

Biomédica 2012;32:418-29  
doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.392>

## ARTÍCULO ORIGINAL

# Expresión diferencial de proteínas en *Leishmania (Viannia) panamensis* asociadas con mecanismos de resistencia a antimonio de meglumina

Ronald Guillermo Peláez<sup>1</sup>, Carlos Enrique Muskus<sup>1</sup>, Patricia Cuervo<sup>2</sup>, Marcel Marín-Villa<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>2</sup> Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, Instituto Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil

**Introducción.** Los mecanismos de resistencia al antimonio pentavalente conocidos hasta el momento, se han descrito ampliamente en cepas del subgénero *Leishmania*, pero poco se sabe sobre las proteínas involucradas en los mecanismos de resistencia presentes en cepas del subgénero *Viannia*, como *Leishmania panamensis*.

**Objetivo.** Identificar proteínas diferencialmente expresadas entre las cepas de *L. panamensis* (UA140), sensible y resistente al antimonio pentavalente, y analizar el posible papel de estas proteínas en mecanismos de resistencia.

**Materiales y métodos.** Las proteínas de las cepas, sensible y resistente al antimonio pentavalente, se compararon usando electroforesis bidimensional. Las proteínas con aumento de la expresión fueron aisladas e identificadas por espectrometría de masas mediante MALDI-TOF/TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time of Flight*). La expresión del ARNm de cinco de estas proteínas se cuantificó mediante PCR en tiempo real.

**Resultados.** Los geles bidimensionales de las cepas sensible y resistente detectaron  $532 \pm 39$  y  $541 \pm 43$  manchas proteicas. Se encontraron 10 manchas con aumento de la expresión en la cepa resistente, identificadas como proteínas de choque térmico (Hsp60 mitocondrial, Hsp70 mitocondrial y citosólica), isomerasa de disulfuro, proteasa de cisteína, enolasa, factor de elongación 5- $\alpha$ , la subunidad 5- $\alpha$  del proteasoma y dos proteínas hipotéticas nombradas como Sp(2) y Sp(25).

**Conclusión.** Este es el primer estudio llevado a cabo con una cepa resistente al antimonio pentavalente en *L. panamensis*, en el cual se han identificado proteínas que están relacionadas con el mecanismo de resistencia del parásito frente al medicamento, abriendo el camino para futuros estudios de estas proteínas como blancos terapéuticos.

**Palabras clave:** *Leishmania*, proteómica, electroforesis, espectrometría de masas, reacción en cadena de la polimerasa.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.392>

## Differential expression of proteins in *Leishmania (Viannia) panamensis* associated with mechanisms of resistance to meglumine antimoniate.

**Introduction.** The well-known drug resistance mechanisms to pentavalent antimony have been widely described in strains of the *Leishmania* subgenus, but little is known about the mechanisms of resistance and the proteins associated with it in strains of the *Viannia* subgenus such as *Leishmania panamensis*.

**Objective.** Differentially expressed proteins were identified between pentavalent antimonial sensitive and resistant *L. panamensis* (UA140) strains, and the role of these proteins was analyzed as possible resistance mechanisms.

**Materials and methods.** The protein lysates of pentavalent antimony sensitive and resistant strains were separated by two-dimensional gel electrophoresis, and the protein patterns compared. The proteins identified as overexpressed were separated and analyzed using MALDI-TOF/TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization/Time of Flight*). The level of mRNA expression of five of these proteins was quantified using real-time PCR.

### Contribución de los autores:

Ronald Guillermo Peláez: contribuyó al desarrollo de todos los ensayos de laboratorio, al análisis de los datos y a la escritura del artículo.

Carlos Enrique Muskus y Patricia Cuervo: contribuyeron al diseño y desarrollo del proyecto, al entrenamiento del estudiante de maestría (Ronald Guillermo Peláez) y al análisis de los datos.

Marcel Marín-Villa: contribuyó al diseño y desarrollo del proyecto, análisis de los datos, escritura y corrección del artículo.

**Results.** On the 2-dimensional gels,  $532 \pm 39$  protein spots were identified for the sensitive strains, and  $541 \pm 43$  spots for the resistant strains. Ten spots were overexpressed in the resistant strain and identified as heat shock protein (Hsp60 mitochondrial, Hsp70 cytosolic and mitochondrial), disulfide isomerase, cysteine protease, enolase, elongation factor 5-alpha, the proteasome alpha-5 subunit and two hypothetical proteins named as Sp(2) and Sp(25).

**Conclusion.** This is the first proteomic study conducted with a *L. panamensis* resistant strain where several proteins were identified and related with the parasite resistance mechanism to pentavalent antimony. This opens the way for future studies aimed at modulating the drug resistance or at evaluating these proteins as therapeutic targets.

**Key words:** *Leishmania*, proteomics, electrophoresis, mass spectrometry, polymerase chain reaction.

doi: <http://dx.doi.org/10.7705/biomedica.v32i3.392>

La leishmaniasis es una enfermedad de distribución mundial que afecta a 98 países en cuatro continentes, con un reporte de 12 millones de personas infectadas en el mundo y 2 millones de casos nuevos anuales, de los cuales, un cuarto corresponde a la forma visceral de la enfermedad (1,2).

Las fallas en la producción de una vacuna efectiva y los innumerables inconvenientes en el control del vector, han hecho que el control de la enfermedad se enfoque principalmente en la quimioterapia (3,4). En la actualidad, cada vez son más los estudios que reportan el hallazgo de *Leishmania* spp. resistente al antimonio pentavalente alrededor del mundo y en Colombia (5-18). Como tratamientos de segunda línea se utilizan la anfotericina B, la pentamidina y la miltefosina, que son medicamentos efectivos contra la leishmaniasis, pero, debido a sus altos costos y los efectos secundarios que pueden ocasionar, estos son poco utilizados (18).

El antimonio pentavalente es suministrado como un promedicamento que requiere ser activado a antimonio trivalente; no se tiene claro si su activación se produce por una vía enzimática o de manera espontánea (19). Se han reportado varios blancos celulares para el antimonio pentavalente y el antimonio trivalente, incluyendo el tripanotión, que es el principal agente reductor de tioles en el parásito (20-22).

Los mecanismos por los cuales *Leishmania* spp. adquiere resistencia, han sido motivo de discusión durante varias décadas. Se propone que los altos

niveles de resistencia pueden deberse a la pérdida en la reducción de los metales, disminución en el ingreso del medicamento, incremento en la síntesis de tripanotión-glutatión e incremento en el transporte (secuestro o eflujo) del conjugado metal-tiol (23).

Dado que son pocos los estudios sobre la especie *Leishmania panamensis*, el tener una aproximación al proteoma de una cepa resistente al antimonio pentavalente, es un paso importante para el descubrimiento de proteínas y mecanismos de resistencia que pueden ser extrapolables a cepas naturalmente resistentes, dando indicios de cómo actúan los medicamentos y por qué algunas veces fallan, lo cual puede ser útil para el desarrollo de nuevos tratamientos.

En el presente estudio se compararon los perfiles de proteínas citosólicas en una cepa de *L. panamensis* resistente y otra sensible al antimonio pentavalente, identificando las proteínas con aumento de la expresión en la cepa resistente y, de acuerdo con sus funciones biológicas, se proponen algunos posibles papeles en el mecanismo de resistencia al antimonio pentavalente para estas moléculas.

## Materiales y métodos

### Inducción de resistencia *in vitro*

Para inducir la resistencia *in vitro* al antimonio pentavalente en promastigotes de *L. panamensis*, cepa (MHOM/87/CO/UA140), los promastigotes se cultivaron en medio Schneider (Sigma®) con 10 % de suplemento de suero fetal bovino en presencia de penicilina y estreptomycin (10.000 U/ml -10.000 µg/ml) a 26 °C. Los parásitos se lavaron dos veces en PBS, y se centrifugaron a 2.500g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los promastigotes se ajustaron a una concentración de  $2 \times 10^6$  por ml en medio de cultivo y se adicionó un mezcla de antimonio pentavalente (Glucantime®, Aventis Pharma Ltda., Brasil) de los lotes L203890 y L203891 a su concentración

### Correspondencia:

Marcel Marín-Villa, Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, PECET, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Calle 62 N° 52-59, laboratorio 632, Medellín, Colombia  
Teléfono: (574) 219 6507; telefax: (574) 219 6511  
mvmarcel@gmail.com

Recibido: 01/07/11; aceptado:27/04/12

efectiva 50 ( $CE_{50}$ ), correspondiente a 4 mg/ml. Esta concentración se determinó previamente utilizando la técnica de bromuro 3-(4,5-dimetil tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (24). Los promastigotes se incubaron a 26 °C por cinco días, haciendo cambio de medio con medicamento; en cada cambio, los parásitos se lavaron con PBS a pH 7,0 ajustando de nuevo la concentración de parásitos a  $2 \times 10^6$  promastigotes/ml de medio.

Este procedimiento se hizo hasta obtener una viabilidad de los parásitos en presencia del medicamento mayor de 80 %, por recuento en cámara de Neubauer. Se utilizaron concentraciones crecientes y graduales de antimonio (8, 12, 16, 20, 24, 26, 28, 32, 33 mg/ml), hasta alcanzar una concentración final de 37 mg/ml. En un trabajo previo, para demostrar un comportamiento diferencial frente al medicamento entre la cepa susceptible y la resistente al antimonio pentavalente, se evaluó la resistencia *in vivo* infectando hámsters con las dos cepas y midiendo el tamaño de la nariz antes de la inoculación, después del desarrollo de la lesión (día 42), terminado el tratamiento con antimonio pentavalente (día 52) y cinco días después del tratamiento (día 57) (no se presentan los datos).

### **Extracción de proteínas**

Para la obtención de proteínas de promastigotes de *L. panamensis* sensible y resistente al antimonio pentavalente, se utilizó el método descrito por Cuervo, *et al.* (25). Se tomaron cultivos de promastigotes sensibles y resistentes en fase logarítmica crecidos durante cuatro días en botellas en una banda giratoria, recolectados por centrifugación a 2.000g durante 10 minutos a 4 °C y lavados dos veces con PBS a pH 7,2, resuspendidos en 2 ml de PBS hipotónico (13,6 mM NaCl, 0,27 mM KCl, 0,4 mM  $Na_2HPO_4$ , 0,15 mM  $KH_2PO_4$ ) en presencia de 1X de cóctel de inhibidores de proteasas (Roche), para obtener una concentración de  $5 \times 10^9$  parásitos/ml. Los parásitos se lisaron por 15 ciclos de congelamiento y descongelamiento, mediante pasos sucesivos en nitrógeno líquido y periodos de cinco minutos en baño con ultrasonido a temperatura ambiente, respectivamente. Los lisados se centrifugaron a 14.000g por siete minutos a 4 °C, en una centrífuga Thermo IEC MicroMax® (Harlow Scientific), para remover el material insoluble y se recuperó el sobrenadante que contenía las proteínas solubles. Las proteínas se precipitaron por incubación con 10 % (v/v) de ácido tricloroacético durante una hora a 4 °C; luego se centrifugaron a 14.000g por

15 minutos a 4 °C y se lavaron con acetona fría (Sigma), bajo las mismas condiciones.

El sedimento de proteínas se dejó secar a temperatura ambiente y luego se volvió a suspender en solución tampón de isoelectroenfoco compuesta de 9 M de urea, 4 % (p/v) CHAPS, 40 mM DTT y 1 % (v/v) de anfolitos 3-10 (GE Healthcare), según el protocolo empleado por Cuervo, *et al.* (25). Posteriormente, se determinó la concentración de las proteínas con el *2D Quant Kit™* (GE Healthcare), siguiendo las recomendaciones de la casa comercial. Las proteínas cuantificadas se guardaron a -20 °C hasta su uso.

### **Electroforesis en dos dimensiones**

Para el isoelectroenfoco se utilizaron alícuotas de 600 µg de proteínas en un volumen final de 350 µl de solución de rehidratación (9 M de urea, 4 % CHAPS, 40 mM DTT y 1 % de anfolitos 3-10). Las proteínas se separaron por punto isoeléctrico (*pI*), en tiras de poliacrilamida (IPG) de 18 cm de longitud con un rango de pH de 4 a 7 (GE Healthcare), utilizando el sistema *Ettan IPGphor 3* a una temperatura de 20 °C a 50 µA/tirilla.

Los parámetros de isoelectroenfoco fueron los siguientes: rehidratación pasiva por 14 horas; constante de 1 a 200 V por cuatro horas; gradiente desde 200 a 500 V por una hora; gradiente desde 500 a 1.000 V por una hora; gradiente desde 1.000 a 8.000 V por 30 minutos; 8.000 V constantes por seis horas o hasta completar un voltaje igual o superior a 32.000. Antes de la segunda dimensión, las tiras se redujeron (10 mg/ml de DTT) y alquilaron (25 mg/ml de iodoacetamida) en 5 ml de solución tampón de equilibrio (urea 6M, SDS 6%, Tris/Cl 0,375M, glicerol 20 %) durante 15 minutos.

La segunda dimensión se hizo en geles de poliacrilamida al 12 % de 1,5 mm de espesor. Las tiras fueron selladas con agarosa al 1 % (p/v) que contenía azul de bromofenol al 0,001 %. La electroforesis se llevó a cabo en un sistema *Ettan DALT Six™* (GE Healthcare) a 10 °C en solución tampón estándar Tris/Glicina/SDS, empleando 2,5 W/gel por 30 minutos, seguido de 15 W/gel por cuatro horas o hasta que el azul de bromofenol alcanzara la parte inferior del gel. Para la visualización de las proteínas, los geles se tiñeron con coloración de azul de Coomassie coloidal (G-250), según el protocolo estándar descrito por Neuhoff, *et al.* (26).

Se hicieron nueve réplicas de geles bidimensionales para cada uno de los perfiles proteicos de

la línea de *L. panamensis* sensible y la resistente a antimonio pentavalente, empleando muestras proteicas de cultivos independientes. Las imágenes de los geles se adquirieron en el escáner *ImageScannerTM III™* y el análisis diferencial de las imágenes se llevó a cabo en el *software ImageMaster 2D Platinum 7.0™* (GE Healthcare). Para determinar si una proteína se expresaba de manera diferencial, se consideró que el cambio relativo de expresión era estadísticamente significativo si el análisis de varianza (ANOVA) arrojaba un valor de  $p < 0,05$  y el valor de proporcionalidad era igual o superior a 1,5.

### **Identificación de proteínas por espectrometría de masas y análisis bioinformáticos**

Las manchas proteicas que mostraron una expresión diferencial en los geles bidimensionales se cortaron manualmente; los trozos de gel se almacenaron en ácido acético al 7 % y se enviaron al *System Proteomics Center, University of North Carolina-Chapel Hill*, en Estados Unidos, para su análisis por espectrometría de masas. Las proteínas se digirieron con tripsina y los péptidos resultantes se analizaron en un espectrómetro de masas ABI 4800 MALDI-TOF/TOF™ (*Applied Biosystems*), trabajando en un modo de reflectrón positivo.

Se obtuvo un espectro de barrido completo en el rango de  $m/z$  de 700 a 4.000, seguido de máximo 45 espectros MS/MS por mancha proteica. Los espectros se calibraron externamente utilizando una mezcla estándar 4.700 *Proteomics Analyzer Calibration Mixture (Applied Biosystems)* e, internamente, utilizando iones derivados de los péptidos de autodigestión de la tripsina. Los espectros de masa se interpretaron usando el programa *GPS Explorer™ Protein Analysis™*, versión 3.6 (*Applied Biosystems*), el cual permite búsquedas no redundantes en la base de datos NCBI nr del *National Center for Biotechnology Information*, mediante el motor de búsqueda MASCOT® (Matrix Science).

Para las búsquedas no se restringió la masa molecular ni el punto isoeléctrico ( $pI$ ) de las proteínas; no se hizo restricción de grupo taxonómico, se eligió tripsina como enzima de digestión especificando dos cortes parciales, y se tuvieron en cuenta modificaciones como la oxidación de las metioninas y la acetilación de las lisinas.

Una tolerancia de masa de 80 ppm y 0,5 Da se asignaron para la comparación de los espectros

de masa (modo MS) y sus fragmentos correspondientes (modo MS/MS), respectivamente.

Finalmente, todos los péptidos identificados automáticamente por homología con especies de *Leishmania*, se confirmaron: i) buscando la homología proteica en la base de datos GeneDB *Leishmania braziliensis*, y ii) haciendo secuenciación manual de todos los péptidos no identificados por el programa *GPS Explorer™*. Las funciones biológicas de las proteínas de *L. panamensis* identificadas se asignaron de acuerdo con la ontología de genes y se determinó la probable vía metabólica en la cual participan las proteínas por medio de la librería de genes y genomas de Kyoto (KEGG); ambos análisis se basaron en búsqueda de información de las proteínas de *L. braziliensis* y *L. major* anotadas en la base de datos GeneDB.

### **Cuantificación del ARNm en proteínas con aumento de expresión**

Se diseñaron seis juegos de cebadores para los genes *16S* (gen normalizador), proteasa de cisteína, isomerasa de disulfuro, enolasa, factor de iniciación 5- $\alpha$ , subunidad 5- $\alpha$  del proteasoma (cuadro 1). El ARN total se extrajo con *Trizol Reagent™* (Invitrogen), según recomendaciones de la casa comercial. Los extractos de ARN total de las líneas sensibles y resistentes, se cuantificaron mediante el espectrofotómetro *NanoDrop 1000™* (*Thermo Scientific*) y se tomaron volúmenes equivalentes a 2  $\mu\text{g}$  de ARN para el proceso de transcripción inversa, el cual se practicó con el estuche comercial *QuantiTect Reverse Transcription™* (Qiagen).

Para cada reacción de PCR en tiempo real, las concentraciones de los reactivos fueron las siguientes: 12,5  $\mu\text{l}$  de 2x *QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix* (1x), 1  $\mu\text{l}$  de cada cebador (1  $\mu\text{M}$ ), 2  $\mu\text{l}$  de ADNc, 8,5  $\mu\text{l}$  de agua libre de ARNsa, para completar un volumen final de 25  $\mu\text{l}$ .

El perfil térmico utilizado para todos los genes fue de cinco minutos a 95 °C para la activación inicial de la Taq polimerasa; luego se usaron 35 ciclos con una temperatura de desnaturalización de 95 °C por 10 segundos y una temperatura de hibridación-extensión de 60 °C por 30 segundos. Una vez terminados los 35 ciclos, se hizo un análisis de *melting*, dejando las reacciones a 72 °C durante cinco minutos y con un rampa de temperatura de 60 a 95 °C, obteniendo los datos de fluorescencia cada 0,4 segundos.



**Cuadro 1.** Oligonucleótidos utilizados para medir la expresión relativa de ARNm en cinco proteínas diferencialmente expresadas en la línea resistente a antimonio pentavalente

Oligonucleótidos	Secuencia	Tm	%GC
ARNr (F)	GGTCGCGCAACGAGGAATGT	60,7	60
ARNr (R)	CACCGCCTGTCCGATCACCT	62,0	65
Disulfuro (F)	TCT GCG TGC AAC TCG CTG CT	62,0	60
Disulfuro (R)	CCA TCA CGG ACC ACC CGT TC	60,0	65
Proteasa C (F)	GGT GCG CAT CGA GGG TGA CT	62,0	65
Proteasa C (R)	GCA GGG TTC GCG TCC TCA AC	61,3	65
Enolasa (F)	TCT GCG TGC AAC TCG CTG CT	62,4	60
Enolasa (R)	CCA TCA CGG ACC ACC CGT TC	60,7	65
FE-5A (F)	CAA CGG CCG TCC GTG TAA GG	61,0	65
FE-5A (R)	CGA GGC GGT TGC CAG TGA AG	61,3	65
Proteasoma (F)	CTA CGA CGC CCA GGC CAT TG	61,0	65
Proteasoma (R)	AGC GTC TCG CCC TCC TCC AG	63,8	70

(F) indica oligonucleótido en sentido y la (R) oligonucleótido en antisentido.

Tm: temperatura de fusión; %GC: porcentaje de guaninas y citocinas

El cálculo del número de veces que un transcripto estaba diferencialmente expresado entre la cepa sensible y la resistente, se estimó mediante el método del delta-delta Ct (27), teniendo en cuenta la eficiencia de amplificación para cada gen. La eficiencia de amplificación se calculó mediante el programa LinReg, empleando, al menos, cuatro o cinco puntos de los valores de fluorescencia de la fase de amplificación exponencial.

## Resultados

### ***Leishmania panamensis* resistente a antimonio pentavalente**

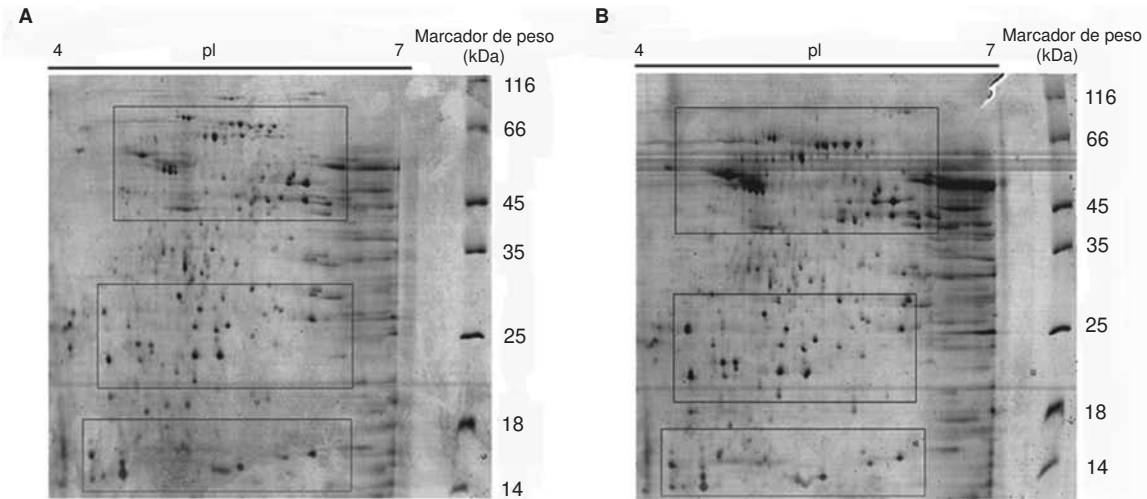
Mediante un proceso gradual de selección *in vitro*, fue posible obtener parásitos de *L. panamensis* resistentes al antimonio pentavalente, los cuales presentaban la capacidad de sobrevivir y multiplicarse en medio de cultivo con altas concentraciones del medicamento (37 mg/ml). En la evaluación del tamaño de la lesión de hámsters infectados con la cepa silvestre y la resistente de *L. panamensis* y tratados con antimonio pentavalente, se pudo observar una diferencia estadísticamente significativa (Mann-Whitney de dos colas;  $p=0,0016$ ), en el tamaño de la lesión entre los dos grupos de animales después de diez días de tratamiento con antimonio pentavalente (no se presenta el dato), lo cual indica diferencias en la sensibilidad al medicamento entre las dos cepas. En los cultivos en masa crecieron  $1 \times 10^{10}$  promastigotes/100 ml, tanto en la cepa sensible como en la resistente, obteniéndose entre 2 y 4 mg de proteínas que fueron disueltas en solución tampón IEF y almacenadas a  $-20^\circ\text{C}$ .

### ***Análisis comparativo del proteoma de las cepas sensible y resistente***

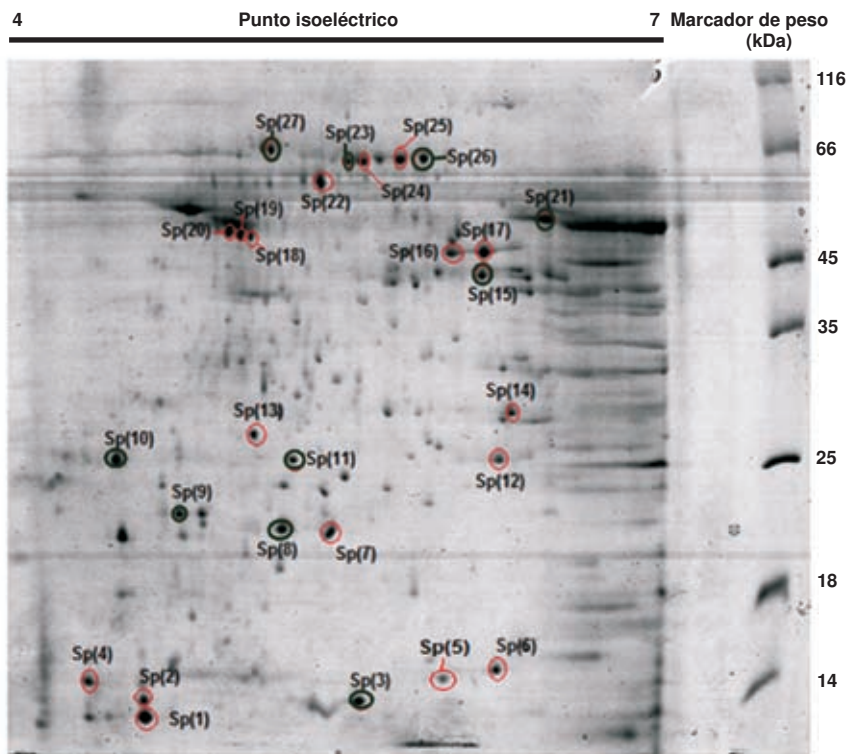
Los dos perfiles proteicos obtenidos para las cepas sensible y resistente presentaron,  $532 \pm 39$  manchas proteicas en la cepa sensible y  $541 \pm 43$  manchas proteicas en la cepa resistente. Estas proteínas tuvieron puntos isoeléctricos entre 4,09 y 7,00, y masas moleculares correspondientes a un intervalo de 10 kDa y 116 kDa, con la mayoría de las manchas localizadas por encima de los 23 kDa (figura 1).

Una vez hecho el análisis de imágenes, al comparar los perfiles proteicos de las cepas sensible y resistente, se encontraron 16 proteínas que presentaban un aumento en la expresión mayor o igual a 1,5 veces y con un valor  $p$  (ANOVA) menor o igual a 0,05. De manera paralela, se eligieron 10 proteínas con expresión constitutiva entre la cepa resistente y la sensible al antimonio pentavalente, con valores de  $p$  (ANOVA) mayores de 0,05 y con diferencias en la expresión menores de 1,5 veces, con el objetivo de validar su uso posterior como posibles genes normalizadores en estudios de transcriptoma.

Entre las manchas proteicas que tuvieron un aumento en la expresión, estuvieron: Sp(1), Sp(2), Sp(5), Sp(6), Sp(7), Sp(12), Sp(13), Sp(14), Sp(16), Sp(17), Sp(18), Sp(19), Sp(20), Sp(22), Sp(24) y Sp(25); mientras que las manchas proteicas que no tuvieron variaciones de expresión entre las cepas sensible y resistente al antimonio pentavalente, fueron nombradas como: Sp(3), Sp(8), Sp(9), Sp(10), Sp(11), Sp(15), Sp(21), Sp(23), Sp(26) y Sp(27) (figura 2).



**Figura 1.** Electroforesis en dos dimensiones (E-2D) de *L. panamensis* sensible (UA140-WT) y resistente (RST-G37). En el panel (A) se muestra el proteoma de promastigotes UA140-WT y en el panel (B) se muestra el proteoma de promastigotes RST-G37. Las regiones delimitadas por los rectángulos, son las zonas donde se ubican las proteínas diferencialmente expresadas.



**Figura 2.** Proteínas identificadas en el proteoma de *L. panamensis* resistente, RST-G37. Las proteínas con expresión exagerada se muestran encerradas en círculos rojos, las proteínas con expresión constitutiva están encerradas en círculos verdes.

**Identificación de las proteínas seleccionadas**

En la mayoría de las proteínas analizadas, la correlación del punto isoeléctrico (*pI*) teórico con el experimental fue la esperada, abarcando puntos isoeléctricos entre 4 y 6,8. Solo algunas proteínas de masa molecular de 13 a 67 kDa tuvieron variaciones significativas en los valores teórico y

experimental de masa, debido a la fragmentación de algunas de ellas.

De las 26 proteínas que se identificaron, 16 correspondían a proteínas con aumento de la expresión en la cepa resistente. Sin embargo, una vez caracterizadas por espectrometría de masas, se evidenció que varias de estas proteínas

correspondían a péptidos fragmentados de tres proteínas, la Hsp70 mitocondrial, la isomerasa de disulfuro y la enolasa.

Teniendo en cuenta lo anterior, el número de proteínas con aumento de la expresión se redujo a 10 (cuadro 2, figura 3). En las proteínas con expresión constitutiva en la cepa sensible y la resistente, se identificaron siete de ellas como: endorribonucleasa Sp(3), complejo proteolítico (hs1vu) Sp(9), posible polipéptido naciente Sp(11), proteína ligasa de biotina Sp(15), proteína de unión a GTP Sp(21), proteína reguladora de glucosa Sp(23) y s-adenosilhomocisteína hidrolasa Sp(27). El número total de péptidos encontrados para cada

proteína estuvo entre 3 y 26. La identificación de las proteínas se aceptó como válida, ya que la puntuación del coeficiente Mowse fue superior a 83 ( $p < 0,05$ ) y la cobertura de secuencia para los péptidos correspondió, al menos, a 10 % del tamaño de la proteína.

**Clasificación de las proteínas según su función biológica**

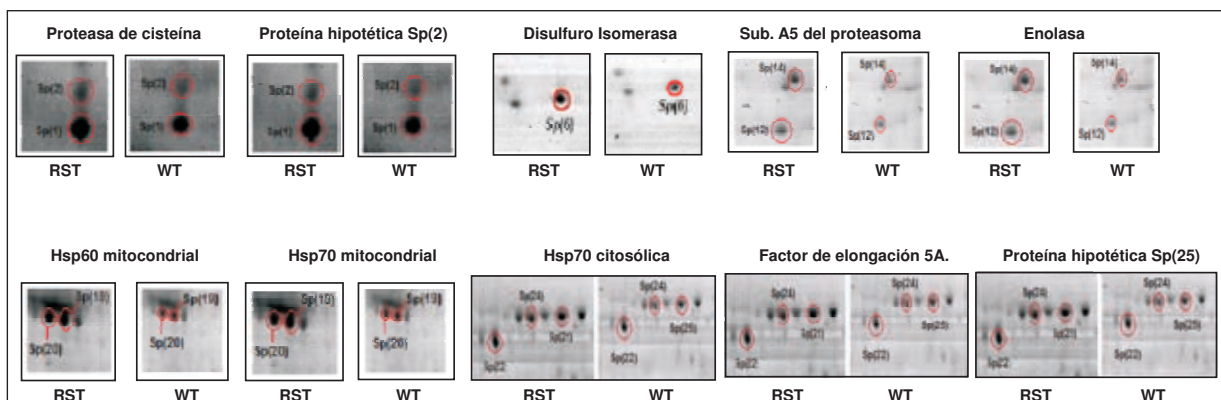
Las proteínas identificadas mediante espectrometría de masas, se agruparon en seis categorías:

- 1) proteólisis (proteasa de cisteína, complejo proteolítico Hs1vu, subunidad 5 alfa del proteasoma),

**Cuadro 2.** Proteínas identificadas como diferencialmente expresadas entre la cepa de *L. panamensis* sensible y la resistente a antimonio pentavalente mediante MALDI-TOF/TOF

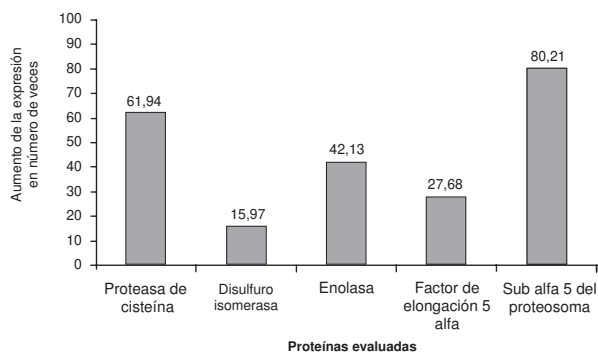
Código proteína	M <sub>r</sub> t/e a	p t/e b	Proteína identificada	Nº de acceso (PIR) c	Nº de péptidos identificados d	ScoreUA140 MASCOT®e	UA140 WT f	UA140 RST37g	Valor d radio h	Valor p i
Sp(1)	13,04/13,02	4,73/4,67	Proteasa de cisteína	gil154334241	10	387/83	0,416	1,047	2,51	0,044
Sp(2)	3,39/14,00	4,72/4,67	Proteína hipotética	gil146080683	5	132/83	0,310	1,326	4,27	0,034
Sp(6)	52,35/14,01	5,07/5,64	Isomerasa de disulfuro	gil154346808	11	159/83	0,325	1,406	4,32	0,002
Sp(12)	26,82/25,08	5,67/6,27	Subunidad alfa del proteosoma	gil154343830	14	494/83	0,301	0,728	2,41	0,015
Sp(14)	46,07/28,32	5,60/6,33	Enolasa	gil154334335	16	385/83	0,155	0,426	2,74	0,013
Sp(19)	59,47/49,06	5,34/5,10	Hsp60 mitocondrial	gil146092550	21	794/83	0,200	1,544	7,70	0,004
Sp(20)	71,36/49,70	5,91/5,05	Hsp70 mitocondrial	gil154341837	5	89/83	0,210	1,322	6,29	0,033
Sp(22)	71,22/59,78	5,27/5,47	Hsp70 del citosol	gil146092550	12	299/83	0,387	1,892	4,89	0,027
Sp(24)	18,82/64,00	5,42/5,83	Factor de elongación eucariota 5A	gil154346808	7	250/83	0,425	0,941	2,21	0,031
Sp(25)	5,17/64,05	5,25/5,56	Proteína hipotética	gil154346808	17	85/83	0,315	1,200	3,80	0,017

Mr t/e: masa molecular, teórica/experimental observada por E-2D; p/ t/e: punto isoeléctrico, teórico/experimental observado por E-2D; Nº de acceso (PIR): número de acceso de la proteína en la base de datos (PIR) ; Nº de péptidos identificados: número de péptidos identificados en la proteína; Puntaje MASCOT: puntaje obtenido a partir de la búsqueda en MASCOT; UA140 W y RTS: valor de prominencia para las proteínas en las cepas sensible y resistente; Valor de radio: relación de prominencia entre las proteínas en las cepas sensible y resistente; Valor p: análisis de varianza (ANOVA) para la expresión de proteínas en las cepas sensible y resistente, estadísticamente significativo con un valor de  $p < 0,05$ .

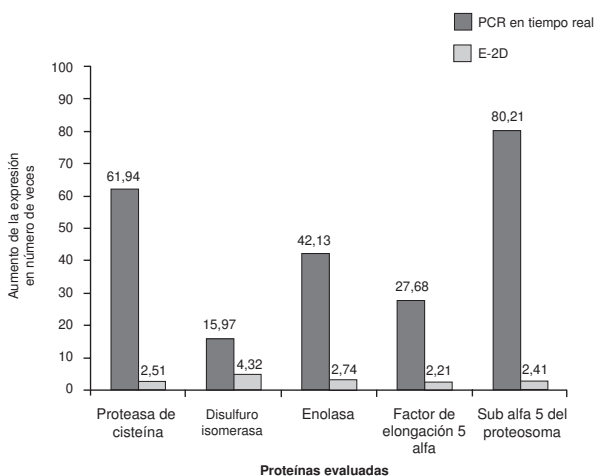


**Figura 3.** Proteínas con expresión exagerada en la cepa resistente RST-G37. En la parte superior de cada imagen se muestra el nombre de la proteína identificada. La abreviatura (RST) indica que la proteína hace parte de la condición resistente, (WT) indica que la proteína hace parte de la condición sensible. El código (Sp) indica la localización de la proteína según el mapa proteómico.

- 2) plegamiento/chaperonas (isomerasa de disulfuro, Hsp70m, Hsp70c, Hsp60m, proteína reguladora glucosa),
- 3) síntesis de proteínas (posible polipéptido naciente, proteína de unión a GTP, factor de elongación eucariota 5 alfa),
- 4) metabolismo de carbohidratos (enolasa),
- 5) metabolismo de aminoácidos (S-adenosil homocisteína hidrolasa), y
- 6) función desconocida (Sp2, Sp25, endorribonucleasa, proteína ligasa de biotina).



**Figura 4.** Evaluación de la expresión de los genes mediante PCR en tiempo real. Los valores sobre cada una de las barras del gráfico, corresponden al número de veces que se encontró aumentado en la cepa resistente RST-G37 el ARNm para cada una de las cinco proteínas evaluadas. El grado de expresión que se muestra en las barras representa el promedio de tres experimentos independientes.



**Figura 5.** Comparación en la expresión de proteínas y ARNm de cinco proteínas que tuvieron un aumento en la cepa resistente a antimonio pentavalente. Las barras con cuadros negros muestran el número de veces que se encontró mayor cantidad de ARNm codificante para las cinco proteínas mediante PCR en tiempo real y las barras con rayas grises oblicuas muestran el número de veces que aumentaron las cinco proteínas mediante electroforesis en dos dimensiones.

**Quantificación del ARNm por PCR en tiempo real de cinco proteínas con aumento de expresión por electroforesis bidimensional**

Utilizando diferentes cantidades de parásitos, se logró determinar que el número óptimo para los procesos de extracción de ARN es de  $5 \times 10^6$  parásitos, lográndose extraer entre 533 y 975 ng/μl de ARN total de la cepa resistente y entre 500 y 950 ng/μl de la cepa sensible. El número de veces que se encontró expresión exagerada de la cantidad de ARNm en la cepa resistente a antimonio pentavalente con respecto a la sensible, fue de 61,9 veces para el gen de la proteasa de cisteína, 15,9 en la isomerasa de disulfuro, 42,1 en la enolasa, 27,6 en el factor de elongación 5 alfa y 80,2 en la subunidad 5 alfa del proteosoma (figura 4). Al hacer un análisis comparativo entre las veces que se expresan en forma aumentada las proteínas cuantificadas mediante electroforesis en dos dimensiones y el ARNm de las proteínas cuantificado por PCR en tiempo real, se encontró que con ambas técnicas se evidenció un incremento en la expresión de ambos tipos de moléculas en la cepa resistente (figura 5).

**Discusión**

La aparición de cepas de *Leishmania* resistentes a los medicamentos antimoniales en varias partes del mundo, ha venido en incremento como consecuencia de la mala utilización del antimonio pentavalente como fármaco de primera línea por más de 50 años para el tratamiento de las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis (28). Inicialmente, una pequeña dosis del medicamento (10 mg/kg) por un corto tiempo (6 a 10 días) era suficiente para la resolución de la enfermedad, pero, la aparición de reportes de fallas clínicas al tratamiento, obligó al aumento de la dosis a 20 mg/kg por 30 a 40 días (23).

En el distrito norte de Bihar, en la India, se ha reportado falla clínica al tratamiento con antimonio pentavalente en 56 a 60 % de los pacientes (28). De igual manera, en países de Suramérica, como Brasil (9), Venezuela (6) y Perú (16), se han evidenciado fallas clínicas al tratamiento con antimonio pentavalente, lo cual sugiere que pueden ser ocasionadas por parásitos resistentes al medicamento.

En Colombia, se tienen pocos informes de resistencia, aunque se ha documentado que las fallas clínicas al tratamiento con antimonio cada vez son más frecuentes, lo cual indica



que la falla clínica al antimonio pentavalente en casos de leishmaniasis cutánea puede deberse a la resistencia de *L. panamensis* al antimonio pentavalente (10-12).

La resistencia de *Leishmania* spp. a los antimoniales parece estar mediada principalmente por mecanismos de amplificación y coamplificación génica, y sistemas de eflujo del medicamento asociados a proteínas de membrana (29-31). Kumar, *et al.*, caracterizaron en el 2010 el proteoma de un aislamiento clínico de *L. donovani* resistente a estibogluconato de sodio, identificando proteínas con aumento de expresión (32).

No obstante el trabajo anterior, nuestra investigación es uno de los pocos estudios proteómicos en una cepa resistente a antimonio pentavalente y es el primer trabajo llevado a cabo en *L. panamensis* resistente a este medicamento. La cepa fue seleccionada hasta 37 mg/ml de antimonio pentavalente, debido a que se buscó tener un espectro de resistencia bastante amplio entre la cepa sensible y la resistente (CE<sub>50</sub> de 4 mg/ml *versus* 37 mg/ml) y con mayor probabilidad de detectar proteínas asociadas al fenotipo resistente. En esta cepa resistente, se encontró expresión exagerada de las proteínas Hsp60 mitocondrial, Hsp70 mitocondrial y citosólica, proteína de isomerasa de disulfuro y dos proteínas hipotéticas nombradas como Sp(2) y Sp(25), las cuales aparentemente podrían estar participando en una respuesta inicial del parásito para evadir la acción leishmanicida del antimonio pentavalente de manera indirecta, contribuyendo al mecanismo primario de desintoxicación mediado por las moléculas de tripanotión-glutatiión al eliminar las formas disulfuro de estos compuestos (19). Además, estas proteínas podrían contribuir a evitar la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, controlar el potencial de oxidorreducción de la célula y evitar los procesos de apoptosis de fragmentación del ADN inducido por los antimoniales pentavalentes.

En varios estudios se ha demostrado que los medicamentos antimoniales inducen un proceso similar a la muerte celular programada de tipo apoptosis, en promastigotes y amastigotes de *Leishmania* spp. (17,33,34). El proceso de muerte de tipo apoptosis en *Leishmania* spp. ha sido demostrado claramente a nivel fenotípico, con el estudio de varias características citoplásmicas, mitocondriales y nucleares, como la contracción de las células, la liberación de fosfatidilserina mitocondrial, una disminución en el potencial de la

membrana mitocondrial, la liberación de citocromo C, la condensación del ADN y la activación de las proteasas citoplásmicas (35-37).

En concordancia con nuestros hallazgos, las Hsp70, en sus versiones citosólicas y mitocondriales, se han reportado con aumento de la expresión después de estimular promastigotes de *Leishmania* spp. con antimonio trivalente, lo que sugiere su papel protector en un posible mecanismo de tolerancia primario a los antimoniales. Igualmente, se ha postulado que la proteína Hsp83 mitocondrial podría estar confiriendo un mecanismo protector contra la muerte celular programada inducida por el antimonio pentavalente, evitando la disminución en el potencial de membrana mitocondrial (37,38). Lo anterior nos permite sugerir que el aumento de la expresión de los precursores mitocondriales Hsp60 y Hsp70, presentes en la matriz mitocondrial de *L. panamensis*, puede participar de igual manera en el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial que está siendo afectado por el antimonio pentavalente en los promastigotes resistentes al medicamento.

La proteína hipotética Sp(2) presenta un dominio Alba, cuya principal función es la unión reversible de proteínas al ADN (39,40). Algunas proteínas que poseen este dominio están distribuidas uniforme y abundantemente sobre el cromosoma, al parecer, participando en el establecimiento o mantenimiento de la arquitectura de la cromatina, y posiblemente protegiendo al ADN de un proceso de fragmentación durante la apoptosis. En nuestro estudio se encontraron dos proteínas con el potencial de reemplazar la función de la reductasa de tripanotión, la proteína hipotética Sp(25) y la isomerasa de disulfuro.

La proteína Sp(25), al poseer un dominio tiolasa, juega un papel clave en el mecanismo de resistencia al antimonio, ya que presenta la función potencial de escindir las formas disulfuro de tripanotión y glutatiión, reemplazando o complementando de esta manera la función de la reductasa de tripanotión, la cual se encuentra inhibida por el antimonio trivalente, dándose de esta manera la producción normal de tioles dentro del parásito.

La isomerasa de disulfuro es un miembro de la superfamilia tioredoxina, enzima capaz de catalizar la oxidación, reducción e isomerización de los puentes disulfuro según el potencial de oxidorreducción *in vitro* (41); esta enzima podría convertir las formas disulfuro del tripanotión y el glutatiión a sus formas de tioles libres, contribuyendo

de esta manera al secuestro y excreción del antimonio trivalente, mediante transportadores de membrana dependientes del conjugado antimonio trivalente-tiol, como la glucoproteína P (Pgpa) o los transportadores de resistencia múltiple a fármacos (42).

Además de las proteínas mencionadas anteriormente, otras como la proteasa de cisteína, la subunidad 5 alfa del proteasoma, la enolasa y el factor de elongación 5 alfa eucariota, también tuvieron un aumento significativo en la cepa resistente y, a pesar de que no se logró vincularlas directamente con el mecanismo de resistencia a antimonio pentavalente, creemos que posiblemente son el reflejo de un cambio metabólico que sufre el parásito para poder mantener el mecanismo de resistencia, debido a que estas proteínas están involucradas en procesos como la síntesis de proteínas, la proteólisis y el metabolismo de carbohidratos.

Cabe anotar que solo en cinco proteínas analizadas por electroforesis en dos dimensiones, se cuantificó la expresión de ARNm mediante PCR en tiempo real (figura 5). Sin embargo, se encontró que la expresión difiere bastante entre estas dos técnicas, debido a que la cuantificación de la expresión por PCR en tiempo real presenta una sensibilidad superior a la cuantificación observada mediante la electroforesis en dos dimensiones. A pesar de ello, lo que se encontró exageradamente expresado en las proteínas, también lo fue en el ARNm. Una explicación lógica de las diferencias en el nivel de aumento de expresión detectado por ambas técnicas, puede ser que la traducción de proteínas en *Leishmania* spp. no conserva una relación lineal con la transcripción de ARNm debido a los diferentes mecanismos de regulación postranscripcionales que existen en este parásito (43-45).

En este trabajo se encontró que tres de las proteínas con expresión exagerada (las proteínas Hsp70, la enolasa y la subunidad 5 alfa del proteasoma) también se reportaron con aumento de la expresión por Kumar, *et al.*, en un aislamiento clínico de *L. donovani*, lo cual confirma y apoya nuestros resultados.

Este trabajo es la primera aproximación proteómica para identificar proteínas involucradas en mecanismos de resistencia al antimonio pentavalente en *L. panamensis*, lo cual valida la utilidad de la electroforesis en dos dimensiones en combinación con la espectrometría de masas.

Posteriores estudios de análisis funcional de genes y establecimiento de la función enzimática de estas proteínas, podrían ayudar a dilucidar el verdadero papel de estas proteínas en los mecanismos de resistencia que presentan los promastigotes de *L. panamensis* para evadir el efecto tóxico de los antimoniales.

### Agradecimientos

Los autores de este estudio agradecen a Óscar Álzate, director del *System Proteomics Center, University of North Carolina-Chapel Hill*, U. S. A., por los servicios prestados en la identificación de las proteínas por MALDI-TOF/TOF.

### Conflicto de intereses

Declaramos que en este trabajo no se presenta ningún conflicto de intereses.

### Financiación

Este estudio fue financiado por el proyecto 111540820533 de Colciencias, CODI: Universidad de Antioquia y el Programa para la Formación de Jóvenes Investigadores de Colciencias.

### Referencias

1. **WHO.** Control of the leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, March 22-26, 2010. WHO technical report series. Geneva: WHO; 2010. p. 1-202.
2. **Desjeux P.** Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 2004;27:305-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>
3. **Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S.** Leishmaniasis: New approaches to disease control. *BMJ.* 2003;326:377-82. <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.326.7385.377>
4. **Requena JM, Iborra S, Carrion J, Alonso C, Soto M.** Recent advances in vaccines for leishmaniasis. *Expert Opin Biol Ther.* 2004;65:1505-17. <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.4.9.1505>
5. **Rocha RA, Sampaio RN, Guerra M, Magalhaes A, Cuba CC, Barreto AC, et al.** Apparent glucantime failure in five patients with mucocutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 1980;83:131-9.
6. **Ei-Masum MA, Evans DA.** Characterization of *Leishmania* isolated from patients with Kala-azar and post Kala-azar dermal leishmaniasis in Bangladesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1995;89:331-2.
7. **Bonfante GR, Barroeta S, Mejía de los Alejos MA, Meléndez E, Torrealba J, Valdivia O, et al.** Disseminated American cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol.* 1996;35:561-5.
8. **Costa JM, Marsden PM, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, et al.** Disseminated cutaneous

- leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: A report of eight cases. *J Trop Med Hyg.* 1986;89:319-23.
9. **Ribeiro RN, Marsden PD.** Mucosal leishmaniasis unresponsive to glucantime therapy successfully treated with AmBisome™. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1997;91:77.
  10. **Vélez I, Agudelo S, Hendrickx E, Puerta J, Grogl M, Modabber F, et al.** Inefficacy of allopurinol as monotherapy for Colombian cutaneous leishmaniasis: A randomized, controlled trial. *Ann Intern Med.* 1997;126:232-6.
  11. **Palacios R, Osorio LE, Grajew LF, Ochoa MT.** Treatment failure in children in a randomized clinical trial with 10 and 20 days of meglumine antimonate for cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania Viannia* species. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;64:187-93.
  12. **Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M, Saravia NG.** Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *J Infect Dis.* 2006;193:1375-83. <http://dx.doi.org/10.1086/503371>
  13. **Faraut-Gambarelli F, Piarroux R, Deniau M, Giusiano B, Marty P, Michel G, et al.** *In vitro* and *in vivo* resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimonate: A study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:827-30.
  14. **Lira R, Sundar S, Makharia A, Kenney R, Gam A, Saraiva E, et al.** Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian Kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of *Leishmania donovani*. *J Infect Dis.* 1999;180:564-7. <http://dx.doi.org/10.1086/314896>
  15. **Moreira ES, Guerra JB, Petrilló-Peixoto M de L.** Glucantime resistant *Leishmania* promastigotes are sensitive to pentostam. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1992;25:247-50.
  16. **Grogl M, Thomason TN, Franke ED.** Drug resistance in leishmaniasis: Its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1992;47:117-26.
  17. **Sereno D, Holzmüller P, Mangot I, Cuny G, Ouaisi A, Lemesre J.** Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45:2064-9. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.45.7.2064-2069.2001>
  18. **Croft SL, Coombs GH.** Leishmaniasis –current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* 2003;19:502-8. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2003.09.008>
  19. **Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH.** Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 2004;279:39925-32. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M405635200>
  20. **Berman JD, Waddel D, Hanson BD.** Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1985;27:916-20.
  21. **Berman JD, Gallalee JV, Best JM.** Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem Pharmacol.* 1987;36:197-201. [http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952\(87\)90689-7](http://dx.doi.org/10.1016/0006-2952(87)90689-7)
  22. **Tovar J, Cunningham ML, Smith AC, Croft SL, Fairlamb AH.** Down-regulation of *Leishmania donovani* trypanothione reductase by heterologous expression of a trans-dominant homologue: Effect on parasite intracellular survival. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95:5311-6.
  23. **Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH.** Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 2006;19:111-26. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.19.1.111-126.2006>
  24. **Muñoz DL, Cardona DP, Cardona A, Carrillo LM, Quiñones W, Echeverri F, et al.** Effect of hydrazones against intracellular amastigotes of *Leishmania panamensis* and a parasitic cysteine protease. *Vitae.* 2006;12:5-12.
  25. **Cuervo P, Batista de Jesus J, Junqueira M, Mendonça-Lima L, Gonzalez LJ, Betancourt L, et al.** Proteome analysis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Mol Biochem Parasitol.* 2007;154:6-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.03.013>
  26. **Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W.** Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 1988;9:255-62. <http://dx.doi.org/10.1002/elps.1150090603>
  27. **Pfaffl MW.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research.* 2001;29:2002-7.
  28. **Sundar S.** Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health.* 2001;6:849-54. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3156.2001.00778.x>
  29. **Groncin K, Roy G, Ouellette M.** Formation of extrachromosomal circular amplicons with direct or inverted duplications in drug-resistant *Leishmania tarentolae*. *Mol Cell Biol.* 1996;16:3587-95.
  30. **Haimeur A, Ouellette M.** Gene amplification in *Leishmania tarentolae* selected for resistance to sodium stibogluconate. *Antimicrob Agent Chemoter.* 1998;42:1689-94.
  31. **Haimeur A, Brochu C, Genest P, Papadopolou B, Ouellette M.** Amplification of the ABC transporter gene *PGPA* and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII) resistant *Leishmania tarentolae*. *Mol Biochem Parasitol.* 2000;108:131-5. [http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851\(00\)00187-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0166-6851(00)00187-0)
  32. **Kumar A, Sisodia B, Misra P, Sundar S, Shasany AK, Dube A.** Proteome mapping of overexpressed membrane-enriched and cytosolic proteins in sodium antimony gluconate (SAG) resistant clinical isolate of *Leishmania donovani*. *Br J Clin Pharmacol.* 2010;70:609-17. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2125.2010.03716.x>
  33. **Lee N, Bertholet S, Debrabant A, Muller J, Duncan R, Nakhasi H.** Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death Differ.* 2002;9:53-64. <http://dx.doi.org/10.1038/sj/cdd/4400952>
  34. **Sudhandiran G, Shaha C.** Antimonial-induced increase in intracellular Ca<sup>2+</sup> through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Biol Chem.* 2003;278:25120-32. <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M301975200>

35. **Arnoult D, Akarid K, Grodet A, Petit PX, Estaquier J, Ameisen, JC.** On the evolution of programmed cell death: Apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death Differ.* 2002;9:65-81. <http://dx.doi.org/10.1038/sj/cdd/4400951>
36. **Zangger H, Mottram JC, Fasel N.** Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: Programmed cell death or necrosis? *Cell Death Diff.* 2002;9:1126-39. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.cdd.4401071>
37. **Brochu C, Haimeur A, Ouellette M.** The heat shock protein HSP70 and heat shock cognate protein HSC70 contribute to antimony tolerance in the protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Stress Chaperones.* 2004;9:294-303. <http://dx.doi.org/10.1379/CSC-15R1.1>
38. **Baptiste V, Benjamin G, Isabelle G, Sundar S, Drummel-Smith J, Ouellette M.** A proteomics screen implicates HSP83 and a small kinetoplastid calpain-related protein in drug resistance in *Leishmania donovani* clinical field isolates by modulating drug-induced programmed cell death. *Mol Cell Proteomics.* 2007;6:88-101. <http://dx.doi.org/10.1074/mcp.M600319-MCP200>
39. **Wardleworth BN, Russell RJ, Bell SD, Taylor GL, White MF.** Structure of Alba: An archaeal chromatin protein modulated by acetylation. *EMBO J.* 2002;21:4654-62. <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdf465>
40. **Bell SD, Botting CH, Wardleworth BN, Jackson SP, White MF.** The interaction of Alba, a conserved archaeal chromatin protein, with Sir2 and its regulation by acetylation. *Science.* 2002;296:148-51. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1070506>
41. **Halliwell B, Gutteridge JM.** Free radicals in biology and medicine. Third edition. Oxford: Oxford University Press; 1999. p. 1-899.
42. **Cortés-Selva F, Muñoz-Martínez M, Attila I, Jiménez AJ, Varadi A, Gamarro F, et al.** Functional expression of a multidrug P-glycoprotein transporter of *Leishmania*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;329:502-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.02.009>
43. **Haile S, Papadopoulou B.** Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Curr Opin Microbiol.* 2007;10:569-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2007.10.001>
44. **Requena JM.** Lights and shadows on gene organization and regulation of gene expression in *Leishmania*. *Front Biosci.* 2011;17:2069-85. <http://dx.doi.org/10.2741/3840>
45. **Walker J, Vásquez J, Gómez MA, Drummel-Smith J, Burchmore R, Girard I, et al.** Identification of developmentally-regulated proteins in *Leishmania panamensis* by proteome profiling of promastigotes and axenic amastigotes. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;147:64-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.01.008>