



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Efecto del Nelfinavir en combinación con las 7-
cloroquinolina-4-oxifenil sustituidas sobre
*Leishmania mexicana***

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre

Universidad Central de Venezuela

Por la bachiller **Fabiola A. Mejías Borjas**

Como requisito parcial para optar al título

De licenciado en Biología

Tutora: Dra. Elizabeth Valdivieso

Caracas, Venezuela

Abril 2015

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elizabeth Valdivieso por abrirme las puertas del Laboratorio de Biología Celular de Parásitos y brindarme la oportunidad de poder realizar mi trabajo especial de grado bajo su tutela. Gracias por su disposición en resolver todas mis dudas y hacerme crecer tanto personal como académicamente.

Al Dr. Gustavo Benaim por el asesoramiento sobre las combinaciones de drogas, así como todo el grupo de trabajo del Laboratorio de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos del Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), quienes me brindaron gran apoyo al momento de realizar los ensayos correspondientes a la determinación del potencial electroquímico mitocondrial y alcalinización de los acidocalcisomas.

Al Dr. Francisco Arvelo y al Lic. Felipe Sojo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del IBE, por todo el apoyo y la colaboración al desarrollo de este trabajo. En especial por las drogas y reactivos suministrados, asesoramiento en el cultivo de macrófagos.

A la Dra. Francehuli Dagger, por su amabilidad y disposición en aclarar todas las dudas que surgieron a lo largo de la realización de este trabajo de investigación. En particular, por el asesoramiento y apoyo en el cultivo de macrófagos y la tinción Giemsa.

Al Prof. Carlos Ayesta, por toda la colaboración y asesoramiento brindado en la toma de las fotografías de los macrófagos infectados.

A Carlos Torrealba, mi compañero de trabajo por su gran ayuda, paciencia y disposición a colaborar en todos los ensayos realizados en este trabajo de investigación.

A la Dra. Ana K. Marcano, por enseñarme todo lo referente al trabajo con cultivos de parásitos y su valioso apoyo y colaboración en el manejo de los equipos utilizados.

Al Laboratorio de Fisiología Molecular y Biofísica y al Laboratorio de Fisiología y Genética de Microorganismos por permitirme utilizar las veces que fueron necesarias su microscopio óptico para realizar el conteo de macrófagos infectados.

A mis padres por toda su ayuda y apoyo brindado sin los cuales este trabajo hubiese sido más difícil de realizar.

A todas las personas e instituciones que de alguna u otra manera colaboraron con la realización de este trabajo de investigación.

ABREVIATURAS

μM: micromolar.

ADN: Ácido Desoxirribonucleico.

ATP: Adenosina Trifosfato.

COL: Colaboradores.

DAN: Diazo-acetil-norleucinametilester.

Ddi1: Proteína Inducible al Daño al DNA 1.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

FIC: Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional.

FR25: 7-cloroquinolina-4-oxifenil-(2-metoxi-5-carboxialdehído).

FR95: 7-cloroquinolina-4-oxifenil-(2-metoxi-5-tiocarbamida).

GTP: Guanosin Trifosfato.

HAART: Terapia Antirretroviral de Alta Eficiencia.

IC₅₀: Concentración inhibitoria del 50% de la proliferación celular.

IP o IP's: Inhibidores de la Proteasa del VIH.

LC: Leishmaniasis cutánea.

LCD: Leishmaniasis cutánea difusa.

LCL: Leishmaniasis cutánea localizada.

LMC: Leishmaniasis mucocutánea.

LV: Leishmaniasis visceral.

MIC: Concentración Mínima Inhibitoria del 90% de la proliferación celular.

mM: milimolar.

NFV: Nelfinavir.

OMS: Organización Mundial de la Salud.

PBS: Buffer Fosfato Salino.

SFB: Suero Fetal Bovino.

SIDA: Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida.

VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana.

RESÚMEN

La terapia antirretroviral de alta eficiencia (HAART) utilizada en el tratamiento de pacientes VIH-positivos, está conformada principalmente por inhibidores de la proteasa del virus. Dentro de estos, el Nelfinavir (NFV), ha demostrado ser uno de los más efectivos sobre las principales infecciones oportunistas, incluyendo las causadas por el parásito protozoario *Leishmania sp.* Al menos media docena de trabajos publicados en distintas especies de *Leishmania* han demostrado que el NFV produce una inhibición del crecimiento de este parásito en el rango micromolar (μM). Sin embargo, el bloqueo de la proliferación causada por el retroviral en el virus ocurre en tres órdenes de magnitud menor al reportado para *Leishmania*. En la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que potencien el efecto del NFV en *Leishmania*, en el presente trabajo nos hemos propuesto evaluar la combinación de este antirretroviral con otras drogas capaces de inhibir de igual forma la proliferación del parásito. Para tal efecto, hemos escogido dos compuestos quinolínicos de la serie 7-cloroquinolina-4-oxifenil sustituidas, FR25 ($\text{C}_{17}\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$) y FR95 ($\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}$). Las drogas en combinación fueron evaluadas sobre la proliferación *in vitro* de promastigotes de *Leishmania mexicana* (Cepa MHOM/BZ/82/BeI21) y sobre el porcentaje de infección de macrófagos murinos de la línea celular J774, previamente infectados con promastigotes del parásito. Nuestros resultados muestran un efecto sinérgico de la combinación de estas drogas, con valores del índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) menor a 1 para ambos morfotipos. Los valores de FIC obtenidos sobre promastigotes fueron de 0,77 para la combinación de NFV/FR25 y de 0,66 para NFV/FR95. Por otro lado, encontramos que los amastigotes fueron más susceptibles al tratamiento de la combinación de las drogas con FIC de 0,33 para NFV/FR25 y de 0,26 para NFV/FR95. En comparación con los resultados obtenidos cuando las drogas se utilizaron de manera individual se observó una mayor inhibición de la proliferación celular, una mayor disminución del porcentaje de infección de macrófagos y del número de amastigotes presentes en las vacuolas lisosomales cuando los parásitos fueron tratados con el NFV en combinación con los compuestos quinolínicos. Estos resultados validan la combinación de drogas como una alternativa eficiente en el tratamiento de esta parasitosis y en casos de coinfección de *Leishmania*/VIH, logrando potenciar el efecto inhibitorio del nelfinavir sobre el parásito.

ÍNDICE GENERAL

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 <i>Leishmaniasis</i>	<i>1</i>
1.2 <i>Tratamientos actuales contra la Leishmaniasis</i>	<i>2</i>
1.3 <i>Coinfección Leishmania/VIH.....</i>	<i>3</i>
1.4 <i>Inhibidores de la proteasa del VIH y Leishmania.....</i>	<i>5</i>
1.5 <i>Combinaciones de compuestos.....</i>	<i>8</i>
2. OBJETIVOS	12
2.1 <i>Objetivo general</i>	<i>12</i>
2.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>12</i>
3. MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1 <i>Preparación de compuestos.....</i>	<i>13</i>
3.2 <i>Cultivo de parásitos.....</i>	<i>13</i>
3.3 <i>Cultivo de macrófagos murinos de la línea celular J774.....</i>	<i>14</i>
3.4 <i>Efecto del Nelfinavir y de las quinolinas sobre la proliferación de promastigotes de L. mexicana.....</i>	<i>14</i>
3.5 <i>Infección de macrófagos murinos de la línea celular J774 por promastigotes de L. mexicana.....</i>	<i>16</i>
3.6 <i>Efecto del Nelfinavir y de las quinolinas sobre el porcentaje de infección por amastigotes de L. mexicana.....</i>	<i>16</i>
4. RESULTADOS	18
4.1 <i>Efecto del Nelfinavir y de las quinolinas sobre la proliferación de promastigotes de L. mexicana.....</i>	<i>18</i>
4.2 <i>Efecto de la combinación del Nelfinavir y de las quinolinas sobre la proliferación de promastigotes de L. mexicana.....</i>	<i>20</i>
4.3 <i>Efecto del Nelfinavir y de las quinolinas sobre el porcentaje de infección por amastigotes de L. mexicana.....</i>	<i>22</i>
4.4 <i>Efecto de la combinación del Nelfinavir y de las quinolinas sobre el porcentaje de infección por amastigotes de L. mexicana.....</i>	<i>24</i>
5. DISCUSIÓN.....	28
6. CONCLUSIONES.....	35
7. BIBLIOGRAFÍA.....	36

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema general del ciclo de vida de <i>Leishmania sp.</i>, en el hospedador vertebrado (Tomado de http://www.dpd.cdc.gov/dpdx 10/01/2014).	2
Figura 2. Estructura de las quinolinas FR25 y FR95 de la serie 7-cloroquinolina-4-oxifenil sustituidas.	11
Figura 3. Fórmula descrita por Hallander y col. (1982) para el cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC).	15
Figura 4. Efecto del NFV sobre la proliferación de promastigotes de <i>L. mexicana</i> a las 48 horas de incubación.	18
Figura 5. Isoblograma de la combinación de NFV/FR25 sobre la proliferación de promastigotes de <i>L. mexicana</i>. La línea punteada representa un efecto aditivo teórico entre las drogas, mientras que la línea sólida muestra un efecto sinérgico de la combinación de NFV/FR25. Los resultados mostrados corresponden a tres experimentos independientes.	20
Figura 6. Isoblograma de la combinación de NFV/FR95 sobre la proliferación de promastigotes de <i>L. mexicana</i>. La línea punteada representa un efecto aditivo teórico entre las drogas, mientras que la línea sólida muestra un efecto sinérgico de la combinación de NFV/FR95. Los resultados mostrados corresponden a tres experimentos independientes.	21
Figura 7. Efecto de la combinación de NFV/FR25 y NFV/FR95 sobre el porcentaje de infección por amastigotes de <i>L. mexicana</i>. (A) Control sin infectar; (B) Control infectado; (C) 0,5 μ M NFV + 2,5 μ M FR25; (E) 1 μ M NFV + 1 μ M FR25; (G) 0,25 μ M NFV + 4,5 μ M FR25; (D) 1,5 μ M NFV + 0,5 μ M FR95; (F) 0,5 μ M NFV + 2 μ M FR95; (H) 0,25 μ M NFV + 3 μ M FR95. Las flechas negras indican presencia de amastigotes y las flechas rojas indican vacuolas vacías. (100.....	27
Figura 8. Isoblograma de la combinación de NFV/FR25 (A) y NFV/FR95 (B) sobre el porcentaje de infección por amastigotes de <i>L. mexicana</i>. La línea punteada representa un efecto aditivo teórico entre las drogas, mientras que la línea sólida muestra un efecto sinérgico de la combinación de NFV/FR25 (A) y NFV/FR95 (B). Los resultados mostrados corresponden a tres experimentos independientes.....	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Combinación del NFV con los compuestos FR25 y FR95 sobre promastigotes de <i>L. mexicana</i>	15
Tabla 2. Combinación del NFV con los compuestos FR25 y FR95 sobre amastigotes intracelulares de <i>L. mexicana</i>	17
Tabla 3. Efecto antiproliferativo del NFV y los compuestos quinolínicos sobre la proliferación de promastigotes de <i>L. mexicana</i>	19
Tabla 4. Efecto antiproliferativo del NFV y las quinolinas sobre el porcentaje de infección de macrófagos por amastigotes de <i>L. mexicana</i>	23
Tabla 5. Efecto antiproliferativo de la combinación del NFV y las quinolinas sobre el porcentaje de infección de macrófagos por amastigotes de <i>L. mexicana</i>	25

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Leishmaniasis*

La leishmaniasis es una enfermedad causada por diferentes especies del género *Leishmania*. Esta parasitosis es endémica en 98 países de las regiones tropicales y subtropicales de América, Europa, Asia y África, con más de 350 millones de personas en situación de riesgo según datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2010). Las cifras publicadas indican una incidencia de 2 millones de nuevos casos por año (0,5 millones de leishmaniasis visceral y 1,5 millones de leishmaniasis cutánea) estimándose más de 50.000 muertes anuales, una tasa superada solo por la malaria (OMS, 2010; Alvar y col., 2012).

Leishmania muestra dos morfologías durante su ciclo de vida, una forma denominada promastigote, que se caracteriza por tener una forma alargada, ser móvil y flagelada y otra denominada amastigote que es de forma oval e inmóvil (Molyneux, 1987; Cunningham, 2002). Este parásito presenta un ciclo de vida donde participa un hospedador invertebrado que hace las veces de vector y un hospedador vertebrado. En la toma de sangre a un hospedador vertebrado infectado, los amastigotes son ingeridos por el insecto vector del género *Phlebotomus* o *Lutzomya*. Una vez dentro del insecto, los amastigotes migran hasta el estómago, donde se transforman y se multiplican en promastigotes, que son nuevamente inoculados en la dermis del mamífero, y se transforman a amastigotes luego de ser fagocitados por los macrófagos (Figura 1) (Bonfante y Barroeta, 2002).

En el humano estos parásitos generan un amplio espectro de manifestaciones clínicas, reconociéndose dos formas de la enfermedad, la leishmaniasis visceral (LV) y la leishmaniasis cutánea (LC). La LV es endémica en 62 países, con un total de 200 millones de personas en situación de riesgo (Alvar y col., 2012). A nivel mundial, se estiman más de 300.000 casos anuales de LV en el este de África, principalmente en Sudán y Etiopía (Van Griensven y Diro, 2012). La LC se presenta a su vez en varias

formas clínicas: la leishmaniasis cutánea localizada (LCL), la leishmaniasis cutánea difusa (LCD) y en la leishmaniasis mucocutánea (LCM) (Rondón, 1993; Convit y Pinardi, 1974).

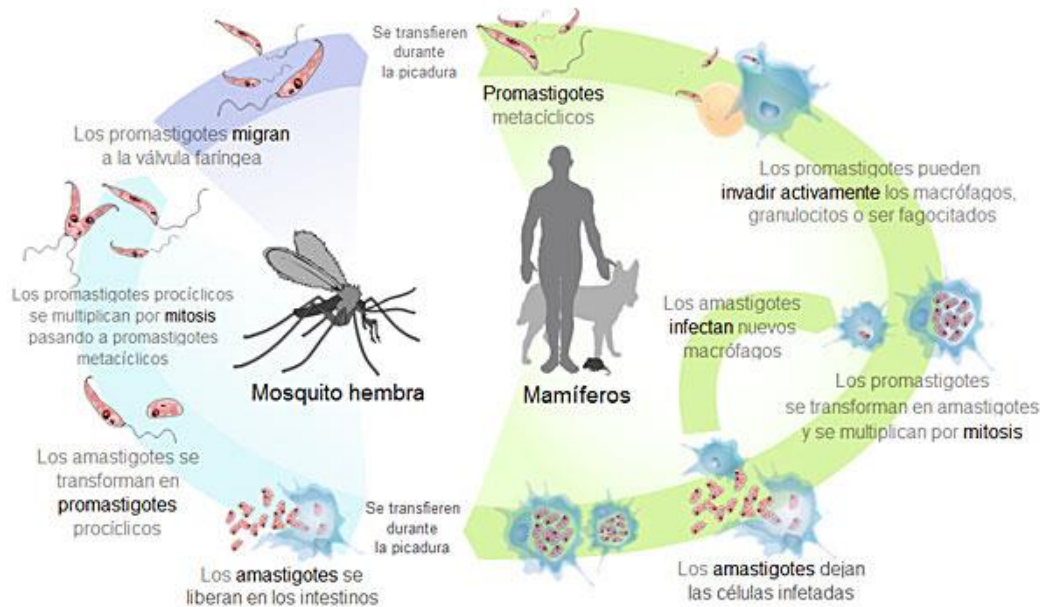


Figura 1. Esquema general del ciclo de vida de *Leishmania* sp., en el hospedador vertebrado (Tomado de <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx> 10/01/2014).

En Venezuela, las infecciones por *Leishmania* han sido reportadas en todas las entidades federales, siendo las más importantes los estados Trujillo y Mérida, presentándose casos en todas las edades, siendo más expuestos a contraer la enfermedad personas del sector agropecuario (Bonfante y Barroeta, 2002).

1.2 Tratamientos actuales contra la Leishmaniasis

Actualmente existen numerosos medicamentos utilizados para el tratamiento de la leishmaniasis que comprenden una gran variedad de estructuras químicas, entre los cuales destacan la terapia con antimoniales pentavalentes, antibióticos específicos y otros fármacos como principales líneas de acción (Alvar y col., 2012; Cunningham, 2002).

La terapia con antimoniales pentavalentes se administran de manera intramuscular contra la LC y LV. Los fármacos más utilizados son el pentostam

(estibogluconato de sodio) y glucantime (antimoniato de meglumina). El detalle acerca del mecanismo de acción de estos fármacos no se conoce con precisión, sin embargo se cree que actúan sobre el metabolismo energético del parásito interfiriendo con la síntesis de ATP y GTP (Oullette y col., 2004).

En caso de intolerancia a los antimoniales pentavalentes se administran fármacos de segunda línea de acción como la anfotericina B, la miltefosina, la pentamidina y la paromomicina (Wilson y col., 2008). La anfotericina B es un antibiótico poliénico que altera la permeabilidad de la membrana plasmática del parásito, produciendo la formación de poros que resulta en la lisis celular (Cunningham, 2002; Ramos y col, 1996). Por otro lado, la miltefosina es un fosfolípido acilado que afecta las rutas de señalización celular e inhibe las enzimas implicadas en la síntesis y en la transcripción de los fosfolípidos de la membrana celular (Paris y col., 2004). Otro fármaco utilizado en el tratamiento contra la leishmaniasis es la pentamidina, una diamina aromática que afecta la replicación del genoma a nivel mitocondrial. Por último, la paromomicina es un aminoglucósido que se cree que afecta el proceso de traducción de proteínas (Sundar y col., 2007).

Todos estos fármacos actualmente utilizados contra la leishmaniasis presentan numerosos efectos secundarios en los pacientes, con el tiempo el parásito desarrolla resistencia al tratamiento, son altamente tóxicos y costosos. Adicionalmente, se ha reportado que estos fármacos son ineficientes para el tratamiento de algunos pacientes en estado crónico de la enfermedad (Paris y col., 2004; Wilson y col., 2008).

1.3 Coinfección *Leishmania*/VIH

Un nuevo factor de riesgo asociado a la enfermedad parasitaria es la coinfección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). Las personas infectadas con VIH, son más propensas a contraer infecciones oportunistas como consecuencia de un sistema inmune debilitado, siendo la leishmaniasis la cuarta infección oportunista en pacientes VIH-positivos. La coinfección por *Leishmania* y VIH plantea un problema importante en

el tratamiento de individuos coinfectados, donde el tratamiento tradicional para ambas enfermedades es poco efectivo (Alvar y col., 2012).

Para el año 2010, la coinfección *Leishmania*/VIH había sido reportada en 35 países endémicos para la leishmaniasis. Este fenómeno es el resultado de un aumento en la superposición entre la leishmaniasis y el VIH, a causa de la extensión de la enfermedad a áreas rurales y suburbanas (Olivier y col., 2003; Alvar y col., 2012). De acuerdo a la OMS (2010), el número de nuevos casos de coinfección ha disminuido en Europa desde el final de la década de 1990, debido principalmente al acceso a la terapia antirretroviral HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy, por sus siglas en inglés). En otras partes del mundo, sin embargo, donde hay un acceso limitado a dicho tratamiento, la prevalencia ha ido en constante aumento. A medida que la pandemia del VIH en los trópicos se extiende a zonas endémicas para la leishmaniasis, la coinfección por *Leishmania*/VIH es un problema de rápida expansión, lo que aumenta la urgencia de un enfoque integral para el control de la leishmaniasis (OMS, 2010).

En pacientes VIH-positivos, la forma clínica más común de la leishmaniasis es la visceral, que presenta características diferentes de la LV en pacientes no coinfectados (Alvar y col., 1997; Cruz y col., 2006). También se han reportado casos de coinfección con LC aunque en menor proporción. La leishmaniasis favorece la progresión clínica de la infección por el VIH y el consiguiente desarrollo del SIDA, con lo cual disminuye la supervivencia de los pacientes y deteriora su respuesta al tratamiento antirretroviral (Olivier y col., 2003; OMS, 2010). A su vez, la propia infección por el VIH aumenta el riesgo de desarrollar leishmaniasis hasta en 100 veces en áreas donde la leishmaniasis es endémica, así como la progresión de la infección asintomática hacia la enfermedad activa, lo cual reduce la tasa de respuesta terapéutica (Guerin y col., 2002; OMS, 2010).

1.4 Inhibidores de la proteasa del VIH y Leishmania

Desde la introducción de la terapia antirretroviral (HAART), las infecciones oportunistas virales, bacterianas, fúngicas y parasitarias han disminuido en los pacientes infectados con VIH (Alfonso y Manzote, 2011). En un estudio que involucró 6.941 individuos con VIH de Australia y diez países Europeos, al comparar los períodos 1997-2001 y 1994-1996, se produjo una disminución de estas infecciones oportunistas cuando los pacientes fueron tratados con la terapia antirretroviral (López-Veléz, 2003). Esto evidencia el impacto que ha tenido la terapia HAART contra las principales infecciones oportunistas asociadas.

Los medicamentos que se usan como terapia antirretroviral han sido clasificado principalmente en 3 categorías según su mecanismo de acción: inhibidores nucleósidos de la transcriptasa inversa como zidovudina, lamivudina y estavudina; inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa inversa como nevirapina, efavirenz y delavirdina e inhibidores de la proteasa del VIH (IP) como indinavir, nelfinavir, saquinavir, ritonavir y lopinavir. Estos compuestos suelen ser utilizados en regímenes de combinación de fármacos para lograr una mayor beneficio posible y para disminuir el riesgo de desarrollar resistencia (De Clercq, 2009).

Los fármacos contra el VIH están diseñados para inhibir dos proteínas víricas de particular interés, la transcriptasa inversa y la proteasa vírica. Esta última es miembro de la familia de las aspartil proteasas y es el blanco de los IP's del VIH. Esta familia de proteasas parece jugar un papel importante en los ciclos de vida de numerosos agentes patógenos incluyendo los protozoos parásitos, bacterias, virus, levaduras y hongos, en donde intervienen en diversas funciones, incluyendo la invasión de las células huésped y los tejidos. Su caracterización bioquímica y molecular ha proporcionado herramientas para mejorar la comprensión de las funciones de estas enzimas. Además, estudios en múltiples sistemas sugieren que los inhibidores de estas enzimas tienen efectos potentes contra varios patógenos.

En *Leishmania*, Valdivieso y col. (2007) reportaron la presencia de una actividad proteolítica tipo aspartil-proteasa en la fracción soluble de promastigotes de *L. mexicana* a un pH óptimo de 3,8. Esta actividad fue inhibida en un 99% por el Diazo-acetil-norleucinametiléster (DAN), un inhibidor selectivo para las aspartil proteasa mientras que inhibidores selectivos para serin-proteinasa y cisteín-proteinasa, no tuvieron ningún efecto inhibitorio. De igual forma, se obtuvo una inhibición dosis-dependiente de la proliferación de promastigotes de *L. mexicana* por DAN, observándose células binucleadas y multinucleadas, lo que sugiere que esta actividad proteolítica podría estar asociada al proceso de citocinesis en estos parásitos.

Estudios pioneros del efecto de los IP's del VIH sobre *Leishmania* fueron realizados en el año 2005 por Savoia y col., donde reportaron que los fármacos indinavir y saquinavir producen un efecto antiproliferativo en cultivos *in vitro* de promastigotes de *L. infantum* y *L. major*. En el año 2008, Trudel y col. estudiaron el efecto de los IP's, nelfinavir y saquinavir, sobre el crecimiento *in vitro* de amastigotes axénicos de *L. infantum*, observando una inhibición dosis dependiente. Adicionalmente, demostraron que el nelfinavir, ritonavir y saquinavir reducen la supervivencia intracelular de *L. infantum* y *L. donovani*, disminuyendo el porcentaje de infección de macrófagos coinfectados o no con el VIH. Este resultado es de gran relevancia fisiológica debido a que estas especies de *Leishmania* son las responsables de LV, forma clínica presente en la mayoría de los casos de coinfección. Posteriormente, Santos y col. (2009) reportaron el efecto de lopinavir, nelfinavir, amprenavir, saquinavir e indinavir sobre la proliferación de promastigotes y en el porcentaje de infección de macrófagos de una especie de importancia en América que produce manifestaciones cutáneas de la enfermedad, *Leishmania amazonensis*. Este grupo de investigación encontró que de todos los inhibidores estudiados, el nelfinavir mostró un mayor efecto inhibitorio sobre la proliferación de promastigotes con un IC₅₀ de 15,12 μ M y una reducción del 90% en el porcentaje de infección de macrófagos por amastigotes. Al evaluar el efecto de estas drogas sobre la actividad proteolítica de *L.*

amazonensis se encontró que el lopinavir fue el compuesto más eficiente en inhibir la hidrólisis de un sustrato sintético de la proteasa del VIH por parte del parásito.

En el 2010, Valdivieso y col., profundizan en el estudio del efecto de los IP's del VIH en *Leishmania*, demostrando que los IP's del VIH, saquinavir y nelfinavir, producen efectos antiproliferativos de manera dosis-dependiente en cultivos *in vitro* de seis especies de *Leishmania*, incluyendo *L. mexicana* y *L. infantum*. Resultados similares fueron obtenidos cuando los parásitos fueron tratados con Ac-Leu-Val-fenilalanina, un inhibidor selectivo de la IP's del VIH. Los fármacos utilizados en este estudio inducen cambios en la morfología del parásito, observándose células binucleadas y multinucleadas. Adicionalmente, los autores reportaron una reducción del porcentaje de infección de macrófagos y monocitos coinfectados con el VIH por amastigotes de *L. infantum* y *L. mexicana*, siendo el nelfinavir más efectivo que el saquinavir, en concordancia con los resultados obtenidos por Trudel y col. (2008). De igual forma, estos compuestos, fueron capaces de inhibir la actividad tipo aspartil proteasa del parásito de manera dosis-dependiente. Estos autores sugieren que la actividad antiproliferativa de DAN (Valdivieso y col., 2007) y los 3 IP's del VIH, Ac-Leu-Val-fenilalanina, nelfinavir y saquinavir, puede estar asociada a la inhibición de la citocinesis durante la replicación del parásito, lo que evidencia la importancia de dicha actividad en el parásito.

A pesar de que se ha demostrado que los IP's del VIH tienen un efecto directo sobre la actividad aspartil proteasa de *Leishmania*, no fue sino hasta el año 2011 que se identificó la proteína responsable de dicha actividad en el parásito. White y col., (2011) demostraron que una proteína de *Leishmania* homóloga a la proteína inducible al daño del DNA (Ddi1) de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* era inhibida por los IP's. En estos estudios se observó que el gen correspondiente a la proteína Ddi1 de *L. major* fue capaz de complementar el fenotipo de secreción de proteínas asociado a la Ddi1 de la levadura *S. cerevisiae*. Asimismo, se encontró que varios de los inhibidores de proteasa del VIH, utilizados como fármacos antirretrovirales, evitan el fenotipo de

complementación resultante, lo que sugiere que la inhibición de la Ddi1 de *Leishmania* podría ser el mecanismo por el cual los inhibidores de la proteasa del VIH median su acción antiparasitaria (White y col., 2011). Estos hallazgos se apoyan con los trabajos realizados por Perteguer y col. (2012) quienes clonaron, secuenciaron y expresaron la proteína Ddi1-like de *L. major*; demostrando por primera vez de forma directa que esta es una proteasa funcional capaz de hidrolizar péptidos específicos de la proteasa del VIH y de proteasas tipo catepsina D. Esta actividad fue inhibida por el fármaco antirretroviral nelfinavir (NFV). Estos resultados señalan a la Ddi1 de *Leishmania* como una blanco potencial para el desarrollo de drogas selectivas contra el parásito.

Sin embargo, a pesar de estos prometedores hallazgos, el uso continuado de la terapia HAART en pacientes coinfectados con *Leishmania*/VIH, se encuentra asociado a importantes inconvenientes que pueden disminuir considerablemente su eficacia con el tiempo, entre los que cabe destacar el desarrollo de resistencias, la dificultad en el cumplimiento terapéutico y la gran toxicidad que producen los fármacos.

1.5 Combinaciones de compuestos

En la última década, los estudios experimentales para identificar nuevos tratamientos antileishmania han estado dirigidos, entre otras acciones, a la búsqueda de sinergismo, en el cual la acción combinada de dos o más drogas produce un efecto total mayor que el efecto que produce cada droga por separado (Olliaro y Taylor, 2003). Algunas de las ventajas de la combinación de drogas incluyen el aumento del efecto terapéutico, disminución de las dosis necesarias, minimizar la toxicidad y el desarrollo de resistencia a los medicamentos. Este esquema terapéutico se ha aplicado en el tratamiento de numerosas patologías como el cáncer y enfermedades infecciosas como el SIDA, mal de chagas y paludismo (Van Griensven y Diro, 2012).

El primer trabajo de investigación en donde se evalúa la combinación de drogas antileishmania fue realizado por Chungue y col. (1990) donde evaluaron en ensayos clínicos, el efecto de la combinación del pentostam con la paromomicina y el

alopurinol, encontrando que con estas combinaciones de fármacos los pacientes se recuperaban más rápido y no sufrían recaída en un periodo de 12 meses. Basados en estos resultados, Seifert y Croft (2006) realizaron ensayos de combinaciones *in vitro* entre la miltefosina y otras drogas antileishmaniasis como anfotericina B, pentostam, y paromomicina sobre *Leishmania donovani*, concluyendo que la combinación de miltefosina/anfotericina B y miltefosina/paromomicina tienen un efecto sinérgico antiproliferativo sobre *L. donovani*.

En el año 2011, Seifert y col., evaluaron las interacciones *in vitro* entre la sitamaquina, una 8-aminoquinolina de interés terapéutico en el tratamiento de la LV, con los actuales medicamentos antileishmania anfotericina B, pentostam, miltefosina, paromomicina y pentamidina contra amastigotes de *L. donovani* en macrófagos peritoneales de ratón, obteniendo que las interacciones entre sitamaquina con anfotericina B, estibogluconato sodio, paromomicina y miltefosina fueron clasificados como indiferente mientras, que la combinación de sitamaquina/pentamidina fue sinérgica. Estos estudios amplían los datos preclínicos sobre combinaciones de fármacos y proporciona la base para futuros tratamientos con múltiples fármacos. Asimismo, logran evidenciar un aumento del efecto de la miltefosina y la sitamaquina sobre el parásito cuando se utilizan en combinación con las otras drogas antileishmania.

Estudios realizados por Serrano-Martín y col. (2009a), encontraron que la amiodarona, un agente anti-rítmico utilizado en casos de chagas crónico, afecta la viabilidad de promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. mexicana*, produciendo un desbalance en la homeostasis de la $[Ca^{2+}]$ en el parásito. Basados en estos resultados, este mismo grupo de investigación, evaluó el efecto antiproliferativo de la combinación de la amiodarona y la miltefosina en *L. mexicana*, encontrando que la combinación de estos fármacos tiene un efecto sinérgico, con un índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) de 0,74 en promastigotes y 0,49 en amastigotes. Asimismo, los autores reportaron que con la aplicación de este esquema

terapéutico se induce cura parasitológica del 90% en un modelo murino, siendo esta la primera vez que se evidencia un efecto sinérgico *in vivo* (Serrano-Martín y col., 2009b).

A la luz de los resultados discutidos anteriormente, la terapia de combinación de fármacos podría ser una alternativa que potencie el efecto de los IP's del VIH sobre *Leishmania*, mejorando el tratamiento de los pacientes coinfectados (Van Griensven y Diro, 2012). Hasta la fecha no se ha reportado ningún trabajo de investigación en donde se estudie el efecto de la combinación de los inhibidores de la proteasa del VIH con fármacos comúnmente utilizados contra la leishmaniasis u otras drogas potenciales. Dado que el NFV es uno de los antirretrovirales más activos, es de particular interés estudiar el posible efecto sinérgico de la combinación de este antirretroviral con otros compuestos capaces de inhibir el crecimiento del parásito.

En la búsqueda de nuevas drogas capaces de inhibir de manera eficiente el crecimiento de este parásito, las cuales podrían utilizarse adicionalmente en terapias de combinación, los científicos han dirigido parte de sus esfuerzos al estudio de especies de plantas que contienen compuestos bioactivos con potencial medicinal (Delgado y col., 2003; Rocha y col., 2005).

El uso de plantas en el tratamiento de la leishmaniasis ha sido ampliamente practicado por habitantes de zonas rurales, reportándose efectos positivos con una variedad de extractos y moléculas de origen natural sobre este parásito (McClure, 1996; Delgado y col., 2003).

Entre estos compuestos destacan las quinolinas, un grupo de moléculas heterocíclicas aromáticas de bajo peso molecular, formadas por la unión de un núcleo derivado del benceno y otro piridínico. Estas son fácilmente solubles en solventes orgánicos y muestran un amplio rango de actividades antisépticas y antibióticas (Tempone y col., 2005). Kouznetsov y col. (2007) han reportado un amplio rango de actividad antimalarial, antifúngica y antileishmania de algunas tetrahydroquinolinas, indenoquinolinas y fenilquinolinas (Jacquemon-Collet y col., 2002; Bompert y col.,

2013). Asimismo, derivados de las tetrahydroquinolinas también presentan actividad antitumoral (Dorey y col., 2002), antioxidante (Kouznetsov y col., 2009) y más recientemente antichagásicos (Fonseca-Berzal y col., 2013). Otro derivado de las quinolinas que ha mostrado efectos inhibitorios contra *Leishmania sp.*, es la sitamaquina, una 8-amino-quinolina que se encuentra en ensayos clínicos para el tratamiento de la LV (Seifert y col., 2011). Este es un fármaco activo por vía oral, que causa una disminución rápida y significativa de los niveles de ATP del parásito, lo que conduce a su colapso bioenergético (Carvalho y col., 2011). Todos estos hallazgos nos permiten señalar a las quinolinas como compuestos de interés para el desarrollo de nuevos fármacos más efectivos contra esta parasitosis.

Por esta razón, en el presente trabajo se planteó estudiar el efecto de la combinación del NFV con dos compuestos quinolínicos de la serie 7-cloroquinolina-4-oxifenil sustituidas extraídas de la planta *Eugenia caryophyllus*, FR25 y FR95, sobre la proliferación de *Leishmania mexicana*.

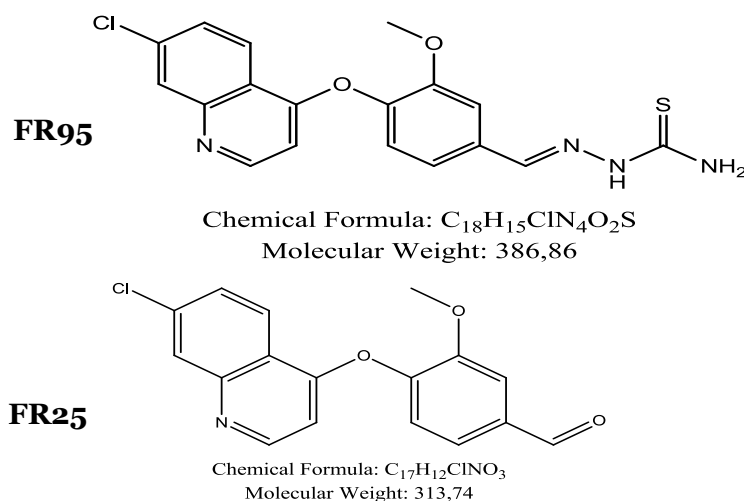


Figura 2. Estructura de las quinolinas FR25 y FR95 de la serie 7-cloroquinolina-4-oxifenil sustituidas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de la combinación del Nelfinavir y dos quinolinas de la serie 7-cloroquinolina-4-oxifenil sustituidas, FR25 y FR95, sobre la proliferación de *Leishmania mexicana*.

2.2 Objetivos específicos

- 1) Evaluar el efecto del Nelfinavir y de las quinolinas sobre:
 - a. La proliferación de promastigotes de *L. mexicana*.
 - b. El porcentaje de infección de macrófagos murinos de la línea celular J774 por amastigotes de *L. mexicana*.
- 2) Evaluar el efecto de la combinación del Nelfinavir con las quinolinas sobre:
 - a. La proliferación de promastigotes de *L. mexicana*.
 - b. El porcentaje de infección de macrófagos murinos de la línea celular J774 por amastigotes de *L. mexicana*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Preparación de compuestos

El nelfinavir fue donado por la empresa Pfizer (Código: AG-1343).

Los compuestos quinolínicos fueron sintetizados en el laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular de la Universidad Industrial de Santander de Colombia y fueron facilitados por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del Instituto de Biología de Experimental de la Universidad Central de Venezuela. Las quinolinas de la serie 7-cloroquinolina-4-oxifenil sustituidas, son compuestos semisintéticos obtenidos de diversas modificaciones de cicloadición del eugenol, extraído del aceite esencial de la planta *Eugenia caryophyllus*.

Se prepararon soluciones “stock” de cada compuesto en el rango mM utilizando el dimetilsulfóxido (DMSO) como disolvente, a partir del cual se tomaron alícuotas para llegar a una concentración determinada directamente en el cultivo.

3.2 Cultivo de parásitos

Se cultivaron promastigotes de *L. mexicana* (MHOM/BZ/82/Bel-21) en medio Schneider (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco, Paisley, UK) inactivado a 56 °C por 45 minutos y 1% Penicilina/Estreptomicina, utilizando értulas estériles de 125 ml de capacidad, a temperatura ambiente y sin agitación.

El número de células fue determinado por un método indirecto y otro directo. Como medida directa se realizó el conteo de células utilizando una cámara de Neubauer. Como medida indirecta se determinó la turbidez del cultivo, realizando mediciones de transmitancia a una longitud de onda de 560 nm en un fotocolorímetro Spectronic 20 por 5 días, basándose en una relación preestablecida entre la turbidez del cultivo, el porcentaje de transmitancia y el número de células/ml.

3.3 Cultivo de macrófagos murinos de la línea celular J774

Se cultivaron macrófagos murinos de la línea celular J774 en medio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) suplementado con 10% de SFB, 1% de Penicilina/Estreptomicina y 1% de L-Glutamina, incubados en una cámara de crecimiento con una atmósfera de CO₂ al 5% y a una temperatura de 37 °C. Los repiques fueron realizados cada 3 días, cuando el cultivo se encontraba en confluencia.

3.4 Efecto del Nelfinavir y de las quinolinas sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*

Los promastigotes de *L. mexicana* se cultivaron en presencia de cada una de las drogas partiendo de una densidad celular de 2x10⁶ promastigotes/ml en medio Schneider suplementado con 10% SFB. El intervalo de concentraciones ensayadas de los compuestos fue de 3 µM a 50 µM. Se realizaron mediciones cada 24 horas durante 5 días consecutivos, observando los parásitos en el cultivo mediante un microscopio de luz Olympus CK40 a 40x.

El efecto de cada uno de las drogas sobre el cultivo fue comparado con dos controles, uno que contiene las células en medio Schneider suplementado con 10% SFB y otro que contiene las células en el medio mencionado anteriormente y 1% DMSO (vehículo de la droga). Los resultados fueron graficados utilizando el programa Sigmaplot 12.0 y para el cálculo del IC₅₀ se utilizó la función "Four Parameter Logistic Curve".

Para evaluar el efecto de la combinación de las drogas sobre promastigotes de *L. mexicana*, se siguió el protocolo descrito anteriormente. Las concentraciones ensayadas para la combinación de NFV y de los compuestos quinolónicos FR25 y FR95 sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana* se encuentran en la Tabla 1. Dichas combinaciones se realizaron a concentraciones por debajo de la

concentración mínima inhibitoria del compuesto sin combinar que causa al menos el 90% de inhibición de la proliferación (MIC).

Tabla 1. Combinación del NFV con los compuestos FR25 y FR95 sobre promastigotes de <i>L. mexicana</i>.
NFV + FR25
15 µM + 5 µM 9 µM + 9 µM 4 µM + 15 µM
NFV + FR95
15 µM + 3,75 µM 8 µM + 8 µM 3,75 µM + 16 µM

Los valores del índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) se obtuvieron según la fórmula descrita por Hallander y col. (1982) (Figura 3) con el propósito de definir el tipo de interacción (antagonista, sinérgica o aditivo) de cada combinación. La construcción de los isobologramas, representación gráfica de la combinación donde cada eje representa las concentraciones de las drogas en escala lineal, se realizó utilizando el programa Sigmaplot 12.0.

$$\sum FIC = \frac{\text{MIC A en combinación}}{\text{MIC A sin combinar}} + \frac{\text{MIC B en combinación}}{\text{MIC B sin combinar}}$$

Figura 3. Fórmula descrita por Hallander y col. (1982) para el cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC).

Si el valor de FIC resulta ser mayor a 1, la combinación de los fármacos se clasifica como antagonista, si es igual a 1 como aditiva, si es menor a 1 como sinergismo moderado y si es menor a 0,5 como un sinergismo fuerte. Por otro lado, al representar gráficamente el isoblograma, si la combinación resulta ser aditiva, la isobola es una recta mientras que, si la combinación resulta ser sinérgica o antagonista, las isobolas serán cóncava y convexa, respectivamente.

3.5 Infección de macrófagos murinos de la línea celular J774 por promastigotes de *L. mexicana*.

Para la infección de macrófagos murinos de la línea celular J774 con promastigotes de *L. mexicana*, se sembró una densidad celular de 150.000 macrófagos/pozo sobre laminillas colocadas en placas de cultivo de 6 pozos estériles. Se incubaron en medio RPMI-1640 suplementando con 10% SFB, 1% Penicilina/Estreptomicina y 1% L-Glutamina durante 24 horas a 37 °C y una atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente, se le añadieron promastigotes en fase estacionaria de crecimiento, en una relación de 10 parásitos por cada macrófago y se incubaron por 1 hora bajo las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados rápidos con medio RPMI-1640 fresco y se mantuvo el cultivo en las mismas condiciones.

3.6 Efecto del Nelfinavir y de las quinolinas sobre el porcentaje de infección por amastigotes de *L. mexicana*.

Para evaluar el efecto de los drogas sobre el porcentaje de infección de macrófagos murinos de la línea celular J774 por amastigotes de *L. mexicana*, a macrófagos previamente infectados, se les añadieron las diferentes concentraciones de los compuestos y posteriormente se incubaron a 37 °C y a una atmósfera de 5% de CO₂ durante 48 horas. El intervalo de concentraciones ensayadas de los compuestos fue de 1 µM a 15 µM.

Para el conteo y visualización de los amastigotes intracelulares se aplicó la tinción Giemsa. Para ello, luego de transcurrido las 48 horas de la incubación con las drogas, se retiró el medio de los pozos y se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS) 150 mM (NaCl 0,12M, NaHPO₄ 10x10⁻³ M, KH₂PO₄ 3,16x10⁻³ M) pH 7,2. Posteriormente, se fijaron con metanol absoluto por 15 minutos y se añadió el

colorante Giemsa diluido 1/10 en agua de chorro por 15 minutos, se retiró el colorante y se lavó con PBS.

Se realizó el conteo del número de macrófagos infectados y no infectados para determinar el porcentaje de infección y se contaron los amastigotes intracelulares presentes en 100 macrófagos en los cultivos tratados y no tratados utilizando el objetivo de inmersión (100x) de un microscopio óptico.

Para evaluar el efecto de la combinación de las drogas sobre el porcentaje de infección de macrófagos murinos de la línea celular J774 por amastigotes de *L. mexicana*, se siguió el protocolo descrito anteriormente. Las concentraciones ensayadas para las combinaciones del NFV con los compuestos quinolónicos FR25 y FR95 sobre los amastigotes intracelulares se encuentran en la Tabla 2. De igual forma, las combinaciones se realizaron a concentraciones por debajo de los valores del MIC previamente establecidos.

Tabla 2. Combinación del NFV con los compuestos FR25 y FR95 sobre amastigotes intracelulares de <i>L. mexicana</i>.
NFV + FR25
0,5 µM + 2,5 µM 1 µM + 1 µM 0,25 µM + 4,5 µM
NFV + FR95
1,5 µM + 0,5 µM 0,5 µM + 2 µM 0,25 µM + 3 µM

4. RESULTADOS

4.1 Efecto del Nelfinavir y de las quinolinas sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*.

Con la finalidad de evaluar el efecto del NFV sobre la proliferación de los promastigotes de *L. mexicana*, se incubaron los parásitos con diferentes concentraciones del compuesto (3 μM a 50 μM), observándose una inhibición dosis-dependiente de la proliferación celular (Figura 4). El IC_{50} estimado fue de 13,81 μM a las 48 horas (Tabla 3). Es importante destacar que a concentraciones por encima de 25 μM se alcanzó cerca del 90% de la inhibición del crecimiento celular (MIC) (Figura 4, Tabla 3).

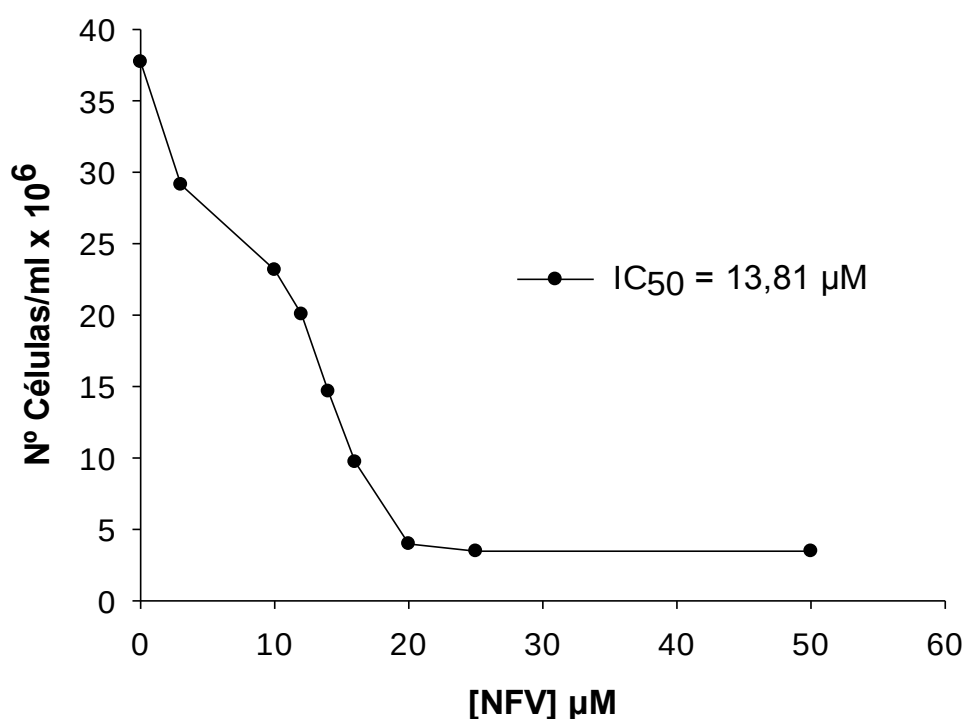
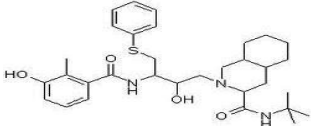
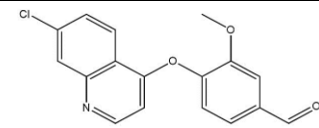
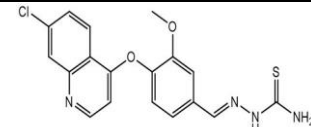


Figura 4. Efecto del NFV sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana* a las 48 horas de incubación.

Al evaluar el efecto de los compuestos FR25 y FR95 sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*, se observó que ambos compuestos fueron capaces de inhibir la proliferación de los promastigotes de manera dosis-dependiente. Los IC₅₀ fueron de 8,93 µM para FR25 y de 16,12 µM para FR95, logrando un 90% de inhibición (MIC) a concentraciones superiores a 25 µM y a 30 µM, respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto antiproliferativo del NFV y los compuestos quinolónicos sobre la proliferación de promastigotes de <i>L. mexicana</i> .			
Estructura	Compuesto	IC ₅₀ (µM)	MIC (µM)
	NFV	13,81	25
	FR25	8,93 ± 0,56	25 ± 0,8
	FR95	16,12 ± 0,75	30 ± 0,7

4.2 Efecto de la combinación del Nelfinavir y de las quinolinas sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*.

Con el fin de evaluar si la eficacia de los fármacos aumenta cuando se usan en conjunto, se determinaron los valores FIC para las distintas combinaciones de drogas establecidas en este trabajo. El valor FIC promedio obtenido de las combinaciones ensayadas de NFV/FR25 fue de 0,77 (menor a 1) (Figura 5), encontrándose un 90% de inhibición de la proliferación *in vitro* de los promastigotes de *L. mexicana* a todas las concentraciones ensayadas. Al construir el isoblograma, se observó una isobola cóncava, característica de una interacción sinérgica entre las drogas.

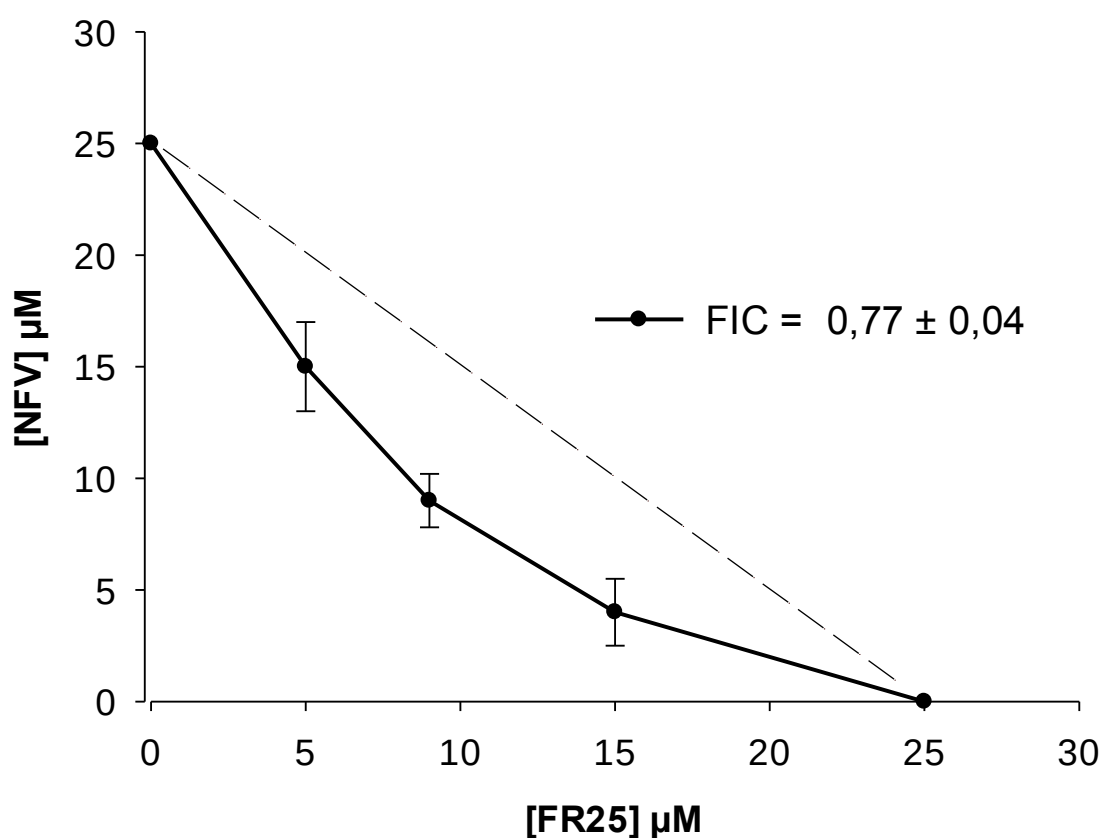


Figura 5. Isoblograma de la combinación de NFV/FR25 sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*. La línea punteada representa un efecto aditivo teórico entre las drogas, mientras que la línea sólida muestra un efecto sinérgico de la combinación de NFV/FR25. Los resultados mostrados corresponden a tres experimentos independientes.

Para la combinación NVF/FR95 también se encontró un valor de FIC menor a 1 cuando las drogas se utilizaron en combinación (FIC = 0,66) (Figura 6). En este caso en particular, se alcanzó un 95% de inhibición en la proliferación *in vitro* de los promastigotes de *L. mexicana* a todas las concentraciones ensayadas. Al construir el isoblograma se observó una isobola cóncava, más pronunciada que la anterior (Figura 5).

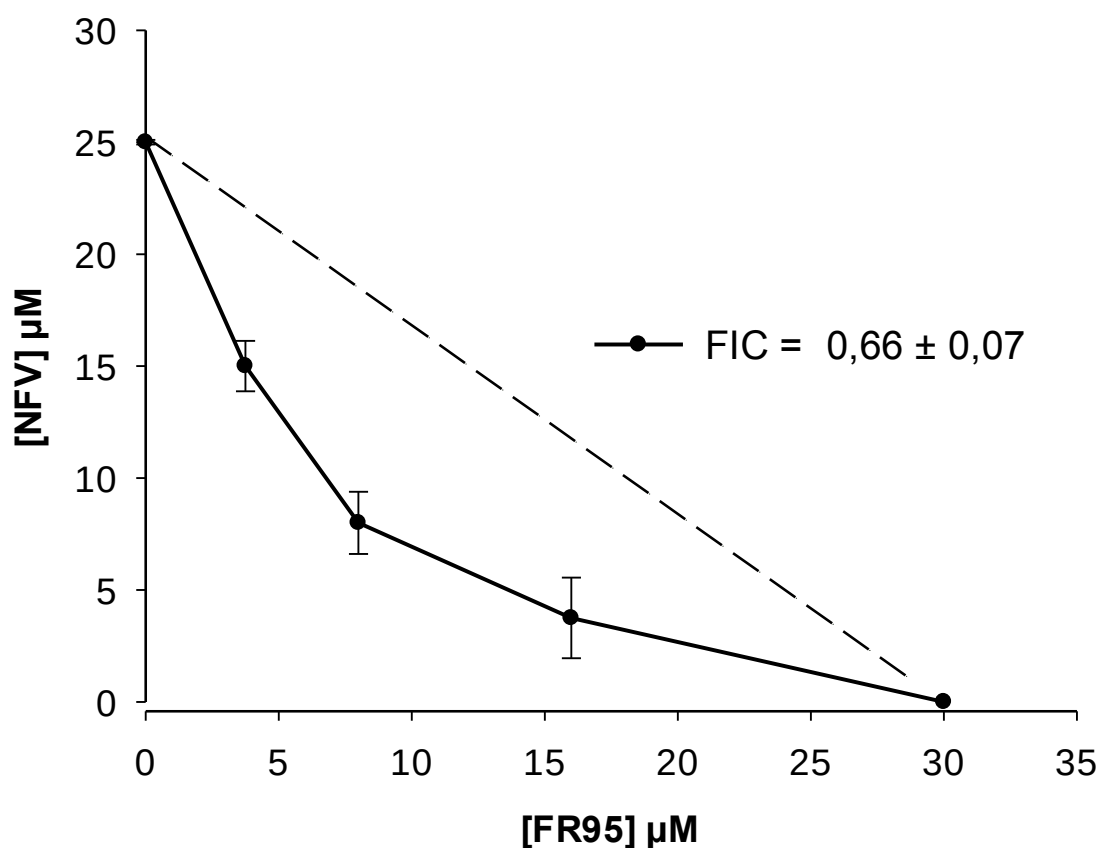


Figura 6. Isoblograma de la combinación de NVF/FR95 sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*. La línea punteada representa un efecto aditivo teórico entre las drogas, mientras que la línea sólida muestra un efecto sinérgico de la combinación de NVF/FR95. Los resultados mostrados corresponden a tres experimentos independientes.

4.3 Efecto del Nelfinavir y de las quinolinas sobre el porcentaje de infección por amastigotes de *L. mexicana*.

Se estudió el efecto del NFV y las quinolinas FR95 sobre amastigotes de *L. mexicana* en macrófagos murinos de la línea celular J774. El NFV y los compuestos quinolínicos fueron capaces de reducir el porcentaje de infección de los macrófagos por amastigotes del parásito y reducir el número de amastigotes por célula (Tabla 4). A medida que aumenta la concentración de las drogas el porcentaje de infección de los macrófagos disminuye considerablemente hasta un 7% para el NFV y 6% para ambos compuestos quinolínicos, en comparación con el control sin tratamiento donde se encontró un 69% de infección (Tabla 4). Los valores de IC_{50} estimados fueron de 0,5 μ M para el NFV y de 2,19 μ M y de 1,15 μ M para FR25 para FR95, respectivamente. Es importante señalar que se alcanza cerca del 90% de inhibición a concentraciones mayores a 10 μ M para el NFV y para ambos compuestos quinolínicos, estableciéndose este valor como el MIC para cada uno de los compuestos.

Tabla 4. Efecto antiproliferativo del NFV y las quinolinas sobre el porcentaje de infección de macrófagos por amastigotes de <i>L. mexicana</i> .						
COMPUESTOS	IC ₅₀ (μM)	MIC (μM)	Concentración (μM)	% Infección ± SD ⁺	Inhibición del % de Infección (%)	Nº amastigotes/célula ± SD ⁺
CONTROL	-	-	-	69 ± 5	-	6 ± 2
NFV	0,5 ± 0,3	10 ± 0,4	0,2	35 ± 3	49	2 ± 1
			0,5	26 ± 2	64	1 ± 0,2
			1	22 ± 1	68	1 ± 0,25
			3	18 ± 2	74	1 ± 0,5
			10	10 ± 1	90	1 ± 0,25
			12,5	8 ± 2	90	1 ± 0,5
			15	7 ± 1	90	1 ± 0,25
FR25	2,19 ± 0,12	10 ± 0,2	1	24 ± 2	65	2 ± 1
			3	17 ± 6	75	1 ± 0,5
			6	15 ± 6	78	1 ± 0,25
			10	10 ± 2	90	1 ± 0,25
			15	6 ± 1	91	1 ± 0,5
FR95	1,15 ± 0,19	10 ± 0,5	1	23 ± 4	67	2 ± 1
			3	15 ± 1	78	2 ± 1
			6	12 ± 2	83	1 ± 0,5
			10	8 ± 1	90	1 ± 0,25
			15	6 ± 1	91	1 ± 0,5

*Los resultados mostrados corresponden a tres experimentos independientes.

4.4 Efecto de la combinación del Nelfinavir y de las quinolinas sobre el porcentaje de infección por amastigotes de *L. mexicana*

El efecto de la combinación de estos compuestos también se evaluó sobre amastigotes intracelulares de *L. mexicana* (Tabla 5, Figura 7). En la Figura 7 observamos que las células tratadas con las diferentes combinaciones de los compuestos, presentaron una disminución significativa del porcentaje de infección, así como una marcada reducción de la cantidad de amastigotes presentes por células (Figura 7 C-H).

El valor FIC obtenido para las combinaciones de NFV/FR25 ensayadas fue de 0,33 (menor a 1) (Figura 8A), alcanzándose porcentajes de inhibición cercanos al 90% (Tabla 5). Adicionalmente, se observó una isobola cóncava, característica de una interacción sinérgica entre las drogas. Para la combinación NFV/FR95 se obtuvo un valor de FIC menor a 1 (FIC = 0,26) y porcentajes de inhibición cercanos al 90% cuando las drogas se utilizaron en combinación sobre los amastigotes intracelulares (Tabla 5; Figura 8B).

Es importante señalar que el valor de FIC obtenido para la combinación de NFV/FR95 es ligeramente menor al obtenido con la combinación de NFV/FR25, al igual que ocurre con el valor de FIC de la combinación de NFV/FR95 sobre los promastigotes (Figura 6). Al construir el isoblograma también se observó una isobola cóncava, un poco más pronunciada que la anterior (Figura 8A).

Tabla 5. Efecto antiproliferativo de la combinación del NFV y las quinolinas sobre el porcentaje de infección de macrófagos por amastigotes de <i>L. mexicana</i>.				
COMPUESTOS	Concentración (µM)	% Infección ± SD ⁺	Inhibición del % de Infección (%)	Nº amastigote/célula ± SD ⁺
CONTROL	-	60 ± 7	-	6 ± 1
NFV/FR25	0,5 µM NFV + 2,5 µM FR25	10 ± 1	83	1 ± 1
	1 µM NFV + 1 µM FR25	9 ± 3	85	2 ± 1
	0,25 µM NFV + 4,5 µM FR25	6 ± 3	90	1 ± 1
NFV/FR95	1,5 µM NFV + 0,5 µM FR95	8 ± 1	97	2 ± 1
	0,5 µM NFV + 2 µM FR95	9 ± 1	85	1 ± 1
	0,25 µM NFV + 3 µM FR95	9 ± 2	85	1 ± 1

*Los resultados mostrados corresponden a tres experimentos independientes.

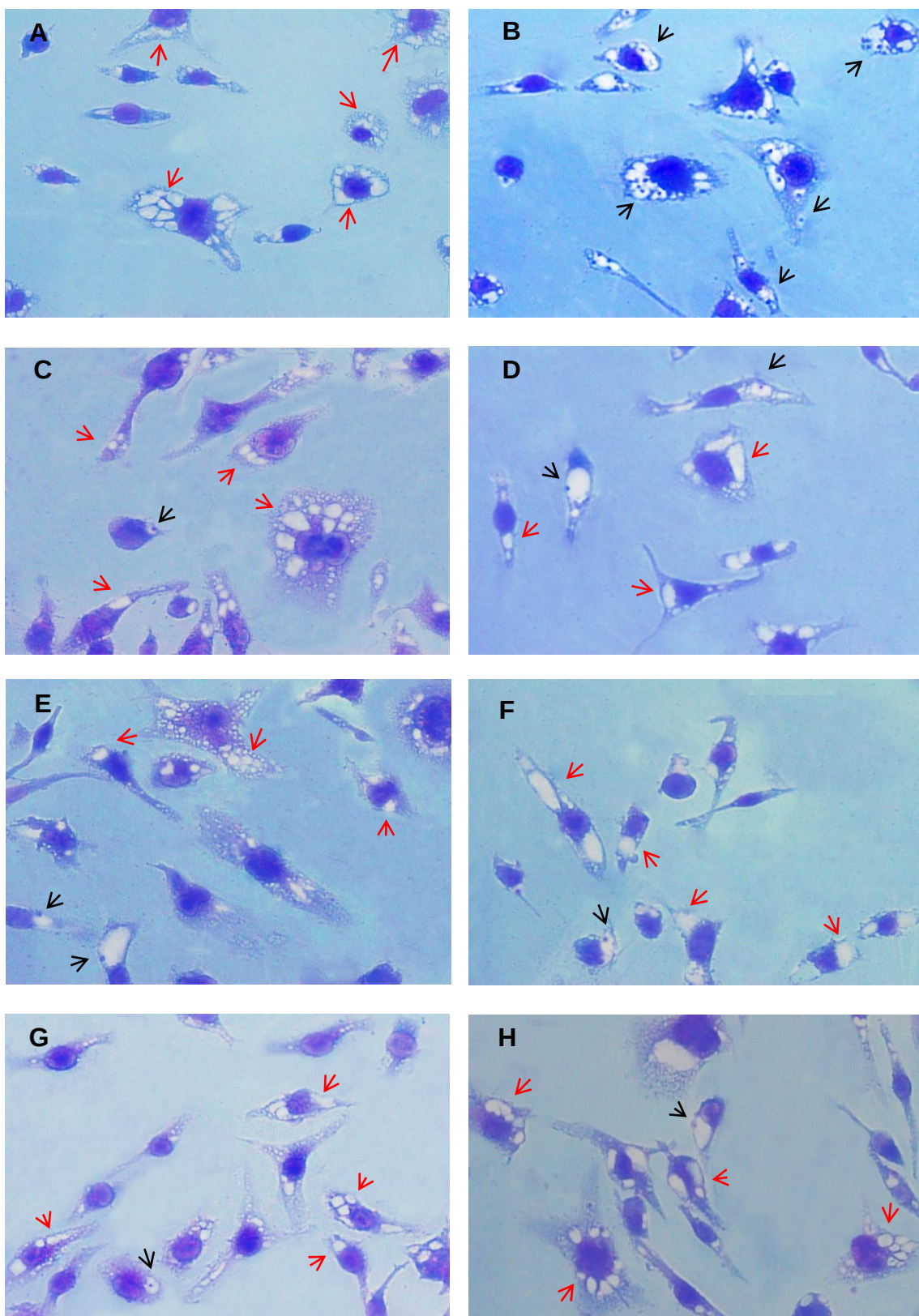


Figura 7. Efecto de la combinación de NFV/FR25 y NFV/FR95 sobre el porcentaje de infección por amastigotes de *L. mexicana*. (A) Control sin infectar; (B) Control infectado; (C) 0,5 μM NFV + 2,5 μM FR25; (E) 1 μM NFV + 1 μM FR25; (G) 0,25 μM NFV + 4,5 μM FR25; (D) 1,5 μM NFV + 0,5 μM FR95; (F) 0,5 μM NFV + 2 μM FR95; (H) 0,25 μM NFV + 3 μM FR95. Las flechas negras indican presencia de amastigotes y las flechas rojas indican vacuolas vacías. (100X)

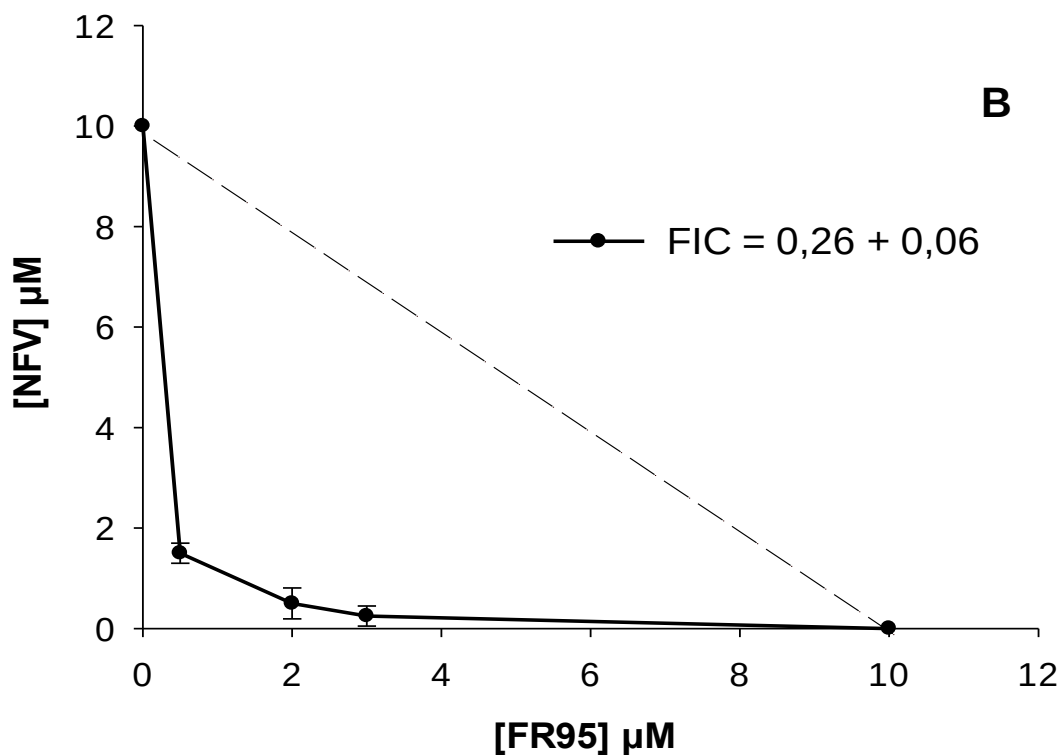
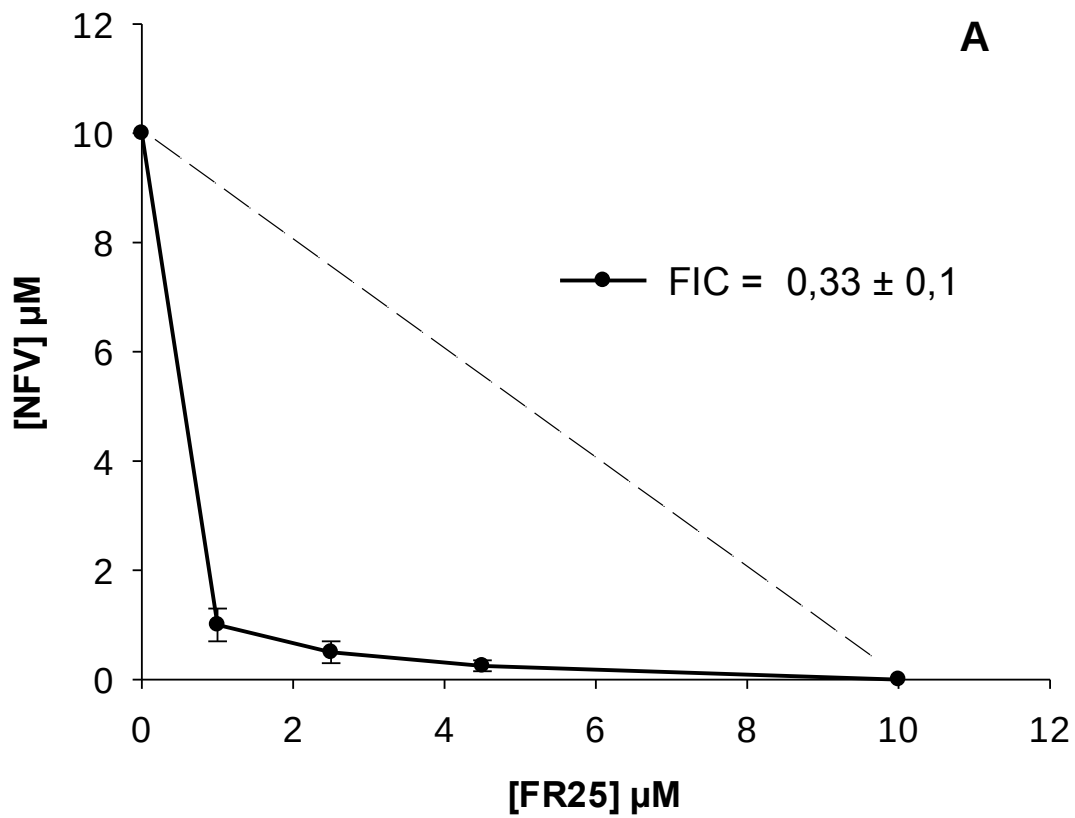


Figura 8. Isoblograma de la combinación de NFV/FR25 (A) y NFV/FR95 (B) sobre el porcentaje de infección por amastigotes de *L. mexicana*. La línea punteada representa un efecto aditivo teórico entre las drogas, mientras que la línea sólida muestra un efecto sinérgico de la combinación de NFV/FR25 (A) y NFV/FR95 (B). Los resultados mostrados corresponden a tres experimentos independientes.

5. DISCUSIÓN

La terapia antirretroviral de alta eficiencia (HAART) utilizada en pacientes VIH-positivos, se encuentra conformada principalmente por inhibidores de la aspartil-proteasa del VIH como el NFV. Estos fármacos producen una disminución de la carga viral del paciente y una recuperación del sistema inmunológico, que se caracteriza por un aumento en el número de linfocitos TCD4⁺ y la subsecuente disminución de las infecciones oportunistas (Olivier y col., 2003). Adicionalmente, numerosos estudios han demostrado que estos inhibidores además, de mejorar la situación inmunológica de los pacientes, tienen un efecto inhibitorio directo sobre los patógenos causantes de las principales infecciones oportunistas, incluyendo las causadas por parásitos protozoarios (Andrews y col., 2006; Jarvis y Lockwood, 2013).

En los últimos años, se ha estudiado a profundidad el efecto que tienen los inhibidores de la proteasa del VIH sobre diferentes especies de *Leishmania*, encontrando que estos fármacos tienen una inhibición dosis-dependiente en el crecimiento *in vitro* de promastigotes y amastigotes axénicos, así como una disminución en el porcentaje de infección de macrófagos. Cambios ultraestructurales y morfológicos en el parásito también han sido asociados a la presencia de estas drogas en los cultivos de promastigotes (Savoia y col., 2005; Santos y col., 2009; Trudel, y col., 2008; Valdivieso y col., 2010; Van Griensven y col., 2013).

Actualmente, se sabe que uno de los mecanismos mediante el cual los inhibidores de la proteasa del VIH ejercen su acción antiparasitaria es a través de la inhibición de la actividad enzimática de la proteína Ddi1-like de *Leishmania* (proteína homóloga a la proteína inducible al daño del DNA en *S. cerevisiae*) involucrada en el control del ciclo celular, lo que trae como consecuencia un efecto directo sobre el crecimiento del parásito. La proteína Ddi1 en levaduras impide la transición metafase-anafase del ciclo celular impidiendo la separación de las cromátidas hermanas.

Tomando en cuenta que los antirretrovirales son fármacos de los cuales se conocen sus propiedades químicas, su farmacocinética, eficacia y tolerabilidad en el organismo, estos podrían ser utilizados como tratamiento alternativo contra esta parasitosis, particularmente en pacientes coinfectados con *Leishmania*/VIH, donde la quimioterapia tradicional contra este parásito es poco efectiva (Van Griensven y col., 2013).

De todos los IP's del VIH estudiados, el NFV resultó ser el más eficaz en inhibir la proliferación de promastigotes y amastigotes de diferentes especies de *Leishmania*, incluyendo especies que causan manifestaciones viscerales de la enfermedad (Savoia y col., 2005; Santos y col., 2009; Trudel, y col., 2008; Valdivieso y col., 2010). De igual forma, varios grupos de investigación reportan alteraciones morfológicas del parásito al ser incubados con este fármaco, logrando observar células binucleadas y multinucleadas, sugiriendo una posible inhibición del ciclo celular (Valdivieso y col., 2010). Al estudiar la selectividad de los IP's del VIH sobre la actividad enzimática de la Ddi1-like de *Leishmania* mediante estudios de docking molecular, el NFV fue el antirretroviral que presentó una menor energía de unión, es decir, una mayor selectividad hacia la Ddi1 parasitaria (Perteguer y col., 2012; Serrano y col., 2012).

Sin embargo, las concentraciones efectivas del NFV en el plasma sanguíneo, se encuentra en el rango nanomolar (IC_{50} de 14 nM sobre el VIH) (Andrews y col., 2006), tres órdenes de magnitud menor a la reportada sobre *Leishmania*. Los efectos antiproliferativos de este antirretroviral en *Leishmania* han sido establecidos en el rango micromolar, tanto en el presente estudio (13,81 μ M sobre promastigotes y 0,5 μ M sobre amastigotes) como en trabajos previos (Valdivieso y col., 2010), lo que hace necesario la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas que mejoren el efecto inhibitorio del fármaco sobre la proliferación de este parásito.

En este sentido, el uso de terapias combinadas, utilizando drogas de diferente estructura química y con diferentes blancos de acción, puede ser una estrategia novedosa para aumentar la eficacia terapéutica, lo que se conoce como sinergismo. El

efecto sinérgico de la combinación de fármacos produce un efecto total mayor al efecto de cada droga por separado, logrando de esta manera, potenciar el efecto terapéutico, minimizar el desarrollo de resistencia, disminuir las dosis requeridas y el período de tratamiento y con ello reducir los efectos secundarios (Alvar y col., 2008). Por tal motivo, en el presente trabajo se estudió el efecto de la combinación del NFV con otras drogas capaces de inhibir igualmente el crecimiento del parásito. Para tal efecto, se han escogido dos compuestos quinolínicos de la serie 7-cloroquinolina-4-oxifenil sustituidas derivados de metabolitos secundarios de la planta *Eugenia caryophyllus*, FR25 ($C_{17}H_{12}ClNO_3$) y FR95 ($C_{18}H_{15}ClN_4O_2S$). Estos compuestos mostraron, en el presente estudio, una actividad antiproliferativa en el rango micromolar contra promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* (Tabla 3 y Tabla 4).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que las combinaciones NFV/FR25 y NFV/FR95 son sinérgicas, ya que lograron inhibir la proliferación de promastigotes y amastigotes de *L. mexicana* a una concentración menor que aquellas reportadas cuando los compuestos se utilizan de manera individual (Tabla 3 y Tabla 4). Los valores FIC obtenidos sobre los promastigotes fueron menores a 1 (FIC de 0,77 para NFV/FR25 y de 0,66 para NFV/FR95), clasificando las combinaciones como sinergismo moderado (Figura 5 y Figura 6) (Hallander y col., 1982). Asimismo, se alcanzaron porcentajes de inhibición del 90% con todas las combinaciones ensayadas.

La combinación de estos compuestos mostró ser más eficaz y selectiva sobre los amastigotes intracelulares de *L. mexicana*, con valores de FIC de 0,33 para NFV/FR25 y de 0,26 para NFV/FR95 (menores a 0,5), clasificándolas como un sinergismo fuerte (Figura 8) (Hallander y col., 1982). De igual forma, en estos ensayos se obtuvo un efecto inhibitorio sobre el porcentaje de infección de macrófagos por el parásito superior al 90% y una marcada reducción del número de amastigotes por célula (Tabla 5).

El valor FIC obtenido para la combinación de NFV/FR95 es ligeramente menor al obtenido para la combinación con FR25, para ambos morfotipos, lo que pareciera indicar que la combinación con FR95 es más eficaz y selectiva sobre este parásito.

Adicionalmente, es interesante resaltar que la forma amastigote del parásito resultó ser más sensible que la forma promastigote, logrando evidenciar una mayor susceptibilidad del estadio amastigote frente a estas drogas. Este resultado es de gran relevancia fisiológica debido a que el amastigote es el morfotipo que afecta al hospedador vertebrado. Algunos investigadores sugieren que la diferencia de susceptibilidad de compuestos entre los dos morfotipos, puede deberse a posibles modificaciones bioquímicas que ocurren en la superficie del parásito durante el proceso de transformación, logrando exponer blancos de acción de la droga en la forma amastigote en comparación con la forma promastigote. Estas diferencias de susceptibilidad también ha sido observada en algunos fármacos utilizados comúnmente contra la leishmaniasis (Benaim y col., 2006; Corral y col., 2012; 2014).

Existen numerosos estudios que demuestran el efecto sinérgico de algunas combinaciones realizadas entre los fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis (Chunge y col., 1990; Seifert y Croft, 2006; Seifert y col., 2011) así como entre otros compuestos capaces de inhibir la proliferación del parásito (Corral y col., 2014; Mesquita y col., 2013; 2014; Serrano-Martín y col., 2009a; 2009b; Trinconi y col., 2014). Sin embargo, hasta lo momentos no se ha evaluado el efecto antiproliferativo de la combinación de los IP's del VIH con otras drogas en *Leishmania*, siendo este trabajo pionero en el área. No obstante, se han estudiado combinaciones de estos inhibidores con diferentes drogas sobre otros agentes patógenos como *Cryptosporidium sp.* y *Plasmodium sp.*

En *Cryptosporidium parvum*, Hommer y col. (2003) evaluaron el efecto de la combinación de los IP's del VIH amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir y saquinavir en combinación con la paromomicina. Este grupo de investigación encontró un mayor efecto antiproliferativo de los inhibidores cuando se utiliza en combinación. De todas

las combinaciones estudiadas, los autores reportan que la combinación de paromomicina con nelfinavir y ritonavir fueron las más eficaces. Adicionalmente, observaron resultados similares al estudiar estas combinaciones sobre el proceso de invasión *in vitro*.

Trabajos realizados por Skinner-Adams y col. (2007), encontraron un incremento del efecto antiparasitario *in vitro* de la cloroquina y la mefloquina sobre *Plasmodium falciparum*, cuando se utilizan en combinación con saquinavir y ritonavir, dos inhibidores de la proteasa del VIH. La cloroquina es una 4-aminoquinolina que actúa interfiriendo con la biosíntesis de ácidos nucleicos del parásito mientras que, la mefloquina, una 4-metanolquinolina, se cree que interfiere con la capacidad del parásito en metabolizar la hemoglobina. Este grupo de investigación reporta que al combinar estos fármacos con saquinavir y ritonavir se observa un efecto sinérgico, logrando aumentar el efecto antimalárico de la cloroquina y la mefloquina, fármacos comúnmente utilizados contra la malaria, incluso en cepas resistentes, siendo más eficaz la combinación con ritonavir en ambos casos. De esta manera, se logra evidenciar por primera vez que la combinación de compuestos quinolínicos, como la 4-aminoquinolina y la 4-metanolquinolina, con los inhibidores de la proteasa del VIH, como el NFV, tienen un efecto sinérgico sobre este parásito, logrando aumentar el efecto terapéutico deseado.

En farmacología, el sinergismo se da entre dos fármacos que tienen diferentes mecanismos de acción, es decir, diferentes blancos bioquímicos, favoreciéndose este efecto cuando dichas drogas afectan una misma ruta (Romand y col., 1996; Pérez-Acuña, 2008; Wagg y col., 2010). Así, podría explicarse el por qué algunas combinaciones de drogas se ven más favorecidas que otras. Si bien no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de los inhibidores de la proteasa del VIH sobre *C. parvum* y *P. falciparum*, los autores sugieren un mecanismo de acción distinto a la otras drogas utilizadas en combinación, haciendo posible encontrar un efecto sinérgico al utilizarlos en conjunto (Hommer y col., 2003; Skinner-Adams y col., 2007).

En *Leishmania sp.*, además de la inhibición de la Ddi1 del parásito (White y col., 2011; Perteguer y col., 2012), Kumar y col. (2010) demostraron que el NFV genera estrés oxidativo en amastigotes de *L. donovani*, observando un aumento en el contenido de ADN, la fragmentación del ADN nuclear y la pérdida del potencial mitocondrial, todas las características de la apoptosis. Sin embargo, el tratamiento de los amastigotes axénicos con inhibidores de las caspasas no inhibió el aumento en el contenido de ADN fragmentado en los parásitos tratados con NFV, lo que sugiere por lo tanto que este antirretroviral elimina el parásito de una manera independiente de caspasas. Adicionalmente, los autores observaron la despolarización de la membrana mitocondrial lo que conduce a la liberación de la endonucleasa G quien se encarga de la fragmentación del ADN. Estos hallazgos proporcionan una visión de los mecanismos de muerte celular inducidos por NFV en el *L. donovani*.

Si bien no se conoce el blanco de acción de los compuestos quinolónicos utilizados en este trabajo, estudios preliminares del posible efecto de estos compuestos sobre el potencial electroquímico mitocondrial y los acidocalcisomas, organelos fundamentales vinculados a la bioenergética del parásito, y por lo tanto, en la viabilidad celular (Vercesi y Docampo, 1992; Roberts y col., 2003), han sido realizados en este trabajo de investigación. Los resultados obtenidos muestran que estos compuestos producen una disipación del potencial electroquímico mitocondrial y una rápida alcalinización de los acidocalcisomas, cuando los parásitos fueron expuestos a concentraciones cercanas a los IC₅₀ de los compuestos quinolónicos (9 µM para FR25 y 16 µM para FR95).

De esta manera, se podría explicar el efecto sinérgico observado sobre la proliferación de *L. mexicana* con la combinación del NFV y los compuestos quinolónicos. Estas combinaciones podrían estar potenciando el efecto antiproliferativo del NFV y disminuyendo las dosis del antirretroviral sobre el parásito.

Si bien nuestras observaciones indican que la aplicación de este esquema terapéutico ha dado resultados prometedores sobre *Leishmania*, es necesario profundizar en el estudio de éstas. En tal sentido, se piensa evaluar el efecto de la combinación del NFV y los compuestos quinolínicos en animales experimentales, con el fin de determinar la posible utilidad de la combinación de estos fármacos en el tratamiento de esta parasitosis. Por último, sería idóneo estudiar las combinaciones de los IP's del VIH con los fármacos comúnmente utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis, con el propósito de establecer una terapia más eficaz en casos de coinfección *Leishmania*/VIH.

6. CONCLUSIONES

Las combinaciones del NFV con los compuestos quinolínicos, FR25 y FR95, resultaron ser sinérgicas, alcanzando una inhibición significativa de la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*. De igual forma, se observó una marcada disminución del porcentaje de infección de macrófagos y del número de amastigotes presentes en las vacuolas lisosomales en el rango nanomolar. De esta manera, se logró potenciar el efecto leishmanicida del NFV y disminuir las dosis necesarias del fármaco cuando se utiliza en combinación con los compuestos quinolínicos.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Alfonso, Y., Monzote, L. 2011. HIV Protease Inhibitors: Effect on the opportunistic protozoan parasites. *Journal Open Medicinal Chemistry*. **5**: 40-50.
2. Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den Boer, M., Cañavate, C., Dedet, J.P., Gradoni, L., Ter-Host, R., López-Veléz, R., Moreno, J. 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Journal of Clinical Microbiology*. **21**: 334–359.
3. Alvar, J., Cañavate, C., Gutiérrez-Solar, B., Jiménez, M., Laguna, F., López-Veléz, R., Molina, R., Moreno, J. 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the First 10 Years. *Journal of Clinical Microbiology*. **10**: 298–310.
4. Alvar, J., Velez, I.D., Bern, C. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One*. **7**: 356-371.
5. Andrews, K.T., Fairlie, D.P., Madala, P.K., Ray, J., Wyatt, D.M., Hilton, P.M., Melville, L.A., Beattie, L., Gardiner, D.L., Reid, R.D., Stoermer, M.J., Skinner-Adams, T., Berry, C., McCarthy, J.S. 2006. Potencies of human immunodeficiency virus protease inhibitors *in vitro* against *Plasmodium falciparum* and *in vivo* against murine malaria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **50**: 634-648.
6. Benaim, G., Sanders, García-Marchán, C., Colina, L.A., Caldera A., Payares, G., Sanoja, C., Burgos, J., León-Rossell, A., Concepción, J., Schijman, A., Levin, M., Oldfield, E., Urbina, J. 2006. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *Open Medicinal Chemistry*. **49**: 892–899.
7. Bompart, D., Kouznetsov, V., Núñez-Durán, J., Rodríguez, D., Meléndez Gómez, C.M., Sojo, F., Arvelo, F., Visbal, G., Álvarez, A., Serrano-Martín, X., García-Marchán, Y. 2013. Anti-leishmanial evaluation of C2-aryl quinolines: mechanistic insight on bioenergetics and sterol biosynthetic pathway of *Leishmania braziliensis*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **15**: 4426-4431.

8. Bonfante-Garrido, R., Barroeta, S. 2002. Leishmaniasis y *Leishmania* en América, con especial referencia a Venezuela. 1era Edición. Barquisimeto, Edo. Lara, Venezuela.
9. Carvalho, L., Luque-Ortega, J., López-Martín, C., Castanys, S., Rivas, L., Gamarro, F. 2011. The 8-aminoquinolines analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **42**: 4204-4210.
10. Chunge, C. N., Owate, J., Pamba, H. O., Donno, L. 1990. Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. **84**: 221-225.
11. Convit, J., Pinardi, M.E. 1974. Cutaneous leishmaniasis. The clinical and immunological spectrum in South America. In: Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas's disease. *Ciba Foundation Symposium Amsterdam, Elsevier, Excerpt Medical*. **20**: 159-169.
12. Corral, M.J., González-Sánchez, E., Cuquerella, M., Alunda, J.M. 2014. *In vitro* synergistic effect of amphotericin B and allicin on *Leishmania donovani* and *L. infantum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **58**:1596-1602.
13. Corral, M.J., Moreno, I., Toraño, A., Domínguez, M., Alunda, J.M. 2012. Effect of allicin on promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*. *Experimental Parasitology*. **132**: 475-482.
14. Cruz, I., Nieto, J., Moreno, J. 2006. *Leishmania*/HIV coinfections in the second decade. *Indian Journal of Medical Research*. **123**: 357–88.
15. Cunningham, A. 2002. Parasitic adaptive mechanism in infection by *Leishmania*. *Experimental and Molecular Pathology*. **72**: 132-141.
16. De Clercq, E. 2009. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **33**: 307-20.

17. Delgado, A., Minguillón, C., Joglar, J. 2003. Introducción a la Química Terapéutica. Segunda Edición. Editorial Díaz de Santos. España, Madrid.
18. Dorey, G., Lockhart, B., Lestage, P., Casara, P. 2002. New quinolinic derivatives as centrally active antioxidants. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **10**: 935-939.
19. Fonseca-Berzal, C., Merchán, D., Romero-Bohórquez, A., Escario, J., Kouznetsov, V., Gómez-Barrio, A. 2013. Selective activity of 2,4-diaryl-1,2,3,4-tetrahydroquinolines on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes and amastigotes expressing β -galactosidase. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. **23**: 4851-4856.
20. Guerin, P.J., Olliaro, P., Sundar, S. 2002. Visceral leishmaniasis: status of control, diagnosis and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infectious Diseases*. **2**: 494-501.
21. Hallander, H. O., K. Dornbusch, L. Gezelius, K. Jacobson, and I. Karlsson. 1982. Synergism between aminoglycosides and cephalosporins with antipseudomonal activity: interaction index and killing curve method. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **22**: 743–752.
22. Hommer, V., Eichholz, J., Petry, F. 2003. Effect of antiretroviral protease inhibitors alone, and in combination with paromomycin, on the excystation, invasion and in vitro development of *Cryptosporidium parvum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **52**: 359–364.
23. Jacquemond-Collet, I., Benoit-Vical, F., Mustofa, V., Stanislas, E., Mallié, M., Fourasté, I. 2002. Antiplasmodial and cytotoxic activity of galipinine and other tetrahydroquinolines from *Galipea officinalis*. *Planta Medica*. **68**: 68-69.
24. Jarvis, J.N., Lockwood, D.N. 2013. Clinical aspects of visceral leishmaniasis in HIV infection. *Current Opinion in Infectious Diseases*. **26**: 1–9.

25. Kouznetsov, V., Meléndez, C. 2009. Búsqueda de nuevos agentes antiprotozoarios selectivos. *MedUNAB*. **12**: 33-45.
26. Kouznetsov, V., Vergas, L.Y., Leal, S.M., Mora, U., Coronado, C.A., Meléndez, C.M., Romero, A.R. 2007. Target-oriented synthesis of antiparasitic heteraryl substituted quinolines based on imino diels-alder reactions. *Letters in Drug Design and Discovery*. **4**: 293-296.
27. Kumar, P., Lodge, R., Trudel, N., Ouellet, M., Tremblay, M.J. 2010. Nelfinavir, an HIV-1 protease inhibitor, induces oxidative stress-mediated caspase-independent apoptosis in *Leishmania* amastigote. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. **4**: 42-50.
28. López-Vélez, R. 2003. The impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on visceral leishmaniasis in spanish patients who are co-infected with HIV. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. **97**: S143-S147.
29. McClure, D.C., Noland, L.L., Zatycka, S.A. 1996. Antileishmanial properties of *Allium sativum* extracts and derivatives. *Acta Horticulturae*. **426**: 183-191.
30. Mesquita, J.T., Pinto, E.G., Taniwaki, N.N., Galisteo Jr., Tempone, A.J. 2013. Lethal action of nitrothiazolyl-salicylamide derivative nitazoxanide via induction of oxidative stress in *Leishmania infantum*. *Acta tropical*. **122**:89-94.
31. Mesquita, J.T., Tempone, A., Tempone, J., Reimao, Q. 2014. Combination Therapy with nitazonadine and amphotericin B, glucantime, miltefosine and sitamaquine against *Leishmania* infantum intracellular amastigotes. *Acta Tropica*. **130**: 112-116.
32. Molyneux, D.H. 1987. Morphology, ultrastructure and life cycle. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. London: Academic Press. **42**: 121-176.
33. Olivier, M., Badaro, R., Medrano, F.J., Moreno, J. 2003. The pathogenesis of *Leishmania*/HIV co-infection: cellular and immunological mechanisms. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. **97**: S79-S98.
34. Olliaro, P.L., Taylor, W. 2003. Antimalarial compounds: from bench to bedside. *Journal of Experimental Biology*. **206**: 3753-3759.

35. Oullette, M., Orummelsmith, J., Papadopoulou, B. 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates*. **7**: 257-266.
36. Paris, C., Loiseau, P.M., Bories, C., Breard, J. 2004. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **48**: 852-859.
37. Pérez-Acuña, F. 2008. Interacciones de drogas anti-hipertensivas. *Revista Latinoamericana de Hipertensión*. **3**: 1856-1865.
38. Perteguer, M.J., Gómez-Puertas, P., Cañavate, C., Dagger, F., Gárate, T. y Valdivieso, E. 2012. Ddi1-like protein from *Leishmania major* is an active aspartyl proteinase. *Cell Stress and Chaperones*. **18**: 171-181.
39. Ramos, H., Saint-Pierre-Chazalet, M., Bolard, J., Cohen, B.E. 1996. Effect of ketoconazole on lethal action of amphotericin B on *Leishmania mexicana* promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **38**: 1079-1084.
40. Roberts, C., McLeod, R., Rice, D., Ginger, M., Chance, M., Goad, L. 2003. Fatty acid and sterol metabolism: potential antimicrobial targets in apicomplexan and trypanosomatid parasitic protozoa. *Molecular and Biochemical Parasitology*. **33**: 129-142.
41. Rocha, L.G., Almeida, J.R., Macedo, R.O., Barbosa-Filho, J.M. 2005. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomed*. **12**: 514-535.
42. Romand, S., Della-Bruna, C., Farinotti, R., Derouin, F. 1996. In vitro and in vivo effects of rifabutin alone or combined with atovaquone against *Toxoplasma gondii*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. **40**: 2015-2020.
43. Rondón, A. J. 1993. Leishmaniasis tegumentary american. *Clinics in Dermatology*. **31**: 12-17.
44. Santos, L.O., Marinho, F.A. Altoe E.F. Vitorio, B.S. Alves C.R., Britto, C., Motta, M.C. Branquinha, M.H., Santos, A.L. d'Avila-Levy, C.M. 2009. HIV aspartyl

- peptidase inhibitors interfere with celular proliferation, ultrastructure and macrophage infection of *Leishmania amazonensis*. *PLoS One*. **4**: 4918-4923.
45. Savoia, D., Alice, T., Tovo, P.A. 2005. Antileishmanial activity of HIV peptidase inhibitors. *International Journal of Antimicrobial Agents*. **26**: 92–94.
 46. Seifert, K., Croft, S.L. 2006. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **50**: 73-79
 47. Seifert, K., Munday, J., Syeda, T., Croft, S. 2011. *In vitro* interactions between sitamaquine and amphotericin B, sodium stibogluconate, miltefosine, paromomycin and pentamidine against *Leishmania donovani*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **66**: 850–885.
 48. Serrano, M., Martín, V., Perteguer, M.J., Dagger, F., Gárate, T., Valdivieso, E. 2012. Análisis Docking de la inhibición dual de las aspartil-proteinasas del VIH-1 y de *Leishmania major* por antirretrovirales. *Boletín de la Sociedad Química de México*. **6**: 143-147.
 49. Serrano-Martín, X., García-Marchán, Y., Fernández, A., Rodríguez, N., Rojas, H., Visbal, G., Benaim, G. 2009a. Amiodarone destabilizes intracellular Ca^{+2} homeostasis and biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **53**: 1403–1410.
 50. Serrano-Martín, X., Payares, G., De Lucca, M., Martínez, J.C., Mendoza-León, A., Benaim, G. 2009b. Amiodarone and miltefosine act synergistically against *Leishmania mexicana* and can induce parasitological cure in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **53**: 5108–5111.
 51. Skinner-Adams, T.S., Andrews, K.T., Melville, L., McCarthy, J., Gardiner, D.L. 2007. Synergistic interactions of the antiretroviral protease inhibitors saquinavir and ritonavir with cloroquine and mefloquine against *Plasmodium Falciparum in vitro*. *Antrimicrobial Agents and Chemotherapy*. **51**: 759-762.

52. Sundar, S., Jha, T.K., Thakur, C.P. 2007. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. *The New England Journal of Medicine*: **356**: 2571-2581.
53. Tempone, A.G., Da Silda, A.C., Brandt, C.A., Martínez, F.S. Borborema, S.E., Da Silveira, M.A. De Andrade, H.F. 2005. Synthesis and antileishmanial activities of novel 3-substituted quinolines. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **49**: 1076-1080.
54. Trinconi, C., Reimao, J.Q., Yokoyama-Yasunaka, J.K.U., Miguel, D., Uliana, S. 2014. Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **58**: 2608-2613.
55. Trudel, N., Garg, R., Messier, N. 2008. Intracellular survival of *Leishmania* species that cause visceral leishmaniasis is significantly reduced by HIV-1 peptidase inhibitors. *Clinical Infectious Diseases*. **198**: 1292–1299.
56. Valdivieso, E., Dagger, F., Rascón, A. 2007. *Leishmania mexicana*: identification and characterization of an aspartil proteinase activity. *Experimental Parasitology*. **116**: 77-82.
57. Valdivieso, E., Rangel, A., Moreno, J., Saugar, J.M., Cañavate, C., Alvar, J., Dagger, F. 2010. Effects of HIV aspartil-proteinase inhibitors on *Leishmania* sp. *Experimental Parasitology*. **126**:557-563.
58. Van Griensven, J., Diro, E. 2012. Visceral leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases*. **26**: 309-322.
59. Van Griensven, J., Diro, E., López-Veléz, R., Boelaert, M., Lynen, L., Zijlstra, E., Dujardin, J.C., Hailu, A. 2013. HIV-1 protease inhibitors for treatment of visceral leishmaniasis in HIV-coinfected individuals. *Lancet Infectious Diseases*. **13**: 251-259.
60. Vercesi, A.E., Docampo, R. 1992. Ca^{+2} transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*: effects of Ca^{+2} , pentamine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential *in situ*. *Biochemical Journal*. **284**: 463-467.

61. Wagg, T., Gelhaus, C., Rath, J., Stich, A., Leippe, M., Schirmeister, T. 2010. Allicin and derivatives are cysteine protease inhibitors with antiparasitic activity. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*. **20**: 5541-5543.
62. White, R.E., Powel, I., Berry, C. 2011. HIV proteinase inhibitors target the Ddi1-like protein of *Leishmania* parasites. *FASEB Journal*. **25**: 1729–1736.
63. Wilson, W.D., Tanious, F.A., Mathis, A., Tevis, D., Hall, J.E., Boykin, D.W. 2008. Antiparasitic compounds that target DNA. *Biochimical and Biophysical Acta*. **90**: 999-1014.
64. World Health Organization. 2010. Control of the Leishmaniases. In: WHO Technical Report Series 949: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of leishmaniases. Geneva, Switzerland.