



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER**



**Eficacia del análogo alquil-lisofosfolípido edelfosina en  
el tratamiento de la leishmaniosis, generación de  
resistencia y su utilidad potencial en terapia  
combinada**

Ph.D Tesis

Rubén Eduardo Varela Miranda

**Departamento de Biología Animal, Parasitología,  
Ecología y Edafología-Química Agrícola.**

**2013**



**UNIVERSIDAD DE SALAMANCA  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN DEL CÁNCER**



**Eficacia del análogo alquil-lisofosfolípido edelfosina en  
el tratamiento de la leishmaniosis, generación de  
resistencia y su utilidad potencial en terapia  
combinada**

Ph.D Tesis

Memoria que presenta Rubén Eduardo  
Varela Miranda, para optar al grado de  
doctor

**Departamento de Biología Animal, Parasitología,  
Ecología y Edafología-Química Agrícola.**

**2013**

Dr. **Faustino Mollinedo García**, Profesor de Investigación del CSIC perteneciente al Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca (CIC).

Prof. Dr. **Antonio Muro Álvarez**, Catedrático de Parasitología de la Universidad de Salamanca, Coordinador de los grupos de Inmunología Parasitaria y Molecular (CIETUS) e INTRO (IBSAL).

Certifican que la presente Tesis Doctoral titulada “**Eficacia del análogo alquil-lisofosfolípido edelfosina en el tratamiento de la leishmaniosis, generación de resistencia, y su utilidad potencial en terapia combinada**”, que se presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Salamanca ha sido realizada por **Rubén Eduardo Varela Miranda**, bajo nuestra dirección en el Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca y el Departamento de Biología Animal, Parasitología, Ecología y Edafología-Química Agrícola de la Universidad de Salamanca, y consideramos que reúne los requisitos necesarios por lo que autorizamos su presentación para ser evaluada.

**Prof. Dr. Antonio Muro Álvarez**

**Prof. Dr. Faustino Mollinedo García**

Tesis Doctoral presentada por **Rubén Eduardo Varela Miranda** para la obtención del Grado de Doctor por la Universidad de Salamanca.

*Un científico debe tomarse la libertad de plantear cualquier cuestión, de dudar de cualquier afirmación, de corregir errores.*

*Julius Robert Oppenheimer.*

*A mi Familia,*

*Que con su apoyo incondicional, ha logrado mantenerme con el ánimo en alto, a pesar de la distancia que nos separó y los años de ausencia. A mi hermosa hija Sofía, por entender el motivo de mi ausencia y por sentirse tan orgullosa de nuestros logros.*

## **Agradecimientos**

Durante estos seis años de Tesis Doctoral, he conocido muchas personas e incluso nuevos compatriotas, personas de otras culturas, creencias religiosas y de diferentes afinidades políticas, con los cuales he compartido un sin número de experiencias que me han servido para ver y entender el mundo desde diferentes perspectivas, esta experiencia me ha ayudado a crecer como persona y adquirir nuevos conocimientos.

Mis más sinceros agradecimientos a mis directores de Tesis y a todas aquellas personas que hicieron posible este trabajo:

**A Faustino Mollinedo García**, por la oportunidad de realizar el doctorado en su laboratorio y por su apoyo para la ejecución de diferentes experimentos, que me han llevado a conocer nuevas áreas del conocimiento; áreas que aun no son muy desarrolladas en el mundo de la parasitología y que serán el pilar de mis futuras investigaciones.

**A Antonio Muro Álvarez**, Quien me asesoro durante el transcurso de los cursos doctorales y de la tesis y me dio la oportunidad de integrarme a su grupo de investigación (CIETUS) de forma muy participativa.

**A Iván Darío Vélez y al grupo del PECET de la Universidad de Antioquia en Colombia**: Por todo el apoyo científico y la confianza depositada en mí, para la postulación a la candidatura de estudiante de doctorado, espero que mis logros alcanzados en la Universidad de Salamanca y las publicaciones en común, respondan a vuestras expectativas.

**A la Secretaria de Estado de Investigación Desarrollo e Innovación del Gobierno de España y al Fondo Social Europeo:** que con el subprograma de becas Torres Quevedo, aportaron financiación para desarrollar este trabajo.

**A la Empresa APOINTECH** por aportar financiación a las investigaciones realizadas.

A mis compañeros de laboratorio 6 del Centro de Investigación del Cáncer (CIC) y del CIETUS en la facultad de farmacia, con los cuales he compartido muchísimas horas de trabajo y con los cuales construí una bonita amistad. Quisiera nombrar a cada uno de ellos y destacar sus grandes valores, pero pienso que el papel de esta tesis sería insuficiente para decirles lo mucho que los quiero, los admiro y les agradezco, muchísimas gracias por todo su apoyo y vuestra amistad.

A mis compatriotas, tenía que dedicarles un espacio de agradecimiento porque son todos muy importantes para mí, muchos de ellos llegaron a España como yo buscando un sueño que les ayudara a mejorar su calidad de vida al regresar a Colombia; a todos ellos les quiero desear la mejor de la suerte para alcanzar sus metas. Agradezco enormemente los momentos ocio y las muchas navidades que compartimos juntos, ya que de esa forma fue más llevadera la ausencia de nuestras familias.

A mi madre y a mi padre, porque sé que se que en muchos momentos difíciles me han necesitado a su lado apoyándolos, pero por la distancia fue imposible compartir esos momentos, agradezco esa grandeza de pensar primero en mi bienestar, que en el vuestro.

A mi hermosa mujer, le tendría que dedicar páginas enteras, pero solo le quiero decir que le agradezco su apoyo decidido e incondicional, ella ha sido mi apoyo emocional constante, sin el cual no hubiera sido capaz de mantenerme a flote en la distancia y tranquilo para desarrollar mi trabajo con dedicación y entusiasmo.

Por último, también quiero dedicar este esfuerzo a todos aquellos pacientes con leishmaniosis que tuve la oportunidad de diagnosticar y tratar en Colombia, años antes a la realización de esta tesis, porque siempre los he tenido en mi mente y han sido mi mayor motivación profesional. Espero que estas investigaciones aporten un granito de arena para ayudar a resolver la grave problemática de salud pública que ocasiona esta enfermedad, en las zonas tropicales y subtropicales del mundo.

# TABLA DE CONTENIDO

Glosario de abreviaturas.....	1
INTRODUCCIÓN.....	4
1. Leishmaniosis.....	5
1.1 Agentes causales y ciclo biológico.....	5
1.2 Epidemiología.....	7
1.3 Patogenia.....	9
1.4 Manifestaciones Clínicas.....	9
1.5 Diagnóstico.....	12
1.6 Tratamiento.....	13
1.7 Prevención.....	14
2. Resistencia a fármacos anti- <i>Leishmania</i> .....	15
2.1 Mecanismo de resistencia a los antimoniales.....	17
2.2 Amplificación y co-amplificación genética.....	17
2.3 Mecanismo de resistencia asociado al fenotipo MDR.....	19
3. Nuevas alternativas terapéuticas: Alquil-lisofosfolípidos como inductores de apoptosis.....	22
4. Nuevas dianas terapéuticas: Proteína quinasa B/RAC/AKT.....	26
4.1 Proteínas chaperonas.....	30
5. Bibliografía.....	38
HIPÓTESIS.....	46
OBJETIVOS.....	47
6. ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN.....	48
6.1 Artículo 1.....	49
6.2 Artículo 2.....	64
6.3 Artículo 3.....	103
CONCLUSIONES.....	119
ANEXO METODOLÓGICO.....	121
PREMIO A LA DIVULGACIÓN CIENTÍFICA.....	144



## Glosario de abreviaturas

### **A**

---

ABC: ATP-binding cassette

ADN: Ácido desoxirribonucleico

AGC: Familia de quinasas

AKT: Serina/treonina quinasa B

ATLs: Lípidos sintéticos antitumorales

ATP: Adenosín trifosfato

ALPs: Alquillisofosfolípidos

### **B**

---

Bad: Quinasa pro-apoptótica

Bcl-2: Quinasa anti-apoptótica

Bcl-X: Quinasa anti-apoptótica

BSA: Albúmina sérica bovina

### **C**

---

cAMP: Adenosin-3',5'-monofosfato cíclico

cDNA: DNA complementario

cGMP: Guanosín-3',5'-monofosfato cíclico

CI<sub>50</sub>: Concentración inhibitoria 50

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

### **D**

---

DNTPs: Desoxinucleótido trifosfato

DO: Densidad óptica

DS: Desviación estándar

### **E**

---

EDTA: Ácido etilen-diamino tetracético

### **G**

---

GA: Geldanamicina A

gP170: Glicoproteína 170

g: Gravedades

gr: Gramo

### **H**

---

HSP: Proteína de choque térmico

### **I**

---

I+D: Investigación y desarrollo

IPFAM: Base de datos de interacción de proteínas

IPTG: Isopropiltiogalactósido

### **K**

---

Kg: Kilogramo

## **L**

---

LB: Luria bertonii

LC: Leishmaniosis cutánea

LLA: Leucemia linfocítica Aguda

LM: Leishmaniosis mucosa

LPC: Lisofosfatidilcolina

LPS: Lipopolisacárido

LV: Leishmaniosis visceral

## **M**

---

MAPKs: Quinasas activadas por mitógenos

mdr1: Gene de resistencia a múltiples drogas 1

MDR: Resistencia a múltiples drogas

mg: miligramo

MRP: Proteínas asociadas a multiresistencia

mm: Milímetro

mM: Milimolar

ml: Mililitro

MOPS: Ácido propanosulfónico N-morfolino

## **N**

---

NF- $\kappa$ B: Factor nuclear kappa B

nm: Nanómetro

NaCl: Cloruro de sodio

## **O**

---

ON: Óxido nítrico

## **P**

---

PBS: Tampón fosfato salino

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PDK1: Piruvato deshidrogenasa quinasa 1

PGPA: Glicoproteína A

pH: Potencial de hidrogeniones

PH: Dominio pleckstrin

PI3K: Fosfatidilinositol 3-quinasa

PK: Proteína quinasa

PP2: Proteína fosfatasa 2 PHLPP1: Fosfatasa específica del dominio pleckstrin

PtdIns: Fosfatidilinositol

PSIMAP: Protein Structural Interactome MAP

PKC: Proteína quinasa C

PKA: Proteína quinasa A

## **R**

---

RAC: Proteína relacionada con A y C

RNA: Ácido ribonucleico

## **S**

---

SbV: Antimonio pentavalente

SDS: Dodecilsulfato sódico

SFB: Suero fetal bovino

## ***T***

---

TBE: Tris/ borato/EDTA

## ***U***

---

µg: Microgramo

µl: Microlitro

Unit: Unidad

µM: Micromolar

USA: Estados Unidos de Norte  
América

## ***V***

---

VIH: Virus de inmunodeficiencia  
humana

## ***X***

---

XTT: Cell Proliferation Kit II

# **INTRODUCCIÓN**

## Infecciones difícilmente transmisibles I: Leishmaniosis

Rubén Eduardo Varela Miranda, Juan Carlos Dib Díaz-Granados, José Luis Pérez-Arellano y Antonio Muro Álvarez

### ÍNDICE DE CAPÍTULO

INTRODUCCIÓN  
AGENTES CAUSALES Y CICLO BIOLÓGICO  
EPIDEMIOLOGÍA  
PATOGENIA

MANIFESTACIONES CLÍNICAS  
VIH y leishmaniosis  
DIAGNÓSTICO  
TRATAMIENTO  
PREVENCIÓN

### INTRODUCCIÓN

Las leishmaniosis son enfermedades zoonóticas causadas por parásitos del género *Leishmania*, transmitidas al hombre y a sus reservorios por la picadura de hembras de insectos hematófagos pertenecientes a los géneros *Lutzomyia* en América y *Phlebotomus* en los demás continentes. Estas enfermedades se distribuyen en zonas tropicales y subtropicales de 88 países del mundo, ocasionando altas tasas de morbilidad y mortalidad. Las leishmaniosis se clasifican atendiendo a:

1. las manifestaciones clínicas predominantes: formas cutáneas (localizadas, difusas o recidivantes), formas mucocutáneas y formas viscerales (clásica y viscerotrópica).
2. su localización geográfica: formas del Viejo Mundo (Europa, África y Asia) o formas del Nuevo Mundo (América).
3. los microorganismos causales.

### AGENTES CAUSALES Y CICLO BIOLÓGICO

*Leishmania* spp son protozoos perteneciente al orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, género *Leishmania*, subgéneros *Viannia* y *Leis-*

*hmania*. La taxonomía de los microorganismos incluidos en el género *Leishmania* es compleja y cambiante (fig. 39-1). Aproximadamente, 21 de las 30 especies descritas de *Leishmania* afectan a los seres humanos. Presentan dos estadios diferentes en su ciclo vital: una forma extracelular (promastigote) en el hospedador invertebrado (flebotomos) y una forma intracelular (amastigote) en el hospedador vertebrado. En el hospedador intermediario (invertebrado) se desarrollan los promastigotes, estructuras unicelulares móviles, elongadas ( $15-20 \mu\text{m} \times 1,5-3,5 \mu\text{m}$ ), con un flagelo prominente ( $15-28 \mu\text{m}$ ). En los vertebrados (incluidos los humanos) el protozoo adopta la forma de amastigote, de características ovoides, de  $2-5 \mu\text{m}$  de diámetro y localización intracelular (vacuola parasitófora) de varias estirpes celulares (principalmente macrófagos).

El ciclo biológico se inicia cuando una hembra de flebotomo parasitada obtiene sangre de un hospedador vertebrado (fig. 39-2). En ese momento, los promastigotes (fig. 39-3A) con capacidad infectiva (promastigotes metacíclicos) penetran en la piel del hospedador a través de la probóscide del insecto. A continuación, los promastigotes son fagocitados por los macrófagos y en el interior de los mismos se transforman en amastigotes que se reproducen por fisión binaria (fig. 39-3B). Cuando se alcanza un límite de

452 MANUAL DE ENFERMEDADES IMPORTADAS

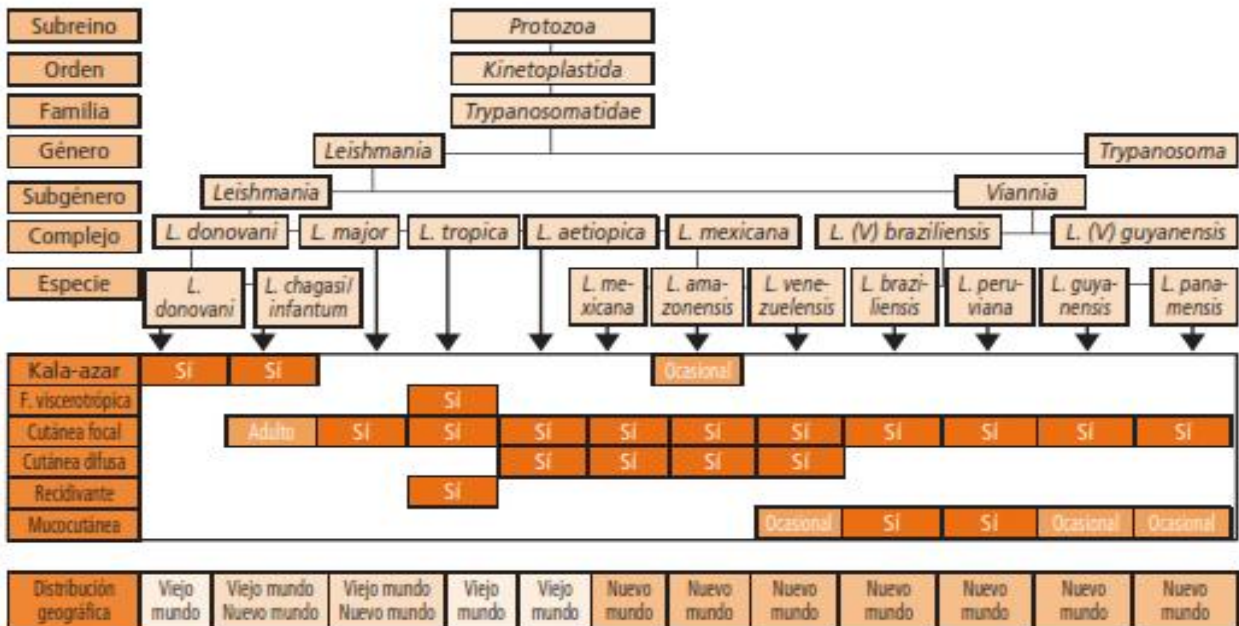


FIGURA 39-1 Taxonomía y características de las principales especies de Leishmania.

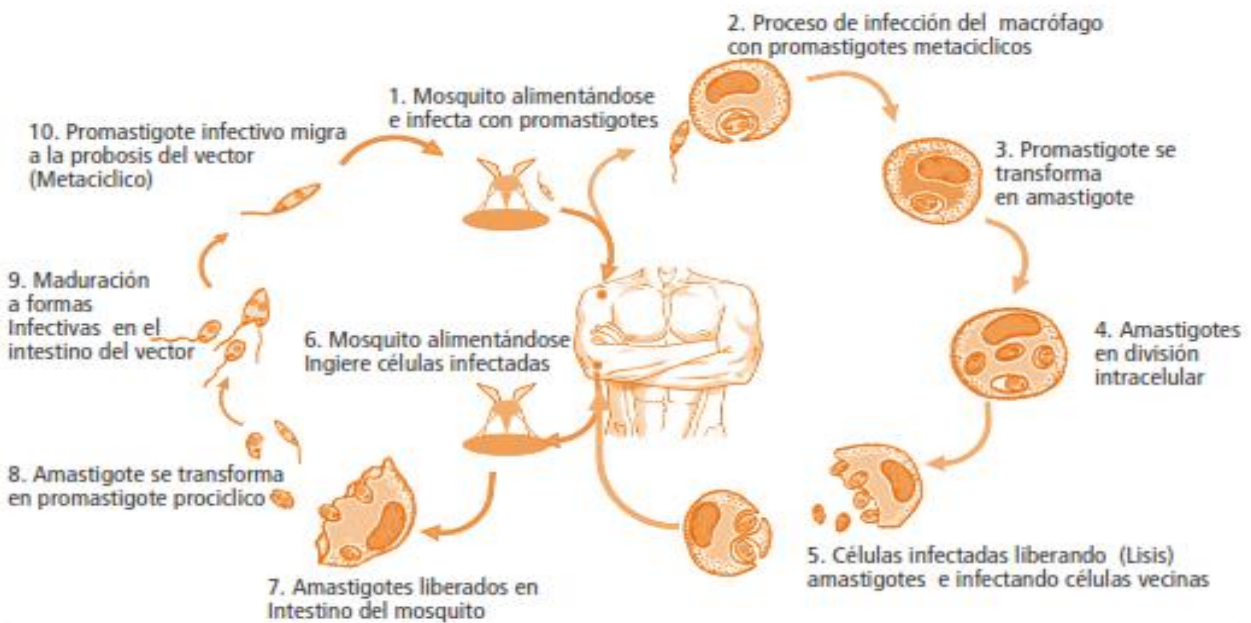


FIGURA 39-2 Ciclo de vida de Leishmania.

protozoos intramacrofágicos, la célula estalla y los amastigotes liberados colonizan células adyacentes. Dependiendo de la especie de *Leishmania* y de las características inmunológicas

del hospedador, la infección queda limitada a la piel, se extiende por vía linfática local, accede a mucosas o se disemina a órganos con elevado contenido en macrófagos (bazo, hígado, médula

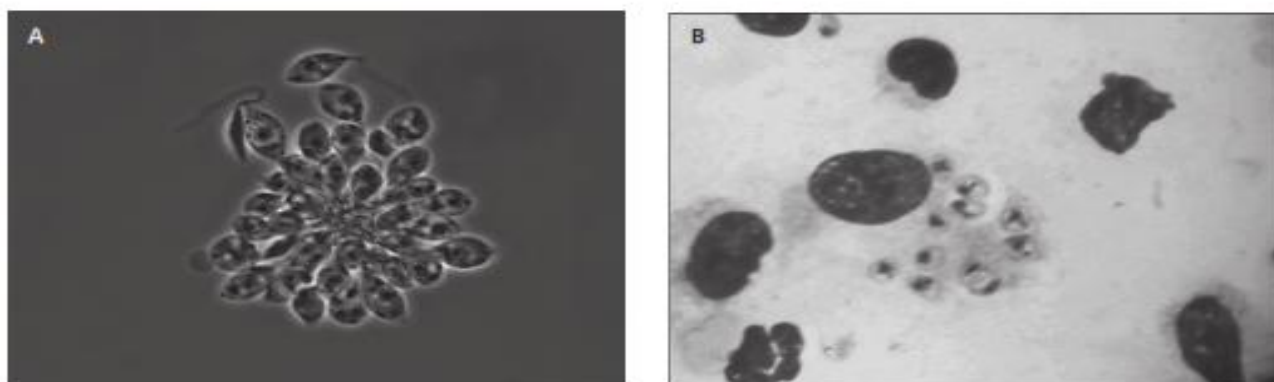


FIGURA 39-3 Roseta de promastigotes en cultivo (A) y macrófago infectado con amastigotes de *Leishmania* (B).

ósea). El ciclo se cierra cuando un nuevo flebótomo ingiere sangre con macrófagos infectados. En diferentes porciones del intestino del artrópodo (dependiendo del subgénero de *Leishmania*), los amastigotes se transforman en promastigotes y se produce la división binaria de los mismos. Los promastigotes emigran a la probóscide de los flebótomos pudiendo infectar a otros hospedadores.

### EPIDEMIOLOGÍA

Se estima que la población mundial de riesgo para el desarrollo de leishmaniosis es de 350 millones de personas. La prevalencia es de 12 millones de personas y la incidencia de nuevos casos se calcula en 2 millones de personas/año. De ellos, aproximadamente 1 millón y medio corresponden a formas cutáneas y mucocutáneas y medio millón a formas viscerales. La mortalidad descrita corresponde principalmente a las formas viscerales y se cifra entre 50.000 y 70.000 casos/año. Por otro lado, la carga de enfermedad (mortalidad y morbilidad) se calcula en 2,4 millones DALYs <sup>2</sup>.

Las leishmaniosis cutáneas son endémicas en más de 70 países del mundo, aunque la mayor parte de los casos (> 90%) se describen en siete países del Viejo Mundo (Afganistán, Arabia Saudí, Argelia, Irán, Irak, Paquistán y Siria) y en dos del Nuevo Mundo (Brasil y Perú) (fig. 39-4). En los últimos años ha aumentado el número de casos en los países mencionados y se han incorporado otros nuevos como Bolivia y Colombia.

Entre las causas de este aumento de incidencia se incluyen los desastres naturales, los conflictos armados (en concreto la guerra de Afganistán) y el turismo.

La mayor parte de los casos (> 90%) de leishmaniosis visceral clásica (kala-azar) aparecen en seis países: tres en Asia (India, principalmente en el estado de Bihar, Bangladesh y Nepal), dos en África (Sudán y Etiopía) y uno en América (Brasil) (fig. 39-5). También los casos de leishmaniosis visceral han aumentado en los últimos años en relación con tres hechos: la falta de medidas de control, los movimientos de población y la presencia de inmunosupresión (principalmente la coinfección por VIH y, en menor medida la relacionada con el trasplante de órganos).

La forma de transmisión habitual de la leishmaniosis es vectorial, aunque también se han descrito casos de transmisión por agujas contaminadas, trasplantes y formas congénitas <sup>2</sup>. Los vectores implicados en la transmisión de la leishmaniosis son los flebótomos (*sand flies*), específicamente las hembras, que requieren sangre de mamíferos para la oviposición. Estos artrópodos viven en lugares oscuros y poseen una escasa capacidad de vuelo (unos 50 m). A diferencia de los mosquitos, vuelan en silencio y tienen un tamaño muy pequeño (2-3 mm) por lo que pueden atravesar las mosquiteras. En general, pican al anochecer y amanecer, aunque existen excepciones (p. ej., *Lutzomya*, vector de *L.(V) braziliensis* pica durante las horas diurnas). De las 500 especies conocidas de flebótomos solo 31 han sido identificadas positivamente como vectores de *Leishmania*.

454 MANUAL DE ENFERMEDADES IMPORTADAS

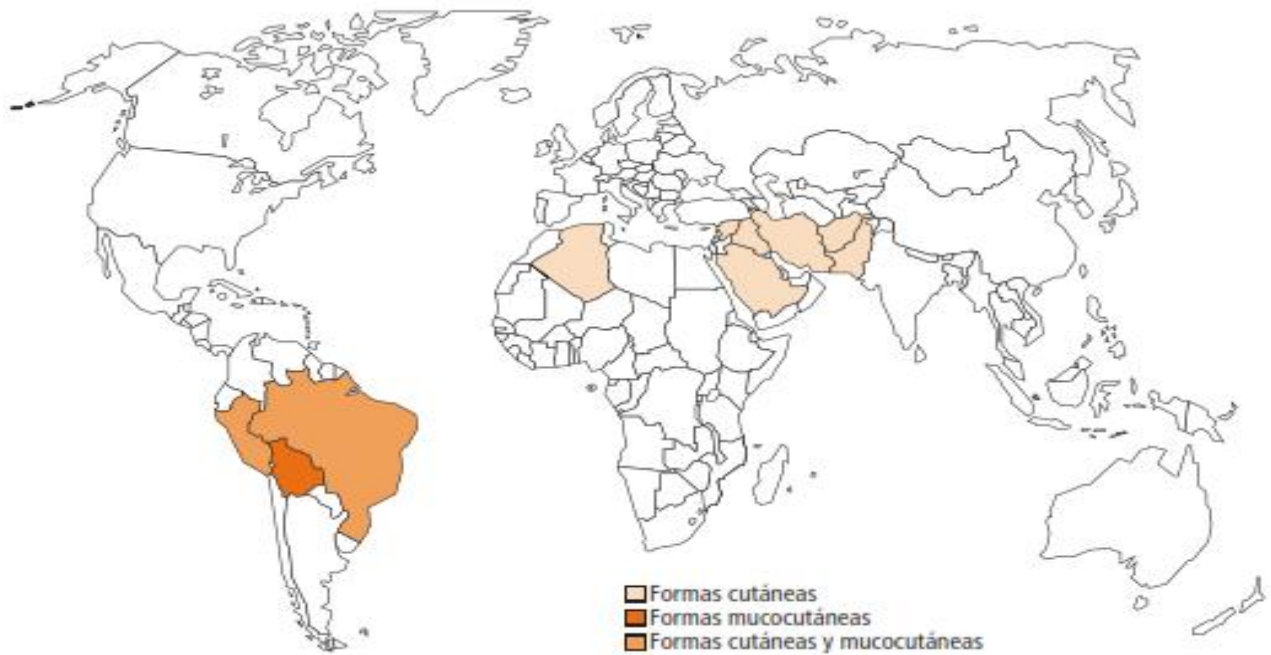



FIGURA 39-4 Distribución geográfica principal de las leishmaniosis cutáneas y mucocutáneas.



FIGURA 39-5 Distribución geográfica de la leishmaniosis visceral.



Las leishmaniosis son ejemplos característicos de antroponosis, describiéndose tres ciclos epidemiológicos 

1. Un ciclo primitivo o selvático (p. ej., *L. (V) braziliensis*), en el que la infección en el humano es accidental y la transmisión tiene lugar en focos concretos.
2. Un ciclo secundario o peridoméstico (p. ej., *L. infantum*), en el que los reservorios son animales domésticos (p. ej., perros) o peridomésticos (roedores) y el protozoo es transmitido a los humanos por flebótomos antropofílicos.
3. Un ciclo terciario, estrictamente antroponótico (p. ej., *L. donovani*), en el que el reservorio animal ha desaparecido (o no se ha identificado) y los flebótomos son totalmente antroponóticos.


### PATOGENIA


La fase inicial de la leishmaniosis consiste en la inoculación de promastigotes en el tejido subcutáneo y la respuesta inflamatoria local. El primer evento patogénico es la adherencia de los tripomastigotes a células presentadoras de antígenos (macrófagos y células dendríticas) y/o la internalización de los protozoos en estas células. La adhesión de los promastigotes a las células presentadoras de antígenos depende de la expresión de moléculas en su superficie (siendo las mejor caracterizadas el lipofosfoglicano o LPG y la leishmanolisina o GP63) y de la presencia de receptores en las células del hospedador (particularmente receptores FC y CR3 en macrófagos y DC-SIGN en las células dendríticas). Una vez tiene lugar la internalización en el fagolisosoma macrofágico, el siguiente proceso clave es la transformación de promastigotes en amastigotes. En estudios experimentales se ha observado que para que se produzca este proceso únicamente son necesarias dos condiciones: un ligero aumento de la temperatura (a 32-37 °C) y un descenso del pH (5,5). La siguiente fase patogénica es la supervivencia y multiplicación de los amastigotes en el fagolisosoma. Para ello, se ponen en marcha mecanismos de evasión por parte del parásito y la obtención de nutrientes de los macrófagos. La proliferación de amastigotes en el interior de los fagolisosomas tiene un límite, produciéndose la muerte celular con liberación de los amastigotes al medio extracelular que,

a su vez, son captados por otros macrófagos. En la figura 39-6 se representan las cuatro fases principales.

Las lesiones producidas por las diferentes especies de *Leishmania* dependen de la expresión de moléculas patogénicas (diferentes en las distintas especies) y de la respuesta inmune del hospedador. En las leishmaniosis cutáneas, al inicio, aparece un infiltrado dérmico constituido principalmente por macrófagos llenos de amastigotes con pocos linfocitos y células plasmáticas. Posteriormente, aumenta el número de células linfoides, la dermis se edematiza y la epidermis subyacente se convierte en hiperqueratósica y, por último, desaparece formando una úlcera. Los principales órganos afectados en la leishmaniosis visceral son bazo, médula ósea e hígado.

### MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Existen cuatro formas clínicas principales de leishmaniosis y una situación especial en pacientes coinfectados con VIH 

1. **Leishmaniosis cutáneas:** Existen tres formas principales de enfermedad cutánea sin afectación mucosa:
    - a) **Leishmaniosis cutáneas focales:** caracterizadas por la aparición inicial de una pequeña pápula eritematosa, pruriginosa, localizada en zonas expuestas al cabo de un intervalo largo de tiempo tras la picadura de un flebótomo (en torno a 6 semanas). A continuación, la pápula se transforma en un nódulo y después en una lesión ulcerosa que progresa en los meses siguientes. Eventualmente, se produce la curación espontánea de las lesiones, aunque este proceso varía según sea la especie implicada. Así, es más rápido en *L. major* (2-6 meses), intermedio en el complejo *L. mexicana* (3-9 meses) y más lento en el complejo *L. (V) braziliensis* y en *L. tropica*. Las características clínicas, biológicas y evolutivas de estas entidades difieren según la distribución geográfica y el agente etiológico concreto 
- Las leishmaniosis cutáneas del Viejo Mundo están ocasionadas por cuatro especies: *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica* y *L. infantum* en adultos. Estas formas reciben denominaciones locales diferentes como «botón de Oriente», rosa de Jericó, furúnculo de Delhi

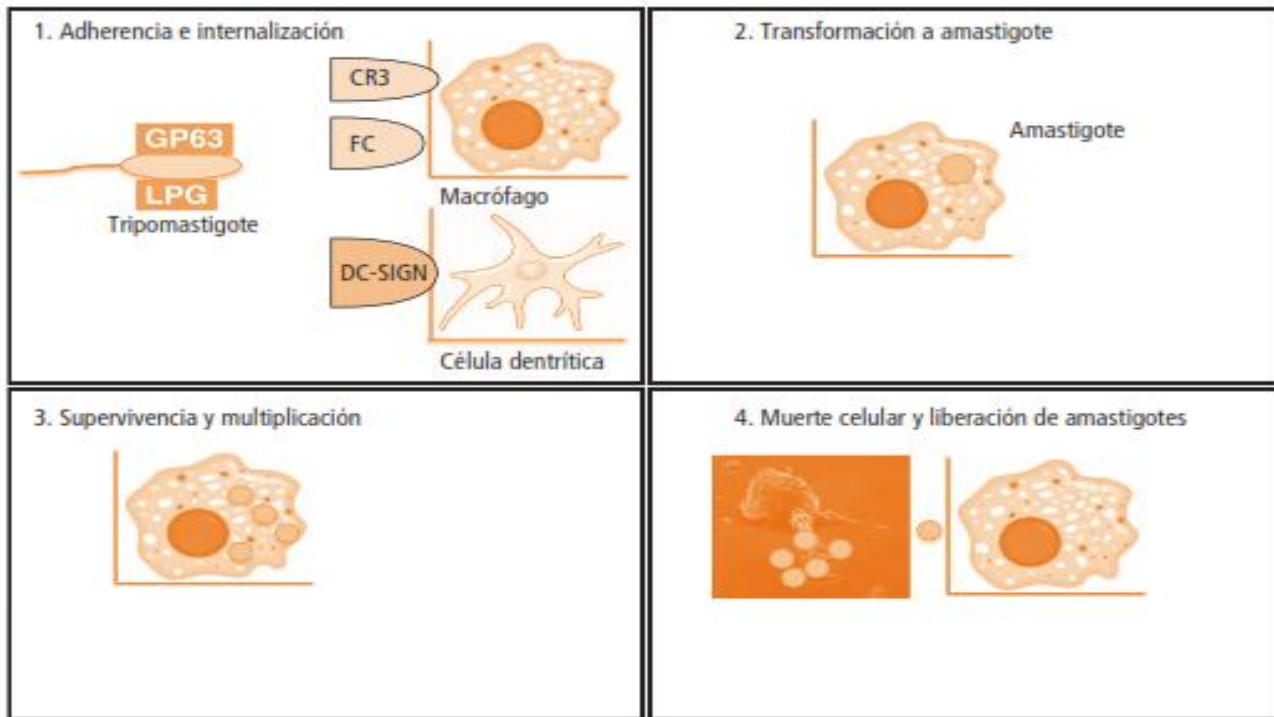


FIGURA 39-6 Mecanismos patogénicos en leishmaniasis.

o furúnculo de Aleppo. Las infecciones producidas por *L. major* se localizan en el norte y oeste de África, Sudán, Oriente Medio y Asia Central. En general, se trata de lesiones múltiples, sobre un fondo húmedo y con tendencia a la curación espontánea. Presenta un predominio rural, siendo una zoonosis en la que el reservorio animal está constituido por roedores. La infección por *L. tropica* se localiza preferentemente en el norte de África, Oriente Medio y Asia Central. A diferencia de las lesiones producidas por *L. major*, suele cursar con lesiones únicas y secas, la curación espontánea es más lenta. En general, esta forma predomina en el ámbito urbano y se suele admitir que es una antroponosis, aunque en algunos casos se ha demostrado la presencia de un reservorio animal (mamíferos del género *Procapra*, similares a cobayas). La infección por *L. aethiops* se ciñe a Etiopía y Kenia. Clínicamente, se caracteriza por una úlcera de evolución muy indolente que puede evolucionar a lo largo de los años. Por lo general, afecta a personas que

viven en regiones montañosas rurales, y el reservorio lo constituyen las procavias. En adultos, la infección por *L. infantum* puede ocasionar lesiones nodulares. Las leishmaniasis cutáneas del Nuevo Mundo están ocasionadas por las especies incluidas en el complejo *Leishmania mexicana* y en el subgénero *Viannia*. La denominación local de estas infecciones varía según los países, por ejemplo, «úlcera del chiclero» o «picadura de pito». A diferencia de las formas del Viejo Mundo, las lesiones son de mayor tamaño, con un borde indurado y sobrelevado con una zona central ulcerada y costrosa. La distribución geográfica de las principales especies se indica en la figura 39-4. Según la especie existen algunas diferencias clínicas. Así, la clásica infección por *L. mexicana* («úlcera del chiclero») suele ser única y de localización en el pabellón auditivo, pudiendo llegar a formas destructivas. Por otro lado, la infección por el complejo *L.(V) guyanensis* [*L.(V) guyanensis* y *L.(V) panamensis*] puede presentar un patrón esporotricóide debido

- a su diseminación linfática. Finalmente, en el caso de infección por complejo *L.(V) braziliensis*, pueden aparecer adenopatías, que en ocasiones alcanzan un gran tamaño (bubones).
- b) Leishmaniosis cutáneas difusas: están ocasionadas por *L. aethiopica* en el Viejo Mundo y por el complejo *L. mexicana* en el Nuevo Mundo. Aparecen en individuos con una escasa respuesta inmune y simulan una lepra lepromatosa, con extensas placas o nódulos rara vez ulcerados y depigmentación de las áreas afectadas.
  - c) Leishmaniosis recurrente: es una forma inhabitual, producida principalmente por *L. tropica* y caracterizada por la nueva aparición de lesiones activas en áreas cicatrizales de lesiones previas. En su patogenia intervienen dos tipos de factores: la persistencia del protozoo en la zona y la presencia de elementos desencadenantes como traumatismos locales o uso tópico de corticosteroides.
2. **Leishmaniosis mucocutáneas.** Esta forma de leishmaniosis (también denominada espundia), más grave que las formas cutáneas, está producida principalmente por el complejo *L.(V) braziliensis*, aunque se han descrito casos ocasionales por el complejo *L.(V) guyanensis* y por *L. amazonensis*. El 90% de los casos de leishmaniosis mucocutánea se describen en Bolivia, Brasil y Perú. Las lesiones cutáneas iniciales se extienden localmente por vía linfática y las mucosas se afectan por diseminación hematogena o linfática. Las mucosas más frecuentemente afectadas, en un principio, son las de la región nasal (con edema, eritema y ulceraciones del tabique nasal), pudiendo extenderse a paladar, faringe o laringe. El proceso es localmente destructivo afectando a tejidos blandos y cartilago, respetando las estructuras óseas. La perforación del tabique nasal y el colapso del puente nasal dan lugar a la denominada «nariz en tapir».
  3. **Leishmaniosis visceral o kala-azar:** está producida por dos especies del complejo *Leishmania donovani*: *L. donovani strictu sensu* (en Asia y África del Este) y *L. infantum/chagasi* (*L. infantum* en la cuenca mediterránea, *L. chagasi* en el Nuevo Mundo). Como ya se ha indicado, la infección por *L. donovani strictu sensu* es una antroponosis, mientras que la infección por *L. infantum/chagasi* es una zoonosis, los cánidos y los roedores constituyen un importante reservorio. Los pacientes con leishmaniosis visceral presentan un cuadro clínico común que se caracteriza por una lesión cutánea inicial (a menudo inadvertida por el enfermo) desarrollando al cabo de 2-6 meses manifestaciones sistémicas. Las más frecuentes son: fiebre (intermitente y con escalofríos), manifestaciones generales (astenia, anorexia, pérdida de peso), esplenomegalia, que puede alcanzar formas masivas (asociada a molestias abdominales por compresión y, en ocasiones, a dolor agudo por infartos esplénicos) y hepatomegalia difusa, dura y no dolorosa. En los exámenes complementarios es frecuente encontrar pancitopenia, cosinopenia, elevación moderada de bilirrubina, transaminasas y fosfatasa alcalina, hipoalbuminemia e hipergammaglobulinemia policlonal (sobre todo con elevación de la IgG). Según el agente etiológico concreto y la localización geográfica, el kala-azar presenta características diferenciales. Así, la presencia de lesión cutánea previa es más frecuente en formas africanas y asiáticas. La asociación con linfadenopatías es más común en la cuenca mediterránea y países del este africano, mientras que es excepcional en Asia. La hiperpigmentación responsable de la denominación de la enfermedad (kala-azar significa «fiebre negra») es mucho más frecuente en la India. Otra forma de afectación visceral menos común es la leishmaniosis viscerotrópica, que se describió en soldados americanos que regresaron tras una estancia prolongada en Oriente Medio durante la Guerra del Golfo. Está ocasionada por *L. tropica* y cursa con fiebre y esplenomegalia, siendo infrecuentes otras manifestaciones del kala-azar.
  4. **Leishmaniosis dérmica post kala-azar (PKDL)** es una lesión cutánea crónica en pacientes sin afectación visceral por especies del complejo *L. donovani*. Aparece principalmente en Sudán y en la India aunque con algunas diferencias. En Sudamérica solo se da en pacientes con coinfección por VIH. Clínicamente, se presenta como una combinación de máculas hipocrómicas y eritematosas con placas y nódulos indurados. La zona corporal más afectada suele ser la cara, pero la piel y la mucosa genital también son otras regiones frecuentemente involucradas. Aunque se sabe que hay diferencias entre las formas de Sudán y de la India, existe un infiltrado de células

linfoides, plasmáticas y macrófagos, con ocasionales granulomas epitelioides. En general, el número de cuerpos de Leishman-Donovan es escaso. La identificación y el tratamiento adecuado de la PKLD son esenciales, ya que constituyen, sobre todo en Sudán, un importante reservorio de la enfermedad.

### VIH y leishmaniosis

Las principales características son:

1. Su elevada prevalencia, especialmente en Europa (25-70% de los casos de kala-azar están coinfectados por VIH) y Etiopía (15-30% de los casos de kala-azar están coinfectados).
2. Los mecanismos involucrados son principalmente la transmisión mediante agujas intravenosas y la reactivación de infecciones preexistentes.
3. Las manifestaciones clínicas suelen aparecer cuando las cifras de CD4 son inferiores a 200/ $\mu$ l.
4. La presentación clínica puede ser atípica; un hecho característico es la afectación del tracto digestivo (desde la boca al ano), y una manifestación frecuente, la hemorragia digestiva.
5. Hasta disponer de tratamiento antirretroviral eficaz, la evolución era rápidamente progresiva.
6. No es infrecuente la presencia de recaídas y de manifestaciones de reconstitución inmune en pacientes con infección por VIH.
7. Además de las características mencionadas previamente en relación con la leishmaniosis visceral, se ha demostrado un incremento en pacientes coinfectados por VIH de formas «visceralizadas» de leishmaniosis cutáneas y mucocutáneas.

### DIAGNÓSTICO

El método clásico para el diagnóstico de leishmaniosis es la demostración en improntas tisulares o biopsias de la presencia de amastigotes de *Leishmania* spp. En el caso de las lesiones cutáneas deben obtenerse muestras por aspiración, biopsia e improntas de material biopsico y directas. En la leishmaniosis visceral clásica, el método habitual es la aspiración/biopsia de médula ósea, aunque el rendimiento de la aspiración esplénica es mayor (pero también el riesgo de complicaciones).

La observación de la fracción mononuclear en sangre periférica puede ocasionalmente aportar resultados positivos. Las muestras deben ser teñidas con Giemsa y observadas con microscopio de inmersión. Los datos morfológicos característicos de los amastigotes (cuerpos de Leishman-Donovan) son el tamaño entre 2-4  $\mu$ m, la forma redondeada u oval y una morfología propia constituida por dos elementos: una zona redondeada de color púrpura oscuro (núcleo) y otra zona de menor tamaño en forma de barra teñida de rojo (kinetoplasto). Los principales problemas de los estudios morfológicos son la baja sensibilidad en aquellos síndromes en los que la carga parasitaria es baja y la imposibilidad para la detección de la especie implicada.

La principal técnica para el diagnóstico de leishmaniosis visceral mediante la detección de antígenos específicos es la prueba de aglutinación de látex (Katex®). Esta técnica emplea orina como muestra biológica (que antes debe ser sometida a ebullición) y, como sustrato de reacción, partículas de látex en las que se ha adsorbido anticuerpos policlonales frente a *L. donovani*. Es una técnica muy específica, aunque su sensibilidad es variable. Una ventaja adicional es la posibilidad de monitorizar la respuesta al tratamiento.

Las técnicas serológicas tienen varias limitaciones:

- Un número notable de individuos en áreas endémicas presentan una serología positiva en ausencia de enfermedad.
- No son útiles en el diagnóstico de recaídas.
- Son poco útiles en el diagnóstico de formas cutáneas y mucocutáneas así como en la forma viscerotrópica.
- Son negativas en pacientes con inmunodepresión. En países desarrollados, la técnica serológica más útil es el ELISA, específicamente el que detecta K39. La inmunofluorescencia indirecta es igual de sensible pero menos específica. En áreas en vías de desarrollo se utilizan las siguientes técnicas: DAT (*direct agglutination test*) es una prueba semicuantitativa en la que se mezclan en pocillos diluciones seriadas de suero del paciente con promastigotes muertos y teñidos de *L. donovani*. A las 18 h se observa a simple vista la presencia de aglutinación. Es una técnica muy sensible, específica, no influida por la zona geográfica ni por la especie. Una modificación de esta

técnica es el FAST (*fast agglutination screening test*), en la que únicamente se realiza una dilución, obteniendo los resultados en 2-3 h. La técnica rK39 ICT es una prueba inmunocromatográfica que emplea antígeno K39 recombinante. La sensibilidad y especificidad son elevadas, aunque se ha observado diferencias entre regiones geográficas (mejores resultados en India y Nepal que en Sudán). Es una prueba sencilla de realizar, rápida (10-20 min) y barata, por lo que presenta gran utilidad en los estudios de campo.

- ) Además de las técnicas descritas, se utilizan otras pruebas biológicas. Los cultivos en medio axénico son un complemento obligado a las técnicas morfológicas. Los dos medios empleados habitualmente son el NNN (Novy, McNeal, Nicolle) y el medio de Schneider; la temperatura adecuada para el cultivo se sitúa entre 26 y 28 °C. Los promastigotes pueden observarse en los días o semanas siguientes, debiendo mantenerse en cultivo al menos 4 semanas. La PCR es una prueba muy útil en el diagnóstico de todas las formas de leishmaniosis, puesto que su sensibilidad es superior a cualquiera de las otras pruebas mencionadas y su especificidad muy elevada. Esta técnica es especialmente útil en el estudio de las leishmaniosis cutáneas del Nuevo Mundo, ya que permite el diagnóstico de *L. braziliensis* y, por lo tanto, la posibilidad de aparición de una forma mucocutánea. La prueba de Montenegro (test de la leishmanina) consiste en la inoculación intradérmica de promastigotes muertos. La lectura se realiza a las 48 h y se considera un test positivo si la induración supera los 5 mm.

### TRATAMIENTO

- i El tratamiento de las leishmaniosis es complejo debido fundamentalmente a las diferentes formas clínicas de la enfermedad, la influencia del estado inmunológico del hospedador, la resistencia de las diferentes especies a antiparasitarios concretos y las posibilidades económicas de cada país.
- ) El tratamiento de la leishmaniosis visceral clásica debe realizarse con fármacos sistémicos, sobre todo antimoniales como estibogluconato sódico o antimonio de meglumina (ambos se utilizan a dosis de 20 mg de antimonio/kg/día por vía IV o IM durante 28 días) o anfotericina B como desoxicolato (0,5-1 mg/kg/día vía IV

una vez al día o cada 2 días hasta 8 semanas) o en formulación liposomal (3 mg/kg/día vía IV durante 5 días, repitiendo la misma dosis los días 14 y 21). Una opción alternativa es el empleo de pentamidina por vía parenteral (4 mg/kg/día vía IV una vez al día o cada 2 días con un total de 15-30 dosis) y, en casos adquiridos en la India, miltefosina por vía oral (2,5 mg/kg/día durante 3-4 semanas). La duración del tratamiento dependerá de la respuesta clínica y el estado de inmunocompetencia.

El tratamiento de la leishmaniosis viscerotrópica se basa en el empleo de antimoniales.

El tratamiento de las leishmaniosis cutáneas localizadas del Viejo Mundo depende de la extensión y gravedad local de las lesiones así como de la posible evolución a formas más graves. En formas leves y no complicadas se puede optar por:

1. La abstinencia terapéutica.
2. La inyección de 1-3 ml de antimoniales en la base de la lesión con repeticiones a intervalos de 1-2 días hasta la curación.
3. El uso de paromomicina tópica al 15%/cloruro de metilbenzetonio en parafina líquida dos veces al día durante 20 días.
4. El empleo de fluconazol por vía oral a dosis de 200 mg/día durante 6 semanas.

En casos que no cumplan estas características, deberán emplearse fármacos por vía sistémica (antimoniales o pentamidina, especialmente esta última en la infección por *L. aethiopica*).

En las leishmaniosis localizadas del Nuevo Mundo es esencial el diagnóstico de especie, ya que la infección por *L. braziliensis* puede asociarse a formas mucocutáneas y siempre requiere tratamiento sistémico. En general, se aplican los mismos criterios que en el Viejo Mundo, empleando tratamiento sistémico en formas graves o complicadas y realizando el tratamiento de la infección por *L. guyanensis* con pentamidina. En algunas regiones (p. ej., Colombia), el tratamiento con miltefosina por vía oral ha resultado eficaz.

En las formas cutáneas difusas está indicado el tratamiento sistémico con antimoniales o pentamidina en el caso de la infección por *L. aethiopica*.

El tratamiento de la leishmaniosis recidivante por *L. tropica* puede realizarse con antimoniales intralesionales asociados a itraconazol por vía oral (400 mg/día durante 8 semanas).

Finalmente, el tratamiento de la leishmaniosis mucocutánea, enfermedad habitualmente producida por *L. braziliensis*, se realiza con fármacos sistémicos.

### PREVENCIÓN

Ante la ausencia de vacunas eficaces, los métodos para la prevención de las leishmaniosis incluyen:

1. El control de reservorios, que se puede realizar únicamente, por razones logísticas, en casos de animales domésticos (en concreto, perros en el caso de *L. infantum/L. chagasi*). Las estrategias basadas en el sacrificio o el tratamiento de los perros infectados no han dado resultados positivos. Sin embargo, el uso de collares impregnados en deltametrina en perros ha disminuido significativamente la tasa de enfermedad tanto en los animales como en los niños de la zona estudiada.
2. Las estrategias basadas en insecticidas residuales han resultado útiles en áreas en las que los flebótomos tienen predilección por el ámbito doméstico. Sin embargo, en áreas en las que los vectores se localizan en el exterior de las viviendas (p. ej., Sudán) o en las que los flebótomos desarrollan resistencia (p. ej., estado de Bihar en la India), estas medidas no son útiles.
3. Existen pocos datos acerca de la utilidad de las mosquiteras impregnadas en permetrina, aunque los resultados son prometedores.
4. El diagnóstico precoz y tratamiento eficaz tienen una gran importancia en la prevención de nuevos casos, especialmente en Sudán, país en el que los casos de PKDL constituyen un importante reservorio de la enfermedad.

### BIBLIOGRAFÍA

- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Cañavate C, et al. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 2008;21:334-59.
- Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the Leishmaniases. A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in Humans. *Adv Parasitol* 2007;64:1-109.
- Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Visceral leishmaniasis, et al. what are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nature Rev* 2007;5:S7-S16.
- Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999;354:1191-9.
- Khatami A, Firooz A, Gorouhi F, Dowlati Y. Treatment of acute Old World cutaneous leishmaniasis. A systematic review of the randomized controlled trials. *J Am Acad Dermatol* 2007;335:e1-29.
- Olliaro PL, Guerin PJ, Gerstl S, Haaskjold AA, Rottingen JA, Sundar S. Treatment options for visceral leishmaniasis. a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. *Lancet Infect Dis* 2005;5:763-74.
- Pérez Arellano JL, Carranza C, Cordero M, Muro A. Infecciones por protozoos hemoflagelados. leishmaniosis. *Medicine* 2010;10:3621-31.
- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Primes C, Alexander B, Broker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007;7:581-96.
- Tuon FF, Amato VS, Graf ME, Machado-Siqueira A, Nicodemo AC, Amato Neto V. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis – a systematic review with a meta-analysis. *Intern J Dermatol* 2008;47:109-24.
- Van Griensven J, Balasegaram M, Meheus F, Alvar J, Lynen L, Boelaert M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2010;10:184-94.
- WHO Technical Report Series. Control of the leishmaniases 2010;1-186.

## 2. Resistencia a fármacos anti-*Leishmania*

Enfermedades tropicales como la leishmaniosis, malaria y tripanosomiasis son consideradas enfermedades “olvidadas” por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Estas enfermedades al no disponer de vacunas actualmente para su control, hacen que sea necesario el uso del tratamiento farmacológico como la principal herramienta disponible para eliminar la infección (Tabla 1). Sin embargo, estos tratamientos tienen varias limitaciones debido a su toxicidad, los altos costos y la aparición de resistencias. En el caso concreto de la leishmaniosis los SbV han sido la terapia de elección durante los últimos 72 años (desde 1940), aunque a partir de 1980 se han reportado fallos en el tratamiento y cada vez son más las publicaciones que la mencionan [1-4]. Existen fracasos terapéuticos hasta de un 60% como ocurre en el distrito norte de Bihar en la India [1]. Oliveira Neto y col., en 1998, pusieron de manifiesto este problema en Brasil en pacientes con lesiones recidivantes y diseminación a otras partes del cuerpo, principalmente mucosa nasal después de un tratamiento completo con SbV lo que sugiere resistencia del parásito al medicamento [5, 6]. En Sur América también han sido publicados en países como Venezuela y Brasil [7-9].

La falta de eficacia en el tratamiento puede ser ocasionado por diversas causas, entre ellas parásitos resistentes. Bryceson en 1985 observó que una alta proporción de pacientes con leishmaniosis visceral en Kenya, no respondían al tratamiento tras uno o más ciclos de SbV, indicando el desarrollo de resistencia parasitaria [2, 4, 10]. Algunos focos de *L. major* presentes en Argelia demostraron ser relativamente resistente a SbV. En Brasil, cepas aisladas de pacientes con leishmaniosis cutánea y mucocutánea no respondieron al tratamiento *in vitro* con Glucantime® por ser posiblemente resistentes a éste, aunque si fueron sensibles al

Pentostam®, lo que sugiere posibles variaciones en la composición del medicamento o en su manufactura [2, 11].

Tratamientos	Primera línea	Principio activo	Dosis	Vía	Costo (USD)	Efectos adversos
leishmaniasis visceral	Glucantime®	SbV	20mg/kg/día 28días	IM-IV	634,4	*TF,F,D,N,AT,LT,AX, ART,TR,TH
	Pentostam®	SbV	20mg/kg/día 28días	IM-IV	634,4	*TF,F,D,N,AT,LT,AX, ART,TR,TH
	Fungizona®	Amfotericina B	0.75-1mg/kg 15-20 dosis	IV	439	*TF,NFX,F,HC,MC
	Ambisome®	Amfotericina B	3-4mg/kg/día 5 días	IV	967,9	*NFX,TC
	Impavido®	Miltefosina	2,5 mg/kg/día 28 días	VO	246,84	*GI, TE,TG
leishmaniasis cutánea y mucosa	Glucantime®	SbV	20mg/kg/día 20días	IM-IV-IL	634,4	*TF,F,D,N,AT,LT,AX, ART,TR,TH
	Fungizona®	SbV	1mg/kg/día Total: 1-1.5g	IV	634,4	*TF,NFX,F,HC,MC
	Impavido®	Miltefosina	2,5 mg/kg/día 28 días	VO	246,84	*GI, TE,TG
	Pentacarinat®	Pentamidina	4mg/kg/día Total: 2.0 g	IM	422,22	*DM,HG,MC,NFX

**Tabla 1. Tratamiento de la leishmaniosis.** Esta tabla muestra los medicamentos comúnmente utilizados para el tratamiento de las diferentes manifestaciones clínicas de la leishmaniosis, con sus respectivas dosis, vías de administración, precio aproximado del tratamiento en dólares (USD) y efectos adversos más comunes. (Los cuales se pueden presentar de forma leve a severa o estar ausentes). Todos los medicamentos son de uso prohibido durante el embarazo.

\* (TF) Tromboflebitis, (F) Fiebre, (D) Diarrea, (N) Náuseas, (AT) Artromialgias, (LT) Letargia, (AX) Anorexia, (ART) Arritmias, (TR) Toxicidad renal, (TH) Toxicidad hepática, (DM) Diabetes mellitus, (HG) Hipoglucemia, (MC) Miocarditis, (NFX) Nefrotoxicidad, (GI) Gastrointestinal, (TE) Transaminasas elevadas, (TG) Teratogénico, (HC) Hipocalcemia, (TC) Trombocitopenia.



## 2.1 Mecanismos de resistencia a los antimoniales

Hasta ahora el conocimiento sobre los genes o los mecanismos de resistencia y la o las moléculas blanco implicadas en la resistencia a los antimoniales es aún limitado: Varios genes asociados directa o indirectamente a un mecanismo de resistencia frente al SbV, han sido amplificados (*odc-140*, *orfsbv* y *pgpa* ) y co-amplificados genéticamente *odc-140* y *gsh-1* [12, 13]. La presencia de un sistema de eliminación del medicamento asociado a proteínas de membrana, o la inhibición de la formación de complejos topoisomerasa I y ADN en cepas resistentes, se han descrito en diferentes especies de *Leishmania* resistentes a arsenicales o antimoniales principalmente en especies del Viejo Mundo [14]. Sin embargo, ninguno de estos genes o proteínas han sido aun ampliamente aceptados como verdadero o único responsables de la resistencia a los antimoniales (Tabla 2).

## 2.2 Amplificación y co-amplificación genética

La amplificación genética del ADN extracromosomal se ha descrito en células eucarióticas y en parásitos, como *Leishmania* resistente a medicamentos. Este fenómeno genético consiste en la amplificación de varias copias de un gen cromosomal. Este gen es posteriormente transcrito extracromosomalmente en el núcleo para originar una mayor cantidad de copias específicas que permitan al parásito resistir el efecto tóxico del medicamento. Hanson en 1991 observó en cepas de *L. donovani*, la formación de entre 10-20 copias de ADN lineal extracromosomal, correspondientes al gen *odc-140*. Este gen era amplificado en respuesta a un estímulo con el medicamento difluormetilornitina [15]. *odc-140* codifica el gen para la enzima ornitina-descarboxilasa que permite la

supervivencia del parásito en presencia del medicamento, inactivando su acción. Igualmente en estudios posteriores, se observó la aparición de múltiples copias de ADN circulares denominados R y G en cepas de *Leishmania tarentolae* en respuesta a la presencia de arsénico y al incremento de la concentración de los medicamentos methotrexate y tunicamicina [16].

Haimeur y Ouellette en 1998 demostraron la amplificación de un nuevo gen (*orfSbV*) en mutantes de *Leishmania tarentolae* resistentes a SbV, demostrando que el producto de dicho gen formaría parte de un posible mecanismo de resistencia, en donde el número de copias del *locus* amplificado está directamente relacionado con el nivel de resistencia a SbV. Aunque aún se desconoce el mecanismo por el cual el gen *orfSbV* genera resistencia, se cree que este podría estar asociado a una proteína de membrana [17].

De forma característica, se ha observado que en cepas de *Leishmania* resistentes a inhibidores de la síntesis del esteroles, se puede lograr la expresión del *locus* H. La región H de un tamaño de 40Kb contiene dos genes relacionados con resistencia a medicamentos: la *Ltpgpa* y la Pteridina reductasa 1 (*PTRI*). El producto del primer gen es un transportador de la familia ABC que confiere resistencia a los metales pesados (antimonios y arsenicales) mediante el secuestro de los metales al interior de vesículas que posteriormente pueden ser expulsadas a través del bolsillo flagelar del parásito, actuando posiblemente como una bomba de expulsión que utiliza conjugados de metales como sustrato. Proteínas del tipo PGPA se ha encontrado sobreexpresadas en cepas de *Leishmania tarentolae* resistentes a arsénico y antimonio de potasio trivalente (SbIII) [18].

El producto de *PTRI* confiere resistencia a methotrexate [19]. La resistencia a este medicamento se ha visto influenciada además, por la amplificación del gen de la

enzima dehidrofolato reductasa-timidilato sintetasa (*dhfr-ts*), en *Leishmania major*. Por razones desconocidas esta amplificación no ocurre en *Leishmania donovani*, *Leishmania tarentolae* o en otras especies seleccionadas para resistencia *in vitro* a methotrexate (MTX). En contraste, la amplificación de *PTR1* se ha observado en todas las especies de *Leishmania* seleccionadas para la resistencia a MTX [20].

Adicionalmente, el gen *gsh1*, que codifica para la enzima  $\gamma$ -glutamylcisteina sintetasa e involucrada en la biosíntesis de glutatión, es co-amplificado junto con el gen *odc-140*, generando conjuntamente un incremento en los niveles intracelulares de glutatión y espermidina, moléculas que conforman el tripanotión. Este último es importante en la conjugación de metales, ya que al poseer grupos sulfihídricos puede conjugarse con otras sustancias por pérdida o ganancia de sus hidrógenos. La disminución de la biosíntesis de esta molécula, disminuye el efecto o la resistencia a SbIII cien veces. Así mismo, la pérdida de los amplicones que codifican para las proteínas precursoras de la molécula tripanotión, glutatión y espermidina hace que disminuya la resistencia unas diez veces en las cepas resistentes [17].

## **2.3 Mecanismo de resistencia asociado al fenotipo MDR**

Uno de los problemas más interesantes que surge del estudio de transportadores, es el de cómo las células sometidas a dosis subterapéuticas de un determinado medicamento pueden adquirir resistencia a otros fármacos con los cuales no están relacionados estructuralmente y frente a los cuales no han sido expuestos

previamente. Este fenómeno se conoce como fenotipo MDR o de multirresistencia a drogas. En los últimos años se ha avanzado en la comprensión de los mecanismos moleculares del fenotipo MDR: incluyendo las proteínas implicadas, los genes que las codifican y los mecanismos por los cuales estas actúan en células cancerígenas [21-23].

Transportadores PGP y *Itmdr1* de la superfamilia de dominios de unión a ATP (ABC), relacionados con transporte de medicamentos en células resistentes, se han identificado en *Leishmania* [24]. Cabe anotar que otros transportadores pertenecientes a esta familia cumplen otras funciones fisiológicas necesarias para la supervivencia de la célula tales como: transporte de aminoácidos, azúcares y péptidos en bacterias, además de otras moléculas en eucariotas.

Los miembros pertenecientes a esta superfamilia ABC se han organizado de acuerdo a diferentes parámetros, como por ejemplo, su secuencia de aminoácidos. Y se han agrupado en diferentes subfamilias, como por ejemplo la ABCB a la cual pertenecen las PGPA de *Leishmania*. Los diferentes transportadores encargados de conferir resistencia a diferentes medicamentos en *Leishmania*, pertenecen al grupo de PGP y MRP. Del grupo PGP, su representante más reconocido es la proteína *LdMDR1*, cuyo gen fue amplificado de un círculo extracromosomal en una cepa de *L. donovani* seleccionada para adquirir resistencia a vinblastina [25]; en cuanto al grupo MRP la proteína que confiere resistencia a los antimonioales es PGPA. El gen que codifica para esta proteína PGPA, inicialmente se detectó amplificado en un círculo extracromosomal denominado círculo H en *L. tarentolae* (*ltpgpA*), la cual fue seleccionada para adquirir resistencia a methotrexate [26] (Tabla 2).

La amplificación de genes del tipo ABC también es común en células neoplásicas resistentes a agentes anticancerígenos y en algunos parásitos tales como *Plasmodium falciparum* [27]. Este fenómeno también se ha identificado en algunas cepas de *Leishmania* [2, 28, 29]. En *Leishmania tarentolae* se demostró la existencia de una glicoproteína P, que le confiere resistencia a metales pesados como el arsénico. De igual forma, el mecanismo de resistencia a arsénico en cepas de *L. mexicana*, *L. trópica* y *L. tarentolae*, previamente seleccionadas para resistencia a este metal *in vitro*, consiste en la amplificación de uno de los genes de las proteínas transportadores ABC: ATP dependientes. En general se cree, que en la membrana celular de *Leishmania* se expresa una proteína similar a la glicoproteína P170 (gp170), producto del gen *mdr1*, que está localizado en el brazo largo del cromosoma 7. Esta proteína constituye un sistema de detoxificación natural, encontrándose también en varios tejidos humanos. Esta proteína funciona a modo de bomba que expulsado el medicamento al exterior de la célula o al interior de las vesículas a través de un mecanismo aún desconocido en su totalidad. Se entiende que los medicamentos son expulsados a través de un transporte activo proporcionado por los dominios transmembranales de la proteína con consumo de ATP. Se ha sugerido que la fosforilización de la glicoproteína (gp170) en los dos dominios citoplasmáticos pudiera modificar el proceso de transporte, modulando la resistencia a agentes citotóxicos [30, 31].

Esta glicoproteína se expresa también en *Trypanosoma cruzi* y *Plasmodium falciparum*. Igualmente, se han descrito en otros microorganismos como *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, donde confieren resistencia a antifúngicos y a otras compuestos.

ESPECIE	GEN	MEDICAMENTO
<i>L. donovani</i>	<i>ldmdr1</i>	Vinblastina
<i>L. amazonensis</i>	<i>lamdr1</i>	Daunomicina
<i>L. tropica</i>	<i>ltmdr1</i>	Daunomicina <b>Miltefosina</b>
<i>L. major</i>	<i>dhfr-ts</i>	Methotrexate
<i>L. major</i> <i>L. tarentolae</i>	<i>ptr1</i>	Methotrexate Primaquina
<i>L. donovani</i>	<i>LdMT</i>	<b>Miltefosina</b>
<i>L. infantum</i>	<i>abcg4</i>	<b>Miltefosina</b>
<i>L. tarentolae</i>	<i>ltpgpA</i>	SbV Arsénico Methotrexate
<i>L. tarentolae</i> <i>L. major</i>	<i>gsh1</i> <i>odc-140</i> <i>orfSbV</i>	SbV

**Tabla 2. Genes de *Leishmania spp* implicados en resistencia a medicamentos**

### **3. Nuevas alternativas terapéuticas: Alquil-lisofosfolípidos como inductores de apoptosis**

Los análogos sintéticos de la fosfatidilcolina (PC) y de la lisofosfatidilcolina con enlaces tipo éter fueron sintetizados como análogos de la 2-lisofosfatidilcolina (LPC) en 1966 por Gerhard Munder y Herbert Fisher en el instituto Max-Planck de Inmunología (Alemania). Munder y cols, observaron en sus experimentos que tras las modificaciones de la LPC en su enlace éster por un enlace éter evitaban la degradación de la molécula por enzimas esterases, presentando luego actividad selectiva en células cancerígenas [32-34]. Estos denominados lípidos sintéticos antitumorales (ATLs, synthetic “*antitumor lipids*”), constituyen una prometedora

familia de compuestos anticancerosos que a diferencia de la mayoría de los antitumorales utilizados actualmente en la clínica, no tienen como diana el ADN [34-36]. Los ATLs pueden clasificarse en dos grandes categorías: a) los fosfolípidos alquiléter, conocidos colectivamente como éter lípidos antitumorales o análogos de alquil-lisofosfolípidos, de los que su prototipo es la edelfosina (1-*O*-octadecil-2-*O*-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina); b) las alquilfosfocolinas, de las que su prototipo es la miltefosina (hexadecilfosfocolina) [34, 36]. Aunque se ha considerado que los ATLs y como prototipo la edelfosina actúan de forma similar, ciertas diferencias parecen emerger entre ambos tipos de familias de ATLs. La edelfosina es un compuesto no mutagénico que induce apoptosis de forma selectiva en células tumorales, a través de un mecanismo de acción que implica la activación intracelular del receptor de muerte Fas/CD95 mediante su reclutamiento y concentración en los denominados “*lipids rafts*” [34, 37-39]. La edelfosina, actuando a través de este mecanismo, parece ser particularmente eficaz frente a malignidades hematológicas [40-43]. La acción antitumoral de la edelfosina es más potente que la miltefosina, comportándose como el ATL con mayor actividad anticancerosa. En tumores sólidos actúa a través de un mecanismo que implica la activación de la apoptosis a través del retículo endoplásmico [44, 45]. Por otra parte, aunque el proceso de apoptosis se inicie a través de distintos mecanismos, la mitocondria es fundamental en la inducción de apoptosis por edelfosina [46-48]. Los datos obtenidos hasta el momento indican que la edelfosina induce la muerte de las células tumorales a través de la activación directa de la maquinaria apoptótica y de esta forma podría considerarse como un buen inductor de apoptosis en distintos sistemas biológicos. En este sentido, la edelfosina induce muerte celular también en levaduras [49, 50].

La edelfosina también posee actividad antiparasitaria contra distintos parásitos, incluyendo *Leishmania* y *Trypanosoma*, y se puede suministrar de forma oral [51, 52]. Sin embargo, el tipo de muerte inducida, el mecanismo de acción, su actividad en leishmaniosis cutánea, mucocutánea y visceral en diferentes especies o diferentes modelos *in vivo* permanecen aún sin aclarar. En cuanto al mecanismo de acción, ciertas evidencias indirectas sugieren que el metabolismo lipídico y la mitocondria pueden estar implicados en la acción antiparasitaria de la edelfosina y otros ATLs [47, 53, 54].

La miltefosina hexadecilfosfocolina (Impavido®) es otra alternativa terapéutica. Actualmente, es el único tratamiento oral y se administra a una dosis de 100 a 150 mg/día durante 28 días en casos viscerales, y a 2,5 mg/kg al día durante 28 días en casos de leishmaniosis cutánea o mucosa [55]. Este medicamento ha sido aprobado en la India (2002) para el tratamiento de LV en pacientes inmunocompetentes de dos años de edad en adelante, en Alemania (2004) para pacientes inmunocomprometidos afectados por LV y en Colombia (2005) para el tratamiento de la LC, logrando tasas de curación variables [56-59]. La administración oral de la miltefosina ha sido una ventaja terapéutica frente a los otros tratamientos disponibles, ya que reduce las dificultades de su aplicación por vía intravenosa o intramuscular, mejorado así la adherencia de los pacientes al tratamiento, por lo cual se espera que este medicamento contribuya a controlar y disminuir los casos de leishmaniosis clínica en zonas endémicas [60]. Sin embargo, no se puede suministrar en mujeres embarazadas por tener efecto teratogénico, y ya se han reportado casos de recaída en pacientes coinfectados con *Leishmania*/VIH y tratados con miltefosina. Se ha evidenciado la facilidad con la



que se pueden generar parásitos resistentes *in vitro* a miltefosina cuando estos son cultivados a dosis bajas y crecientes del fármaco [61, 62]. Además, la miltefosina presenta una vida media entre 150-200 horas, manteniendo niveles plasmáticos subterapéuticos durante varias semanas en los pacientes, lo que posibilita la aparición de cepas resistentes a miltefosina en aislados de campo. De hecho, a pesar de la reciente aprobación de la miltefosina para el tratamiento de la leishmaniosis, ya existen fallos terapéuticos en la LC o de LM: 49% en Colombia, Brasil 75%, Bolivia 70%, Guatemala 33% causada por *L. braziliensis*. En parásitos como *L. (L.) donovani* se ha observado que las líneas resistentes a miltefosina presentan una marcada disminución en la acumulación intracelular del medicamento en comparación con las líneas sensibles, lo cual no parece ser resultado de un metabolismo acelerado del medicamento o de un defecto en el mecanismo de internalización [60]. Dicho evento es dependiente de temperatura y ATP, lo que indica una traslocación activa de la miltefosina a través de la membrana plasmática del parásito [63]. Lo anterior fue confirmado mediante estudios moleculares y de transfección, en los que se evidenció el papel fundamental de un transportador de la superfamilia ATPasas de tipo P, denominado LdMT (*Leishmania donovani* Miltefosine Transporter), en la resistencia de *L. (L.) donovani* a miltefosina; la adquisición de mutaciones puntuales en cualquiera de los dos alelos del genLdMT presentes en las líneas resistentes, llevan a la pérdida de funcionalidad de la proteína para transportar la miltefosina al interior de parásito [64, 65].

La perifosina es otro alquil-lisofosfolípido que tiene una significativa actividad anti-proliferativa tanto *in vitro* como *in vivo* en diferentes tumores humanos. Este compuesto ocasiona arresto del ciclo celular con inducción de p21, p53 o

inhibición de la fosforilación de proteína AKT de forma dosis dependiente en cáncer de próstata entre otros [66]. La terapia combinada con perifosina e irradiación, en un modelo *xenografts* de carcinoma de células escamosas, muestra buenos resultados con la completa regresión del tumor [67]. Estudios de fase I han demostrado que este compuesto es tolerable y seguro; sin embargo, a dosis más altas de 600 mg se observan síntomas como náuseas, vómitos, deshidratación, diarrea y fatiga. La perifosina también se puede combinar de forma segura con otros compuestos como temsirolimus (Inhibidor de mTOR) y sorafenib (Inhibidor de tirosina quinasas y Raf quinasas). Estudios en Fase II con este compuesto han demostrado resultados variables en su actividad frente a neoplasias hematológicas como la macroglobulinemia de Waldenstrom, mieloma múltiple, leucemia y otras malignidades hematológicas [68]. La perifosina también tiene efecto en diferentes especies de *Leishmania* [69, 70]. En nuestro estudio *in vitro* fue el segundo alquil-lisofosfolípido más potente después de la edelfosina [52].

## **4.0 Nuevas dianas terapéuticas: Proteína quinasa**

### **B/RAC/ AKT**

Las proteínas quinasas (PK) son componentes críticos de las rutas de señalización en casi todos los procesos celulares en eucariotas. Siendo el foco de una intensa investigación en los últimos decenios debido a que la desregulación de la fosforilación de estas PK generan diferentes enfermedades como por ejemplo el cáncer y procesos inflamatorios crónicos [71, 72]. Estas proteínas son además en cáncer el objetivo prioritario de la quimioterapia moderna [73, 74].

El conocimiento básico como aplicado concerniente a las PK podrá probablemente aprovecharse para el control de diversos agentes infecciosos, entre ellos, los parásitos. La parasitología entró en la era genómica hace una década; facilitando el estudio de genomas, proteomas y transcriptomas [75, 76], que podrían responder a preguntas aún no resueltas de la biología de los parásitos, como por ejemplo: ¿Qué papel cumplen estas PK en la rápida respuesta adaptativa de *Leishmania*, durante el transcurso de su ciclo de vida heteroxeno?

Dentro de las proteínas serina/treonina quinasas existe una subfamilia de proteínas llamadas AGC quinasas, término acuñado por Steven Hanks y Tony Hunter en 1995. agrupadas en función de sus secuencias del dominio catalítico de la quinasa [77]. Entre las más conocidas cabe mencionar PKC, PKA, cGMP y cAMP. Esta familia está conformada por 60 de las 518 proteínas quinasas de humanos y están conservadas evolutivamente en eucariotas [78]. De las 60 AGC quinasas, 42 poseen dominios funcionales y están involucradas en la regulación de otras quinasas implicadas en rutas de señalización, que responden a diversos estímulos. Estas proteínas están reguladas principalmente por la fosforilación del motivo *T-loop*, localizado en el dominio catalítico, y el motivo hidrofóbico encontrado en la región no catalítica [79, 80]. Dentro de la familia de proteínas AGC existe una proteína llamada AKT que posee en su región N-terminal un dominio llamado pleckstrin (PH) que interactúa con alta afinidad con fosfatidilinositol (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>), producto de la activación de fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) en respuesta a factores de crecimiento o a segundos mensajeros entre otros (Figura 3) [81, 82]. Esta interacción de AKT con (PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>) en la membrana plasmática induce un cambio conformacional que permite la fosforilación de su residuo treonina-308 por la quinasa PDK1; sin embargo, el

máximo de actividad de AKT se obtiene cuando el motivo hidrofóbico se fosforila en el aminoácido serina 473 de la proteína [83, 84]. Se han identificado 130 substratos, dichos substratos poseen un motivo consenso de fosfoactivación del tipo Arg-X-Arg-X-X-Ser/Thre-φ donde X es cualquier aminoácido y φ un aminoácido hidrofóbico [84, 85]. En humanos existen 3 tipos de AKTs; AKT1, implicada principalmente en la supervivencia y el crecimiento celular; AKT2, expresada en altos niveles en músculo y adipocitos, contribuyendo así a la homeostasis de la glucosa y AKT3, expresada principalmente en células de testículo y cerebro [86]. Estas proteínas están normalmente inactivas en el citoplasma, y el control de su desfosforilación está a cargo de la proteína fosfatasa 2 (PP2) y de las fosfatasas ricas en leucina específicas del dominio pleckstrin como PHLPP1 y PHLPP2 [87]. AKT es principalmente una quinasa que promueve la supervivencia de las células a través de la fosforilación de la quinasa pro-apoptótica Bad, que hace que Bad se disocie del complejo Bcl-2/Bcl-X inhibiéndose así la apoptosis (Figura 3) [88]. AKT también puede activar a través de NF-κβ genes pro-supervivencia para mantener la viabilidad celular en condiciones de estrés o para activar la proteína FOXO1 [89, 90].

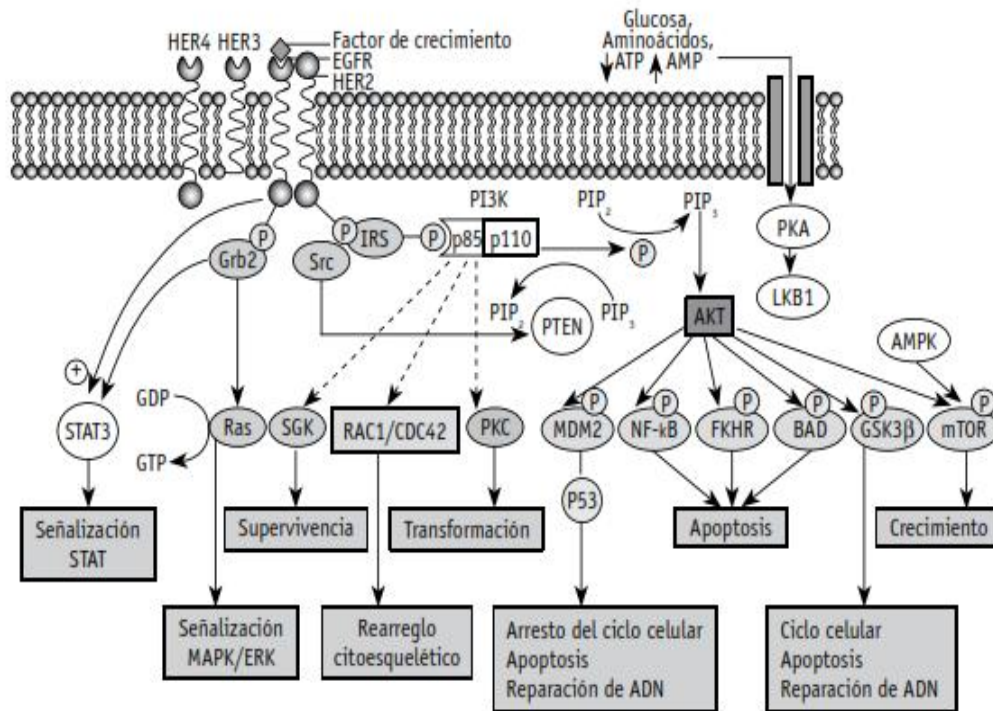
En cáncer existen células que activan persistentemente AKT favoreciendo la tumorigénesis y la supervivencia de células tumorales. Un ejemplo, son las células *Jurkat* provenientes de una leucemia linfocítica aguda (LLA), las cuales presentan activación constitutiva de AKT en la membrana para favorecer su viabilidad [91, 92].

En otros cánceres como el de colon u ovario, también se activa la AKT en defensa al estrés generado por la quimioterapia [93]. Por su importante papel en la supervivencia y resistencia al tratamiento de las células tumorales esta proteína ha

sido objeto de estudio intensivo para encontrar inhibidores que puedan bloquear su activación. Algunos de los inhibidores más estudiados son los competidores de ATP, los alostéricos del sitio de unión a PIP3 y competidores de sustrato.

En los últimos años, se han descubierto algunas proteínas de señalización en *Leishmania*, basándose en la hipótesis de que todas las células eucariotas poseen proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) [94]. En humanos estas quinasas regulan entre otras funciones el ciclo celular, diferenciación, supervivencia y adaptación en respuesta al estrés celular. En el genoma de *L. major*, *L. mexicana*, *L. infantum* y *L. braziliensis*, se han identificado 15 genes para MAPKs. Entre las proteínas codificadas por estos genes se encuentran LmxMPK1 y LmxMPK2, esenciales para los amastigotes, o LmxMPK4 que es fundamental en promastigotes durante su estadio en el vector. En *L. major* MPK7 regula el crecimiento del parásito y aumenta su actividad después de su exposición a un estrés de pH 5,5 y temperatura de 34°C [95-98].

Ni en *Leishmania* ni en *Trypanosoma*, como en la mayoría de los parásitos, no se conocen con exactitud cuáles, cuántas y qué interacciones existen entre las distintas quinasas ni qué papel juegan en la supervivencia, así como tampoco se ha documentado la existencia de una proteína con funciones similar a AKT en trypanosomátidos. Sin embargo, algunos autores como *Bahia y cols., 2009*, resaltan la importancia de estudiar la ruta de fosfatidilinositol quinasa en estos parásitos, y a través de herramientas bioinformáticas su grupo ha detectado en las bases de datos algunas proteínas que podrían participar en la ruta de señalización PI3K, aunque ninguna ha sido todavía validada experimentalmente [99].



**Figura 3.** Esquema de la vía de señalización fosfatidil inositol 3 quinasa /AKT. ERK; quinasa regulada por señales extracelulares. FKHR; forkhead. GDP; Guanosín difosfato. IRS; Serina/treonina *proteína* quinasa AKT; sustrato receptor de insulina. GSK3; quinasa sintasa de glicógeno. MAPK; proteína quinasa mitógeno activado. NFκβ; factor nuclear κβ. PIP2; fosfatidil inositol 3,4 difosfato. PIP3; fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato. PKC; proteína quinasa C. STAT3; traductor de señal y activador de la transcripción. Tomado de Pinzón *et al.*, 2009.

## 4.1 Proteínas chaperonas

Las proteínas de choque térmico, cumplen un papel importante en la célula en respuesta a diferentes tipos de estrés celular, protegiendo de la degradación específica de proteínas o facilitando el paso de una proteína a una organela.

La expresión de este tipo de proteínas se caracteriza por ser rápida e intensa; sin embargo, algunas chaperonas son expresadas constitutivamente y de forma abundante en la célula, como por ejemplo la familia HSP90 [100]. La presencia de proteínas mal plegadas en una célula es una de las señales importantes que desencadena la inducción de la respuesta, ya que las proteínas sin un adecuado plegamiento perderían su conformación funcional nativa [101, 102]. Existen

mecanismos para proteger a la célula frente a la presencia de proteínas dañadas por el choque térmico [103]. Uno es la degradación de proteínas aberrantes vía proteosoma previa ubiquitinación de la proteína [104]. El segundo consiste en prevenir la agregación de proteínas mal plegadas con el fin de promover su correcto plegamiento y ensamblaje [105]. En este último caso, las HSPs desempeñan un papel primordial actuando como chaperonas moleculares [102].

El término chaperonina molecular fue acuñado por Hemmingsen en 1988 para designar una familia de proteínas que comparten homología en su secuencia aminoácidica y actúan como chaperonas en cloroplastos, mitocondrias y bacterias [106].

Las proteínas de choque térmico no solo ayudan al plegamiento de otras proteínas en condiciones de estrés, sino que también actúan en condiciones normales junto con factores de transcripción o mediadores del ciclo celular como las ciclinas, mediante uniones y liberaciones controladas [107, 108]. Durante el proceso de plegamiento de una proteína las interacciones existentes en la secuencia de aminoácidos originan una estructura tridimensional con plena funcionalidad. Es en este proceso en el que también las chaperonas moleculares participan. Sin embargo, las proteínas con función chaperona no contienen información estructural acerca del plegamiento de una determinada proteína, sino que facilitan su plegamiento al prevenir las interacciones incorrectas entre polipéptidos [109]. El plegamiento de una proteína ocurre en un entorno muy complejo en el que la concentración de proteínas es muy elevada. Esto, aumenta la probabilidad de formación de agregados, al quedar expuestos residuos hidrofóbicos que estarán ocultos una vez que la proteína finalice su plegamiento. Las HSPs, como chaperonas moleculares, se unen a esos residuos activos previniendo la

agregación de las cadenas polipeptídicas parcialmente plegadas durante su salida del ribosoma, y la de proteínas completas [110, 111]. La unión y liberación de proteínas no plegadas a las HSPs suele estar acoplada a la hidrólisis de ATP, lo que provoca cambios conformacionales en las HSPs que varían su afinidad por las cadenas polipeptídicas, o su interacción con otras chaperonas y cochaperonas [101]. Por último, estas proteínas también son importantes para el correcto funcionamiento de las rutas de señalización tanto en condiciones normales de la célula o en condiciones patológicas, como el cáncer. Así por ejemplo la unión de la HSP90 con la quinasa pro-supervivencia AKT, evita la degradación proteosomal de AKT y contribuye a la estabilización funcional de la señalización de la vía PI3K/AKT, previniendo la apoptosis [112]. La quinasa AKT y la chaperona HSP90 se sobreexpresan en numerosas líneas celulares de cáncer y están presentes en complejos multi-chaperonas, por lo que se consideran importantes dianas terapéuticas [113, 114].

## **Principales familias de HSPs**

Evolutivamente estas proteínas han sido conservadas en distintos tipos de células. En todos los organismos han sido descritos genes que codifican para las principales familias de proteínas de choque térmico. Las HSPs incluyen proteínas tanto de expresión constitutiva como de expresión inducible, y algunas de ellas se encuentran entre las proteínas más abundantes de la célula. Muchas de las HSPs se encuentran en los distintos orgánulos celulares [103]. Las HSPs se agrupan en familias, en función de la homología de las secuencia y del peso molecular (**Tabla 3**). Estas familias están formadas por proteínas que pueden diferir en su



localización intracelular, función y expresión en respuesta al choque térmico. Las principales familias son: HSP110, HSP100, HSP90, HSP70 y HSP40.

<b>FAMILIA</b>	<b>MIEMBROS EN EUCARIOTAS</b>	<b>Localización celular</b>
<i>HSP110</i>	<i>HSP 110, GRP170</i>	Citosol y Reticulo endoplasmático
<i>HSP100</i>	<i>HSP104</i>	Citosol
<i>HSP90</i>	<b><i>HSP83, HSP90, GRP94, GRP96, HSP75, TRAP1</i></b>	Citosol, Reticulo endoplasmático y mitocondria
<i>HSP70</i>	<i>HSP70, HSC70, BiP, GRP78, mHSP70</i>	Citosol, Reticulo endoplasmático y mitocondria
<i>HSP40</i>	<i>HSP40</i>	Citosol
Chaperoninas	<i>HSP60, CPN60, HSP10, CPN10</i>	Mitocondria y cloroplasto

**Tabla 3.** Principales familias de proteínas de choque térmico en eucariotas. Las HSPs se agrupan en función de su homología de secuencia y de su peso molecular. Estas proteínas pueden diferir en su localización intracelular y función en respuesta al choque térmico. **HSP90** es reclutada a la balsa lipídica (*lipid raft*) en respuesta al tratamiento con edelfosina en células leucémicas (Nieto y cols., 2008).

## **Familia HSP90/HSP83**

El nombre de esta proteína hace referencia a su peso molecular. Estas proteínas están muy conservadas en eucariotas y representan el 2.8% del total de proteínas de *Leishmania* [115]. Las proteínas pertenecientes a esta familia se caracterizan por poseer un dominio de unión a ATP en su extremo amino terminal, y una región carboxilo terminal en la que se encuentra el dominio de dimerización [116]. Estas proteínas desempeñan entre otras, funciones de regulación de la respuesta al estrés, estabilización de proteínas, traducción de señales y se asocian

con otras chaperonas para cumplir múltiples tareas [100, 117]. En diferentes estudios, estas proteínas han sido relacionadas con varios tipos de tumores, incluyendo cáncer de mama, carcinoma de páncreas y leucemia humana entre otros, así como en la resistencia a múltiples fármacos usados en la quimioterapia [118].

### ***Leishmania* HSP83**

La proteína HSP83 de *Leishmania*, es una proteína ATP-dependiente que se encuentra en la parte soluble citoplasmática del parásito y se considera una proteína ortóloga de la HSP90 humana, comparte una identidad del 52% y una similitud del 61.9%. Estudios de diferenciación celular en *Leishmania* y *Trypanosoma* han encontrado incrementada la síntesis de HSP60, HSP70 y HSP83 durante este proceso [119]. Esta chaperona actúa normalmente con otras chaperonas formando un complejo llamado “foldosoma”, también ha sido implicada en resistencia a medicamentos, en cepas aisladas de regiones con alta resistencia a antimoniales en la India [120]. Esta proteína tiene una expresión constitutiva y representa el 2.8% del total de proteínas del parásito, es decir no es activada exclusivamente tras el choque térmico y su regulación es postranscripcional, como ocurre para la mayoría de proteínas del parásito [115].

Los genes que codifican para esta proteína han sido estudiados en distintas especies de *Leishmania*, poniendo de manifiesto una organización homogénea en todas ellas. *L. major*, *L. donovani* y *L. amazonensis* presentan 5-6 copias organizadas en tándem, en tanto que en *L. infantum* posee 7 copias igualmente dispuestas en tándem [121, 122]. Aparte de la conservación en la organización génica, se ha descrito una elevada homología de secuencia entre los genes *HSP83*

de las distintas especies, tanto en la región codificante como en la región intergénica. Sin embargo, las mayores diferencias se localizan en la 3'UTR, incluso en el caso intra-especie [121]. En *L. amazonensis* los mensajeros de los genes *HSP83* se acumulan durante el choque térmico, situación en la que además se traducen de forma más eficiente. Los mensajeros *HSP83* se degradan rápidamente a 26°C, mientras que a temperaturas de choque térmico aumenta su estabilidad. La elevada tasa de degradación a 26°C depende de la síntesis activa de proteínas, lo que sugiere la existencia de una ribonucleasa específica cuya actividad se ve disminuida a 35°C, permitiendo la acumulación de los mensajeros [123, 124]. La región 3'UTR de estos genes es la responsable del aumento en la estabilidad de los mensajeros *HSP83* durante el choque térmico, se ha definido un elemento de esta región comprendido entre las posiciones 201 y 472 que potencia la traducción durante el estrés térmico [125]. En *L. infantum* también se ha observado una mayor estabilidad de los transcritos a 37°C, comparado con 39°C. Sin embargo, en este caso la acumulación es dependiente de la síntesis activa de proteínas [126]. Durante la diferenciación hacia la forma amastigote se ha observado que la concentración de mensajeros *HSP83* aumentan rápidamente durante las dos primeras horas tras el inicio del proceso, y descienden hasta niveles iniciales a las 9 horas siendo casi indetectables a las 24 horas. Estos cambios en los niveles de los ARN mensajeros se corresponden con las variaciones observadas en la síntesis de *novo* de la proteína: la síntesis de *HSP83* aumenta hasta 8 veces tras 3 horas de diferenciación, cayendo hasta los niveles iniciales a las 9 horas y produciéndose 4 veces menos tras 24 horas [126]. El papel de la *HSP83* durante el proceso de diferenciación ha sido estudiado en *L. donovani* [119]. La imposibilidad de obtener mutantes nulos para estudiar esta

proteína, ha potenciado la búsqueda de compuestos que inactiven la proteína HSP83. Compuestos como la geldanamicina A (GA) o el radicicol inducen diferenciación de la forma promastigote a amastigote. En *Leishmania* el primer gen de la familia HSP83/90 con localización en el retículo endoplasmico, fué denominado *GRP94*, e identificado en *L. infantum* [127]. La proteína GRP94 esta codificada por un gen de copia única y se ha mostrado su inmunogenicidad durante la infección por el parásito.

Las HSP83/HSP70 *in vitro* inducen la proliferación de esplenocitos de ratones BALB/c, su efecto puede ser inhibiendo con anticuerpos específicos. Por esta razón se piensa que si este papel inmonogénico se cumple en condiciones de infección natural podría tener un efecto inmunomodulador [128].

## **Inhibidores de HSP90**

Dado que los sustratos de Hsp90 son variados y numerosos, su inhabilitación mediante el uso de diferentes compuestos químicos conduce a la inhibición simultánea de varias cascadas de señalización. La utilización de Hsp90 como diana conduce a la inestabilidad simultánea de múltiples cascadas de transducción de señales, lo que tendría una particular utilidad para el tratamiento del cáncer en estadios avanzados en los que frecuentemente hay múltiples alteraciones oncogénicas o para interferir en las rutas de vida de los parásitos.

El antibiótico geldanamicina (GA) fue el primer compuesto inhibidor de Hsp90 descrito, y fue aislado como un producto natural de *Streptomyces hygroscopicus*. A pesar de que posee claros efectos antitumorales, debido a su elevada hepatotoxicidad se han encontrado dificultades en los ensayos clínicos [129].

El análogo 17AAG (17-alilamino-17-demetoxi-Geldanamicina) posee todas las características antitumorales de la geldanamicina pero con una toxicidad mucho menor, por lo que ha superado el ensayo en Fase I y el de Fase II está en progreso [130].

La inhibición de Hsp90 induce la degradación vía proteosoma de proteínas fundamentales en la supervivencia y viabilidad de células tumorales, por lo que se la está considerando como una prometedora diana en la quimioterapia anticancerígena, ya que con su inhibición se consigue que numerosas proteínas relevantes en la supervivencia de la célula tumoral se degraden simultáneamente [131].

En los casos donde una proteína este asociada a Hsp90 y participe directamente en la patogénesis de un determinado tipo de cáncer, el uso de inhibidores contra la proteína Hsp90 podría ayudar en el tratamiento. Así por ejemplo, la estabilidad de la proteína Bcr-Abl, implicada en el desarrollo de la leucemia mieloide crónica y de la leucemia linfocítica aguda, depende de Hsp90, y el tratamiento de estas células con geldanamicina o 17AAG conduce a la rápida destrucción de Bcr-Abl [132]. Los beneficios clínicos de la utilización de inhibidores de Hsp90 como agentes únicos en quimioterapia parecen prometedores; sin embargo, su aplicación se encuentra muy restringida a ciertos tipos de cáncer. En algunos casos, el uso combinado de inhibidores de Hsp90 junto con otros compuestos antitumorales como la doxorubicina, el taxol, o inhibidores de la histona deacetilasa, es más efectivo que su uso independiente [129, 133, 134]. La utilización de terapia combinada, puede tener múltiples beneficios y hace menos probable la aparición de resistencia [129].

## 5. BIBLIOGRAFÍA

1. Sundar, S., *Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis*. Trop Med Int Health, 2001. **6**(11): p. 849-54.
2. Grogl, M., T.N. Thomason, and E.D. Franke, *Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease*. Am J Trop Med Hyg, 1992. **47**(1): p. 117-26.
3. Faraut-Gambarelli, F., et al., *In vitro and in vivo resistance of Leishmania infantum to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis*. Antimicrob Agents Chemother, 1997. **41**(4): p. 827-30.
4. Lira, R., et al., *Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-azar is due to the emergence of antimony-resistant strains of Leishmania donovani*. J Infect Dis, 1999. **180**(2): p. 564-7.
5. Rocha, R.A., et al., *Apparent Glucantime failure in five patients with mucocutaneous leishmaniasis*. J Trop Med Hyg, 1980. **83**(4): p. 131-9.
6. el-Masum, M.A., et al., *Visceral leishmaniasis in Bangladesh: the value of DAT as a diagnostic tool*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1995. **89**(2): p. 185-6.
7. Bonfante-Garrido, R., et al., *Disseminated American cutaneous leishmaniasis*. Int J Dermatol, 1996. **35**(8): p. 561-5.
8. Costa, J.M., et al., *Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases*. J Trop Med Hyg, 1986. **89**(6): p. 319-23.
9. Nonata, R., R. Sampaio, and P.D. Marsden, *Mucosal leishmaniasis unresponsive to glucantime therapy successfully treated with AmBisome*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1997. **91**(1): p. 77.
10. Bryceson, A.D., et al., *Visceral leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs. I. Clinical and immunological studies*. Trans R Soc Trop Med Hyg, 1985. **79**(5): p. 700-4.
11. Moreira, E.S., J.B. Guerra, and L. Petrillo-Peixoto Mde, *Glucantime resistant Leishmania promastigotes are sensitive to pentostam*. Rev Soc Bras Med Trop, 1992. **25**(4): p. 247-50.
12. Haimeur, A. and M. Ouellette, *Gene amplification in Leishmania tarentolae selected for resistance to sodium stibogluconate*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(7): p. 1689-94.
13. Grondin, K., et al., *Co-amplification of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene gsh1 and of the ABC transporter gene pgpA in arsenite-resistant Leishmania tarentolae*. EMBO J, 1997. **16**(11): p. 3057-65.
14. Lucumi, A., et al., *Sensitivity of Leishmania viannia panamensis to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes*. Antimicrob Agents Chemother, 1998. **42**(8): p. 1990-5.
15. Hanson, S., et al., *Unstable amplification of two extrachromosomal elements in alpha-difluoromethylornithine-resistant Leishmania donovani*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(12): p. 5499-507.
16. Detke, S., K. Katakura, and K.P. Chang, *DNA amplification in arsenite-resistant Leishmania*. Exp Cell Res, 1989. **180**(1): p. 161-70.
17. Haimeur, A., et al., *Amplification of the ABC transporter gene PGPA and increased trypanothione levels in potassium antimonyl tartrate (SbIII)*

- resistant Leishmania tarentolae*. Mol Biochem Parasitol, 2000. **108**(1): p. 131-5.
18. El Fadili, K., et al., *Role of the ABC transporter MRPA (PGPA) in antimony resistance in Leishmania infantum axenic and intracellular amastigotes*. Antimicrob Agents Chemother, 2005. **49**(5): p. 1988-93.
  19. Marchini, J.F., et al., *The H region HTBF gene mediates terbinafine resistance in Leishmania major*. Mol Biochem Parasitol, 2003. **131**(1): p. 77-81.
  20. Kundig, C., et al., *Role of the locus and of the resistance gene on gene amplification frequency in methotrexate resistant Leishmania tarentolae*. Nucleic Acids Res, 1999. **27**(18): p. 3653-9.
  21. Shustik, C., W. Dalton, and P. Gros, *P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in tumor cells: biochemistry, clinical relevance and modulation*. Mol Aspects Med, 1995. **16**(1): p. 1-78.
  22. Angelini, A., et al., *Modulation of multidrug resistance p-glycoprotein activity by flavonoids and honokiol in human doxorubicin-resistant sarcoma cells (MES-SA/DX-5): implications for natural sedatives as chemosensitizing agents in cancer therapy*. J Biol Regul Homeost Agents, 2010. **24**(2): p. 197-205.
  23. Angelini, A., et al., *Inhibition of P-glycoprotein-mediated transport by S-adenosylmethionine and cynarin in multidrug-resistant human uterine sarcoma MES-SA/Dx5 cells*. J Biol Regul Homeost Agents, 2012. **26**(3): p. 495-504.
  24. Cortes-Selva, F., et al., *Functional expression of a multidrug P-glycoprotein transporter of Leishmania*. Biochem Biophys Res Commun, 2005. **329**(2): p. 502-7.
  25. Henderson, D.M., et al., *Multidrug resistance in Leishmania donovani is conferred by amplification of a gene homologous to the mammalian mdr1 gene*. Mol Cell Biol, 1992. **12**(6): p. 2855-65.
  26. Chow, L.M. and S.K. Volkman, *Plasmodium and Leishmania: the role of mdr genes in mediating drug resistance*. Exp Parasitol, 1998. **90**(1): p. 135-41.
  27. Krogstad, D.J., et al., *Efflux of chloroquine from Plasmodium falciparum: mechanism of chloroquine resistance*. Science, 1987. **238**(4831): p. 1283-5.
  28. Callahan, H.L. and S.M. Beverley, *Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in Leishmania*. J Biol Chem, 1991. **266**(28): p. 18427-30.
  29. Legare, D., et al., *The Leishmania ATP-binding cassette protein PGPA is an intracellular metal-thiol transporter ATPase*. J Biol Chem, 2001. **276**(28): p. 26301-7.
  30. Osorio, E.J., et al., *[Leishmania: role of P glycoprotein in drug resistance and reversion strategies]*. Biomedica, 2005. **25**(2): p. 242-60.
  31. Águila JF, R.O., Álvarez IV y Vázquez RP *Resistencia a drogas mediada por la glicoproteína P*. Rev Cubana Oncol, 1998. **14**(2): p. 111-20.
  32. Andreesen, R., et al., *Selective destruction of human leukemic cells by alkyl-lysophospholipids*. Cancer Res, 1978. **38**(11 Pt 1): p. 3894-9.
  33. Berdel, W.E., et al., *Anti-tumor action of alkyl-lysophospholipids (Review)*. Anticancer Res, 1981. **1**(6): p. 345-52.

34. Mollinedo, F., et al., *ET-18-OCH<sub>3</sub> (edelfosine): a selective antitumour lipid targeting apoptosis through intracellular activation of Fas/CD95 death receptor*. *Curr Med Chem*, 2004. **11**(24): p. 3163-84.
35. David-Cordonnier, M.H., et al., *DNA and non-DNA targets in the mechanism of action of the antitumor drug trabectedin*. *Chem Biol*, 2005. **12**(11): p. 1201-10.
36. Gajate, C. and F. Mollinedo, *Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH<sub>3</sub> (edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells*. *Curr Drug Metab*, 2002. **3**(5): p. 491-525.
37. Gajate, C. and F. Mollinedo, *Lipid rafts and Fas/CD95 signaling in cancer chemotherapy*. *Recent Pat Anticancer Drug Discov*, 2011. **6**(3): p. 274-83.
38. Mollinedo, F., et al., *Involvement of lipid rafts in the localization and dysfunction effect of the antitumor ether phospholipid edelfosine in mitochondria*. *Cell Death Dis*, 2011. **2**: p. e158.
39. Gajate, C. and F. Mollinedo, *The antitumor ether lipid ET-18-OCH<sub>3</sub> induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells*. *Blood*, 2001. **98**(13): p. 3860-3.
40. Mollinedo, F. and C. Gajate, *Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: new targets for apoptosis-directed cancer therapy*. *Drug Resist Updat*, 2006. **9**(1-2): p. 51-73.
41. Gajate, C. and F. Mollinedo, *Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts*. *Blood*, 2007. **109**(2): p. 711-9.
42. Mollinedo, F., et al., *Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma*. *Oncogene*, 2010. **29**(26): p. 3748-57.
43. Mollinedo, F., et al., *In vitro and In vivo selective antitumor activity of Edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts*. *Clin Cancer Res*, 2010. **16**(7): p. 2046-54.
44. Nieto-Miguel, T., et al., *Endoplasmic reticulum stress in the proapoptotic action of edelfosine in solid tumor cells*. *Cancer Res*, 2007. **67**(21): p. 10368-78.
45. Nieto-Miguel, T., C. Gajate, and F. Mollinedo, *Differential targets and subcellular localization of antitumor alkyl-lysophospholipid in leukemic versus solid tumor cells*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(21): p. 14833-40.
46. Burgeiro, A., et al., *Edelfosine and perifosine disrupt hepatic mitochondrial oxidative phosphorylation and induce the permeability transition*. *Mitochondrion*, 2012.
47. Gajate, C., et al., *Involvement of mitochondria and caspase-3 in ET-18-OCH<sub>3</sub>-induced apoptosis of human leukemic cells*. *Int J Cancer*, 2000. **86**(2): p. 208-18.
48. Vrablic, A.S., et al., *Altered mitochondrial function and overgeneration of reactive oxygen species precede the induction of apoptosis by 1-O-octadecyl-2-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine in p53-defective hepatocytes*. *FASEB J*, 2001. **15**(10): p. 1739-44.
49. Hanson, P.K., et al., *Lem3p is essential for the uptake and potency of alkylphosphocholine drugs, edelfosine and miltefosine*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(38): p. 36041-50.



50. Zarembeg, V., et al., *Cytotoxicity of an anti-cancer lysophospholipid through selective modification of lipid raft composition*. J Biol Chem, 2005. **280**(45): p. 38047-58.
51. Croft, S.L., K. Seifert, and M. Duchene, *Antiprotozoal activities of phospholipid analogues*. Mol Biochem Parasitol, 2003. **126**(2): p. 165-72.
52. Varela, M.R., et al., *In vitro and in vivo efficacy of ether lipid edelfosine against Leishmania spp. and SbV-resistant parasites*. PLoS Negl Trop Dis, 2012. **6**(4): p. e1612.
53. Lux, H., et al., *Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in Leishmania*. Mol Biochem Parasitol, 2000. **111**(1): p. 1-14.
54. Santa-Rita, R.M., et al., *Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against Leishmania amazonensis*. J Antimicrob Chemother, 2004. **54**(4): p. 704-10.
55. Jha, T.K., et al., *Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis*. N Engl J Med, 1999. **341**(24): p. 1795-800.
56. Murray, H.W., et al., *Advances in leishmaniasis*. Lancet, 2005. **366**(9496): p. 1561-77.
57. Soto, J., et al., *Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis*. Am J Trop Med Hyg, 2008. **78**(2): p. 210-1.
58. Troya, J., et al., *Long term failure of miltefosine in the treatment of refractory visceral leishmaniasis in AIDS patients*. Scand J Infect Dis, 2008. **40**(1): p. 78-80.
59. Sindermann, H., et al., *Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis*. Med Microbiol Immunol, 2004. **193**(4): p. 173-80.
60. Velez, I., et al., *Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis*. Am J Trop Med Hyg, 2010. **83**(2): p. 351-6.
61. Dorlo, T.P., et al., *[Miltefosine: a new remedy for leishmaniasis]*. Ned Tijdschr Geneesk, 2006. **150**(49): p. 2697-701.
62. Jarvis, J.N. and D.N. Lockwood, *Clinical aspects of visceral leishmaniasis in HIV infection*. Curr Opin Infect Dis, 2013. **26**(1): p. 1-9.
63. Perez-Victoria, J.M., et al., *Alkyl-lysophospholipid resistance in multidrug-resistant Leishmania tropica and chemosensitization by a novel P-glycoprotein-like transporter modulator*. Antimicrob Agents Chemother, 2001. **45**(9): p. 2468-74.
64. Perez-Victoria, J.M., et al., *Combination of suboptimal doses of inhibitors targeting different domains of LtrMDR1 efficiently overcomes resistance of Leishmania spp. to Miltefosine by inhibiting drug efflux*. Antimicrob Agents Chemother, 2006. **50**(9): p. 3102-10.
65. Perez-Victoria, J.M., et al., *Sitamaquine overcomes ABC-mediated resistance to miltefosine and antimony in Leishmania*. Antimicrob Agents Chemother, 2011. **55**(8): p. 3838-44.
66. Kondapaka, S.B., et al., *Perifosine, a novel alkylphospholipid, inhibits protein kinase B activation*. Mol Cancer Ther, 2003. **2**(11): p. 1093-103.
67. Vink, S.R., et al., *Phase I and pharmacokinetic study of combined treatment with perifosine and radiation in patients with advanced solid tumours*. Radiother Oncol, 2006. **80**(2): p. 207-13.
68. Ghobrial, I.M., et al., *Clinical and translational studies of a phase II trial of the novel oral Akt inhibitor perifosine in relapsed or relapsed/refractory*

- Waldenstrom's macroglobulinemia*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(3): p. 1033-41.
69. Cabrera-Serra, M.G., B. Valladares, and J.E. Pinero, *In vivo activity of perifosine against Leishmania amazonensis*. Acta Trop, 2008. **108**(1): p. 20-5.
70. Cabrera-Serra, M.G., et al., *In vitro activity of perifosine: a novel alkylphospholipid against the promastigote stage of Leishmania species*. Parasitol Res, 2007. **100**(5): p. 1155-7.
71. Brown, J.R. and K.R. Auger, *Phylogenomics of phosphoinositide lipid kinases: perspectives on the evolution of second messenger signaling and drug discovery*. BMC Evol Biol, 2011. **11**: p. 4.
72. Fabian, M.A., et al., *A small molecule-kinase interaction map for clinical kinase inhibitors*. Nat Biotechnol, 2005. **23**(3): p. 329-36.
73. Canduri, F., et al., *Protein kinases as targets for antiparasitic chemotherapy drugs*. Curr Drug Targets, 2007. **8**(3): p. 389-98.
74. Doerig, C. and L. Meijer, *Antimalarial drug discovery: targeting protein kinases*. Expert Opin Ther Targets, 2007. **11**(3): p. 279-90.
75. Ivens, A.C., et al., *The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major*. Science, 2005. **309**(5733): p. 436-42.
76. Parsons, M., et al., *Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: Leishmania major, Trypanosoma brucei and Trypanosoma cruzi*. BMC Genomics, 2005. **6**: p. 127.
77. Hanks, S.K. and T. Hunter, *Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification*. FASEB J, 1995. **9**(8): p. 576-96.
78. Pearce, L.R., D. Komander, and D.R. Alessi, *The nuts and bolts of AGC protein kinases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(1): p. 9-22.
79. Wullschlegel, S., et al., *How moderate changes in Akt T-loop phosphorylation impact on tumorigenesis and insulin resistance*. Dis Model Mech, 2011. **4**(1): p. 95-103.
80. Yang, J., et al., *Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation*. Mol Cell, 2002. **9**(6): p. 1227-40.
81. Huang, X., et al., *Crystal structure of an inactive Akt2 kinase domain*. Structure, 2003. **11**(1): p. 21-30.
82. Wu, W.I., et al., *Crystal structure of human AKT1 with an allosteric inhibitor reveals a new mode of kinase inhibition*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e12913.
83. Calleja, V., et al., *Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo*. PLoS Biol, 2007. **5**(4): p. e95.
84. Alessi, D.R., et al., *Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-I*. EMBO J, 1996. **15**(23): p. 6541-51.
85. Marte, B.M. and J. Downward, *PKB/Akt: connecting phosphoinositide 3-kinase to cell survival and beyond*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(9): p. 355-8.
86. Wickenden, J.A. and C.J. Watson, *Key signalling nodes in mammary gland development and cancer. Signalling downstream of PI3 kinase in mammary epithelium: a play in 3 Akts*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(2): p. 202.

87. Andjelkovic, M., et al., *Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): p. 5699-704.
88. Polzien, L., et al., *Identification of novel in vivo phosphorylation sites of the human proapoptotic protein BAD: pore-forming activity of BAD is regulated by phosphorylation*. J Biol Chem, 2009. **284**(41): p. 28004-20.
89. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. Cell, 1999. **96**(6): p. 857-68.
90. Cheng, J., et al., *Akt fine-tunes NF-kappaB-dependent gene expression during T cell activation*. J Biol Chem, 2011. **286**(41): p. 36076-85.
91. Thayyullathil, F., et al., *Protein phosphatase 1-dependent dephosphorylation of Akt is the prime signaling event in sphingosine-induced apoptosis in Jurkat cells*. J Cell Biochem, 2011. **112**(4): p. 1138-53.
92. Zhang, Y.Y., T. Liu, and W.T. Meng, *[Correlation of expression of PTEN with AKT phosphorylation level in leukemia cells]*. Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi, 2010. **18**(5): p. 1109-13.
93. Meira, D.D., et al., *Efficient Blockade of Akt signaling is a determinant factor to overcome resistance to Matuzumab*. Mol Cancer, 2011. **10**: p. 151.
94. Brumlik, M.J., et al., *Parasite mitogen-activated protein kinases as drug discovery targets to treat human protozoan pathogens*. J Signal Transduct, 2011. **2011**: p. 971968.
95. Morales, M.A., et al., *Phosphoproteomic analysis of Leishmania donovani pro- and amastigote stages*. Proteomics, 2008. **8**(2): p. 350-63.
96. Saravanan, P., et al., *Mitogen-activated protein kinase 4 of Leishmania parasite as a therapeutic target*. Eur J Med Chem, 2010. **45**(12): p. 5662-70.
97. Wiese, M., *Leishmania MAP kinases--familiar proteins in an unusual context*. Int J Parasitol, 2007. **37**(10): p. 1053-62.
98. Kumari, S., et al., *Leishmania major MAP kinase 10 is protective against experimental L. major infection*. Vaccine, 2011. **29**(48): p. 8783-7.
99. Bahia, D., et al., *The TryPIKinome of five human pathogenic trypanosomatids: Trypanosoma brucei, Trypanosoma cruzi, Leishmania major, Leishmania braziliensis and Leishmania infantum--new tools for designing specific inhibitors*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **390**(3): p. 963-70.
100. Pratt, W.B. and D.O. Toft, *Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery*. Exp Biol Med (Maywood), 2003. **228**(2): p. 111-33.
101. Hendrick, J.P. and F.U. Hartl, *Molecular chaperone functions of heat-shock proteins*. Annu Rev Biochem, 1993. **62**: p. 349-84.
102. Fink, A.L., *Chaperone-mediated protein folding*. Physiol Rev, 1999. **79**(2): p. 425-49.
103. Parsell, D.A. and S. Lindquist, *The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins*. Annu Rev Genet, 1993. **27**: p. 437-96.
104. Wang, R.E., *Targeting heat shock proteins 70/90 and proteasome for cancer therapy*. Curr Med Chem, 2011. **18**(27): p. 4250-64.

105. Calderwood, S.K., A. Murshid, and T. Prince, *The shock of aging: molecular chaperones and the heat shock response in longevity and aging--a mini-review*. Gerontology, 2009. **55**(5): p. 550-8.
106. Hemmingsen, S.M., et al., *Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly*. Nature, 1988. **333**(6171): p. 330-4.
107. Wang, S.A., et al., *Heat shock protein 90 is important for Sp1 stability during mitosis*. J Mol Biol, 2009. **387**(5): p. 1106-19.
108. Helmbrecht, K., E. Zeise, and L. Rensing, *Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review*. Cell Prolif, 2000. **33**(6): p. 341-65.
109. Hartl, F.U., *Molecular chaperones in cellular protein folding*. Nature, 1996. **381**(6583): p. 571-9.
110. Hartl, F.U. and M. Hayer-Hartl, *Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein*. Science, 2002. **295**(5561): p. 1852-8.
111. Frydman, J., *Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones*. Annu Rev Biochem, 2001. **70**: p. 603-47.
112. Bai, L., et al., *Blocking NF-kappaB and Akt by Hsp90 inhibition sensitizes Smac mimetic compound 3-induced extrinsic apoptosis pathway and results in synergistic cancer cell death*. Apoptosis, 2011. **16**(1): p. 45-54.
113. Redlak, M.J. and T.A. Miller, *Targeting PI3K/Akt/HSP90 signaling sensitizes gastric cancer cells to deoxycholate-induced apoptosis*. Dig Dis Sci, 2011. **56**(2): p. 323-9.
114. Barksdale, K.A. and G.N. Bijur, *The basal flux of Akt in the mitochondria is mediated by heat shock protein 90*. J Neurochem, 2009. **108**(5): p. 1289-99.
115. Brandau, S., A. Dresel, and J. Clos, *High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus Leishmania*. Biochem J, 1995. **310** ( Pt 1): p. 225-32.
116. Csermely, P., et al., *The 90-kDa molecular chaperone family: structure, function, and clinical applications. A comprehensive review*. Pharmacol Ther, 1998. **79**(2): p. 129-68.
117. Miyata, Y., H. Nakamoto, and L. Neckers, *The Therapeutic Target Hsp90 and Cancer Hallmarks*. Curr Pharm Des, 2012.
118. Soga, S., S. Akinaga, and Y. Shiotsu, *Hsp90 inhibitors as anti-cancer agents, from basic discoveries to clinical development*. Curr Pharm Des, 2012.
119. Wiesgigl, M. and J. Clos, *Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in Leishmania donovani*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(11): p. 3307-16.
120. Kumar, A., et al., *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**(4): p. 609-17.
121. Hubel, A. and J. Clos, *The genomic organization of the HSP83 gene locus is conserved in three Leishmania species*. Exp Parasitol, 1996. **82**(2): p. 225-8.
122. Angel, S.O., et al., *During canine leishmaniasis a protein belonging to the 83-kDa heat-shock protein family elicits a strong humoral response*. Acta Trop, 1996. **62**(1): p. 45-56.

123. Aly, R., et al., *A regulatory role for the 5' and 3' untranslated regions in differential expression of hsp83 in Leishmania*. Nucleic Acids Res, 1994. **22**(15): p. 2922-9.
124. Argaman, M., R. Aly, and M. Shapira, *Expression of heat shock protein 83 in Leishmania is regulated post-transcriptionally*. Mol Biochem Parasitol, 1994. **64**(1): p. 95-110.
125. Zilka, A., et al., *Developmental regulation of heat shock protein 83 in Leishmania. 3' processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation is directed by a determinant in the 3'-untranslated region*. J Biol Chem, 2001. **276**(51): p. 47922-9.
126. Larreta, R., et al., *The expression of HSP83 genes in Leishmania infantum is affected by temperature and by stage-differentiation and is regulated at the levels of mRNA stability and translation*. BMC Mol Biol, 2004. **5**: p. 3.
127. Larreta, R., et al., *Leishmania infantum: gene cloning of the GRP94 homologue, its expression as recombinant protein, and analysis of antigenicity*. Exp Parasitol, 2000. **96**(2): p. 108-15.
128. Rico, A.I., et al., *The heat shock proteins, Hsp70 and Hsp83, of Leishmania infantum are mitogens for mouse B cells*. Cell Stress Chaperones, 2002. **7**(4): p. 339-46.
129. Neckers, L., *Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents*. Trends Mol Med, 2002. **8**(4 Suppl): p. S55-61.
130. Pacey, S., et al., *Hsp90 inhibitors in the clinic*. Handb Exp Pharmacol, 2006(172): p. 331-58.
131. Whitesell, L. and S.L. Lindquist, *HSP90 and the chaperoning of cancer*. Nat Rev Cancer, 2005. **5**(10): p. 761-72.
132. An, W.G., T.W. Schulte, and L.M. Neckers, *The heat shock protein 90 antagonist geldanamycin alters chaperone association with p210bcr-abl and v-src proteins before their degradation by the proteasome*. Cell Growth Differ, 2000. **11**(7): p. 355-60.
133. Blagosklonny, M.V., et al., *The Hsp90 inhibitor geldanamycin selectively sensitizes Bcr-Abl-expressing leukemia cells to cytotoxic chemotherapy*. Leukemia, 2001. **15**(10): p. 1537-43.
134. George, P., et al., *Combination of the histone deacetylase inhibitor LBH589 and the hsp90 inhibitor 17-AAG is highly active against human CML-BC cells and AML cells with activating mutation of FLT-3*. Blood, 2005. **105**(4): p. 1768-76.

# HIPÓTESIS

La leishmaniosis es un conjunto de enfermedades que no ha podido ser controlada de forma definitiva siendo la farmacoterapia la única posibilidad para el tratamiento sistémico. Sin embargo, no se dispone en la actualidad de múltiples alternativas farmacológicas y las existentes tienen problemas de resistencia, altos costos, eficacia variable entre especies y efectos adversos graves. Por lo tanto, es necesario buscar nuevos fármacos anti-*Leishmania*, como alternativa a los medicamentos disponibles. Una de las nuevas estrategias que ha sido incluida recientemente en el tratamiento de la leishmaniosis incluye el compuesto denominado miltefosina, un compuesto que pertenece a la familia de moléculas lipídicas conocida como análogos alquil-lisofosfolípidos (ALPs) que muestran actividades antitumorales. El éter lipídico edelfosina se considera como el prototipo de los ALPs, ya que presenta una actividad antitumoral superior a otros ALPs estudiados, a través de su capacidad de inhibir la ruta de supervivencia AKT y de inducir apoptosis en la célula tumoral. De esta forma, en este trabajo se evalúa la eficacia de la edelfosina como agente anti-*Leishmania*, y se compara con la actividad leishmanicida de miltefosina y otros ALPs. Así mismo, y tomando como base la acción de la edelfosina sobre rutas de señalización, se estudia la posible expresión en *Leishmania* de un gen que pueda transcribir una proteína con características similares a la AKT humana, como una potencial diana terapéutica. Además, dado que la proteína chaperona HSP90 estabiliza varias proteínas de supervivencia, entre ellas AKT, nuestra hipótesis de trabajo implica que la inhibición de la ruta de supervivencia de AKT, así como la de las moléculas chaperona HSP90, puede constituir una nueva terapia antiparasitaria y favorecer la acción de edelfosina en una terapia combinada con 17-AAG.

# OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, los objetivos específicos de esta tesis doctoral son:

1. Estudiar la actividad anti-*Leishmania* de la edelfosina *in vitro*, y su comparación con otros análogos alquil-lisofosfolípidos (ALPs) (miltefosina, perifosina, erucilfosfocolina). Determinando el papel del óxido nítrico en macrófagos infectados y tratados con la edelfosina.
2. Analizar la actividad anti-*Leishmania* de la edelfosina *in vivo* en modelos animales de ratón y hámster.
3. Evaluar el tiempo de la generación de resistencia a edelfosina, comparándolo con la resistencia generada por miltefosina.
4. Estudiar la actividad anti-*Leishmania* de la edelfosina sobre cepas resistentes a SbV en el modelo de hámster.
5. Demostrar la presencia de un gen de supervivencia *akt-like* en *Leishmania spp.*
6. Determinar el efecto antiparasitario de la edelfosina, durante una “terapia” combinada *in vitro* con un inhibidor de chaperona HSP90.

## **6. ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN**

### **1- *In Vitro* and *In Vivo* Efficacy of Ether Lipid Edelfosine against *Leishmania* spp. and SbV-Resistant Parasites.**

Rubén E. Varela-M, Janny A. Villa-Pulgarin, Edward Yepes, Ingrid Müller, Manuel Modolell, Diana L. Muñoz, Sara M. Robledo, Carlos E. Muskus, Julio López-Abán, Antonio Muro, Iván D. Vélez, Faustino Mollinedo. Publicado en: **PLoS Neglected Tropical Disease, 2012.**

### **2- Presence of a *Rac/Akt*-like gene in *Leishmania* parasites as a putative stress response protein and therapeutic target in leishmaniasis.**

Rubén E. Varela-M, Rodrigo Ochoa, Carlos E. Muskus, Antonio Muro, Faustino Mollinedo. Enviado a la revista: **PLoS Neglected Tropical Disease, MS # PNTD-D-12-01551, 2012.**

### **3- The HSP90 inhibitor 17-AAG potentiates the antileishmanial activity of the ether lipid edelfosine.**

Rubén E. Varela-M, Antonio Muro, and Faustino Mollinedo. Enviado a la revista: **Acta Tropica: Ref. No.: ACTROP-D-12-00506**



## 6.1 ARTÍCULO 1.

### ***In Vitro* and *In Vivo* Efficacy of Ether Lipid Edelfosine against *Leishmania* spp. and SbV-Resistant Parasites**

Varela-M RE, Villa-Pulgarin JA, Yepes E, Müller I, Modolell M, Muñoz DL, Robledo SM, Muskus CE, López-Abán J, Muro A, Vélez ID, Mollinedo F.

PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(4):e1612. doi: 10.1371/journal.pntd.0001612. Epub 2012 Apr 10.

En este artículo, demostramos que la edelfosina es el más potente de los ALPs para matar diferentes especies de *Leishmania* spp. Usando diferentes metodologías tanto *in vitro* como *in vivo*, hemos observado el potencial efecto terapéutico de este compuesto en comparación con otros ALPs, incluyendo a la miltefosina, compuesto disponible en algunos países para el tratamiento de las formas viscerales, cutáneas y mucocutáneas de la enfermedad. La miltefosina clínicamente ha mostrado diferentes índices de curación y riesgo de generar resistencia a corto plazo. Sin embargo, la edelfosina tiene mayor eficacia en este estudio, retrasando el tiempo de aparición de resistencia *in vitro*. En nuestro trabajo, este compuesto ocasiona la muerte del parásito por apoptosis-like; inhibiendo la proliferación celular a dosis bajas. Se ha observado también que atraviesa la membrana del macrófago y se deposita en el interior de los amastigotes, ocasionando disminución significativa de la carga parasitaria, sin intervención del óxido nítrico del macrófago. Estudios *in vivo* han demostrado la eficacia de edelfosina tanto en el modelo experimental murino como en el hámster, reduciendo en ambos la carga parasitaria en los animales tratados. Este efecto antiparasitario ha sido comprobado también cuando los animales se infectaron con cepas resistentes al SbV. Teniendo en cuenta nuestro estudio podemos generar la siguiente escala de actividad anti-*Leishmania*: edelfosina>perifosina>miltefosina>erucilfosfocolina. Nuestros resultados indican que la edelfosina es una buena alternativa para el tratamiento de la leishmaniosis y que podría utilizarse en ensayos clínicos en humanos, sobre todo en países donde existe resistencia a los antimoniales.

# *In Vitro* and *In Vivo* Efficacy of Ether Lipid Edelfosine against *Leishmania* spp. and SbV-Resistant Parasites

Rubén E. Varela-M<sup>1,2,3</sup>, Janny A. Villa-Pulgarin<sup>1,2,3</sup>, Edward Yepes<sup>2,3</sup>, Ingrid Müller<sup>4</sup>, Manuel Modolell<sup>5</sup>, Diana L. Muñoz<sup>6</sup>, Sara M. Robledo<sup>6</sup>, Carlos E. Muskus<sup>6</sup>, Julio López-Abán<sup>3</sup>, Antonio Muro<sup>3</sup>, Iván D. Vélez<sup>6</sup>, Faustino Mollinedo<sup>1\*</sup>

**1** Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, Spain, **2** APOINTECH, Centro Hispano-Luso de Investigaciones Agrarias, Parque Científico de la Universidad de Salamanca, Villamayor, Salamanca, Spain, **3** Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular, CIETUS, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, Spain, **4** Department of Medicine, Section of Immunology, St. Mary's Campus, Imperial College London, London, United Kingdom, **5** Department of Cellular Immunology, Max-Planck-Institut für Immunbiologie, Freiburg, Germany, **6** Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

## Abstract

**Background:** The leishmaniasis are a complex of neglected tropical diseases caused by more than 20 *Leishmania* parasite species, for which available therapeutic arsenal is scarce and unsatisfactory. Pentavalent antimonials (SbV) are currently the first-line pharmacologic therapy for leishmaniasis worldwide, but resistance to these compounds is increasingly reported. Alkyl-lysophospholipid analogs (ALPs) constitute a family of compounds with antileishmanial activity, and one of its members, miltefosine, has been approved as the first oral treatment for visceral and cutaneous leishmaniasis. However, its clinical use can be challenged by less impressive efficiency in patients infected with some *Leishmania* species, including *L. braziliensis* and *L. mexicana*, and by proneness to develop drug resistance *in vitro*.

**Methodology/Principal Findings:** We found that ALPs ranked edelfosine > perifosine > miltefosine > erucylphosphocholine for their antileishmanial activity and capacity to promote apoptosis-like parasitic cell death in promastigote and amastigote forms of distinct *Leishmania* spp., as assessed by proliferation and flow cytometry assays. Effective antileishmanial ALP concentrations were dependent on both the parasite species and their development stage. Edelfosine accumulated in and killed intracellular *Leishmania* parasites within macrophages. *In vivo* antileishmanial activity was demonstrated following oral treatment with edelfosine of mice and hamsters infected with *L. major*, *L. panamensis* or *L. braziliensis*, without any significant side-effect. Edelfosine also killed SbV-resistant *Leishmania* parasites in *in vitro* and *in vivo* assays, and required longer incubation times than miltefosine to generate drug resistance.

**Conclusions/Significance:** Our data reveal that edelfosine is the most potent ALP in killing different *Leishmania* spp., and it is less prone to lead to drug resistance development than miltefosine. Edelfosine is effective in killing *Leishmania* in culture and within macrophages, as well as in animal models infected with different *Leishmania* spp. and SbV-resistant parasites. Our results indicate that edelfosine is a promising orally administered antileishmanial drug for clinical evaluation.

**Citation:** Varela-M RE, Villa-Pulgarin JA, Yepes E, Müller I, Modolell M, et al. (2012) *In Vitro* and *In Vivo* Efficacy of Ether Lipid Edelfosine against *Leishmania* spp. and SbV-Resistant Parasites. PLoS Negl Trop Dis 6(4): e1612. doi:10.1371/journal.pntd.0001612

**Editor:** Jayne Raper, New York University School of Medicine, United States of America

**Received:** November 7, 2011; **Accepted:** February 27, 2012; **Published:** April 10, 2012

**Copyright:** © 2012 Varela-M et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2008-02251; SAF2011-30518; RD06/0020/1037 from Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer, Instituto de Salud Carlos III, cofunded by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional of the European Union; and TRA2009-0275), European Community's Seventh Framework Programme FP7-2007-2013 (grant HEALTH-F2-2011-256986), Junta de Castilla y León (CSI052A11-2; GR15-Experimental Therapeutics and Translational Oncology Program) and Spain-UK International Joint Project grant from The Royal Society-CSIC (2004GB0032). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** FM is co-founder of Apointech and a member of its scientific advisory board. REV, JAVP and EY are employees of Apointech. The other authors disclose no potential conflicts of interest.

\* E-mail: fmollin@usal.es

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

The impact of the leishmaniasis on human health has been grossly underestimated for many years, and this complex of diseases has been classified by the World Health Organization (WHO) as one of the most neglected tropical diseases [1]. During the last decade, endemic areas have been spreading and a sharp increase in the number of leishmaniasis cases has been recorded. The WHO classifies leishmaniasis as a category 1 disease

(“emerging and uncontrolled”), and there is an urgent need to develop new therapeutic drugs and approaches. Currently, about 350 million people in 98 countries around the world are at risk, and an estimated 12 million people are infected [1]. Despite progress in the diagnosis and treatment, leishmaniasis remains a major public health problem, particularly in tropical and sub-tropical developing countries. Published figures indicate an estimated incidence of two million new cases per year, with 1.5 million cases of self-healing, but disfiguring, cutaneous leishman-

### Author Summary

Leishmaniasis represents a major international health problem, has a high morbidity and mortality rate, and is classified as an emerging and uncontrolled disease by the World Health Organization. The migration of population from endemic to nonendemic areas, and tourist activities in endemic regions are spreading the disease to new areas. Unfortunately, treatment of leishmaniasis is far from satisfactory, with only a few drugs available that show significant side-effects. Here, we show *in vitro* and *in vivo* evidence for the antileishmanial activity of the ether phospholipid edelfosine, being effective against a wide number of *Leishmania* spp. causing cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis. Our experimental mouse and hamster models demonstrated not only a significant antileishmanial activity of edelfosine oral administration against different wild-type *Leishmania* spp., but also against parasites resistant to pentavalent antimonials, which constitute the first line of treatment worldwide. In addition, edelfosine exerted a higher antileishmanial activity and a lower proneness to generate drug resistance than miltefosine, the first drug against leishmaniasis that can be administered orally. These data, together with our previous findings, showing an anti-inflammatory action and a very low toxicity profile, suggest that edelfosine is a promising orally administered drug for leishmaniasis, thus warranting clinical evaluation.

iasis, and 500,000 cases of life-threatening visceral leishmaniasis [1,2]. Approximately 60,000 people die from visceral leishmaniasis each year, a rate surpassed among parasitic diseases only by malaria; and a loss of about 2.4 million disability-adjusted life years (DALYs) throughout the world has been calculated as the total disease burden of leishmaniasis [1–3]. Furthermore, a number of reports have emphasized the increasing importance of visceral leishmaniasis as an opportunistic infection among HIV-positive patients in areas where both infections are endemic [4].

The chemotherapy currently available for the leishmaniasis is far from satisfactory and presents several problems, including toxicity, many adverse side-effects, high costs and development of drug resistance [2,5]. Two pentavalent antimonial (SbV) compounds, sodium stibogluconate (Pentostam) and meglumine antimoniate (Glucantime), were first introduced in the 1940's and have since been used as first-line chemotherapeutic agents against all forms of leishmaniasis through parenteral administration. Although SbV, administered by intramuscular or intravenous route, remains the first-line drug for the treatment of leishmaniasis worldwide, its efficacy is becoming increasingly lower [6], and highly depends on *Leishmania* species and distinct endemic regional variations, even within the same country. Resistance is now common in India, and rates of resistance have been shown to be higher than 60% in parts of the state of Bihar, in north-east India [7,8]. In addition, the incidence of adverse effects, including myalgia, arthralgias, pancreatitis, nephrotoxicity, hepatotoxicity, and cardiotoxicity [1,2,9], makes the search for new alternative medicines to SbV an urgent issue, and a number of drugs are now in clinical trials [10]. Intravenous infusion of liposomal amphotericin B (AmBisome) is at present the most effective anti-*Leishmania* drug [2,11], but its relatively high cost makes it unaffordable in several poor areas of the world where the disease is more prevalent [2]. In addition, the requirement for long periods of parenteral administration, frequently requiring hospitalization, has also limited the clinical use of amphotericin B.

Miltefosine (Impavido) is a new oral agent that has shown high cure rates in visceral leishmaniasis in India (*L. donovani*; 94% cure) [12], and in cutaneous leishmaniasis in Colombia (*L. panamensis*; >90% cure) [13]. However, a recent therapeutic trial has revealed a limited potential of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis, with an unsatisfactory cure rate of 69.8% in Colombia [14]. Furthermore, this percentage fell to 49% when miltefosine was administered to patients with lesions caused by *L. braziliensis*, which comprise more than 60% of cutaneous leishmaniasis in Colombia [14]. Additional recent clinical trials in Brazil showed a cure rate of miltefosine for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis* of 75% [15], and for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *L. guyanensis* of 71% [16]. Miltefosine treatment also led to approximately 70% cure rate for mucosal leishmaniasis due to *L. braziliensis* in Bolivia [17,18]. Moreover, the miltefosine cure rate was approximately 53% for cutaneous leishmaniasis (33% for *L. braziliensis* infection, and 60% for *L. mexicana* infection) in Guatemala [13,19,20], and a cure rate of 63% was reported for *L. tropica* in Afghanistan [20]. These figures contrast with cure rates of more than 82% in the treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) in India [21,22] and Bangladesh [23]. These data point out the great variability in the outcome depending on the geographical area for reasons that are not well understood. In addition, miltefosine commonly induces gastrointestinal side-effects, such as anorexia, nausea, vomiting and diarrhea, that sometimes lead to drop out from treatment [1,2,22]. Miltefosine is potentially teratogenic and should not be administered to pregnant women [1,2], for whom adequate contraception should be guaranteed during treatment and for up to 3 months afterwards [1], given the teratogenic potential of miltefosine in animal models [24]. An additional concern is the rapid *in vitro* generation of resistance to miltefosine [25–27] that could limit its clinical use. Thus, these studies reinforce the need to search for new therapeutic alternatives in the treatment of leishmaniasis.

Edelfosine (1-*O*-octadecyl-2-*O*-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine, ET-18-OCH<sub>3</sub>) is a promising antitumor ether lipid drug [28–30], which is not mutagenic and acts by activating apoptosis through its interaction with cell membranes [31–34]. In addition to its antitumor activity, edelfosine has been shown to exert *in vitro* antiparasitic activity against different species of *Leishmania* parasites [35–37]. Edelfosine has been considered the prototype molecule of a rather heterogeneous family of synthetic compounds collectively known as alkyl-lysophospholipid analogs (ALPs), that comprise the above clinically relevant miltefosine as well as perifosine, which also shows anti-*Leishmania* activity [38,39]. Although the mechanism of action of miltefosine against *Leishmania* parasites remains to be fully elucidated, there are some reports showing that the ability of this compound to promote an apoptosis-like cell death is critical for its leishmanicidal activity [40,41]. Because edelfosine has been shown to have a higher proapoptotic activity than both miltefosine and perifosine in human cancer cells [29,30,33], we have carried out here a comprehensive *in vitro* and *in vivo* study, investigating the putative anti-*Leishmania* traits of edelfosine, as compared to other ALPs, using different *Leishmania* species as well as mouse and hamster experimental models.

## Materials and Methods

### Ethics statement

Animal procedures in this study complied with the Spanish (Real Decreto RD1201/05) and the European Union (European Directive 2010/63/EU) guidelines on animal experimentation for the protection and humane use of laboratory animals, and were

conducted at the accredited Animal Experimentation Facility (Servicio de Experimentación Animal) of the University of Salamanca (Register number: PAE/SA/001). Procedures were approved by the Ethics Committee of the University of Salamanca (protocol approval number 48531).

### Drugs

Edelfosine (1-*O*-octadecyl-2-*O*-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine) was from INKEYSA (Barcelona, Spain) and Apointech (Salamanca, Spain). Miltefosine (hexadecylphosphocholine) was from Calbiochem (Cambridge, MA). Perifosine (octadecyl-(1,1-dimethyl-piperidinio-4-yl)-phosphate) and erucylphosphocholine ((13Z)-docos-13-en-1-yl 2-(trimethylammonio)ethyl phosphate) were from Zentaris (Frankfurt, Germany). Stock sterile solutions of the distinct ALPs (2 mM) were prepared in RPMI-1640 culture medium (Invitrogen, Carlsbad, CA), supplemented with 10% (*v/v*) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) as previously described [28].

### *Leishmania* cells and culture conditions

The following *Leishmania* strains were used in this study: *L. amazonensis* (MHOM/Br/73/LV78), *L. braziliensis* (MHOM/CO/88/UA301), *L. donovani* (MHOM/IN/80/DD8), *L. infantum* (MCAN/ES/96/BCN150), *L. major* LV39 (MRHO/SU/59/P), *L. mexicana* (MHOM/MX/95/NAN1), and *L. panamensis* (MHOM/CO/87/UA140).

*Leishmania* promastigotes were grown in RPMI-1640 culture medium, supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin at 26°C. Promastigotes were treated with the indicated compounds during their logarithmic growth phase ( $1.5 \times 10^6$  parasites/ml) at 26°C. Late stationary promastigotes were obtained after incubation of the parasites for 5–6 days with starting inocula of  $1 \times 10^6$  parasites/ml. *Leishmania* axenic amastigotes were obtained at pH 5.0 in Schneider's culture medium following a stepped temperature increase to 30, 31 and 32°C, except for *L. infantum* amastigotes, which were exposed to 34, 36 and 37°C, as previously described [42].

### Growth inhibition assay

The antileishmanial activity in promastigotes and axenic amastigotes was determined by using the XTT (sodium 3,3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) cell proliferation kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) as previously described [42,43]. Cells were resuspended in FBS-containing RPMI-1640 culture medium ( $1.5 \times 10^6$  cells/ml for promastigotes, and  $2 \times 10^6$  cells/ml for axenic amastigotes), and plated (100 µl/well) in 96-well flat-bottomed microtiter plates at 26°C, in the absence and in the presence of different concentrations of the indicated ALPs. After 72-h incubation at 26°C, IC<sub>50</sub> (half-maximal inhibitory concentration) values, defined as the drug concentration causing 50% inhibition in cell proliferation with respect to untreated controls, were determined for each compound. Measurements were done in triplicate, and each experiment was repeated four times.

### Analysis of apoptosis-like cell death by flow cytometry

One and a half million *Leishmania* spp. promastigotes or axenic amastigotes were treated in the absence and in the presence of the indicated concentrations of ALPs for different incubation times. Then, parasites were pelleted by centrifugation ( $1000 \times g$ ) for 5 min,

and analyzed for apoptosis-like DNA breakdown by flow cytometry following a protocol previously described [44]. Quantitation of apoptotic-like cells was monitored as the percentage of cells in the sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> region (hypodiploidy) in cell cycle analysis [44,45], using a fluorescence-activated cell sorting (FACS) Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) equipped with a 488 nm argon laser. WinMDI 2.8 software was used for data analysis.

### Intracellular distribution of fluorescent edelfosine analog in *L. panamensis*-infected J774 macrophages

The mouse macrophage-like cell line J774, grown in RPMI-1640 culture medium, supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin, at 37°C in humidified 95% air and 5% CO<sub>2</sub>, was infected overnight at the exponential growth phase ( $3 \times 10^5$  cells/ml) with stationary-phase *L. panamensis* promastigotes, at a macropage/promastigote ratio of 1/10 in complete RPMI-1640 culture medium. Non-internalized promastigotes were removed by 2–3 successive washes with PBS. Then, uninfected and *L. panamensis*-infected J774 macrophages were incubated for 1 h with 10 µM of the fluorescent edelfosine analog all-(E)-1-*O*-(15'-phenylpentadeca-8',10',12',14'-tetraenyl)-2-*O*-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine (PTE-ET) [34,46,47] (kindly provided by F. Amat-Guerri and A.U. Acuña, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, Spain) in complete RPMI-1640 culture medium. In addition, J774 cells were also incubated first with 10 µM PTE-ET for 1 h, then washed with PBS and infected with *L. panamensis* in the darkness for 6 h. Samples were fixed with 1% formaldehyde, and analyzed with a Zeiss Axioplan 2 fluorescence microscope (Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Germany) (40× magnification).

### Assessment of intracellular parasitic load in macrophage-like cells

J774 cells were infected with *L. panamensis* promastigotes as above. The number of intracellular viable parasites was assessed by incubating infected cells with RPMI-1640 medium containing 0.008% SDS to gently disrupt macrophage plasma membrane, followed by addition of RPMI-1640 culture medium containing 20% FBS to stop further lysis. Samples were then sequentially diluted in 96-well plates containing biphasic Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) medium. Plates were incubated at 26°C for 20 days, and examined weekly under an inverted Nikon TS-100 microscope (Nikon, Kanagawa, Japan) to evaluate the presence of viable motile promastigotes. The reciprocal of the highest dilution found positive for parasite growth was considered to be the concentration of parasites.

### Determination of nitric oxide (NO) by the nitrite assay

Macrophage-like J774 cells were plated in complete RPMI-1640 culture medium at a concentration of  $1 \times 10^6$  cells/well in 24-well culture plates (Costar, Cambridge, MA), and let them adhere for 2 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Non-adhering cells were removed by gentle washing with complete RPMI-1640 culture medium. Adherent J774 cells were incubated in the absence (negative control), or in the presence of 10 µg/ml lipopolysaccharide (Sigma, St. Louis, MO) (LPS; positive control) or of different concentrations of edelfosine. After 18-h incubation at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>, supernatants were collected, centrifuged at  $500 \times g$  for 10 min, and stored at –80°C until analysis. NO release was indirectly measured using a colorimetric assay based on the Griess reaction. Triplicate 100-µl aliquots of cell culture supernatants were incubated with 50 µl of freshly prepared Griess reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamide dihydrochloride,

and 2.5% orthophosphoric acid) for 15 min at room temperature, and then absorbance of the azo-chromophore was measured at 550 nm. Nitrite concentration was determined by using sodium nitrite as a standard. All samples were assayed against a blank comprising complete RPMI-1640 culture medium incubated for 18 h on the same plates as the samples, but in the absence of cells. All reagents were purchased from Sigma. Results were expressed in nanomoles of nitrite per  $10^6$  macrophages.

### Evaluation of antileishmanial activity in mouse and hamster models

Six-week-old female BALB/c mice (18–20 g) and four-week-old male Syrian golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) (about 120 g) (Charles River Laboratories, Lyon, France), kept in a pathogen-free facility and handled according to institutional guidelines, complying with the Spanish legislation under a 12/12-h light/dark cycle at a temperature of 22°C, received a standard diet and water *ad libitum*. Mice were inoculated *s.c.* into their left hind footpad (in a total volume of 50  $\mu$ l PBS) with  $2 \times 10^6$  infective stationary-phase promastigotes, whereas hamsters, previously anesthetized with inhaled Forane, were inoculated intradermally in the nose with  $1 \times 10^6$  stationary-phase promastigotes in a volume of 50  $\mu$ l PBS. When inflammation was evident (about 1 week in mice, and 6 weeks in hamsters, after inoculation), animals were randomly assigned into cohorts of 7 animals each, receiving a daily oral administration (through a feeding needle) of edelfosine (15 mg/kg for mice, and 26 mg/kg for hamsters, in water), or an equal volume of vehicle (water). In mice, the footpad thickness was measured with calipers every week, and compared with the uninfected right hind footpad to obtain the net increase in footpad swelling. In hamsters, nose swelling was measured with calipers every week, and compared with the nose size before inoculation and treatment. Evolution index of the lesion was calculated as size of the lesion during treatment (mm)/size of the lesion before treatment. Animal body weight and any sign of morbidity were monitored. Drug treatment lasted for 28 days, and animals were killed following institutional guidelines, 24 h after the last drug administration.

After the killing of the animals, the parasite burden in the infected tissues was determined by limiting dilution assays as previously described [48]. Biopsies were washed 3 times with PBS supplemented with 100 units/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin (GIBCO-BRL), and then incubated overnight (12 h) at 4°C with PBS containing 100 units/ml of penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin. Following overnight incubation, biopsies were washed 2–3 times with PBS supplemented with the above antibiotics, and then a weighed piece of the infected area was homogenized in 1 ml PBS containing antibiotics using a sterile glass Potter-Elvehjem type tissue grinder. Homogenate was diluted at a final concentration of 0.1 mg/ml in Schneider's culture medium, containing 100 units/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml streptomycin; and then serial dilutions were made in triplicate in 96-well plates containing biphasic Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) medium. Plates were incubated at 26°C for 20 days, and examined weekly under an inverted Nikon TS-100 microscope to evaluate the presence of viable promastigotes. The reciprocal of the highest dilution found positive for parasite growth was considered to be the concentration of parasites per mg of tissue. Total parasite load was calculated using the total weight of the respective infected organ.

### Induction of *in vitro* resistance to Glucantime in *L. panamensis* promastigotes

Parasites cultured in Schneider's culture medium supplemented with 10% FBS, 100 units/ml penicillin, and 100  $\mu$ g/ml strepto-

mycin at 26°C for 5 days, were washed twice with PBS, and centrifuged at  $1000 \times g$  for 10 min at room temperature. Parasites were then resuspended at  $2 \times 10^6$  promastigotes/ml in Schneider's culture medium, and incubated at 26°C for 5 days with 4 mg/ml Glucantime (Aventis Pharma, Sao Paulo, Brazil), which corresponded to its  $IC_{50}$  value, previously assessed by the XTT technique. Drug-containing culture medium was changed every 4–6 days, depending on parasite growth, and parasites were washed with PBS, analyzed by XTT assay, and resuspended again at  $2 \times 10^6$  parasites/ml. This procedure was repeated until parasite viability in the presence of the drug was over 80%. Then, after achieving this viability rate, this process was repeated three times, with increasing concentrations of SbV, up to reaching a final concentration of 37 mg/ml. The volume of drug solution used in each passage was controlled not to exceed 10% of the total volume of culture medium.

### Assessment of *L. panamensis* resistance to SbV in the hamster animal model

The level of SbV resistance was further assessed by infection of golden hamsters with the above *in vitro*-generated SbV-resistant (SbV-R) *L. panamensis* parasites, growing in the presence of 37 mg/ml SbV, as well as with wild-type susceptible *L. panamensis*, followed by treatment with Glucantime. Hamsters were divided into two groups, eight animals infected with the resistant strain and eight animals infected with the susceptible strain. Each group was inoculated intradermally on the nose with  $1 \times 10^6$  stationary-phase promastigotes in a volume of 50  $\mu$ l PBS. These animals were previously anesthetized with ketamine (50 mg/ml) and xylazine (5 mg/kg) intraperitoneally. About six weeks after infection, lesions were evident in both animal groups, and animals were treated daily with 40 mg/kg Glucantime, intramuscularly using a 27-gauge needle, for ten days. Evolution of the lesions and drug efficacy were monitored as above.

### Induction of *in vitro* resistance to ALPs in different *Leishmania* species

ALP-resistant *Leishmania* strains were generated as indicated above for SbV-resistant parasites. Drugs were initially incubated at their corresponding  $IC_{50}$  values, and then drug concentration was gradually increased. Parasites were considered resistant when they could grow at a drug concentration of 30  $\mu$ M.

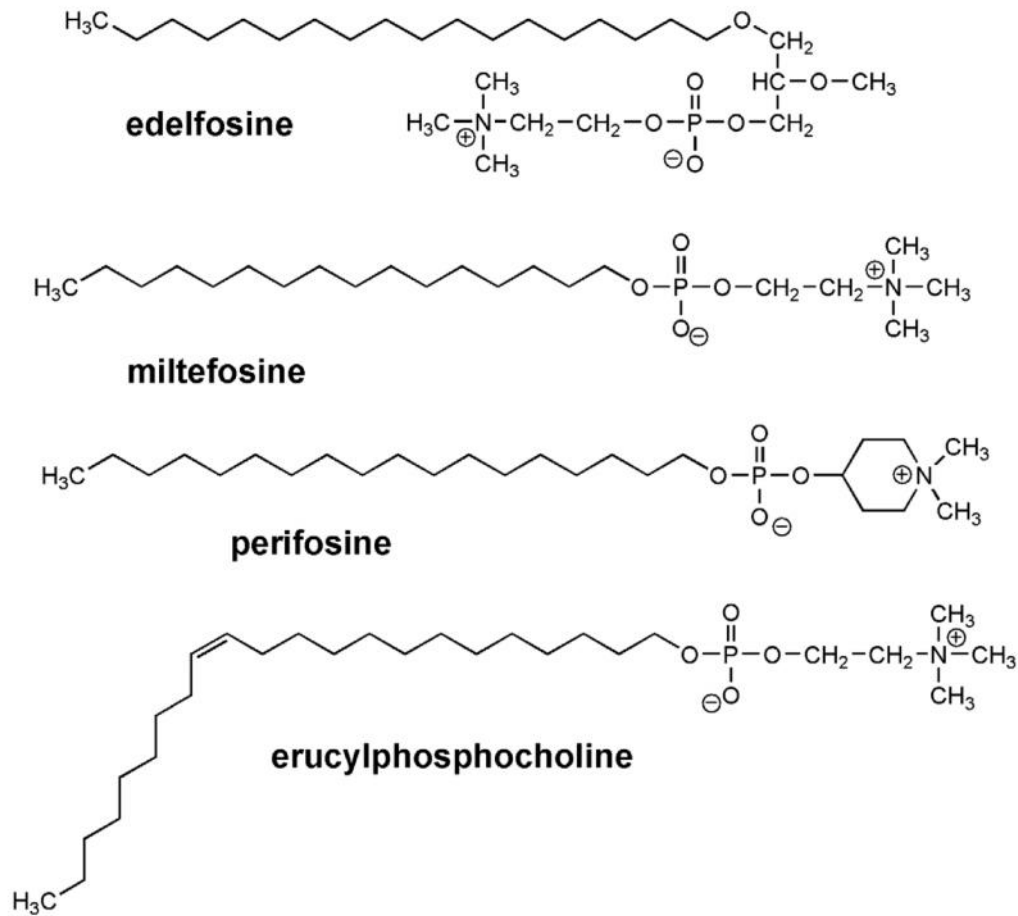
### Statistical analysis

Data are shown as mean  $\pm$  SD. Between-group statistical differences were assessed using the Mann-Whitney or the Student's *t* test. A *P*-value of  $<0.05$  was considered statistically significant.

## Results

### ALPs differentially inhibit the proliferation of *Leishmania* spp. promastigotes

We analyzed the antileishmanial potential of the four most clinically relevant ALPs, namely edelfosine, miltefosine, perifosine and erucylphosphocholine (Figure 1). By using the XTT assay, we found that edelfosine and perifosine were the most active ALPs inhibiting proliferation of distinct *Leishmania* spp. promastigotes with  $IC_{50}$  values in the range of low micromolar concentration ( $\sim 2$ – $9 \mu$ M) in most cases (*L. donovani*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. major*, *L. amazonensis*) (Table 1). *L. braziliensis* and *L. infantum* promastigotes were more resistant to the action of edelfosine, perifosine and miltefosine than the other *Leishmania* species tested



**Figure 1. Chemical structures of edelfosine, miltefosine, perifosine and erucylphosphocholine.**  
doi:10.1371/journal.pntd.0001612.g001

(Table 1). Erucylphosphocholine was the least efficient ALP in inhibiting parasite proliferation regarding most *Leishmania spp.* promastigotes, but interestingly it showed the highest antiparasitic activity against *L. infantum* promastigotes (Table 1). In general, the antileishmanial activity of the distinct ALPs ranked edelfosine  $\geq$  perifosine  $>$  miltefosine  $>$  erucylphosphocholine against *Leishmania spp.* promastigotes.

#### Effect of ALPs in inhibiting proliferation of *Leishmania spp.* axenic amastigotes

Next, we analyzed the antileishmanial activity of the distinct ALPs against distinct axenic *Leishmania* amastigotes. Following an axenic amastigote drug screening, we found that edelfosine and perifosine behaved as the most potent ALPs in the inhibition of proliferation of distinct *Leishmania spp.* amastigotes (Table 1). A wider range of IC<sub>50</sub> values was detected for amastigote than for promastigote forms of *Leishmania* (Table 1). The IC<sub>50</sub> values for the anti-*Leishmania* amastigote activity of edelfosine and perifosine ranged between  $\sim 3$ – $12 \mu\text{M}$  and  $\sim 2$ – $15 \mu\text{M}$ , respectively. Miltefosine showed a higher degree of variability (IC<sub>50</sub>,  $\sim 4$ – $39 \mu\text{M}$ ), with *L. panamensis* amastigotes being rather resistant (IC<sub>50</sub>,  $39.3 \mu\text{M}$ ) (Table 1). Erucylphosphocholine showed the highest IC<sub>50</sub> values ( $\sim 28$ – $66 \mu\text{M}$ ) for the inhibition of cell growth

in all the *Leishmania spp.* amastigotes analyzed (Table 1). Surprisingly, *L. infantum* amastigotes were very sensitive to the action of perifosine, edelfosine and miltefosine, whereas their cognate promastigotes forms were rather resistant (Table 1), with double digit IC<sub>50</sub> figures for promastigotes and low one-digit IC<sub>50</sub> values for amastigotes. Interestingly, *L. braziliensis* amastigotes were far more sensitive to edelfosine and miltefosine than their promastigote counterparts (Table 1), whereas perifosine and erucylphosphocholine showed similar IC<sub>50</sub> values for both *L. braziliensis* promastigote and amastigote forms with IC<sub>50</sub> figures over  $14 \mu\text{M}$  (Table 1). In general, the antileishmanial activity of the distinct ALPs ranked edelfosine  $\geq$  perifosine  $>$  miltefosine  $>$  erucylphosphocholine against *Leishmania spp.* amastigotes. These results indicate that sensitivity of *Leishmania* parasites to ALPs is highly dependent on each species as well as on their stage form, namely promastigote or amastigote. Interestingly, because we have recently found that the level of edelfosine in plasma, after daily oral administration of 30 mg/kg, was about  $10.3$ – $25.2 \mu\text{M}$  in both BALB/c and immunodeficient mice [29,30,49], a dose that was effective in inhibiting cancer cell growth *in vivo* [29,30,50], our results indicate that edelfosine was active against all *Leishmania spp.* tested at pharmacologically relevant concentrations (Table 1).

**Table 1.** Inhibition of proliferation of different *Leishmania* spp. (IC<sub>50</sub> values) by ALPs.

Parasite stage	IC <sub>50</sub> (μM)			
Promastigotes	Edelfosine	Miltefosine	Perifosine	ErPC
<i>L. amazonensis</i>	6.4±0.3	13.0±0.8	9.6±1.8	40.0±3.0
<i>L. braziliensis</i>	18.3±3.7	37.7±3.2	14.3±2.1	21.0±3.5
<i>L. donovani</i>	2.1±0.3	3.1±0.8	2.2±0.4	13.3±1.2
<i>L. infantum</i>	27.7±4.6	47.3±4.1	35.3±2.5	16.7±2.8
<i>L. major</i>	2.0±0.2	6.8±0.3	7.1±0.5	12.7±1.5
<i>L. mexicana</i>	2.4±0.2	2.7±0.7	2.5±0.1	11.1±4.9
<i>L. panamensis</i>	2.3±0.8	6.3±0.6	2.4±0.2	14.1±3.1
Axenitic amastigotes	IC <sub>50</sub> (μM)			
Axenitic amastigotes	Edelfosine	Miltefosine	Perifosine	ErPC
<i>L. amazonensis</i>	3.1±0.1	5.9±1.2	2.9±0.5	42.9±3.9
<i>L. braziliensis</i>	8.1±0.2	6.5±1.2	15.1±3.0	28.2±0.7
<i>L. donovani</i>	5.3±0.2	14.5±0.5	9.9±0.7	47.7±3.9
<i>L. infantum</i>	4.2±0.6	4.4±1.1	1.7±0.2	37.0±3.1
<i>L. mexicana</i>	5.2±1.4	4.4±0.8	2.5±0.8	37.6±7.8
<i>L. panamensis</i>	12.2±1.2	39.3±3.7	9.3±0.8	65.8±6.7

*Leishmania* parasites were incubated with edelfosine, miltefosine, perifosine and erucylphosphocholine (ErPC), and assayed for growth inhibition by XTT assays as described in Materials and Methods. Data are shown as the mean values ± SD of four independent determinations.

doi:10.1371/journal.pntd.0001612.t001

### Edelfosine is the most potent ALP in inducing apoptosis-like cell death in *Leishmania* promastigotes

The above results showed that ALPs were able to inhibit *Leishmania* spp. proliferation at distinct rates. We next analyzed whether these agents, used at the pharmacologically relevant concentration of 10 μM, were able to induce an apoptotic-like cell death in *Leishmania* spp. promastigotes by determining DNA fragmentation by flow cytometry. Parasites displaying a sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> hypodiploid DNA content represent cells that undergo DNA breakdown and an apoptotic-like cell death [51]. We found that edelfosine was the most active ALP in promoting a potent apoptotic-like response in all *Leishmania* spp. tested (Figure 2A). The well nigh absence of apoptotic response in *L. infantum* promastigotes (Figure 2A) was expected, as ALPs were used at 10 μM, below the IC<sub>50</sub> value for the inhibition of *L. infantum* promastigote proliferation measured by XTT assays (Table 1). Interestingly, edelfosine showed a much higher proapoptotic-like activity against *L. donovani* and *L. mexicana* promastigotes than miltefosine and perifosine (Figure 2A), despite the similar IC<sub>50</sub> values (~2–3 μM) of the three ALPs, assessed by XTT assays (Table 1). These results suggest that the induction of cell death by edelfosine might differ somewhat from the way by which miltefosine and perifosine promote parasite killing. The ability of the distinct ALPs to induce apoptosis-like cell death in *Leishmania* spp. promastigotes ranked edelfosine>perifosine≅miltefosine>erucylphosphocholine. Results shown in Figure 2A also show that the ability of edelfosine to promote an apoptosis-like cell death is highly dependent on the *Leishmania* sub-genus. In this regard, edelfosine inhibited proliferation of *L. amazonensis* (sub-genus *Leishmania*) and *L. braziliensis* (sub-genus *Viannia*) promastigotes with XTT IC<sub>50</sub> values of 6.4 and 18.3 μM, respectively (Table 1), but the percentage of parasites with a sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> hypodiploid DNA content was higher in *L. braziliensis* than in *L. amazonensis* promastigotes (Figure 2A).

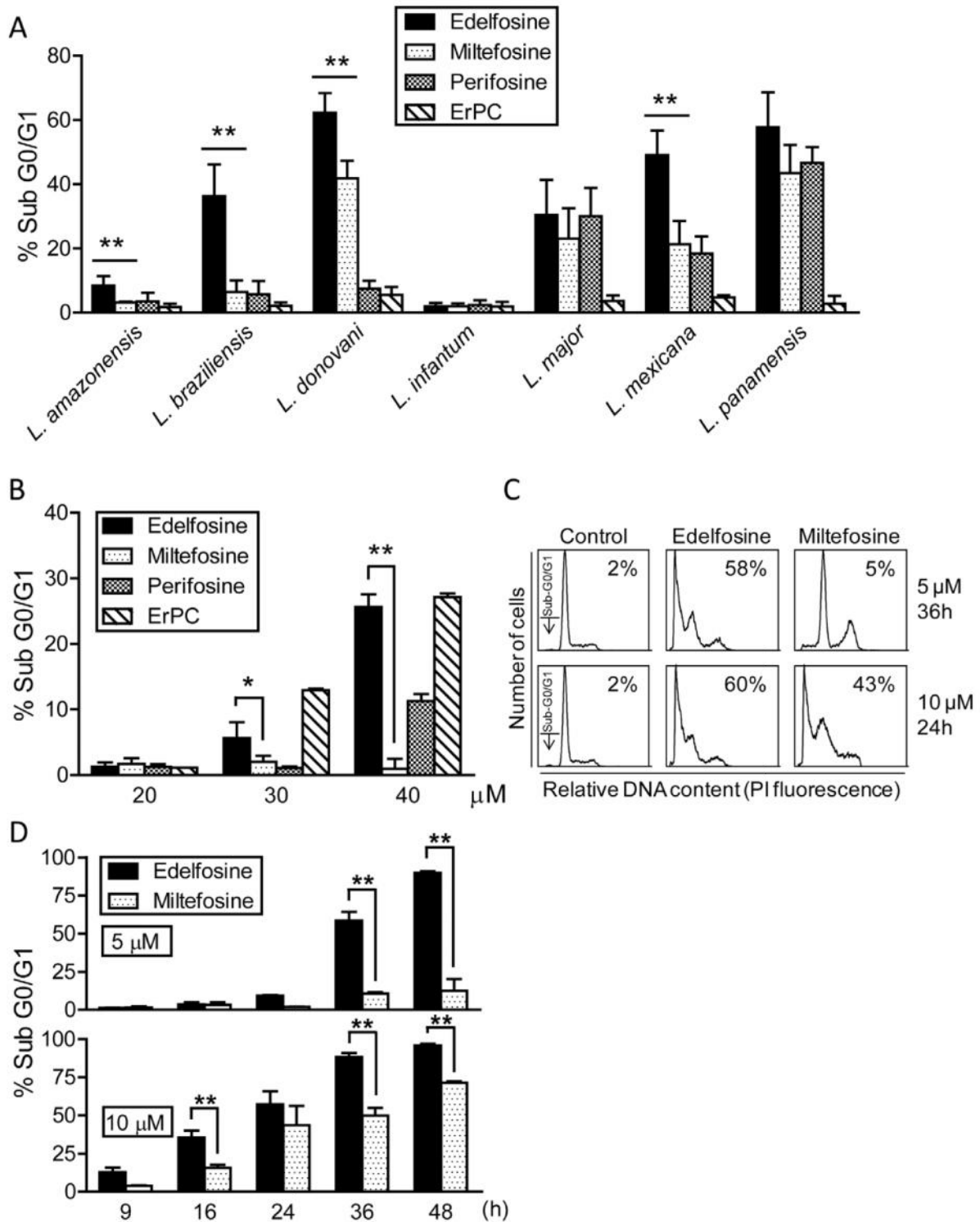
*L. infantum* promastigotes behaved somewhat different from other *Leishmania* species, with regard to their sensitivity to undergo

apoptosis-like cell death by ALPs, requiring high ALP concentrations. A dose-response analysis of the apoptotic-like response of *L. infantum* promastigotes to the four ALPs tested was in agreement with the above XTT IC<sub>50</sub> values of the corresponding drugs (cf. Figure 2B and Table 1), with erucylphosphocholine as the most efficient ALP at 30 μM (Figure 2B). However, at higher concentrations, edelfosine became as efficient as erucylphosphocholine in prompting an apoptotic-like cell death in *L. infantum* promastigotes (Figure 2B).

A comparative dose-response analysis showed that edelfosine was more potent than miltefosine in inducing apoptosis-like cell death in *L. panamensis* promastigotes (Figure 2, C and D), edelfosine being highly effective even at 5 μM. These results agree with our above data on XTT IC<sub>50</sub> figures (Table 1). The cell cycle profiles from propidium iodide-stained *L. panamensis* promastigotes showed a high percentage of parasites with apoptosis-like DNA breakdown following edelfosine treatment at either 5 or 10 μM (Figure 2, C and D), whereas miltefosine induced only a significant DNA breakdown response at 10 μM (Figure 2, C and D). Interestingly, edelfosine also induced apoptosis-like cell death in *L. panamensis* axenic amastigotes (25.8±4.6 and 55.4±2.8% sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> cells (*n*=3) after 24 h incubation with 10 and 20 μM edelfosine, respectively).

### Edelfosine accumulates in intracellular *Leishmania* parasites

Because *Leishmania* parasites use macrophages as their main host cell in mammalian infection, we next analyzed the localization of edelfosine in *Leishmania*-infected macrophages. To this aim, we used the fluorescent edelfosine analog *all-(E)-1-O-(15'-phenylpentadeca-8',10',12',14'-tetraenyl)-2-O-methyl-rac-glycero-3-phosphocholine* (PTE-ET), which has been previously used as a *bona fide* compound to analyze the subcellular localization of edelfosine in cancer cells [30,34,46,52,53], and it fully mimics the antitumor [30,34,46,52,53] and antileishmanial [54] (data not shown)



**Figure 2. Differential ability of ALPs to induce apoptosis-like cell death in *Leishmania* spp.** (A) Promastigotes from different *Leishmania* spp. were treated with 10 μM edelfosine, miltefosine, perifosine or erucylphosphocholine (ErPC) at 26°C for 24 h. Apoptosis-like cell death was then quantitated as percentage of parasites in the sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> region by flow cytometry. (B) *L. infantum* promastigotes were incubated with different concentrations of edelfosine, miltefosine, perifosine and erucylphosphocholine (ErPC) at 26°C for 24 h, and then apoptosis-like cell death was



determined by flow cytometry. (C) Representative histograms of cell cycle analysis of *L. panamensis* promastigotes treated with 5 and 10  $\mu\text{M}$  edelfosine and miltefosine at different incubation times. The position of the sub- $G_0/G_1$  peak, integrated by parasites undergoing apoptosis-like cell death, is indicated by arrows. Percentages of apoptotic parasites are shown in each histogram. (D) *L. panamensis* promastigotes were treated with 5 and 10  $\mu\text{M}$  edelfosine or miltefosine at different incubation times, and then apoptosis-like cell death was determined by flow cytometry. Untreated *Leishmania* promastigotes were run in parallel, and apoptosis-like cell death was less than 1.5% in untreated parasites in all cases shown in panels A–D. Data are means  $\pm$  SD or representative of four independent experiments. Asterisks indicate that the differences between edelfosine- and miltefosine-treated cells are statistically significant. (\*)  $P < 0.05$ . (\*\*)  $P < 0.01$ . doi:10.1371/journal.pntd.0001612.g002

actions of the parent drug edelfosine. The mouse macrophage-like cell line J774 was rather resistant to undergo apoptosis following treatment with edelfosine ( $\text{IC}_{50} = 40.7 \pm 7.1 \mu\text{M}$ , assessed by XTT assays), and therefore it was used as a host cell line for *Leishmania* infection. Edelfosine (10  $\mu\text{M}$ ) was unable to induce apoptosis in J774 cells following 24 h incubation (<2% apoptosis), and caused less than 15% apoptosis after 48 h incubation. This is in stark contrast to the high sensitivity of other monocyte-like cell lines to edelfosine, such as human U937 cells [28,55,56], which undergo rapid apoptosis and can therefore not be used as host cells to analyze the effect of ALPs on intracellular parasites residing in macrophages. Incubation of J774 macrophages with PTE-ET showed that the fluorescent edelfosine analog was taken up into the cell (Figure 3A). The blue fluorescence of PTE-ET was mainly located around the nucleus (Figure 3A, left panel) that could be related to a predominant accumulation of this ether lipid in the endoplasmic reticulum of J774 cells, as previously reported for solid tumor cells [50,52]. When macrophages were infected with *L. panamensis* parasites, an intense blue fluorescence was detected in the intracellular parasites (Figure 3A, middle panel), indicating that a major location of the PTE-ET fluorescent compound turned out to be in the intracellular parasites inside the macrophage. The PTE-ET location in the parasites residing in the macrophage was clearly detected, irrespective of whether

PTE-ET was incubated with macrophages previously infected with parasites (Figure 3A, middle panel), or with intact macrophages and then subsequently incubated with parasites (Figure 3A, right panel). Macrophages containing a low number of *Leishmania* amastigotes are shown in Figure 3 in order to facilitate visualization of the fluorescent drug location in the parasites (Figure 3A). Similar data were obtained with primary mouse bone marrow-derived macrophages, which were resistant to 10  $\mu\text{M}$  edelfosine, following infection with *L. major* (data not shown). These data suggest that edelfosine accumulates in intracellular *Leishmania* parasites inside macrophages, in a similar way as PTE-ET, to exert its anti-parasite action regardless drug treatment is before or after infection.

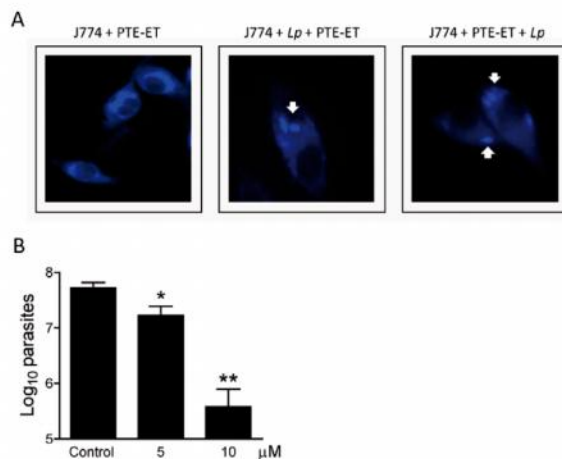
### Edelfosine induces cell death of *Leishmania* amastigotes inside macrophages

We also found that edelfosine efficiently killed J774 macrophage-residing *L. panamensis* by examining the parasitic burden of macrophages through limiting dilution assays (Figure 3B). The cytotoxic action of edelfosine against intracellular *L. panamensis* amastigotes was further confirmed by a dramatic decrease in the number of intracellular parasites, using J774 macrophages infected with green fluorescent *L. panamensis*, previously transfected with p.6.5-egfp to express green fluorescent protein (GFP) [57] (data not shown).

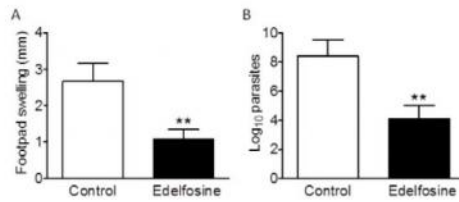
Some anti-parasite drugs are suggested to promote their action through the generation of nitric oxide (NO) [58], as this molecule exerts an important anti-parasitic effect [59,60]. Miltefosine has been reported to induce NO in U937 cells [61]. However, we were unable to detect NO production following incubation of 10  $\mu\text{M}$  edelfosine with J774 macrophages (<2 nmol nitrites/ $10^6$  J774 cells after 18 h incubation), unlike cell incubation with 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  LPS (100 nmol nitrites/ $10^6$  J774 cells after 18 h incubation). Likewise, edelfosine treatment failed to prompt NO synthesis in mouse bone marrow-derived macrophages and rat alveolar macrophages (data not shown). These data suggest that the killing effect of edelfosine on macrophage-residing *Leishmania* parasites does not depend on NO generation.

### *In vivo* antileishmanial activity of edelfosine in a mouse model

We next examined the *in vivo* antileishmanial activity of edelfosine in BALB/c mice infected subcutaneously in the footpad with  $2 \times 10^6$  infective stationary-phase *L. major* promastigotes. In agreement with previous estimates [29,30,49], we found that a daily oral administration of 15 or 30 mg/kg edelfosine was well tolerated, 45 mg/kg being the maximum tolerated dose, following toxicity analyses, where animals were monitored for body weight loss or any appreciable side-effect, including changes in strength and general condition (data not shown). We found that a daily oral administration dose of 15 mg/kg body weight edelfosine achieved a remarkable inhibition of both footpad inflammation (Figure 4A) and parasitic load (Figure 4B), as assessed by caliper measures of footpad swelling and limiting dilution assays, respectively, at the end of the 28-day treatment period. In comparison experiments, we found that oral treatment of *L. major*-infected BALB/c mice



**Figure 3. Antileishmanial activity of edelfosine against intracellular *Leishmania* amastigotes within macrophage-like J774 cells.** (A) J774 cells, incubated with the blue-emitting fluorescent analog PTE-ET (left panel), or with *L. panamensis* (*Lp*) and then with PTE-ET (middle panel), or with PTE-ET and then with *L. panamensis* (*Lp*) (right panel), were analyzed by fluorescence microscopy to examine drug localization. White arrows point to the intracellular amastigotes. (B) Parasite burden in *L. panamensis*-infected J774 cells untreated (Control) and treated with 5 or 10  $\mu\text{M}$  edelfosine for 24 h. Data are means  $\pm$  SD or representative of four independent experiments. Asterisks indicate that the differences between control and edelfosine-treated groups are statistically significant. (\*)  $P < 0.05$ . (\*\*)  $P < 0.01$ . doi:10.1371/journal.pntd.0001612.g003



**Figure 4. *In vivo* antileishmanial action of edelfosine in *L. major*-infected mice.** BALB/c mice were infected with  $2 \times 10^6$  *L. major* promastigotes in the left hind footpad, and after swelling was perceptible, mice were randomized into drug-treated (15 mg edelfosine/kg of body weight, daily oral administration for 28 days) and control (water vehicle) groups of 7 mice each. After completion of the 4-week treatment, lesions were evaluated by measuring the footpad swelling (A) and determining the parasite load (B), using caliper measurements and limiting dilution assays respectively. Data are means  $\pm$  SD ( $n = 7$ ). Asterisks indicate that the differences between control and edelfosine-treated groups are statistically significant. (\*\*  $P < 0.01$ ). doi:10.1371/journal.pntd.0001612.g004

with edelfosine was slightly more effective than with miltefosine, although differences were not statistically significant (data not shown). The dose of edelfosine used in our assays was similar to the dose used for miltefosine in mouse models, ranging from 2.5 to 25 mg/kg of body weight/day given orally, and being 20 mg/kg/day the most widely used dose for *in vivo* murine experiments [35,39,62–65]. In addition, because the molecular masses for edelfosine and miltefosine are 523.7 and 407.6, respectively, the edelfosine dose used in our assays (15 mg/kg, corresponding to 28.6  $\mu\text{mol/kg}$ ) was even lower than the usual miltefosine dose (20 mg/kg, corresponding to 49.1  $\mu\text{mol/kg}$ ) in these *in vivo* murine studies.

#### *In vivo* antileishmanial activity of edelfosine in hamster models of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis

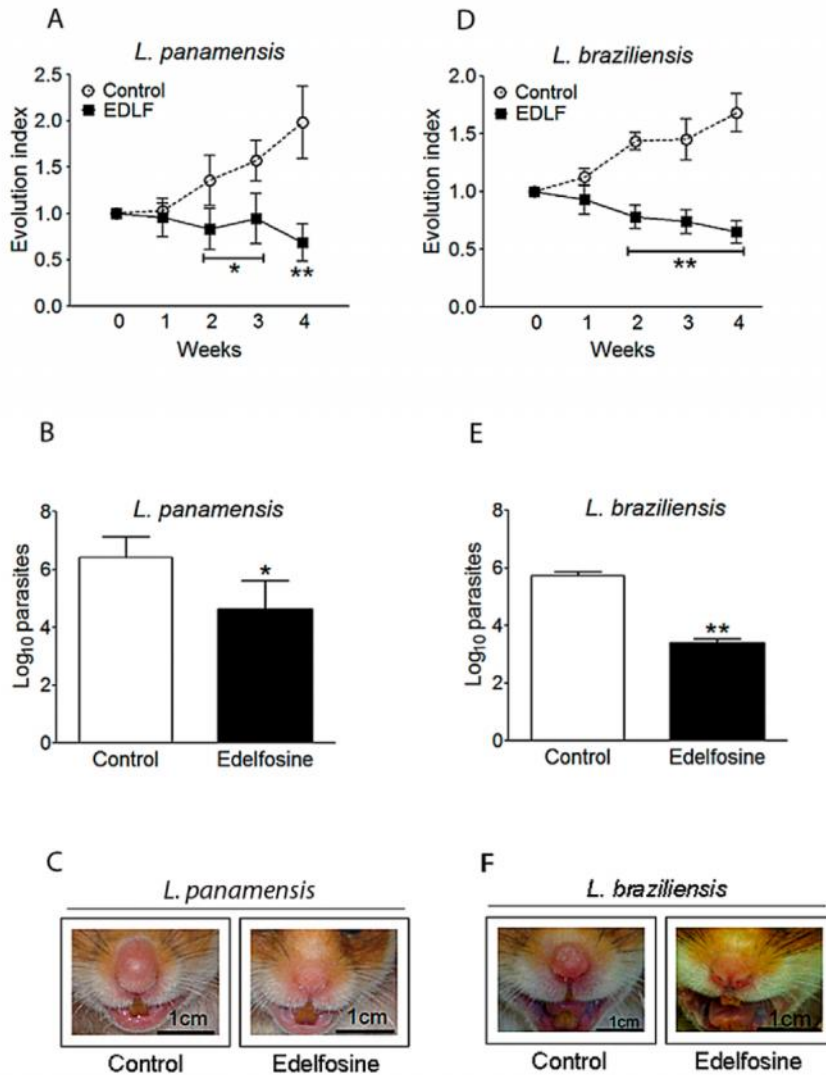
Next, we used golden hamsters as an additional experimental animal model of leishmaniasis. Hamsters have been reported to better reproduce the clinicopathological features of human leishmaniasis than mice [66–68]. One million promastigotes of *L. panamensis* and *L. braziliensis* were inoculated in the nose of golden hamsters, as animal models for cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, since the above *Leishmania* species can cause both cutaneous and mucocutaneous disease [69,70]. Then, hamsters were randomized into drug-treated and drug-free control (water vehicle) groups of seven hamsters each, and the animal models for *L. panamensis* (Figure 5, A–C) and *L. braziliensis* (Figure 5, D–F) infections were monitored for the antileishmanial efficacy of edelfosine. Serial caliper measurements during the course of the assays were made to determine the rate of nose swelling (Figure 5, A and D). Progression of the disease led to a dramatic swelling and ulceration of the nose. Oral administration of edelfosine (26 mg/kg body weight) on a daily basis for 4 weeks (28 days) induced a remarkable decrease in both nasal swelling and parasitic load at the site of infection (Figure 5). This dose is lower than the miltefosine dose (40 mg/kg/day) used in a recent study with *L. donovani*-infected hamsters [71]. Here, we found no appreciable adverse effects on the general condition of the animals following a daily oral administration of 26 mg/kg edelfosine. The effect of edelfosine on nose swelling became evident in both *L. panamensis* and *L. braziliensis* infections after two weeks of treatment (Figure 5, A and D). The parasite loads, assessed by limiting dilution assays, were significantly diminished in both animal models following oral treatment with edelfosine

(Figure 5, B and E). Untreated infected animals displayed intense swelling and ulceration in their noses, but edelfosine treatment greatly ameliorated the signs of leishmaniasis (Figure 5, E and F).

#### Edelfosine shows potent *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity against SbV-resistant *L. panamensis* parasites

Cutaneous leishmaniasis is the most common form of leishmaniasis and is endemic in many tropical and subtropical countries [1,2]. Common therapies for leishmaniasis for more than 60 years include the use of SbV drugs as meglumine antimoniate (Glucantime) or sodium stibogluconate (Pentostam) [2,72]. However, extensive use of these compounds is leading to SbV resistance. Thus, parasites have become resistant to antimony in many parts of the world, and primary resistance to SbV exceeds 60% of cases of leishmaniasis in the state of Bihar in India [73]. Different *Leishmania* species have been shown to display distinct susceptibility to antimonials [74,75]. In addition, susceptibility of *L. donovani* to SbV has been reported to follow stage transformation from promastigotes to axenic amastigotes, while resistance to SbV is acquired when amastigotes differentiate into promastigotes [76]. SbV has also been reported to be active, even though to different degrees, against a number of *Leishmania* spp. promastigotes and amastigotes *in vitro*, including *L. panamensis* [77–81]. On these grounds and because of possible clinical implications, we generated a SbV-resistant *L. panamensis* strain to be tested for the antiparasitic activity of the distinct ALPs. Induction of resistance to SbV in *L. panamensis* promastigotes was achieved by continuous *in vitro* exposure of these parasites to increasing Glucantime concentrations for 1 year. The SbV-resistant *L. panamensis* strain was able to resist concentrations of Glucantime as high as 36 mg/ml, as assessed by XTT assays, a concentration 9-fold higher than the  $\text{IC}_{50}$  (4 mg/ml) for wild type *L. panamensis* promastigotes. Because of the different susceptibility to SbV shown by certain *Leishmania* spp., depending on their promastigote or amastigote stage, SbV resistance of *L. panamensis* promastigotes was further evaluated by *in vivo* experiments in a hamster model. Two groups of eight hamsters each were inoculated in the nose with wild type and SbV-resistant *L. panamensis* promastigotes, and then, after a 6-week post-infection period, when nose swelling was clearly detected, hamsters were injected intramuscularly with 40 mg/kg body weight Glucantime (SbV), on a daily basis for 4 weeks. As shown in Figure 6 (A and B), swelling was decreased in animals infected with wild type *L. panamensis*, but increased in animals infected with SbV-resistant *L. panamensis*. In addition, macrophages infected with *Leishmania* amastigotes were readily observed in smears from the nose of SbV-resistant *L. panamensis*-infected hamsters, but not from wild type *L. panamensis*-infected animals, treated with SbV (Figure 6B). Moreover, the parasitic burden in the nose of the two groups of animals indicated that the amount of viable wild type *L. panamensis* was dramatically diminished following treatment with the pentavalent antimonial drug, but the SbV-resistant *L. panamensis* parasites remained viable in the *in vivo* assay (data not shown). These results indicate that the generated SbV-resistant *L. panamensis* strain was highly resistant to pentavalent antimonial treatment both *in vitro* and *in vivo*.

Next, we tested *in vitro* the activity of the four ALPs edelfosine, miltefosine, perifosine and erucylphosphocholine against both wild type and SbV-resistant *L. panamensis* promastigotes by XTT assays. We found that all ALPs were effective in inhibiting proliferation of SbV-resistant *L. panamensis* promastigotes showing similar  $\text{IC}_{50}$  values to those found against wild type *L. panamensis* (Figure 6C).



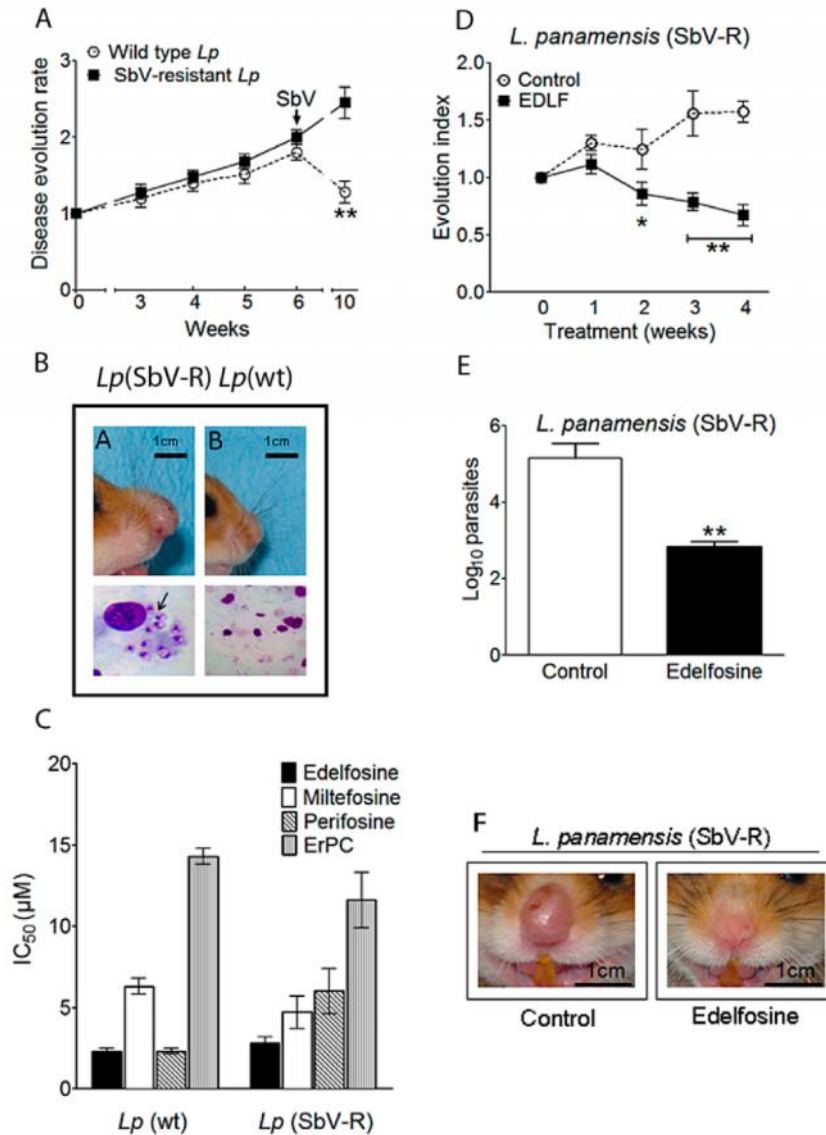
**Figure 5. In vivo antileishmanial action of edelfosine in *L. panamensis*- and *L. braziliensis*-infected hamsters.** Golden hamsters were infected with  $1 \times 10^6$  *L. panamensis* or *L. braziliensis* promastigotes in the nose, and after swelling was perceptible, hamsters were randomized into drug-treated (26 mg edelfosine/kg of body weight, daily oral administration for 28 days) and control (water vehicle) groups of 7 hamsters each. (A, D) Lesion development was monitored by measuring nose thickness at regular intervals, and comparison to values obtained before treatment (evolution index). (B, E) Parasite load was determined by limiting dilution assays after completion of the 4-week *in vivo* assays. Data are means  $\pm$  SD ( $n = 7$ ). Asterisks indicate that the differences between control and edelfosine-treated groups are statistically significant. (\*)  $P < 0.05$ . (\*\*)  $P < 0.01$ . (C, F) Edelfosine treatment led to a dramatic decrease and amelioration in parasite-induced nose thickness and damage, as shown by representative photographs from drug-free control and edelfosine-treated hamsters. doi:10.1371/journal.pntd.0001612.g005

Edelfosine was the most effective ALP against SbV-resistant *L. panamensis* promastigotes and no difference in edelfosine sensitivity was observed between wild type and SbV-resistant strains (Figure 6C).

Infection of hamsters with SbV-resistant *L. panamensis* parasites in the nose, showed that a daily oral treatment with edelfosine (26 mg/kg body weight) for 4 weeks led to a dramatic decrease in the evolution index, parasitic burden and local inflammation (Figure 6, D–F). The first signs of improvement were detected after about two weeks of treatment (Figure 6A). These data indicate that oral treatment with edelfosine was efficient against leishmaniasis caused by SbV-resistant *L. panamensis* parasites.

#### Differential time requirement for the generation of resistance to edelfosine and miltefosine in *Leishmania* spp. promastigotes

A major concern in anti-parasitic chemotherapy is the generation of drug resistance. Thus, we next analyzed the feasibility to generate drug resistance to miltefosine and edelfosine in different *Leishmania* species, by a gradual increase in drug concentration. We determined the time required to achieve resistance to 30  $\mu$ M miltefosine or edelfosine. This drug concentration could be appropriate to distinguish between specific and unspecific effects, and thereby drug resistance was considered



**Figure 6. Sensitivity of SbV-resistant *L. panamensis* parasites to edelfosine.** (A) Two groups of eight golden hamsters each were infected in the nose with wild type and SbV-resistant *L. panamensis* (*Lp*) promastigotes, and after the sixth week post-infection, they were treated with a daily intramuscular injection of Glucantime (SbV) for 4 weeks. Disease evolution rate was measured along the whole process through determining nose thickness as compared to figures obtained before infection. (B) Golden hamsters inoculated with SbV-resistant (SbV-R) *L. panamensis* (*Lp*) did not respond to treatment with Glucantime (inflamed nose) (upper left panel), and nose smears showed amastigotes within macrophages (arrow) following Giemsa staining (lower left panel). However, hamsters infected with wild type (wt) *L. panamensis* (*Lp*) fully responded to Glucantime treatment, showing uninfamed nose and negative staining for amastigotes in nose smears (upper and lower right panels). (C) IC<sub>50</sub> values of edelfosine, miltefosine, perifosine, and erucylphosphocholine (ErPC) for *in vitro* growth inhibition of wild type (wt) and SbV-resistant (SbV-R) *L. panamensis* (*Lp*) promastigotes were determined by XTT assays. (D–F) Golden hamsters were infected with  $1 \times 10^6$  SbV-resistant *L. panamensis* promastigotes in the nose, and after nose inflammation was evident, hamsters were randomized into drug-treated (26 mg edelfosine/kg of body weight, daily oral administration for 28 days) and control (water vehicle) groups of 7 hamsters each. (D) Lesion development was monitored by measuring nose thickness at regular intervals and comparison to values obtained before treatment (evolution index). (E) Parasite load was determined by limiting dilution assays after completion of the 4-week *in vivo* assay. (F) Edelfosine treatment led to a dramatic decrease and amelioration in parasite-induced nose thickness and damage, as shown by photographs from drug-free control and edelfosine-treated hamsters. Data are means  $\pm$  SD or representative experiments ( $n=7$ ). Asterisks indicate that differences between control and edelfosine-treated groups, or between wild type and SbV-resistant parasites treated with SbV, are statistically significant. (\*)  $P<0.05$ . (\*\*)  $P<0.01$ . doi:10.1371/journal.pntd.0001612.g006

when parasites became resistant to a final drug concentration of 30  $\mu\text{M}$ . We found that the continuous exposure of *L. donovani*, *L. major* and *L. panamensis* promastigotes to increasing amounts of miltefosine led to a rather rapid advent of drug resistance following 40–64 days of treatment (Table 2). However, relatively more protracted continuous treatments were required to generate edelfosine resistance in *L. major* and *L. panamensis* promastigotes (Table 2). Interestingly, whereas miltefosine treatment led to drug resistance in *L. donovani* after a relatively short period of time (Table 2), no drug resistance was detected after 100-day treatment of *L. donovani* with edelfosine (Table 2).

## Discussion

Our results show the *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activity of edelfosine against different *Leishmania* species. The ability of edelfosine to kill distinct *Leishmania* spp. promastigotes and amastigotes is in general higher than other ALPs, and the antileishmanial activity of ALPs ranked edelfosine > miltefosine > crucyphosphocholine. Edelfosine also shows a higher capacity to induce an apoptosis-like cell death in *Leishmania* than miltefosine (Impavido), which has been approved as the first oral drug active against visceral leishmaniasis [2]. However, recent studies have challenged the efficacy of miltefosine against some cutaneous leishmaniasis [13–15,17–20], and relapse cases of miltefosine-treated parasites have been reported in visceral and diffuse cutaneous leishmaniasis [82–84] as well as in HIV-positive patients [85,86].

Here, we have found that edelfosine shows an outstanding activity against a wide number of *Leishmania* spp. causing cutaneous, mucocutaneous and visceral leishmaniasis. Edelfosine was able to kill parasites in both promastigote and amastigote forms through an apoptosis-like process that involved DNA degradation, as assessed by an increase in the percentage of cells with a hypodiploid DNA content. *Leishmania* parasites infect macrophages wherein they reside and replicate in a fusion competent vacuole (parasitophorous vacuole). Interestingly, edelfosine efficiently killed intracellular parasite amastigotes inside macrophages, without affecting the host cells. This killing activity on intracellular parasites seems to be mainly due to a direct action of the drug on the parasite, as edelfosine was unable to induce NO generation in macrophages, while a fluorescent edelfosine analog accumulated in the intracellular parasites within macrophages.

**Table 2.** Differential incubation times required for drug resistance generation.

<i>Leishmania</i> species	Time required for drug resistance (days)	
	Edelfosine	Miltefosine
Promastigotes		
<i>L. donovani</i>	NR	40
<i>L. major</i>	88	60
<i>L. panamensis</i>	89	64

*Leishmania* promastigotes were incubated with increasing concentrations of edelfosine and miltefosine until parasite viability in the presence of 30  $\mu\text{M}$  drug was over 80% (considered as drug resistant). The maximum period of time evaluated for acquisition of the resistant phenotype was 100 days, and no resistance to edelfosine was generated in *L. donovani* promastigotes after this incubation time. NR, no resistance.  
doi:10.1371/journal.pntd.0001612.t002

Our data also reveal a remarkable antileishmanial activity of edelfosine in several *in vivo* assays using mouse and hamster animal models infected with *L. major*, *L. panamensis* or *L. braziliensis*. To our knowledge this is the first study using hamsters as animal models for the *in vivo* evaluation of ALPs against cutaneous leishmaniasis. In addition, both *in vitro* and *in vivo* evidence showed that edelfosine was very effective against SbV-resistant *Leishmania* parasites. This is of importance as pentavalent antimonials Glucantime and Pentostam are being used in the treatment of leishmaniasis for over more than six decades, and still they are the first line drugs of choice and the traditional treatment worldwide. However, resistance to pentavalent antimonials is emerging as a result of their widespread use. A stark example of SbV resistance is well documented in Bihar (India), which houses approximately 90% of India's cases of visceral leishmaniasis, representing about 50% of the world's cases, and where resistance ended the usefulness of SbV more than a decade ago [2].

A major potential drawback in the use of miltefosine could be the relatively rapid generation of drug resistance *in vitro*. We have found here that generation of drug resistance required longer incubation times of *Leishmania* spp. with edelfosine than with miltefosine. Furthermore, whereas miltefosine generated drug resistance in *L. donovani* following a 40-day treatment, no resistance to edelfosine was detected after 100-day incubation.

It is worthwhile to note that miltefosine treatment has been reported to be unsatisfactory against infections caused by *L. braziliensis* [13–15,17–20], whereas here we have found a remarkable antiparasitic activity of edelfosine in *L. braziliensis*-infected hamsters. In addition, edelfosine offers a number of additional advantages as compared to miltefosine, such as the fact that edelfosine shows a potent anti-inflammatory action [87], and no apparent toxicity [87]. *Leishmania* parasites enter first neutrophils through the regulation of granule fusion processes that prevents any deleterious action on the parasite [88]. *Leishmania* parasites use polymorphonuclear neutrophils as intermediate hosts before their ultimate delivery to macrophages, following engulfment of parasite-infected neutrophils, and in this way *Leishmania* can escape the host immune system [89]. A significant part of the destruction caused by cutaneous leishmaniasis is due to severe inflammation at the site of infection in the skin, leading to ulceration [90]. Neutrophils are recruited into the site of infection during cutaneous leishmaniasis [91,92], and accumulation of neutrophils have been linked to tissue damage [93]. Edelfosine induces L-selectin (CD62L) shedding, and thus prevents neutrophil extravasation to the inflammation or infection site [87]. On these grounds, leishmaniasis could be ameliorated by oral treatment of edelfosine, which could reduce the parasite burden, by direct parasite killing, as well as the ulcerative process and subsequent scar formation, by a reduction in the recruitment of neutrophils into the site of infection.

A serious drawback of miltefosine is its teratogenic effects [24], however no studies have been conducted so far for a putative teratogenic action of edelfosine.

The studies reported here provide compelling evidence for the potent antileishmanial activity of edelfosine, which together with the low toxicity profile displayed by this ether lipid and its anti-inflammatory activity, warrants further clinical evaluation as a possible alternative treatment against leishmaniasis.

## Acknowledgments

We are indebted to P. Kropf and B. G. Sierra for excellent and skillful assistance in the initial stages of this study.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: FM REV JAV-P. Performed the experiments: REV JAV-P EY IM DLM JL-A. Analyzed the data: REV

## References

- WHO (2010) Control of the leishmaniasis. World Health Organ Tech Rep Ser 949: 1–186.
- Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366: 1561–1577.
- Hotez PJ, Remme JH, Buss P, Alleyne G, Morel C, et al. (2004) Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clin Infect Dis* 38: 871–878.
- Alvar J, Aparicio P, Aseffa A, Den Boer M, Canavate C, et al. (2008) The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin Microbiol Rev* 21: 334–359.
- van Griensven J, Balasegaram M, Meheus F, Alvar J, Lynen L, et al. (2010) Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 10: 184–194.
- Mishra J, Saxena A, Singh S (2007) Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr Med Chem* 14: 1153–1169.
- Sundar S (2001) Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health* 6: 849–854.
- Sundar S, Chatterjee M (2006) Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J Med Res* 123: 345–352.
- Palumbo E (2010) Treatment strategies for mucocutaneous leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* 2: 147–150.
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH (2006) Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 19: 111–126.
- Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, et al. (2008) Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. *Parasitol Res* 103: 1–10.
- Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, et al. (2002) Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med* 347: 1739–1746.
- Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, et al. (2004) Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 38: 1266–1272.
- Velez I, Lopez L, Sanchez X, Mesra L, Rojas C, et al. (2010) Efficacy of miltefosine for the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 83: 351–356.
- Machado PR, Ampuero J, Guimaraes LH, Villasboas L, Rocha AT, et al. (2010) Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e912.
- Chrusciak-Talhari A, Dietze R, Chrusciak Talhari C, da Silva RM, Gadelha Yamashita EP, et al. (2011) Randomized controlled clinical trial to access efficacy and safety of miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 84: 255–260.
- Soto J, Rea J, Valderrama M, Toledo J, Valda L, et al. (2009) Efficacy of extended (six weeks) treatment with miltefosine for mucosal leishmaniasis in Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* 81: 387–389.
- Soto J, Toledo J, Valda L, Balderrama M, Rea J, et al. (2007) Treatment of Bolivian mucosal leishmaniasis with miltefosine. *Clin Infect Dis* 44: 350–356.
- Soto J, Berman J (2006) Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100 Suppl 1: S34–40.
- Soto J, Soto P (2006) Oral miltefosine to treat leishmaniasis. *Biomedica* 26 Suppl 1: 207–217.
- Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Bhattacharya SK, Rai M (2006) Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100 Suppl 1: S26–33.
- Bhattacharya SK, Sinha PK, Sundar S, Thakur CP, Jha TK, et al. (2007) Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 196: 591–598.
- Rahman M, Ahmed BN, Faiz MA, Chowdhury MZ, Islam QT, et al. (2011) Phase IV trial of miltefosine in adults and children for treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) in Bangladesh. *Am J Trop Med Hyg* 85: 66–69.
- Sindermann H, Engel J (2006) Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100 Suppl 1: S17–20.
- Perez-Victoria FJ, Sanchez-Canete MP, Seifert K, Croft SL, Sundar S, et al. (2006) Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resist Updat* 9: 26–39.
- Seifert K, Matu S, Javier Perez-Victoria F, Castanys S, Gamarro F, et al. (2003) Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). *Int J Antimicrob Agents* 22: 380–387.
- Seifert K, Perez-Victoria FJ, Stetler M, Sanchez-Canete MP, Castanys S, et al. (2007) Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists *in vivo*. *Int J Antimicrob Agents* 30: 229–235.
- Mollinedo F, Fernandez-Luna JL, Gajate C, Martin-Martín B, Benito A, et al. (1997) Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH<sub>3</sub> (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub>. *Cancer Res* 57: 1320–1328.
- Mollinedo F, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Estella-Hermoso de Mendoza A, Villa-Pulgarin JA, et al. (2010) *In vitro* and *in vivo* selective antitumor activity of Edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts. *Clin Cancer Res* 16: 2046–2054.
- Mollinedo F, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Estella-Hermoso de Mendoza A, Villa-Pulgarin JA, et al. (2010) Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. *Oncogene* 29: 3748–3757.
- Gajate C, Mollinedo F (2002) Biological activities, mechanisms of action and biomedical prospect of the antitumor ether phospholipid ET-18-OCH<sub>3</sub> (Edelfosine), a proapoptotic agent in tumor cells. *Curr Drug Metab* 3: 491–525.
- Gajate C, Mollinedo F (2001) The antitumor ether lipid ET-18-OCH<sub>3</sub> induces apoptosis through translocation and capping of Fas/CD95 into membrane rafts in human leukemic cells. *Blood* 98: 3860–3863.
- Gajate C, Mollinedo F (2007) Edelfosine and perifosine induce selective apoptosis in multiple myeloma by recruitment of death receptors and downstream signaling molecules into lipid rafts. *Blood* 109: 711–719.
- Gajate C, Del Canto-Janez E, Acuna AU, Amat-Guerri F, Geijo E, et al. (2004) Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J Exp Med* 200: 353–365.
- Croft SL, Snowdon D, Yardley V (1996) The activities of four anticancer alkylphospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J Antimicrob Chemother* 38: 1041–1047.
- Escobar P, Matu S, Marques C, Croft SL (2002) Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH<sub>3</sub> (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Trop* 81: 151–157.
- Santa-Rita RM, Henriques-Pons A, Barbosa HS, de Castro SL (2004) Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine, and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. *J Antimicrob Chemother* 54: 704–710.
- Cabrera-Serra MG, Lorenzo-Morales J, Romero M, Valladares B, Pintero JE (2007) *In vitro* activity of perifosine: a novel alkylphospholipid against the promastigote stage of *Leishmania* species. *Parasitol Res* 100: 1155–1157.
- Cabrera-Serra MG, Valladares B, Pintero JE (2008) *In vivo* activity of perifosine against *Leishmania amazonensis*. *Acta Trop* 108: 20–25.
- Verma NK, Dey CS (2004) Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3010–3015.
- Paris C, Loiseau PM, Bories C, Breard J (2004) Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 852–859.
- Taylor VM, Munoz DL, Cedeno DL, Velez ID, Jones MA, et al. (2010) *Leishmania tarentolae*: utility as an *in vitro* model for screening of antileishmanial agents. *Exp Parasitol* 126: 471–475.
- David-Gordonnier MH, Gajate C, Olmea O, Laine W, de la Iglesia-Vicente J, et al. (2005) DNA and non-DNA targets in the mechanism of action of the antitumor drug trabectedin. *Chem Biol* 12: 1201–1210.
- Gajate C, Santos-Beneit AM, Macho A, Lazaro M, Hernandez-De Rojas A, et al. (2000) Involvement of mitochondria and caspase-3 in ET-18-OCH<sub>3</sub>-induced apoptosis of human leukemic cells. *Int J Cancer* 86: 208–218.
- Gajate C, Barasoain I, Andreu JM, Mollinedo F (2000) Induction of apoptosis in leukemic cells by the reversible microtubule-disrupting agent 2-methoxy-5-(2',3',4'-trimethoxyphenyl)-2,4,6-cycloheptatrien-1-one: protection by Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub> and cell cycle arrest. *Cancer Res* 60: 2651–2659.
- Quesada E, Delgado J, Gajate C, Mollinedo F, Acuna AU, et al. (2004) Fluorescent phenylpolyene analogues of the ether phospholipid edelfosine for the selective labeling of cancer cells. *J Med Chem* 47: 5333–5335.
- Mollinedo F, Fernandez M, Hornillos V, Delgado J, Amat-Guerri F, et al. (2011) Involvement of lipid rafts in the localization and dysfunction effect of the antitumor ether phospholipid edelfosine in mitochondria. *Cell Death Dis* 2: e158.
- Henoa HH, Osorio Y, Saravia NG, Gomez A, Travi B (2004) Efficacy and toxicity of pentavalent antimonials (Glucantime and Pentostam) in an American cutaneous leishmaniasis animal model: luminometry application. *Biomedica* 24: 393–402.
- Estella-Hermoso de Mendoza A, Campanero MA, de la Iglesia-Vicente J, Gajate C, Mollinedo F, et al. (2009) Antitumor alkyl ether lipid edelfosine: tissue distribution and pharmacokinetic behavior in healthy and tumor-bearing immunosuppressed mice. *Clin Cancer Res* 15: 858–864.
- Gajate C, Matos-da-Silva M, Dakir E-H, Fonteriz RI, Alvarez, et al. (2012) Antitumor alkyl-lysophospholipid analogue edelfosine induces apoptosis in pancreatic cancer by targeting endoplasmic reticulum. *Oncogene* (In press).
- Gajate C, Fonteriz RI, Cabaner C, Alvarez-Noves G, Alvarez-Rodriguez Y, et al. (2000) Intracellular triggering of Fas, independently of FasL, as a new mechanism of antitumor ether lipid-induced apoptosis. *Int J Cancer* 85: 674–682.

52. Nieto-Miguel T, Gajate C, Mollinedo F (2006) Differential targets and subcellular localization of antitumor alkyl-lysophospholipid in leukemic versus solid tumor cells. *J Biol Chem* 281: 14833–14840.
53. Gajate C, Gonzalez-Camacho F, Mollinedo F (2009) Involvement of raft aggregates enriched in Fas/CD95 death-inducing signaling complex in the antileukemic action of edelfosine in Jurkat cells. *PLoS ONE* 4: e5044.
54. Saugar JM, Delgado J, Hornillos V, Luque-Ortega JR, Amat-Guerri F, et al. (2007) Synthesis and biological evaluation of fluorescent leishmanicidal analogues of hexadecylphosphocholine (miltefosine) as probes of antiparasite mechanisms. *J Med Chem* 50: 5994–6003.
55. Mollinedo F, Martínez-Dalmau R, Modolell M (1993) Early and selective induction of apoptosis in human leukemic cells by the alkyl-lysophospholipid ET-18-OCH<sub>3</sub>. *Biochem Biophys Res Commun* 192: 603–609.
56. Alonso MT, Gajate C, Mollinedo F, Modolell M, Alvarez J, et al. (1997) Dissociation of the effects of the antitumor ether lipid ET-18-OCH<sub>3</sub> on cytosolic calcium and on apoptosis. *Br J Pharmacol* 121: 1364–1368.
57. Varela MR, Muñoz DL, Robledo SM, Kolli BK, Dutta S, et al. (2009) *Leishmania (Viannia) panamensis*: an *in vitro* assay using the expression of GFP for screening of antileishmanial drug. *Exp Parasitol* 122: 134–139.
58. Kolodziej H, Kiderlen AF (2005) Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitised RAW 264.7 cells. *Phytochemistry* 66: 2056–2071.
59. Colasanti M, Gradoni L, Mattu M, Persichini T, Salvati L, et al. (2002) Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO. *Int J Mol Med* 9: 131–134.
60. Ascenzi P, Bocedi A, Gradoni L (2003) The anti-parasitic effects of nitric oxide. *IUBMB Life* 55: 573–578.
61. Eue I, Zeisig R, Arndt D (1995) Alkylphosphocholine-induced production of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha by U937 cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 121: 350–356.
62. Kuhlencord A, Maniera T, Eibl H, Unger C (1992) Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 36: 1630–1634.
63. Le Fichoux Y, Rousseau D, Ferrua B, Ruetter S, Lelievre A, et al. (1998) Short- and long-term efficacy of hexadecylphosphocholine against established *Leishmania infantum* infection in BALB/c mice. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 654–658.
64. Murray HW (2000) Suppression of posttreatment recurrence of experimental visceral leishmaniasis in T-cell-deficient mice by oral miltefosine. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 3235–3236.
65. Serrano-Martín X, Payares G, De Lucca M, Martínez JC, Mendoza-León A, et al. (2009) Amiodarone and miltefosine act synergistically against *Leishmania mexicana* and can induce parasitological cure in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 53: 5108–5113.
66. Melby PC, Chandrasekar B, Zhao W, Coe JE (2001) The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. *J Immunol* 166: 1912–1920.
67. Sacks DL, Melby PC (2001) Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. *Curr Protoc Immunol* Chapter 19: Unit 19 12.
68. Hommel M, Jaffe CL, Travi B, Milon G (1995) Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann Trop Med Parasitol* 89 Suppl 1: 55–73.
69. Osorio LE, Castillo CM, Ochoa MT (1998) Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in Colombia: clinical characteristics. *Am J Trop Med Hyg* 59: 49–52.
70. Gonzalez U, Pinart M, Rengifo-Pardo M, Macaya A, Alvar J, et al. (2009) Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database Syst Rev*. CD004834.
71. Gupta R, Kushawaha PK, Samant M, Jaiswal AK, Baharia RK, et al. (2012) Treatment of *Leishmania donovani*-infected hamsters with miltefosine: analysis of cytokine mRNA expression by real-time PCR, lymphoproliferation, nitrite production and antibody responses. *J Antimicrob Chemother* 67: 440–443.
72. Sundar S, Rai M (2005) Treatment of visceral leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother* 6: 2821–2829.
73. Chakravarty J, Sundar S (2010) Drug resistance in leishmaniasis. *J Glob Infect Dis* 2: 167–176.
74. Yardley V, Ortuno N, Llanos-Cuentas A, Chappuis F, Doncker SD, et al. (2006) American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? *J Infect Dis* 194: 1168–1175.
75. Arevalo J, Ramirez L, Adani V, Zimic M, Tulliano G, et al. (2007) Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis* 195: 1846–1851.
76. Ephros M, Binun A, Shaked P, Waldman E, Zilberstein D (1999) Stage-specific activity of pentavalent antimony against *Leishmania donovani* axenic amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 43: 278–282.
77. Lucumi A, Robledo S, Gama V, Saravia NG (1998) Sensitivity of *Leishmania viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. *Antimicrob Agents Chemother* 42: 1990–1995.
78. Robledo SM, Valencia AZ, Saravia NG (1999) Sensitivity to Glucantime of *Leishmania viannia* isolated from patients prior to treatment. *J Parasitol* 85: 360–366.
79. Walker J, Saravia NG (2004) Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote DNA topoisomerase I and human monocyte DNA topoisomerases I and II by antimonial drugs and classical antiparasitic agents. *J Parasitol* 90: 1155–1162.
80. Hadighi R, Boucher P, Khamesipour A, Meamar AR, Roy G, et al. (2007) Glucantime-resistant *Leishmania tropica* isolated from Iranian patients with cutaneous leishmaniasis are sensitive to alternative antileishmaniasis drugs. *Parasitol Res* 101: 1319–1322.
81. Shokri A, Sharifi I, Khamesipour A, Nakhaee N, Fasihi Harandi M, et al. (2012) The effect of verapamil on *in vitro* susceptibility of promastigote and amastigote stages of *Leishmania tropica* to meglumine antimoniate. *Parasitol Res* 110: 1113–1117.
82. Pandey BD, Pandey K, Kaneko O, Yanagi T, Hirayama K (2009) Relapse of visceral leishmaniasis after miltefosine treatment in a Nepalese patient. *Am J Trop Med Hyg* 80: 580–582.
83. Calvopina M, Gomez EA, Sindermann H, Cooper PJ, Hashiguchi Y (2006) Relapse of new world diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) mexicana* after miltefosine treatment. *Am J Trop Med Hyg* 75: 1074–1077.
84. Zerpa O, Ulrich M, Blanco B, Polegre M, Avila A, et al. (2007) Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. *Br J Dermatol* 156: 1328–1335.
85. Troya J, Casquero A, Refoyo E, Fernandez-Guerrero ML, Gorgolas M (2008) Long term failure of miltefosine in the treatment of refractory visceral leishmaniasis in AIDS patients. *Scand J Infect Dis* 40: 78–80.
86. Sindermann H, Engel KR, Fischer C, Bommer W (2004) Oral miltefosine for leishmaniasis in immunocompromised patients: compassionate use in 39 patients with HIV infection. *Clin Infect Dis* 39: 1520–1523.
87. Mollinedo F, Gajate C, Morales AI, del Canto-Janez E, Justies N, et al. (2009) Novel anti-inflammatory action of edelfosine lacking toxicity with protective effect in experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 329: 439–449.
88. Mollinedo F, Janssen H, de la Iglesia-Vicente J, Villa-Pulgarin JA, Calafat J (2010) Selective fusion of azurophilic granules with *Leishmania*-containing phagosomes in human neutrophils. *J Biol Chem* 285: 34528–34536.
89. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, et al. (2004) Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 173: 6521–6525.
90. Tasew G, Nylan S, Lieke T, Lemu B, Meless H, et al. (2010) Systemic FasL and TRAIL neutralisation reduce leishmaniasis induced skin ulceration. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e844.
91. Bomfim G, Andrade BB, Santos S, Clarencio J, Barral-Netto M, et al. (2007) Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: insights into the early phases of human disease. *Am J Trop Med Hyg* 77: 854–859.
92. Bretana A, Avila JL, Lizardo G, Convit J, Rondon AJ (1983) *Leishmania* species: comparative ultrastructure of experimental nodules and diffuse human cutaneous lesions in American leishmaniasis. *Exp Parasitol* 55: 377–385.
93. Lopez Kostka S, Dinges S, Griewank K, Iwakura Y, Udey MC, et al. (2009) IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol* 182: 3039–3046.

## 6.2 ARTÍCULO 2.

### **Presence of a *Rac/Akt*-like gene in *Leishmania* parasites as a putative stress response protein and therapeutic target in leishmaniasis**

Rubén E. Varela-M, Rodrigo Ochoa, Carlos E. Muskus, Antonio Muro, Faustino Mollinedo. . Enviado a la revista: PLoS Neglected Tropical Disease, MS # PNTD-D-12-01551, 2012.

Este estudio demuestra la existencia de una proteína de 56-kDa del tipo RAC/AKT-*like*, conservada en todas las especies de *Leishmania spp* (93-99% identidad); esta quinasa podría tener un papel importante en la supervivencia del parásito dadas las diferentes condiciones de estrés celular que experimenta durante su complejo ciclo de vida. Esta quinasa RAC/AKT-*like* es un posible ortólogo de la proteína AKT de humanos y de otras especies. La AKT es una quinasa de la familia de proteínas llamadas AGC evolutivamente conservadas en eucariotas; AKT está involucrada en la supervivencia de diferentes tipos de cáncer por lo tanto se considera un importante blanco de la quimioterapia. Esta quinasa forma parte de la ruta de señalización PI3K/AKT la cual controla la supervivencia, metabolismo y ciclo celular, entre otros. En parásitos, esta ruta de señalización no está caracterizada, aunque algunos estudios informáticos plantean la existencia de proteínas asociadas a ella. Para nuestra investigación, se establecieron condiciones de estrés celular, aumentando la temperatura o disminuyendo los nutrientes en el medio de cultivo. Se detectó una fosfo-señal correspondiente a una proteína de 56-KDa en los extractos proteicos. Anticuerpos específicos contra la proteína AKT de humanos reconocieron la proteína; el anticuerpo usado fue un anti-p-AKT (Thr308) y el p-AKT (Ser 473), estos dos sitios son fosfo-activados en la AKT humana para la total actividad de la proteína. En *Leishmania* solo observamos actividad fosfo-treonina y los análisis bioinformáticos revelaron que *Leishmania* tiene una treonina en su motivo hidrofóbico y no una serina como en los humanos. Después de un análisis bioinformático se encontró que solo *T. cruzi* tiene una serina en ese motivo. El gen clonado y secuenciado en este estudio codifica una proteína de 510 aminoácidos con una identidad entre 25-26% con la humana; sin embargo, esta proteína conserva los tres típicos dominios de estas proteínas (Pleckstrin (PH), Quinasa (Ser/Thr) y AGC). Además, utilizando un inhibidor químico de la proteína AKT de humanos en el cultivo de parásitos estresados se obtiene una alta apoptosis-*like* a las pocas horas de su incubación en promastigotes y amastigotes. Datos bioinformáticos del tipo *docking in silico* demuestran una posible interacción entre el inhibidor y la RAC/AKT-*like*. Estudios más profundos de esta quinasa podrán, desarrollar esta idea (RAC/AKT-*like* como diana terapéutica).



## **Presence of a *Rac/Akt*-like gene in *Leishmania* parasites as a putative stress response protein and therapeutic target in leishmaniasis**

Rubén E. Varela-M<sup>1</sup>, Rodrigo Ochoa<sup>2</sup>, Carlos E. Muskus<sup>2</sup>, Antonio Muro<sup>3</sup>, Faustino Mollinedo<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, Spain

<sup>2</sup>Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

<sup>3</sup>Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular, IBSAL-CIETUS, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, Spain

**Short Title:** RAC/AKT-like protein in *Leishmania* stress response

**Funding:** This work was supported by grants from Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (SAF2011-30518), Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer, Instituto de Salud Carlos III, cofunded by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional of the European Union (RD06/0020/1037), Junta de Castilla y León (CSI052A11-2 and CSI221A12-2), and Fundación Ramón Areces 2010-13. REVM was supported by a Torres Quevedo fellowship (Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain – Apointech).

**\*Correspondence:** Faustino Mollinedo, Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E-37007 Salamanca, Spain. Phone: (+34)923-294806, Fax: (+34)923-294795, E-mail: [fmollin@usal.es](mailto:fmollin@usal.es)

**Competing Interests:** The authors disclose no potential conflicts of interest.

## Abstract

**Background:** A subgroup of serine/threonine protein kinases named as related to A and C protein kinases (RAC), or protein kinase B (PKB)/AKT, have been identified in several organisms including *Trypanosoma cruzi* parasites. Despite the role of *Trypanosoma cruzi* PKB protein is unknown, PKB/AKT protein plays a critical role in mammalian cell signaling, promoting cell survival under stress conditions and apoptosis inactivation.

**Methodology/Principal Findings:** We have found that antibodies against human AKT recognized a protein of about 56-kDa in *Leishmania* promastigote extracts. A phosphoprotein band was detected by using anti-human-p-AKT(Thr308), but not anti-human-p-AKT(Ser473), antibodies, in extracts from *Leishmania spp.* exposed to stressful experimental conditions, such as nutrient deprivation or heat shock. Incubation of AKT inhibitor X with *Leishmania spp.* promastigotes under stressful conditions or with *Leishmania*-infected macrophages led to parasite cell death. We have cloned and sequenced a novel gene from *Leishmania donovani* (MHOM/IN/80Dd8), named *Ld-Rac/Akt*-like, that encoded a 510 amino acid protein closely related to RAC/PKB proteins from other *Leishmania* (93-99% identity) and *Trypanosoma* (32-35% identity) species, as well as mammalian AKT1/2/3 (25-26% identity). *Ld-RAC/AKT*-like protein contains the typical pleckstrin, protein kinase and AGC kinase domains, major mammalian PKB/AKT hallmarks. In contrast to mammalian AKT that contains key phosphorylation sites at Thr308 and Ser473 in the activation loop and hydrophobic motif, respectively, *Ld-RAC/AKT*-like protein has a Thr residue

in both motifs. By domain sequence comparison, we classified AKT proteins from different origins in four major categories that included different parasites.

**Conclusions/Significance:** Our data suggest that the herein reported Ld-RAC/AKT-like protein may represent a *Leishmania* ortholog of mammalian AKT, which by functional homology with its mammalian counterpart might be involved in parasite stress response and survival. Thus, this gene might become a new therapeutic target, and inhibition of this putative survival signaling could be a novel approach in antileishmanial drug discovery.

### Author Summary

Leishmaniasis is one of the world's most neglected diseases caused by at least 20 different species of the protozoan parasite *Leishmania*. Although new drugs have become recently available, current therapy for leishmaniasis is still unsatisfactory. Main concerns on the antileishmanial treatments include their toxicity, cost, acquired resistance or lack of total effectiveness. A short number of antileishmanial drugs are currently available, and their mechanisms of action remain to be fully elucidated. Thus, identification of novel therapeutic targets, leading to new drug development, for the treatment of leishmaniasis is urgent. Here, we clone and sequence a *Leishmania donovani* gene, named Ld-RAC/AKT-like, whose encoded protein contains typical domains of an AKT protein. This protein is homologous with the major mammalian survival signaling molecule AKT and shares a similar *in silico* 3D structure with human AKT1. Anti-human AKT antibodies recognized a 56-kDa protein in different *Leishmania spp.* Following incubation under stressful conditions, *Leishmania spp.* parasites

expressed a band protein recognized by anti-phosphorylated AKT and were killed following incubation with an AKT inhibitor. These data suggest that *Ld-RAC/AKT*-like is a *Leishmania* ortholog of mammalian AKT, which might act as a survival signaling in *Leishmania* and could be a new druggable target for leishmaniasis therapy.

## **Introduction**

Leishmaniasis, caused by at least 20 species of the protozoan parasite *Leishmania*, is classified in three different clinical forms, visceral, cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis, which have different immunopathologies and degrees of morbidity and mortality. Visceral leishmaniasis, which results in splenomegaly and hepatomegaly, is caused by *L. donovani* and *L. infantum* and is fatal if not treated. Leishmaniasis is major health problem in many parts of the world, affecting 12 million people worldwide, mainly in developing countries; 350 million people are considered at risk of contracting the disease, and some 2 million new cases occur yearly [134]. In addition, increasing immigration, tourism, and military activity in *Leishmania* endemic areas has posed a risk and threat in expanding the disease to nonendemic areas of the world. The lack of effective vaccines for leishmaniasis makes chemotherapy as the only available treatment for this disease. Major challenges in antileishmanial chemotherapy include availability of rather few drugs, emergence of drug resistance, toxicity and lack of cost-effectiveness analysis. The availability of the complete genome sequence of various species of *Leishmania*, including *L. major*, *L. infantum*, *L. braziliensis*, *L. donovani*, and *L. mexicana* [74, 135-137] is an extraordinary tool to find out new antileishmanial targets. The comparison of the parasite genome

with the human genome sequence will facilitate the identification of genes unique to the parasite as well as the presence of *Leishmania* genes for which drugs are being developed. However, most of the genes found in *Leishmania* parasites remain to be characterized, and less than a half of annotated genes have been assigned gene ontology terms.

The serine/threonine kinase protein kinase B (PKB) or AKT is an important regulator of cell proliferation and survival in mammalian cells. Data accumulated in the last decade have established that AKT also plays a major role in cancer development and progression, prompting the development of drugs targeting this survival pathway in cancer therapy [138]. AKT is a protein kinase that belongs to the AGC family of serine/threonine kinases and has three conserved domains, namely: pleckstrin homology domain (PH), which binds phosphoinositides with high affinity, as well as catalytic and regulatory domains [139]. AKT has a wide range of cellular substrates, and the oncogenicity of AKT arises from activation of both proliferative and anti-apoptotic signaling, thus making this kinase an attractive target for cancer therapy. Activation of mammalian AKT depends on its recruitment to membrane through binding of phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PIP3) to the PH domain of AKT, and subsequent phosphorylation at two key residues, Thr308 and Ser473, located at catalytic domain and C-terminal regulatory domain, respectively [140]. The physiological action of AKT kinase is mediated through the phosphorylation of a wide variety of downstream substrates [139-142]. One of the major AKT substrates is glycogen synthase kinase-3 (GSK-3), which has been recently identified in *Leishmania major* and *Trypanosoma brucei* [143, 144].

A subgroup of Ser/Thr protein kinases, related to protein kinases A and C (RAC) or to PKB/AKT have been identified in a number of mammalian cells [145], *Drosophila melanogaster* [146], *Caenorhabditis elegans* [147], *Dyctiostelium discoideum* [148], *Entamoeba histolytica* [149], *Giardia intestinalis* [150], and *Trypanosoma cruzi* [151]. So far, none of these proteins have been reported in *Leishmania* parasites.

Interestingly, glycogen synthase kinase-3 has been found in *Trypanosma spp.* and *Leishmania spp.*, and can be a drug target in trypanosomatids [143, 144, 152]. The fast adaptability of *Leishmania* parasites to different adverse environments in their life cycle, including changes in temperature, pH, nutrient availability, etc, suggests these protozoa should be provided with an appropriate cell survival machinery. Because glycogen synthase kinase-3 is a major cellular substrate of the cell survival molecule AKT [153], this prompted us to investigate the putative presence of an AKT homolog in *Leishmania* parasites and its putative role as a drug target in the treatment of leishmaniasis.

Here, we show that *Leishmania spp.* genomes express AKT-like genes and we have cloned and sequenced a novel gene, named *Ld-RAC/AKT-like*, from *Leishmania donovani* (MHOM/IN/80Dd8) that encoded a protein closely related to previously reported RAC serine-threonine kinases from other *Leishmania* and *Trypanosoma* species, as well as to mammalian AKT. Our data suggest that *Ld-RAC/AKT-like* protein may behave as a survival molecule in *Leishmania* parasites, and might become a novel target in leishmaniasis therapy.

## **Materials and Methods**

### **Cell culture**

The following *Leishmania* strains were used in this study: *L. panamensis* (MHOM/CO/87/UA140), *L. infantum* (MCAN/ES/96/BCN150), *L. donovani* (MHOM/IN/80/Dd8), and *L. braziliensis* (MHOM/CO/88/UA301). *Leishmania* promastigotes were grown at 26°C in RPMI-1640 culture medium, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin. Promastigotes in stationary phase, used for macrophage infection, were prepared after incubation in cell culture medium of a starting inoculum of  $1 \times 10^6$  parasites/ml for 5-6 days. For the experiments of nutritional stress, the culture medium was prepared as above in the absence of FBS. For the thermal shock assays, parasites were incubated for 3 h at 37°C in complete culture medium as above.

### **Western blot**

$1.5 \times 10^7$  promastigotes were lysed with 180 µl of 150 mM NaCl, 10 mM HEPES, 1% CHAPS, and 0.1 mM sodium orthovanadate, supplemented with protease inhibitors (1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 20 µg/ml aprotinin, and 20 µg/ml leupeptin). Proteins (40-60 µg) were run on SDS-polyacrylamide gels under reducing conditions, transferred to PVDF membranes (Merck Millipore, Billerica, MA), blocked with 5% (w/v) defatted milk powder in 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl and 0.1% (v/v) Tween 20 (TBST) for 90 min at room temperature, and then incubated for 1 h at room temperature or overnight at 4°C with the following primary antibodies: anti-60 kDa phospho-AKT (Thr308) and anti-60 kDa phospho-AKT (Ser473) rabbit polyclonal antibodies, which

recognize the phosphorylated forms at Thr308 and Ser473 respectively in human AKT (Cell Signaling Technology, Beverly, MA) (1:1000 dilution in TBST with 5% BSA), and the anti-60 kDa AKT rabbit polyclonal antibody (H-136) (1:1000 dilution in TBST with 5% BSA) that recognizes the whole human protein AKT1/2/3 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA). Antibody reactivity was monitored with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit IgG, using an enhanced chemiluminescence detection kit ECL-PLUS (GE Healthcare Life Sciences, Piscataway, NJ). Both Fujifilm super RX autoradiography films (Tokyo, Japan) and image capture by Odyssey (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE) were used to visualize immunoreactive bands. Molecular weight of the immunoreactive bands was determined using molecular weight standard markers (Precision Plus Protein™ Standards, BioRad, Hercules, CA).

Analysis for putative AKT substrates was carried out by using the anti-phospho-AKT substrate (RXRXXS\*/T\*) (23C8D2) rabbit monoclonal antibody (Cell Signaling technology) in total *Leishmania* protein extracts. This antibody recognizes endogenous proteins containing phospho-Ser/Thr preceded by Arg at positions -5 and -3 in a manner largely independent of the surrounding amino acid sequence. Minor cross-reactivity is observed for proteins that contain phospho-Ser/Thr preceded by Arg at position -3 only. No cross-reactivity is observed with the corresponding nonphosphorylated sequences or with other phospho-Ser/Thr-containing motifs.

### **Analysis of apoptosis-like cell death by flow cytometry**

Two million *Leishmania spp.* promastigotes were treated as indicated, and then parasites were pelleted by centrifugation (1000 x g) for 5 min, and analyzed for



apoptosis-like DNA breakdown by flow cytometry following a protocol previously described [154]. Quantitation of apoptotic cells was monitored as the percentage of cells in the sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> region (hypodiploidy) in cell cycle analysis [154, 155], using a fluorescence-activated cell sorting (FACS) Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) equipped with a 488 nm argon laser. WinMDI 2.8 software was used for data analysis. In addition, photographs of the parasites, before starting their preparation for flow cytometry assays, were taken using a Zeiss Axioplan microscope (Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Germany) at 40X magnification.

#### **Infection of J774 macrophages with *L. panamensis***

The mouse macrophage-like cell line J774, grown in RPMI-1640 culture medium, supplemented with 10% FBS, 2 mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, and 100 µg/ml streptomycin, at 37°C in humidified 95% air and 5% CO<sub>2</sub>, was infected overnight at the exponential growth phase ( $3 \times 10^5$  cells/ml) with stationary-phase *L. panamensis* promastigotes, at a macrophage/promastigote ratio of 1/10 in complete RPMI-1640 culture medium. Non-internalized promastigotes were removed by 2-3 successive washes with PBS. *Leishmania*-infected macrophages were treated with 10 µM AKT inhibitor X (10-(4'-(N-diethylamino)butyl)-2-chlorophenoxazine) (Calbiochem) for 24 h and then stained with Giemsa to calculate the number of intracellular amastigotes in 100 infected macrophages. In addition, untreated control and AKT inhibitor X-treated infected macrophages were pelleted and the percentage of apoptotic macrophages was analyzed by flow cytometry as indicated above.

### **mRNA isolation and cDNA synthesis in *L. donovani***

Total RNA from  $1 \times 10^7$  *L. donovani* (MHOM/IN/80/Dd8) promastigotes was isolated using the RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. RNA preparations were carefully checked by gel electrophoresis and found to be free of DNA contamination. Total RNA (2  $\mu$ g), primed with 1  $\mu$ M oligo-(pdT)<sub>15</sub>, was reverse-transcribed into cDNA with 10 units AMV reverse transcriptase (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland), according to the manufacturer's instructions for 1 h at 42°C in a final volume of 20  $\mu$ l. To evaluate the quality of the generated cDNA, we amplified the constitutively expressed gene *kmp-11* (GenBank/EMBL accession no. XM\_003864757) as previously described [156]. KMP11 protein is one of the most abundant molecules in the cell surface of *Leishmania spp.* parasites. The sense and antisense primers for *kmp11* gene cDNA amplification were 5'-ATGGCCACCACGTACGAGGAG-3' and 5'-GGACGGGTACTGCGCAGCCTT-3'. PCR was performed in a GeneAmp PCRsystem model 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). PCR amplification was as follows: 1 cycle at 95°C for 5 min as an initial denaturation step, then denaturation at 95°C for 1 min, annealing for 1 min at 58°C, and extension at 72°C for 1 min (30 cycles). PCR products (236 bp) were electrophoresed on 2% agarose gels in 1X TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA (pH 8.0)) and visualized by staining with 0.5  $\mu$ g/ml ethidium bromide.

### **Cloning and sequencing of *Ld-Rac/Akt*-like gene**

The cDNA generated as above was submitted to PCR by using the following sense and antisense primers: 5'-CACCATGAGTGGTATTGGAAGGTGCT-3'

and 5'-GGATCCCTACTTCGTGGGCTTGTCG-3', designed from *L. major* LmjF.30.0800 (GenBank/EMBL accession no. XM\_001684621). PCR reaction was performed in the presence of 8% DMSO, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM dNTPs, 2.5 units of GoTaq DNA polymerase, and 1.5 units Pfu DNA polymerase (Promega). PCR was performed in a GeneAmp PCRsystem model 9600 (Perkin-Elmer, Norwalk, CT). PCR amplification was as follows: 1 cycle at 95°C for 5 min as an initial denaturation step, then denaturation at 95°C for 30 s, annealing for 50 s at 61°C, and extension at 72°C for 1 min (35 cycles), followed by further incubation for 15 min at 72°C (1 cycle). PCR product (about 1.5 Kb) was electrophoresed on 1% agarose gels in 1X TAE buffer (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA (pH 8.0)), and visualized by ethidium bromide staining. PCR bands were cut, and the amplified DNA was isolated by using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare), following the manufacturer's instructions. Quantification of the isolated DNA was performed by using a NanoDrop™ 8000 spectrophotometer (Thermo Scientific). The 1533-bp amplified product was cloned into the PCR 2.1 TOPO® vector (Invitrogen), following the manufacturer's instructions, and using a vector/insert ratio of 1:3. DNA sequencing was performed by thermal cycle sequencing using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems). DNA sequencing was performed on both strands from at least 6 independent cDNA clones.

### **Bioinformatic analysis of protein sequence identity and similarity**

BlastX, ClustalW2, PROSITE and Uniprot databases were used to determine percentages of identity and similarity among different proteins and domains. The Uniprot accession numbers used in sequence analysis were as follows: *H.*

*sapiens* AKT1 (P31749), *H. sapiens* AKT2 ([P31751](#)), *H. sapiens* AKT3 ([Q9Y243](#)), *M. musculus* (P31748), *C. familiaris* (E2RJX4), *D. melanogaster* (Q8INB9), *S.mansoni* ([G4M056](#)), *C. elegans* ([Q17941](#)), *D.discoideum* (P54644), *E. histolytica* ([Q761W9](#)), *L. mexicana* ([E9B0K7](#)), *L. braziliensis* ([A4HI35](#)), *L. infantum* ([A4I5B1](#)), *L. major* ([Q4Q7M5](#)), *L. donovani* ([E9BLH8](#)), *T. cruzi* (Q4D6D3), *T.brucei* (Q584T1), *T.vivax* (G0TWP8), *T. rubrum* (F2SV36), *G. intestinalis* ([C6M0B9](#)), *P.yoeli* ([Q7RSF6](#)), *P.falciparum* ([Q8I4W3](#)).

### **Protein modeling and inhibitor docking**

Because the 3D structure of the herein reported *Ld*-RAD/AKT-like protein is lacking by experimental methods, we used a virtual structural model based on its homology with human AKT1 protein, previously reported in the Protein Data Bank (PDB). The model was built using the ESyPred3D Web Server 1.0 program [157]. The structure of the AKT inhibitor X was obtained from ZINC database [158] in mol2 format. In order to improve the modeling for the putative interaction between protein and ligand, we carried out a pairwise alignment between *Ld*-RAC/AKT-like protein and human AKT1, mapping the residues of the active site [159]. Then, the inhibitor was docked into the *Ld*-RAC/AKT-like protein using the AutoDock VINA software [160].

### ***In silico* detection of the interactions of *Ld*-RAC/AKT-like protein with other parasite proteins**

To determine the putative interactions of the *Ld*-RAC/AKT-like protein with other *Leishmania* proteins, we used an *in silico* interactome based approach as previously described [161] using PSIMAP, PEIMAP and iPfam databases.

Putative interactions with AKT were analyzed from the *Leishmania* databases for which this information was available (*L. major*, *L. braziliensis* and *L. infantum* databases). Only interactions with proteins containing the typical RXRXX(S/T) phosphorylation site, present in AKT substrates, through NetPhos 2.0 program [162], were taken into consideration.

### **Statistical analysis**

Data are shown as mean  $\pm$  SD. Between-group statistical differences were assessed using the Student's *t* test. A *P*-value of  $< 0.05$  was considered statistically significant.

### **Results**

#### ***Leishmania* parasites express an AKT-immunoreactive protein that is phosphorylated at Thr residue under stress conditions**

Because AKT signaling plays a critical role in the survival of mammalian cells, we examined whether anti-human AKT antibodies recognized a band in *Leishmania* parasites. We found that Western blot analyses of *L. panamensis* (MHOM/CO/87/UA140) and *L. infantum* (MCAN/ES/96/BCN150) promastigotes, previously grown in the presence or absence of fetal bovine serum (FBS), with anti-human AKT monoclonal antibody recognized a band of about 56 kDa in promastigote extracts (Fig. 1A). Interestingly, we also found a 56-kDa band that was immunoreactive against anti-human pAKT(Thr308) antibodies only when parasites were incubated in the absence of serum (Fig. 1A). Similarly, *L. panamensis* and *L. donovani* (MHOM/IN/80/Dd8) promastigotes also expressed the above Akt-immunoreactive protein (Fig. 1B), as well as a protein of about 56 kDa by using the anti human-p-AKT(Thr308) antibody when parasites were

submitted to a heat shock at 37°C (Fig. 1B). However, no band was detected when anti-human p-AKT(Ser473) was used in parasites grown under stressful conditions (data not shown). These data suggest that *Leishmania spp.* promastigotes express an AKT-like protein that could be recognized by the anti-human AKT antibody, and that this parasite protein can be phosphorylated in Thr residues, but not in Ser residues.

### **AKT inhibition induces apoptosis-like cell death in *Leishmania* parasites under stress conditions**

Next, we analyzed the effect of AKT inhibitor X that prevents phosphorylation of AKT in mammalian cells [163]. We found that incubation of  $2 \times 10^6$  *Leishmania* promastigotes from different species, including *L. panamensis*, *L. braziliensis* (MHOM/CO/88/UA301), *L. infantum* and *L. donovani*, with AKT inhibitor X did not affect cell viability, provided serum was present in the culture medium (Fig. 2A), but AKT inhibitor X induced a potent apoptosis-like cell death, assessed by the increase in the percentage of hypodiploid cells as an indication of DNA breakdown as well as by changes in morphology, when parasites were submitted to stress conditions, such as serum deprivation or incubation at 37°C (Fig. 2, A-D).

### **AKT inhibition kills *Leishmania* amastigotes inside macrophages**

Interestingly, we also found that AKT inhibitor X killed J774 macrophage-residing *L. panamensis* amastigotes by examining the parasitic burden of macrophages by Giemsa staining (Fig. 3A), whereas macrophages were spared as assessed by flow cytometry (Fig. 3B).

## **Cloning and sequence of a gene coding for a protein in *Leishmania donovani* (MHOM/IN/80Dd8) that has similarities to mammalian AKT**

Because the above data suggested the presence of an AKT-like protein in *Leishmania* parasites, we analyzed the presence of a putative sequence similar to mammalian AKT in the already sequenced genome of Nepalese *L. donovani* (MHOM/NP/02/BPK282A1). We found that a gene named as *LDBPK\_300850* (RAC serine-threonine kinase, putative) showed a 26.3% identity with the sequence of human AKT1. By using PCR oligonucleotides designed from *LDBPK\_300850*, we generated fragments by RT-PCR from Indian *L. donovani* (MHOM/IN/80Dd8) mRNA, which were subsequently cloned and sequenced. Following this strategy, we isolated and sequenced the *LDBPK\_300850* homolog from *L. donovani* (MHOM/IN/80Dd8). We coined this gene as *Ld-Rac/Akt*-like gene, indicating its origin and the similarity to the previous parasite *Rac*-like and mammalian *Akt* genes. The *Ld-Rac/Akt*-like cDNA codes for a protein sequence of 510 amino acids with a deduced molecular mass of about 57612.5 Da and a theoretical isoelectric point (pI) of 6.25. This *Ld-RAC/AKT*-like protein contains the typical pleckstrin (PH domain), protein kinase and AGC kinase domains, which represent the major hallmarks of mammalian PKB/AKT proteins (Fig. 4).

We found a small number of differences, namely thirty two nucleotides (97.8% identity) and 5 amino acid residues (99% identity), when the corresponding *L. donovani* (MHOM/IN/80Dd8) and *L. donovani* (MHOM/NP/02/BPK282A1) homologous sequences were compared. The amino acid sequence of *Ld-RAC/AKT*-like showed a 26.5% identity and 43.2% similarity to the corresponding human AKT1 coding region (Table 1). By using

the ESyPred3D Web Server 1.0 program, we found that the structure of this *Ld*-RAC/AKT-like protein is similar to that of human AKT1 (Figure 5A). By using the Docking Software AutoDock VINA, *Ld*-RAC/AKT-like protein could interact with AKT inhibitor X (Figure 5B). Using the AutoDock VINA software for binding prediction, the AKT inhibitor X docked into the *Ld*-RAD/AKT-like protein with a -7.5 kcal/mol, whereas the interaction between AKT inhibitor X and human AKT1 was -8.8 kcal/mol, in a 0 to -14 Kcal/mol scale, the latter value representing the highest probability of interaction.

### **Presence of Akt-like genes in *Leishmania* and *Trypanosoma* parasites**

A comparison of the *Ld*-RAC/AKT-like protein sequence with those derived from the genome sequences already available in the databases from *Leishmania* and *Trypanosoma* parasites showed a strong similarity in their respective primary structures (*Leishmania*: 92.9-99% identity, 94.5-99.2% similarity; *Trypanosoma*: 32.5-34.6 identity, 46.3-48.4% similarity) (Table 2). This protein also contained the 12 conserved subdomains of the eukaryotic protein kinase domain, which were also present in the predicted homologous sequences of trypanosomatids (Fig. 6). A more extensive comparative analysis of the sequences showing homology with human AKT in different biological systems, regarding the whole sequence as well as the major PH, kinase and AGC domains, is shown in Supplementary Fig. S1, and prompted us to classify this large family of genes in four major categories (Fig. 7). The *Leishmania* group shows a longer C-terminal sequence, whereas there is another category that lacks the PH domain (Fig. 7).



## Differential presence of Thr and Ser amino acid residues at the phosphorylation sites in mammalian and *Leishmania Akt*-like genes

The full activation of mammalian AKT is accomplished by its phosphorylation at two key residues, Thr308 and Ser473 [140]. Thr308 site is localized in the activation loop, while Ser473 is localized in the C-terminal hydrophobic motif of mammalian AKT. Interestingly, AKT-like proteins from *Leishmania spp.* have the Thr residue in the activation loop, but showed another Thr residue instead of the mammalian Ser residue at the hydrophobic motif (Fig. 8). Thus, the typical FPQFSY hydrophobic motif of mammalian AKT becomes LAGYTY in *Leishmania* parasites (Fig. 8). The absence of this Ser residue might explain the lack of detection of a protein band in *Leishmania spp.* extracts when an anti-p-AKT(Ser473) antibody was used, as stated above. Likewise, the corresponding AKT-like sequences from *T. brucei* and *T. vivax* also lacked the Ser residue at the hydrophobic motif (Fig. 8). However, the AKT-like amino acid sequence from *T. cruzi* contained the Ser residue at the hydrophobic motif (IACFSF) (Fig. 8), and therefore it was the only Trypanosomatidae that showed homology with mammalian AKT regarding these critical phosphorylation sites.

## Discussion

Our data reveal that *Leishmania donovani* parasites express the *Ld-Rac/Akt-like* gene encoding a protein that shows a significant identity (26.5%) and similarity (43.2%) with mammalian PKB/AKT, and antibodies against human AKT recognize a protein in *Leishmania spp.* that is phosphorylated under stressful conditions, including nutrient deprivation and heat shock. Comparison of the *Ld-RAC/AKT*-like protein amino acid sequence with those of known eukaryotic

Ser/Thr protein kinases indicate that the newly described *L. donovani* protein belongs to the RAC or PKB/AKT subgroup of proteins. Because PKB/AKT plays a major role in survival signaling in mammalian cells, our data suggest that the herein reported *Ld-Rac/Akt*-like gene could represent part of a PKB/AKT signaling pathway present in trypanosomatids, and thereby could play a role in *Leishmania* survival during its complex life cycle. On these grounds, inhibition of this AKT-like signaling pathway in *Leishmania* could be a novel approach in the search of anti-*Leishmania* drugs, thus sensitizing parasites to undergo apoptosis. The induction of apoptosis-like cell death in *Leishmania spp.* by the AKT inhibitor X, when parasites are submitted to stressful conditions, further supports the involvement of an AKT signaling pathway in *Leishmania* parasite survival. Figure 9 portrays a scheme involving the *Ld-RAC/AKT*-like protein in the stress response of parasites under conditions where the life of the parasite might be at risk. According to this model, parasites growing in nutrient-deficient medium or at high temperature might defend themselves by triggering phosphorylation of the *Ld-RAC/AKT*-like protein, thus prompting a survival response against detrimental conditions. Our data suggest that blocking this response by an AKT inhibitor would lead to parasite cell death, as the parasite will become defenseless against the aggressive insult. The fact that identity between *Ld-RAC/AKT*-like protein and human AKT is 26.5% suggests the existence of differences that might be exploited to identify drugs, which could selectively inhibit *Leishmania* AKT homolog.

Following sequence comparison, we postulate the evolutionary conservation of the PKB/AKT signaling pathway in different parasites. Trypanosomatidae parasite homologs contain the hallmark traits of PKB/AKT

proteins, such as pleckstrin, protein kinase and AGC kinase domains. Here we classify the AKT family of proteins in four major categories that include the parasitic homologs, *Leishmania* forming a major group by their own. Only one category, comprised of *P. falciparum*, *P. yoeli*, *T. rubrum* and *G. intestinalis*, lacks the pleckstrin-homologous domain. Interestingly, while mammalian AKT is activated through phosphorylation at both Thr308 and Ser473 key residues in the activation loop and hydrophobic motif [140], the *Leishmania* AKT homolog lacks the corresponding Ser residue and shows Thr in both motifs. It is worth to note that, unlike *Leishmania* parasites, *T. cruzi* homolog, but not *T. brucei* and *T. vivax* homologs, contains both Thr and Ser residues in its sequence, similarly to what occurs in human PKB/AKT.

Interestingly, we have also found that nutrient deprivation and incubation at 37°C allowed to identify a number of proteins by Western blot using a phospho-Akt substrate antibody recognizing proteins containing the AKT phosphorylation motif RXRXXS\*/T\* (Varela-M, R.E. and Mollinedo, F., unpublished observations). In this regard, Supplementary Table S1 shows 54 kinases that were found to be putative substrates of the homolog *L. infantum* RAC/AKT-like protein following *in silico* detection of the protein-protein interactions from the *Leishmania* databases for which this information was available. Similar data were obtained with the *L. braziliensis* y *L. major* databases (data not shown). Thus, this RAC/AKT-like protein is suggested to play a critical role in the regulation of phosphorylation processes in *Leishmania* parasites.

Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinase and PKB/AKT activities by *T. cruzi* has been shown to be an early invasion signal required for

trypomastigote internalization [164]. Thus, PKB/AKT signaling is associated with parasite invasion and survival, and therefore it might represent a novel target in the treatment of leishmaniasis. Taken together, the identification of *Ld*-RAC/AKT-like protein may lead to the eventual design of approaches and drugs targeting *Leishmania* parasites.

## References

1. WHO (2010) Control of the leishmaniases. World Health Organ Tech Rep Ser 949: 1-186.
2. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, et al. (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. Science 309: 436-442.
3. Peacock CS, Seeger K, Harris D, Murphy L, Ruiz JC, et al. (2007) Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. Nat Genet 39: 839-847.
4. Downing T, Imamura H, Decuypere S, Clark TG, Coombs GH, et al. (2011) Whole genome sequencing of multiple *Leishmania donovani* clinical isolates provides insights into population structure and mechanisms of drug resistance. Genome Res 21: 2143-2156.
5. Rogers MB, Hilley JD, Dickens NJ, Wilkes J, Bates PA, et al. (2011) Chromosome and gene copy number variation allow major structural change between species and strains of *Leishmania*. Genome Res 21: 2129-2142.

6. Falasca M (2010) PI3K/Akt signalling pathway specific inhibitors: a novel strategy to sensitize cancer cells to anti-cancer drugs. *Curr Pharm Des* 16: 1410-1416.
7. Brazil DP, Hemmings BA (2001) Ten years of protein kinase B signalling: a hard Akt to follow. *Trends Biochem Sci* 26: 657-664.
8. Franke TF (2008) PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene* 27: 6473-6488.
9. LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA (2008) Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Updat* 11: 32-50.
10. Hers I, Vincent EE, Tavaré JM (2011) Akt signalling in health and disease. *Cell Signal* 23: 1515-1527.
11. Ojo KK, Arakaki TL, Napuli AJ, Inampudi KK, Keyloun KR, et al. (2011) Structure determination of glycogen synthase kinase-3 from *Leishmania major* and comparative inhibitor structure-activity relationships with *Trypanosoma brucei* GSK-3. *Mol Biochem Parasitol* 176: 98-108.
12. Ojo KK, Gillespie JR, Riechers AJ, Napuli AJ, Verlinde CL, et al. (2008) Glycogen synthase kinase 3 is a potential drug target for African trypanosomiasis therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 3710-3717.
13. Song G, Ouyang G, Bao S (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* 9: 59-71.
14. Scanga SE, Ruel L, Binari RC, Snow B, Stambolic V, et al. (2000) The conserved PI3K/PTEN/Akt signaling pathway regulates both cell size and survival in *Drosophila*. *Oncogene* 19: 3971-3977.

15. Paradis S, Ruvkun G (1998) *Caenorhabditis elegans* Akt/PKB transduces insulin receptor-like signals from AGE-1 PI3 kinase to the DAF-16 transcription factor. *Genes Dev* 12: 2488-2498.
16. Meili R, Ellsworth C, Firtel RA (2000) A novel Akt/PKB-related kinase is essential for morphogenesis in *Dictyostelium*. *Curr Biol* 10: 708-717.
17. Que X, Reed SL (1994) Expression and characterization of a rac family protein kinase of *Entamoeba histolytica*. *Mol Biochem Parasitol* 66: 111-118.
18. Kim KT, Mok MT, Edwards MR (2005) Protein kinase B from *Giardia intestinalis*. *Biochem Biophys Res Commun* 334: 333-341.
19. Pascucci V, Labriola C, Tellez-Inon MT, Parodi AJ (1999) Molecular and biochemical characterization of a protein kinase B from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 102: 21-33.
20. Xingi E, Smirlis D, Myrianthopoulos V, Magiatis P, Grant KM, et al. (2009) 6-Br-5methylindirubin-3'oxime (5-Me-6-BIO) targeting the leishmanial glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) short form affects cell-cycle progression and induces apoptosis-like death: exploitation of GSK-3 for treating leishmaniasis. *Int J Parasitol* 39: 1289-1303.
21. Liang J, Slingerland JM (2003) Multiple roles of the PI3K/PKB (Akt) pathway in cell cycle progression. *Cell Cycle* 2: 339-345.
22. Gajate C, Santos-Beneit AM, Macho A, Lazaro M, Hernandez-De Rojas A, et al. (2000) Involvement of mitochondria and caspase-3 in ET-18-OCH<sub>3</sub>-induced apoptosis of human leukemic cells. *Int J Cancer* 86: 208-218.
23. Gajate C, Barasoain I, Andreu JM, Mollinedo F (2000) Induction of apoptosis in leukemic cells by the reversible microtubule- disrupting

- agent 2-methoxy-5-(2',3',4'-trimethoxyphenyl)-2,4,6-cycloheptatrien-1-one: protection by Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub> and cell cycle arrest. *Cancer Res* 60: 2651-2659.
24. Ramirez JR, Berberich C, Jaramillo A, Alonso C, Velez IV (1998) Molecular and antigenic characterization of the *Leishmania (Viannia) panamensis* kinetoplastid membrane protein-11. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 247-254.
25. Lambert C, Leonard N, De Bolle X, Depiereux E (2002) ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics* 18: 1250-1256.
26. Irwin JJ, Sterling T, Mysinger MM, Bolstad ES, Coleman RG (2012) ZINC: A free tool to discover chemistry for biology. *J Chem Inf Model* (In press).
27. Blake JD, Cohen FE (2001) Pairwise sequence alignment below the twilight zone. *J Mol Biol* 307: 721-735.
28. Trott O, Olson AJ (2010) AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31: 455-461.
29. Florez AF, Park D, Bhak J, Kim BC, Kuchinsky A, et al. (2010) Protein network prediction and topological analysis in *Leishmania major* as a tool for drug target selection. *BMC Bioinformatics* 11: 484.
30. Blom N, Gammeltoft S, Brunak S (1999) Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J Mol Biol* 294: 1351-1362.
31. Thimmaiah KN, Easton JB, Germain GS, Morton CL, Kamath S, et al. (2005) Identification of N10-substituted phenoxazines as potent and specific inhibitors of Akt signaling. *J Biol Chem* 280: 31924-31935.

32. Wilkowsky SE, Barbieri MA, Stahl P, Isola EL (2001) *Trypanosoma cruzi*: phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. *Exp Cell Res* 264: 211-218.



## **FIGURE LEGENDS**

**Figure 1. Anti-Akt and anti-pAkt immunoreactive bands in *Leishmania* parasites under resting and stressful conditions.** (A) *L. panamensis* and *L. infantum* promastigotes were cultured in the presence (+FBS) or absence (-FBS) of FBS, and protein extracts were submitted to Western blot using anti-human Akt 1/2/3 and anti-pAkt(Thr308) polyclonal antibodies. (B) *L. panamensis* and *L. donovani* promastigotes were cultured at 26°C or 37°C, and protein extracts were submitted to Western blot using anti-human Akt 1/2/3 and anti-pAkt(Thr308) polyclonal antibodies. The positions of the immunoreactive bands are indicated by arrows. Experiments shown are representative of 3 performed.

**Figure 2. Apoptosis-like cell death induced by AKT inhibitor X in *Leishmania* parasites.** (A) Promastigotes of different *Leishmania* spp. were incubated for 14 h at 26°C in the presence (+FBS) or absence (-FBS) of FBS, and without (Control) or with 5 µM AKT inhibitor X. Then, parasites were collected and analyzed for the induction of apoptosis-like cell death as assessed by the percentage of parasites in the sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> region (hypodiploid cells) by flow cytometry. (B) *L. donovani* promastigotes were incubated at 26°C for 14 h in the presence of FBS (+FBS, Control), or in serum deficient medium (-FBS) containing 5 µM AKT inhibitor X, and then photographs were taken. (C) Promastigotes of different *Leishmania* spp. were incubated at 37°C for 3 h in the presence or absence (Control) of 5 µM AKT inhibitor X. Then, parasites were collected and analyzed for the induction of apoptosis-like cell death as

assessed by the percentage of parasites in the sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> region (hypodiploid cells) by flow cytometry. (D) *L. donovani* promastigotes were incubated for 3 h at 26°C in the absence (Control) or at 37°C in the presence of 5 µM AKT inhibitor X, and then photographs were taken. Data shown are means ± SD or representative of 3 independent experiments. Asterisks indicate statistically significant differences with respect of control values. (\*\*)  $P < 0.01$ .

**Figure 3. Antileishmanial activity of AKT inhibitor X against intracellular *Leishmania* amastigotes without induction of macrophage apoptosis.** (A) J774 macrophage-like cells infected with *L. panamensis* were untreated (Control) or treated with 10 µM AKT inhibitor X for 24 h. Then, the number of intracellular amastigotes was quantified by Giemsa staining (A), and the percentage of apoptotic macrophages was assessed through the percentage of mammalian cells at the sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> region (hypodiploid cells) by flow cytometry (B). Asterisks indicate statistically significant differences with respect of control values. (\*\*)  $P < 0.01$ .

**Figure 4. Primary structure of *Ld*-RAC/AKT-like protein.** The nucleotide and predicted amino acid sequences of *Ld*-RAC/AKT-like protein are available from GenBank/EMBL database under accession number HF548848. The PH, kinase and AGC kinase domains of the *Ld*-RAC/AKT-like protein are underlined in green, blue and red, respectively. This primary sequence shows 5 differences in amino acids (underlined in black) when compared to a previously homologous sequence from another *L. donovani* strain (MHOM/NP/02/BPK282A1) (Genbank/EMBL accession number: XM\_003862750).

**Figure 5. Prediction of 3D structures of human AKT1 and *Ld*-RAC/AKT-like protein, and interaction with AKT inhibitor X.** (A) Human AKT1 and *Ld*-RAC/AKT-like proteins were modeled using the ESyPred3D Web Server 1.0 program. The  $\alpha$ -helical and  $\beta$ -strand domains are colored magenta and yellow, respectively, while turns are colored violet. (B) Different views of the predicted interaction between *Ld*-RAC/AKT-like protein and AKT inhibitor X using the AutoDock VINA software. (Upper left) The whole protein surface is shown and the black arrow indicates the location of the inhibitor X. (Upper right) The cavity of the ATP binding pocket at higher magnification is displayed, showing the interaction with AKT inhibitor X. The images at the lower panels show the inhibitor X within the ATP binding pocket in horizontal and vertical position interacting with the protein.

**Figure 6. Alignment of the catalytic domains of the distinct RAC/AKT-like proteins present in *Leishmania spp.* and *Trypanosoma spp.* parasites.** Multiple sequence alignment was performed using the ClustalW program. Asterisks indicate identity and small dashes represent similarity. The distinct conserved subdomains of the catalytic domain are indicated by Roman numerals (I-XI).

**Figure 7. Classification of RAC/AKT-like proteins in four major subcategories.** This scheme depicts the alignment of the different amino acid sequences corresponding to RAC/AKT-like proteins in four major subcategories, based on the presence of the three typical PH (green), kinase

(blue) and AGC (red) domains of AKT proteins. The last group does not contain the PH domain but it is included here because of its homology regarding the other two domains. The *Leishmania* group shows a longer C-terminal sequence.

**Figure 8. Differences in the amino acids involved in AKT phosphorylation in the RAC/AKT-like protein family.** The alignments of the distinct VIb catalytic loop, VIII activation loop and hydrophobic motif, where D is important for phosphotransference, T for AKT phosphoactivation, and S for AKT activity potentiation, respectively, are shown, with the above amino acid residues highlighted in bold. RAC/AKT-like proteins from *Leishmania spp.* have T instead of S in the hydrophobic motif. Likewise, proteins derived from *T. brucei* and *T. vivax* have T instead of S, whereas *T. cruzi* shows the same S residue as the human AKT1.

**Figure 9. Schematic model for the putative action of RAC/AKT-like protein in the survival and cell death responses of *Leishmania* parasites under stressful conditions.** This is a schematic view of the putative role of *Ld*-RAC/AKT-like protein in cell death and survival of *Leishmania* parasites based on the data reported here. See text for details.

Figure 1  
Varela-M et al.

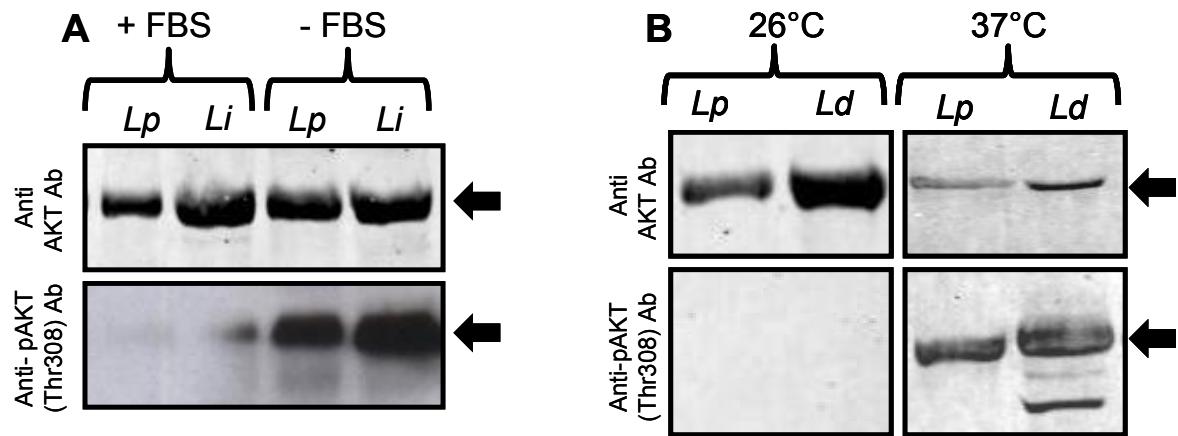


Figure 2  
Varela-M et al.

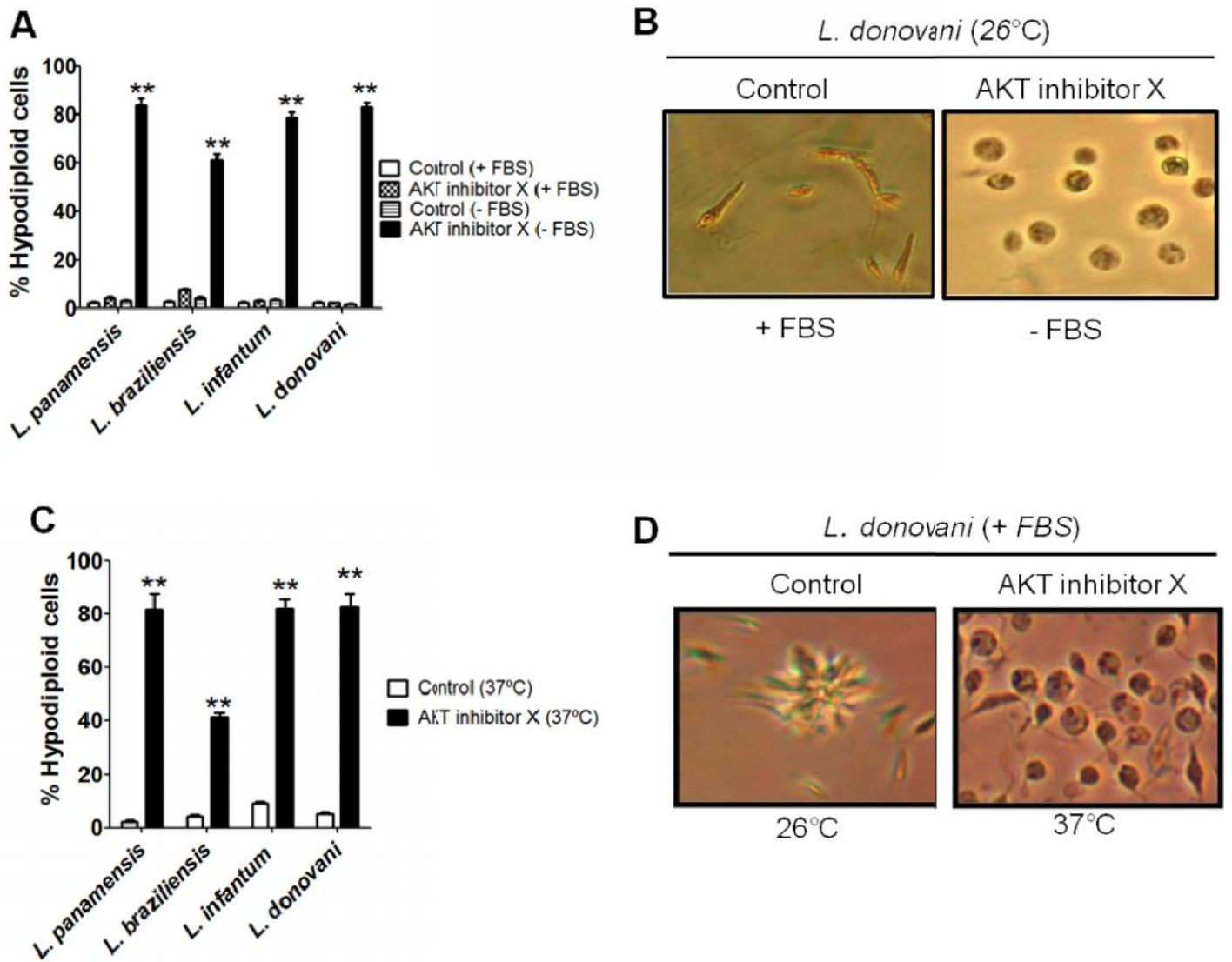


Figure 3  
Varela-M et al.

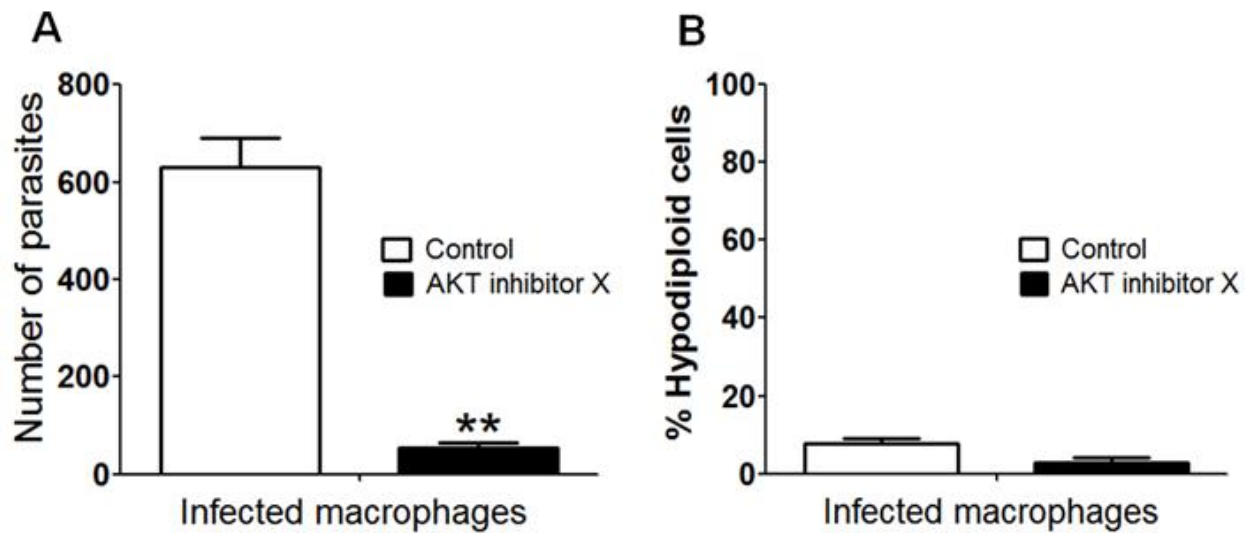
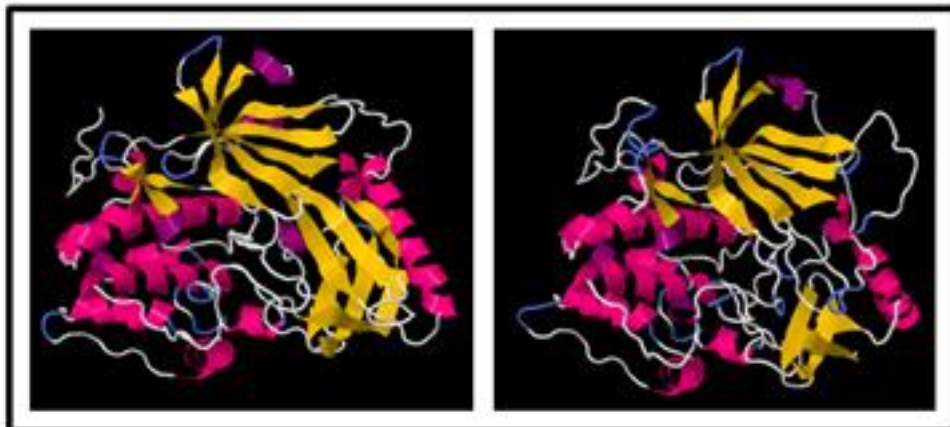


Figure 4  
Varela-M et al

MSGYLKVLSPDGRWETRYIEIDDAKLRIWRTKGDKESSAAVVKELDLKCATLREVSEPN  
TWAVOPEKAEATYFOADGEERKTEWMDTLRHYNSSSSGSEKVTLRDFEKKFVLGKGSYG  
KVFMVVKKDTDKWYAMKEMSAEKMROAEIKAPFAERIILEEIDHPFIVHLHYSFOEQGN  
LYMILDLLAGGELFTYIEQHAPLDEEVVKFYAAEVALALGYLHSRNIIYRDLKPENVVF  
DRDGHACLTDFGLAKANVHEPNAVTYCGTNEYLAPELLKGVPHGKAVDWWSLGLMMCEM  
LFNDLPFYDENPMOMOMKILTEDVAFPPHIQITEETKDLIRCLLNKNPERRLOTLAFAK  
AHKCFSNLDFGLLEARKLKAPITPDPNPAHNFAKEFTSEVIVQNESPSOAVVTLAGYTY  
DRDLSEQEKSPSHSPTIAEELRQRRASKKRSTNGSDAASPVTGENRPSNSSPAGAPTK  
QAAGGPVKKVEHHIPAKVAPQAARKKLTGNKSFDKPTK

Figure 5  
Varela-M et al.

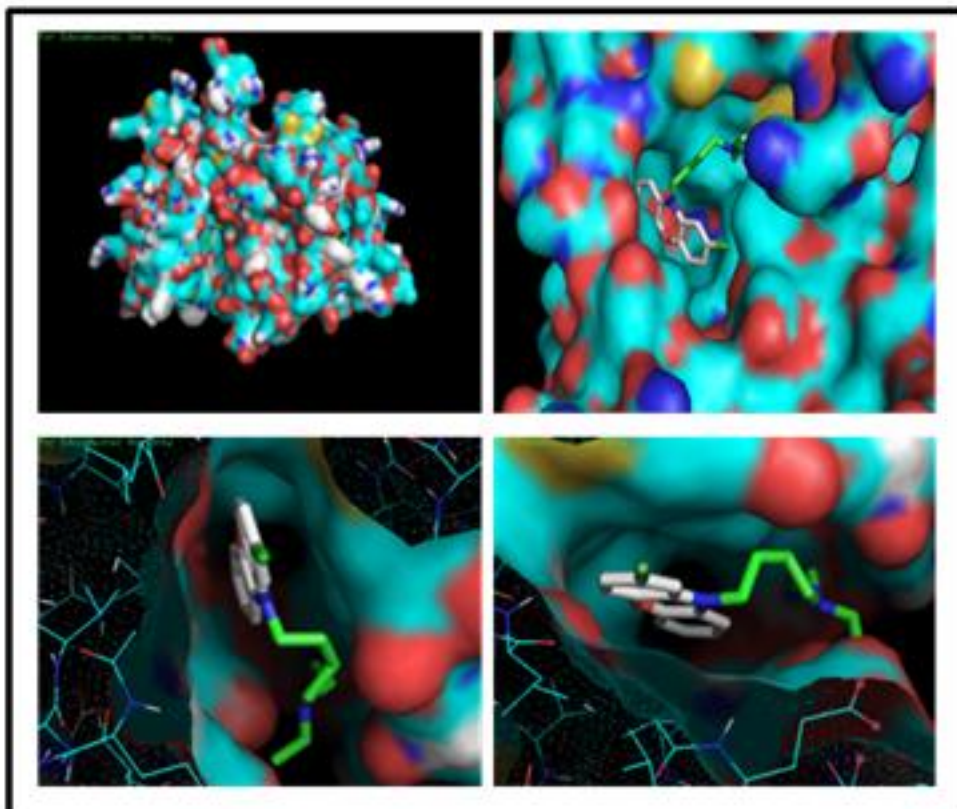
A



AKT1  
*Homo sapiens*

*Ld*-RAC/AKT-like protein

B



Interaction between *Ld*-RAC/AKT-like protein and AKT inhibitor X



Figure 6  
Varela-M et al.

	I	II		III	IV	V	VIa
<i>L. donovani</i> (India)	--SSSGSEKVTLRDFEKKFVLGKGSYGKVFVMVVKDDTKWYAMKEMSAEKMRQAE- IKAP						
<i>L. donovani</i> (Nepal)	--SSSASEKVTLRDFEKKFVLGKGSYGKVFVMVVKDDTKWYAMKEMSAEKMRQAE- IKAP						
<i>L. braziliensis</i>	--SSIGSEKVTLSDFEKKFVLGKGSYGKVFVMVVKDDTKWYAMKEMSAEKMRQAE- IKAP						
<i>L. infantum</i>	--SSSASEKVTLRDFEKKFVLGKGSYGKVFVMVVKDDTKWYAMKEMSAEKMRQAE- IKAP						
<i>L. major</i>	--SSSGSEKVTLRDFEKKFVLGKGSYGKVFVMVVKDDTKWYAMKEMSAEKMRQAE- IKAP						
<i>L. mexicana</i>	--GSTGSEKVTLRDFEKKFVLGKGSYGKVFVMVVKDDTKWYAMKEMSAEKMRQAE- IKAP						
<i>T. cruzi</i>	TLYTGGRHKVSLLDDFELKATIGAGSFSNVFVAREKSTDKVYAIKEMGKELIQHNMLNSNI						
<i>T. brucei</i>	PLCSGGSNRVSLNDFQFAAKIGKGSFSSVYAATEKATGKTYAIKKMEKEVIERYNMIDNI						
<i>T. vivax</i>	TL--YGDVKVSLNDFEVTITIGKGSFVYAAREKSTNKLYAVKEMKEVIERANMLENI						
	. . :*: * **:	: * **:	: * **:	: * **:	: * **:	: * **:	: * **:
<i>L. donovani</i> (India)	FAERIILEEIDHPPFIVHLHYSFQEQGNLYMILDLLAGGELFTYIEQHAPLDEEVVKFYAA						
<i>L. donovani</i> (Nepal)	FAERIILEEIDHPPFIVHLHYSFQEQGNLYMILDLLAGGELFTYIEQHAPLDEEVVKFYAA						
<i>L. braziliensis</i>	FAERIILEEIDHPPFIVHLHYSFQEQGNLYMILDLLAGGELFTYIEQHAPLDEEVVKFYAA						
<i>L. infantum</i>	FAERIILEEIDHPPFIVHLHYSFQEQGNLYMILDLLAGGELFTYIEQHAPLDEEVVKFYAA						
<i>L. major</i>	FAERIILEEIDHPPFIVHLHYSFQEQGNLYMILDLLAGGELFTYIEQHAPLDEEVVKFYAA						
<i>L. mexicana</i>	FAERIILEEIDHPPFIVHLHYSFQEQGNLYMILDLLAGGELFTYIEQHAPLDEEVVKFYAA						
<i>T. cruzi</i>	AAEKHILQTI SHPPFIVSLHYAFETKKCLYLVLDFLPGGELFFHLLAKEKVFDEYRAKFFYCG						
<i>T. brucei</i>	SAERLILQKIDHPPFIVSLHYAFETKGSLYLVMDFLSGGELFFHLLSFSVDFEWRKFFYCG						
<i>T. vivax</i>	FTEKRILQDIRHPPFIVSLHYAFQTPNCLYLVMDFLPGGELFFHLLGNVKTDFEQRAKFFYCG						
	:* : **:	* **:	* **:	* **:	* **:	* **:	* **:
<i>L. donovani</i> (India)	IVALALGYLHRSNI IYRDLKPENNVFDRDGHACLTDGFLAKANVHEPNNAVTYCGTNEYLA						
<i>L. donovani</i> (Nepal)	IVALALGYLHRSNI IYRDLKPENNVFDRDGHACLTDGFLAKANVHEPNNAVTYCGTNEYLA						
<i>L. braziliensis</i>	IVALALGYLHRSNI IYRDLKPENNVFDRDGHACLTDGFLAKANVHEPNNAVTYCGTNEYLA						
<i>L. infantum</i>	IVALALGYLHRSNI IYRDLKPENNVFDRDGHACLTDGFLAKANVHEPNNAVTYCGTNEYLA						
<i>L. major</i>	IVALALGYLHRSNI IYRDLKPENNVFDRDGHACLTDGFLAKANVHEPNNAVTYCGTNEYLA						
<i>L. mexicana</i>	IVALALGYLHRSNI IYRDLKPENNVFDRDGHACLTDGFLAKANVHEPNNAVTYCGTNEYLA						
<i>T. cruzi</i>	EIALAIGYLSLDI IFRDLKPENI VLDEDDGHACLTDGFLAKMNVSNASNFTFCGTPEYIA						
<i>T. brucei</i>	EIALALGYLHAQDI IYRDLKPENAVLDADGHVCLTDGFLAKMDVRDACSNTFCGTPEYIA						
<i>T. vivax</i>	EIALALEYLHEHNI IYRDLKPENAVLDADGHVCLTDGFLAKMNVSDASNTFCGTPEYIA						
	*:***: * **:	* **:	* **:	* **:	* **:	* **:	* **:
<i>L. donovani</i> (India)	PELLKGVPHGKAVDWWSLGLMMCEMLFNDLPFYDENPMQMQMKILTEDVAFPP-----						
<i>L. donovani</i> (Nepal)	PELLKGVPHGKAVDWWSLGLMMCEMLFNDLPFYDENPMQMQMKILTEDVAFPP-----						
<i>L. braziliensis</i>	PELLKGVPHGKAVDWWSLGLMMCEMLFNDLPFYDENPMQMQMKILTEDVAFPP-----						
<i>L. infantum</i>	PELLKGVPHGKAVDWWSLGLMMCEMLFNDLPFYDENPMQMQMKILTEDVAFPP-----						
<i>L. major</i>	PELLKGVPHGKAVDWWSLGLMMCEMLFNDLPFYDENPMQMQMKILTEDVAFPP-----						
<i>L. mexicana</i>	PELLKGVPHGKAVDWWSLGLMMCEMLFNDLPFYDENPMQMQMKILTEDVAFPP-----						
<i>T. cruzi</i>	PEFLLGQPHGRAVDWALGILLYEMIEGIPPFNENSNEYEELKGLKFGDVGGEESG						
<i>T. brucei</i>	PEFLLGKPHGKAVDWWSLGILLYEMIEGIPPFYSENVSAMYDKILSSELQFGDGEESG						
<i>T. vivax</i>	PEIVLKGPHGKAVDWWSLGILLYEMIEGIPPFYSENVNAMYDKILSSELKFGTGDDE-SD						
	*:***: * **:	* **:	* **:	* **:	* **:	* **:	* **:
<i>L. donovani</i> (India)	HIQITEETKDLIRCLLNKNPERRLQTLFAFKAHKCFNSLDFGLLEARKLKAPITPDPNPA						
<i>L. donovani</i> (Nepal)	HIQITEETKDLIRCLLNKNPERRLQTLFAFKAHKCFNSLDFGLLEARKLKAPITPDPNPA						
<i>L. braziliensis</i>	HIQITEETKDLIRCLLNKNPERRLQTLFAFKAHKCFNSLDFGLLEARKLKAPITPDPNPA						
<i>L. infantum</i>	HIQITEETKDLIRCLLNKNPERRLQTLFAFKAHKCFNSLDFGLLEARKLKAPITPDPNPA						
<i>L. major</i>	HIQITEETKDLIRCLLNKNPERRLQTLFAFKAHKCFNSLDFGLLEARKLKAPITPDPNPA						
<i>L. mexicana</i>	HIQITEETKDLIRCLLNKNPERRLQTLFAFKAHKCFNSLDFGLLEARKLKAPITPDPNPA						
<i>T. cruzi</i>	LPVISENAKALLRRLDRNPQTRLQDLEEFKHHFFEDIDWVKLSRREIQPPFRPSSNII						
<i>T. brucei</i>	MPQISEEAQDLRRLDRNPQTRLQDVEELKGHFFFRDLWEKLFREIEPPFRPDGNAL						
<i>T. vivax</i>	IPAISEAAQDILRRLDRPDTRLQDLEDVKAHFFFSIDWDKLGKREIEPPFRPDGNAL						
	*:***: * **:	* **:	* **:	* **:	* **:	* **:	* **:

Figure 7  
Varela-M et al.

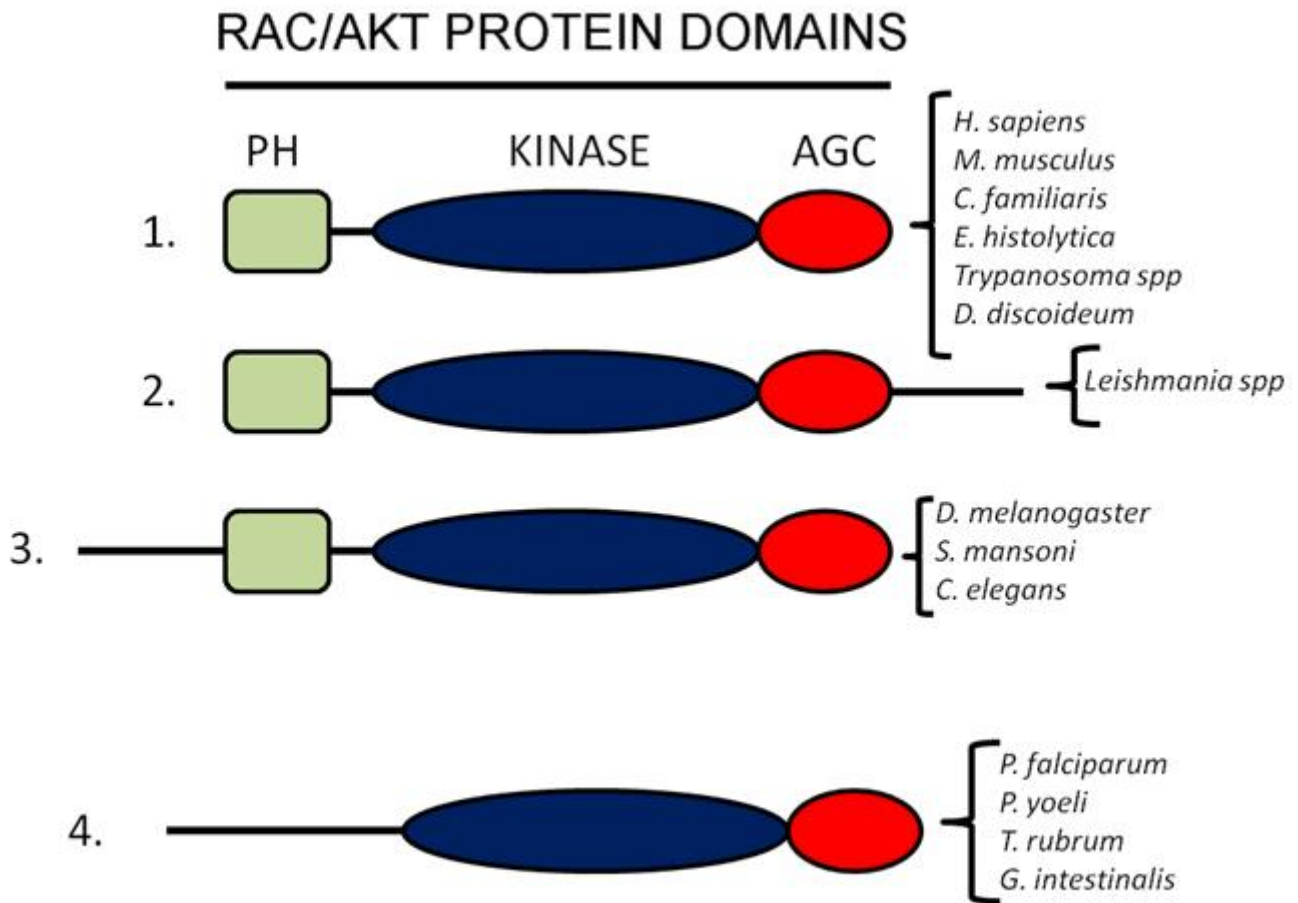
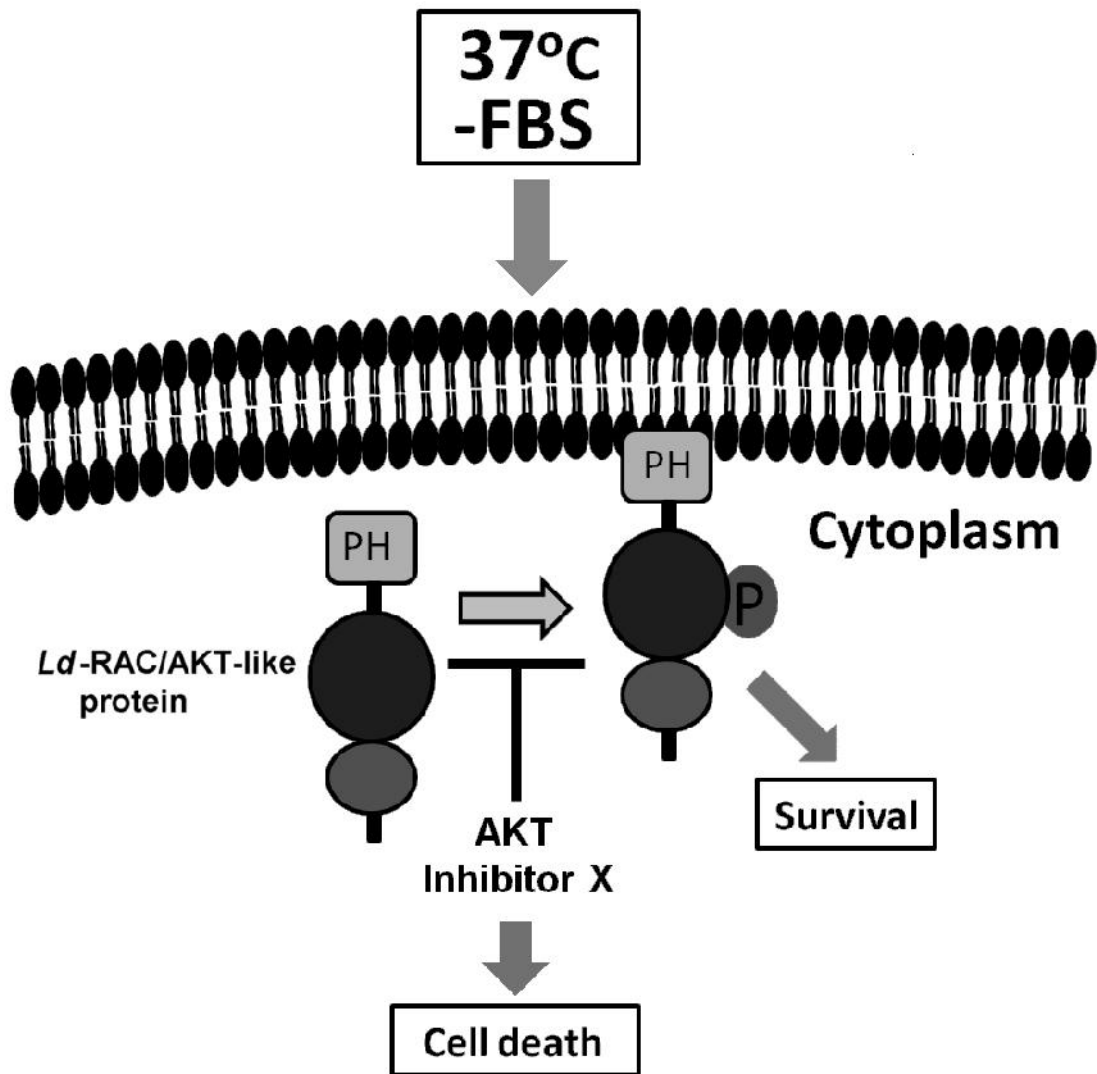


Figure 8  
Varela-M et al.

	VIIb Catalytic loop	VIII Activation loop	Hydrophobic motif FXXF[S/T]Y/F
<b>AKT1</b> <i>H. sapiens</i>	YRDLKLEN	TMKTFCGTPEYLAPE	FPQFSYSASGTA
<b>AKT2</b> <i>H. sapiens</i>	YRDIKLEN	TMKTFCGTPEYLAPE	FPQFSYSASIRE
<b>AKT3</b> <i>H. sapiens</i>	YRDLKLEN	TMKTFCGTPEYLAPE	FPQFSYSASGRE
<i>M. musculus</i>	YRDLKLEN	TMKTFCGTPEYLAPE	FPQFSYSASGTA
<i>C. familiaris</i>	YRDLKLEN	TMKTFCGTPEYLAPE	FPQFSYSASGTA
<i>D. melanogaster</i>	YRDLKLEN	TTKTFCGTPEYLAPE	FPQFSYQGDMS
<i>S. mansoni</i>	YRDLKLEN	STKTFCGTPEYLAPE	FEQFSFHGSRQS
<i>C. elegans</i>	YRDMKLEN	KTSTFCGTPEYLAPE	FTQFSFHNVMS
<i>D. discoideum</i>	YRDLKPEN	KTGTFCGTPEYLAPE	FEGFTYVAESEH
<i>E. histolytica</i>	YRDLKPEN	QTNTFCGTPEYLAPE	FSGFTYVVK---
<i>L. braziliensis</i>	YRDLKPEN	NAVTYCGTNEYLAPE	LAGYTYDRDSSE
<i>L. infantum</i>	YRDLKPEN	NAVTYCGTNEYLAPE	LAGYTYDRDLSE
<i>L. major</i>	YRDLKPEN	NAVTYCGTNEYLAPE	LAGYTYDRDLSE
<i>L. mexicana</i>	YRDLKPEN	NAVTYCGTNEYLAPE	LAGYTYDRDLSE
<i>L. donovani</i> (Nepal)	YRDLKPEN	NAVTYCGTNEYLAPE	LAGYTYDRDLSE
<i>L. donovani</i> (India)	YRDLKPEN	NAVTYCGTNEYLAPE	LAGYTYDRDLSE
<i>T. cruzi</i>	FRDLKPEN	SNFTFCGTTEYIAPE	IACFSFDGQMGP
<i>T. brucei</i>	YRDLKPEN	CNFTFCGTPEYIAPE	ICGFTFNGRSRP
<i>T. vivax</i>	YRDLKPEN	SNFTFCGTPEYVAPE	VAGFTFVGNRGT

Figure 9  
Varela-M et al.



**Table 1. Comparison of human AKT1 with RAC/AKT kinases from different origins.** Identity and similarity percentages of the full protein as well as percentages of similarity in the distinct domains are shown. Sequence alignment was performed using the Needleman-Wunsch algorithm.

Species	Identity	Similarity			
	Full Protein	Full Protein	PH Domain	Kinase Domain	AGC Domain
<i>H. sapiens</i>	100	100	100	100	100
<i>M. musculus</i>	98.3	99	99	99.6	97.2
<i>C. familiaris</i>	96.9	98.3	100	99.2	93.1
<i>D. melanogaster</i>	48.6	60.5	71.3	88.4	62.3
<i>S. mansoni</i>	47.9	58.5	74	81.5	52.6
<i>C. elegans</i>	51.8	65.8	72.1	83	60.3
<i>D. discoideum</i>	41.5	58.5	43.9	72.7	46.7
<i>E. histolytica</i>	37.5	56	45.8	70.3	41.8
<i>L. mexicana</i>	26.3	43	28.9	61.7	36.8
<i>L. braziliensis</i>	26.8	42.1	28.7	61.7	21.7
<i>L. infantum</i>	26.3	42.8	29.8	61.7	29.6
<i>L. major</i>	26	41.9	26	61.7	29.6
<i>L. donovani (India)</i>	26.5	43.2	29.8	61.7	29.6
<i>L. donovani (Nepal)</i>	26.3	42.8	29.8	61.7	29.6
<i>T. cruzi</i>	33	52.6	42	64.6	37.2
<i>T. brucei</i>	32.7	50.9	36.8	63.6	41
<i>T. vivax</i>	34.7	54.3	42.3	64.8	45.2
<i>T. rubrum</i>	25.9	38.2	3	69.3	43.4
<i>G. intestinalis</i>	27.2	41.1	14.9	58	38.4
<i>P. yoeli</i>	23.2	35	3.9	71.8	50
<i>P. falciparum</i>	23.1	34.8	6.7	74.5	45.3

**Table 2. Comparison of *Ld-Rac/Akt*-like genes with Trypanosomatidae and human homologs.** Identity and similarity percentages of the full cDNA and protein sequences are shown as compared to the herein reported *Ld-Rac/Akt*-like gene from *L. donovani* (MHOM/IN/80/Dd8).

<b>Species</b>	<b>cDNA % identity</b>	<b>Protein % identity</b>	<b>cDNA % Similarity</b>	<b>Protein % Similarity</b>
<i>L. donovani (Nepal)</i>	97.8	99	97.8	99.2
<i>L. braziliensis</i>	89.6	92.9	89.6	94.5
<i>L. infantum</i>	97.7	98.8	97.7	99.2
<i>L. major</i>	98	98.8	98	98.8
<i>L. mexicana</i>	96	96.7	96	97.6
<i>T. cruzi</i>	45.6	32.5	45.6	46.3
<i>T. vivax</i>	41.8	32.9	41.8	48.1
<i>T. brucei</i>	42	34.6	42	48.4
<i>Human AKT1</i>	43.9	26.5	43.9	43.2
<i>Human AKT2</i>	42.1	26.1	42.1	41.5
<i>Human AKT3</i>	43.8	25.4	43.8	40.7

## 6.3 ARTÍCULO 3.

### **The HSP90 inhibitor 17-AAG potentiates the antileishmanial activity of the ether lipid edelfosine**

Rubén E. Varela-M, Antonio Muro, and Faustino Mollinedo. Enviado a la revista Acta Tropica: Ref. No.: ACTROP-D-12-00506

Este artículo sugiere que la terapia combinada entre edelfosina y el antibiótico 17-AAG análogo de geldanamicina, puede ser efectivo contra la infección ocasionada por *Leishmania spp.* Nuestros datos, publicados previamente, han demostrado el potencial efecto terapéutico de la edelfosina en diferentes especies de *Leishmania*. Sin embargo, sabemos que la monoterapia tiene el riesgo de generar resistencia temprana a los medicamentos. En este estudio demostramos que el co-tratamiento con 17-AAG, un inhibidor químico de la proteína HSP90 de humanos, que está actualmente en fases de estudio clínico para el tratamiento de tumores, puede generar un efecto sinérgico con otros compuestos anti-*Leishmania*, ya que este compuesto demostró su capacidad de detener el ciclo celular del parásito en  $G_0/G_1$ , interrumpiendo así la progresión del ciclo celular del parásito. En nuestras investigaciones, cuando evaluamos la eficacia de la edelfosina *in vitro* contra la cepa de *L. infantum*, encontramos que este compuesto fue poco efectivo; sin embargo, cuando se realizó el co-tratamiento *in vitro* con 17-AAG se aumentó el efecto apoptótico-like. Este hallazgo supone que se podría controlar el aumento de la carga parasitaria mientras se establece un tratamiento o durante el mismo, así como prevenir la aparición de clones resistentes al tratamiento.

**The HSP90 inhibitor 17-AAG potentiates the antileishmanial activity of the ether lipid edelfosine**

Rubén E. Varela-M<sup>1</sup>, Antonio Muro<sup>2</sup>, and Faustino Mollinedo<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, Spain

<sup>2</sup>Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular, IBSAL-CIETUS, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, Salamanca, Spain

\*Corresponding author: Faustino Mollinedo, Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer, CSIC-Universidad de Salamanca, Campus Miguel de Unamuno, E-37007 Salamanca, Spain. Phone: (+34)923-294806, Fax: (+34)923-294795, E-mail: [fmollin@usal.es](mailto:fmollin@usal.es)



## **Abstract**

HSP90 is an abundant protein in *Leishmania* parasites that plays a major role in the parasite survival under stress conditions. Here we found that the HSP90 inhibitor 17-AAG induced cell cycle arrest at G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> in *L. infantum* and *L. panamensis* promastigotes, and highly potentiated the induction of cell death by an apoptotic-like process mediated by the ether phospholipid edelfosine. These data suggest that the combined treatment of 17-AAG and edelfosine might be a novel and effective approach of combination therapy in the treatment of leishmaniasis.

**Keywords:** HSP inhibitor; 17-AAG; edelfosine; cell cycle arrest; apoptosis-like cell death; *Leishmania spp.*

## **1. Introduction**

The current therapy of leishmaniasis, caused by the protozoan parasite *Leishmania*, includes a rather small number of drugs and is not satisfactory. The emergence of drug resistance and toxicity urges the identification of new targets and drugs in the treatment of this disease.

Heat shock protein (HSP) 83, the *Leishmania* ortholog of the human HSP90 (52% identity and 61.9% similarity), is highly and constitutively expressed in *Leishmania spp.*, where represents about 2.8% of the total cell protein [114]. In mammalian cells, HSP90 is involved in the stabilization and correct folding of a number of different client proteins, many of them playing a major role in cell survival, cell proliferation, and cancer cell growth [130]. In this regard, HSP90 has become a valuable target in cancer chemotherapy as its

inhibition promotes proteasomal degradation of client proteins required for tumor cell survival [130]. Despite HSP90 is promiscuous in its action, and therefore caution should be taken into account to avoid undesired effects on chemotherapy [165], a wide number of studies have shown that HSP90 inhibitors enhance the cytotoxic action of some anticancer drugs [128, 133]. Similarly, inhibition of HSP90 in *Leishmania* parasites using specific inhibitors, such as geldanamycin, radicicol and 17-AAG has been shown to inhibit transformation of promastigotes into rounded amastigote-like forms and to kill intracellular amastigotes [118, 166, 167]. These data suggest that HSP90 inhibition can be a new therapeutic approach in the treatment of leishmaniasis. In addition, we have recently found that the ether lipid edelfosine (1-*O*-octadecyl-2-*O*-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine) represents a promising drug against leishmaniasis, killing *Leishmania* parasites through an apoptosis-like process [168]. On these grounds, we analyzed here whether the combination of HSP90 and edelfosine could improve the antileishmanial activity of each individual agent.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Drugs*

Edelfosine (1-*O*-octadecyl-2-*O*-methyl-*rac*-glycero-3-phosphocholine) was from INKEYSA (Barcelona, Spain). Stock sterile solution of edelfosine (2 mM) was prepared as previously described [169] in complete RPMI-1640 culture medium (Invitrogen, Carlsbad, CA), supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (FBS). 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) was purchased from InvivoGen (San Diego, CA). An 8 mM 17-AAG stock solution in

dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, St Louis, MO) was aliquoted and stored at -20°C until use.

### *2.2. Leishmania cells and culture conditions*

The following *Leishmania* strains were used in this study: *L. infantum* (MCAN/ES/96/BCN150) and *L. panamensis* (MHOM/CO/87/UA140). *Leishmania* promastigotes were grown in RPMI-1640 culture medium, supplemented with 10% FBS, 2 mM glutamine, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin at 26°C. Promastigotes were treated with the indicated compounds during their logarithmic growth phase ( $2 \times 10^6$  parasites/ml) at 26°C.

### *2.3. Growth inhibition assay*

The inhibition of promastigote growth was determined by using the XTT (sodium 3,3'-[1-(phenylaminocarbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene sulfonic acid hydrate) cell proliferation kit (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) as previously described. Cells were resuspended in FBS-containing RPMI-1640 culture medium ( $1.5 \times 10^6$  cells/ml) and plated (100 µl/well) in 96-well flat-bottomed microtiter plates at 26°C, in the absence and in the presence of 10 µM 17-AAG. After 17-h incubation at 26°C, the percent of growth inhibition was calculated with respect to untreated controls. Measurements were done in triplicate.

#### 2.4. Analysis of apoptosis-like cell death by flow cytometry

Two million *Leishmania spp.* promastigotes were treated in the absence and in the presence of 10  $\mu$ M 17-AAG for 24 h. Edelfosine was used at two different concentrations (5  $\mu$ M for *L. panamensis*, and 20  $\mu$ M for *L. infantum*) for 24 h. In combination therapies, 17-AAG was preincubated for 1 h before adding edelfosine. Then, parasites were pelleted by centrifugation (1000 x g) for 5 min, and analyzed for apoptosis-like DNA breakdown by flow cytometry following a protocol previously described [154]. Quantitation of apoptotic-like cells was monitored as the percentage of cells in the sub- $G_0/G_1$  region (hypodiploidy) in cell cycle analysis, using a fluorescence-activated cell sorting (FACS) Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA) equipped with a 488 nm argon laser. WinMDI 2.8 software was used for data analysis. In addition, photographs of untreated and drug-treated parasites, before starting their preparation for flow cytometry assays, were taken using a Zeiss Axioplan microscope (Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Germany) at 40X magnification.

### 3. Results

#### 3.1. 17-AAG inhibits cell cycle in *Leishmania spp.* promastigotes

We found that 10  $\mu$ M 17-AAG arrested *L. infantum* and *L. panamensis* promastigotes at the  $G_0/G_1$  phase of cell cycle, as assessed by flow cytometry (Figs. 1A and 1B), which led to a complete growth inhibition (Fig. 1C). Treatment of *Leishmania spp.* promastigotes with 10  $\mu$ M 17-AAG induced dramatic changes in cell morphology, leading to stubby-shaped bodies, rounding-up, and changes in the flagellum (Fig. 2).

### 3.2. 17-AAG pretreatment sensitizes *Leishmania* spp. parasites to edelfosine-induced cell death

We have recently reported that the ether phospholipid edelfosine induces cell death in *Leishmania* parasites through an apoptosis-like process [168]. Here we found that pretreatment of *Leishmania* promastigotes with 17-AAG highly potentiated the anti-*Leishmania* activity of edelfosine, as assessed by an increase in the percentage of hypodiploid cells (protozoa at the sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> region of cell cycle) (Figs. 3A and 3B). These results suggest that 17-AAG facilitates the induction of apoptosis-like cell death mediated by edelfosine.

## 4. Discussion

The data reported here indicate that the combined treatment of 17-AAG and edelfosine largely potentiates the killing activity of the ether phospholipid edelfosine on *Leishmania* spp. promastigotes. Interestingly, *L. infantum* promastigotes were previously reported rather resistant to the action of the ether lipid [168], but here we found that pretreatment with 17-AAG turned *L. infantum* promastigotes into edelfosine-sensitive protozoa. Thus, 17-AAG sensitizes *Leishmania* parasites to edelfosine. In this regard, it might be envisaged that Hsp-90 inhibition could be an interesting way to potentiate antiparasitic therapy. Because 17-AAG is currently in clinical trials [170, 171] and preclinical assays indicate a rather lack of significant toxicity for edelfosine [41, 42, 172, 173], our data suggest that the combination of 17-AAG and edelfosine could be a new approach to treat leishmaniasis that warrants further investigation. Our present and previous data [168] indicate that 17-AAG leads to cell cycle arrest and edelfosine promotes an apoptosis-like response in

*Leishmania spp.* The cell cycle arrest, inhibiting cell proliferation, might decrease the probability to render drug resistance, thus potentiating the cell death response triggered by a cytotoxic drug. This could represent a good example of combination therapy, bringing together both cytostatic and proapoptotic agents in the treatment of leishmaniasis. HSP90 protects and stabilizes a wide number of proteins involved in cell survival [130]. Thus, it might be envisaged that inhibition of HSP90 leads to the degradation of some critical proteins in *Leishmania* survival that would facilitate the action of a proapoptotic agent, such as edelfosine. Our results reported here indicate that the combined addition of 17-AAG and edelfosine is effective against *Leishmania* parasites causing either visceral (*L. infantum*) and cutaneous (*L. panamanesis*) leishmaniasis. Furthermore, both 17-AAG [167] and edelfosine [173] have been reported to lower or inhibit inflammation that, in turn, could be beneficial on leishmaniasis treatment. This inhibitory action would be of particular importance in the treatment of cutaneous and muco-cutaneous leishmaniasis, which are characterized by an intense inflammatory response causing severe tissue destruction [174, 175].

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from Ministerio de Economía y Competitividad of Spain (SAF2011-30518), Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer, Instituto de Salud Carlos III, cofunded by the Fondo Europeo de Desarrollo Regional of the European Union (RD06/0020/1037), Junta de Castilla y León (CSI052A11-2 and CSI221A12-2), and Fundación

Ramón Areces 2010-13. REVM was supported by a Torres Quevedo fellowship (Ministerio de Ciencia e Innovación of Spain – Apointech).

## References

- Brandau, S., Dresel, A., and Clos, J., 1995. High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus *Leishmania*. *Biochem J* 310 (Pt 1), 225-232.
- Gajate, C., Del Canto-Janez, E., Acuna, A. U., Amat-Guerri, F., Geijo, E., Santos-Beneit, A. M., Veldman, R. J., and Mollinedo, F., 2004. Intracellular triggering of Fas aggregation and recruitment of apoptotic molecules into Fas-enriched rafts in selective tumor cell apoptosis. *J Exp Med* 200, 353-365.
- Gajate, C., Santos-Beneit, A. M., Macho, A., Lazaro, M., Hernandez-De Rojas, A., Modolell, M., Munoz, E., and Mollinedo, F., 2000. Involvement of mitochondria and caspase-3 in ET-18-OCH<sub>3</sub>-induced apoptosis of human leukemic cells. *Int J Cancer* 86, 208-218.
- George, P., Bali, P., Annavarapu, S., Scuto, A., Fiskus, W., Guo, F., Sigua, C., Sondarva, G., Moscinski, L., Atadja, P., and Bhalla, K., 2005. Combination of the histone deacetylase inhibitor LBH589 and the hsp90 inhibitor 17-AAG is highly active against human CML-BC cells and AML cells with activating mutation of FLT-3. *Blood* 105, 1768-1776.
- Li, Q., Zhou, Y., Yao, C., Ma, X., Wang, L., Xu, W., Wang, Z., and Qiao, Z., 2009. Apoptosis caused by Hsp90 inhibitor geldanamycin in *Leishmania donovani* during promastigote-to-amastigote transformation stage. *Parasitol Res* 105, 1539-1548.

- Lopez Kostka, S., Dinges, S., Griewank, K., Iwakura, Y., Udey, M. C., and von Stebut, E., 2009. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *J Immunol* 182, 3039-3046.
- Mollinedo, F., de la Iglesia-Vicente, J., Gajate, C., Estella-Hermoso de Mendoza, A., Villa-Pulgarin, J. A., Campanero, M. A., and Blanco-Prieto, M. J., 2010a. Lipid raft-targeted therapy in multiple myeloma. *Oncogene* 29, 3748-3757.
- Mollinedo, F., de la Iglesia-Vicente, J., Gajate, C., Estella-Hermoso de Mendoza, A., Villa-Pulgarin, J. A., de Frias, M., Roue, G., Gil, J., Colomer, D., Campanero, M. A., and Blanco-Prieto, M. J., 2010b. *In vitro* and *in vivo* selective antitumor activity of Edelfosine against mantle cell lymphoma and chronic lymphocytic leukemia involving lipid rafts. *Clin Cancer Res* 16, 2046-2054.
- Mollinedo, F., Fernandez-Luna, J. L., Gajate, C., Martin-Martin, B., Benito, A., Martinez-Dalmau, R., and Modolell, M., 1997. Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH<sub>3</sub> (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X<sub>L</sub>. *Cancer Res* 57, 1320-1328.
- Mollinedo, F., Gajate, C., Morales, A. I., del Canto-Janez, E., Justies, N., Collia, F., Rivas, J. V., Modolell, M., and Iglesias, A., 2009. Novel anti-inflammatory action of edelfosine lacking toxicity with protective effect in experimental colitis. *J Pharmacol Exp Ther* 329, 439-449.
- Neckers, L., 2002. Hsp90 inhibitors as novel cancer chemotherapeutic agents. *Trends Mol Med* 8, S55-61.



- Neckers, L., and Workman, P., 2012. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: are we there yet? *Clin Cancer Res* 18, 64-76.
- Nieto-Miguel, T., Gajate, C., Gonzalez-Camacho, F., and Mollinedo, F., 2008. Proapoptotic role of Hsp90 by its interaction with c-Jun N-terminal kinase in lipid rafts in edelfosine-mediated antileukemic therapy. *Oncogene* 27, 1779-1787.
- Petersen, A. L., Guedes, C. E., Versoza, C. L., Lima, J. G., de Freitas, L. A., Borges, V. M., and Veras, P. S., 2012. 17-AAG kills intracellular *Leishmania amazonensis* while reducing inflammatory responses in infected macrophages. *PLoS One* 7, e49496.
- Tasew, G., Nylen, S., Lieke, T., Lemu, B., Meless, H., Ruffin, N., Wolday, D., Asseffa, A., Yagita, H., Britton, S., Akuffo, H., Chiodi, F., and Eidsmo, L., 2010. Systemic FasL and TRAIL neutralisation reduce leishmaniasis induced skin ulceration. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e844.
- Usmani, S. Z., Bona, R., and Li, Z., 2009. 17 AAG for HSP90 inhibition in cancer--from bench to bedside. *Curr Mol Med* 9, 654-664.
- Varela-M, R. E., Villa-Pulgarin, J. A., Yepes, E., Muller, I., Modolell, M., Munoz, D. L., Robledo, S. M., Muskus, C. E., Lopez-Aban, J., Muro, A., Velez, I. D., and Mollinedo, F., 2012. *In vitro* and *in vivo* efficacy of ether lipid edelfosine against *Leishmania spp.* and SbV-resistant parasites. *PLoS Negl Trop Dis* 6, e1612.
- Whitesell, L., and Lindquist, S. L., 2005. HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer* 5, 761-772.

Wiesgigl, M., and Clos, J., 2001. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. *Mol Biol Cell* 12, 3307-3316.

## FIGURE LEGENDS

### **Figure 1. 17-AAG inhibits proliferation of *Leishmania* promastigotes.**

(A) Dot-plot histogram representing the distinct phases of cell cycle in control untreated *L. infantum* (upper) and *L. panamensis* (lower) promastigotes, and after treatment with 10  $\mu$ M 17-AAG for 17 h by flow cytometry analysis. (B) Profiles of cell cycle analysis from the above dot-plot histograms showing the distinct cell cycle phases of control untreated (black) *L. infantum* and *L. panamensis* promastigotes, and after treatment with 10  $\mu$ M 17-AAG for 17 h (red). The position of the G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phase is indicated. (C) *L. panamensis* and *L. infantum* promastigotes were incubated in the absence and in the presence of 10  $\mu$ M 17-AAG for 17 h and then the percentage of cell growth inhibition was determined by the XTT method. Representative experiments of 2-3 performed are shown.

### **Figure 2. 17-AAG induces changes in *Leishmania* promastigote morphology.**

*L. infantum* and *L. panamensis* promastigotes, untreated (Control) and treated with 10  $\mu$ M 17-AAG for 17 h were analyzed for changes in cell morphology. Red arrows show different forms of parasite morphology.

### **Figure 3. 17-AAG pretreatment potentiates the antileishmanial activity of edelfosine.**

*L. infantum* (A) and *L. panamensis* (B) promastigotes were untreated (Control) or treated with 10  $\mu$ M 17-AAG, edelfosine (EDLF; 5  $\mu$ M for *L. panamensis*; 20  $\mu$ M for *L. infantum*) or 17-AAG + edelfosine for 24 h. Apoptosis-like cell death was then quantitated as the percentage of promastigotes in the sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> region by flow cytometry, and indicated in each

histogram. The positions of the  $G_0/G_1$  and sub- $G_0/G_1$  regions are indicated. Representative experiments of three performed are shown.

Figure 1  
Varela-M et al.

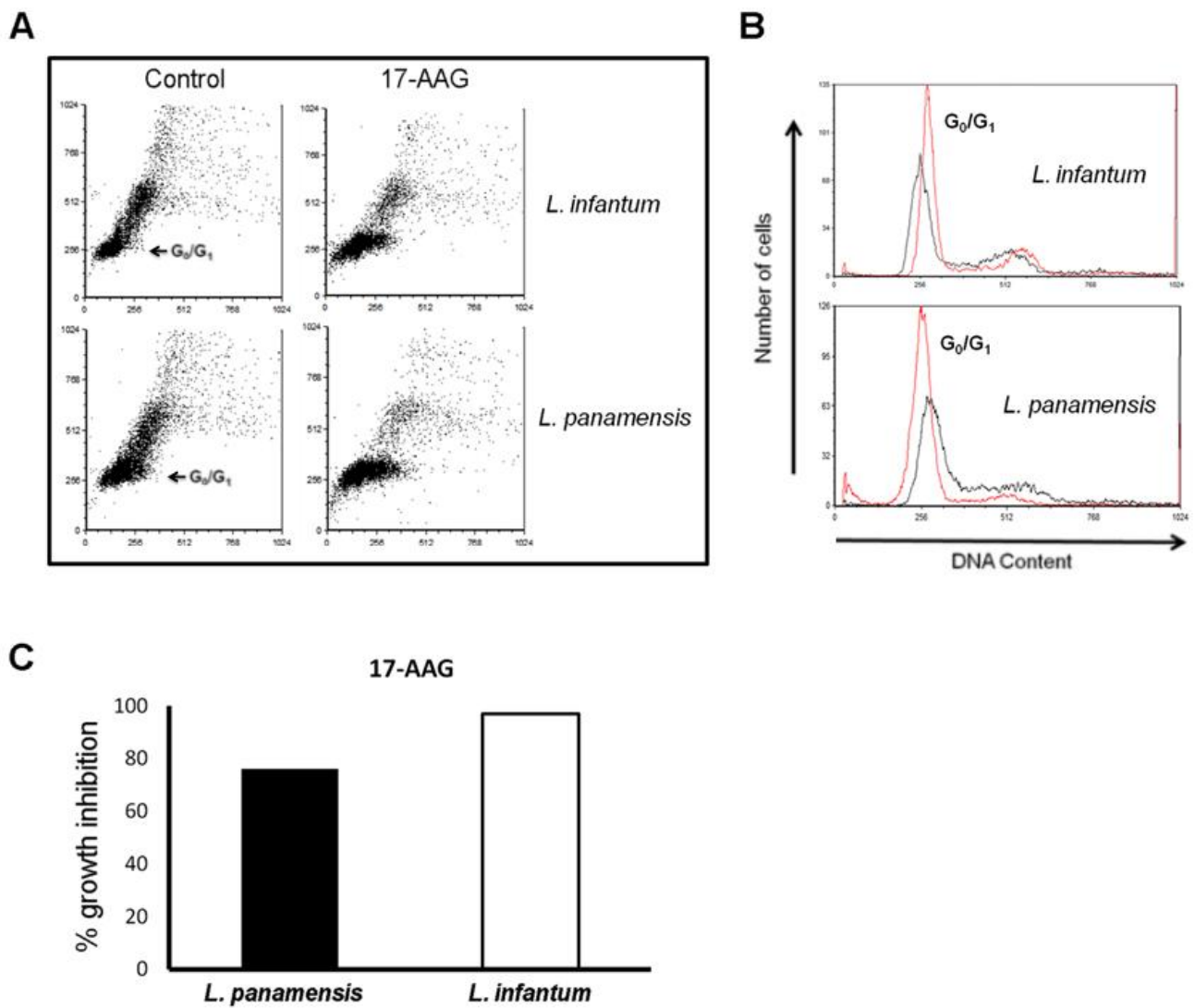


Figure 2  
Varela-M et al.

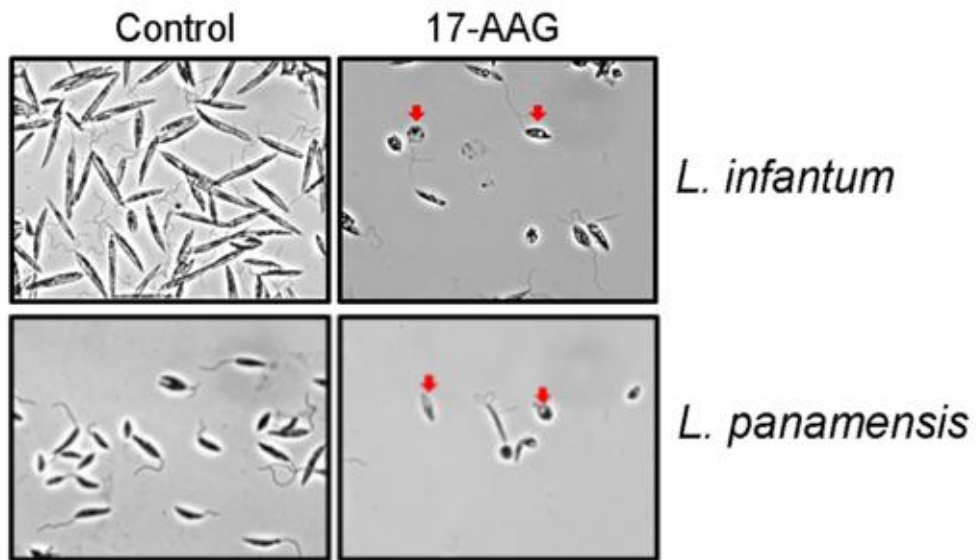
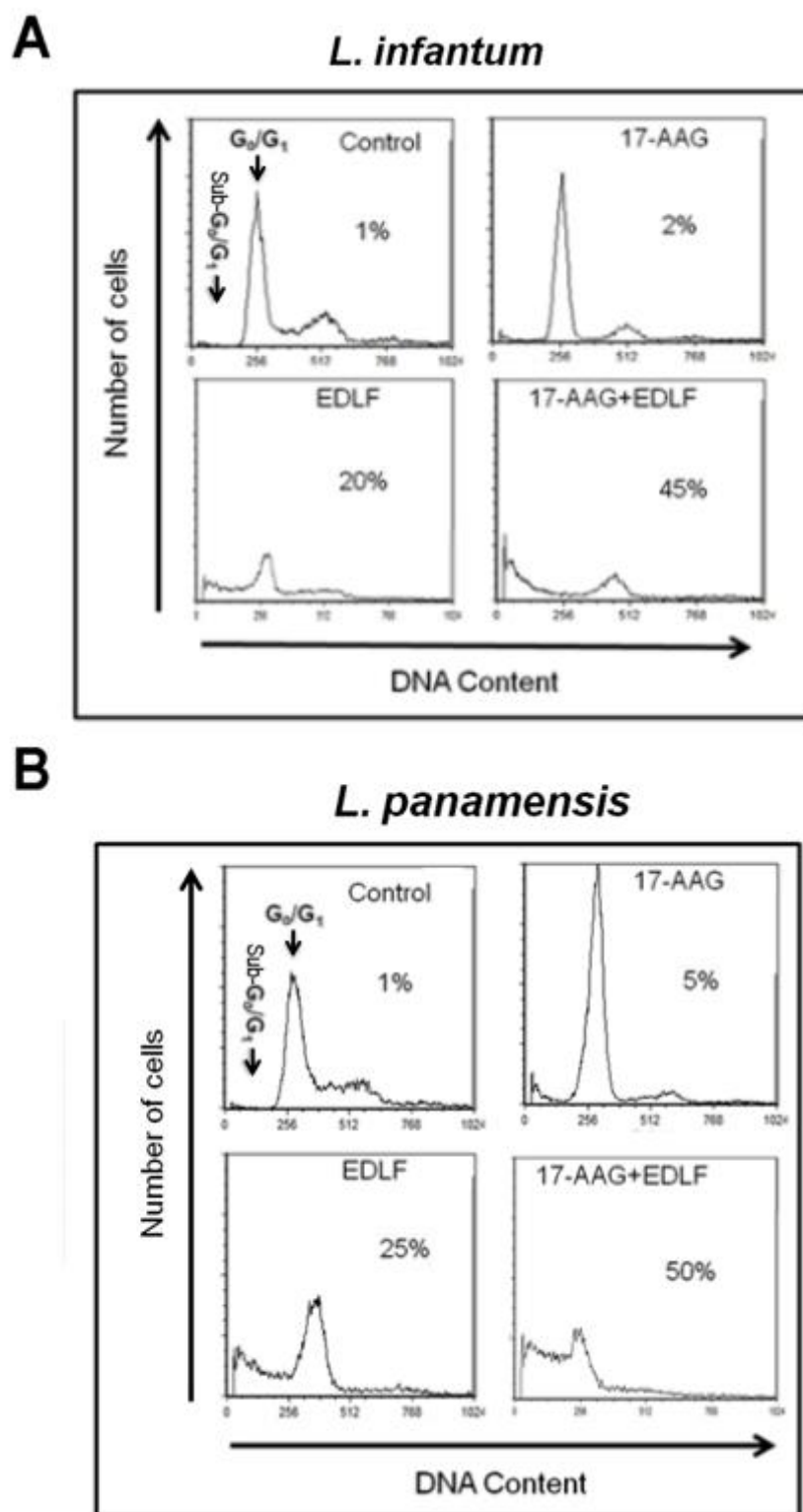


Figure 3  
Varela-M et al.



# **CONCLUSIONES**

1. La edelfosina es el más potente de los ALPs en relación a su actividad anti-*Leishmania*, causando la muerte del parásito tanto *in vitro*, *in vivo* como en el macrófago infectado. Además la edelfosina es efectiva contra cepas de *Leishmania* resistentes al antimonio pentavalente y la generación de resistencia *in vitro* es más lenta o ausente dependiendo de la especie estudiada, si se compara con la miltefosina.

2. La identificación de un gen homólogo de *akt-like* en tripanosomátidos, y su similitud con la proteína AKT de células de mamífero, plantea la posibilidad de la existencia de rutas de señalización molecular, implicadas en la supervivencia del parásito como respuesta a diferentes condiciones de estrés celular. Este hallazgo podría permitir la identificación de nuevas dianas terapéuticas en leishmaniosis, y la posibilidad de realizar una farmacoterapia dirigida contra proteínas implicadas en rutas de señalización.

3. El inhibidor de HSP90 17-AAG potencia la acción anti-*Leishmania* de la edelfosina, lo que podría sugerir una posible terapia combinada en el tratamiento de leishmaniosis. 17-AAG detiene la progresión del ciclo celular en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> en promastigotes de *Leishmania spp*, logrando disminuir la posibilidad teórica de la aparición de clones resistentes al tratamiento y el aumento de la carga parasitaria progresiva, dos factores importantes en el desarrollo de la enfermedad.

4. Los datos mostrados en este trabajo sobre las posibles dianas terapéuticas HSP90 y la proteína AKT en el tratamiento de leishmaniosis, plantean la posibilidad de desarrollar una nueva estrategia en la terapia antiparasitaria atacando rutas de supervivencia.



# **ANEXO METODOLÓGICO**

## Declaración Ética

Los animales utilizados en este proyecto fueron estudiados cumpliendo las disposiciones contempladas en el Real Decreto RD1201/05 y la directiva Europea 2010/63/EU. Los animales fueron mantenidos en el servicio de experimentación animal de la Universidad de Salamanca (Registro número: PAE/SA/001), previa aprobación del comité de ética animal (Protocolo aprobado numero 48531).

## Compuestos

Edelfosina (1-*O*-ctadecil-2-*O*-methil-*rac*-glicero-3-fosfocolina) fue obtenida de INKEYSA (Barcelona, España) y APOINTECH (Salamanca, España), Miltefosina (hexadecilfosfocolina) de Calbiochem (Cambridge, MA, EE.UU), Perifosina (octadecil-(1,1 dimetil-piperidinio-4-il)-fosfato) y erucilfosfocolina ((13 $Z$ )-docos-13-en-1-il 2-(trimetilamonio) etil fosfato) de Zentaris (Frankfurt, Alemania). Las soluciones de trabajo se esterilizaron por filtración (0,22  $\mu$ m, Millipore), los distintos ALPs (2 mM) fueron preparados en el medio de cultivo RPMI-1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementado con suero fetal bovino (SFB), 2 mM L-glutamina, 100 unidades de penicilina, y 100  $\mu$ g/ml estreptomina (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, EE.UU), para una completa homogenización del compuesto en el medio de cultivo, esta mezcla se incubó durante 30 minutos a 50°C en un baño-maría. La solución fue almacenada posteriormente a 4°C y se utilizó durante un tiempo máximo de un mes [176].

## Akt inhibidor X

El inhibidor de la proteína AKT usado en este estudio fue: 10-(4'-(*N*-dietilamino) butil)-2-clorofenoxazina, HCl, 10-NCP (Cat. No: 124020 AKT Inhibidor X) Calbiochen®, Merck Chemicals Ltd. United Kingdom [163, 177].

## HSP90 inhibidor 17-AAG

El inhibidor 17-AAG es un inhibidor con baja toxicidad y un potente inhibidor de HSP90 que regula su actividad e indirectamente la de sus proteínas clientes como AKT, inhibiendo así rutas de señalización como Ras/Raf/MEK y PI3K. Este compuesto es un derivado del antibiótico ansamycin benzoquinona geldanamicina, de *Streptomyces hygroscopicus*, el cual induce apoptosis en células de las líneas SKBRE y MCF7. El inhibidor Comercialmente fue comprado a InvivoGen, San Diego, CA, EE.UU. Se disuelve en DMSO y se almacena a -20°C en alícuotas protegidas de la luz [178, 179].

## Células y condiciones de cultivo

En estos estudios se utilizaron las siguientes cepas: *L. amazonensis* (MHOM/Br/73/LV78), *L. braziliensis* (MHOM/CO/88/UA301), *L. donovani* (MHOM/IN/80/DD8), *L. infantum* (MCAN/ES/96/BCN150), *L. major* LV39 (MRHO/SU/59/P), *L. mexicana* (MHOM/MX/95/NAN1) y *L. panamensis* (MHOM/CO/87/UA140).

Los promastigotes de *Leishmania* fueron cultivados en medio RPMI suplementado con 10 % SFB, 2 mM glutamina, 100 unidades/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina a 26°C. Los promastigotes fueron tratados con cada uno de los compuestos durante la fase logarítmica de su crecimiento, partiendo de una concentración inicial de  $1,5 \times 10^6$  parásitos/ml.

Los promastigotes en fase estacionaria necesarios para las infecciones *in vitro*, fueron obtenidos después de la incubación de los parásitos en medio de cultivo durante 5-6 días, con un inóculo inicial de  $1 \times 10^6$  parásitos/ml. Los amastigotes axénicos fueron obtenidos a un pH de 5.0 en el medio de cultivo Schneider, paso siguiente se

incremento la temperatura gradualmente desde 26, 30, 31 y 32°C, excepto para *L. infantum* que fue expuesta a 34, 36 y 37°C. Como ha sido descrito previamente [180].

## **Ensayo de inhibición de crecimiento de promastigotes de *Leishmania***

La actividad anti-*Leishmania* se realizó con el ensayo colorimétrico “*cell proliferation Kit II*” XTT (sodio 3,3'- [1(fenilaminocarbonil)-3,4 tetrazolium]-bis (4-metoxi- 6 nitro) ácido sulfónico benceno hidratado (Roche Mannheim Alemania) según se ha descrito previamente [34, 180]. Las células fueron resuspendidas en el medio de cultivo RPMI-1640 conteniendo 10% de suero fetal bovino (SFB); la concentración de promastigotes para el ensayo fue de  $1,5 \times 10^6$  células/ml y la de amastigotes axénicos fue de  $2 \times 10^6$  células/ml, los cuales se colocaron en placas de 96 pocillos (Corning®) en un volumen de 100 µl por pocillo y se incubó a 26°C, en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de cada ALP o de 17-AAG. Después de 72 horas de incubación, se adicionaron 50 µl del reactivo XTT junto con (N-methyl dibenzopyrazine methyl sulfate), 49:1 (V/V). Posteriormente se determinó para cada compuesto la IC<sub>50</sub> (concentración inhibitoria 50), la cual se define como la concentración en la cual se inhibe la proliferación celular en un 50% en relación al control no tratado, esto fue determinado para cada compuesto. Todas las mediciones fueron realizadas por triplicado, y cada experimento fue repetido cuatro veces. La absorbancia fue medida a 490 nm con un filtro de referencia de 655 nm.

## **Análisis por citometría de flujo de la muerte celular**

En todos los experimentos donde se realizó la técnica de citometría de flujo se siguieron los mismos pasos que se indican a continuación. Después de finalizar los tratamientos específicos para cada caso, los parásitos fueron centrifugados a 1000 x g durante 5 minutos, y el sedimento celular resultante se analizó para determinar la ruptura del ADN. Se centrifugaron 1-2 ml de cada tratamiento y los controles a 3000 r.p.m por 10 minutos, en los tubos de citometría de flujo, se adicionaron 500µl de alcohol al 70% frío (4°C) a cada sedimento, almacenándose a -20°C, durante toda la noche. Posteriormente se retiró el alcohol por centrifugación y se adicionó una solución de tampón fosfato salino (PBS 1X) que contenía RNasa (50 µg/ml) e Ioduro de propidio (5 µg/ml) en un volumen final de 500 µl por cada tubo. Las muestras se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación constante y en una gradilla protegida de la luz hasta su lectura. La cuantificación de la muerte celular de los parásitos se calculó a través del porcentaje de células que estaban en la región sub-G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> (hipodiploides) en el análisis de ciclo celular [46, 181]. Para este análisis se utilizó un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson, San José, CA, EE.UU), equipado con un laser de argón a 488 nm. Para el análisis de los datos se utilizó un software libre WinMDI 2.8 o FCS Express 4 Flow Research (Versión de prueba).

## **Distribución intracelular del análogo edelfosina fluorescente en macrófagos J774 infectados con *L. panamensis***

Los macrófagos de la línea celular J774 de ratón fueron crecidos en el medio de cultivo RPMI-1640, suplementado con SFB al 10%, 2 mM L- glutamina, 100 U/ml penicilina y

100 µg/ml estreptomina a 37°C y con 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente estas células fueron infectadas con promastigotes en fase estacionaria a una relación 1:10 macrófago/promastigotes, partiendo de un total de macrófagos de 3 x 10<sup>5</sup> células/ml en medio RPMI-1640. Los promastigotes que no infectaron fueron eliminados mediante 2-3 lavados sucesivos con tampón fosfato salino (PBS 1X). Las células control (no infectadas) y las células infectadas fueron incubadas posteriormente con 10 µM del análogo de edelfosina fluorescente all- (E)-1-O-(15'-fenilpentadeca-8',10',12',14'-tetraenil)-2-O-metil-*rac*-glicero-3-fosfocolina (PTE-ET) (donado por F. Amat-Guerri y A.U Acuña, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España) en medio de cultivo RPMI-1640 completo. Adicionalmente las células J774 fueron incubadas con 10 µM de PT-ET durante una hora y lavadas con PBS 1X e infectadas con *L. panamensis* en completa oscuridad durante 6 horas. Posteriormente, todas las muestras fueron fijadas con formaldehído al 1% y analizadas en un microscopio de fluorescencia Zeiss Axioplan a 40X de aumento (Carl ZeissGmbH, Oberkochen, Alemania).

## **Cuantificación de la carga parasitaria en macrófagos infectados**

Células macrofágicas J774 fueron infectadas con promastigotes de *L. panamensis* de la misma forma que en el apartado anterior. El número de parásitos intracelulares viables fue calculado mediante la incubación de las células infectadas en medio RPMI-1640, conteniendo 0.008% de dodecilsulfato sódico (SDS), produciendo un daño en la membrana del macrófago que permitía la salida de los amastigotes. Inmediatamente después, se adicionaba de nuevo RPMI-1640 con SFB al 20% para detener la lisis celular. Todas las muestras para las que se determinaría la carga parasitaria fueron secuencialmente diluidas en placas de 96 pocillos que contenían el medio bifásico

Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) e incubadas a 26°C durante 20 días, y examinadas semanalmente en un microscopio invertido Nikon TS-100 (Nikon, Kanagawa, Japón) para evaluar la presencia de promastigotes móviles en el medio. El recíproco de la dilución más alta donde se encontraron parásitos crecidos fue considerado como la concentración de parásitos existentes en la muestra.

## **Determinación de Óxido Nítrico (ON) por el método de nitritos**

Macrófagos de la línea celular J774 fueron colocados en placas con medio RPMI-1640 a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/ pocillo en placas de cultivo de 24 pocillos (Costar, Cambridge, MA, EE.UU) y se dejaron adherir durante dos horas a 37°C en una atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Las células no adherentes fueron eliminadas pasado este tiempo por lavados suaves con medio RPMI-1640. Las células adheridas a las placas se usaron como control negativo en ausencia de 10 µg/ml de lipopolisacárido bacteriano (LPS: inductor de óxido nítrico) (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU), y como control positivo se utilizaron células con LPS. A otro grupo de células se le añadieron diferentes concentraciones de edelfosina. Después de 18 horas de incubación a 37°C en 5% de CO<sub>2</sub> las muestras fueron centrifugadas 500 x g durante 10 minutos, y el sobrenadante fue recuperado y almacenado a -80°C hasta el análisis. La generación de óxido nítrico en las muestras fue medida indirectamente usando un método colorimétrico llamado reacción de Griess. Tres alícuotas de sobrenadante de 100 µl cada una fueron incubadas con 50 µl del reactivo de Griess recién preparado (1% sulfanilamida (S-9251, Sigma), y 7.7 mM diclorhidrato de N-1-naftiletildiamina (N-5889, Sigma) y 2,5% de ácido ortofosfórico) durante 15 minutos a temperatura ambiente, y la absorbancia de el azo-

cromóforo fue medida a 550 nm en un espectrofotómetro (Easy Reader EAR 400FT). La concentración de nitritos resultante fue determinada usando una curva estándar de nitrito de sodio. Todas las muestras fueron contrastadas contra un blanco que era el medio RPMI-1640 completo incubado durante 18 horas de igual forma que las muestras de estudio y en ausencia de células. Todos los reactivos fueron de Sigma. Los resultados fueron expresados en nanomoles de nitritos por  $10^6$  macrófagos [182].

## **Evaluación de la actividad anti-*Leishmania* en los modelos ratón y hámster**

Ratones BALB/c de seis semanas de edad y un peso entre 18-20gr, junto a hámster Syrian dorados (*Mesocricetus auratus*) con peso aproximado de 120 gr (Charles River Laboratories, Lyon France), libres de patógenos y mantenidos bajo condiciones acordes a la legislación española, estuvieron bajo ciclos de luz de 12 horas y de oscuridad de 12 horas a una temperatura de 22°C, con una dieta estándar y agua *ad libitum*. Los ratones fueron inoculados previa anestesia (Forane®) en la pata izquierda con  $2 \times 10^6$  promastigotes en fase estacionaria en un volumen total de 50µl de PBS1X. Los hámsteres fueron previamente anestesiados con Forane® inhalado, para ser inoculados intradérmicamente en la nariz con  $1 \times 10^6$  promastogotes en 50 µl de PBS1X. La inflamación en el hámster fue evidente aproximadamente entre 1-6 semanas después del inóculo. Posteriormente se separaron los animales en grupos de 7 animales. Los grupos control, sin tratamiento, solo recibían agua con la sonda gástrica. A los grupos de ratones tratados se les suministró una dosis de 15 mg/Kg de edelfosina en agua, mientras que los hámsteres recibieron una dosis 26 mg/Kg de edelfosina en agua. Tanto la patas de los ratones control y tratados fueron medidos semanalmente con un



calibrador digital; de igual forma se procedió con la nariz del hámster. Una vez se obtienen los datos semanales, estos se analizaron para calcular el índice de evolución (IE) de la lesión durante el tratamiento, midiendo el tamaño de la lesión durante el tratamiento mm / el tamaño de la lesión antes del tratamiento en mm. El peso del animal o alguna señal de morbilidad fueron monitoreadas. El tratamiento de los animales fue durante 28 días completos según el protocolo establecido. Después de este tiempo los animales fueron sacrificados

Para determinar la carga parasitaria en la lesión, se empleó el método de dilución límite descrito previamente [183]. Las biopsias obtenidas como muestras fueron pesadas y lavadas tres veces en una solución de PBS 1X que contenía 100 unidades/ml de penicilina y 100 µg de estreptomina (GIBCO BRL), y se dejaron 12 horas en descontaminación a 4°C. Tras este proceso el tejido fue de nuevo lavado 2-3 veces con PBS y antibióticos, para su posterior homogenización en un macerado de vidrio (Potter-Alejen). Del total del tejido macerado, sólo 0.1 mg/ml se cultivó en el medio de cultivo bifásico Novy-MacNeal-Nicolle (NNN) que contenía como parte líquida medio Scheneider con 10% SFB para enriquecer el medio. Este medio se añadió a de 96 pocillos para realizar el ensayo de dilución límite del tejido macerado para determinar la carga parasitaria. Los cultivos se incubaron a 26°C durante un periodo máximo de 20 días y su lectura se realizó cada semana usando un microscopio invertido Nikon TS-100 para evaluar la presencia de promastigotes viables. La recíproca dilución donde crecieron parásitos fue considerada la concentración de parásitos en 0.1 mg de tejido. El total de parásitos en el tejido se realizó considerando el peso total del tejido aislado.

## **Inducción de resistencia a Glucantime *in vitro* en promastigotes de *L. panamensis***

Promastigotes cultivados en medio de cultivo Schneider suplementado con SFB al 10%, penicilina 100 U/ml y estreptomicina 100 µg/ml a 26°C durante 5 días fueron lavados dos veces con PBS 1X y centrifugados a 1000 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. Los parásitos fueron resuspendidos a una concentración final de  $2 \times 10^6$  promastigotes/ml en medio de cultivo e incubados con Glucantime® (Aventis Pharma, Sao Paulo, Brasil) a una concentración de 4 mg/ml durante 5 días, la cual corresponde a su IC<sub>50</sub> previamente determinada por la técnica de XTT. El medicamento en el medio de cultivo era sustituido cada 4-6 días, dependiendo del crecimiento del parásito, y los parásitos fueron lavados en PBS 1X y resuspendidos a una concentración de  $2 \times 10^6$  para el análisis del ensayo XTT. Este protocolo fue repetido hasta que los parásitos incrementaran su viabilidad en presencia del compuesto hasta un 80% entre pase y pase, y se alcanzara una concentración final de 37mg/ml Glucantime®. El volumen del medicamento en todos los casos no superó el 10% del total de volumen del medio.

## **Evaluación de *L. panamensis* resistente a SbV (SbV-R) en el modelo animal hámster**

El nivel de resistencia a SbV de la cepa anterior fue evaluado en hámster dorado. Los hámsteres fueron divididos en dos grupos de 8 animales infectados con la cepa resistente a 37 mg/ml de SbV y con la cepa silvestre. Cada grupo fue inoculado intradérmicamente en la nariz con  $1 \times 10^6$  promastigotes en fase estacionaria en un volumen de 50 µl de PBS 1X. Los animales fueron previamente anestesiados con ketamina (50 mg/ml) y xilacina (5 mg/kg) intra-peritonealmente. Después de seis

semanas las lesiones fueron evidentes en ambos grupos de animales, y estos fueron tratados diariamente con una dosis de 40 mg/ml de Glucantime® de forma intramuscular usando una aguja número 27, durante 10 días. La evolución de la lesión fue evaluada según la fórmula de IE anteriormente descrita.

## **Inducción de resistencia *in vitro* a los ALPs en diferentes cepas de *Leishmania***

La resistencia a ALPs se realizó usando el mismo método que con la cepa resistente a SbV. Las cepas fueron incubadas con los ALPs a partir de su IC<sub>50</sub> inicial, y las concentraciones de cada compuesto se incrementaron gradualmente dependiendo de su nivel de resistencia alcanzado. Los parásitos fueron considerados resistentes cuando alcanzaron un crecimiento óptimo a 30 µM de cada compuesto en el medio de cultivo RPMI-1640 conteniendo 10% de SFB.

## **Análisis Estadístico**

Los resultados se muestran como media ± SD. Para calcular si los resultados obtenidos entre distintos grupos de tratamiento eran estadísticamente diferentes, se utilizaron los métodos de Mann-Whitney o de la *t*- Students. Un valor  $P < 0.05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## **Estudio de Docking proteína-ligando con la proteína quinasa AKT de *Leishmania major***

La secuencia de aminoácidos de la proteína AKT de *Leishmania major* (LmjF30.0800) se descargó de la base de datos GeneDB o TriTrypdb, versión 4.1 (Aslett et al. 2010).

Como la proteína no presentaba estructura tridimensional resuelta por métodos experimentales, se construyó un modelo de la estructura de la proteína basado en la homología de la misma contra la plantilla de la proteína AKT1 humana reportada en la base de datos Protein Data Bank (PDB). El modelo se construyó en el servidor web ESyPred3D [157]. Una vez obtenida la estructura de la proteína, los compuestos necesarios para realizar las simulaciones de docking fueron descargados de las bases de datos ZINC [158] DrugBank [184] y ChEMBL [185]. De la base de datos ZINC se obtuvieron las estructuras tridimensionales en formato MOL2; de las otras bases se obtuvieron solamente las estructuras en 2D, por lo cual se implementó el software OpenBabel [186] para la conversión a 3D. Tanto la proteína AKT como los respectivos compuestos fueron preparados para el docking por medio del paquete AutoDock Tools, con el cual se adicionaron las cargas y eliminarón los átomos o moléculas no deseadas a la hora de ejecutar el docking.

Un aspecto a tener en cuenta a la hora de realizar la simulación, es limitar el espacio de búsqueda en el cual los compuestos puedan generar la mejor interacción con los residuos del sitio activo de la proteína, y por ende se obtenga la mayor afinidad en términos de la función de puntaje del software implementado, la cual es una aproximación de la energía libre que se genera en la interacción proteína ligando. Para determinar las coordenadas del sitio, se realizó un alineamiento pareado entre la proteína AKT de humano contra la de *Leishmania major*, mapeando los residuos que en el humano se reportan que pertenecen al sitio activo. Finalmente el docking se ejecutó por medio del software libre AutoDock VINA [160].

## **Detección *in silico* de interacciones de la AKT de *Leishmania spp* con otras proteínas del parásito**

Para determinar las posibles interacciones que la proteína AKT de diferentes especies de *Leishmania* posee con otras proteínas, se utilizó como base un interactoma generado para el parásito a través de herramientas *in silico* [161]. La red de interacción se construyó por medio de la comparación de las proteínas de *Leishmania* contra proteínas que reportan interacciones presentes en tres bases de datos: PSIMAP, PEIMAP e IPFAM. Todas las interacciones reportadas están relacionadas con un valor de confiabilidad, el cual se fusionó para crear un puntaje consenso entre 0 y 1. El puntaje criterio para seleccionar una interacción en el parásito fue es si el puntaje consenso era mayor de 0.7. Según esto se extrajeron todas las interacciones relacionadas con la proteína AKT en *Leishmania* de las bases de datos de *L. infantum*.

## **Extracción de RNA total de la cepa de *L. donovani***

Para la extracción del RNA total se utilizaron  $1 \times 10^7$  promastigotes de *L. donovani* ((MHOM/IN/80/Dd8) y para su purificación se utilizó el RNeasy mini kit (QUIAGEN) siguiendo el protocolo y las especificaciones recomendadas por la casa comercial. La calidad y pureza del RNA total se verificó en un gel de agarosa al 0.8% en 1X TBE (Para preparar una solución concentrada 50X: pesar 242 g de tris base y disolverlo en 500 ml de agua estéril, agregar 57.1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8. Aforar a 1 litro). El gel fue teñido con bromuro de etidio al 0.5  $\mu\text{g/ml}$ .

## Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se realizó siguiendo el protocolo descrito en el kit comercial First Strand cDNA Synthesis kit RT-PCR.. La síntesis de cDNA se realizó a partir de 2 µg de RNA total y 1 µM del oligo (pdT)<sub>15</sub> como cebador de anclaje, en presencia de 10 unidades de la enzima transcriptasa reversa AMV (Roche) a 42°C durante 1 hora. Finalmente las muestras se incubaron a 75°C durante 10 minutos y se almacenaron a -20°C hasta la realización de la PCR.

## Evaluación de la calidad del cDNA obtenido por transcripción reversa

Para evaluar la calidad del cDNA se amplificó un gen de expresión constitutiva en el parásito, el gen *kmp-11* de manera similar a lo descrito en Ramírez *et al.*, 1998. Este gen codifica para la proteína 11 de la membrana de los kinetoplastidios (KMP11) y es una de las moléculas más abundante en la superficie de *Leishmania*, en diferentes especies de *Leishmania*, entre ellas *Leishmania panamensis*. Por tal motivo este gen *kmp-11* fue utilizado para evaluar la calidad del cDNA obtenido [156] .

Los oligonucleotidos utilizados para la amplificación fueron CB1 (5'-ATGGCCACCACGTACGAGGAG-3') y CB2 (5'-GGACGGGTACTGCGCAGCCTT-3'), la reacción se llevó a cabo en un termociclador Perkin-Elmer 2400, programado con las siguientes condiciones de amplificación: un ciclo inicial de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, seguido de 30 ciclos de 1 minuto de desnaturalización a 95°C, 1 minuto de alineamiento de los oligonucleótidos a 58°C y 1 minuto de extensión a 72°C.

El producto amplificado se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio a 0.5 µg/ml [156].

## **PCR del gen *rac-akt like***

EL gen *rac* “AKT” de *L. donovani* fue amplificado a partir de cDNA, con la pareja de cebadores, sentido AKT (5-CACCATGAGTGGTTATTTGAAGGTGCT) y anti-sentido AKT: 5-(GGATCCCTACTTCGTGGGCTTGTCG) (Sigma) en presencia de DMSO al 8%, 1.5 mM Mg<sup>2+</sup>, 200 µM DNTPs, tampón 1X y DNA polimerasa (GoTaq DNA polimerasa, Promega, Barcelona, España). El programa de amplificación fue el siguiente 95°C durante 5 minutos de desnaturalización, 35 ciclos de amplificación (97°C-30 seg, 61°C- 50 seg y 72°C- 1min con 50 seg), extensión final a 72°C-15 min. Se empleó un termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600. El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% (p/v) en tampón TBE (45 mM Tris, 45 mM ácido bórico, 1 mM EDTA) y mediante tinción con bromuro de etidio. Las bandas correspondientes a los fragmentos amplificados fueron visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta, y sus tamaños fueron determinados por comparación con el marcador de peso molecular fX174/Hae III (Promega, Barcelona, Spain).

## **Extracción de las bandas amplificadas**

Las bandas amplificadas específicamente y visualizadas en la agarosa, se cortaron con una hoja de bisturí nueva y se recolectaron en un tubo estéril de 1.5 ml. Para recuperar el fragmento de DNA amplificado del gel se utilizó el kit GFX PCR DNA and Gel Band Purification y el protocolo aconsejado por la casa comercial GE Healthcare.

Los amplificadores extraídos a partir del gel se cuantificaron en un equipo NanoDrop™ 8000 espectrofotómetro (Thermo Scientific) para su posterior clonación.

## **Clonación del producto amplificado**

El producto purificado (1533 pares de bases) se clonó en el plásmido PCR 2.1 TOPO® (Invitrogen™). Las condiciones de la reacción de ligación se realizaron de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, empleando una proporción plásmido: inserto de 1:3. El producto de ligación se empleó para transformar bacterias competentes *E. coli* de la cepa DH5α.

## **Preparación de bacterias competentes**

Se utilizaron bacterias *E. coli* de la cepa DH5α cultivadas durante toda la noche. Para esto se tomaron 10 µl del cultivo bacteriano y se inocularon en 990 µl de medio LB sin antibióticos. El cultivo se incubó a 37°C en agitación hasta alcanzar una DO<sub>600</sub>=0.5. Las bacterias fueron puestas en hielo durante 5 minutos y luego centrifugadas a 3500 x g durante 10 minutos a 4°C. Las bacterias sedimentadas se resuspendieron en 20 ml de buffer TFB1 estéril (100 mM RbCl, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 30 mM acetato de potasio, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glicerol, PH 5.8) y se incubaron a -20°C durante 90 minutos para luego centrifugar a 3500 x g durante 10 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 2 ml de buffer TFB2 (10mM MOPS, 10mM RbCl, 75mM CaCl<sub>2</sub>, 15% glicerol, pH 8.0). Se alicuotaron en fracciones de 200 µl y se congelaron a -70°C hasta su uso.



## Transformación y selección de clones

Para la transformación, se utilizaron 100  $\mu\text{L}$  de bacterias *E. coli* de la cepa DH5 $\alpha$  competentes, las cuales se descongelaron en hielo. En un vial de 1.5 ml se adicionó 100  $\mu\text{l}$  de bacterias y 2  $\mu\text{l}$  de la reacción de ligación y se incubaron en hielo por 20 minutos seguido de un choque térmico a 42 $^{\circ}\text{C}$  durante 30 segundos en baño-maría y retornando inmediatamente el vial al hielo durante 2 minutos. Finalmente se adicionó 250  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo SOC a 37 $^{\circ}\text{C}$  sin ampicilina y se incubó en agitación constante. Trascurrido este tiempo se tomaron 200  $\mu\text{l}$  del cultivo bacteriano, y se sembraron en placa Petri con medio LB agar, que contenía 100  $\mu\text{g/ml}$  de ampicilina, 0.5 mM de IPTG (isopropil  $\beta$ -D-tiogalactosido) y 80  $\mu\text{g/ml}$  de X-gal. El volumen restante se centrifugó a 3500 x g durante cinco minutos, se descartó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en aproximadamente 150  $\mu\text{l}$  de medio LB y se sembró en el mismo medio de selección. Las placas de Petri se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.

La selección de los clones transformados, se realizó inicialmente visualizando las colonias blancas o transparentes. Las colonias seleccionadas que presentaron esta coloración fueron subcultivadas en 1.5 ml de medio LB líquido que contenía Ampicilina a 100  $\mu\text{g/mL}$  y se incubaron a 37 $^{\circ}\text{C}$  en agitación constante durante toda la noche.

## Tamizaje de las colonias seleccionadas

Cada uno de los clones bacterianos seleccionados fue evaluado para determinar la presencia del inserto, para lo cual se hizo un miniprep de las bacterias seleccionadas empleando el kit NucleoSpin (Macherey-Nagel). De los plásmidos purificados se realizó una PCR con los oligonucleótidos específicos para el inserto (FLm AKT: 5-CACCATGAGTGGTTATTTGAAGGTGCT y FLm AKT: 5-

GGATCCCTACTTCGTGGGCTTGTCG). La presencia del producto amplificado correspondiente al tamaño del inserto esperado, se verificó por electroforesis en gel de agarosa, como se ha descrito previamente.

## **Secuenciación e identificación de un gen putativo en *Leishmania***

Los productos clonados en PCR 2.1 TOPO® (Invitrogen™) un total de 6 clones se secuenciaron en un equipo automatizado utilizando el kit BigDye Terminator Cycling, por ambas cadenas empleando los oligonucleótidos M13 sentido y M13 antisentido presentes en este plásmido, los cuales flanquean el sitio de clonación.

Las secuencias obtenidas de ambas cadenas fueron comparadas y editadas con el programa ChromasPro, versión 2.0 El alineamiento de las dos cadenas para corroborar la identidad de la secuencia obtenida, se realizó empleando el programa BlastN de la base de datos Gene<sup>DB</sup> ([http://www.genedb.org/blast/submitblast/GeneDB\\_Ldonovani\\_BPK282A](http://www.genedb.org/blast/submitblast/GeneDB_Ldonovani_BPK282A)). Para determinar el porcentaje de identidad en la secuencia de aminoácidos se utilizó el programa BlastX de base de datos del Gene<sup>DB</sup>, que traduce la secuencia de nucleótidos a aminoácidos y los compara con las base de datos de proteínas de *Leishmania*. Para reconfirmar o buscar identidad de las secuencias de aminoácidos obtenidas en el BLASTX, con alguna proteína ya conocida, se utilizó la base de datos de familias de proteínas y dominios PROSITE <http://tw.expasy.org/prosite/>.

Una vez la secuencia fue obtenida esta secuencia se comparó contra otras especies en la base de datos de Uniprot.

# **Electroforesis de proteínas en geles SDS-PAGE, Western-blot, e inmunodetección**

1.5 x 10<sup>7</sup> células fueron lisadas en 160 µl de 1% CHAPS, 150mM de NaCl, 10mM HEPES y 0,1 mM ortovanadato sódico, suplementado con inhibidores de proteasas (1mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), 20 µg/ml aprotinina, 20 µg/ml leupeptina). Tras una agitación vigorosa e incubación en hielo durante 2 horas, y posterior congelación a -80°C por 3 días, las proteínas solubilizadas se obtuvieron por centrifugación a 13000 rpm 20 min a 4 °C. La medida de la concentración proteica se realizó mediante el método de Bradford, método colorimétrico basado en la reacción del colorante azul de Coomassie G-250 al unirse a proteínas. La absorbancia de una disolución ácida de este colorante pasa de 465 nm a 595 nm cuando se une a los grupos amino libres de las proteínas. Se utilizó la solución comercial Kit Protein Assay (BioRad, Richmond, CA, USA), y la cantidad de proteínas totales de cada muestra se determinó mediante la interpolación de las absorbancias obtenidas en una curva patrón realizada con concentraciones conocidas de BSA (Sigma). 40-50 µg de proteínas totales fueron desnaturalizados mediante una incubación de 5 min a 95 °C en tampón Laemmli (2% SDS, 10% glicerol, 140 mM β-mercaptoetanol, 60 mM Tris-HCl (pH 6.8), 0,01% azul de bromofenol), y sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (dodecilsulfato sódico) (SDS-PAGE). Una vez separadas en función de su peso molecular, las proteínas fueron transferidas a membranas de PVDF (Merck Milipore) previamente activadas en etanol absoluto (*Western-blot*) El tampón de transferencia utilizado contenía 25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% (v/v) metanol. Tras eliminar los restos de metanol mediante un lavado con tampón TBS-T (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.1% Tween-20). A continuación, las membranas fueron bloqueadas con

leche desnatada al 5% (p/v) en TBS-T durante 90 min a temperatura ambiente y agitación, y posteriormente incubadas durante 1 h a temperatura ambiente, o toda la noche a 4 °C, con los anticuerpos primarios que más adelante se detallan. Tras el exhaustivo lavado de las membranas, se procedió a la incubación con los correspondientes anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa de rábano (HRP) durante 1h a temperatura ambiente en agitación, y a su posterior lavado en TBS-T. Finalmente, las membranas se incubaron en oscuridad durante dos minutos con el sustrato ECL-PLUS (*Western Blotting Detection*, GE Healthcare Life Sciences). El peso molecular de las proteínas en estudio se calculó utilizando marcadores estándar de peso molecular conocido (Precision Plus Protein™ Standards, BioRad). La película de revelado usada fue Fujifilm súper RX. También se utilizó el equipo Odyssey (LI-COR Biosciences) para capturar las imágenes directamente de la membrana de Western blot. En algunos casos las membranas fueron reutilizadas. Para conseguir eliminar los anticuerpos ya unidos, sumergíamos las membranas en 100 mM β-mercaptoetanol, 2% SDS, 62,5 mM Tris-HCl pH 6.2 durante 30 min a 50 °C con agitación ocasional, y tras el posterior lavado con TBST, las membranas quedaban listas para ser reutilizadas, comenzando con el bloqueo con leche al 5%, y continuando con las incubaciones con los anticuerpos correspondientes. Anticuerpos primarios utilizados y diluciones empleadas:

- Anticuerpo monoclonal de conejo IgG (244F9) anti-60-kDa phospho- AKT (Thr 308) que reconoce la forma fosforilada en la treonina 308 de la proteína AKT, dilución 1:1000 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). Este anticuerpo tiene reacción cruzada con humano, ratón y rata.

- Anticuerpo policlonal IgG de conejo anti-AKT1/2/3 (H-136), dilución 1:1000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc)
- Phospho-AKT Substrate (RXRXXS\*/T\*) (23C8D2) Rabbit mAb # 10001. 1000 (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA)

## **Medio de Cultivo Novy-MacNeal-Nicolle (NNN)**

Se utiliza un erlenmeyer con tapa de 150 ml previamente estéril, se depositan en él 42.5 ml de agua destilada, 0.65gr de agar-agar y 0.3gr de NaCl. Se llevan a la autoclave a 15 lb de presión durante 15 minutos hasta alcanzar una temperatura de 121°C. Se saca de la autoclave, se cierra la tapa y se deja a temperatura ambiente, hasta alcanzar una temperatura entre 55-65°C. Se adicionan 7.5 ml de sangre de conejo anticuagulada con citrato de sodio 129 mM y desfibrinada con perlas de vidrio en un vaso de precipitación en agitación constante durante 15 minutos. Posteriormente, se adiciona la sangre por las paredes para evitar la hemolización y se agita manualmente hasta la homogenización. Se sirven 2.5 ml de este material en cada tubo Falcon™ de 15 ml o 30 µl para las placas de 96 pocillos. Estos tubos o las placas de 96 pocillos se colocan en posición oblicua para formar bisel y se llevan a refrigeración a 4°C. La fase líquida del medio puede ser tampón fosfato salino PBS 1X o medio de cultivo. A la sangre se le puede adicionar antibióticos para evitar contaminación (100 unidades/ml de penicilina, y 100µg/ml estreptomicina). Protocolo usado en el Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales PECET- Colombia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Mollinedo, F., et al., *Selective induction of apoptosis in cancer cells by the ether lipid ET-18-OCH<sub>3</sub> (Edelfosine): molecular structure requirements, cellular uptake, and protection by Bcl-2 and Bcl-X(L)*. *Cancer Res*, 1997. **57**(7): p. 1320-8.
2. Tsvetkov, A.S., et al., *A small-molecule scaffold induces autophagy in primary neurons and protects against toxicity in a Huntington disease model*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. **107**(39): p. 16982-7.
3. Thimmaiah, K.N., et al., *Identification of N10-substituted phenoxazines as potent and specific inhibitors of Akt signaling*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(36): p. 31924-35.
4. Schulte, T.W. and L.M. Neckers, *The benzoquinone ansamycin 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin binds to HSP90 and shares important biologic activities with geldanamycin*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1998. **42**(4): p. 273-9.
5. Agnew, E.B., et al., *Measurement of the novel antitumor agent 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin in human plasma by high-performance liquid chromatography*. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001. **755**(1-2): p. 237-43.
6. Taylor, V.M., et al., *Leishmania tarentolae: utility as an in vitro model for screening of antileishmanial agents*. *Exp Parasitol*, 2010. **126**(4): p. 471-5.
7. David-Cordonnier, M.H., et al., *DNA and non-DNA targets in the mechanism of action of the antitumor drug trabectedin*. *Chem Biol*, 2005. **12**(11): p. 1201-10.
8. Gajate, C., et al., *Involvement of mitochondria and caspase-3 in ET-18-OCH<sub>3</sub>-induced apoptosis of human leukemic cells*. *Int J Cancer*, 2000. **86**(2): p. 208-18.
9. Gajate, C., et al., *Induction of apoptosis in leukemic cells by the reversible microtubule-disrupting agent 2-methoxy-5-(2',3',4'-trimethoxyphenyl)-2,4,6-cycloheptatrien-1-one: protection by Bcl-2 and Bcl-X(L) and cell cycle arrest*. *Cancer Res*, 2000. **60**(10): p. 2651-9.
10. Andrade, M.A., et al., *Increased rat alveolar macrophage expression of functional iNOS induced by a Dirofilaria immitis immunoglobulin superfamily protein*. *Nitric Oxide*, 2005. **13**(4): p. 217-25.
11. Henao, H.H., et al., *[Efficacy and toxicity of pentavalent antimonials (Glucantime and Pentostam) in an American cutaneous leishmaniasis animal model: luminometry application]*. *Biomedica*, 2004. **24**(4): p. 393-402.
12. Lambert, C., et al., *ESyPred3D: Prediction of proteins 3D structures*. *Bioinformatics*, 2002. **18**(9): p. 1250-6.
13. Irwin, J.J., et al., *ZINC: A Free Tool to Discover Chemistry for Biology*. *J Chem Inf Model*, 2012.
14. Knox, C., et al., *DrugBank 3.0: a comprehensive resource for 'omics' research on drugs*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(Database issue): p. D1035-41.
15. Gaulton, A., et al., *ChEMBL: a large-scale bioactivity database for drug discovery*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(Database issue): p. D1100-7.
16. O'Boyle, N.M., et al., *Open Babel: An open chemical toolbox*. *J Cheminform*, 2011. **3**: p. 33.
17. Trott, O. and A.J. Olson, *AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading*. *J Comput Chem*, 2010. **31**(2): p. 455-61.

18. Florez, A.F., et al., *Protein network prediction and topological analysis in Leishmania major as a tool for drug target selection*. BMC Bioinformatics, 2010. **11**: p. 484.
19. Ramirez, J.R., et al., *Molecular and antigenic characterization of the Leishmania (Viannia) panamensis kinetoplastid membrane protein-11*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1998. **93**(2): p. 247-54.

# Premio de divulgación científica sobre trabajos de investigación de estudiantes de máster y doctorado



La Universidad de Salamanca concede el premio  
a mejor trabajo de la rama de conocimiento de Ciencias de la Salud a

D. Rubén Eduardo Varela Miranda

por el trabajo titulado "Eficacia in vitro e in vivo del éter lípido edelfosina  
contra Leishmania spp. Y en parásitos resistentes SbV",  
en el I Certamen de Divulgación Científica sobre Trabajos de Investigación  
de Estudiantes de Máster y Doctorado

En Salamanca a 5 de julio de 2012

Cristina Pita Yáñez

Vicerrectora de Estudiantes e Inserción Profesional

María de los Ángeles Serrano García

Vicerrectora de Investigación