

ARTÍCULO DE REFLEXIÓN/REFLECTION PAPER

¿ESTÁN LOS CLC DE *Leishmania* ASOCIADOS CON LA ADAPTACIÓN DEL PARÁSITO A CAMBIOS DE pH Y/O DE OSMOLARIDAD?

Are the *Leishmania* CLC Associated with Parasite Adaptation to pH and/or Osmolarity Changes?

Marcela CAMACHO^{1,2}, Yenny LOZANO^{2,3}.

¹ Departamento de Biología, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Ciudad universitaria, edificio 421. Cra 30 n.º 45-03. Bogotá, Colombia.

² Laboratorio de Biofísica, Centro Internacional de Física, Edificio Manuel Ancizar, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Bogotá, Colombia.

³ Doctorado en Ciencias Farmacéuticas, Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá. Bogotá, Colombia.

For correspondence. mmcamachon@unal.edu.co

Received: 12th May 2015, Returned for revision: 8th July 2015, Accepted: 31st August 2015.

Associate Editor: Edwin Acosta Virguez.

Citation / Citar este artículo como: Camacho M, Lozano Y. ¿Están los CLC de *Leishmania* asociados con la adaptación del parásito a cambios de pH y/o de osmolaridad?. Acta biol. Colomb. 2016;21(1)Supl:S265-277. doi: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v21n1sup.50591>

RESUMEN

Leishmania es un protozoario patógeno, que transita durante su ciclo de vida desde el intestino de su vector hasta un compartimiento fagolisosomal al interior de su célula hospedera, el macrófago. Durante este recorrido el parásito está expuesto a ambientes que cambian en temperatura, pH y presumiblemente osmolaridad. Para su supervivencia, *Leishmania* debe hacer ajustes para adaptarse y la expresión de canales de cloruro ha sido implicada en estos. Basándose en los antecedentes de nuestro grupo de investigación, que registró corrientes de cloruro voltaje dependientes luego de la inyección de mRNA de promastigotes de *Leishmania* en ovocitos de *Xenopus laevis*, se postula que éstas son el resultado de la actividad de proteínas CLC. Se mencionan algunas bases moleculares de la adaptación de este parásito con énfasis en transportadores, regulación de calcio, pH y osmolaridad. Con base en datos del grupo se argumenta que la osmolaridad de la vacuola parasitófora es alta. Además se da evidencia de la transcripción en promastigotes de tres genes que codificarían CLC putativos, y se postulan funciones potenciales que llevarían a cabo en los dos estadios del parásito.

Palabras clave: canal de cloruro CLC, *Leishmania*, osmolaridad, pH, proteína CLC.

ABSTRACT

Leishmania is a protozoan pathogen that transits during its lifecycle from the gut of the vector to a phagolysosomal compartment within its host cell, the macrophage. During this journey, the parasite is exposed to environments that change in temperature, pH and osmolarity. For their survival, *Leishmania* must make adjustments to adapt and expression of chloride channels has been involved in these. Based on our research group results: reported voltage-dependent chloride currents after mRNA injection of promastigotes of *Leishmania* in *Xenopus laevis* oocytes, it is postulated that these are the result of CLC protein activity. Some molecular bases of adaptation of this parasite are mentioned with emphasis on regulation of calcium, pH and osmolarity. Based on data from our group it is argued that the osmolarity of the parasitophorous vacuole is high. In addition, evidence of the transcription in promastigotes of three genes that encode putative CLC is given and potential functions that take place in the two stages of the parasite are postulated.

Keywords: CLC chloride channel, CLC protein, *Leishmania*, Osmolarity, pH.

INTRODUCCIÓN

Leishmania es un organismo unicelular, del dominio Eukarya, reino Protista, agente causal de leishmaniosis, enfermedad de impacto en salud pública en las zonas tropical y subtropical del mundo. En su ciclo de vida transita desde el intestino de su vector invertebrado, un ambiente con fluctuaciones de pH (Santos *et al.*, 2008) y presumiblemente de osmolaridad, hasta un compartimiento intracelular ácido al interior de su célula hospedera, el macrófago (Antoine *et al.*, 1990), en donde la osmolaridad podría ser alta (McConville *et al.*, 2007, y esta revisión). Para mantener homeostasis iónica, volumen, osmolaridad y pH en ambientes que se diferencian durante su ciclo de vida, este parásito debe hacer ajustes y garantizar la entrada adecuada de nutrientes y salida de desechos.

Transporte iónico en membranas celulares

El transporte de iones y nutrientes es fundamental para la vida y debe hacerse a través del lindero de la célula, la membrana plasmática. Las membranas celulares son bicapas de lípidos con proteínas integrales inmersas en su espesor (Singer y Nicholson, 1972). Su estructura las hace semi-permeables limitando el paso en particular, a átomos o moléculas con carga neta por su baja solubilidad en la bicapa lipídica. En consecuencia, el transporte de iones y moléculas hidrofílicas como monosacáridos se garantiza a través de proteínas especializadas (canales iónicos, trasportadores e intercambiadores), de naturaleza anfipática (hidrofóbica-hidrofílica), que permiten su paso a través de la membrana. Así mismo, la membrana celular genera gradientes (diferencias de concentración y/o carga) haciendo uso de energía por la función de proteínas integrales de membrana especializadas (bombas e intercambiadores). Las bombas gastan energía, que puede ser en forma de ATP, para llevar un ión en contra de su gradiente electroquímico (transporte activo primario) mientras que los intercambiadores usan la energía potencial del gradiente electroquímico de un ión para concentrar otro ión u otra molécula (transporte activo secundario). El mecanismo por el cuál las bombas logran transportar sus sustratos está dado por cambios en su conformación, acople temporal con el sustrato y cambios de afinidad energía dependiente, lo que resulta en tasas de transporte bajas (Läuger, 1991). La disipación de la energía potencial de los gradientes construidos por bombas e intercambiadores permite el transporte de iones, monosacáridos y aminoácidos a través de transportadores selectivos: canales iónicos o transportadores de monosacáridos o aminoácidos respectivamente (transporte pasivo).

Se acepta como mecanismo de transporte para canales iónicos el flujo de iones a favor de un gradiente electroquímico por un poro acuoso en la estructura del canal que atraviesa el espesor de la membrana celular (Hille, 2001). Estas proteínas presentan las tasas de flujo de transporte más

altas. Los transportadores e intercambiadores a su vez transportarían su substrato luego de acoplarlo y de cambios de conformación en la estructura de la proteína, los primeros a favor del gradiente, los segundos en contra, lo que resulta en tasas de flujo intermedias o bajas.

Canales iónicos

La función de canales iónicos es base de la transmisión de impulsos eléctricos (potenciales de acción) y la contracción muscular. Los canales iónicos son proteínas integrales de membrana, especializadas en el transporte de iones para lo cual tienen un poro acuoso en su interior. Son capaces de conducir iones a velocidades muy altas, al tope del límite de la electro-difusión, al tiempo que escogen un ión en forma muy selectiva (Hille, 2001). Se clasifican acorde con su mecanismo de apertura: voltaje, ligando y mecano-dependientes y/o por la especie iónica más permeable: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- (Hille, 2001). Dentro de los canales encargados del transporte de Cl^- se reconocen tres familias: los voltaje dependientes o familia CLC, los ligando dependientes de GABA o Glicina y transportadores ABC (Jentsch *et al.*, 2002).

Familia CLC

Los CLC son una familia de proteínas que incluye canales iónicos voltaje dependientes de Cl^- e intercambiadores anión/ H^+ . Todos los CLC estudiados en bacteria son intercambiadores (Accardi y Miller, 2004; Accardi *et al.*, 2005; Stockbridge *et al.*, 2012). En células eucariota, la localización celular de éstas muestra que los que se comportan funcionalmente como canales de Cl^- se ubican en la membrana plasmática, y se asocian con estabilización del potencial de membrana y regulación de volumen. Por otra parte, los intercambiadores se restringen a membranas intracelulares donde se postulan como *shunts*¹, acoplados a bombas ATPasas vacuolares para facilitar la acidificación de estos compartimientos (Miller, 2006) y/o para la concentración de un anión de interés (De Angeli *et al.*, 2006; Novarino *et al.*, 2010).

El estudio de esta familia ha sido tardío comparado con el de los canales voltaje dependiente de cationes. Sin embargo, recientemente han ganado atención por su ubicuidad, su comportamiento electrofisiológico, su asociación con algunas enfermedades, su estructura molecular y como se mencionó al hecho que hay miembros que se comportan como canales de Cl^- y otros como intercambiadores anión/ H^+ (revisado por Miller, 2006). Este último aspecto es interesante desde el punto de vista biofísico porque presumiendo la misma estructura molecular, ésta parece sustentar dos mecanismos diferentes de transporte que se asumían excluyentes (revisado por Miller, 2006), flujo de iones a favor de un gradiente de concentración en los canales y paso energéticamente acoplado en los intercambiadores anión/ H^+ (revisado por Miller, 2015).

¹ *Shunt*: paso para una carga de un contra-ión

CIC-0, el prototipo de canal

CIC-0 de *Torpedo californica* fue descrito por primera vez por el grupo de Christopher Miller y fue el primer miembro de la familia en ser caracterizado con técnicas electrofisiológicas (Miller y White, 1980). Éstas permiten estudiar moléculas cuya función se asocia con el transporte de carga (+/-) a través de membranas. Registros electrofisiológicos de esta proteína aislada y re-incorporada en bicapas, indicaron que es un canal de Cl⁻ voltaje dependiente (Miller, 1982). Estos canales se abren a potenciales muy negativos y permanecen abiertos la mayor parte del tiempo cuando se analizan en escala de segundos. Al estudiar su comportamiento en escala de milisegundos se observa que una vez abierto este canal fluctúa rápidamente en tres niveles de conductancia espaciados equitativamente, lo que refleja la función de dos poros acuosos cuya apertura y cierre son independientes, por lo que Miller sugirió que operan como una escopeta de dos cañones, *double-barrel Cl channel* (Miller, 1982).

Desde el punto de vista del mecanismo de apertura debería considerarse ligando-voltaje dependiente en vista que la apertura de la compuerta también depende de la presencia de Cl⁻ y su concentración absoluta. Así, el efecto de la concentración extracelular de Cl⁻ fue estudiado cambiando ésta y, determinando el tiempo de duración de la apertura e inactivación del canal. A mayor concentración extracelular de Cl⁻ se observaron facilitación de aperturas rápidas y menor tiempo de inactivación, indicando que la presencia de este ión favorece su apertura. En experimentos en los que se favorecía la corriente de Cl⁻ a través de este canal al aumentar la fuerza electromotriz para este ión, se observó probabilidad de apertura de 0,83 a 150 mM y de 0,22 a 1 mM de Cl⁻ extracelular, mostrando que los canales no se abrían a concentraciones bajas de Cl⁻. Además, a medida que la concentración extracelular de Cl⁻ disminuye la activación voltaje dependiente se corre hacia la derecha, es decir disminuye. En otras palabras, se necesita de mayor diferencia de voltaje para abrir los canales e indica que la dependencia del voltaje se asocia con el flujo de Cl⁻ (Chen y Miller, 1996).

EcCIC1, el prototipo de intercambiador procariota

EcCIC1 de *Escherichia coli* es el intercambiador CLC más estudiado. Su análisis funcional indica que transporta 2Cl⁻/1H⁺ con tasas relativamente bajas en comparación con CIC-0 y en contraste con los canales, su apertura es pH y no voltaje-dependiente (Accardi y Miller, 2004; Accardi *et al.*, 2005). Estudios de estructura tridimensional obtenida por dispersión de rayos X sobre cristales de EcCIC1, muestran que es una proteína dimérica, apoyando los estudios electrofisiológicos en canales (Miller, 1982). Cada monómero tiene una arquitectura antiparalela en forma de reloj de arena que está conformada por 18 hélices alfa, 11 de las cuales atraviesan el espesor de la membrana. La zona de selectividad para el anión se atribuye a regiones en los dominios transmembranales denominados D (GSGIPE:

106-111), F (GREGP: 146-150) y N (GIFAP: 355-359) (Dutzler *et al.*, 2002; Jentsch *et al.*, 2002). La conservación de estas regiones es la marca CLC y se parte de ella para describir los miembros de esta familia. El sitio de unión de Cl⁻ yace hacia la mitad de la membrana en la ruta del poro (Pusch *et al.*, 1995; Chen y Miller, 1996; Dutzler *et al.*, 2002). A la selección de Cl⁻, paradójicamente contribuye una carga negativa que es movilizada por este anión al permear el CLC, abriéndolo, el llamado Glu_{ext} (residuo E148 de EcCIC-1 de *E. coli*; Dutzler *et al.*, 2002; Dutzler *et al.*, 2003). El paso y estabilización parcial de Cl⁻ en el poro estarían coordinados por otros residuos (S107 y Y445 en EcCIC-1 de *E. coli*; Dutzler *et al.*, 2002; Dutzler *et al.*, 2003).

El modelo de transporte del intercambiador supone selección del sustrato y translocación a través de cambios conformacionales en donde la energía potencial del gradiente electroquímico de un ión se usa para transportar el otro ión en contra de su gradiente (Accardi y Miller, 2004). En EcCIC1 el transporte compromete dos residuos glutamato asociados con el acoplamiento del H⁺: Glu_{ext} (E148) y Glu_{int} (E202). El ciclo de transporte iniciaría cuando un H⁺ se acopla con el Glu_{int}, que luego es translocado hacia el Glu_{ext} en donde al protonar la cadena lateral de este residuo lo desplazaría para favorecer el paso de Cl⁻ (Miller y Nguiragool, 2009). Este último mecanismo explicaría también la apertura de los que son canales (revisado por Jentsch, 2015).

CIC-5, un intercambiador eucariota

CIC-5 ha sido extensamente estudiado porque mutaciones de este intercambiador se asocian con síndrome de Dent, una enfermedad caracterizada por proteinuria, cálculos renales y otras anomalías (revisado por Jentsch *et al.*, 2002). Estas proteínas se localizan en endosomas de reciclaje de células del túbulo contorneado proximal del nefrón en el riñón (Günther *et al.*, 1998), y su función garantizaría la expresión de transportadores para la captación de proteína, fosfato y calcio (Novarino *et al.*, 2010). En esta ubicación se ha asumido que su función es la de disipar el gradiente eléctrico (*shunt*) generado por la función de H⁺ATPasas vacuolares a cargo de la acidificación de estos compartimientos, ingresando aniones para contrarrestar el efecto eléctrico de la acumulación de H⁺. Sin embargo, estudios funcionales muestran que CIC-5 se comporta como un intercambiador capaz de introducir 2Cl⁻ y expulsar un H⁺ (Picollo y Pusch, 2005). Por tanto este proceso de transporte estaría disipando la función de la bomba, y usando el gradiente de H⁺ para concentrar Cl⁻. Este mecanismo es apoyado por datos del grupo de Thomas Jentsch quienes usando como modelo ratones, indujeron la mutación E221A en el Glu_{ext} de CIC-5, (recíprocos E148 de EcCIC1 y E166 CIC-0), desacoplando transporte de H⁺ y convirtiendo este CLC en canal de Cl⁻. Esta mutación permitió acidificación endosomal en células del túbulo proximal, pero comprometió la endocitosis de fase líquida y mediada por

receptor, así como la expresión de transportadores de fosfato (Novarino *et al.*, 2010). Estos autores sugieren entonces, que la concentración de Cl⁻ en la vía endosomal sería importante en el proceso de tráfico vesicular.

Algunas bases fisiológicas de la adaptación de *Leishmania* durante su ciclo de vida

Ciclo de vida de *Leishmania*

Protozoos del género *Leishmania* (Trypanosomatidae) son parásitos intracelulares obligados de macrófagos, incluido el

hombre, trasmítidos por la picadura de insectos hematófagos de la subfamilia Phlebotominae (género *Phlebotomus* en el Viejo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo; revisado por Bañuls *et al.*, 2007). Presentan un ciclo de vida que inicia con la picadura de una hembra infectada (vector), que inocula parásitos en su estadio flagelado infectivo (promastigote metacíclico; Fig. 1a; Fig. 1b) en la piel del mamífero, en donde son fagocitados por macrófagos (Fig. 2a) y confinados en un fagosalisosoma denominado así o como vacuola parasitófora (VP; Fig. 2b-d), para posteriormente diferenciarse a su estadio no flagelado (amastigote) con la

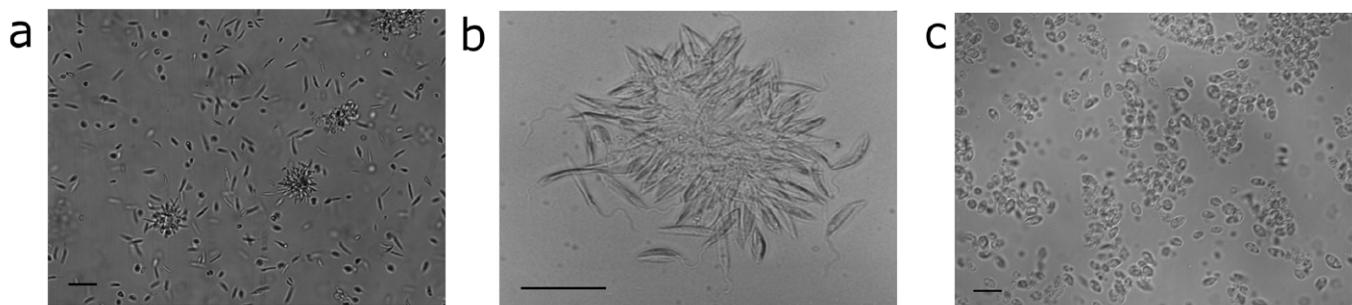


Figura 1. *Leishmania braziliensis* en cultivo *in vitro*. Promastigotes de *L. braziliensis* en fase exponencial de crecimiento con formación de algunas rosetas. Los parásitos (cepa: HOM/BR/75/M2903, Cideim, Cali, Colombia) fueron cultivados en medio Schneider (Life Technologies) suplementado con 5 % de suero fetal bovino (SFB; BioWest) a 28 °C. Note la forma alargada del parásito (a) y la formación de roseta de promastigotes de *L. braziliensis* (b). Note la presencia de flagelo. Barra representa: 15 mm. (c). Amastigotes axénicos de *L. braziliensis*. Promastigotes en fase estacionaria fueron cultivados en RPMI (Life Technologies) suplementado con 5-10 % de SFB, pH 5 y a 35 °C hasta alcanzar formas redondeadas sin flagelo aparente (retraído) como se observa en la imagen. Barra representa 10 mm.

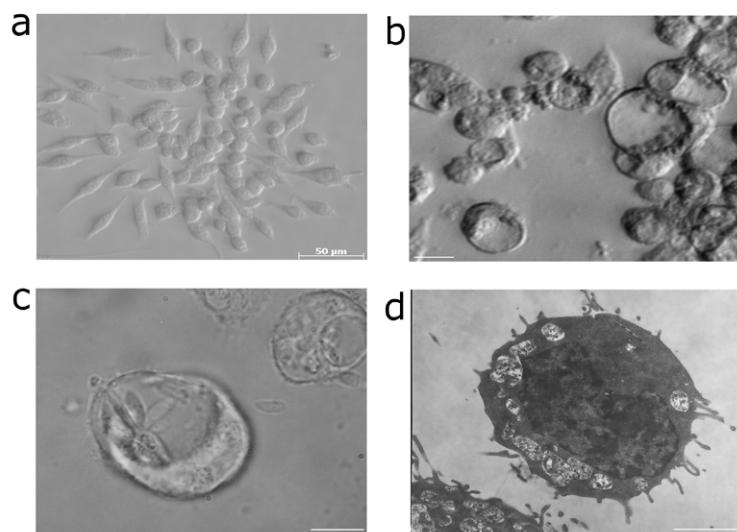


Figura 2. Infección de macrófagos. (a). La línea de macrófagos de ratón J774A.1 fue cultivada *in vitro* en RPMI suplementado con 5 % de SFB a 35 °C. (b). Macrófagos J774A.1 con 80 % de confluencia fueron infectados con *Leishmania amazonensis* (FLA/BR/67/PH8, Cideim, Cali, Colombia) en proporción 1:10 respectivamente. Micrografía de luz de cultivo a 72 horas post-infección (hpi). Note VP comunales de gran volumen con parásitos en su interior. Barra representa 30 mm. (c). Micrografía de luz de cultivo a 6 hpi. Note la presencia de parásitos con morfología típica de promastigotes en una VP comunal. Barra representa 15 mm. (d). Micrografía electrónica a 24 hpi. Note VP individuales con parásitos en su interior. Barra representa 10 mm.

influencia del ambiente de la VP y multiplicarse antes de salir de la célula hospedera e infectar nuevas células; el ciclo se completa cuando una hembra ingiere macrófagos invadidos por amastigotes que se liberan en el intestino medio del vector y se transforman en formas flageladas proliferativas, no infectivas (promastigotes procíclicos; Fig. 1a) que se multiplican y se diferencian en promastigotes metacíclicos (Fig. 1b) para migrar a la probóscide del insecto y recomenzar el ciclo (revisado por Bañuls *et al.*, 2007).

Leishmania durante su ciclo de vida encuentra ambientes que difieren en temperatura, pH (Antoine *et al.*, 1990; Santos *et al.*, 2008) y osmolaridad (Lloyd, 2000; LeFurgey *et al.*, 2005; McConville *et al.*, 2007). El ajuste a estos ambientes implica la expresión diferencial de canales iónicos, transportadores, intercambiadores y bombas para garantizar su supervivencia. Se ha sugerido que estos cambios en las condiciones ambientales, exigen a *Leishmania* mayores esfuerzos que a otros protozoarios, los que se ven reflejados en gasto de energía para obtener nutrientes y regular pH (ter Kulle, 1993).

Canales iónicos y transportadores en *Leishmania*

Se ha documentado la presencia de canales iónicos y transportadores en *Leishmania*, que están involucrados en el mantenimiento de potencial de membrana, homeostasis iónica y regulación de pH (Vieira y Cabantchik, 1995; Vieira *et al.*, 1995; DiFranco *et al.*, 1995; Vieira *et al.* 1996; Lagos *et al.*, 2007; Prole y Taylor, 2011; Prole y Marrion, 2012; Prole y Taylor, 2013), así como en el transporte de nutrientes (Glaser y Mukkada, 1992; ter Kulle, 1993; Tetaud *et al.*, 1994; Vieira *et al.*, 1996; Inbar *et al.*, 2013), la exclusión de fármacos (Ouellette *et al.*, 2001; Sudhandiran y Shah, 2003), y el transporte de purinas (Ogbunude y Dzimidi, 1993). La presencia de porinas, que en algunos protozoarios se asocia con virulencia, ha sido descrita para *Trypanosoma cruzi* en donde se involucran en lisis de la membrana de la VP (revisado por Horta, 1997). En *Leishmania* se ha sugerido que también inducirían lisis de las membranas del macrófago y de la VP explicando así la salida del parásito de su célula hospedera (Noronha *et al.*, 1994; Noronha *et al.*, 1996; revisado por Horta, 1997; Almeida-Campos *et al.*, 2013). Nuestro grupo de investigación postula que la salida de *Leishmania* obedece a un proceso de fusión de membranas más que de lisis (Quintana *et al.*, 2010).

También se han encontrado en *Leishmania* proteínas homólogas a AQP9, acuagliceroporina de mamíferos. Las acuagliceroporinas son proteínas de membrana formadoras de poro, responsables del intercambio de moléculas de bajo peso, sin carga neta tales como agua, glicerol y otros polialcoholes, gases como CO_2 y NH_3 , o cationes (Figarella *et al.*, 2007). En *Leishmania major* y *Leishmania tarentolae*, estas proteínas son capaces de transportar una forma reducida de antimonio, forma activa de derivados de

antimonio pentavalente, fármacos de primera línea en el tratamiento de leishmaniosis; la inhibición de su expresión (*down-regulation*) genera resistencia a estos medicamentos (Gourbal *et al.*, 2004; Figarella *et al.*, 2007). Sin embargo, esto podría no ser cierto para especies de *Leishmania* del Viejo Mundo en donde no se observó el mismo efecto (Maharjan *et al.*, 2008).

Regulación de calcio en *Leishmania*

Dentro de los iones activos fisiológicamente, Ca^{2+} es de especial importancia por su capacidad como primero, segundo y tercer mensajero. Un número importante de proteínas y procesos celulares son sensibles a este ión por lo que su concentración intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) es regulada. El trabajo de bombas que expulsan Ca^{2+} del citoplasma ($\text{Ca}^{+}\text{ATPasas}$) hacia fuera de la célula o lo concentran en el retículo endoplasmático, el gradiente eléctrico de la matriz de la mitocondria que fuerza este ión en su interior y la función de proteínas citoplasmáticas que atrapan calcio resultan en ($[\text{Ca}^{2+}]_i$ bajas (Benaim, 1993). La razón es que la entrada de calcio al citoplasma celular permite activar procesos como liberación de neurotransmisor, hormonas, contracción muscular y apoptosis, entre otros.

Leishmania al igual que otros eucariota controla sus niveles $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y mantiene depósitos intracelulares ricos en este ión en mitocondria y retículo endoplasmático (Philosoph y Zilberstein, 1989), para procesos relacionados con invasión a su célula hospedera, diferenciación y replicación, entre otros (revisado por Moreno y Docampo, 2003). En este parásito canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes similares a los tipo-L de mamífero (Benaim *et al.*, 2013), explicarían la entrada de este ión. Como mecanismos asociados con homeostasis de Ca^{2+} se han descrito proteínas solubles como calmodulina (Benaim *et al.*, 1987; Moreno y Docampo, 2003), y $\text{Ca}^{+}\text{ATPasas}$ (Philosoph y Zilberstein, 1989; Benaim y Romero, 1990; Corte-Real *et al.*, 1995; Mandal *et al.*, 1997). Además, para *L. donovani* parece importante la contribución de una $\text{H}^{+}\text{ATPasa}$ tipo P (Philosoph y Zilberstein, 1989) en el control de calcio.

Junto con retículo endoplasmático y mitocondria (Benaim *et al.*, 1990) otro depósito intracelular de calcio denominado acidocalcisoma (Lu *et al.*, 1997), ha sido descrito en estos parásitos. Los acidocalcisomas son organelos vesiculares densos que expresan en su membrana actividad $\text{Ca}^{+}\text{ATPasa}$ y de bombas de protones como $\text{H}^{+}\text{ATPasa}$ vacuolares, $\text{H}^{+}\text{pirofosfatasas}$ e intercambiadores $\text{Na}^{+}/\text{H}^{+}$ (Rodrigues *et al.*, 1999; Vercesi *et al.*, 2000; revisado por Docampo *et al.*, 2005). Los acidocalcisomas estarían contribuyendo a almacenar calcio pero también servirían de depósito para otros iones, aminoácidos básicos y compuestos de fosfato y además de regular niveles de calcio estarían involucrados en osmoregulación y control de pH (revisado por Docampo *et al.* 2005; Moreno y Docampo, 2009).

Regulación de pH en *Leishmania*

Las células eucariota también regulan pH a través de varios mecanismos entre los que se cuentan transportadores de membrana y sistemas tampón de protones. Esta regulación obedece a la necesidad de mantener este parámetro en un rango estrecho dado que variaciones de pH pueden alterar la función de proteínas y procesos metabólicos asociados. La regulación de pH por parte de *Leishmania* es crítica. Como el estadio intracelular (amastigote; Fig. 2) reside en un compartimiento ácido (Antoine *et al.*, 1990), pero mantiene su pH intracelular en ~6,7 (Marchesini y Docampo, 2002), el parásito debe contar con mecanismos que alivien el ingreso de H⁺ a su interior como consecuencia del gradiente de concentración. Se ha sugerido que una H⁺ATPasa tipo P, sensible a DCCD², contribuiría electrogénicamente al mantenimiento del potencial de membrana (Vm) y a la secreción de ácido en promastigotes de *L. major* (Vieira *et al.*, 1995). El funcionamiento de esta bomba estaría acoplado con un canal de Cl⁻ sensible al inhibidor de transportadores de Cl⁻ DIDS³ (Vieira *et al.*, 1995). Aceptando este modelo funcional un sistema similar ha sido descrito tanto para promastigotes como amastigotes de *L. amazonensis* (Marchesini y Docampo, 2002). En promastigotes el control de pH depende de transportadores de HCO₃⁻ y amortiguación por este ión (Vieira *et al.*, 1995; Vieira y Cabantchik, 1995; Marchesini y Docampo, 2002). Es de anotar que los amastigotes de *L. amazonensis* parecen no usar el sistema HCO₃⁻ para regular pH, pero ajustan este parámetro ante un gradiente importante de H⁺ (Marchesini y Docampo, 2002). Las H⁺ATPasas descritas en *L. donovani* además de favorecer transporte secundario de otros nutrientes podrían contribuir al control de pH (Zilberstein y Shapira, 1994), y su función estaría acoplada con el paso de Cl⁻ como contra-ión (Vieira *et al.*, 1994).

Regulación de la osmolaridad en *Leishmania*

La distribución asimétrica de iones a través de la membrana genera una diferencia de potencial. En células animales se acepta que en condiciones de reposo las células son permeables a K⁺ (Hodgkin y Huxley, 1945; Hodgkin y Huxley, 1947), por la presencia de canales iónicos selectivos a este ión que están abiertos todo el tiempo. Esto genera que el flujo de K⁺ por concentración (es mayor al interior celular) induzca un gradiente eléctrico por la salida de cargas (+), que se contrapone a la difusión de este ión por gradiente. Si la célula fuera solamente permeable a K⁺ el potencial al cual la fuerza química de este ión, es contrarestada por el gradiente eléctrico consecuencia de su movilización, sería su potencial de reposo y se podría calcular con la ecuación de Nernst. Sin embargo, al interior celular se acumulan proteínas solubles cuya carga neta es negativa a pH intracelular, que por su carga y tamaño se

constituyen en aniones impermeables y contribuyen a su vez a restringir la salida de K⁺ y a la redistribución de aniones permeables como Cl⁻. A la condición de estado estacionario que resulta de estas tendencias se le denomina equilibrio de Gibbs-Donnan. Dadas estas condiciones el efecto de la concentración de aniones impermeables contribuye un mayor número de partículas osmóticamente activas y por tanto la presión osmótica al interior de la célula se hace también mayor, y siendo ésta superior a la presión osmótica extracelular, se induce entrada de agua (ósmosis). El efecto neto sería aumento de volumen de la célula y riesgo de lisis celular. Sin embargo, esto no ocurre. La razón es el trabajo continuo de la bomba Na⁺/K⁺ATPasa que se encarga de limitar la entrada de Na⁺ y consecuentemente de agua, y se traduce en baja permeabilidad a Na⁺ y se teoriza como el doble equilibrio de Gibbs-Donnan en donde, las partículas osmóticamente activas (aniones impermeables) se contraponen al Na⁺ extracelular, que se hace impermeable por efecto de la bomba. Efecto denominado “bomba y fuga” (revisado por Hoffmann *et al.*, 2009).

En promastigotes de *Leishmania* el Vm es más negativo y de aproximadamente -110 mV (Vieira *et al.*, 1995; Vieira *et al.*, 1996; Marchesini y Docampo, 2002), con respecto a células animales y sería el resultado de electro-difusión de K⁺ (Glaser *et al.*, 1992), y el funcionamiento de H⁺ATPasas (Vieira *et al.*, 1995). En contraste, los potenciales de membrana reportados para amastigotes están en -58,5 ± 5 mV (Marchesini y Docampo, 2002), pero al igual que en promastigotes dependerían de K⁺ y contribución de H⁺ATPasas tipo P (Marchesini y Docampo, 2002).

En el intestino del vector se presume que *Leishmania* estaría expuesto a fluctuaciones de osmolaridad asociadas con la ingesta de alimento por parte del insecto, y sería capaz de responder migrando con relación a éstas (Leslie *et al.*, 2002). En la VP no es claro cuál sería la osmolaridad experimentada por el parásito. Se ha sugerido que este compartimiento es hipo-osmolar (LeFurgey *et al.*, 2005) basando esta afirmación en mediciones de permeabilidad a sacarosa en lisosomas hepáticos (Lloyd, 2000). En contraste se postula, que al interior de fagolisosomas de macrófagos se concentra gran cantidad de aminoácidos (McConville *et al.*, 2007), lo que es coherente con la concentración de solutos en vesículas secretoras (Palade, 1974). Esta última postura es favorecida en la literatura que indica que la VP tiene características fagolisosomales (Antoine *et al.*, 1998), y también por nuestros datos. Cambios de pH del medio (de ≈ neutro a ácido) y de temperatura (de 28 a 35 °C) induce diferenciación de promastigotes estacionarios en amastigotes axénicos. En estas condiciones el parásito retrae el flagelo, se redondea y disminuye su volumen (Fig. 1c). Pero el diámetro promedio de estos últimos es mayor al de amastigotes *in situ* (Fig. 2b; Fig. 3a-b). Así mismo, el volumen de VPs aisladas (Cortázar *et al.*, 2006; Navarrete, 2012) es proporcionalmente mayor al de este

2 Diciclohexilcarbodiimida

3 4-diisotiocianostilbene-2-2ácido disulfónico

compartimiento *in situ* (Quintana *et al.*, 2010; Fig. 2b; Fig. 2d; Fig. 3b). La disminución del volumen del amastigote *in situ* y el aumento de volumen de VPs aisladas es explicado fácilmente si este compartimiento fuera hiperosmolar, forzando una disminución de volumen del amastigote *in situ* por pérdida de agua y un aumento en la VP aislada por ganancia de esta.

Ante estrés hipotónico que resultaría en aumento del volumen celular, la célula animal responde regresando al volumen original en un proceso denominado decremento regulado de volumen, que se asocia con flujo de iones, monosacáridos o aminoácidos que promueven arrastre de agua (revisado por Hoffmann *et al.*, 2009). *Leishmania* durante su ciclo de vida debe hacer estos ajustes para adaptarse y ante un reto hipotónico ajusta volumen (Darling *et al.*, 1997; Vieira *et al.*, 1997) en forma similar, consecuencia de salida de Na^+ (LeFurgey *et al.*, 2001), cambios menores en K^+ y secreción de alanina (LeFurgey *et al.*, 2005; Vieria *et al.*, 1996). La disminución de alanina intracelular y su presencia en el medio extracelular sugieren que este aminoácido es secretado para perder volumen a través de un transportador capaz de disminuir el V_m de *Leishmania* (sensible a DIDS), y que podría ser un canal iónico por su comportamiento cinético (Vieria *et al.*, 1996). Este canal sería regulado por señalizadores intracelulares como proteínas kinasa A y C, y ácido araquidónico (Vieira *et al.*, 1997). Otros transportadores son importantes también para ajustes de volumen ante retos osmóticos. Así, la delección del gen que codifica para el transportador de lisina LdAAP7 resulta en promastigotes incapaces de ajustar volumen ante un reto hipo-osmolar (Inbar *et al.*, 2013). Además de acidocalcisomas (Moreno y Docampo, 2009), podrían existir otros organelos densos que concentran iones y que estarían asociados con respuestas a estrés hipotónico a través de movilización de Na^+ y Cl^- en particular (LeFurgey *et al.*, 2001).

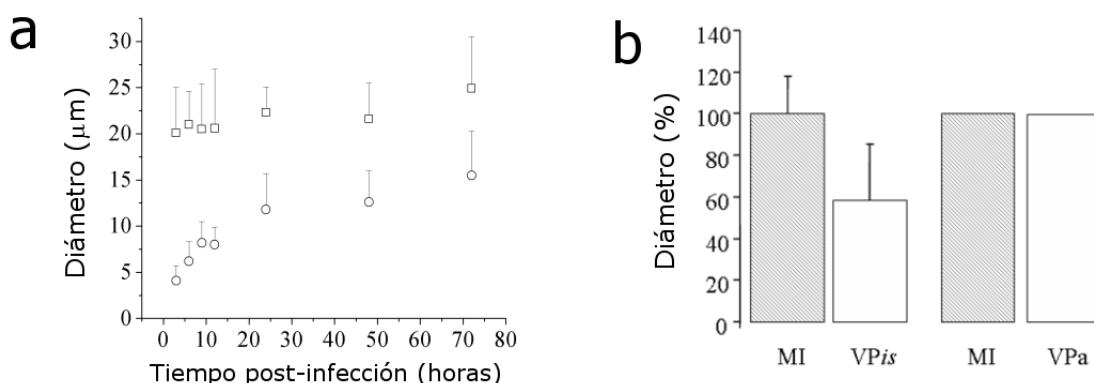


Figura 3. Volumen de la vacuola parasitófora. (a). Promedio de volumen de macrófagos infectados con *L. amazonensis* (□) o de VP *in situ* (○). Datos basados en Quintana *et al.* (2015). (b). Promedio de volumen de macrófagos infectados (MI) comparados con VP *in situ* (VPis) o VP aisladas (VPa). Datos calculados de Navarrete (2013). Barras de dispersión corresponde a desviación estándar.

Transportadores de cloruro en *Leishmania*

Algunos reportes indican la presencia de transportadores de Cl^- sensibles a DIDS en *L. major* y *L. amazonensis* que están involucrados en ajuste de osmolaridad y funcionamiento de H^+ ATPasas (Vieira *et al.*, 1995; Vieira y Cabantchik, 1995; Vieira *et al.*, 1996; Marchesini y Docampo, 2002). Estudios electrofisiológicos en bicapas lipídicas han mostrado corrientes de Cl^- en membranas de *Leishmania mexicana* (DiFranco *et al.*, 1995). Así mismo, luego de inyección en ovocitos de *Xenopus laevis* (Chaves *et al.*, 2003) y en ovocitos de la especie nativa *Bufo marinus* (Vargas *et al.*, 2004), de mRNA de *L. amazonensis* (Arroyo, 2005; Lagos *et al.*, 2007) y *L. braziliensis* (Garzón *et al.*, 2009) respectivamente, nuestro grupo registró corrientes en el 40-50 % de ovocitos inyectados, que se activaban a potenciales cercanos a -40 mV, disminuían significativamente en ausencia de Cl^- pero no de Ca^{2+} y eran sensibles a la inhibición por DIDS y ácido niflúmico, dos inhibidores reconocidos de transportadores de Cl^- (Lagos *et al.*, 2007; Garzón *et al.*, 2009). Basados en estos hallazgos postulamos que estas corrientes podrían ser el resultado de la función de proteínas CLC y por tanto se hizo una búsqueda en el genoma de *L. braziliensis* que reportó la presencia de cuatro canales de cloruro putativos: *LbrM01* V2.0210 (*LbCLC-A*), *LbrM04* V2.1010 (*LbCLC-D*), *LbrM32* V2.3670 (*LbCLC-B*) y *LbrM33* V2.1260 (*LbCLC-C*). De estos sólo *LbCLC-A* estaba registrado como un CLC putativo. Sin embargo, alineamientos de las secuencias de proteína de éstos muestran las regiones CLC canónicas, por lo que nuestro grupo postula las cuatro secuencias como intercambiadores anión/ H^+ CLC putativos.

LbCLC-A, *LbCLC-B* y *LbCLC-C* son transcritos por promastigotes (Fig. 4; Lozano *et al.*, 2009; Quintero, 2013; Camacho, 2012; Parada, 2014) y amastigotes axénicos de *L. braziliensis* (Quintero, 2013; Parada, 2014). Estos CLC putativos tienen homología con los CLC de mamífero expresados en la vía endocítica que se comportan como

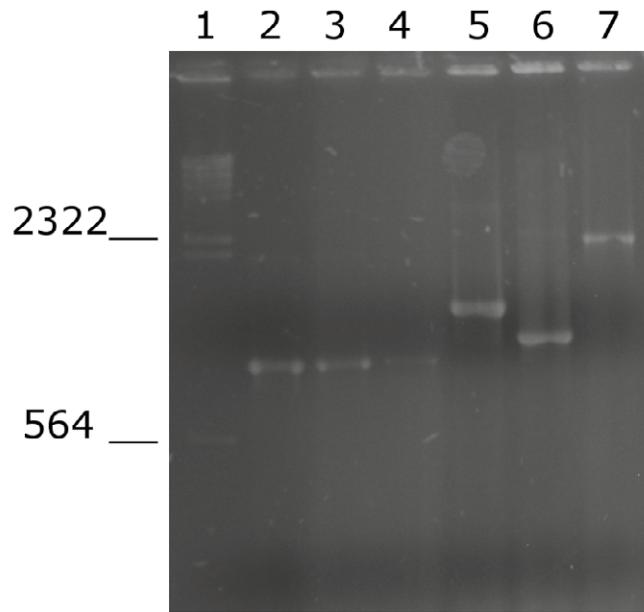


Figura 4. Expresión de CLC de promastigote de *Leishmania*. Productos de PCR separados por electroforesis en gel de agarosa 2 %, 70 mV. Como plantilla se partió de DNA plasmídico de bacterias *E. coli* DH5-a transformadas con la reacción de ligación de los productos de RT-PCR + pGEM-T-Easy. Se usó como marcador de peso molecular λ hind. Bandas 2, 3, 4 de aproximadamente 950 pb (peso esperado) de CLC-A de promastigotes de *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. major*. Banda en carril 5 de 1365 pb (peso esperado) de LbCLC-C. Banda en carril 6 de 1104 pb de LbCLC-B. Banda en carril 2307 pb, peso esperado para el producto completo de LbCLC-A. Gel teñido con 1 mg/mL de bromuro de etidio y observado en iluminación UV.

intercambiadores Cl^-/H^+ (Jentsch, 2007), y que contribuyen a la concentración de Cl^- en estos compartimientos (Novarino *et al.*, 2010). *LbCLC-D*, no se transcribe en promastigotes ni en amastigotes axénicos. Sin embargo, un fragmento pequeño de éste fue amplificado en parásitos luego de la infección por *Leishmania* (Carreño, 2015), indicando que otros estímulos diferentes a pH y temperatura inducen su expresión y postulamos que cambios en la osmolaridad podrían ser importantes.

Funciones putativas de CLC en *Leishmania*

Sólo un CLC ha sido descrito funcionalmente en protozoarios. EhCIC-A de *Entamoeba histolytica* fue expresado en ovocitos de *X. laevis* y registrado por *voltage clamp*. Estos estudios mostraron que la proteína putativa se agrupa con los CLC que son canales, y al expresarse en éste modelo heterólogo indujo corrientes voltaje-dependientes de Cl^- similares a las descritas en CIC-2 por lo que se concluyó que era un canal (Salas-Casas *et al.*, 2006). Recientemente estudios electrofisiológicos directos en trofozoitos de *Giardia lamblia* sugieren la presencia de una corriente similar (Moreno-Galindo *et al.* 2014) a la descrita por Salas-Casas *et al.* 2006, pero en una búsqueda por BLAST, no se encontraron secuencias CLC putativas en este organismo.

Para *Leishmania* que habita en ambientes que varían en pH y osmolaridad, los intercambiadores CLC podrían apoyar varias funciones. Por su homología con CLCs de la

vía endocítica de mamíferos se espera que estén localizados en estos compartimientos, donde permitirían concentración de Cl^- , que se ha reportado importante en la vía endocítica (Novarino *et al.*, 2010; Smith y Schwappach, 2010). Esto sería cierto para *LbCLC-B* y *LbCLC-C* que presentan en la posición recíproca a S107 de EcCIC1, este mismo residuo que ha sido postulado como el que confiere selectividad a Cl^- (Dultzer *et al.*, 2002; Dultzer *et al.*, 2003).

Gef1 el CLC de *Saccharomyces cerevisiae*, sería un intercambiador Cl^-/H^+ (Braun *et al.*, 2010) que se localiza en la membrana de vesículas del Golgi (Schwappach *et al.*, 1998), y se postuló que haría las veces de *shunt* para la función de una bomba de Cu^{2+} tipo P (Gaxiola *et al.*, 1998). Sin embargo, se sugiere que la entrada de Cl^- a través de este intercambiador sería necesaria como co-factor alostérico para Cu^{2+} (Davis-Kaplan *et al.*, 1998). Si en *Leishmania* se ubicaran en este compartimiento podrían apoyar la función del aparato de Golgi.

En la membrana plasmática del promastigote acoplados a la H^+ATPasa (Vieira *et al.*, 1995), funcionando como *shunt*, disiparían el gradiente de H^+ generado por la bomba para transporte secundario de nutrientes (Zilberstein y Shapira, 1994) y explicarían la hiperpolarización de su V_m . En la membrana plasmática del amastigote, los intercambiadores CLC serían capaces de expulsar H^+ y concentrar un anión, facilitando y/o complementando el trabajo de la bomba para suplir transporte secundario de

iones y nutrientes, al tiempo que contribuirían a mantener gradiente y pH para la supervivencia de *Leishmania* en la VP. Si por el contrario funcionaran usando el gradiente de H⁺ para sacar un anión, sería interesante postular que podrían ayudar a la detoxificación del parásito de metabolitos secundarios de óxido nítrico como NO₃⁻ (Liew *et al.*, 1999). *Lb*CLC-A y *Lb*CLC-D poseen G en la posición recíproca de S107 de EcCLC1, por lo que no seleccionarían Cl⁻. Ninguno de los CLC estudiados funcionalmente hasta el momento poseen glicina en esta posición, pero en CLC-5 la mutación S168G favorece selectividad a NO₃⁻ (Bergsdorf *et al.*, 2009; Zifarelli y Pusch, 2009). Nuestros primeros análisis indican que los CLC de *Leishmania* serían intercambiadores y marcas con anticuerpos comerciales sugieren expresión de proteínas CLC en la membrana del parásito (Lozano, 2012), lo que indicaría que este parásito podría expresar intercambiadores en forma más estable que lo sugerido para CLC-5 que ubicado en endosomas tempranos tendría paso temporal por membrana plasmática (Zhang *et al.*, 2014; Jentsch, 2015).

Algunos CLCs son sensibles a cambios de osmolaridad como el intercambiador Cl⁻/H⁺ CLC-3 (revisado por Jentsch, 2015) que además podría modular la expresión de AQP3 (una aquaporina) y consecuentemente regular volumen (Zhang *et al.*, 2014). Así mismo, los CLC eucariota presentan dominios CBS⁴ lo que implica que pueden ser regulados por ATP o sus metabolitos (Estévez *et al.*, 2004) y JAK3 (una kinasa) regula negativamente la actividad de CLC-2 alterando la tasa de inserción de este canal en la membrana (Warsi *et al.*, 2014).

A futuro marcaciones con anticuerpos específicos permitirían valorar ubicación, mientras que registros electrofisiológicos establecerían si en realidad son intercambiadores. Más aún silenciamiento de los CLC de *Leishmania*, usando una aproximación como la mostrada por Atayde *et al.* (2012), para el subgénero *Viannia* (como *L. braziliensis*) aportarían en la comprensión de la función de los CLC de este parásito.

AGRADECIMIENTOS

Al Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, en particular a Consuelo Burbano su directora por la iniciativa para la celebración del aniversario 50 de nuestro Departamento concretada en la Cátedra José Celestino Mutis: "Biología, construyendo país"; al laboratorio de Biofísica, Centro Internacional de Física. A Colciencias programas de Ciencias de la Salud, proyecto: 2228519289191, 222851928951, y de Ciencias Básicas proyectos: 222852129302 y 110165841813. A la DIB, Universidad Nacional de Colombia, proyectos: 11836 y 16028. A Michel García, MD, candidato a Ph.D, Michael Delay, Ph.D y los revisores anónimos por la lectura crítica y aportes a este manuscrito.

4 Cystathionine β synthase

REFERENCIAS

- Accardi A, Miller C. Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of CLC Cl⁻ channels. *Nature*. 2004;427(6977):795-797. Doi:10.1038/nature02314
- Accardi A, Kolmakova-Partensky L, Williams C, Miller C. Ionic currents mediated by a prokaryotic homologue of CLC Cl⁻ channels. *J Gen Physiol*. 2004;123(2):109-119. Doi:10.1085/jgp.200509417
- Almeida-Campos FR, Castro-Gomes T, Machado-Silva A, de Oliveira JS, Santoro MM, Frézard F, *et al.* Activation of *Leishmania* spp. *leishporin*: evidence that dissociation of an inhibitor not only improves its lipid-binding efficiency but also endows it with the ability to form pores. *Parasitol Res*. 2013;112(9):3305-3314. Doi:10.1007/s00436-013-3510-4.
- Antoine Jc, Prina E, Jouanne C, Bongrand P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. *Infect Immun*. 1990;58(3):779-787.
- Arroyo R. Expresión heteróloga de ARNm poli(A)⁺ de *Leishmania* (Trypanosomatidae) en ovocitos de anfibio (*Bufo*idae). (Trabajo de grado). Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2005. 45 p.
- Atayde VD, Ullu E, Kolev NG. A single-cloning-step procedure for the generation of RNAi plasmids producing long stem-loop RNA. *Mol Biochem Parasitol*. 2012;184(1):55-58. Doi:10.1016/j.molbiopara.2012.04.003
- Bañuls A-L, Mallorie H, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmanias: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol*. 2007;64:1-109. Doi:10.1016/S0065-308X(06)64001-3
- Benaim G, Szabo V, Cornivelli L. Isolation and characterization of calmodulin from *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*. *Acta Cient Venez*. 1987;38(2):289-291.
- Benaim G, Romero PJ. A calcium pump in plasma membrane vesicles from *Leishmania braziliensis*. *Biochim Biophys Acta*. 1990;1027(1):79-84. Doi:10.1016/0005-2736(90)90051-O
- Benaim G, Bermudez R, Urbina JA. Ca²⁺ transport in isolated mitochondrial vesicles from *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol*. 1990;39(1):61-8. Doi:10.1016/0166-6851(90)90008-A
- Benaim G. Intracellular calcium homeostasis. Calmodulin and Ca(2+)-ATPase of the plasma membrane of Trypanosomatids. *Acta Cient Venez*. 1993;44(2):57-66.
- Benaim G, García-Marchán Y, Reyes C, Uzcanga G, Figarella K. Identification of a sphingosine-sensitive Ca²⁺ channel in the plasma membrane of *Leishmania mexicana*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;430(3):1091-1096. Doi:10.1016/j.bbrc.2012.12.033.
- Bergsdorf EY, Zdebik AA, Jentsch TJ. Residues important for nitrate/proton coupling in plant and mammalian CLC transporters. *J Biol Chem*. 2009;284:11184-11193. Doi:10.1074/jbc.M901170200

- Blast. Available from: http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome
- Braun NA, Morgan B, Dick TP, Schwappach B. The yeast CLC protein counteracts vesicular acidification during iron starvation. *J Cell Sci.* 2010;123:2342-2350. Doi:10.1242/jcs.068403
- Camacho M. Electrical membrane properties in the model *Leishmania*-macrophage. Chapter 10. In: Patch Clamp Technique. Shad Kaneez Fatima, editor. Darussalam, Pakistan: PAP RSB Institute of Health Sciences, University Brunei; 2012. p. 203-230.
- Carreño M. Cuantificación de la expresión del canal de cloruro *Lbrm01_v2.0210* y de los canales CIC putativos *Lbrm32v2.3670*, *Lbrm33_v2.1260* y *Lbrm04_v2.1010* en promastigotes y amastigotes de *L.braziliensis*. (Tesis Maestría en Bioquímica). Bogotá: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2015. p. 43-49.
- Cortázar TM, Hernández J, Echeverry MC, Camacho M. Role of the parasitophorous vacuole of murine macrophages infected with *Leishmania amazonensis* in molecule acquisition. *Biomedica.* 2006;Suppl-1:26-37.
- Corte-Real S, Santos CB, Meirelles MN. Differential expression of the plasma membrane Mg²⁺ ATPase and Ca²⁺ ATPase activity during adhesion and interiorization of *Leishmania amazonensis* in fibroblasts in vitro. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1995;27(3):359-366.
- Chaves H, Villalba C, Lagos L, Vargas R, Martínez-Wittingham F, Clavijo C, et al. Expresión de canales de potasio voltaje dependientes en ovocitos de *Xenopus laevis* (amphibia) *Acta biol Colomb.* 2003;8(1):59-67.
- Chen TY, Miller C. Nonequilibrium gating and voltage dependence of the CIC-0 Cl⁻ channel. *J Gen Physiol.* 1996;108(4):237-250. Doi:10.1085/jgp.108.4.237
- Darling T N, Burrows CM, Blum JJ. Rapid shape change and release of ninhydrin-positive substances by *Leishmania* major promastigotes in response to hypo-osmotic stress. *J Protozool.* 1990;37:493-499. Doi:10.1111/j.1550-7408.1990.tb01254.x
- Davis-Kaplan SR, Askwith CC, Bengtzen AC, Radisky D, Kaplan J. Chloride is an allosteric effector of copper assembly for the yeast multicopper oxidase Fet3p: an unexpected role for intracellular chloride channels. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:13641-13645. Doi:10.1073/pnas.95.23.13641
- De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse JM, Thomine S, Gambale F, Barbier-Brygoo H. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature.* 2006;442(7105):939-942. Doi:10.1038/nature05013
- DiFranco M, Villarroel A, Ponte-Sucre A, Quinonez M, Drujan D, Dagger F. Incorporation of ion channels from the plasma membrane of *Leishmania mexicana* into planar bilayers. *Acta Cient Venez.* 1995;46(3):206-207.
- Docampo R, de Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN. Acidocalcisomes—conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(3):251-261. Doi:10.1038/nrmicro1097
- Dutzler R, Campbell EB, Cadene M, Chait BT, Mackinnon R. X-ray structure of a CIC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature.* 2002;415:287-294. Doi:10.1038/415287a
- Dutzler R, Campbell EB, MacKinnon R. Gating the selectivity filter in CIC chloride channels. *Science.* 2003;300(5616):108-112. Doi:10.1126/science.1082708
- Estévez R, Pusch M, Ferrer-Costa C, Orozco M, Jentsch TJ. Functional and structural conservation of CBS domains from CLC channels. *J Physiol.* 2004;557:363-378.
- Figarella K, Uzcategui NL, Zhou Y, LeFurgey A, Ouellette M, Bhattacharjee H, et al. Biochemical characterization of *Leishmania* major aquaglyceroporin LmAQP1: possible role in volume regulation and osmotaxis. *Mol Microbiol.* 2007;65(4):1006-1017. Doi:10.1111/j.1365-2958.2007.05845.x
- Garzón C, Stuhmer W, Camacho M. Corrientes aniónicas de *Leishmania* expresadas en ovocitos de *Xenopus laevis* luego de la inyección de mRNA. *Biomédica.* 2009;29(S)177-178.
- Gaxiola RA, Yuan DS, Klausner RD, Fink GR. The yeast CLC chloride channel functions in cation homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998;95:4046-4050.
- Glaser TA, Mukkada AJ. Proline transport in *Leishmania* donovani amastigotes: dependence on pH gradients and membrane potential. *Mol Biochem Parasitol.* 1992;51(1):1-8. Doi:10.1016/0166-6851(92)90194-O
- Gourbal B, Sonuc N, Bhattacharjee H, Legare D, Sundar S, Ouellette M, Rosen BP, Mukhopadhyay R. Drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. *J Biol Chem.* 2004;279(30):31010-31017. Doi:10.1074/jbc.M403959200
- Hille B. Ion channels of excitable membranes. Third edition. Sinauer Associates; 2001. p. 1-19.
- Hodgkin AL, Huxley AF. Resting and action potentials in single nerve fibres. *J Physiol.* 1945;104(2):176-195. Doi:10.1113/jphysiol.1945.sp004114
- Hodgkin AL, Huxley AF. Potassium leakage from an active nerve fibre. *J Physiol.* 1947;106(3):341-367. Doi:10.1113/jphysiol.1947.sp004216
- Hoffmann EK, Lambert IH, Pedersen SF. Physiology of cell volume regulation in vertebrates. *Physiol Rev.* 2009;89(1):193-277. Doi:10.1152/physrev.00037.2007.
- Horta MF. Pore-forming proteins in pathogenic protozoan parasites. *Trends Microbiol.* 1997;5(9):363-366. Doi:10.1016/S0966-842X(97)01109-8
- Inbar E, Schlisselberg D, Suter Grottemeyer M, Rentsch D, Zilberstein D. A versatile proline/alanine transporter in the unicellular pathogen *Leishmania donovani* regulates

- amino acid homoeostasis and osmotic stress responses. *Biochem J.* 2013;449(2):555-566. Doi:10.1042/BJ20121262.
- Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, Zdebik AA. Molecular structure and physiological function of chloride channels. *Physiol Rev.* 2002;82(2):503-568. Doi:10.1152/physrev.00029.2001
- Jentsch TJ. Chloride and the endosomal-lysosomal pathway: emerging roles of CLC chloride transporters. *J Physiol.* 2007;578(Pt 3):633-640. Doi:10.1113/jphysiol.2006.124719
- Jentsch TJ. Discovery of CLC transport proteins: cloning, structure, function and pathophysiology. *J Physiol.* 2015;593(8):4091-4109. Doi:10.1113/jphysiol.2014.270043
- Lagos M LF, Moran O, Camacho M. *Leishmania amazonensis*: Anionic currents expressed in oocytes upon microinjection of mRNA from the parasite. *Exp Parasitol.* 2007;116(2):163-170. Doi:10.1016/j.exppara.2006.12.010
- Läuger P. *Electrogenic ion pumps*. Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associates, Inc.; 1991. p. 1-60.
- LeFurgey A, Ingram P, Blum JJ. Compartmental responses to acute osmotic stress in *Leishmania* major result in rapid loss of Na⁺ and Cl⁻. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 2001;128(2):385-394. Doi:10.1016/S1095-6433(00)00319-6
- LeFurgey A, Gannon M, Blum J, Ingram P. *Leishmania donovani* amastigotes mobilize organic and inorganic osmolytes during regulatory volume decrease. *J Eukaryot Microbiol.* 2005;52(3):277-289. Doi:10.1111/j.1550-7408.2005.00030.x
- Leslie G, Barrett M, Burchmore R. *Leishmania mexicana*: promastigotes migrate through osmotic gradients. *Exp Parasitol.* 2002;102(2):117-120. Doi: 10.1016/S0014-4894(03)00031-6
- Liew FY, Xu D, Chan WL. Immune effector mechanism in parasitic infections. *Immunol Lett.* 1999;65(1-2):101-104. Doi: 10.1016/S0165-2478(98)00131-X
- Lozano Y, Gomez C, Posada ML, Camacho M. Canales de cloruro CLC de *Leishmania*. Biomédica. 2009;29(S):184.
- Lozano Y. Estudio de un canal de cloruro de *Leishmania* y su importancia en la fisiología del parásito (Tesis Doctorado en Farmacia). Bogotá: Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2012. p. 50-53.
- Lloyd JB. Lysosome membrane permeability: implications for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2000;41(2):189-200.
- Lu HG, Zhong L, Chang KP, Docampo R. Intracellular Ca²⁺ pool content and signaling and expression of a calcium pump are linked to virulence in *Leishmania mexicana amazonensis* amastigotes. *J Biol Chem.* 1997;272(14):9464-9473. Doi:10.1074/jbc.272.14.9464
- Mandal D, Mukherjee T, Sarkar S, Majumdar S, Bhaduri A. The plasma-membrane Ca²⁺-ATPase of *Leishmania donovani* is an extrusion pump for Ca²⁺. *Biochem J.* 1997;322(Pt 1):251-257.
- Marchesini N, Docampo R. A plasma membrane P-type H⁽⁺⁾-ATPase regulates intracellular pH in *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol.* 2002;119(2):225-236. Doi:10.1016/S0166-6851(01)00419-4
- Maharjan M, Singh S, Chatterjee M, Madhubala R. Role of aquaglyceroporin (AQP1) gene and drug uptake in antimony-resistant clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79(1):69-75.
- McConville MJ, de Souza D, Saunders E, Likic VA, Naderer T. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania amastigotes*. *Trends Parasitol.* 2007;23(8):368-375.
- Miller C. Open-state substructure of single chloride channels from Torpedo electroplax. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1982;299(1097):401-411. Doi:10.1098/rstb.1982.0140
- Miller C. CLC chloride channels viewed through a transporter lens. *Nature.* 2006;440(7083):484-489. Doi:10.1038/nature04713
- Miller C. In the beginning: A personal reminiscence on the origin and legacy of CLC-0, the “Torpedo Cl- channel”. *J Physiol.* 2015;593(18):4085-4090. Doi:10.1113/jphysiol.2014.286260
- Miller C, White MM. A voltage-dependent chloride conductance channel from Torpedo electroplax membrane. *Ann N Y Acad Sci.* 1980;341:534-551. Doi:10.1111/j.1749-6632.1980.tb47197.x
- Miller C, Nguiragool W. A provisional transport mechanism for a chloride channel-type Cl⁻/H⁺ exchanger. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2009;364(1514):175-180. Doi:10.1098/rstb.2008.0138.
- Moreno SN, Docampo R. Calcium regulation in protozoan parasites. *Curr Opin Microbiol.* 2003;6(4):359-364. Doi:10.1016/S1369-5274(03)00091-2
- Moreno SN, Docampo R. The role of acidocalcisome in parasitic protists. *J Eukaryot Microbiol.* 2009;56(3):208-213. Doi:10.1111/j.1550-7408.2009.00404.x
- Moreno-Galindo EG1, Rodríguez-Elías JC, Ramírez-Herrera MA, Sánchez-Chapula JA, Navarro-Polanco RA. The principal conductance in *Giardia lamblia* trophozoites possesses functional properties similar to the mammalian CLC-2 current. *Pflugers Arch.* 2014;466(5):915-924. Doi:10.1007/s00424-013-1350-9.
- Navarrete I. *Modelo hidrodinámico de la separación de especies celulares en canales finos Step-Splitt* (Tesis Maestría en Biofísica). Bogotá: Departamento de Física, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2013. p. 42-52.
- Novarino G, Weinert S, Rickheit G, Jentsch TJ. Endosomal chloride-proton exchange rather than

- chloride conductance is crucial for renal endocytosis. *Science.* 2010;328(5984):1398-1401. Doi:10.1126/science.1188070
- Noronha FS, Ramalho-Pinto FJ, Horta MF. Identification of a putative pore-forming hemolysin active at acid pH in *Leishmania amazonensis*. *Braz J Med Biol Res* 1994;27(2):477-482.
- Noronha FS, Ramalho-Pinto FJ, Horta MF. Cytolytic activity in the genus *Leishmania*: involvement of a putative pore-forming protein. *Infect Immun.* 1996;64(10):3975-3982.
- Ogbunude PO, Dzimiri MM. Expression of a channel-like pathway for adenosine transport in *Leishmania donovani* promastigotes. *Int J Parasitol.* 1993;23(6):803-807. Doi:10.1016/0020-7519(93)90078-D
- Ouellette M, Legare D, Papadopoulou B. Multidrug resistance and ABC transporters in parasitic protozoa. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2001;3(2):201-206.
- Palade GE. Intracellular Aspects of the Process of Protein Secretion Nobel Lecture; 1974 Available from: http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1974/palade-lecture.html
- Quintana MP, León S, Forero ME, Camacho M. Mecanismos de salida de su célula hospedera de parásitos intracelulares. *Acta biol Colomb.* 2010;15(3):19-32.
- Quintero N. Estudio funcional de un canal de cloruro de *Leishmania* (LbrM32_V2.3670), caracterización electrofisiológica y molecular. (Tesis Maestría en Biología). Bogotá: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2013. p. 28-31.
- Parada O. Estudio funcional de un canal de cloruro de *Leishmania* (LbrM33 V2.1260). (Tesis Maestría en Bioquímica). Bogotá: Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia; 2014. p. 47-52.
- Philosoph H, Zilberstein D. Regulation of intracellular calcium in promastigotes of the human protozoan parasite *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 1989;264(18):10420-10424.
- Picollo A, Pusch M. Chloride/proton antiporter activity of mammalian CLC proteins CIC-4 and CIC-5. *Nature.* 2005;436(7049):420-423. Doi:10.1038/nature03720
- Prole DL, Taylor CW. Identification of intracellular and plasma membrane calcium channel homologues in pathogenic parasites. *PLoS One.* 2011;6(10):e26218. Doi:10.1371/journal.pone.0026218
- Prole DL, Marrion NV. Identification of putative potassium channel homologues in pathogenic protozoa. *PLoS One.* 2012;7(2):e32264. Doi: 10.1371/journal.pone.0032264
- Prole DL, Taylor CW. Identification and analysis of putative homologues of mechanosensitive channels in pathogenic protozoa. *PLoS One.* 2013;8(6):e66068. Doi:10.1371/journal.pone.0066068
- Pusch M, Ludewig U, Rehfeldt A, Jentsch TJ. Gating of the voltage-dependent chloride channel CIC-0 by the permeant anion. *Nature.* 1995;373(6514):527-531. Doi:10.1038/373527a0
- Pusch M, Zifarelli G, Murgia AR, Picollo A, Babini E. Channel or transporter? The CLC saga continues. *Exp Physiol.* 2006;91(1):149-152. Doi:10.1113/expphysiol.2005.031799
- Rodrigues CO, Scott DA, Docampo R. Presence of a vacuolar H+-pyrophosphatase in promastigotes of *Leishmania donovani* and its localization to a different compartment from the vacuolar H+-ATPase. *Biochem J.* 1999;340(Pt 3):759-766.
- Salas-Casas A, Ponce-Balderas A, Garcia-Perez RM, Cortes-Reynosa P, Gamba G, Orozco E, et al. Identification and functional characterization of EhCLC-A, an Entamoeba histolytica CIC chloride channel located at plasma membrane. *Mol Microbiol.* 2006;59:1249-1261. Doi:10.1111/j.1365-2958.2006.05023.x
- Santos VC, Araujo RN, Machado LA, Pereira MH, Gontijo NF. The physiology of the midgut of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz and Neiva 1912): pH in different physiological conditions and mechanisms involved in its control. *J Exp Biol.* 2008;211(Pt 17):2792-2798. Doi: 10.1242/jeb.019836.
- Schwappach B, Stobrawa S, Hechenberger M, Steinmeyer K, Jentsch TJ. Golgi localization and functionally important domains in the NH₂ and COOH terminus of the yeast CLC putative chloride channel Gef1p. *J Biol Chem.* 1998;273:15110-15118. Doi:10.1074/jbc.273.24.15110
- Singer SJ, Nicolson GL. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science.* 1972;175(4023):720-731. Doi:10.1126/science.175.4023.720
- Smith AJ, Schwappach B. Cell biology. Think vesicular chloride. *Science.* 2010;328(5984):1364-1365. Doi:10.1126/science.1191529
- Stockbridge RB, Lim HH, Otten R, Williams C, Shane T, Weinberg Z, Miller C. Fluoride resistance and transport by riboswitch-controlled CLC antiporters. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012;109(38):15289-15294. Doi:10.1073/pnas.1210896109
- Sudhandiran G, Shah A. Antimonial-induced increase in intracellular Ca²⁺ through non-selective cation channels in the host and the parasite is responsible for apoptosis of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *J Biol Chem.* 2003;278(27):25120-25132. Doi:10.1074/jbc.M301975200
- Tetaud E, Bringaud F, Chabas S, Barrett MP, Baltz T. Characterization of glucose transport and cloning of a hexose transporter gene in *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(17):8278-8282. Doi:10.1111/j.1749-6632.1980.tb47197.x
- ter Kulle BH. Glucose and proline transport in kinetoplastids. *Parasitol Today.* 1993;9(6):206-210. Doi:10.1016/0169-4758(93)90009-5

- Vargas R A, Botero L, Lagos L, Camacho M. *Bufo marinus* oocytes as a model for ion channel protein expression and functional characterization with electrophysiological studies. *Cell Physiol Biochem.* 2004;14(4-6):197-202. Doi:10.1159/000080327
- Vercesi AE, Rodrigues CO, Catisti R, Docampo R. Presence of a Na^+/H^+ exchanger in acidocalcisomes of *Leishmania donovani* and their alkalinization by anti-leishmanial drugs. *FEBS Lett.* 2000;473(2):203-206. Doi: 10.1016/S0014-5793(00)01531-3
- Vieira LL, Cabantchik ZI. Amino acid uptake and intracellular accumulation in *Leishmania major* promastigotes are largely determined by an H^+ -pump generated membrane potential. *Mol Biochem Parasitol* 1995;75(1):15-23. Doi: 10.1016/0166-6851(95)02505-7
- Vieira L, Lavan A, Dagger F, Cabantchik ZI. The role of anions in pH regulation of *Leishmania major* promastigotes. *J Biol Chem.* 1994;269(23):16254-16259.
- Vieira L, Cabantchik ZI. Bicarbonate ions and pH regulation of *Leishmania major* promastigotes. *FEBS Lett.* 1995;361(1):123-126. Doi: 10.1016/0014-5793(95)00171-5
- Vieira L, Slotki I, Cabantchik ZI. Chloride conductive pathways which support electrogenic H^+ pumping by *Leishmania major* promastigotes. *J Biol Chem.* 1995;270:5299-5304. Doi:10.1074/jbc.270.10.5299
- Vieira LL, Lafuente E, Gamarro F, Cabantchik Z. An amino acid channel activated by hypotonically induced swelling of *Leishmania major* promastigotes. *Biochem J.* 1996;319:691-697.
- Vieira LL, Lafuente E, Blum J, Cabantchik ZI. Modulation of the swelling-activated amino acid channel of *Leishmania major* promastigotes by protein kinases. *Mol Biochem Parasitol.* 1997;90(2):449-61. Doi: 10.1016/S0166-6851(97)00180-1
- Warsi J, Elvira B, Hosseinzadeh Z, Shumilina E, Lang F. Downregulation of chloride channel CLC-2 by Janus kinase 3. *J Membr Biol.* 2014;247(5):387-93. Doi:10.1007/s00232-014-9645-0
- Zhang H, Li H, Liu E, Guang Y, Yang L, Mao J, et al. The AQP-3 water channel and the CIC-3 chloride channel coordinate the hypotonicity-induced swelling volume in nasopharyngeal carcinoma cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2014;57:96-107. Doi:10.1016/j.biocel.2014.10.014
- Zifarelli G, Pusch M. Conversion of the $2\text{Cl}^-/1\text{H}^+$ antiporter CLC-5 in a NO_3^-/H^+ antiporter by a single point mutation. *EMBO J.* 2009;28:175-182. Doi:10.1038/emboj.2008.284.
- Zilberman D, Shapira M. The role of pH and temperature in the development of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol.* 1994;48:449-470. Doi: 10.1146/annurev.mi.48.100194.002313

