

Celebración de los 20 años del Laboratorio de Fisiología Molecular

Alicia Ponte-Sucre¹, Maritza Padrón-Nieves², Emilia Díaz López¹

Escuela Luis Razetti, Cátedras de ¹Fisiología y ²Farmacología y Toxicología,

Instituto de Medicina Experimental, Universidad Central de Venezuela

La carrera académica de Alicia Ponte-Sucre (APS) comenzó en 1981, cuando ingresó como Profesor Instructor en el Departamento de Ciencias Fisiológicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Central de Venezuela (UCV). Sin embargo, el Laboratorio de Fisiología Molecular (LFM) se fundó en 1994, a los pocos meses del retorno a la Cátedra de Fisiología de APS, al culminar sus estudios de cuarto nivel y obtener el grado de Doctor en Ciencias (Farmacología, 1993, UCV).

En 1988, al comenzar su doctorado, APS orientó su interés de investigación hacia un tema estrechamente relacionado con salud y desarrollo sustentable, retos cardinales en las zonas del mundo que incluyen su país de origen, Venezuela. Así, su laboratorio se ha encaminado hacia el estudio de las enfermedades desatendidas tropicales (NTDs por sus siglas en inglés), leishmaniasis y tripanosomiasis, producidas por los parásitos unicelulares *Leishmania* y *Trypanosoma*.

La comprensión de estas enfermedades necesita de la investigación experimental, a fin de establecer un diagnóstico y ofrecer una quimioterapia óptimos, un control y/o eliminación de los vectores adecuados, y, sobre todo, optimizar las directrices a ser aplicadas en contextos epidemiológicos, socioculturales y de salud, comunes en las zonas del mundo donde estas enfermedades son endémicas.

Por ello, el *leitmotiv* del LFM ha sido entender los procesos fundamentales que intervienen en las funciones esenciales relacionadas con la homeostasis y la preservación de la vida con un enfoque hacia el estudio de los mecanismos responsables de la susceptibilidad a fármacos, o resistencia a ellos, en los parásitos metabólicamente flexibles anteriormente mencionados. La aproximación integral que el LFM ha realizado en este campo de la investigación en salud se asienta en la amplia formación que tanto su fundadora, como quienes la acompañan como profesoras, tienen en áreas del conocimiento que incluyen bioquímica, biofísica, biología celular, fisiología y farmacología.

Este documento resume la producción científica, actividades de enseñanza, y servicios prestados por el Laboratorio de Fisiología Molecular al cumplir sus 20 años de existencia.

La actividad científica del laboratorio se ha centrado hacia las siguientes áreas de interés:

- Interacción parásito-hospedero en *Leishmania*
- Adaptabilidad de *Leishmania* y su implicación en la resistencia a los medicamentos
- Desarrollo de fármacos contra *Leishmania* y *Trypanosoma*
- Edición de libros científicos en el ámbito de la resistencia a los medicamentos

Con el fin de examinar la **interacción parásito-hospedero en *Leishmania***, los integrantes del LFM, fundamentaron parcialmente sus investigaciones en datos previos ^{1,2} en los cuales se había demostrado que la enzima piruvato quinasa (PYK) de *Leishmania amazonensis* presenta dos isoformas con diferentes propiedades cinéticas y de comportamiento hacia el activador, la fructosa, 2,6-bifosfato (F2,6DP), el cual desencadena la conversión de la enzima de monómero a tetramero e inhibe la actividad de la forma tetramérica de PYK y activa la de la forma monomérica de la enzima.

APS y sus colegas habían demostrado además la factibilidad del estudio de las propiedades fisiológicas de membranas plasmáticas, purificadas a partir de extractos de *Leishmania mexicana*, incorporadas en membranas lipídicas artificiales y la susceptibilidad de los parásitos de *Leishmania* a inhibidores de canales iónicos, a concentraciones que no afectan la viabilidad de las células hospederas, los macrófagos ³⁻⁶.

Todos estos estudios constituyeron el basamento de una investigación fundamental que formó parte de la tesis doctoral de la Prof. Maritza Padrón Nieves ⁷, en la cual se demostró el valor terapéutico potencial que el uso combinado de un fármaco leishmanicida clásico con un bloqueador de transportadores ABC puede tener para la terapia contra la leishmaniasis.

Por otra parte, y con el fin de examinar los mecanismos implicados en la diferenciación celular y en la interacción celular parásito-hospedador en *Leishmania*, los integrantes del LFM, se apoyaron en investigaciones previas en las cuales se había demostrado que la interacción del parásito con las células hospederas es un proceso dinámico, y que la exposición de las células hospederas a moléculas de superficie de *Leishmania*, como el lipofosfoglicano no afecta sus propiedades de presentación de antígenos, inhibe a corto plazo su actividad fagocítica e inhibe sus propiedades migratorias y refuerzan el concepto de la naturaleza dinámica de la respuesta inmune Th1-Th2 ⁸⁻¹¹.

En este sentido es fundamental resaltar los estudios pioneros llevados a cabo por la Prof. Emilia Díaz López que incluyen la adaptación de una metodología «el ensayo de quimiotaxis por el método de los capilares-dos cámaras», como una técnica sencilla y útil para la evaluación cuantitativa de la taxis en *Leishmania* ¹² y su utilización para caracterizar los efectos quimiotácticos de drogas basadas en polipéptidos modificados, así como de aminoácidos fundamentales en el metabolismo del parásito ^{13, 14}.

En resumen, los trabajos del LFM, han contribuido a renovar la forma de estudiar la parasitología experimental relativa a la interacción parásito-hospedero en *Leishmania*. Este grupo de trabajo pertenece a una generación de científicos que ha desarrollado herramientas, y utiliza la innovación para actualizar la forma de hacer ciencia en este campo del saber. Así, y a fin de comprender mejor la enfermedad, han comenzado a hacerle preguntas directamente al parásito y a desentrañar su biología.

De hecho, sus estudios sobre los mecanismos implicados en la diferenciación celular y la interacción parásito-hospedador son de los primeros en incluir el análisis del rol de los parásitos en el reconocimiento, la taxis, la internalización, y el proceso de infección, con el objetivo de describir los mecanismos implicados en el proceso, e identificar moléculas -del parásito-, que podrían afectar la interacción parásito-hospedador y ser utilizadas como herramientas para inhibir la internalización del parásito por la célula hospedera, y de esta forma, la infección.

Con el fin de examinar **la adaptabilidad y flexibilidad de *Leishmania*** y sus implicaciones para la resistencia a los medicamentos, el LFM y sus colaboradores han caracterizado las consecuencias fisiológicas de la resistencia a los medicamentos en estos parásitos.

Los parásitos de *Leishmania* son exitosos, flexibles, y capaces de implementar múltiples mecanismos de evasión frente al hospedero. Entre estos, la resistencia a los medicamentos constituye un desafío cotidiano; la misma puede ser inducida por un uso indebido de los medicamentos, y lamentablemente se está extendiendo a nivel mundial. Los mecanismos moleculares implicados en la adaptación fisiológica del parásito a este fenotipo son esenciales para su supervivencia.

Con los estudios realizados, el LFM y sus colaboradores han consolidado el concepto de que el desarrollo de resistencia a drogas en *Leishmania* incluye, además del aumento de la expresión de fragmentos de ADN genómico, reconocidos por sondas pertenecientes a proteínas de la familia de la glicoproteína-P la alteración de funciones que incluyen entre otros, la infectividad del parásito (fosfatasa ácida y proteína meta-1), el metabolismo intracelular y la fosforilación oxidativa (aminoácidos y carbohidratos fundamentales para la supervivencia del parásito), la interacción hospedero-parásito (aglutinación por lectinas, potencial de membrana), y la morfología del parásito ¹⁵⁻²¹.

Actualmente, la investigación del LFM tiene como objetivo la validación de la utilidad de estos marcadores celulares en parásitos aislados de pacientes con fracaso quimioterapéutico contra las drogas clásicas ²²⁻²⁶.

En resumen, las contribuciones del LFM han sido fundamentales para incorporar en el campo de la parasitología el concepto de que la fármaco-resistencia es un proceso dinámico que abarca cambios esenciales en la fisiología del parásito. Estos estudios pioneros han ampliado los horizontes en este ámbito y han estimulado a otros científicos a estudiar si tales cambios constituyen modificaciones epigenéticas que ocurren en paralelo con los cambios genéticos asociados con la expresión de la resistencia a fármacos ²⁷⁻²⁹.

Además, su trabajo se suma al entusiasmo de científicos a nivel mundial para entender si estos eventos fisiológicos se modifican de manera coordinada, y si su análisis y comprensión sistemáticos pueden ser útiles en el diseño de enfoques quimioterapéuticos a múltiples dianas celulares, identificando así estrategias para eludir la resistencia a drogas en *Leishmania* y tratar con éxito la enfermedad ³⁰.

Por último, sus estudios han incorporado en el léxico de *Leishmania* ^{32, 33} el concepto de “fitness”, utilizado fundamentalmente en virus ³¹. La importancia de este concepto se relaciona con los cambios moleculares que ocurren en parásitos quimio-resistentes y cómo la comprensión, identificación y análisis de los elementos que los conforman pueden ser útiles para orientar la terapia de pacientes. Esto constituye un conocimiento crucial dado que el único método fiable para evaluar la resistencia de los aislados de parásitos obtenidos de pacientes es el modelo *in vitro* “amastigote-macrófago” y que no se han descrito marcadores celulares y moleculares de esta condición, fáciles de utilizar en el laboratorio clínico ³⁴. Las investigaciones llevadas a cabo por el LFM desde 2000 hacen hincapié en este último punto y destacan la necesidad de describir marcadores celulares y moleculares que se puedan utilizar de forma sistemática para identificar el fenotipo resistente a los medicamentos, de los parásitos infectantes.

La comprensión de la adaptación asociada a este estado fisiológico puede ser esencial para el desarrollo de herramientas útiles para el control de la enfermedad, especialmente en las zonas geográficas donde la resistencia a las drogas es un problema clínico común.

Con el fin de buscar nuevas **herramientas terapéuticas contra *Leishmania* y *Trypanosoma***, el LFM, y sus colaboradores en el exterior, han caracterizado la actividad de productos naturales y compuestos diseñados para dianas específicas en contra de estos parásitos³⁵⁻⁴⁵.

El interés del LFM en esta área de investigación se consolidó durante la estadía de APS en Würzburg (2003-2007) como personal científico y coordinador del laboratorio central para la identificación y caracterización de productos naturales y compuestos diseñados contra dianas específicas (bacterias, hongos y parásitos), como agentes anti-infecciosos. Este trabajo fue llevado a cabo en el marco del proyecto multidisciplinario y multicéntrico (SFB630, financiado por el gobierno alemán): Reconocimiento, Preparación y análisis funcional de los agentes contra enfermedades infecciosas.

En estos estudios el LFM y sus colegas demostraron la actividad de compuestos pertenecientes a diferentes clases químicas, y analizaron parte de sus mecanismos de acción contra *Leishmania* y *Trypanosoma*⁴⁶⁻⁴⁹.

Una de las contribuciones más relevantes del LFM ha sido la posición de liderazgo que ha jugado, no sólo en centrarse en la actividad *in vitro* de los compuestos desarrollados, sino en la necesidad de evaluar el mecanismo de acción, la farmacodinamia, la farmacocinética y, por último, pero no menos importante, la necesidad de evaluar los compuestos en ensayos *in vivo*, sin olvidar nunca que el objetivo final del proyecto es lograr que al menos un compuesto llegue a ensayos a nivel clínico.

Paralelamente el LFM ha sido asesor para proyectos relacionados con la descripción de la actividad antiviral, antitumoral e inmunomoduladora de extractos de plantas de la familia Euphorbiaceae⁵⁰, y para la determinación de los compuestos activos responsables de su actividad biológica. Este trabajo ha sido realizado en colaboración con la Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. Adicionalmente el LFM pertenece a una red iberoamericana dedicada a la identificación de marcadores de enfermedad, infección y susceptibilidad o resistencia a la leishmaniasis visceral en perros, patrocinado por el Programa Iberoamericano de Ciencia, Tecnología y Desarrollo (CYTED).

En otro ámbito de acción, las profesoras miembros del LFM están convencidas de que, además de hacer investigación es fundamental preparar y escribir libros científicos integrales. Por este motivo han editado tres libros y han contribuido con capítulos correspondientes a la leishmaniasis, transportadores ABC y resistencia a los medicamentos en dos de ellos.

Alicia Ponte-Sucre (Ed.). ABC transporters in microorganisms: Research, Innovation and Value as Targets against Drug Resistance, Horizon Scientific Press, Caister Academic Press, Norwich, UK (2009).

Incluyendo el capítulo:

Ponte-Sucre A, Padrón-Nieves M, Díaz E. ABC transporter blockers and reversal of drug resistance in microorganisms, pp, 177-195.

Alicia Ponte-Sucre, Emilia Díaz, Maritza Padrón-Nieves (Eds.). Drug resistance in *Leishmania* parasites: Consequences, Molecular Mechanisms and Possible Treatments, SpringerVerlagWien, AU (2013).

Incluyendo tres capítulos:

Ponte-Sucre A. Leishmaniasis, the biology of a parasite.

Zerpa O, Ponte-Sucre A. American tegumentary leishmaniasis.

Ponte-Sucre A, Díaz E, Padrón-Nieves M. The concept of fitness in *Leishmania*.

Luis Germán Rodríguez LG, Alicia Ponte-Sucre (Eds.). Las TIC en el combate de las enfermedades desatendidas: una visión latinoamericana, 2014. Fundación Telefónica, Venezuela, ISBN 978-980-271-460-5, http://www.fundaciontelefonica.com/arte_cultura/publicaciones-listado/pagina-item-publicaciones/?itempubli=313

Finalmente, el LFM ha desarrollado una labor tesonera en la formación de recursos humanos, al brindar espacio para la investigación a estudiantes de pre y postgrado de las Escuelas de Bioanálisis, Medicina y de la Facultad de Farmacia. Los estudiantes que han pasado por el LFM se han entrenado en todas las técnicas y áreas citadas y han culminado sus estudios con honores en la mayoría de los casos. Es de resaltar que, en los últimos años, el LFM ha participado activamente en la integración de los estudiantes al concepto de investigación integrada a la carrera de medicina, a través del Programa de Estímulo a la Investigación para los Estudiantes de Pregrado de la Facultad de medicina (PEEI),

Más aún, el LFM ha prestado ayuda a otras secciones adscritas al Instituto de Medicina Experimental y a los profesores, asistentes de investigación, estudiantes de pregrado y postgrado quienes la hayan solicitado. Dicho apoyo ha cubierto diversas áreas desde el préstamo de equipos o insumos hasta asesorías académicas. Adicionalmente el LFM ha apoyado a 21 estudiantes y profesores venezolanos para ir al exterior a completar sus estudios de tercero o cuarto nivel. Aproximadamente el 50 % de ellos ocupan cargos académicos en el país.

No podemos dejar de mencionar que paralelamente a sus actividades de investigación las profesoras Maritza Padrón Nieves, Emilia Díaz López y Alicia Ponte Sucre han recorrido todos los pasos académicos correspondientes. Actualmente son Profesoras Asociadas y Titular, respectivamente, del Departamento de Ciencias Fisiológicas de la Escuela de Medicina Luis Razetti de la UCV. Han sido profesoras en diversos cursos de postgrado en la Escuela de Biología, y en las Facultades de Farmacia y Medicina de la UCV y cumplen con labores de gran responsabilidad, propias del cargo de profesor en las áreas administrativas, de extensión y docencia. Además, han trabajado en numerosas áreas de servicio de la UCV, así como en organizaciones científicas dentro y fuera del país y han sido coordinadoras y jurados de diversos premios académicos y miembros de comité organizador de diversas reuniones y simposio, así como evaluadoras de numerosas revistas internacionales y nacionales y organizaciones internacionales financiadoras de proyectos.

En resumen, durante los últimos 20 años el Laboratorio de Fisiología Molecular ha contribuido a la comprensión de los mecanismos fisiológicos responsables de la resistencia a los medicamentos y la susceptibilidad a los mismos en los parásitos metabólicamente flexibles *Leishmania* y *Trypanosoma*, mediante la integración del uso de herramientas de bioquímica, biofísica, biología celular y farmacología. Sus estudios y trabajos han sido pioneros en conceptos

fundamentales útiles para fomentar el diseño de terapias alternativas contra estos parásitos tropicales y ha contribuido a la educación de muchas generaciones de médicos y estudiantes de postgrado en Venezuela. Su trabajo ha sido citado al menos 800 veces en la literatura científica internacional.

Agradecimientos

Diversas instituciones nacionales e internacionales han sido fundamentales para el aporte de los recursos para los logros que aquí se mencionan: El Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la UCV, la Coordinación de Investigación de la Facultad de Medicina de la UCV, el Programa Iberoamericano de Ciencia, Tecnología y Desarrollo, la Fundación Alejandro de Humboldt-Alemania, la Oficina Internacional de Intercambio Académico (DAAD)-Alemania, el Consejo Alemán de Investigación (DFG), la Universidad de Würzburg-Alemania, Instituto de Misiones para Enfermedades Tropicales, Würzburg-Alemania, Universidad Semmelweis, Budapest, Hungría, Universidad de Helsinki, Finlandia,

Referencias

- ¹ Ponte-Sucre AI, Alonso G, Martínez C, Hung A, Rivas L, Ramírez JL. Isolation of two pyruvate kinase activities in the parasitic protozoan *Leishmania mexicana amazonensis*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 300: 466-471, 1993.
- ² Ponte-Sucre AI, Ramírez JL. Fructose 2,6 bisphosphate promotes the monomer-tetramer conversion of *Leishmania mexicana amazonensis* pyruvate kinase type two. Biological Research, 26: 131-134, 1993.
- ³ DiFranco M, Villarroel A, Ponte-Sucre A, Quiñonez M, Drujan D, Dagger F. Incorporation of ion channels from the plasma membrane of *L. mexicana* into planar bilayers. Acta Científica Venezolana, 45: 206-207, 1995.
- ⁴ Ponte-Sucre A, Campos Y, Vásquez J, Moll H, Mendoza-León A. Sensitivity of *Leishmania spp.* to glibenclamide and 4-aminopyridine: a tool for the study of drug resistance development. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 92: 601-606, 1997.
- ⁵ Ponte-Sucre A, Campos Y, Fernández M, Moll H, Mendoza-León A. *Leishmania sp.*: Growth and survival of *Leishmania sp.* are impaired by ion channel blockers. Experimental Parasitology, 88: 11-19, 1998.
- ⁶ Ponte-Sucre A, Mendoza-León A, Moll H. Experimental leishmaniasis: synergistic effect of ion channel blockers and interferon- γ on the clearance of *Leishmania major* parasites. Parasitology Research, 87: 27-31, 2001.
- ⁷ Padrón-Nieves M, Díaz E, Machuca C, Romero A, Ponte-Sucre A. Glibenclamide modulates glucantime activity and disposition in *Leishmania major*. Experimental Parasitology, 121: 331-337, 2009.
- ⁸ Ponte-Sucre A, Heise D, Moll H. *Leishmania major* lipophosphoglycan modulates the phenotype and inhibits migration of murine Langerhans cells. Immunology, 104: 462-467, 2001.
- ⁹ Ponte-Sucre A, Figarella K, Moll H. Experimental Leishmaniasis: The glibenclamide-triggered decrease in parasite growth correlates with changes in macrophage features. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 23: 477-486, 2001.

- ¹⁰ Ponte-Sucre A, Scharner A, Moll H. El lipofosfoglicano de *Leishmania major* modula la expresión de receptores involucrados en la internalización del parásito en células de Langerhans de la piel. *Acta Científica Venezolana*, 53: 218-224, 2002.
- ¹¹ Ponte-Sucre, A. Modulación de la expresión del asa de regulación hierro libre-óxido nítrico sintetasa de células dendríticas por quelantes de hierro. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 25: 11-17, 2006.
- ¹² Díaz E, Köhidai L, Ríos A, Vanegas O, Ponte-Sucre A. Ensayos de quimiotaxis in vitro en *Leishmania sp.* Evaluación de la técnica de los capilares-dos cámaras en promastigotes. *Revista de la Facultad de Farmacia-UCV*, 74: 31-40, 2011.
- ¹³ Díaz E, Köhidai L, Ríos A, Vanegas O, Silva A, Szabó R, Mező G, Hudecz H, Ponte-Sucre A. *Leishmania braziliensis*: Cytotoxic and chemotactic effects of branched chain polypeptide conjugates with poly [L-Lysine] backbone. *Experimental Parasitology*, 135(1):134-141, 2013.
- ¹⁴ Díaz E, Zacarías AK, Pérez S, Vanegas O, Köhidai L, Padrón-Nieves M, Ponte-Sucre A. Effect of aliphatic, monocarboxylic, dicarboxylic, heterocyclic and sulphur-containing amino acids on *Leishmania spp.* Chemotaxis. *Parasitology* 142(13):1621-1630, 2015.
- ¹⁵ García N, Figarella K, Mendoza-León A, Ponte-Sucre A. Changes in the infectivity, pyruvate kinase and acid phosphatase activity and p-glycoprotein expression in glibenclamide resistant *Leishmania mexicana*. *Parasitology Research*, 86: 899-904, 2000.
- ¹⁶ Silva N, Ponte-Sucre A. ABC proteins in *Leishmania mexicana*: Modulation of parasite host cell interaction. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 20: 134-138, 2001.
- ¹⁷ Figarella K, Uzcátegui N, García N, Silva N, Camacho N, Ponte-Sucre A. Molecular pharmacology of chemo-resistant *Leishmania*. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 22:19-24, 2003.
- ¹⁸ Ponte-Sucre A. Physiological consequences of drug resistance in *Leishmania* and their relevance for chemotherapy. *Kinetoplastid Biology and Disease*, 2:14 (<http://www.kinetoplastids.com/home/>), 2003.
- ¹⁹ Silva N, Camacho N, Figarella K, Ponte-Sucre A. Cell differentiation and infectivity of *Leishmania mexicana* are inhibited in an ABC-transporter blocker resistant strain. *Parasitology*, 128: 629-634, 2004.
- ²⁰ Uzcátegui NL, Figarella K, Camacho N, Ponte-Sucre A. Substrate preferences and glucose uptake in glibenclamide- resistant *Leishmania* parasites. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 140:395-402, 2005.
- ²¹ Machuca C, Rodríguez A, Herrera M, Silva S, Ponte-Sucre A. *Leishmania amazonensis*: metabolic adaptations induced by resistance to an ABC transporter blocker. *Experimental Parasitology*, 114:1-9, 2006.
- ²² Natera, S, Machuca C, Padrón-Nieves M, Romero A, Diaz E, Ponte-Sucre A. *Leishmania sp.*: Proficiency of drug resistant parasites. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 29: 637-42, 2007.
- ²³ Padrón Nieves M, Díaz E, Romero A, Machuca C, Ponte-Sucre A. Valor pronóstico de los cambios fisiológicos asociados a la quimio-resistencia en *Leishmania*. *Vitae, Academia Biomédica Digital* 2008, 33: 7 (<http://vitae.ucv.ve/>)
- ²⁴ Padrón-Nieves M, Ponte-Sucre A. Marcadores de resistencia en *Leishmania*: Susceptibilidad in vitro a drogas leishmanicidas vs. retención de calceína en aislados de pacientes venezolanos con Leishmaniasis Cutánea Difusa. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 32: 29-33, 2013.

- ²⁵ Vanaerschot M, Dumet F, Roy S, Ponte-Sucre A, Arevalo J, Dujardin JC. Treatment failure in leishmaniasis: drug-resistance or another (epi-) phenotype? *Expert Reviews Anti Infective Therapy*, 12(8):937-46, 2014.
- ²⁶ Padrón-Nieves M, Díaz E, Machuca C, Rodríguez N, Cotrim P, Ponte-Sucre A. Correlation between glucose uptake and membrane potential in *Leishmania* parasites isolated from DCL-patients with therapeutic failure: A proof of concept. *Parasitology Research* 113(6):2121-2128, 2014.
- ²⁷ Dujardin JC. Structure, dynamics and function of *Leishmania* genome: resolving the puzzle of infection, genetics and evolution? *Infect Genet Evol.* 2009; 9:290-297.
- ²⁸ Mukhopadhyay Ra, Mukherjee S, Mukherjee B, Naskar K, Mondal D, Decuypere S, Ostyn B, Prajapati VK, Sundar S, Dujardin JC, Roy S. Characterization of antimony-resistant *Leishmania donovani* isolates: Biochemical and biophysical studies and interaction with host cells. *Int J Parasitol.* 2011; 41:1311-1321.
- ²⁹ Scheltema RA, Decuypere S, T'kindt R, Dujardin JC, Coombs GH, Breitling R. The potential of metabolomics for *Leishmania* research in the post-genomics era. *Parasitology.* 2010; 137:1291-1302.
- ³⁰ Berg M, García-Hernández R, Cuypers B, Vanaerschot M, Manzano JI, Poveda JA, Ferragut JA, Castanys S, Dujardin JC, Gamarro F. Experimental resistance to drug combinations in *Leishmania donovani*: metabolic and phenotypic adaptations. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015; 59(4):2242-55. doi: 10.1128/AAC.04231-14.
- ³¹ Buckheit RW Jr. Understanding HIV resistance, fitness, replication capacity and compensation: targeting viral fitness as a therapeutic strategy. *Expert Opin Investig Drugs.* 2004; 13:933-958.
- ³² Ait-Oudhia K, Gazanion E, Oury B, Vergnes B, Sereno D. The fitness of antimony-resistant *Leishmania* parasites: lessons from the field. *Trends Parasitol.* 2011; 27:141-142.
- ³³ Hendrickx S, Leemans A, Mondelaers A, Rijal S, Khanal B, Dujardin JC, Delputte P, Cos P, Maes L. Comparative Fitness of a Parent *Leishmania donovani* Clinical Isolate and Its Experimentally Derived Paromomycin-Resistant Strain. *PLoS One.* 2015; 10:e0140139. doi: 10.1371/journal.pone.0140139. eCollection 2015.
- ³⁴ Croft SL, Olliaro P. Leishmaniasis chemotherapy- challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17:1478-1483.
- ³⁵ Vicik R, Hoerr V, Glaser M, Schultheis M, Hansell E, McKerrow J, Holzgrabe U, Caffrey C, Ponte-Sucre A, Moll H, Stich A, Schirmeister T. Aziridine dicarboxylate inhibitor targeting the major cysteine protease of *Trypanosoma brucei* as lead trypanocidal agents. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 16:2753-2757, 2006.
- ³⁶ Ponte-Sucre A, Vicik R, Schultheis M, Schirmeister T Moll H. Aziridine-2,3-dicarboxylates: Peptidomimetic cysteine protease inhibitors with antileishmanial activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50: 2439-2447, 2006.
- ³⁷ Bringmann G, Kajahn I, Pedersen SEH, Reichert M, Faber JH, Gulder T, Brun R, Christensen SB, Ponte-Sucre A, Moll H, Heubl G, Mudogo V. Ancistrocladinium A and B, the first N,C-coupled naphthyl-dihydro-isoquinoline alkaloids, from Congolese *Ancistrocladus* species. *Journal of Organic Chemistry*, 71: 9348-56, 2006.
- ³⁸ Ponte-Sucre A, Faber JH, Gulder T, Kajahn I, Pedersen SEH, Schultheis M, Bringmann G, Moll H. Activity of naphthylisoquinoline alkaloids and synthetic analogs against *Leishmania major*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51:188-94, 2007.

- ³⁹ Muth M, Hoerr V, Glaser M, Ponte-Sucre A, Moll H, Stich A, Holzgrabe U. Antitrypanosomal Activity of Quaternary Naphthalimide Derivatives. *Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*, 17: 1590-1593, 2007.
- ⁴⁰ Caffrey CR, Weismann J, Swinerton RK, Kelly B, Fafarman AT, Rodgers M, Deady LW, Zorn JA, Walshe D, Debnath A, Land K, Beauchene J, Schreiber K, Cohen FE, McKerrow JH, Zhou YM, Doyle P, Moll H, Ponte-Sucre A, Schirmeister T, Saravanamuthu A, Fairlamb AH, Steverding D, May BCH. Bis-acridines as lead anti-parasitic agents: structure activity analysis of a discrete compound library in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51: 2164-72, 2007.
- ⁴¹ Goebel T, Ulmer D, Projahn H, Kloeckner J, Heller E, Glaser M, Ponte-Sucre A, Specht S, Sarite SR, Hoerauf A, Kaiser A, Hauber I, Hauber, J Holzgrabe U. In search of novel agents for therapy of tropical diseases and human immunodeficiency virus. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51: 238-50, 2008.
- ⁴² Ponte-Sucre A, Gulder T, Wegehaupt A, Albert C, Rikanović C, Schaefflein L, Frank A, Schultheis M, Unger M, Holzgrabe U, Bringmann G, Moll H. Structure-Activity Relationship and Studies on the Molecular Mechanism of Leishmanicidal N,C-Coupled Arylisoquinolinium Salts. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52:626-36, 2009.
- ⁴³ Ponte-Sucre A, Gulder T, Gulder T, Vollmers T, Bringmann G, Moll H. Alterations on the structure of *Leishmania major* induced by N arylisoquinolines correlate with compound accumulation and disposition. *Journal of Medical Microbiology*, 59: 69-75, 2010. Stich A, Ponte-Sucre A, Holzgrabe U. Do we need new drugs against Human African trypanosomiasis? *Lancet Infectious Diseases*, 13: 733-734, 2013.
- ⁴⁴ Ponte-Sucre A, Bruhn H, Schirmeister T, Ceci, A, Albert CA, Buechold C, Tischer M, Schlesinger S, Goebel T, Fuß A, Mathein D, Merget B, Sottriffer CA, Stich A, Krohne G, Engstler M, Bringmann G, Holzgrabe U. Anti- trypanosomal activities and structural chemical properties of selected compound classes. *Parasitology Research* 114:501-12, 2015
- ⁴⁵ Cecil A, Ohlsen K, Menzel T, Francois P, Schrenzel J, Fischer A, Dörries K, Selle M, Lalk M, Hantzschmann J, Dittirch M, Liang C, Bernhardt J, Oelschlaeger T, Bringmann G, Bruhn H, Unger M, Ponte-Sucre A, Lehmann L, Dandekar T. Modelling antibiotic and cytotoxic isoquinoline effects in Staphylococci and human cells. *International Journal of Medical Microbiology* 305:96-109, 2015.
- ⁴⁶ Ponte-Sucre A. Availability and applications of ATP-binding cassette (ABC) transporter blockers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76: 279-86, 2007.
- ⁴⁷ Ponte-Sucre A, Díaz E, Padrón-Nieves M. Quantitative Structure-Activity Analysis of Leishmanicidal Compounds. In *Chemoinformatics: Directions Toward Combating Neglected Diseases*, 2012, pp. 37-57. Teodorico C. Ramalho, editor. E-book, Bentham Sciences, ISBN 978-1-60805-183-0. <http://benthamscience.com/ebooks/9781608051830/index.htm>.
- ⁴⁸ Alcazar W, Silva López A, Alakurti S, Tuononen ML, Yli-Kauhaluom J, Ponte-Sucre A. Betulin derivatives impair *Leishmania braziliensis* viability and host-parasite interaction by. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 22:6220-6226, 2014.
- ⁴⁹ Ponte-Sucre A. Propiedades químicas estructurales de compuestos que actúan contra el *Trypanosoma brucei*. *Vitae* 62: <http://vitae.ucv.ve/?module=articulo&rv=118&n=5121>, 2015
- ⁵⁰ Llanes-Coronel DS, Gámez-Díaz LY, Suarez-Quintero LP, Páez LJ, Torres F, Echeverri F, Ponte-Sucre A, Patiño PJ, Trujillo-Vargas CM. New promising Euphorbiaceae extracts with activity in human lymphocytes from primary cell cultures. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 33:279-90, 2011.