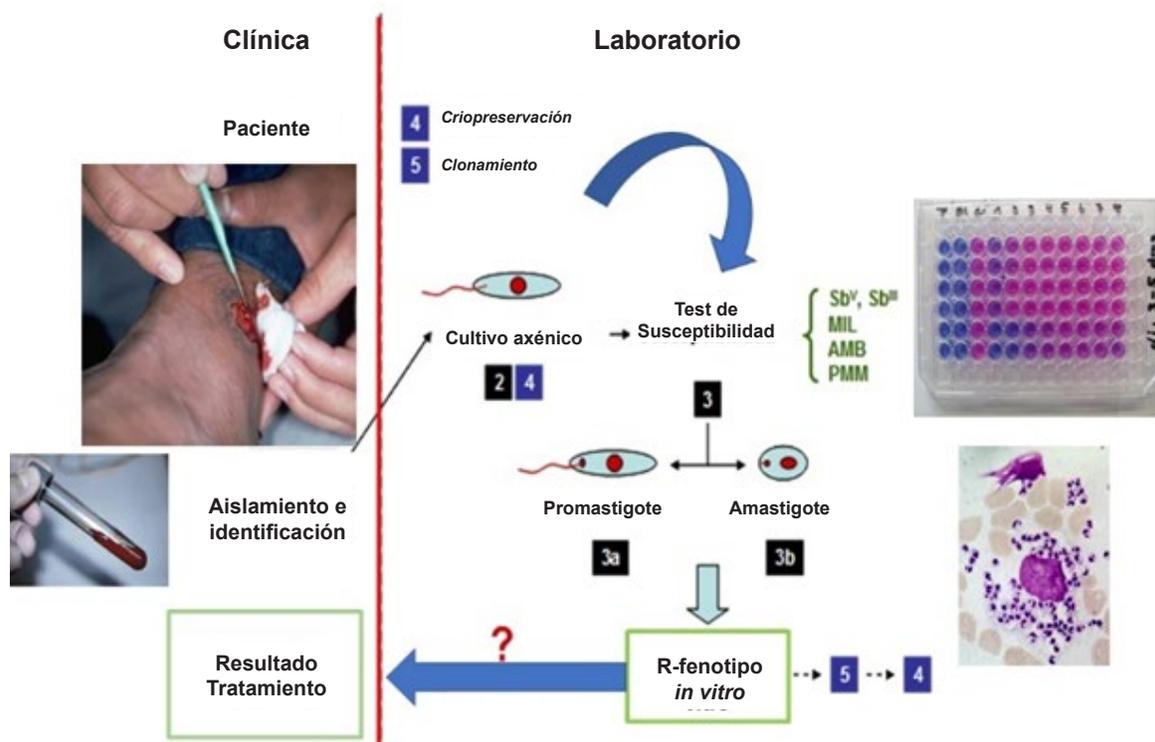


Figura 4. Flujograma de ensayos a realizar para definir la susceptibilidad de parásitos de *Leishmania* de referencia y aislados de pacientes con LV. Válido también para LT. (1) aislamiento del parásito del paciente; (2) cultivo axénico, (3) criopreservación, y (4) clonamiento, del parásito; (5) test de susceptibilidad en promastigotes y amastigotes

parámetro biológicamente adecuado puesto que se evalúa inhibición de crecimiento [38].

Los resultados (ver **Tabla 1**) sugieren [27] que las especies de referencia son susceptibles a anfotericina-B (LTB0016 > LTB300 > Bel21 > *L. major*) en el rango micromolar ($\mu\text{mol/L} = \mu\text{M}$). Para pentamidina, la susceptibilidad difiere (LTB300 > Bel21 > LTB0016 > *L. major*). Con base en estos resultados, y puesto que *L. mexicana* y *L. amazonensis* son responsables de la mayoría de los casos de LCD en Venezuela, los siguientes ensayos se realizaron con *L. mexicana* Bel 21, *L. amazonensis* LTB0016 o sucedaneos.

5.2 Diferenciación y metaciclologénesis de *Leishmania*

La diferenciación celular -o metaciclologénesis- es el proceso mediante el cual ocurren modificaciones coordinadas

Tabla 1. GI₅₀ de las especies de referencia a las 72 horas.

Especie	Glibenclamida (μM)	Pentamidina (μM)	Anfotericina-B (μM)
LTB300	38	1,75	0,25
Bel21	75	4,56	1,05
LTB0016	13,28*	8,84	0,089**
<i>L. major</i>	70	ND	1,5

GI₅₀, Concentración Inhibitoria de crecimiento celular 50. * Tomado de [39]; **Silva-López no publicado. Tomado de [27]. Reproducido con permiso de Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica.

del metabolismo y la morfología de *Leishmania* que se correlacionan con la transformación de los parásitos a infectivos. La metaciclologénesis está vinculada a lapsos específicos de la cinética de crecimiento y a la densidad celular, que pueden emularse *in vitro* al pasar los parásitos de fase logarítmica a fase estacionaria, fase en la cual, la forma recuerda ampliamente la fase metacíclica de crecimiento observada *in vivo*.

Alteraciones de la cinética de crecimiento podrían representar cambios en la diferenciación y virulencia celular; a su vez podrían estar influenciados por la quimioresistencia; i.e., en aislados de pacientes con LV, infectados con *L. donovani* resistentes a antimoniales, se ha demostrado *in vitro*, una mayor tasa de metaciclologénesis [40]. Por el contrario, en *L. amazonensis* se demostró que la quimioresistencia se asocia a menores tasas de metaciclologénesis [41, 42] y que la cinética de crecimiento difiere entre parásitos quimiosensibles y quimioresistentes [36, 43].

La divergencia de comportamiento entre las especies de *Leishmania* permite intuir el rol de la diversidad de especies en el espectro clínico de la enfermedad y su respuesta a la presión de la quimioterapia; adicionalmente sugiere que la adaptabilidad de los parásitos en condiciones de estrés es amplia y se traduce en ganancia o costo, en la pericia, dependiendo de la especie en estudio. Existen ejemplos en los cuales el cultivo de parásitos quimioresistentes en ausencia de drogas,

produce un rebote de crecimiento con fases logarítmicas más veloces que las evidenciadas en organismos silvestres [40, 44]. Esto permitiría suponer un retorno al fenotipo original y dudar de si la modificación de comportamiento observada es persistente, o si realmente estamos en presencia de un ejemplo de flexibilidad del organismo estudiado. *Leishmania* exhibe amplios rangos de velocidad de replicación, aún en ausencia de cambios genéticos asociados a quimioresistencia; es decir, la velocidad de replicación y los cambios de la misma, constituyen parámetros cuya alteración no necesariamente está vinculada a la quimioresistencia. Las variaciones en el crecimiento por tanto podrían no ser predictivas de la “pericia” del parásito.

Los parásitos metacíclicos son pequeños y delgados [42], y expresan carbohidratos de superficie característicos del estadio de desarrollo del parásito. En el LFM se evaluaron algunos de estos parámetros como potenciales marcadores de quimioresistencia. Nuestros resultados demuestran cómo *L. mexicana* resistente [NR(Gr)] a glibenclamida, un inhibidor de transportadores ABC, presenta una mayor área tanto en fase exponencial y estacionaria de crecimiento, que los parásitos sensibles [41, 42], igual que en otras especies de *Leishmania*. [44]. NR(Gs) fue aislada de un paciente y adaptada al laboratorio; en el LFM se indujo resistencia al inhibidor de transportadores ABC, la glibenclamida [NR(Gr)].

Los parásitos quimioresistentes en fase estacionaria son menos susceptibles al ataque por el complemento del suero humano que las células sensibles; esto sugiere una modificación de la expresión de los carbohidratos de superficie [41, 42, 44]. Nuestros datos demuestran que *L. mexicana* quimioresistente expresa menos META-1 que las células quimiosensibles [41, 42]. META-1, producto del gen meta-1 fue descrito originalmente en *L. major* [45], está muy conservado en leishmanias del Viejo y Nuevo Mundo, predominantemente expresado en parásitos metacíclicos [46.] Los resultados sugieren que este parámetro podría formar parte de una batería de marcadores de quimioresistencia en aislados de pacientes infectados con *Leishmania*, con fracaso terapéutico; sin embargo, se necesita más de una semana para la obtención de resultados, un obstáculo para su implementación en laboratorios de rutina.

5.3 Funcionalidad de transportadores ABC

La variabilidad en la respuesta clínica a SbV ha sido un reto persistente en el tratamiento contra *Leishmania* durante los últimos 60 años. La falta de respuesta de los parásitos podría estar relacionada con características intrínsecas de los mismos [47], o con una condición adquirida promovida por la presión de la droga [38], que se traduce en la expresión exacerbada de sistemas de transporte especializados en disminuir la concentración efectiva del compuesto a nivel intracelular.

De hecho, transportadores ABC ubicados en la membrana plasmática o en la membrana de los sistemas vesiculares intracelulares modulan los niveles citoplasmáticos de SbV [48, 49], lo que sugiere que los transportadores ABC son cruciales para mantener un fenotipo quimioresistente. Este hecho se evaluó en el LFM para constatar su utilidad como marcadores de quimioresistencia.

La función de los transportadores ABC en *L. amazonensis*, LTB0016 y su contraparte quimioresistente LTB160 se determinó en promastigotes incubados a concentraciones crecientes de calceína acetoximetilada (CAL-AM). Las pruebas fluorescentes utilizando CAL-AM, compuesto hidrófóbico no fluorescente, determinan la acumulación intracelular del compuesto (modificado a nivel del enlace acetoximetilado por esterasas citoplasmáticas no específicas), sustrato de transportadores ABC. La molécula resultante, calceína (CAL), es hidrofílica y altamente fluorescente [50, 51]. El aumento en la fluorescencia se midió en función del tiempo. Los ensayos de calibración y de expresión constitutiva de los transportadores ABC que mobilizan al sustrato neutro CAL-AM, más eficientemente (103x) en LTB160 que en LTB0016, y cómo la quimioresistencia induce la expresión de proteínas ABC que transfieren el sustrato aniónico CAL están disponibles en las publicaciones originales del LFM [36].

Rautio y colaboradores [52] definieron la fortaleza de los inhibidores de transportadores ABC como alta (A, con $IC_{50} < 1 \mu M$), media (M, con $1 \mu M < IC_{50} < 15 \mu M$) y baja (B, con $IC_{50} > 15 \mu M$). Esta escala permite establecer el tipo de transportadores preferencialmente expresado en un tipo celular, al utilizar inhibidores selectivos como ciclosporina-A (P-gp-MDR4) y verapamil (P-gp-MDR1), así como glibenclamida (MRP1). En el LFM se caracterizaron los transportadores ABC expresados en *L. amazonensis* mediante la retención de CAL-AM y CAL y su inhibición por estos sustratos/inhibidores. La **Tabla 2** resume cómo los sistemas de eflujo CAL-AM expresados constitutivamente en *L. amazonensis* tienen velocidades similares a los de *L. major*, *L. mexicana*, *L. (V.) braziliensis*, y *L. guyanensis* [36, 51]. Sugieren que la retención basal de CAL por LTB0016 fue 50 % mayor que por LTB160 ($p < 0,05$). La menor acumulación de CAL-AM y CAL se asocia con mayor expresión de transportadores ABC en *L. amazonensis* (quimioresistente), tal y como se ha descrito en varias especies de *Leishmania* [51, 53]. Dentro del rango de concentración utilizado, ciclosporina-A no incrementó la retención de CAL en *L. amazonensis*, resultado difícil de reconciliar con mecanismos de transporte de drogas a través de transportadores P-gp [54]. Los resultados indican que verapamil es un inhibidor tipo M para ambas especies y glibenclamida un inhibidor tipo M para LTB0016 y B para

Tabla 2. Inhibición de la retención de CAL por Ciclosporina A, Verapamil y Glibenclamida en LTB0016 y LTB160

Inhibidor	Concentración μM para 50 % inhibición de retención de CAL	
	LTB0016	LTB160
Ciclosporina-A	n.d.	n.d.
Verapamil	3,00 \pm 0,80	14,00 \pm 4,00
Glibenclamida	60,00 \pm 26,00	128,00 \pm 36,00

n.d., no detectado, se utilizaron concentraciones hasta 100 μM ciclosporina A. Tomado de [36]. Reproducido con permiso de Elsevier.

LTB160. El verapamil interfiere con sustratos aniónicos transportados por transportadores MRP-1 en otros sistemas incluyendo humanos [55-57], e inhibe los transportadores expresados en *L. amazonensis*, presentados en este trabajo.

Estos resultados demuestran que los sistemas de transporte expresados en *Leishmania* tienen diferentes eficiencias y son sensibles a los inhibidores verapamil y glibenclamida, pero no al inhibidor de P-gp ciclosporina-A y confirman la expresión constitutiva en *Leishmania* spp. de sistemas que transportan compuestos neutros no metabolizados [50, 51] y sistemas MRP-1 que transfieren compuestos aniónicos, así como su regulación por quimioresistencia. Adicionalmente, indican que las estrategias metabólicas utilizadas por *Leishmania* quimioresistente divergen de las descritas para células de mamíferos resistentes a ácidos neutros y orgánicos. Finalmente, sugieren que la evaluación de la acumulación de CAL como ensayo cualitativo de la expresión y/o funcionalidad de los transportadores ABC es sencillo de implementar en el laboratorio de rutina y arroja resultados que permiten clasificarlo como un marcador celular interesante.

Si los resultados descritos resultan ciertos para todas las especies de *Leishmania*, este sería un marcador idóneo para el pronóstico de tratamiento. Adicionalmente sugerirían que la administración simultánea de compuestos terapéuticos con un bloqueador de transportadores ABC, que mantuviese suficientemente altos los niveles citoplasmáticos del medicamento, constituiría una estrategia terapéutica óptima para recuperar la susceptibilidad de *Leishmania* (resistente) a los fármacos. Estudios *in vivo* [59] han demostrado que la administración simultánea del bloqueador de transportadores ABC glibenclamida en combinación con glucantime aumenta la eficacia de este último y disminuye la tasa de infección de ratones BALB/c infectados con *Leishmania*. El secuestro de glucantime en organelos intracelulares mediado por transportadores ABC parece ser el mecanismo por el cual el nivel citoplasmático de la droga disminuye en los parásitos [60]. El bloqueo de estos transportadores ABC mantiene (o aumenta) los niveles terapéuticos citoplasmáticos de

glucantime. En el LFM analizamos la interacción sinérgica entre glucantime y el inhibidor de transportadores ABC, glibenclamida. La administración simultánea de ambos aumentó la eficacia de glucantime en la disminución de la tasa de infección de macrófagos infectados por *Leishmania*. La proporción de fármacos utilizada de forma combinada (3:2), corresponde a la usada en experimentos *in vivo* [59]. Adicionalmente, en experimentos de colocalización donde se exploraron los organelos intracelulares en los cuales se acumula la glibenclamida se demostró que el marcador fluorescente Bodipy-GLIB para glibenclamida, se acumuló en un sistema tubular intracelular que comienza en el extremo anterior de la célula y prosigue a lo largo del parásito; aquí también se acumuló el LysoTracker-rojo, asociado a compartimientos ácidos [61]. El doble marcaje sugiere que el compartimiento donde ambas sondas se acumulan constituiría el mismo donde se almacena glucantime. Datos no mostrados [62].

5.4 Preferencias de sustrato e incorporación de glucosa en parásitos quimioresistentes

En células de mamíferos resistentes a drogas las estrategias metabólicas asociadas a la quimioresistencia incluyen un aumento del transporte y metabolismo de glucosa y un aumento del consumo de oxígeno [63]. Nuestros resultados sugieren que en *Leishmania* las estrategias difieren de las usadas por las células de mamíferos [43, 64].

En el LFM se caracterizó el transporte de glucosa en parásitos quimiosensibles y quimioresistentes. Se utilizó inicialmente NR(Gs) y su contraparte resistente [NR(Gr)]. Posteriormente se confirmaron los resultados en la especie de referencia, LTB0016 y su contraparte resistente, LTB160. El objetivo, estandarizar una metodología para evaluar el consumo de glucosa y comprobar su potencial uso como marcador de resistencia en aislados de pacientes [65].

Los resultados demuestran una mayor incorporación de glucosa y mayor expresión de una banda de 55 KDa, (transportador de glucosa) [64] en *L. mexicana* NR(Gs) vs. NR(Gr). Estos datos podrían explicar el comportamiento del flujo glicolítico en parásitos resistentes durante la fase exponencial de crecimiento y cómo, la diferenciación a fase estacionaria se traduce en una menor incorporación de glucosa y expresión de la banda de 55 KDa. Un metabolismo disminuido de glucosa se ha demostrado en otras especies de *Leishmania* al comienzo de la fase estacionaria [66]. En *Saccharomyces cerevisiae* una permeasa que permite la incorporación de glucosa está involucrada en resistencia pleiotrópica a drogas; su expresión aumenta la susceptibilidad a drogas incluso en especies inicialmente susceptibles [67]. La incorporación de glucosa en NR(Gs) y NR(Gr) es inhibida parcialmente por

citocalasina-B y floretina demostrando que el transporte de glucosa ocurre por difusión facilitada, al igual que en otras especies de *Leishmania* y *Trypanosoma brucei* [68, 69]. Los resultados sugieren la modulación de puntos de control que, dada la flexibilidad metabólica de *Leishmania* explicaría la incorporación diferencial de sustratos dependiendo de la fase de crecimiento, como respuesta fisiológica [30] al reto de la presión de la droga.

En las especies de *L. amazonensis* LTB0016 y LTB160 [36] se constató que sin disminución aparente del crecimiento de los parásitos quimioresistentes (LTB160), aunque si de su velocidad de replicación, hay una menor incorporación de glucosa, y una menor susceptibilidad de los parásitos a antimetabolitos como 2-MA (un inhibidor de la acil-CoA deshidrogenasa) [69] y UL-2-DOG (análogo no metabolizable de la glucosa) [70], manteniendo los caracteres funcionales asociados al fenotipo infeccioso [42, 44, 71]. Estos resultados sugieren un cambio metabólico general asociado a la quimioresistencia en *L. amazonensis* el cual afecta, como en *L. mexicana* mutante para el transportador de glucosa, su capacidad de mantener la infección en el modelo murino [66]. La restitución genética por rescate con el transportador de glucosa LmGT3 restablece la infectividad en *L. mexicana*.

En células de mamíferos, la glibenclamida estimula la acumulación de glucosa [73] y estabiliza los transportadores de glucosa en la membrana plasmática [74]. La exposición de *L. major* o LTB0016 a glibenclamida disminuye dramáticamente la acumulación de glucosa [76] esta resulta 9 veces más lenta en LTB160 que en LTB0016; además, en LTB160 expuesta a glibenclamida es 2 veces más lenta que LTB0016 no expuesta a glibenclamida (Tabla 3). Estos resultados sugieren un mecanismo que difiere de lo que ocurre en mamíferos.

Finalmente, parásitos quimioresistentes en fase estacionaria utilizan mas amino ácidos como sustratos energéticos que parásitos quimiosensibles; expresan actividad aumentada de enzimas como la hexoquinasa, la fosfoglucoasa isomerasa y especialmente la enzima glutamato deshidrogenada (GDH) asociada a NAD⁺ (datos no mostrados) [36, 43]. Estos resultados sugieren que la resistencia a drogas activa el uso de la fosforilación oxidativa, la GDH regulada por NAD⁺ reorienta los metabolitos de los amino ácidos hacia el ciclo de Krebs [75] aunque la producción de ATP es similar en los parásitos sensibles y resistentes a drogas [76].

Estas observaciones implican que en parásitos en fase exponencial de crecimiento las actividades de las enzimas al comienzo de la vía glicolítica no dependen de la velocidad de incorporación de glucosa y por lo tanto no estarían relacionadas con la infectividad de la célula y sugieren que la

presión continua de las drogas induce al parásito a seleccionar vías metabólicas específicas que le permitan compensar los defectos primarios producidos por la presión de la droga; esto implica que en principio la evaluación de estos cambios en las vías metabólicas no servirían como predictores de resistencia a drogas.

A fin de analizar si en aislados de parásitos obtenidos de pacientes infectados existe una correlación entre el éxito de la terapia y la infección con parásitos quimioresistentes y una modulación de la tasa de incorporación de glucosa durante la fase exponencial de crecimiento, y debido a lo engorroso de los métodos aquí explicados, en el LFM se estandarizó una metodología basada en la determinación de glucosa en el sobrenadante del medio de cultivo a un tiempo determinado, mediante el método enzimático de Trinder, ampliamente descrita por Padrón-Nieves y Ponte-Sucre [65]. Posteriormente se presentarán datos obtenidos mediante este método.

5.5 Potencial de membrana

La diferencia en el potencial eléctrico (ΔV_m) a través de la membrana es una característica común de células procariotas y eucariotas. El ΔV_m es consecuencia de flujos iónicos (Na⁺, K⁺, H⁺, Cl⁻...) a través de las membranas, e involucra la acción de diferentes canales, transportadores y bombas [77, 78]. En reposo las células de mamíferos tienen un ΔV_m entre 40 y 90 mV (promedio ~70 mV), siendo el interior negativo con respecto al exterior [79]. Por convención el interior negativo se expresa con un signo menos (-40 a -90 mV). En protistas como *Leishmania*, el ΔV_m depende del metabolismo energético y el ciclo de vida del parásito; varía entre -75 mV en amastigotes [79] y -113 mV en promastigotes. [80] La hiperpolarización ocurre cuando hay un aumento del potencial de membrana (un valor más negativo que el anterior), en la depolarización ocurre lo contrario.

Tabla 3. Cinética del transporte de glucosa en LTB0016 y LTB160 mol x 10⁻¹⁴ x cel⁻¹ x s⁻¹

Especie de <i>Leishmania</i>	Acumulación de *2-DOG		Inhibición de la acumulación de *2-DOG		
	-GLIB	+GLIB	D-glu	L-glu	2-DOG
LTB0016	11,04 [#] ± 2,76	-0,181 ± 0,02	-17,81 ± 3,20	-11,48 ± 0,15	-12,51 ± 1,47
LTB160	1,262 ± 0,26	5,653 ± 1,36	-16,55 ± 0,29	-11,13 ± 0,93	-13,63 ± 0,30

D-glu: D-glucosa

L-glu: L-glucosa

#p = 0,001. Tomado de [36]. Reproducido con permiso de Elsevier. GLIB = glibenclamida. Reproducido con permiso de Elsevier.

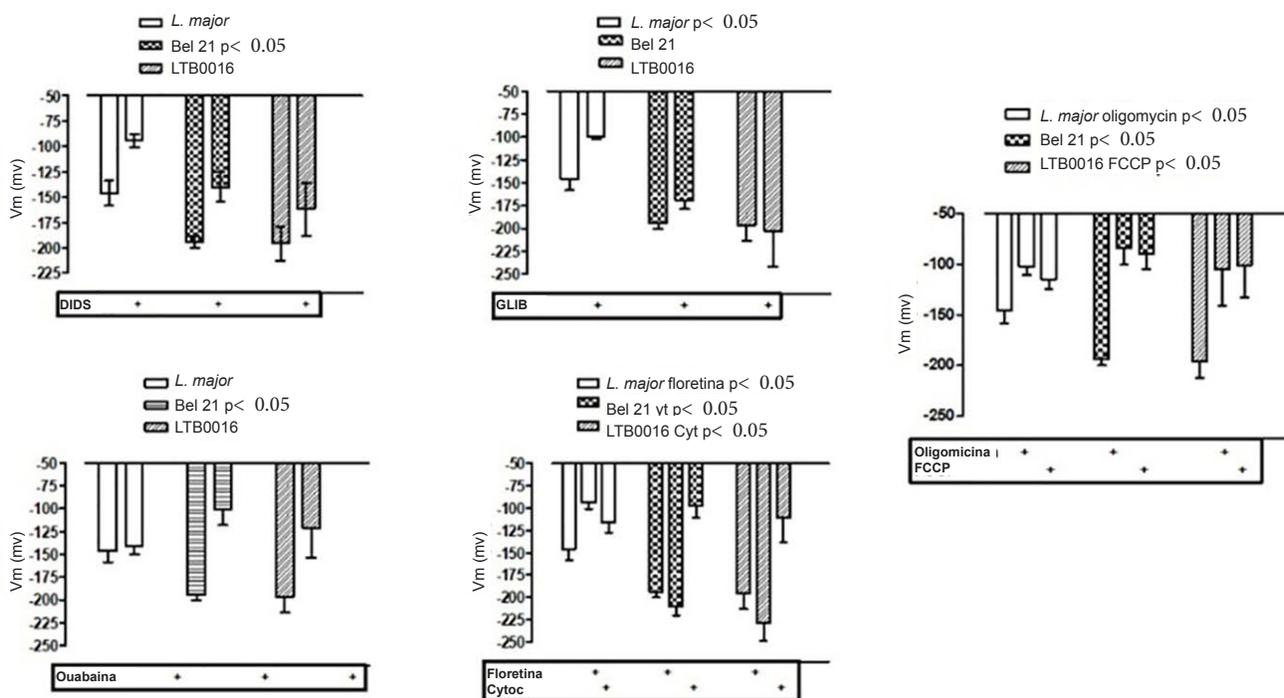


Figura 5. Efecto de DIDS, ouabaina, floretina y citocalasina-B (Cytoc), oligomicina y FCCP sobre el potencial de membrana de especies de referencia, $p < 0,05$ en cada especie o aislado comparando los tratados y los no tratados. Tomado de [87]. Reproducido con permiso de Springer Nature.

El ΔV_m es fundamental para la conformación de la fuerza electromotriz que permite la adquisición de nutrientes, así como para la interacción con el hospedero [77, 80-82]. El ΔV_m podría reflejar el estado metabólico, la homeostasis celular y la integridad física de la membrana y del organismo en estudio. En el LFM se evaluó el ΔV_m con una metodología descrita por Vieira *et al.* [83], optimizada como método no invasivo por Padrón-Nieves y Ponte-Sucre [65]. Esta técnica ha sido utilizada en tripanosomatídeos y *Giardia intestinalis* [79, 84, 85].

Se realizaron curvas de calibración para ΔV_m en cada especie de *Leishmania* en presencia de concentraciones crecientes de KCl (0,25 a 50 mM). Se estableció una correlación lineal entre la fluorescencia de bisoxonol y cada concentración de KCl (datos no mostrados) [65]. El ΔV_m se calculó con la ecuación de Nernst: $-V_m = (-59,4 \text{ mV}) \log\left(\frac{[K]_i}{[K]_o}\right)$, donde K_i es la concentración intracelular de potasio (entre 120 y 200 mM) y K_o es la concentración de KCl añadida.

El efecto de varios compuestos sobre el ΔV_m (ver **Figura 5**) permitió explorar el rol de diversos iones en su generación: el bloqueador del transportador ABC, glibenclamida (GLIB; 100 μM); el inhibidor de la Na^+ , K^+ -ATPasa ouabaina (1 mM); el ionóforo monensina de sodio (1 μM); el inhibidor del canal de cloruro 4,4'-di-isotiocianato-sal de sodio

de 2,2'-disulfonato (DIDS; 500 μM); el bloqueador de incorporación de glucosa floretina (150 μM); el inhibidor del transporte de glucosa citocalasina-B (Cytoc; 300 μM); el inhibidor de la ATPasa mitocondrial oligomicina (20 μM); y el de la fosforilación oxidativa mitocondrial carbonil cianuro 4- trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP; 1 μM).

La **Figura 5** ilustra el colapso del ΔV_m de *L. major* (Viejo Mundo) en presencia de glibenclamida; del ΔV_m de Bel 21 en presencia de DIDS y ouabaina, mientras el de LTB0016 no. El ΔV_m de las tres especies de referencia colapsa en presencia de floretina, citocalasina-B, oligomicina y FCCP, datos que sugieren un comportamiento homogéneo de la función mitocondrial y adquisición de nutrientes como glucosa, con diferencias en la permeabilidad iónica a través de la membrana plasmática y su función en la generación del ΔV_m [86, 87].

6. Estudios en pacientes

A fin de validar los resultados encontrados en especies de referencia, en el LFM en un estudio pionero en Venezuela, se evaluaron los parámetros referidos en aislados de pacientes con LCD. Los aislados denominados VE2000MM y VE98MR (*L. amazonensis*), y VE96ZC (*L. mexicana*), fueron identificados mediante métodos moleculares [88]. La **Tabla 4** resume las características de estos aislados de pacientes. Su status actual es de enfermedad activa con tratamiento.

Tabla 4. Características de los aislados de *Leishmania* de pacientes con LTD y fracaso terapéutico contra glucantime

Código internacional	Edad (años)	Procedencia	Diagnóstico	Terapia
VE2000MM <i>L. (L)</i> <i>amazonensis</i>	23	San Fernando de Apure	1990 4/10/1991	Glucantime
VE98MR <i>L. (L)</i> <i>amazonensis</i>	31	Zaraza - Guárico	1985 19/07/1987	Glucantime Immunoterapia Miltefosina
VE96ZC <i>L. (L)</i> <i>mexicana</i>	18	Biruaca - Apure	1984, 1/7/1986	Glucantime Immunoterapia

Tomado de [86]. Con permiso de la Facultad de Farmacia, UCV.

Inicialmente se evaluó la susceptibilidad a drogas leishmanicidas de los aislados de pacientes. Seguidamente se determinó su porcentaje de supervivencia a concentraciones máximas de glibenclamida (3X GI50), pentamidina (7X GI50) y anfotericina-B (4X GI50) determinadas de acuerdo al valor correspondiente del GI50 multiplicado por N en μM para cada droga utilizada. Esto permitió utilizar valores cercanos al GI90 para todas las drogas. Este valor se correlacionó con la capacidad de las células de acumular calceína, sustrato de los transportadores ABC, así como con su sensibilidad a los inhibidores específicos de los mismos. Los resultados se compararon con los de las especies de referencia correspondientes. Se incluyó *L. (V.) braziliensis* LTB300 como control negativo.

La susceptibilidad *in vitro* de las especies de referencia a anfotericina-B y pentamidina, y a glibenclamida fue similar a la descrita [89, 90]. Los datos demuestran que los aislados fueron menos susceptibles a anfotericina-B y glibenclamida que sus especies homólogas, el porcentaje de supervivencia fue $\geq 50\%$, a altas concentraciones de las drogas. Con pentamidina, sólo el aislado VE96ZC tuvo un porcentaje de supervivencia $> 50\%$ a altas concentraciones de la droga. Con anfotericina-B sólo VE98MR tuvo un porcentaje de supervivencia $> 50\%$ a altas concentraciones de la droga [36]. Estos resultados sugieren que la susceptibilidad a drogas de promastigotes es un método fácil, rápido y reproducible, más no necesariamente predictivo de fenotipo quimiorresistente. La validación de estos hallazgos en un mayor número de aislados es más que deseable.

Seguidamente y para cuantificar la actividad de los transportadores ABC comparamos la acumulación de calceína y la calceína-acetoximetil ester (CAL-AM), así como su inhibición por compuestos específicos, entre los aislados de pacientes y las especies de referencia. y su modulación por verapamil, ciclosporina-A y glibenclamida [36].

Los resultados obtenidos en especies de referencia de *Leishmania* demuestran que estos sistemas están constitutivamente expresados [36, 50]. Los resultados (Tabla 5) en aislados de pacientes corroboran estos datos y permiten concluir que ciclosporina-A se comporta como un inhibidor tipo B para el aislado VE2000MM y LTB0016 (insensibles a la droga hasta niveles mM); y es un inhibidor tipo M para los aislados VE96ZC y VE98MR.

Al ser ciclosporina-A un inhibidor selectivo de transportadores MDR4, se concluye que estos transportadores deben estar medianamente expresados en VE96ZC y VE98MR (sensibles a la droga entre 1 y 15). Para VE96ZC y VE98MR, el verapamil se comporta como un inhibidor tipo B (insensibles a la droga hasta niveles mM), y como un inhibidor tipo A para el aislado VE2000MM y tipo M para LTB0016. Verapamil inhibe transportadores MRP, pero preferencialmente transportadores MDR. [91] A partir de estos datos se estima que los MRP no están expresados -o no son funcionales- en VE96ZC y VE98MR, mas sí en VE2000M. Verapamil y ciclosporina-A son inhibidores tipo B para Bel21, sugiriendo que esta especie no expresa -o los transportadores no son funcionales- ni MDR1 ni MDR4. Finalmente, acorde con la clasificación presentada, glibenclamida se comporta como un inhibidor tipo A para Bel21, B para LTB0016, y M para los aislados. Estos resultados que sugieren la expresión funcional de transportadores MRP1 en los aislados, susceptibles a concentraciones de glibenclamida entre 1 y 15 μM , mas no así en LTB0016, tal y como había sido demostrado anteriormente [36].

Estos resultados indican que la evaluación de la acumulación de calceína como ensayo cualitativo de la expresión y/o funcionalidad de los transportadores ABC podría ser un marcador celular interesante y hace imperativo la validación de estos hallazgos en mayor número de aislados.

Tabla 5. Concentración efectiva de Verapamil, Ciclosporina-A y Glibenclamida, necesarias para aumentar 50 % la retención de calceína de las especies de referencia y aislados de pacientes

Especie	Verapamil (μM)	Ciclosporina-A (μM)	Glibenclamida (μM)
LTB300	10,90 \pm 8,00	83,40 \pm 4,00	6,76 \pm 4,50
Bel 21	>mM	17,80 \pm 13,00	0,43 \pm 0,26
LTB0016*	3,0 \pm 0,8	>mM	60,00 \pm 26,00
VE2000MM	0,10 \pm 0,08	>mM	5,40 \pm 2,90
VE98MR	>mM	1,20 \pm 7,00	1,80 \pm 0,97
VE96ZC	> mM	1,28 \pm 0,75	2,80 \pm 2,09

Concentración efectiva > mM, concentraciones superiores a mM. * Datos tomados de [36] y [87]. Reproducido con permiso de Elsevier.

La tasa de captación de glucosa por *Leishmania* es un indicador de viabilidad celular, estrechamente asociada con el metabolismo del parásito [67]. Utilizando la metodología estandarizada en el LFM [65] se evaluó el curso temporal de la captación de glucosa en las especies y los aislados descritos [87]. Los resultados están resumidos en la **Tabla 6**.

Los resultados sugieren que las células acumulan glucosa en el siguiente orden: *L. mexicana* (VE96ZC > Bel21) = *L. amazonensis* (VE98MR) > *L. amazonensis* (LTB0016 = VE2000MM) >> *L. major* (*L. major* > PTR). Estos resultados indican que: (1) *L. major*, responsable de LC en el Viejo Mundo, acumula glucosa a una tasa menor que *L. amazonensis* y *L. mexicana*, responsables de DCL en América; (2) en la especie PTR resistente a la pentamidina, la acumulación de glucosa es menor que en su especie de referencia *L. major*; y (3) en parásitos de *L. amazonensis* y *L. mexicana* aislados de pacientes con DCL, la acumulación de glucosa aumenta o permanece en valores similares a los de su cepa de referencia correspondiente.

Tabla 6. Velocidad de incorporación de glucosa en pacientes y especies de referencia mol de glucosa x 10⁻¹²/cel x s.

Especie	Referencia	Velocidad (mol glucosa x 10 ⁻¹² /cel x s)
<i>L. major</i>	<i>L. major</i>	0,19 ± 0,002
	PTR ^a	0,06 ± 0,004
<i>L. mexicana</i>	Bel21 ^b	2,12 ± 0,05
	VE96ZC ^b	3,02 ± 0,04
	LTB0016 ^c	1,23 ± 0,03
<i>L. amazonensis</i>	VE2000MM	0,97 ± 0,5
	VE98MR ^c	2,17 ± 0,06

^{a,b} p < 0,001, ^c p < 0,005. ^d p: sin diferencia significativa Tomado de [87]. Reproducido con permiso de Elsevier.

Las alteraciones en ΔV_m se han asociado con la fisiología de la quimioresistencia en *Saccharomyces cerevisiae* [67]. En el LFM se evaluó el ΔV_m de especies de referencia y aislados. La **Tabla 7** resume estos resultados. Los datos demuestran que el ΔV_m de las especies de referencia y los aislados VE96ZC y VE98MR permanecen en valores cercanos a -200 mV. Sin embargo, el ΔV_m en el aislado VE2000MM se desvía significativamente hacia valores despolarizantes. Esto sugiere una menor energía electromotriz para incorporar nutrientes en VE2000MM que en los otros aislados descritos.

Seguidamente se evaluó la respuesta del ΔV_m de los aislados a los inhibidores que afectan selectivamente canales, conductancias, o transportadores a fin de comparar su comportamiento con el de las especies de referencia. La **Figura 6**, resume los resultados obtenidos con los inhibidores que afectaron a la mayoría de las especies [87].

Tabla 7. Potencial de membrana en aislados y especies de referencia

Especies	ΔV_m [mV] (95 % intervalo de confianza)	Bondad del ajuste (R^2)
<i>L. major</i>	-180 (-196/-169)	0,99
<i>L. major</i> (PTR)	-200 (-219/-186)	0,96
<i>L. mexicana</i> (Bel 21)	-200 (-220/-190)	0,84
VE96ZC	-195 (-240/-168)	0,54
<i>L. amazonensis</i> (LTB0016)	-212 (-230/-198)	0,89
VE2000MM	-170 (-190/-150)	0,73
VE98MR	-190 (-240/-170)	0,54

R^2 = coeficiente de correlación. Tomado de [62]. Reproducido con permiso de Elsevier.

El ΔV_m de *L. major* y PTR, así como de LTB0016 y VE2000MM, fueron insensibles al DIDS; la ouabaina disminuyó significativamente el ΔV_m de Bel21 y VE96ZC y de *L. major* (PTR) resistente a la pentamidina y curiosamente, el bloqueador de transportadores MRP-1 y de canales K+ glibenclamida no afectó el ΔV_m de ningún representante de *L. amazonensis* ni de Bel21 (datos no mostrados). Sin embargo, la inhibición del transporte de glucosa por floretina o citocalasina-B disminuyó significativamente el ΔV_m en todas las células. La mayoría de las especies fueron sensibles a oligomicina y FCCP; LTB0016 y VE98MR solo a FCCP, y VE2000MM insensible a ambos inhibidores. *L. major* fue sensible a la oligomicina (ver **Figura 6**).

En conjunto estos resultados sugieren que la sensibilidad del ΔV_m de *Leishmania* hacia los inhibidores clásicos de los canales iónicos y los transportadores dependen de la especie estudiada. Esta situación complica la comprensión del origen del ΔV_m y pone al descubierto un elemento más de la flexibilidad de estos parásitos y su capacidad de incorporar nutrientes, acorde a la fuerza electromotriz a través de su superficie de membrana. Además, sugieren que aislados de pacientes que sufren DCL, pertenecientes a la misma especie difieren en su comportamiento fisiológico.

En conclusión: (1) el ΔV_m de *L. mexicana* [Bel21 (referencia) y VE96ZC (aislado)] se comportaron de manera similar, además VE96ZC fue sensible al bloqueador de transportadores ABC y canal K + glibenclamida, y al inhibidor del transportador de hexosa floretina; (2) el ΔV_m de *L. amazonensis* [LTB0016 (referencia) y VE98MR (aislado)] se comportaron de manera similar, VE98MR además fue sensible al inhibidor de corrientes aniónicas DIDS; y (3) el ΔV_m de *L. amazonensis* (VE2000MM) fue sensible solo a inhibidores del transportador de glucosa.

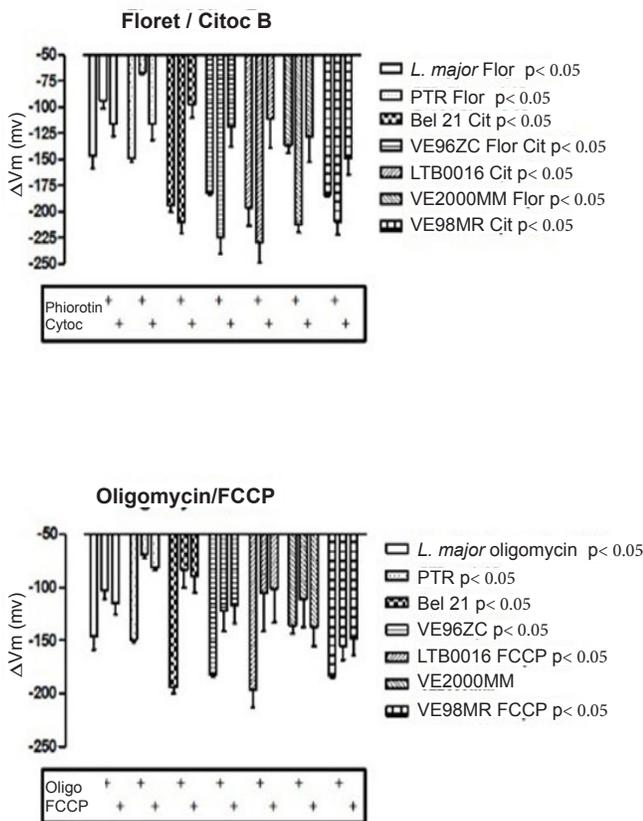


Figura 6. Efecto de floretina y citocalasina B, oligomicina y FCCP en el potencial de membrana. $p < 0,05$ en cada especie de referencia o aislado comparando los tratados y los no tratados. Tomado de [87]. Reproducido con permiso de Springer Nature.

7. Reflexiones finales

Los parásitos de *Leishmania* son exitosos, flexibles, y capaces de implementar múltiples mecanismos de evasión frente al hospedero. Con el fin de examinar la adaptabilidad y flexibilidad de *Leishmania* y sus implicaciones, el LFM ha caracterizado algunas de las consecuencias fisiológicas asociadas a la quimioresistencia en estos parásitos.

Con los estudios realizados, el LFM ha consolidado el concepto de que la quimioresistencia en *Leishmania* incluye, además del aumento de la expresión de fragmentos de ADN genómico, reconocidos por sondas pertenecientes a proteínas de la familia de la glicoproteína-P (transportadores ABC), una alteración de funciones que incluyen entre otros, la infectividad del parásito (fosfatasa ácida y proteína meta-1), el metabolismo intracelular y la fosforilación oxidativa (aminoácidos y carbohidratos fundamentales para la supervivencia del parásito), la interacción hospedero-parásito (aglutinación por lectinas, potencial de membrana), y la morfología del parásito [30, 36, 43, 64, 92-94].

Además, su trabajo analiza si estos eventos fisiológicos se modifican de manera coordinada, y si su análisis y comprensión

sistemáticos pueden ser útiles en el diseño de enfoques quimioterapéuticos a múltiples dianas celulares, identificando así estrategias para eludir la quimioresistencia en *Leishmania* y tratar con éxito la enfermedad.

Los resultados sugieren, tal y como se presenta en la **Figura 7**, que en *L. mexicana* y *L. amazonensis*, aislados de pacientes venezolanos con DCL, podría producirse una modificación de la fisiología del parásito.

En consecuencia, los parásitos expresan una mayor “profesionalidad” con una tasa de consumo de glucosa eficiente y aumentada sin cambios significativos en el potencial de membrana. La evaluación y correlación de ambos marcadores podrían contribuir a una prognosis adecuada de la enfermedad [65]. La validación adicional de los conceptos establecidos debe realizarse en mayor número de muestras y el fenotipo real del aislado VE2000MM debe estudiarse a nivel genético.

En resumen, el Laboratorio de Fisiología Molecular ha contribuido a la par que sus colegas a nivel internacional [95-100] a la comprensión de los mecanismos fisiológicos asociados a la resistencia a drogas y la susceptibilidad a los mismos en los parásitos metabólicamente flexibles *Leishmania* y *Trypanosoma*, mediante la integración del uso de bioquímica, biofísica, biología celular y farmacología. Los trabajos del LFM han sido pioneros en conceptos fundamentales para fomentar el diseño de terapias alternativas contra estos parásitos tropicales y ha contribuido a la educación de muchas generaciones de médicos y estudiantes de postgrado en Venezuela.

Agradecimientos

Diversas instituciones nacionales e internacionales han sido fundamentales en el aporte de los recursos para la

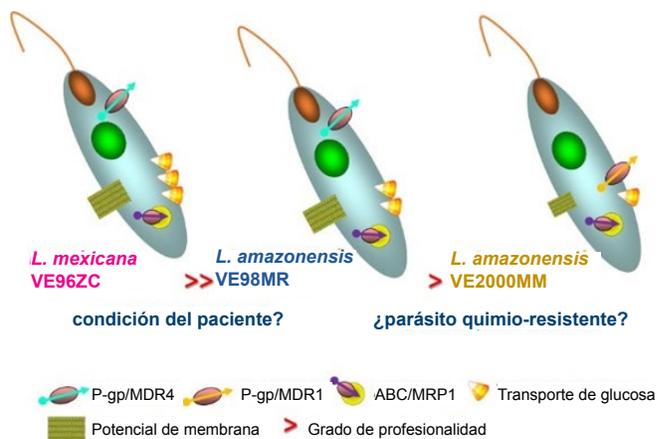


Figura 7. En búsqueda de marcadores con ayuda de la Fisiología. Se presentan de forma esquemática los marcadores identificados en este trabajo. P-gp/MDR4, P-gp/MDR1, ABC/MRP1, transportador de glucosa y potencial de membrana. Las densidades de cada uno de ellos en los diferentes aislados se correlaciona con su grado de profesionalidad que pudiera estar asociado a la expresión de quimioresistencia.

obtención de los resultados que aquí se resumen: El Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (UCV), la Coordinación de Investigación de la Facultad de Medicina de la UCV, el Programa Iberoamericano de Ciencia, Tecnología y Desarrollo (CyTED), la Fundación Alejandro de Humboldt (AvHF)-Alemania, la Oficina Internacional de Intercambio Académico (DAAD)-Alemania, el Consejo Alemán de Investigación (DFG)-Alemania, la Universidad de Würzburg (Uni-Wue)-Alemania, el Instituto de Misiones para Enfermedades Tropicales (Med-Missio)-Würzburg-Alemania, la Academia de Ciencias “Siebold Colegium” (SCIAS)-Uni-Wue-Alemania, Universidad Semmelweis de Budapest, Hungría, y la Universidad de Helsinki en Finlandia. A todos ellos mi agradecimiento por confiar en nuestro trabajo. Agradezco especialmente a los estudiantes y colegas profesores que durante estos años han confiado en nuestro trabajo y han decidido desarrollar sus retos de investigación en el laboratorio. Estudiantes y colegas han sido fuente constante de inspiración. Su apoyo, ideas y trabajo experimental han sido fundamentales en la elaboración de este documento que resume parte del trabajo realizado en estos últimos 25 años, sin ellos no hubiese sido posible.

Referencias

- [1] World Health Organization. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. *Third Who Report on Neglected Tropical Diseases*, p. 118–26 (2015).
- [2] Savoia, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. *J. Infect. Dev. Ctries.* **9** (6), 588-596 (2015). doi: 10.3855/jidc.6833.
- [3] Bañuls, A.L., Hide, and M., Prugnolle, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv. Parasitol.* **64**, 1-109 (2007).
- [4] De Vries, H.J.C., Reedijk, S.H. and Schallig, H.D.F.H. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. *Am. J. Clin. Dermatol.* **16**(2), 99-109 (2015). doi:10.1007/s40257-015-0114-z.
- [5] Ponte-Sucre, A. Leishmaniasis - the biology of a parasite. En: *Drug Resistance in Leishmania Parasites. Consequences, Molecular Mechanisms, and possible treatments*, Ponte-Sucre, A., Díaz, E. and Padrón-Nieves, M. (Eds.), (Springer-Verlag Wien, 2013), pp. 1–12.
- [6] Reyes Romero, H., Navarro Rojas, P., Ruíz Montufar, *et al.* Leishmaniasis Tegumentaria Americana. En: *Medicina Tropical y Enfermedades del Viajero*, Reyes Romero, H., Navarro Rojas, P. y Reyes Barrios, H. (Eds.), (CDCH-UCV, Caracas, 2011), pp. 441–481.
- [7] Zerpa, O., Padrón-Nieves, M. and Ponte-Sucre, A. American tegumentary leishmaniasis. En: *Drug Resistance in Leishmania Parasites. Consequences, Molecular Mechanisms, and possible treatments*, Ponte-Sucre, A. and Padrón-Nieves, M. (Eds.), (Springer-Verlag Wien, 2018), pp. 177–191.
- [8] Strazzulla, A., Cocuzza, S., Pinzone, M.R., *et al.* Mucosal leishmaniasis: An underestimated presentation of a neglected disease. *Biomed. Res. Int.* **2013**, 805108 (2013). doi: 10.1155/2013/805108
- [9] Lindoso, J.A.L., Lima, A.C.S., Cunha, M.A., *et al.* Diagnosing neglected tropical diseases in HIV coinfection. *Hum. Parasit. Dis.* **7**, 11–18 (2015). doi: 10.4137/HPD.S19569
- [10] Cota, G.F., de Sousa, M.R., Demarqui, F.N., *et al.* The diagnostic accuracy of serologic and molecular methods for detecting visceral leishmaniasis in HIV infected patients: Meta-analysis. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* **6**(5), e1665 (2012). doi: 10.1371/journal.pntd.0001665.
- [11] Feliciangeli, M.D. Leishmaniasis en Venezuela: Situación actual, acciones y perspectivas para el control vectorial en el marco de un programa de control multisectorial. *Bol. Malarial. y Salud Ambient.* **LIV**, 1–7 (2014).
- [12] Guevara, J.R. MPPS. Estadísticas de Leishmaniasis Visceral en Venezuela Histórico / Año 1990-2018 Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit” (2018).
- [13] Zerpa, O., Ulrich, M., Borges, R., *et al.* Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela. *Rev. Panam. Salud. Pública* **13**, 239–245 (2003).
- [14] Rodríguez, N.M., De Guglielmo, Z., Barrios, M.A., *et al.* Nueva Esparta Genetic homogeneity within *Leishmania (L.) infantum* isolated from human and dogs: the relationship with the sandfly fauna distribution in endemic areas of Nueva Esparta State, Venezuela. *Parasitol.* **130**, 611-619 (2005).
- [15] Guevara, J.R. MPPS Estadísticas De Leishmaniasis Cutánea En Venezuela Histórico / Año 1990-2018 Servicio Autónomo Instituto de Biomedicina “Dr. Jacinto Convit” 2018.
- [16] De Lima, H., Borges, R.H., Escobar, J., *et al.* Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela: un análisis clínico epidemiológico a nivel nacional y por entidad federal, 1988-2007. *Bol. Malarial. y Salud Ambient.* **50**, 283–299 (2010).
- [17] Organización Panamericana de la Salud. Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento. OPS series (2013), pp.1–43.

- [18] Natera, S., Machuca, C., Padrón-Nieves, M., *et al.* *Leishmania* spp.: proficiency of drug-resistant parasites. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **29**, 637-642 (2007).
- [19] William, S., Sabra, A., Ramzy, F., *et al.* Stability and reproductive fitness of *Schistosoma mansoni* isolates with decreased sensitivity to praziquantel. *Int. J. Parasitol.* **31**, 1093–1100 (2001).
- [20] Peyron, F., Eudes, N., de Monbrison, F., *et al.* Fitness of *Toxoplasma gondii* is not related to DHFR single-nucleotide polymorphism during congenital toxoplasmosis. *Int. J. Parasitol.* **34**, 1169–1175 (2004).
- [21] Hastings, I.M. and Donnelly, M.J. The impact of antimalarial drug resistance mutations on parasite fitness, and its implications for the evolution of resistance. *Drug Resist. Update* **8**, 43–50 (2005).
- [22] Beverley, S.M. Genetic and genomic approaches to the analysis of *Leishmania* virulence. En: *Molecular and Medical Parasitology*, Marr, J., Nilsen, T., Komunacki, R. (eds), (Elsevier, Amsterdam, 2003), pp. 111-122.
- [23] Uliana, S.R.B., Goyal, N., Freymuller, E., *et al.* *Leishmania*: overexpression and comparative structural analysis of the stage-regulated meta-1 gene. *Exp. Parasitol.* **92**, 183-191 (1999).
- [24] Debrabant, A. and Nakhasi, H. Programmed cell death in trypanosomatids: is it an altruistic mechanism for survival of the fittest? *Kinetoplastid Biol. Dis.* **2**, 7 (2003).
- [25] Padrón Nieves, M., Alcázar, W. and Ponte-Sucre, A. Adaptabilidad y Fracaso Terapéutico en *Leishmania*. *Dermatol. Venez.* **54**(2), 9-16 (2016).
- [26] Vanaerschot, M., Dumetz F, Jara M, *et al.* The concept of fitness in *Leishmania*. En: *Drug resistance in Leishmania parasites. Consequences, molecular mechanism and possible treatments.* Ponte-Sucre, A. and Padrón-Nieves, M. (Eds.), (Springer-Verlag Wien, 2018) pp. 341-67.
- [27] Padrón-Nieves, M. and Ponte-Sucre, A. Marcadores de resistencia en *Leishmania*: Susceptibilidad in vitro a drogas leishmanicidas vs. retención de calceína en aislados de pacientes venezolanos con Leishmaniasis Cutánea Difusa. *Arch. Venez. Farmacol. Terap.* **34**, 29-33 (2015).
- [28] Vanaerschot, M., Dumetz, F., Roy, S., *et al.* Treatment failure in leishmaniasis: drug-resistance or another (epi-) phenotype? *Exp. Rev. Anti. Infec. Ther.* **12**(8), 937-946 (2014).
- [29] Padrón-Nieves, M., Díaz, E., Romero, A., *et al.* Valor pronóstico de los cambios fisiológicos asociados a la quimioresistencia en *Leishmania*. *Vitae, Academia Biomédica Digital* **33** (2008).
- [30] Ponte-Sucre, A. Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for chemotherapy. *Kinetoplastid Biol. Dis.* **2**, 14 (2003).
- [31] Croft, S.L., Sundar, S. and Fairlamb, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 111–126 (2006).
- [32] Ouellette, M., Fase-Fowler, F and Borst, P. The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. *EMBO J.* **9**(4), 1027–1033 (1990).
- [33] Hendrickson, N., Sifri, C.D., Henderson, D.M., *et al.* Molecular characterization of the *ldmdr1* multidrug resistance gene from *Leishmania donovani*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **60**, 53–64 (1993).
- [34] Mbongo, N., Loiseau, P.M., Lawrence, F., *et al.* Uptake into *Leishmania donovani* promastigotes and antileishmanial action of an organometallic complex derived from pentamidine. *Arzneimittelforschung* **48**(8), 850-851 (1998).
- [35] Basselin, M., and Robert-Gero, M. Alterations in membrane fluidity, lipid metabolism, mitochondrial activity and lipophosphoglycan expression in pentamidine-resistant *Leishmania*. *Parasitol. Res.* **60**, 78–83 (1998).
- [36] Machuca, C., Rodríguez, A., Herrera, M., *et al.* Metabolic adaptations induced by resistance to glibenclamide in *Leishmania amazonensis*. *Exp. Parasitol.* **114**, 1–9 (2006).
- [37] Halder, A.K., Sen, P. and Roy, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Mol. Biol. International* **2011**, 1–23 (2011).
- [38] Król, S.K., Kielbus, M., Rivero-Müller, A., *et al.* Comprehensive review on betulin as a potent anticancer agent. *Biomed. Res. Int.* **2015**, 1–11 (2015). <http://dx.doi.org/10.1155/2015/584189>
- [39] Ponte-Sucre, A., Campos, Y., Fernández, M., *et al.* *Leishmania* sp.: growth and survival of *Leishmania* sp. are impaired by ion channel blockers. *Exper. Parasitol.* **88**, 11–19 (1988).
- [40] Ouakad, M., Vanaerschot, M., Rijal, S., *et al.* Increased metacyclogenesis of antimony-resistant *Leishmania donovani* clinical lines. *Parasitol.* **138**(11), 1392-1399 (2011). doi: 10.1017/S0031182011001120.
- [41] Silva, N. and Ponte-Sucre, A. ABC proteins in *Leishmania mexicana*: Modulation of parasite host cell interaction. *Arch. Venez. Farmacol. Terap.* **20**, 134-138 (2001).
- [42] Silva, N., Camacho, N., Figarella, K., *et al.* Cell differentiation and infectivity of *Leishmania mexicana* are inhibited in an ABC-transporter blocker resistant strain. *Parasitol.* **128**, 629-634 (2004).

- [43] Uzcátegui, N.L., Figarella, K., Camacho, N., *et al.* Substrate preferences and glucose uptake in glibenclamide-resistant *Leishmania* parasites. *Comp. Biochem. Physiol.* **140**, 395–402 (2005).
- [44] Bandyopadhyay, P., Ghosh, D.K., De, A., *et al.* Metacyclogenesis of *Leishmania* spp: species-specific *in vitro* transformation, complement resistance, and cell surface carbohydrate and protein profiles. *J. Parasitol.* **77**, 411–416 (1991).
- [45] Nourbakhsh, F., Uliana, S.R. and Smith, D.F. Characterization and expression of a stage-regulated gene of *Leishmania major*. *Molec Biochem Parasitol.* **76**, 201–213 (1996).
- [46] Berberich, C., Marin, M., Ramírez, J.R., *et al.* The metacyclic stage-expressed Meta-1 gene is conserved between Old and New World *Leishmania* species. *Memor. Inst. Oswaldo Cruz* **93**, 819–821 (1998).
- [47] Laurent, T., Rijal, S., Yardley, V., *et al.* Epidemiological dynamics of antimonial resistance in *Leishmania donovani*: genotyping reveals a polyclonal population structure among naturally-resistant clinical isolates from Nepal. *Infect. Genet. Evolution* **7**, 206–212 (2007).
- [48] Ouellette, M., Légaré, D., Haimeur, A., *et al.* ABC transporters in *Leishmania* and their role in drug resistance. *Drug Resist. Update* **1**, 43–48 (1998).
- [49] Singh, N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Indian J. Med. Res.* **123**, 411–422 (2006).
- [50] Essodaïgui, M., Broxterman, H., and Garnier-Suillerot, A. Kinetic analysis of calcein and calcein acetoxymethyl ester efflux mediated by the multidrug resistance protein and p-glycoprotein. *Biochem.* **37**, 2243–2250 (1998).
- [51] Essodaïgui, M., Freezard, F., Moreira, E.S.A., *et al.* Energy dependent efflux from *Leishmania* promastigotes of substrates of the mammalian multidrug resistance pumps. *Molec. Biochem. Parasitol.* **100**, 73–84 (1998).
- [52] Rautio, J., Humpreys, J., Webster, L., *et al.* *In vitro* P-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: A recommendation for probe substrates. *Drug Metab and Disp*, **34**, 786–792 (2006).
- [53] Dodge, M.A., Waller, R.F., Chow, L.M., *et al.* Localization and activity of multidrug resistance protein 1 in the secretory pathway of *Leishmania* parasites. *Mol Microbiol.* **51**, 1563–1575 (2004).
- [54] Jones, P.M. and George, A.M. Multidrug resistance in parasites: ABC transporters, P-glycoproteins and molecular modelling. *Int. J. Parasitol.* **35**, 555–566 (2005).
- [55] Loe, D.W., Deeley, R.G. and Cole, S.P. Verapamil stimulates glutathione transport by the 190-kDa multidrug resistance protein 1 (MRP1). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **293**, 530–538 (2000).
- [56] Forestier, C., Frangne, N., Eggmann, T., *et al.* Differential sensitivity of plant and yeast MRP (ABCC)-mediated organic anion transport processes towards sulfonylureas. *FEBS Lett.* **554**, 23–29 (2003).
- [57] Salerno, M., Loechariyaku, P., Saengkhae, C., *et al.* Relation between the ability of some compounds to modulate the MRP1-mediated efflux of glutathione and to inhibit the MRP1-mediated efflux of daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 2159–2165 (2004).
- [58] Loo, T.W. and Clarke, D.M. Defining the drug-binding site in the human multidrug resistance P-glycoprotein using a methanethiosulfonate analog of verapamil, MTS-verapamil. *J. Biol. Chem.* **276**, 14972–14979 (2001).
- [59] Serrano-Martin X., Payares G., and Mendoza-León A. Glibenclamide, a blocker of K⁺(ATP) channels, shows antileishmanial activity in experimental murine cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 4214–4216 (2006).
- [60] El Fadili, K., Messier, N., Leprohon, P., *et al.* Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in *Leishmania infantum* axenic and intracellular amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 1988–1993 (2005).
- [61] Chazotte, B. Labeling Lysosomes in Live Cells with LysoTracker. *Cold Spring Harb Protoc* (2011). doi:10.1101/pdb.prot5571
- [62] Padrón-Nieves, M., Díaz, E., Machuca, C., *et al.* Glibenclamide modulates glucantime activity and disposition in *Leishmania major*. *Exper. Parasitol.* **121**, 331–337 (2009).
- [63] Harper, M.E., Antoniou, A., Villalobos-Menuy, E., *et al.* Characterization of a novel metabolic strategy used by drug-resistant tumor cells. *Faseb J.* **16**, 1550–1557 (2002).
- [64] García, N., Figarella, K., Mendoza-León, A., *et al.* Changes in the infectivity, pyruvate kinase and acid phosphatase activity and p-glycoprotein expression in glibenclamide resistant *Leishmania mexicana*. *Parasitol. Res.* **86**, 899–904 (2000).
- [65] Padrón-Nieves, M. and Ponte-Sucre, A. Cellular Markers for the Identification of Chemo-Resistant Isolates in *Leishmania*. En: *Protocols Methods, Trypanosomatids.*, Michels,

- P., Ginger, and M., Zilberstein, D. (Eds.) (Springer-Verlag, Heidelberg, 2020) ch. 46. doi: 10.1007/978-1-0716-0294-2_44. PMID: 32221953.
- [66] Blum, J. Energy metabolism in *Leishmania*. *J. Bioenerg. Biomemb.* **26**, 147–154 (1994).
- [67] Nourani, A., Wesolowski-Loucel, M., *et al.* Multiple-drug resistance phenomenon in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of two hexose transporters. *Mol. Cell Biol.* **17**, 5453–5460 (1997).
- [68] Seyfang, A. and Duszenko, M. Specificity of glucose transport in *Trypanosoma brucei*. Effective inhibition by phloretin and cytochalasin B. *Eur. J. Biochem.* **202**, 191–196 (1991).
- [69] Bauché, F., Sabourault, D., Nordmann, J., *et al.* 2-Mercaptoacetate administration depresses the β -oxidation pathway through an inhibition of long-chain acyl CoA dehydrogenase activity. *Biochem. J.* **196**, 803–807 (1981).
- [70] Brown, J. Effects of 2-deoxyglucose on carbohydrate metabolism: review of the literature and studies in the rat. *Metabolism* **11**, 1098–1112 (1962).
- [71] Gazola, K.C., Ferreira, A.V., Anacleto, C., *et al.* Cell surface carbohydrates and in vivo infectivity of glucantime sensitive and resistant *Leishmania (viannia) guyanensis* cell lines. *Parasitol. Res.* **87**, 935–940 (2001).
- [72] Burchmore, R.J.S., Rodríguez-Contreras, D., McBride, K., *et al.* Genetic characterization of glucose transporter function in *Leishmania mexicana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 3901–3906 (2003).
- [73] Farese, R.V., Ishizuka, T., Standaert, M.L., *et al.* Sulfonylureas activate glucose transport and protein kinase C in rat adipocytes. *Metabolism* **40**, 196–200 (1991).
- [74] Tsiani, E., Ramlal, T., Leiter, L.A., *et al.* Stimulation of glucose uptake and increased plasma membrane content of glucose transporters in L6 skeletal muscle cells by the sulfonylureas gliclazide and glyburide. *Endocrinol.* **136**(6), 2505–2512 (1995).
- [75] Urbina, J. Intermediary metabolism of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Today* **10**, 107–110 (1994).
- [76] Singh, A.K. and Lee, S.T. Status of respiration and ATP content in arsenite resistant *Leishmania mexicana amazonensis*. *Microb. Pathog.* **26**, 171–174 (1999).
- [77] Konings, W., Albers, S-V., Koning, S., *et al.* The cell membrane plays a crucial role in survival of bacteria and archaea in extreme environments. *Antonie Van Leeuwenhoek* **81**(1-4), 61–72 (2002).
- [78] Nolan, D.P. and Voorheis, H.P. Factors that determine the plasma-membrane potential in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Biochem.* **267**, 4615–4623 (2000).
- [79] Glaser, T.A., Utz, G.L. and Mukkada, A.J. The plasma membrane electrical gradient (membrane potential) in *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* **51**, 9–15 (1992).
- [80] Zilberstein, D. and Dwyer, D.M. Protonmotive force-driven active transport of D-glucose and L-proline in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 1716–1720 (1985).
- [81] Zilberstein, D. and Dwyer, D.M. Identification of a surface membrane proton-translocating ATPase in promastigotes of the parasitic protozoan *Leishmania donovani*. *Biochem. J.* **256**, 13–21 (1988).
- [82] Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., *et al.* Electrical signals of nerve cells. En: *Neuroscience*, Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., Hall, W., La Mantia, A., McNamara, J and, Williams, S.M. (Eds) (Sinauer Associates, Oxford, 2001) pp. 31–46.
- [83] Vieira, L., Slotki, I. and Cabantchik, Z.I. Chloride conductive pathways which support electrogenic H^+ pumping by *Leishmania major* promastigotes. *J. Biol. Chem.* **270**, 5299–5304 (1995).
- [84] Van Der Heyden, N. and Docampo, R. Proton and sodium pumps regulate the plasma membrane potential of different stages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **120**, 127–139 (2002).
- [85] Biagini, G.A., Lloyd, D., Kirk, K., *et al.* The membrane potential of *Giardia intestinalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* **192**, 153–157 (2000).
- [86] Padrón-Nieves, M. Evaluación del transporte de glucosa, fármacos y del potencial de membrana como métodos pronósticos de quimioterapia en *Leishmania* spp. Tesis doctoral en Ciencias Mención Farmacología, Universidad Central de Venezuela, 2011.
- [87] Padrón-Nieves, M., Diaz, E., Machuca, C., *et al.* Correlation between glucose uptake and membrane potential in *Leishmania* parasites isolated from DCL-patients with therapeutic failure: A proof of concept. *Parasitol. Res.* **113**(6), 2121–2128 (2014).
- [88] Rodríguez, N., Guzman, B., Rodas, A., *et al.* Diagnosis of cutaneous leishmaniasis and species discrimination of parasites by PCR and hybridization. *J. Clin. Microbiol.* **32**(9), 2246–2252 (1994).

- [89] Lunardi, F., Guzela, M., Rodrigues, A.T., *et al.* Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. *Antimicrob Agents Chemother.* **47**, 1449-1451 (2003).
- [90] Lima, N.M.F., Correia, C.S., León, L.L., *et al.* Antileishmanial activity of lapachol analogues. *Mem. Inst. Osw. Cruz* **99**, 757-761 (2004).
- [91] Choi, Y.H. and Yu, A.M. ABC transporters in multidrug resistance and pharmacokinetics, and strategies for drug development. *Curr. Pharm. Des.* **20**(5), 793-807 (2014).
- [92] Silva, N. and Ponte-Sucre, A. ABC proteins in *Leishmania mexicana*: Modulation of parasite host cell interaction. *Arch. Venez. Farmacol. Terap.* **20**, 134-138 (2001).
- [93] Figarella, K., Uzcátegui, N., García, N., *et al.* Molecular pharmacology of chemo-resistant *Leishmania*. *Arch. Venez. Farmacol. Terap.* **22**, 19-24 (2003).
- [94] Silva, N., Camacho, N., Figarella, K., *et al.* Cell differentiation and infectivity of *Leishmania mexicana* are inhibited in an ABC-transporter blocker resistant strain. *Parasitol.* **128**, 629-634 (2004).
- [95]. Dujardin, J.C. Structure, dynamics and function of *Leishmania* genome: resolving the puzzle of infection, genetics and evolution? *Infect. Genet. Evol.* **9**, 290-297 (2009).
- [96] Mukhopadhyay, R., Mukherjee, S., Mukherjee, B., *et al.* Characterization of antimony-resistant *Leishmania donovani* isolates: Biochemical and biophysical studies and interaction with host cells. *Int. J. Parasitol.* **41**, 1311-1321 (2011).
- [97] Scheltema, R.A., Decuyper, S., T'kindt, R., *et al.* The potential of metabolomics for *Leishmania* research in the post-genomics era. *Parasitol.* **137**, 1291-1302 (2010).
- [98] Berg, M., García-Hernández, R., Cuypers, B., *et al.* Experimental resistance to drug combinations in *Leishmania donovani*: metabolic and phenotypic adaptations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **59**(4), 2242-2255 (2015). doi: 10.1128/AAC.04231-14.
- [99] Ait-Oudhia, K., Gazanion, E., *et al.* The fitness of antimony-resistant *Leishmania* parasites: lessons from the field. *Trends Parasitol.* **27**, 141-142 (2011).
- [100] Hendrickx, S., Leemans, A., Mondelaers, A., *et al.* Comparative Fitness of a Parent *Leishmania donovani* Clinical Isolate and Its Experimentally Derived Paromomycin-Resistant Strain. *PLoS One* **10**, e0140139 (2015). doi: 10.1371/journal.pone.0140139. eCollection 2015.