



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO EN BIOLOGÍA CELULAR

**Combinación del nelfinavir con fármacos
leishmanicidas: alternativa quimioterapéutica para la
coinfección *Leishmania*/VIH**

TRABAJO DE GRADO DE MAESTRÍA

Presentado ante la ilustre

Universidad Central de Venezuela

Por la *Lic. Fabiola A. Mejías Borjas*

Como requisito parcial para optar al título

De MSc. en Biología Celular

Tutor: Dra. Elizabeth Valdivieso

Caracas, Venezuela

Junio 2018



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

ACTA DE DEFENSA DE TRABAJO DE
GRADO

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Ciencias y el Consejo de Estudios de Postgrado de la Universidad Central de Venezuela, para examinar el Trabajo de Grado presentada por: Fabiola Alexandra Mejías Borjas portadora de la cédula de identidad N° 21.345.663, bajo el título, **“Combinación Del Nelfinavir Con Fármacos Leishmanicidas: Alternativa Quimioterapéutica Para La Coinfección Leishmania/VIH”**. A fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **Magister Scientiarum en Ciencias Mención Biología Celular**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 29 de Junio de 2018 a las 10:00 am, para que la Lic. Fabiola Mejías lo defendiera en forma pública, la cual se efectuó en la Sala de Conferencia del Centro de Computación de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, mediante un resumen oral de su contenido, con la participación por video conferencia de la tutora; Luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **APROBARLA**, por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por la Lic. Fabiola Mejías, que dicho trabajo se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado representa una alternativa eficiente para el tratamiento de pacientes co-infectados con VL/SIDA. Estos estudios coinciden con dos importantes hitos de la terapéutica actual, el reposicionamiento de medicamentos y la combinación de drogas.



3.- El jurado por unanimidad decidió otorgar la calificación de EXCELENTE al presente trabajo por considerarlo de excepcional calidad dado que los resultados han sido publicados recientemente en una revista internacional de alto impacto en el área (*International Journal of Antimicrobial Agents*).

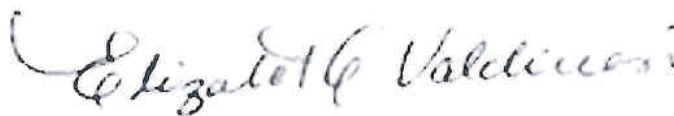
En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 29 días del mes de junio del año 2018. Conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuaron como miembros del jurado. Dr. Gustavo Benaim (IBE, UCV); Dr. Héctor Rangel (IVIC); Dra. Elizabeth Valdivieso (Tutor).



Dr. Gustavo Benaim (IBE, UCV).
C.I. 3.658.620
Universidad Central de Venezuela
Jurado designado por el Consejo
de la Facultad de Ciencias



Dr. Héctor Rangel (IVIC).
C.I. 9.418.210
Universidad Central de Venezuela
Jurado designado por el Consejo
de la Facultad de Ciencias



Dra. Elizabeth Valdivieso,
C.I. 9.881.834
Universidad Central de Venezuela
Tutor



RESÚMEN

En la actualidad, se han reportado casos de coinfección por *Leishmania* y por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) en al menos 35 países del mundo, donde la leishmaniasis visceral es la forma clínica más común en estos pacientes. No existe un tratamiento específico para la coinfección por *Leishmania*/VIH; y según datos reportados por la Organización Mundial (OMS), al menos el 75% de los pacientes coinfectados con *Leishmania*/VIH, los cuales son tratados con los fármacos recomendados, sufren recaídas de la enfermedad, generando un cuadro clínico más severo y cepas más virulentas. Tomando en cuenta la falta de un tratamiento específico y las altas tasas de recaídas, surge la necesidad de implementar nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la coinfección *Leishmania*/VIH. Por esta razón, en el siguiente trabajo se planteó estudiar la potenciación del Nelfinavir (NFV), un antirretroviral usando contra el VIH y el cual se le ha demostrado un significativo efecto anti-*Leishmania*, al combinarlo con dos fármacos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis visceral como lo son la Anfotericina B (AMB) y la Miltefosina (MTF). En primer lugar, se evaluó *in vitro* el efecto de las combinaciones NFV+AMB y NFV+MTF sobre promastigotes y amastigotes de *L. donovani*, encontrando un efecto sinérgico en ambos casos, con un índice de concentración inhibitoria fraccional (Σ FIC) menor a 0,5. Estas combinaciones también fueron evaluadas sobre amastigotes intracelulares de *L. infantum*; observándose también una potenciación de las drogas al emplearlas en combinación (Σ FIC<0,5). Por último, también se examinó el efecto del NFV sobre la leishmaniasis visceral inducida por *L. infantum* en ratones BALB/c. Los resultados demuestran que el NFV tiene un efecto leishmanicida cuando se administra en monoterapia (reduce en aproximadamente un 60% la carga parasitaria); y además se observó una reducción significativa en la carga parasitaria por la combinación de NFV+MTF (89% de reducción de la carga parasitaria), en comparación con la obtenida cuando estos fármacos se usaron de manera individual. 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 aumentar el efecto del antirretroviral sobre *Leishmania*.

Palabras Claves: Coinfección, *Leishmania*/VIH, Leishmaniasis, Sinergismo, Combinaciones.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elizabeth Valdivieso por abrirme una vez más las puertas del Laboratorio de Biología Celular de Parásitos y brindarme la oportunidad de poder realizar mi tesis de maestría bajo su tutela. Estoy y estaré infinitamente agradecida por su disposición, por su tiempo, por su paciencia e insistencia en hacer de este trabajo lo mejor posible y de siempre contribuir con mi crecimiento personal y académico. Gracias por su confianza y oportunidad en las pasantías en el ISCIH.

A todo el equipo del Centro Colaborador para la OMS para la Leishmaniasis del Instituto de Salud Carlos III de Madrid, en especial al Dr. Javier Moreno y a la Dra. Eugenia Carillo, por brindarme la oportunidad trabajar en su laboratorio, por poner a mi disposición equipos y reactivos para la realización de este trabajo. Sin ustedes parte de este trabajo no hubiese sido posible de realizar. A Carmen Sánchez y a MSc. Ana Ibarra, por haberme ayudado más de lo que debían, por convertirse en más que en sólo compañeras de laboratorio.

A la Dra. Francehuli Dagger, por su invaluable ayuda y dedicación en la corrección de este manuscrito. Por sus palabras de aliento, su gran amabilidad y disposición en aclarar todas las inquietudes que surgieron en este largo camino, tanto académicas como personales.

Al Dr. Gustavo Benaim y a todo el equipo del Lab. de Señalización y Bioquímica de Parásitos del IDEA, por siempre poner a nuestra disposición cualquier material y equipo de laboratorio que se necesitó para la realización de este trabajo.

A la Dra. Carolina Bernal, por siempre estar pendiente de esos detalles que marcan la diferencia en cualquier trabajo.

Al Dr. Francisco Arvelo y al Lic. Felipe Sojo del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Biología de Tumores del IBE, por poner a mi disposición el lector de ELISA las veces que fueron necesarias.

Al Lic. Carlos Torrealba, por ser siempre mi compañero de trabajo, por su gran ayuda, paciencia, tiempo, dedicación y disposición en colaborar en este y todos los trabajos realizados tanto en pregrado como postgrado.

A mi Madre por toda su ayuda, apoyo, comprensión y compañía, desde el inicio de la licenciatura y ahora en la maestría, sin ti este trabajo hubiese sido más difícil de realizar.

A mi Padre por su ayuda y apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

A todas las personas e instituciones que de alguna manera colaboraron con la realización de este proyecto.

ÍNDICE GENERAL

i. ABREVIATURAS.....	v
ii. ÍNDICE DE FIGURAS.....	vii
iii. INDICE DE TABLAS.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Leishmaniasis.....	1
1.2 <i>Leishmania</i> como patógeno oportunista en pacientes VIH-positivos.....	4
1.3 Coinfección <i>Leishmania</i> /VIH.....	6
1.4 Prevalencia de la coinfección <i>Leishmania</i> /VIH.....	8
1.5 Tratamiento en pacientes coinfectados con <i>Leishmania</i> /VIH.....	12
1.5.1 Efecto anti- <i>Leishmania</i> de los IP's del VIH.....	22
1.5.2 Combinaciones de fármacos sobre <i>Leishmania</i>	26
2. JUSTIFICACIÓN.....	31
3. OBJETIVO GENERAL.....	32
CAPITULO I Estudio de la susceptibilidad <i>in vitro</i> de <i>Leishmania donovani</i> hacia la combinación del NFV+AMB y del NFV+MTF.....	33
I.1 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	34
I.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
I.2.1 Compuestos.....	34
I.2.2 Cultivo de parásitos.....	34
I.2.3 Cultivo de macrófagos murinos.....	35
I.2.4 Efecto de la combinación del NFV+AMB y del NFV+MTF sobre la proliferación <i>in vitro</i> de promastigotes de <i>L. donovani</i>	35
I.2.5 Infección de macrófagos murinos de la línea celular J774.....	37
I.2.6 Efecto de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF sobre el porcentaje de infección <i>in vitro</i> de macrófagos murinos por amastigotes de <i>L. donovani</i>	38
I.3 RESULTADOS.....	41
I.3.1 Efecto del Nelfinavir, la Anfotericina B y la Miltefosina sobre la proliferación <i>in vitro</i> de promastigotes de <i>L. donovani</i>	41
I.3.2 Efecto de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF sobre la proliferación <i>in vitro</i> de promastigotes de <i>L. donovani</i>	43
I.3.3 Efecto del Nelfinavir, la Anfotericina B y la Miltefosina sobre el porcentaje de infección <i>in vitro</i> de macrófagos murinos por amastigotes de <i>L. donovani</i>	45

I.3.4	Efecto de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF sobre el porcentaje de infección <i>in vitro</i> de macrófagos por amastigotes de <i>L. donovani</i>	47
CAPITULO II Estudio de la susceptibilidad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de <i>Leishmania infantum</i> hacia la combinación del NFV+AMB y del NFV+MTF		
II.1	OBJETIVO ESPECÍFICO	51
II.2	MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
II.2.1	Cultivo de parásitos.....	51
II.2.2	Cultivo de macrófagos murinos	52
II.2.3	Infección de macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7.....	52
II.2.4	Efecto de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF sobre el porcentaje de infección <i>in vitro</i> de macrófagos murinos por amastigotes de <i>L. infantum</i>	53
II.2.5	Estudio <i>in vivo</i> de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF en ratones BALB/c infectados con <i>L. infantum</i>	54
II.2.5.1	Infección y tratamiento de ratones BALB/c	55
II.2.5.2	Procesamiento de los órganos	56
II.2.5.3	Extracción de ADN de las muestras de hígado y bazo.....	57
II.2.5.4	Cuantificación de la carga parasitaria.....	57
II.2.5.5	Uso de Animales y Estatus Éticos	58
II.2.5.6	Análisis Estadístico	59
II.3	RESULTADOS.....	60
II.3.1	Efecto del Nelfinavir, la Anfotericina B y la Miltefosina sobre el porcentaje de infección <i>in vitro</i> de macrófagos murinos por amastigotes de <i>L. infantum</i>	60
II.3.2	Efecto de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF sobre el porcentaje de infección <i>in vitro</i> de macrófagos murinos por amastigotes de <i>L. infantum</i>	62
II.3.3	Efecto de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF en ratones BALB/c infectados con <i>L. infantum</i>	66
4.	DISCUSIÓN.....	68
5.	CONCLUSIONES.....	90
6.	BIBLIOGRAFIA.....	91

i. ABREVIATURAS

μL	Microlitros
μM	Micromolar
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
AMB	Anfotericina B
ATP	Adenosin trifosfato
COL	Colaboradores
DAN	Diazo-acetil-norleucinametilster
Ddi-1	Proteína Inducible al Daño al ADN 1
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNDi	Iniciativa de Drogas para Enfermedades Desatendidas
FIC	Índice de Concentración Inhibitoria Fraccional
GTP	Guanosin trifosfato
HAART	Terapia Antirretroviral de Alta Eficiencia
IC₅₀	Concentración inhibitoria del 50% de la proliferación celular
INNTR	Inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa
INTR	Inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa
IP	Inhibidores de la Proteasa del VIH
Ki	Constante de Inhibición
LC	Leishmaniasis cutánea
LCD	Leishmaniasis cutánea difusa
LCL	Leishmaniasis cutánea localizada
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LV	Leishmaniasis visceral
MDM	Macrófagos derivados de monocitos humanos

MIC	Concentración Mínima Inhibitoria del 90% de la proliferación celular
mM	Milimolar
MSF	Médicos Sin Fronteras
MTF	Miltefosina
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NFV	Nelfinavir
OMS	Organización Mundial de la Salud
PBS	Tampón Fosfato Salino
PCR-RT	Reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real
PKDL	Post Kala-azar dérmica
RP	Dominio retroviral
Sb^{III}-Sb^V	Valencia del Grupo Antimonio
SFB	Suero Fetal Bovino
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida
UBA	Dominio receptor de ubiquitina
UBL	Dominio de ubiquitinación
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

ii. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de infección por <i>Leishmania</i> en el huésped vertebrado. Proliferación de los promastigotes del parásito en el interior del vector y de los amastigotes en el huésped vertebrado. (Tomado de Cunha y col. 2013).	2
Figura 2. Distribución mundial de la leishmaniasis y la coinfección <i>Leishmania</i>/VIH. En azul claro se indican las regiones en donde la leishmaniasis es endémica y en azul oscuro las regiones en donde se han reportado casos de coinfección <i>Leishmania</i> /VIH, según el último reporte emitido por la OMS para el año 2010. (Tomado de: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/ , 12/05/2017).	7
Figura 3. Distribución geográfica de la incidencia de la coinfección <i>Leishmania</i>/VIH en Venezuela. Tomado de los casos reportados en los Servicios de Dermatología Sanitaria a nivel nacional en el período 2000-2013 (Tomado de Ortega y col., 2013).	11
Figura 4. Estructuras de los Inhibidores de la Proteasa del VIH utilizados en la terapia HAART (Tomado de Serrano y col., 2012).	20
Figura 5. Compuestos evaluados en el docking molecular. Es posible observar los valores de energía de unión y la constante de inhibición (K _i) para cada IP's del VIH empleado (Tomado de Serrano y col., 2012).	25
Figura 6. Fórmula descrita por Hallander y col. (1982) para el cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) empleada en promastigotes de <i>Leishmania</i> sp.	37
Figura 7. Fórmula descrita por Hallander y col. (1982) para el cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) empleada en amastigotes intracelulares de <i>Leishmania</i> sp.	40
Figura 8. Efecto del NFV (A), AMB (B) y MTF (C) sobre la proliferación <i>in vitro</i> de promastigotes de <i>L. donovani</i>. La inhibición del crecimiento celular se evaluó <i>in vitro</i> mediante la reducción del MTT como se indica en materiales y métodos. Los datos mostrados son el resultado de tres experimentos independientes.	42
Figura 9. Isobologramas de la combinación de NFV+AMB (A) y NFV+MTF (B) sobre la proliferación <i>in vitro</i> de promastigotes de <i>L. donovani</i>. La inhibición de la infección se evaluó <i>in vitro</i> como se indica en materiales y métodos. La línea punteada representa un efecto aditivo teórico entre las drogas, mientras que la línea sólida muestra un efecto sinérgico de la combinación. Los resultados mostrados corresponden a tres experimentos independientes.	44

Figura 10. Efecto del NFV (A), AMB (B) y MTF (C) sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos de la línea celular J774 por amastigotes de *L. donovani*. La inhibición de la infección de macrófagos se evaluó *in vitro* como se indica en materiales y métodos. Los datos mostrados son el resultado de tres experimentos independientes. 46

Figura 11. Isobologramas de la combinación de NVF+AMB (A) y NFV+MTF (B) sobre la infección *in vitro* de macrófagos de la línea celular J774 por amastigotes de *L. donovani*. La inhibición de la infección se evaluó *in vitro* como se indica en materiales y métodos. La línea punteada representa un efecto aditivo teórico entre las drogas, mientras que la línea sólida muestra un efecto sinérgico de la combinación. Los resultados mostrados corresponden a tres experimentos independientes. 48

Figura 12. Efecto del NFV (A), AMB, (B) y MTF (C) sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos de la línea celular RAW 264.7 por amastigotes de diferentes cepas de *L. infantum*. La inhibición de la infección se evaluó *in vitro* como se indica en materiales y métodos. Los datos mostrados son el resultado de tres experimentos independientes. 61

Figura 13. Isobologramas de la combinación de NVF+AMB y NFV+MTF sobre la infección *in vitro* de macrófagos murinos de la línea celular RAW 261.7 por amastigotes de *L. infantum*. (A) MCAN/ES/98/LLM-724, (B) MHOM/PT/09/LLM-1708 y (C) MHOM/ES/15/LLM-2284. La línea punteada representa un efecto aditivo teórico entre las drogas, mientras que la línea sólida muestra un efecto sinérgico de la combinación. Los resultados mostrados corresponden a tres experimentos independientes. 65

Figura 14. Estimación de las cargas parasitarias en hígado (A) y bazo (B) en ratones BALB/c infectados con *L. infantum*. (1) Control sin tratamiento, (2) 5 mg/kg NFV, (3) 1 mg/kg AMB, (4) 5 mg/kg MTF, (5) 5 mg/kg NFV + 1 mg/kg AMB y (6) 5 mg/kg NFV + 5 mg/kg MTF. Se puede observar como el tratamiento con los compuestos solos y combinados, redujeron significativamente la carga parasitaria en ambos órganos, respecto al grupo control sin tratamiento. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo control sin tratamiento y el grupo tratado sólo con NFV (* $p < 0.05$) y con MTF (* $p < 0.05$) en hígado y bazo. Con el tratamiento combinado, se obtuvo un * $p < 0.05$ en hígado para las dos combinaciones ensayadas y en bazo sólo con la combinación de NFV+MTF (** $p < 0.01$). 67

iii. INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales manifestaciones clínicas de la leishmaniasis y la especie de <i>Leishmania</i> frecuentemente asociada a la enfermedad (Tomado de Cunha y col., 2013).....	3
Tabla 2. Concentraciones ensayadas de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF sobre la proliferación <i>in vitro</i> de promastigotes de <i>L. donovani</i>	36
Tabla 3. Concentraciones ensayadas de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF sobre el porcentaje de infección <i>in vitro</i> de macrófagos de la línea celular J774 por amastigotes de <i>L. donovani</i>	40
Tabla 4. Efecto del NFV, AMB y MTF sobre la proliferación <i>in vitro</i> de promastigotes de <i>L. donovani</i>	41
Tabla 5. Efecto del NFV, la AMB y la MTF sobre el porcentaje de infección <i>in vitro</i> de macrófagos murinos de la línea celular J774 por amastigotes de <i>L. donovani</i> . .	45
Tabla 6. Efecto de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF sobre el porcentaje de infección <i>in vitro</i> de macrófagos murinos de la línea celular J774 por amastigotes de <i>L. donovani</i>	49
Tabla 7. Concentraciones ensayadas de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF sobre el porcentaje de infección <i>in vitro</i> de macrófagos de la línea celular RAW 264.7 por amastigotes de diferentes cepas de <i>L. infantum</i>	54
Tabla 8. Efecto del NFV, AMB y MTF sobre el porcentaje de infección <i>in vitro</i> de macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7 por amastigotes de diferentes cepas de <i>L. infantum</i>	60
Tabla 9. Efecto de las combinaciones del NFV+AMB y NFV+MTF sobre el porcentaje de infección <i>in vitro</i> de macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7 por amastigotes de diferentes especies de <i>L. infantum</i>	64

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Leishmaniasis*

La leishmaniasis comprende un grupo de enfermedades causadas por parásitos protozoarios del género *Leishmania* (Alvar y col., 1997; 2008; 2012). La infección por *Leishmania sp.* inicia con la picadura del insecto vector del género *Phlebotomus sp.* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia sp.* en el Nuevo Mundo, infectado con la forma promastigote del parásito (Alvar y col., 2008; Cunha y col., 2013; Molina y col., 2003) (Figura 1). Una vez en el interior del huésped vertebrado, los promastigotes son fagocitados por células de origen mieloide como macrófagos, monocitos, neutrófilos y células dendríticas, donde se diferencian a la forma amastigote y se multiplican dentro del fagolisosoma hasta lisis la célula (Figura 1) (Mougneau y col., 2011; Okwor y Uzonna, 2013).

Esta parasitosis es endémica en 98 países del mundo, afectando principalmente a regiones tropicales y subtropicales (Van Griensven y col., 2014; OMS, 2010; 2017). Para el año 2015, se estimaron entre 20000 y 30000 muertes anuales y una incidencia de 0,7 a 1 millón de nuevos casos anuales, siendo el continente Africano el más afectado (Alvar y col., 2012; Cruz y col., 2006; OMS 2017). En Venezuela, la enfermedad se distribuye geográficamente en tres focos, el foco central, el oriental y el occidental, siendo los estados Lara, Trujillo y Anzoátegui los más afectados, con una prevalencia de 12,3 casos por cada 100.000 habitantes para el año 2015 (Bonfante-Garrido y Barroeta, 2002; Feliciangeli y col., 2005; Moreno y col., 2016; Ortega y col., 2013; Traviezo, 2012; Zerpa y col., 2003).

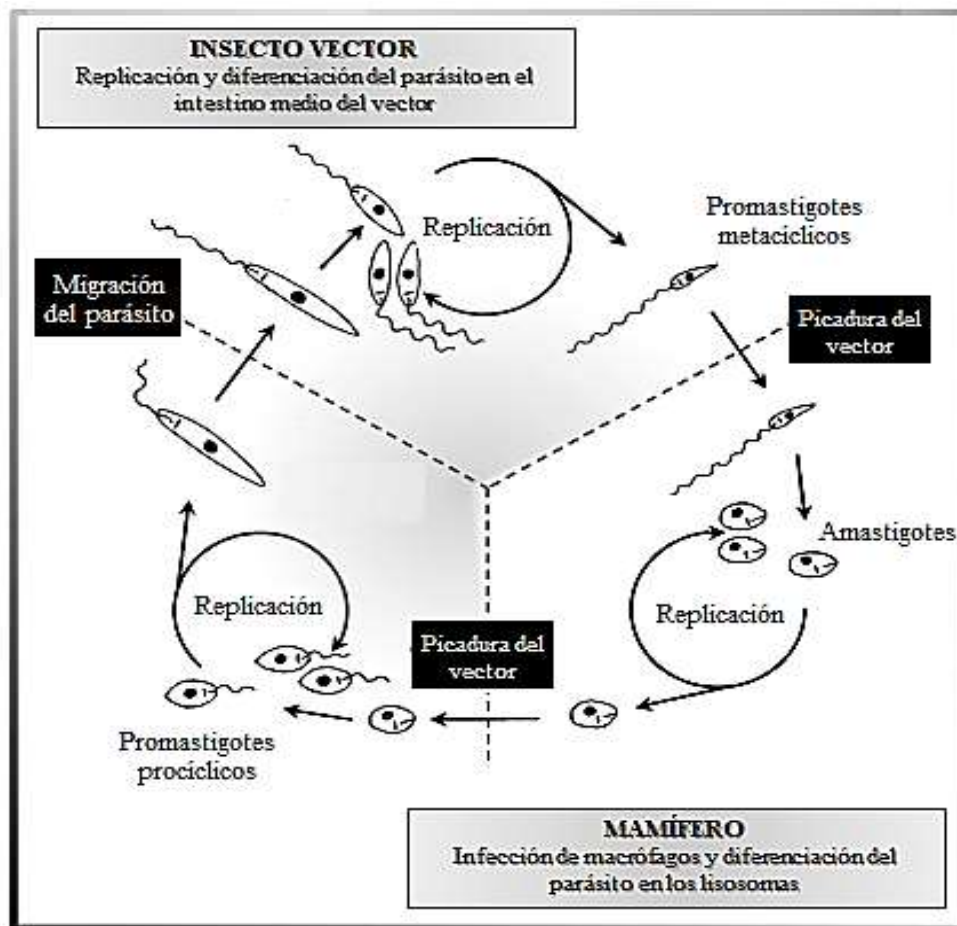


Figura 1. Ciclo de infección por *Leishmania* en el huésped vertebrado. Proliferación de los promastigotes del parásito en el interior del vector y de los amastigotes en el huésped vertebrado. (Tomado de Cunha y col. 2013).

De acuerdo a las manifestaciones clínicas, los síntomas asociados y la especie de *Leishmania* involucrada en la infección, es posible distinguir tres formas principales de la enfermedad (Tabla 1) (Cruz y col., 2002; Van Griensven y Diro, 2012; Van Griensven y col., 2014; OMS, 2010; 2017). La leishmaniasis cutánea (LC), considerada como la forma menos letal de la enfermedad, se caracteriza por la presencia de úlceras cutáneas que pueden presentarse de forma localizada (LCL) o difusa (LCF) (OMS, 2010; 2017). La leishmaniasis mucocutánea (LMC), considerada como una variante de la LC, afecta principalmente el tejido de la mucosa naso-faríngea. Por último, la leishmaniasis visceral (LV) o Kala-azar, es la forma letal de la enfermedad sino es tratada a tiempo, afectando

principalmente los órganos viscerales como el hígado y el bazo (Van Griensven y Diro, 2012; Van Griensven y col., 2014). Adicionalmente, es posible distinguir la leishmaniasis dérmica post Kala-azar (PKDL), la cual puede aparecer semanas o años después de la infección por LV, se caracteriza por presentar úlceras y máculas pigmentadas dispersas en todo el cuerpo (Alvar y col., 2012; Cruz y col., 2002; De Trez y col., 2009).

Tabla 1. Principales manifestaciones clínicas de la leishmaniasis y la especie de *Leishmania* frecuentemente asociada a la enfermedad (Tomado de Cunha y col., 2013).

Forma Clínica	Especie
Viejo Mundo subgénero <i>Leishmania</i>	
Leishmaniasis Cutánea	<i>L. major</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. aethiopica</i>
Leishmaniasis Visceral	<i>L. donovani</i> y <i>L. infantum</i>
Post Kala-azar Dérmica	<i>L. donovani</i>
Nuevo Mundo subgénero <i>Leishmania</i>	
Leishmaniasis Cutánea	<i>L. infantum</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. pifanoi</i> y <i>L. amazonensis</i>
Leishmaniasis Visceral	<i>L. infantum</i> (<i>L. chagasi</i>)
Nuevo Mundo subgénero <i>Vianna</i>	
Leishmaniasis Cutánea	<i>L. braziliensis</i> , <i>L. guayanensis</i> , <i>L. panamensis</i> , <i>L. peruviana</i> , <i>L. venezuelensis</i>
Leishmaniasis Mucocutánea	<i>L. braziliensis</i> y <i>L. panamensis</i>

La LC es causada por una gran variedad de especies de *Leishmania* (Tabla 1). En el Viejo Mundo, la LC suele producirse por *L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopica*, mientras que en el Nuevo Mundo, la infección puede originarse por una mayor variedad de especies como *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guayanensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana* y *L. venezuelensis* (Alvar y col., 2008; OMS, 2010).

Por su parte, la LV es causada por dos especies, *L. infantum* y *L. donovani* (Tabla 1). Típicamente, la infección originada por *L. infantum*, es considerada zoonótica, donde animales domésticos actúan como reservorios del parásito, posicionando al humano como un hospedador accidental (Andreani y col., 2012; Gossage y col., 2003; Okwor y Uzonna,

2013), a diferencia de la infección causada por *L. donovani*, considerada como antropológica, el humano actúa como reservorio del parásito, capaz de infectar a individuos sanos (Andreani y col., 2012; Van Griensven y col., 2014).

1.2 Leishmania como patógeno oportunista en pacientes VIH-positivos

Una de las principales amenazas para el control de *Leishmania* es su interacción con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) (Bernier, 1995; Kaye y Scott, 2011; Kumar y Nylen, 2012). En regiones endémicas para el virus, se ha generado un nuevo interés en la leishmaniasis, considerada una infección desatendida a nivel mundial (Alvar y col., 2008; 2012; Diro y col., 2014; Van Griensven y col., 2014). Actualmente, la infección por *Leishmania* es reconocida como la tercera infección oportunista causada por protozoarios patógenos en pacientes VIH-positivos (Ukwor y Uzonna, 2013), producto del bajo recuento de linfocitos T CD4⁺ (< 200 células/mm³), que permite a los parásitos del género *Leishmania*, establecer la infección en conjunto con el VIH (Desjeux y Alvar, 2003; Molina y col., 2003; Podinovskaia y Descoteaux, 2015).

En la coinfección por *Leishmania*/VIH, el parásito y el virus presentan efectos recíprocos que se potencian al producirse en conjunto (Bentwich, 2003; Stebbing y col., 2004; Okwor y Uzonna, 2013). La inmunosupresión causada por el virus del VIH es particularmente favorable para *Leishmania*, aumentando el riesgo de desarrollar leishmaniasis por un factor de entre 100 y 1000 en áreas endémicas, reduciendo la probabilidad de respuesta terapéutica y aumentando la posibilidad de sufrir recaídas de la enfermedad (Kaye y Scott, 2011; Kumar y Nylen, 2012). Por su parte, la infección por *Leishmania* estimula la replicación y reactivación del virus en las células infectadas, produciendo un rápido incremento de la carga viral, estableciéndose entonces una “simbiosis” entre ambos patógenos (Okwor y Uzonna, 2013).

En el transcurso de los años, son muchas las investigaciones que se han realizado para poder elucidar cuales son los mecanismos, a nivel celular y molecular, que producen la patogénesis de la coinfección por *Leishmania*/VIH (Alvar y col., 2008; Garg, 2009; Van Griensven y col., 2010). Se ha evidenciado que tanto, el establecimiento de la infección por parte del parásito y la replicación del virus, son el resultado de una red compleja de señales extracelulares, como aquellas provistas por citoquinas, en conjunto con efectos transcripcionales y post-transcripcionales (Garg y col., 2007; Garg, 2009; Okwor y Uzonna, 2013; Tomioka y col., 2012; Wolday y col., 1999).

Actualmente, se conoce que ambas infecciones alteran el balance entre la repuesta inmunológica tipo Th1 y Th2, existiendo una regulación cruzada entre ambas respuestas, de manera tal que las citoquinas producidas por un subconjunto Th puede suprimir la producción y/o actividad del otro subconjunto (De Oliveira y Brodskyn, 2012; Garg, 2009; Olivier, 2003; Podinovskaia y Descoteaux, 2015). La infección por *Leishmania* tiende a inducir la actividad tipo Th2 y el virus tiende a promover una repuesta tipo Th1. De esta manera, el cambio del perfil de citoquinas inducido por la repuesta inmunológica frente a la infección por ambos patógenos, se encuentra asociado a la progresión clínica de la coinfección por *Leishmania*/VIH (Alvar y col., 2008; Azzam, 2006; Nylen y Sacks, 2007; Okwor y Uzonna, 2013; Van Griensven y col., 2010).

No obstante, las investigaciones realizadas hasta ahora, sólo plantean posibles modelos de la interacción entre *Leishmania* y el VIH en los individuos coinfectados. Si bien no se encuentra del todo claro cuáles son los mecanismos celulares mediante el cual, el parásito y el virus logran potenciar su desarrollo e infección en estos pacientes, es un hecho que la presencia de ambos agentes infecciosos en un mismo individuo altera el curso de la infección, resultando en muchos casos en patologías atípicas dificultando su diagnóstico y tratamiento.

1.3 Coinfección Leishmania/VIH

De acuerdo al último reporte emitido por la Organización Mundial de la Salud (OMS) se han registrado casos de coinfección *Leishmania*/VIH en al menos 35 países del mundo (OMS, 2010; Van Griensven y col., 2014). El número de casos de coinfección reportados ha aumentado rápidamente desde la década de 1990, debido a la propagación de la epidemia del VIH y la creciente superposición geográfica entre las dos enfermedades (Diro y col., 2014; Gossage y col., 2003). Al analizar la distribución espacial de la población afectada, se sugirió una creciente propagación de la infección por el VIH a zonas rurales y de la leishmaniasis a zonas urbanas, dando como resultado un aumento en la incidencia de los casos de coinfección por *Leishmania*/VIH (Figura 2) (López-Vélez, 2003; Van Griensven y col., 2013; 2014).

Sumado a la creciente superposición geográfica entre ambas enfermedades, es importante señalar que el uso de jeringas compartidas entre los usuarios de drogas intravenosas, constituye una vía de transmisión artificial que incrementa en gran medida la incidencia de los casos de coinfección por *Leishmania*/VIH, contribuyendo no sólo a la trasmisión del virus, sino también del parásito (Alvar y col., 2012; Monge-Maillo y col., 2014).

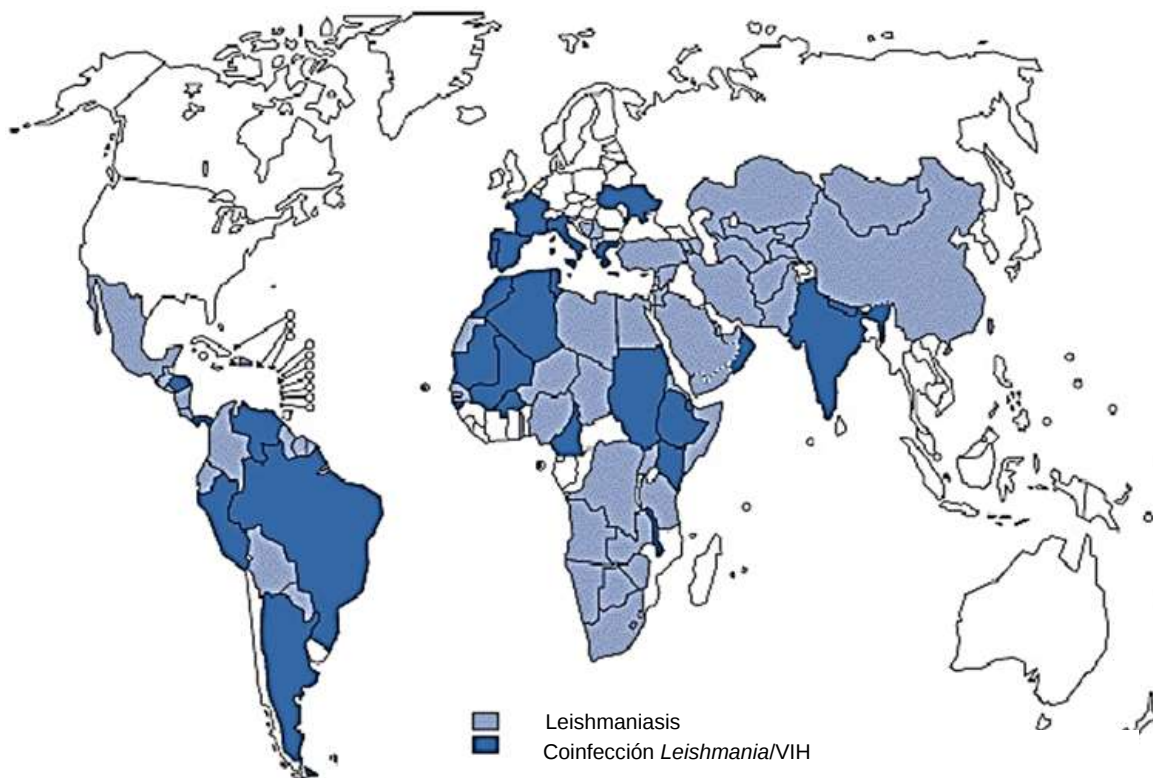


Figura 2. Distribución mundial de la leishmaniasis y la coinfección *Leishmania*/VIH. En azul claro se indican las regiones en donde la leishmaniasis es endémica y en azul oscuro las regiones en donde se han reportado casos de coinfección *Leishmania*/VIH, según el último reporte emitido por la OMS para el año 2010. (Tomado de: http://www.who.int/leishmaniasis/burden/hiv_coinfection/burden_hiv_coinfection/en/, 12/05/2017).

Tanto en pacientes coinfectados o no con el VIH, las manifestaciones clínicas de la leishmaniasis dependen de la especie de *Leishmania* involucrada así como, del estado nutricional e inmunológico del huésped vertebrado (Gossage y col., 2003; Raes y col., 2007). La forma clínica más común de la leishmaniasis en pacientes coinfectados es la LV, aunque también se han reportado casos de LC (Alvar y col., 2008; Van Griensven y Diro, 2010; Van Griensven y col., 2014). Las manifestaciones clínicas de la LV, causada por *L. infantum* y *L. donovani*, en pacientes VIH-positivos son similares a la LV producida en pacientes infectados únicamente con *Leishmania* (Alvar y col., 1992; 1997; 2008; Cruz y col., 2006; Michel y col., 2011). No obstante, en pacientes coinfectados, se

ha reportado la diseminación del parásito en lugares atípicos, como en pulmones, en el sistema gastrointestinal, en sangre periférica y el desarrollo de lesiones cutáneas asociadas a LV (PKDL) en al menos el 45% de los casos (Cruz y col., 2006; David y Craft, 2009; OMS, 2008). De igual manera, se ha observado la visceralización de cepas dermatrópicas del parásito en pacientes coinfectados (Colomba y col., 2009; Kaye y Scott, 2011; Kumar y Nylen, 2012; OMS, 2010).

1.4 Prevalencia de la coinfección Leishmania/VIH

El primer caso de leishmaniasis asociado a la infección por el VIH fue reportado en el año 1985 en el este de Europa, producto de la propagación de la epidemia del VIH y la creciente superposición geográfica entre ambas enfermedades. A partir de esa fecha, el número de casos reportados de coinfección aumentó rápidamente durante la década de los 90 alrededor del mundo (Alvar y col., 1997; 2008; 2012; Diro y col., 2014). Aunque la mayor parte de la literatura publicada para esa época se refiere a los países del sur de Europa, en la actualidad los casos de coinfección *Leishmania*/VIH son notoriamente altos en el continente africano (Albrecht, 1998; Albrecht y col., 1996; Alvar y col., 2008; 2012).

En Europa, para el año 2001, se habían registrado un total de 1911 casos de coinfección *Leishmania*/VIH, con más del 50% procedentes principalmente de España, seguido de Italia, Francia y Portugal (Bourgeois y col., 2010; Monge-Maillo y col., 2014; Moreno y col., 2000; OMS, 2008; Van Griensven y col., 2013). Actualmente, al menos el 10% de los casos de leishmaniasis reportados en esta región provienen de pacientes VIH-positivos, siendo España y Portugal los países más afectadas (Aree y col., 2013). También se han registrado casos en otros países europeos como Suiza, Reino Unido y

Alemania, aunque con menos frecuencia (Bourgeois y col., 2010; Monge-Maillo y López-Vélez, 2013; Pintado y col., 2001).

Mientras que en Europa los casos de coinfección por *Leishmania*/VIH corresponden al 10% del total casos de leishmaniasis reportados, en África la prevalencia es distinta. Para el año 2000, se había estimado que al menos el 40% de los casos de leishmaniasis registrados en el África Subsahariana provenían de pacientes coinfectados con el VIH (Alvar y col., 2008; Guiguemde y col., 2003; Mengistu y Ayele, 2007; Merson y col., 2008; Musa y col., 2010). En esta región se encuentra la mayor proporción de personas infectadas con VIH y con leishmaniasis, lo que representa un alto riesgo de coinfección, siendo el África Subsahariana la zona más afectada (Merson y col., 2008; Van Griensven y Diro, 2012; OMS, 2017). Actualmente, los países con una mayor incidencia de coinfección son Etiopía, Kenya, Uganda, Somalia y Sudán, donde la transmisión es básicamente antroponótica, reportándose casos de PKDL en al menos el 50% de los casos de LV, constituyendo la principal vía de transmisión en África (Diro y col., 2014; Fenske y col., 1991; Lyon y col., 2003; Stork y col., 2006).

Por su parte, en el continente Asiático el primer caso de coinfección por *Leishmania*/VIH fue reportado en el año 1999 en la India. En esta región la coinfección por ambos patógenos ocurre debido a la migración de personas de zonas rurales a urbanas para ejercer su actividad económica, los cuales adquieren la infección por el VIH y luego retornan a las zonas rurales donde la LV es endémica (Jarvis y Lockwood, 2013; Merson y col., 2008; Stork y col., 2006). Según datos reportados por el Centro Médico de Kala-azar en la India, el número de coinfectados aumentó de 0.88% a 7% del total de casos de leishmaniasis reportados para el año 2012 (Mengistu y Ayele, 2003; Van Griensven y Diro, 2012). De igual forma que ocurre en Europa, la infección por el VIH puede reactivar

infecciones latentes de la leishmaniasis debido al deterioro progresivo del sistema inmune causado por la infección del VIH.

Por último, en Suramérica, los reportes de la prevalencia de la coinfección por *Leishmania*/VIH se encuentran altamente subestimadas. Debido a que la leishmaniasis es una enfermedad que se encuentra asociada principalmente a países de bajos recursos, los sistemas de notificación y la falta de un diagnóstico adecuado y oportuno, tiene como resultado una subestimación de los casos reales que se presentan en cada región, así como de la población que se encuentra en riesgo (Alvar y col., 2012; Lindoso y col., 2014; López-Veléz, 2003).

En el año 2006, la Organización Panamericana de la Salud estimó un aproximado de 62.000 casos de LV y 5.000 de LC en la región americana, siendo Brasil el país más afectado (Bernier y col., 1995; Zhao, 2006). Ese mismo año, se reportó que al menos el 2% de los casos de LV registrados provenían de pacientes infectados con el VIH (Wolday, 1999; Uzonna, 2001; Azzam, 2006). Ya para el año 2010, la proporción de coinfectados *Leishmania*/VIH había aumentado hasta un 17%, según datos reportados por el Ministerio de Salud de Brasil (Lima y col., 2013; Milano, 2012; Mogneau y col., 2011).

En Venezuela, la información sobre la incidencia y prevalencia de la coinfección *Leishmania*/VIH es escasa, por lo que el análisis epidemiológico es limitado. El primer caso de coinfección por *Leishmania*/VIH en Venezuela fue reportado en el año 1995 por Hernández y col, ya para el año 2013, se habían reportado casos de coinfección en 11 de las 24 entidades federales (Figura 3) (Ortega y col., 2013; Zerpa y col., 2003a; 2003b; 2005). Para ese mismo año, se estimó que el 31 % de los casos reportados de coinfección provenían del estado Bolívar y en un 22% del estado Anzoátegui, siendo los estados con una mayor prevalencia de casos de coinfección por *Leishmania*/VIH (De Lima y col., 2011).

En algunas zonas endémicas para la leishmaniasis en Venezuela, como Mérida, Trujillo, Cojedes, Yaracuy y Monagas, las cuales han sido catalogadas como zonas con un alto índice de infección por *Leishmania*, no se reportaron pacientes coinfectados con VIH (Figura 3). Este hallazgo puede deberse a deficiencias en los programas de control de ambas enfermedades y no a la ausencia de casos de pacientes con coinfección *Leishmania*/VIH, produciéndose un sub-registro de los casos de coinfección (De Lima y col., 2011; Ortega y col., 2013).

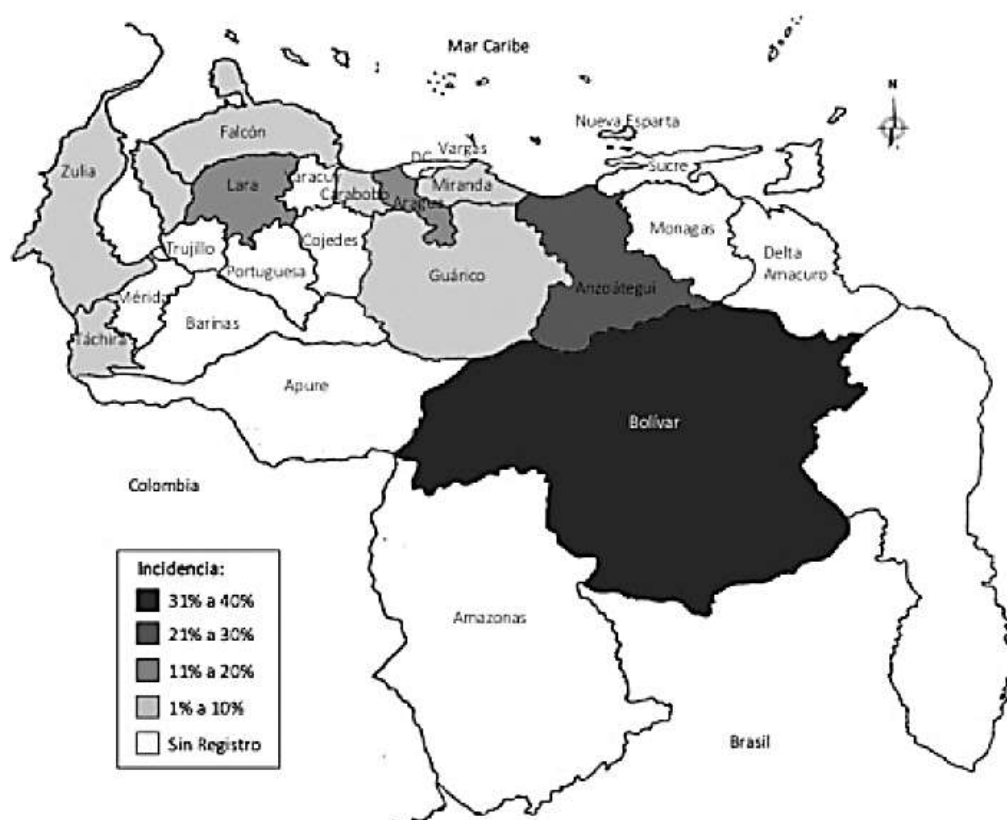


Figura 3. Distribución geográfica de la incidencia de la coinfección *Leishmania*/VIH en Venezuela. Tomado de los casos reportados en los Servicios de Dermatología Sanitaria a nivel nacional en el período 2000-2013 (Tomado de Ortega y col., 2013).

1.5 Tratamiento en pacientes coinfectados con Leishmania/VIH

Actualmente, el tratamiento de la leishmaniasis, tanto en pacientes coinfectados o no con el VIH, presenta una eficacia variable de acuerdo al estado clínico del paciente. En el caso del tratamiento de la leishmaniasis en paciente VIH-negativos se utilizan una gran variedad de fármacos, entre los cuales destacan la terapia con antimoniales pentavalentes y antibióticos, como principales líneas de acción (Alvar y col., 2012; Cunningham, 2002). Por otra parte, las opciones terapéuticas para el tratamiento de la LV en pacientes VIH-positivos es complejo, tomando en cuenta el cuadro clínico producido por ambos patógenos, en general se suelen emplear combinaciones de los fármacos comúnmente utilizados para el tratamiento de la LV en individuos no coinfectados.

Desde la introducción de los antimoniales pentavalente en el año 1945, estos compuestos se han mantenido como primera línea de acción en el tratamiento de la leishmaniasis. Dicha terapia comprende la administración del pentostam (estibogluconato de sodio) y glucantime (antimoniato de meglumina) por vía parenteral, lo cual hace obligatorio la hospitalización y monitoreo constante del paciente por parte del personal médico (Alvar y col., 2008; Halder y col., 2011; Soto y Soto, 2006).

El mecanismo de acción de los antimoniales pentavalentes 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, producto de la inhibición de la actividad glicolítica y de la oxidación de los ácidos grasos (Friedrich y col., 2012; Oullette y col., 2004). Por otro lado, también se ha demostrado la inhibición de enzimas específicas tales como la tripanotión reductasa, una enzima equivalente a la glucatió reductasa en mamíferos, producto de la acción de los antimoniales pentavalentes (de Lima y col., 2007; Fredzard y col., 2005; Halder y col., 2011). Se ha postulado que el grupo antimonio (Sb^V)

de estos compuestos es reducido en el interior celular a la forma trivalente del antimonio (Sb^{III}), el cual exhibe tanto la actividad leishmanicida como tóxica en el organismo (de Lima y col., 2007; Fredzard y col., 2005; Friedrich y col., 2012; Haldar y col., 2011). Aunque se desconoce el blanco de acción en el parásito y el mecanismo mediante el cual el grupo antimonio es reducido a la forma trivalente no se encuentra del todo claro, se ha propuesto que la reducción del antimonio requiere la participación activa de compuestos tanto del huésped como del parásito (Croft y col., 2006; Davis y Kedzierski, 2005; Friedrich y col., 2012).

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 (Alvar y col., 2008; OMS, 2010; Wilson y col., 2008).

La anfotericina B es un antibiótico poliénico, el cual se extrajo originalmente de *Streptomyces nodosus* (Alvar y col., 2008; Serrano y col., 2013). Su estructura química se caracteriza por presentar un anillo, que contiene un ácido carboxílico y una cadena hidrocarbonada con un grupo amino, que juegan un papel clave en su actividad biológica y le confiere características anfipáticas (Ramos y col., 1996; Roberts y col., 2003; Serrano y col., 2013). Esta propiedad, hace que la anfotericina B sea muy poco soluble, no solamente en disolventes acuosos, sino también en la mayoría de los disolventes orgánicos, por esta razón su absorción oral es mínima y debe administrarse por vía parenteral (Serrano y col., 2013; Volmer y col., 2010). Otras de las características más relevantes de la anfotericina B es su estado de agregación. Este parámetro de la anfotericina B es bastante complejo, dado que condiciona no sólo la toxicidad si no también la actividad y la farmacocinética del mismo en el organismo (Torrado y col., 2008). En medios acuosos y a bajas concentraciones, la anfotericina B se halla en estado monomérico, sin embargo y como consecuencia de su naturaleza anfipática, tiende a

agregarse a altas concentraciones, formando dímeros u oligómeros (Espada y col., 2008; Torrado y col., 2008; Volmer y col., 2010). Adicionalmente, el uso de agentes surfactantes o excipientes como el desoxicolato sódico, también favorecen la formación de estructuras agregadas (Torrado y col., 2008). Estos hallazgos son la base de las nuevas formulaciones de la anfotericina B que se administran en la actualidad, como el Fungizone y el AmBisome, las cuales se desarrollaron con la finalidad de disminuir la toxicidad del compuesto (Alvar y col., 2008; Espada y col., 2008; Torrado y col., 2008; Volmer y col., 2010).

Este antibiótico actúa uniéndose a los esteroides de membrana, principalmente el ergosterol, presente en la membrana celular de los hongos y *Leishmania*. Como consecuencia de esta fijación se producen alteraciones en la estructura de la membrana, producto de la formación de poros compuestos de agregados de anfotericina B y esteroides (Ramos y col., 1996; Roberts y col., 2003). Estas alteraciones originan una despolarización de la membrana y un aumento de la permeabilidad para protones y cationes, resultando finalmente en la lisis celular (Torrado y col., 2008; Van Griensven y col., 2014). Adicionalmente, se sabe que la anfotericina B es capaz de generar estrés oxidativo, aunque se desconoce el mecanismo por el cual se produce. Una de las hipótesis más extendidas, afirma que la anfotericina B es capaz de comportarse como un agente pro-oxidante, generando especies reactivas de oxígeno (ROS) (Liu y col., 2016).

Algunos agentes antifúngicos como los imidazoles y triazoles han mostrado clínicamente un efecto antiproliferativo sobre el parásito, en particular el itraconazol, posaconazol, ketoconazol y metronidazol, los cuales inhiben la 14 α -desmetilasa asociada al sistema del citocromo P450, enzima clave en la ruta de la biosíntesis del ergosterol, que como ya se ha mencionado, afecta el metabolismo de la membrana celular de *Leishmania sp.* (Alvar y col., 2008; OMS, 2010). Estos fármacos se encuentran

disponibles en presentación oral e intravenosa para el tratamiento de infecciones micóticas y también pueden emplearse en el tratamiento de la leishmaniasis. Además de los azoles, existen una variedad de compuestos capaces de inhibir o inducir la actividad de CYP3A4 entre ellos algunos antibióticos, antirretrovirales y nuevos azoles sintéticos de la familia de las imidazolflavononas (Robertson y col., 2003; Shokri y col., 2017)

Por otro lado, la pentamidina es otro de los fármacos frecuentemente utilizados en el tratamiento contra la leishmaniasis y otras enfermedades causadas por tripanosomatidios como el Mal de Chagas (Vercesi y Docampo, 1992). La pentamidina es una diamina aromática, la cual es administrada clínicamente como pentamidina de isetionato (Alvar y col., 2008; Nguewa y col., 2005; OMS, 2010). El mecanismo de acción aún no se conoce con exactitud, sin embargo se ha propuesto que la pentamidina afecta la replicación del genoma a nivel mitocondrial, desestabilizando los surcos menores del ADN formado por la interacción de la timina y la adenosina, además de inhibir la topoisomerasa II del kinetoplasto del parásito, inactivando la transcripción de proteínas (Nguewa y col., 2005). Por otro lado, también se ha reportado que la pentamidina puede inhibir la actividad de la Ca^{+2} -ATPasa de la membrana plasmática de *T. cruzi* (Benaim y col., 1993).

Otro fármaco empleado en el tratamiento de la leishmaniasis es la paromomicina, un aminoglucósido que se cree que afecta el proceso de traducción de proteínas, al bloquear la subunidad 30S ribosomal dificultando la transcripción del ARN mensajero (Armijos y col., 2004; Sundar y col., 2007). Este fármaco presenta baja absorción por vía oral por tanto debe ser administrado por vía parenteral y en algunos regiones, se han desarrollado algunas formulaciones tópicas para lesiones cutáneas (Kim y col., 2009; Morais-Teixeira y col., 2014).

Por último, la miltefosina, un fosfolípido acilado, es ampliamente utilizada en el tratamiento de la leishmaniasis, el cual fue inicialmente desarrollado como fármaco antineoplásico (Croft y col., 1987; Paris y col., 2004). Una de las ventajas del tratamiento con la miltefosina es su administración por vía oral. Sin embargo, resulta ser altamente teratogénico, favoreciendo además la aparición de resistencia (Sindermann y col., 2004).

Existen numerosas evidencias que sugieren que la miltefosina altera el metabolismo lipídico de *Leishmania* (Croft y col., 1987; Imbert y col., 2012), lo cual afecta las rutas de señalización celular dependientes de lípidos. Específicamente, se ha planteado que la miltefosina ejerce su acción antiparasitaria inhibiendo la acilcoenzima A alquil-aciltransferasa, una enzima clave en la remodelación lipídica de la membrana, involucrada en la síntesis de fosfatidilcolina en *L. mexicana*, produciendo una disminución de los niveles de fosfatidilcolina (Henke y col., 1999; Lux y col., 2000; Rakotamanga y col., 2007). Por su parte, en *L. donovani* y en otros tripanosomatidios como *T. cruzi*, se ha demostrado que la miltefosina actúa inhibiendo la fosfatidiletanolamina N-metil-transferasa, produciendo un aumento de los niveles de fosfatidiletanolamina (Lira y col., 2001). Sumado a esto, a nivel mitocondrial, la miltefosina inhibe de manera dosis-dependiente, la actividad de la citocromo c oxidasa en *Leishmania*, enzima que participa en la cadena transportadora de electrones, lo que origina una reducción del potencial electroquímico mitocondrial y una disminución marcada de los niveles de ATP intracelular (Luque-Ortega y Rivas, 2007).

Actualmente, también se ha demostrado que la miltefosina es capaz de alterar las homeostasis intracelular del Ca^{+2} en estos parásitos (Serrano-Martín y col., 2009; Verma y Dey, 2004). En el año 2013, se describió un canal de Ca^{+2} presente en la membrana plasmática de *L. mexicana*, similar al canal de Ca^{+2} dependiente de voltaje tipo L en humanos (Benaïm y col., 2013). Dicho canal en *Leishmania* es activado por esfingosina

a diferencia del canal en humanos, y además, es activado por la miltefosina (Pinto y col., 2018). Adicionalmente, también se demostró que este fármaco induce la rápida alcalinización de los acidocalcisomas (Pinto y col., 2018). De este modo, la miltefosina estaría induciendo una gran acumulación de calcio intracelular que, sumado al efecto que se ha reportado sobre la mitocondria y sobre la ruta de síntesis de lípidos en el parásito, podrían explicar el efecto leishmanicida de este fármaco sobre *Leishmania*.

En pacientes coinfectados con *Leishmania*/VIH el tratamiento es complejo, producto de la presencia de ambos patógenos en un mismo individuo (Alvar y col., 2008; Van Griensven y col., 2010; OMS, 2010). Cuando surgieron los primeros focos de coinfección, no existía un consenso general sobre el esquema general del tratamiento a seguir para estos pacientes (Alvar y col., 2006; Croft y col., 2006; Van Griensven y col., 2010). Sin importar el tratamiento elegido, los pacientes coinfectados no presentaban mejoras en los síntomas asociados (Alvar y col., 2006; Molina y col., 2003). De manera general, se ha observado que estos pacientes presentan menores tasas de curación, mayor probabilidad de generar resistencia, una mayor toxicidad a los fármacos empleados y una alta posibilidad de sufrir recaídas una vez culminado el tratamiento (Guerin y col., 2002; Rijal y col., 2007).

Otro inconveniente en el tratamiento de pacientes coinfectados por *Leishmania*/VIH se produce al realizar la extrapolación de posibles tratamientos en distintos continentes, donde pueden presentarse muy probablemente diferentes susceptibilidades a los fármacos empleados (Maltezou, 2008; Rijal y col., 2007).

Se han realizado numerosos ensayos clínicos que evalúan la eficacia de diferentes tratamientos para los pacientes coinfectados con *Leishmania*/VIH, empleando fármacos comúnmente utilizados contra la leishmaniasis, principalmente los antimoniales

pentavalentes, la anfotericina B y la miltefosina (Cota y col., 2013; Sundar y col., 2007; Sundar y Murray, 2005; Van Griensven y col., 2010; 2014).

Estos estudios revelaron que si bien el tratamiento con los antimoniales pentavalentes presentó altas tasas de curación en pacientes coinfectados con *Leishmania*/VIH, se observó una mayor tasa de mortalidad producto de una alta sensibilidad de estos pacientes a los efectos tóxicos del antimonio (Laguna y col., 1999; 2003; Petter y col., 2011; Ritmeijer, 2013).

En cuanto al tratamiento con la anfotericina B, se han encontrado altas tasas de curación al igual que con los antimoniales pentavalentes. No obstante, a diferencia de estos, los efectos secundarios de la anfotericina B se han visto reducidos con el uso de formulaciones lipídicas, las cuales han contribuido ampliamente a reducir las dosis necesarias sin perder la eficacia (Cota y col., 2013; Kumar y col., 2009; Laguna y col., 2003; OMS, 2010). Por esta razón, la anfotericina B ha sido señalada como la primera línea de acción terapéutica en el tratamiento de pacientes coinfectados con *Leishmania*/VIH (Alvar y col., 2008; Diro y col., 2014; Van Griensven y col; 2013; 2014).

Por otro lado, si bien los estudios con la miltefosina son más escasos, se reportaron altas tasas de curación en pacientes que sufrían recaídas, en comparación con el tratamiento con otros fármacos. La experiencia con otros fármacos como la pentamidina o la paromomicina se limita a pocos casos clínicos, y estos se administran principalmente en combinación con otros fármacos y no como primera opción (Alvar y col., 2008; OMS; 2010). Por esta razón, se ha propuesto a la miltefosina como tratamiento profiláctico en pacientes coinfectados con *Leishmania*/VIH (OMS, 2010).

En este sentido, la profilaxis secundaria ha demostrado prolongar la supervivencia al reducir el número recaídas en pacientes coinfectados, además de reducir la posibilidad de transmisión de cepas resistentes (Alvar y col., 2008; Kumar y col., 2009; Van

Griensven y col., 2013; 2014). En la LV zoonótica, los parásitos son transmitidos de animales a humanos, y no entre seres humanos, lo que significa que la profilaxis puede completarse con cualquier fármaco, ya que no hay riesgo de propagación (Cruz y col., 2006; OMS, 2010). Basado en la experiencia de la leishmaniasis zoonótica en la cuenca mediterránea, la profilaxis recomendada por la OMS incluyen a la miltefosina y la anfotericina B en dosis subóptimas (Al-Mohammed y col, 2005; Durand, 1998; Lachaud, 2009). En los focos antroponóticos, donde los parásitos resistentes pueden transmitirse en ausencia de cualquier reservorio animal dentro del ciclo, se recomienda no utilizar profilaxis secundaria con medicamentos utilizados en los régimen terapéuticos convencionales (Alvar y col., 2008; Saint-Pierre-Chazalet y col., 2009; Sundar y col., 2007; OMS, 2007; Ostyn y col., 2015).

Adicionalmente, la OMS recomienda el inicio o mantenimiento de la terapia antirretroviral de alta eficiencia o HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*) para el tratamiento de la infección por el VIH, en conjunto con los fármacos leishmanicidas en pacientes coinfectados (OMS, 2010). Los fármacos que se usan como terapia antirretroviral han sido clasificado principalmente en 3 categorías según su mecanismo de acción: inhibidores nucleósidos de la transcriptasa reversa (INTR) como zidovudina, lamivudina y estavudina; inhibidores no nucleósidos de la transcriptasa reversa (INNTR) como nevirapina, efavirenz y delavirdina e inhibidores de la proteasa del VIH (IP) como indinavir, nelfinavir, saquinavir, ritonavir y lopinavir (Figura 4) (Bernal, 2016; Ribera y col., 2011; Romera y col., 2011). Estos compuestos suelen ser utilizados en regímenes de combinación de fármacos para lograr el mayor beneficio posible y para disminuir el riesgo de desarrollar resistencia (De Clercq, 2009).

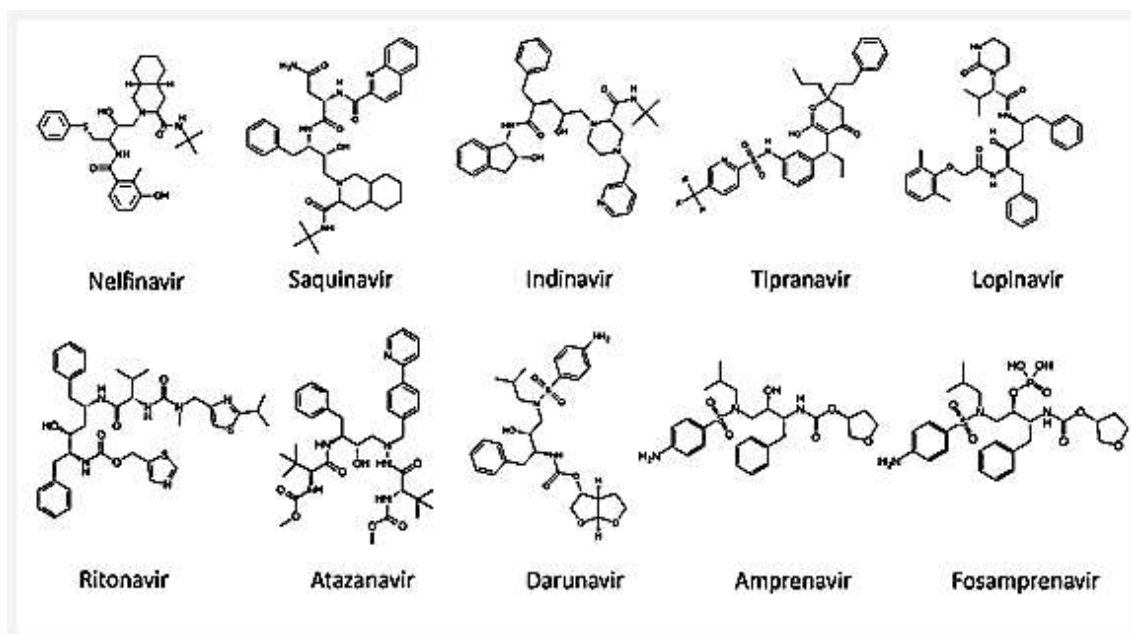


Figura 4. Estructuras de los Inhibidores de la Proteasa del VIH utilizados en la terapia HAART (Tomado de Serrano y col., 2012).

Desde la introducción de la terapia HAART, la incidencia de infecciones oportunistas, como la leishmaniasis en pacientes VIH-positivos se redujo considerablemente (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 observó 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.

En el caso específico de la coinfección por *Leishmania*/VIH, el inicio de la terapia HAART en el año 1997 contribuyó notablemente a la disminución de la incidencia de la coinfección por estos patógenos (Alvar y col., 1997; 2008; 2012; López-Veléz, 2003). Dicha disminución ha sido más relevante en la región Europea, sin embargo en otras regiones de bajos recursos como África y la India, donde el acceso a la terapia antirretroviral es limitada, el número de nuevos casos de coinfección por *Leishmania*/VIH

sigue en constante aumento, lo cual sigue siendo hoy en día un reto de gran importancia (Cruz y col., 2006; Diro y col., 2014).

En la región Africana, la terapia HAART fue introducida apenas en el año 2003. Tres años más tarde, se estimó que aproximadamente sólo unas 65000 personas se encontraba recibiendo la terapia HAART en toda la región, siendo esto un factor de riesgo para la alta incidencia de casos de coinfección por *Leishmania*/VIH (Cruz y col., 2006).

En Asia la terapia antirretroviral fue iniciada en algunos centros médicos a partir del año 2004. En la actualidad, el tratamiento y control de infecciones endémicas en esta región, como el SIDA y la leishmaniasis, es proporcionada por organizaciones internacionales como Médicos Sin Fronteras (MSF), la iniciativa de Drogas para Enfermedades Desatendidas (DNDi) y la OMS (Deniau y col., 2003; Lyon y col., 2003). No obstante, en algunas áreas poco pobladas de difícil acceso y con una alta incidencia de coinfección, el acceso a la terapia HAART sigue siendo mínima (Mengistu y Ayele, 2003; Van Griensven y Diro, 2012)

Dado que la terapia antirretroviral se encuentra principalmente asociada a estas organizaciones no gubernamentales, dichos programas cubren un pequeño número de pacientes, mientras que los programas gubernamentales están ausentes, presentan un mal funcionamiento o aún se encuentran en la primera fase de la aplicación (Van Griensven y col., 2014; OMS, 2010).

Si los pacientes no reciben el tratamiento HAART, aumentan las tasas de recaídas a un 60% en un plazo de 6 a 9 meses después de finalizado el tratamiento para la LV. En un estudio realizado por Pintado y col. (2001), se reportó que pacientes coinfectados con *Leishmania*/VIH sufrieron recaídas de la enfermedad a menos de 3 meses de haber culminado el tratamiento aparentemente exitoso de LV, con una reconstitución del sistema inmune y cargas virales indetectables en el momento de la recaída con la LV

(Pintado y col., 2001). Por esta razón, se ha sugerido que en regiones donde el recuento de células T CD4⁺ es difícil de obtener, dado las deficiencias en los sistemas de diagnóstico, la LV debe ser considerada como una enfermedad altamente riesgosa, y por tanto un punto válido para la administración de la terapia HAART (Van Griensven y col., 2010).

La restablecimiento de la inmunidad celular inducida por la terapia HAART parece ser el principal determinante en la reducción de infecciones oportunistas en individuos VIH-positivos (Alvar y col., 2008; Cruz y col., 2006). No obstante, se ha reportado que el uso de los IP's del VIH, como tratamiento antirretroviral, promueve la disminución de la carga parasitaria aun cuando el recuento de linfocitos T CD4⁺ se encuentra por debajo del límite establecido en pacientes coinfectados con *Leishmania*/VIH (Alvar y col., 2008; Van Griensven y col., 2012; 2014). Estos hallazgos condujeron a plantear que los IP's del VIH empleados en la terapia HAART, podrían tener un efecto directo sobre diferentes agentes patógenos como *Leishmania*.

1.5.1 Efecto anti-Leishmania de los IP's del VIH

Estudios pioneros del efecto de los IP's del VIH sobre *Leishmania* fueron realizados en el año 2005 por Savoia y col., quienes 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 varios IP's, 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 derivados de monocitos humanos

(MDM's) coinfectados o no con el virus. De igual forma, los autores encontraron una inhibición de la replicación viral producto del tratamiento con los IP's en MDM's infectados con *Leishmania*, evidenciando que la actividad leishmanicida de los IP's sobre las células no disminuye en presencia del virus.

Posteriormente, Santos y col. (2009) reportaron el efecto de lopinavir, nelfinavir, amprenavir, saquinavir e indinavir sobre una especie de importancia en América que produce manifestaciones cutáneas de la enfermedad, *L. amazonensis*. Este grupo de investigación encontró que de todos los inhibidores estudiados, el nelfinavir mostró un mayor efecto inhibitorio sobre la proliferación de promastigotes y una reducción del 90% en el porcentaje de infección de macrófagos por amastigotes. Al evaluar el efecto de estos compuestos 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, presentan un efecto antiproliferativo de manera dosis-dependiente en cultivos *in vitro* de seis especies de *Leishmania*, incluyendo *L. donovani* 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 de manera dosis-dependiente la actividad tipo aspartil proteasa previamente reportada en el parásito (Valdivieso y col., 2007).

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 del VIH. 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 que la Ddi1-like de *L. major* es una proteasa funcional capaz de hidrolizar péptidos específicos de la proteasa del VIH y de proteasas tipo catepsina D, y además su actividad es inhibida por el nelfinavir.

Tomando en cuenta que los IP's del VIH bloquean la actividad enzimática del dominio retroviral (RP) de la Ddi1-like de *Leishmania*, Serrano y col (2012) evaluaron mediante docking molecular la afinidad de los diez IP's del VIH utilizados en la terapia HAART hacia el dominio RP de la Ddi1 de *Leishmania*. Los resultados obtenidos revelan que el nelfinavir fue el antirretroviral que presentó una mayor selectividad hacia el dominio RP de la DDi1 de *Leishmania*. (Figura 5). En concordancia con estos hallazgos, el nelfinavir fue el antirretroviral que presentó una mayor efectividad sobre la

proliferación del parásito y la actividad enzimática tipo aspartil proteasa en el parásito (Valdivieso y col., 2010; Perteguer y col., 2012).

No obstante, desde el año 2003, los antirretrovirales que se encuentran disponibles para el tratamiento del VIH en países de recursos limitados es el lopinavir, seguido por el darunavir y el atazanavir, impulsados como fármacos de segunda y tercera línea para el tratamiento contra el VIH (Alvar y col., 2008; Van Griensven, 2013). Los hallazgos realizados hasta la fecha indican que dichos fármacos ofrecidos en la actualidad en países de bajos recursos, en donde la incidencia de la coinfección por *Leishmania*/VIH es alta, no son la mejor opción terapéutica. El lopinavir, el darunavir y el atazanavir, no fueron los IP's del VIH que presentaron la mejor efectividad sobre el crecimiento del parásito, ni la menor afinidad hacia el dominio RP de la enzima en el parásito (Serrano y col., 2012).

Antirretroviral	Energía de Unión (Kcal/mol)	Desviación	Ki (μM)
Nelfinavir	-6.36	0,50	29
Saquinavir	-5.45	0.44	134
Indinavir	-5.34	0.37	147
Tipanavir	-3.85	0.56	2000
Lopinavir	-3.84	0.50	2040
Ritonavir	-2.72	0.62	17100
Atazanavir	-2.42	0.65	28100
Darunavir	-1.59	0.36	78800
Amprenavir	-1.57	0.53	97400
Fosamprenavir	-1.29	0.41	13800

Figura 5. Compuestos evaluados en el docking molecular. Es posible observar los valores de energía de unión y la constante de inhibición (Ki) para cada IP's del VIH empleado (Tomado de Serrano y col., 2012).

Si bien estos hallazgos son de gran importancia en vías de mejorar la quimioterapia actual en pacientes con leishmaniasis y coinfectados con VIH, ha sido reportado que el efecto leishmanicida de los antirretrovirales sobre diferentes especies del parásito, se encuentra entre 10 – 26 μM (Santos y col., 2009; Savoia y col., 2005; Trudel y col., 2008; Valdivieso y col., 2010) mientras que, la concentración en el plasma sanguíneo del nelfinavir, el IP más efectivo sobre el parásito, se encuentra entre 1,7 – 7 μM , suficiente para inhibir la replicación viral (IC_{50} 14 nM) pero no para bloquear el crecimiento del parásito (Andrews y col., 2006), lo que hace necesario la búsqueda de nuevas alternativas farmacológicas que mejoren el efecto inhibitorio de este fármaco sobre la proliferación de *Leishmania*.

1.5.2 Combinaciones de fármacos sobre Leishmania

En la última década, los estudios experimentales para identificar nuevos tratamientos leishmanicidas han estado dirigidos a la búsqueda de combinaciones sinérgicas. El sinergismo es un tipo de interacción entre fármacos, en donde la acción combinada de dos o más fármacos produce un efecto total mayor al que producen cada fármaco por separado, empleando para ello fármacos de diferentes estructura química y con diferentes blancos de acción (Olliaro y Taylor, 2003), a diferencia de la combinación aditiva y antagonista, en donde el uso de los fármacos de forma conjunta es indiferente o producen efectos contrarios, respectivamente. Algunas de las ventajas de la combinación de fármacos incluyen el aumento del efecto terapéutico deseado, 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, el Mal de Chagas y el Paludismo (Van Griensven y Diro, 2012).

Tomando en cuenta la falta de un tratamiento específico para la coinfección por *Leishmania*/VIH, además de las altas tasa de recaídas de la enfermedad una vez culminado el tratamiento recomendado, surge la necesidad de implementar nuevas estrategias terapéuticas. En este sentido, la OMS ha recomendado la introducción de la terapia de combinación de fármacos en el tratamiento de la LV y LC, tanto en pacientes coinfectados o no con el VIH, con la finalidad de reducir al mínimo la aparición de cepas resistentes y reducir las tasas de recaídas.

Aunque son escasos los ensayos clínicos que se han realizado hasta la fecha, de posibles terapias de combinación en pacientes coinfectados con *Leishmania*/VIH, en la práctica se administran algunos fármacos en conjunto en pacientes con múltiples recaídas (Omollo y col., 2011; Rybniker y col., 2010; Wasunna y col., 2016).

Estudios pioneros sobre la combinación de compuestos en *Leishmania* fueron realizados por Chungue y col. (1990) y Neal y col. (1995), quienes evaluaron en ensayos clínicos, el efecto del estibogluconato de sodio en combinación con la paromomicina y el alopurinol, encontrando que con estas combinaciones de fármacos los pacientes se recuperaban más rápido y no sufrían recaídas en un periodo de 12 meses. A partir los trabajos de Chungue y col. (1990) y Neal y col. (1995), se consideró incluir las combinaciones de fármacos en el tratamiento de pacientes con múltiples recaídas, no sólo en pacientes con leishmaniasis sino también coinfectados con el VIH. Desde entonces, se han realizado numerosos estudios clínicos y ensayos *in vitro*, en donde se evalúa la eficacia de la combinación entre compuestos comúnmente empleados para el tratamiento de la leishmaniasis.

En casos clínicos se ha evaluado la eficacia de la combinación de varios fármacos disponibles en el mercado, para el tratamiento de la coinfección por *Leishmania*/VIH. El primero de ellos fue realizado en 1994 por Laguna y col., quienes realizaron el seguimiento de 11 pacientes tratados con la combinación del alupurinol con el glucantime por al menos 4 meses. De todos los pacientes evaluados, sólo 5 presentaron cura parasitológica en el tiempo de tratamiento evaluado. A partir de entonces, se han realizado distintos ensayos clínicos de combinaciones entre fármacos leishmanicidas, entre los cuales se incluyen la combinación del pentostam con el fluconazol (Rybniker y col., 2010), la miltefosina con anfotericina B (Omollo y col., 2010) y el pentostam con la anfotericina B (Wasunna y col., 2016). Dichos tratamientos, si bien inducen cura parasitológica en al menos el 65% de los casos, la mayoría de los pacientes coinfectados presentan recaídas de la enfermedad una vez culminado el tratamiento. Además, se ha observado que la probabilidad de sufrir recaídas es mayor si no se sigue un tratamiento profiláctico (Laguna y col., 1994; Omollo y col., 2011; Rybniker y col., 2010; Wasunna y col., 2016).

Considerando que los ensayos clínicos realizados hasta la fecha tienen una eficacia variable, no previenen futuras recaídas de la enfermedad y suelen realizarse de manera experimental en pacientes con un cuadro clínico más complejo, es necesario realizar ensayos *in vitro* con combinaciones de fármacos que brinden mayores evidencias de posibles combinaciones que puedan emplearse en ensayos clínicos.

Uno de los primeros trabajos en donde se evaluó la combinación *in vitro* de fármacos sobre *Leishmania* fue realizado en el 2006 por Seifert y Croft. Estos investigadores evaluaron el efecto de la combinación entre la miltefosina y otros compuestos leishmanicidas como la anfotericina B, el pentostam y la paromomicina, sobre amastigotes intracelulares de *L. donovani*. Este grupo de investigación encontró un

efecto sinérgico *in vitro* de la combinación de miltefosina con el pentostam mientras que, las otras combinaciones se clasificaron como aditivas. De igual manera, Seifert y Croft (2006) evaluaron la combinación de la miltefosina con la anfotericina B, el pentostam y la paromomicina en ratones BALB/c infectados con *L. donovani*. En el modelo murino, fue posible observar la potenciación del efecto leishmanicida de la miltefosina al combinarla con la anfotericina B en altas dosis y con la paromomicina (Seifert y Croft, 2006).

De igual forma, se suelen realizar combinaciones de fármacos que se encuentran disponibles en el mercado, con compuestos prometedores que tenga un efecto sobre el parásito. En este sentido, Seifert y col. (2011), ha reportado un efecto sinérgico de la combinación de la sitamaquina, un derivado de la 8-aminoquinolina que se encuentra en fase 2B de estudios clínicos para el tratamiento de la leishmaniasis, con la miltefosina sobre la infección *in vitro* de macrófagos murinos por amastigotes de *L. donovani* (Carvalho y col., 2011; Seifert y col., 2011; Yeates, 2002; Wasunna, 2005).

En el 2009, Serrano-Martín y col., reportaron que la combinación de la amiodarona, un agente antiarrítmico con fuerte actividad anti-*Leishmania*, con la miltefosina en *L. mexicana*, 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 encontraron que la aplicación de este esquema terapéutico induce cura parasitológica en un 90% en un modelo murino de LC, siendo esta la primera vez que se evidencia un efecto sinérgico *in vivo* en un modelo de LC (Serrano-Martín y col., 2009).

Si bien existen varios estudios que demuestran el efecto sinérgico de algunas combinaciones entre fármacos leishmanicidas y compuestos prometedores (Carvalho y col., 2011; Seifert y Croft, 2006; Seifert y col., 2011; Serrano-Martin y col., 2009), no fue

sino hasta el año 2015, cuando se realizaron las primeras combinaciones de fármacos leishmanicidas con los IP's del VIH.

Estudios pioneros llevados a cabo en el Laboratorio de Biología Celular de Parásitos del Instituto de Biología Experimental de la UCV, evaluaron la combinación del nelfinavir con la anfotericina B o con la miltefosina sobre *L. mexicana*, especie del parásito que causa manifestaciones cutáneas de la enfermedad. Los resultados obtenidos muestran un efecto sinérgico de la combinación de estos compuestos sobre el porcentaje de infección de macrófagos por amastigotes del parásito, con valores de FIC de 0,61 y 0,85 para la combinación con anfotericina B y miltefosina, respectivamente. Con ambas combinaciones se logró potenciar el efecto anti-*Leishmania* del antirretroviral al emplearlo en conjunto con los fármacos leishmanicidas; adicionalmente, se logró disminuir las dosis necesarias de los compuestos al utilizarlos en conjunto para inhibir el crecimiento del parásito. Estos trabajos abren la posibilidad de estudiar el efecto de estas combinaciones sobre otras especies del parásito así como, realizar futuras combinaciones de antirretrovirales con otros fármacos comúnmente empleados para el tratamiento de la leishmaniasis, con la finalidad de diseñar un esquema terapéutico más eficaz y menos tóxicos para los pacientes coinfectados con *Leishmania*/VIH.

2. JUSTIFICACIÓN

El panorama epidemiológico de la coinfección por *Leishmania* y el VIH ha cambiado considerablemente desde los primeros casos reportados a mediados de los años 80. Como ya se ha mencionado, debido a la creciente expansión geográfica de ambas infecciones, es cada vez más frecuente encontrar pacientes coinfectados con *Leishmania*/VIH, en particular en zonas endémicas. Sumado a esto, la falta de medidas de control epidemiológico eficaces ha ocasionado un aumento de los casos a nivel global, dando lugar a la aparición de nuevos casos de leishmaniasis en pacientes VIH-positivos cada vez mas frecuentes (OMS, 2010). Adicionalmente, es aún más alarmante el hecho de que las manifestaciones clínicas más comunes de la leishmaniasis que se observan en pacientes infectados con VIH sean viscerales, la cual presenta una alta mortalidad y morbilidad sino es tratada de manera oportuna. La LV es producida por *L. donovani* y *L. infantum*, las cuales presentan diferentes características intraespecies; *L. infantum* es capaz de producir lesiones cutáneas y manifestaciones viscerales de la enfermedad, a diferencia de *L. donovani* donde sólo se producen manifestaciones viscerales. Además de ello, *L. infantum* es responsable de la mayoría de los casos asintomáticos que se presentan en la región mediterránea, constituyendo un factor de riesgo en pacientes inmunodeprimidos.

Las herramientas de control de la coinfección por *Leishmania*/VIH deben comprender un sistema de detección temprana de los casos, con sistemas de diagnóstico y seguimiento eficaces, así como un tratamiento farmacológico temprano y efectivo. En la actualidad no existe un tratamiento específico para estos pacientes, por el contrario son tratados con diferentes opciones de fármacos según su historia clínica, estado inmunológico y respuesta a tratamientos previos. La presencia del virus y el parásito en un mismo individuo, trae como consecuencia cambios importantes en la fisiología del

hospedador, traducíéndose en una infección inusual y recurrente con altas cargas parasitarias, además de la posibilidad de producirse una activación del virus latente, siendo esto un punto esencial a tomar en cuenta en el momento de diseñar un esquema terapéutico específicos para pacientes coinfectados con *Leishmania*/VIH.

Una de las estrategias que se ha adoptado a nivel mundial para el tratamiento de pacientes coinfectados con ambos patógenos es el uso de combinaciones de fármacos, con el objetivo de aumentar la eficacia terapéutica, de reducir las recaídas de la LV y la toxicidad de los compuestos. Para esto, es necesario evaluar cuales combinaciones de fármacos pudiesen ser más efectivas y menos tóxicas, sobre diferentes especies de *Leishmania* en particular aquellas causantes de las manifestaciones viscerales, empleando sistemas *in vitro* y modelos murinos de LV, que puedan validar su uso en casos clínicos.

Por las razones antes expuestas, el siguiente trabajo se planteó evaluar el efecto combinado del nelfinavir con la anfotericina B y con la miltefosina, sobre infecciones *in vitro* de macrófagos murinos por especies viscerotópicas del parásito, *L. donovani* y *L. infantum*, así como, realizar una primera aproximación de la combinación de estos compuestos en un modelo murino de LV.

3. OBJETIVO GENERAL

Estudiar el posible efecto sinérgico del Nelfinavir al combinarlo con los fármacos leishmanicidas, Anfotericina B y Miltefosina, sobre *Leishmania donovani* y *Leishmania infantum*, especies del parásito causantes de las manifestaciones viscerales de la enfermedad.

CAPITULO I

**Estudio de la susceptibilidad *in vitro* de *Leishmania donovani* hacia la
combinación del NFV+AMB y del NFV+MTF**

I.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

Evaluar el efecto de la combinación de NFV+AMB y NFV+MTF sobre la proliferación *in vitro* de promastigotes de *L. donovani* y sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos murinos de la línea celular J774 por amastigotes de *L. donovani*.

I.2 MATERIALES Y MÉTODOS

I.2.1 *Compuestos*

El Nelfinavir (NFV) fue donado por la empresa Pfizer (Código: AG1343) para su uso en investigación. La Anfotericina B (AMB) (Fungizone; Código: A2411) y la Miltefosina (MTF) (hexadecil-fosfocolina; Código: M5571) se obtuvieron comercialmente por Sigma Aldrich (St. Louis, MO).

I.2.2 *Cultivo de parásitos*

Para los ensayos *in vitro* con *L. donovani* (MHOM/IN/80/DD8), se emplearon promastigotes del parásito suministrados por el Laboratorio de Biología Celular de Parásitos del Instituto de Biología Experimental de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela. Los parásitos se cultivaron en frascos T25 de 25 cm³ en medio Schneider (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) (Gibco, Paisley, UK) inactivado a 56 °C por 45 minutos y 100 UI/ml penicilina y 100 µg/ml estreptomicina (Gibco, Paisley, UK) a temperatura ambiente y sin agitación.

I.2.3 Cultivo de macrófagos murinos

Se cultivaron macrófagos murinos de la línea celular J774, en frascos T25 de 25 cm³ en medio RPMI-1640 con 10% de SFB, 100 UI/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 2 mM de L-glutamina (Gibco Paisley, UK), incubados en una cámara de crecimiento con una atmósfera de CO₂ al 5% y a una temperatura de 37 °C. Los repiques se realizaron cada 3 días, cuando los cultivos celulares se encontraban en confluencia.

I.2.4 Efecto de la combinación del NFV+AMB y del NFV+MTF sobre la proliferación in vitro de promastigotes de L. donovani

El efecto de los compuestos sobre la proliferación de promastigotes de *L. donovani*, se evaluó mediante el método cuantitativo del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Mosmann, 1983).

En placas estériles de 96 pozos, se sembró una densidad celular de 5x10⁵ promastigotes/pozo en medio RPMI sin rojo fenol suplementado con 10% de SFB, 100 UI/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 2 mM de L-glutamina, en presencia de los compuestos solos o combinados, incluyendo el control sin tratamiento, por 48 horas y a temperatura ambiente. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se añadió 100 µl de MTT (Research Organic, EU) (5 mg/ml) a cada uno de los pozos y se incubó por 3 horas en oscuridad y a temperatura ambiente. Una vez finalizado el tiempo de incubación, se descartó el medio, se añadió 100 µl de DMSO puro y se incubó por 15 minutos bajo las mismas condiciones. Finalmente, se determinó la intensidad del color a 586 nm en un lector ELISA-TECAN.

Los compuestos fueron evaluados solos y en combinación. El rango de concentraciones utilizadas para los compuestos evaluados individualmente fue de 3 a 30 μM para el NFV y la MTF y de 0,03 a 0,5 μM para la AMB. Para la escogencia de las concentraciones de cada compuesto a ser evaluado en combinación (Tabla 2), se determinaron los valores del IC_{50} y la mínima concentración inhibitoria (MIC) que causa al menos el 90% de inhibición de la proliferación celular de cada compuesto. Se ensayaron combinaciones de NFV+AMB y NFV+MTF a concentraciones por debajo del MIC para cada uno de los compuestos en el caso de los promastigotes del parásito. Los resultados fueron graficados utilizando el programa Sigmaplot 12.0 y para el cálculo del IC_{50} se utilizó la función “*Four Parameter Logistic Curve*”.

Tabla 2. Concentraciones ensayadas de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF sobre la proliferación *in vitro* de promastigotes de *L. donovani*

Combinación	[μM]
NFV + AMB	11 NFV + 5×10^{-3} AMB
	9 NFV + 7×10^{-3} AMB
	5 NFV + 0,013 AMB
NFV + MTF	12 NFV + 8 MTF
	10 NFV + 10 MTF
	8 NFV + 16 MTF

Para determinar el tipo de interacción existente entre el NFV+AMB y el NFV+MTF se estimó el índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) según la fórmula descrita por Hallander y col. (1982) (Figura 6). El valor del índice FIC se usa comúnmente para categorizar la interacción de los dos medicamentos evaluados y estima la combinación de compuestos que produjo el mayor cambio del MIC con respecto al compuesto solo.

Para calcular el índice FIC, se utilizaron los valores de MIC según la ecuación: $\Sigma FIC = [(MIC \text{ de la combinación A}) / (MIC \text{ de A sola})] + [(MIC \text{ de la combinación B}) / (MIC \text{ de B sola})]$ (Figura 6), sobre la proliferación celular de los promastigotes del parásito. 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. 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. Para una combinación aditiva, la isóbola es una recta mientras que, si la combinación resulta ser sinérgica o antagonista, las isóbolas serán cóncava o convexa, respectivamente.

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

Figura 6. Fórmula descrita por Hallander y col. (1982) para el cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) empleado en promastigotes *Leishmania sp.*

I.2.5 Infección de macrófagos murinos de la línea celular J774

Se infectaron macrófagos murinos de la línea celular J774 con promastigotes de *L. donovani* (MHOM/IN/80/DD8) en fase estacionaria de crecimiento. Para ello, se sembró una densidad celular de 150.000 macrófagos/pozo sobre laminillas colocadas en placas de cultivo de 6 pozos estériles y se incubaron en medio RPMI-1640 suplementando con 10% SFB, 100 UI/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 2 mM L-glutamina durante 24 horas a 37 °C y una atmósfera de 5% de CO₂. Posteriormente, se añadieron promastigotes en fase estacionaria de crecimiento, en una relación de 10 parásitos por

cada macrófago y se incubaron por 5 horas bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados rápidos con medio RPMI-1640 fresco y se mantuvieron los cultivos bajo las mismas condiciones.

1.2.6 Efecto de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF sobre el porcentaje de infección in vitro de macrófagos murinos por amastigotes de L. donovani

Para evaluar el efecto de los compuestos solos y combinados sobre el porcentaje de infección de macrófagos murinos, se añadieron las diferentes concentraciones a evaluar a macrófagos previamente infectados con amastigotes de *L. donovani*, y se incubaron a 37 °C y a una atmósfera de 5% de CO₂ durante 48 horas. Para el conteo y visualización de los amastigotes intracelulares se aplicó la tinción Giemsa (Merck Millipore, USA). Para ello, luego de transcurrido las 48 horas de la incubación con los compuestos, se retiró el medio de los pozos y se lavó 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 fijó con metanol absoluto frío por 15 minutos y se añadió el colorante Giemsa diluido 1/20 en agua de destilada por 15 minutos, se retiró el colorante y se lavó nuevamente con PBS.

Se realizó el conteo del número de macrófagos infectados y no infectados para determinar el porcentaje de infección y del número de amastigotes intracelulares presentes en 100 macrófagos en los cultivos tratados y no tratados utilizando el objetivo de inmersión (100x) de un microscopio óptico. Los resultados fueron graficados utilizando el programa *Sigmaplot 12.0* y para el cálculo del IC₅₀ se utilizó la función “*Four Parameter Logistic Curve*”.

El intervalo de concentraciones ensayadas de los compuestos individuales fue de 1 a 10 μM para el NFV y la MTF y de 0,001 a 0,01 μM para la AMB. Para evaluar el efecto de la combinación de los compuestos, se establecieron concentraciones por debajo de los IC_{50} de cada uno de los compuestos previamente calculados sobre *L. donovani*. Las concentraciones ensayadas para ambas combinaciones sobre el porcentaje de infección de macrófagos por amastigotes de *L. infantum* se encuentran en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentraciones ensayadas de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos de la línea celular J774 por amastigotes de *L. donovani*.

Combinación	[μM]
NFV + AMB	0,6 NFV + 8×10^{-5} AMB
	0,4 NFV + 2×10^{-4} AMB
	0,05 NFV + 5×10^{-4} AMB
NFV + MTF	0,55 NFV + 0,2 MTF
	0,19 NFV + 0,6 MTF
	0,09 NFV + 1,2 MTF

Para calcular el índice FIC, se utilizaron los valores del IC_{50} combinados según la ecuación: $\Sigma\text{FIC} = [(\text{IC}_{50} \text{ de la combinación A}) / (\text{IC}_{50} \text{ de A sola})] + [(\text{IC}_{50} \text{ de la combinación B}) / (\text{IC}_{50} \text{ de B sola})]$ (Figura 7), sobre el porcentaje de infección de macrófagos por amastigotes de *L. donovani*. Para el cálculo del IC_{50} combinado se procedió a realizar una curva dosis-respuesta del efecto del NFV en presencia de la AMB ó de la MTF sobre los amastigotes intracelulares, con la finalidad de calcular el IC_{50} combinado del NFV en presencia de la otra droga. De igual manera, se procedió a calcular el IC_{50} combinado de la AMB y de la MTF en presencia del NFV sobre los amastigotes intracelulares.

Si el valor del índice FIC resulta ser mayor a 1, la combinación se clasificará 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. Finalmente, si los isobogramas resultan en una isóbola recta la combinación se clasificará como aditiva mientras que, si la combinación resulta ser sinérgica o antagonista, las isóbulas serán cóncava o convexa, respectivamente.

$$\sum FIC = \frac{IC_{50} \text{ combinado de A}}{IC_{50} \text{ A sin combinar}} + \frac{IC_{50} \text{ combinado de B}}{IC_{50} \text{ B sin combinar}}$$

Figura 7. Fórmula descrita por Hallander y col. (1982) para el cálculo del índice de concentración inhibitoria fraccional (FIC) empleado en amastigotes intracelulares de *Leishmania sp.*

I.3 RESULTADOS

I.3.1 Efecto del Nelfinavir, la Anfotericina B y la Miltefosina sobre la proliferación *in vitro* de promastigotes de *L. donovani*

Se evaluó el efecto inhibitorio del NFV, de la AMB y de la MTF sobre la proliferación de promastigotes de *L. donovani* (MHOM/IN/80/DD8) empleando el método del MTT. Se observó una inhibición dosis-dependiente de la proliferación celular con los 3 compuestos ensayados (Figura 8), estimándose un IC₅₀ de 10,93 ± 0,16 µM para el NFV, de 0,91 ± 0,01 µM para la AMB y de 11,27 ± 0,25 µM para la MTF (Tabla 4).

A concentraciones superiores a 20 µM, se alcanzó cerca del 90% de inhibición del crecimiento celular para el NFV, estableciéndose este valor como la mínima concentración inhibitoria (MIC) de este compuesto sobre la proliferación *in vitro* de promastigotes de *L. donovani* (Figura 8, Tabla 4). En el caso de la AMB, fue posible alcanzar porcentajes de inhibición cercanos al 90% a concentraciones superiores a 0,3 µM, considerando este valor como el MIC de la AMB sobre la forma promastigote de *L. donovani*. Por último, el MIC establecido para la MTF fue de 30 µM sobre la proliferación del parásito.

Tabla 4. Efecto del NFV, AMB y MTF sobre la proliferación *in vitro* de promastigotes de *L. donovani*.

Compuesto	Promastigotes	
	IC ₅₀ (µM)	MIC (µM)
NFV	10,93 ± 0,16	20 ± 1,15
AMB	0,091 ± 0,011	0,3 ± 0,002
MTF	11,27 ± 0,25	30 ± 3,5

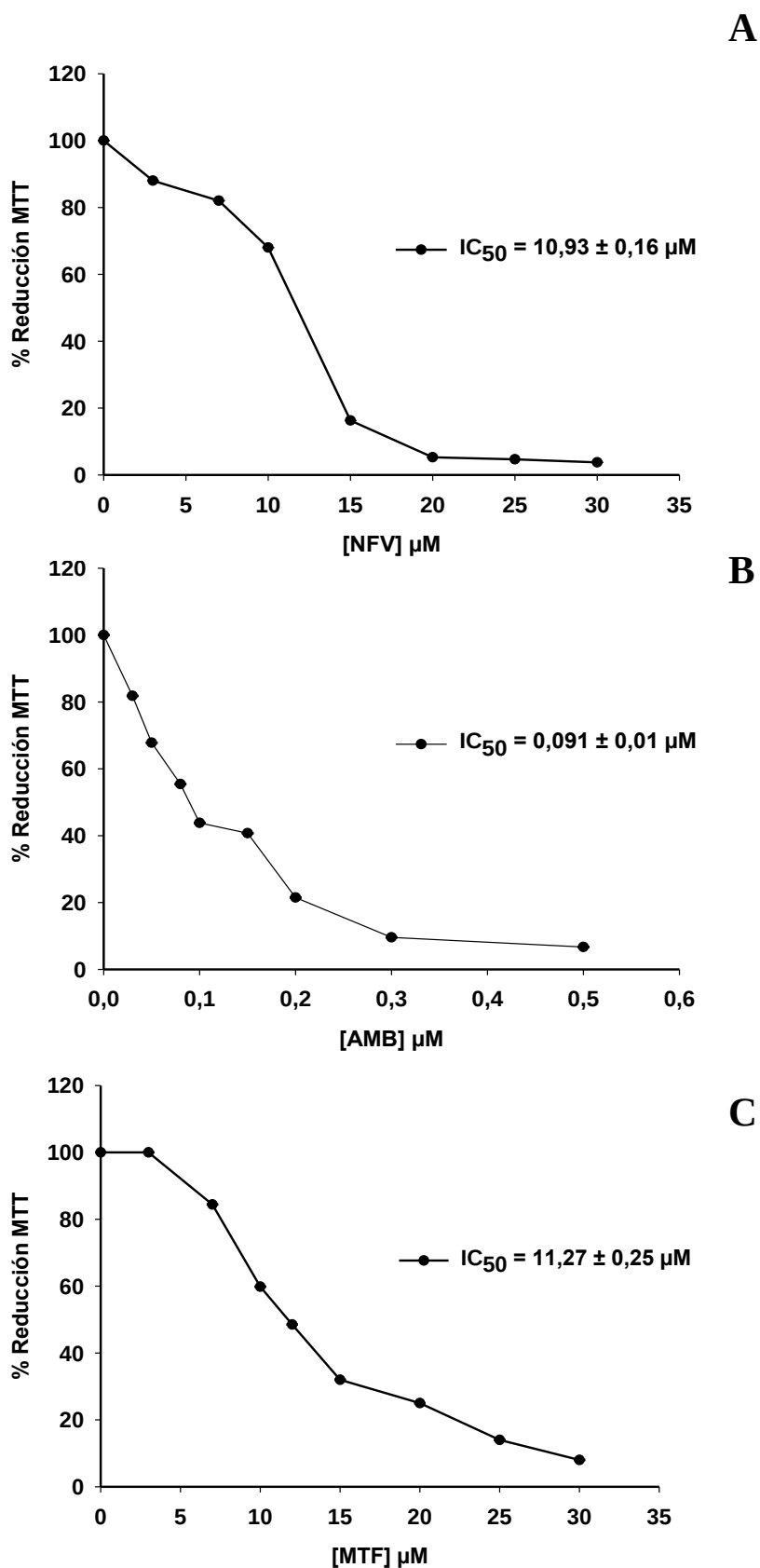


Figura 8. Efecto del NFV (A), AMB (B) y MTF (C) sobre la proliferación *in vitro* de promastigotes de *L. donovani*. La inhibición del crecimiento celular se evaluó *in vitro* mediante la reducción del MTT como se indica en materiales y métodos. Los datos mostrados son el resultado de tres experimentos independientes.

1.3.2 Efecto de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF sobre la proliferación *in vitro* de promastigotes de L. donovani

Con el fin de evaluar si la eficacia de los compuestos aumenta cuando se usan en combinación sobre la proliferación *in vitro* de promastigotes de *L. donovani*, se determinaron los valores FIC para las distintas combinaciones de compuestos establecidas en este trabajo (Tabla 2).

El valor FIC promedio obtenido de las combinaciones ensayadas del NFV+AMB fue de $0,43 \pm 0,1$ (Figura 9A), encontrándose un 95% de inhibición de la proliferación *in vitro* de los promastigotes de *L. donovani*, a todas las concentraciones ensayadas. Al construir el isoblograma, se observó una isóbola cóncava, característica de una interacción sinérgica entre los compuestos.

Para la combinación de NFV+MTF, se encontró un valor de FIC menor a 1 cuando las drogas se utilizaron en combinación ($FIC = 0,88 \pm 0,05$) (Figura 9B). En esta oportunidad, se alcanzó un 90% de inhibición en la proliferación *in vitro* de los promastigotes de *L. donovani* a todas las concentraciones ensayadas. Al construir el isoblograma se observó una isóbola cóncava, menos pronunciada que la anterior (Figura 9B).

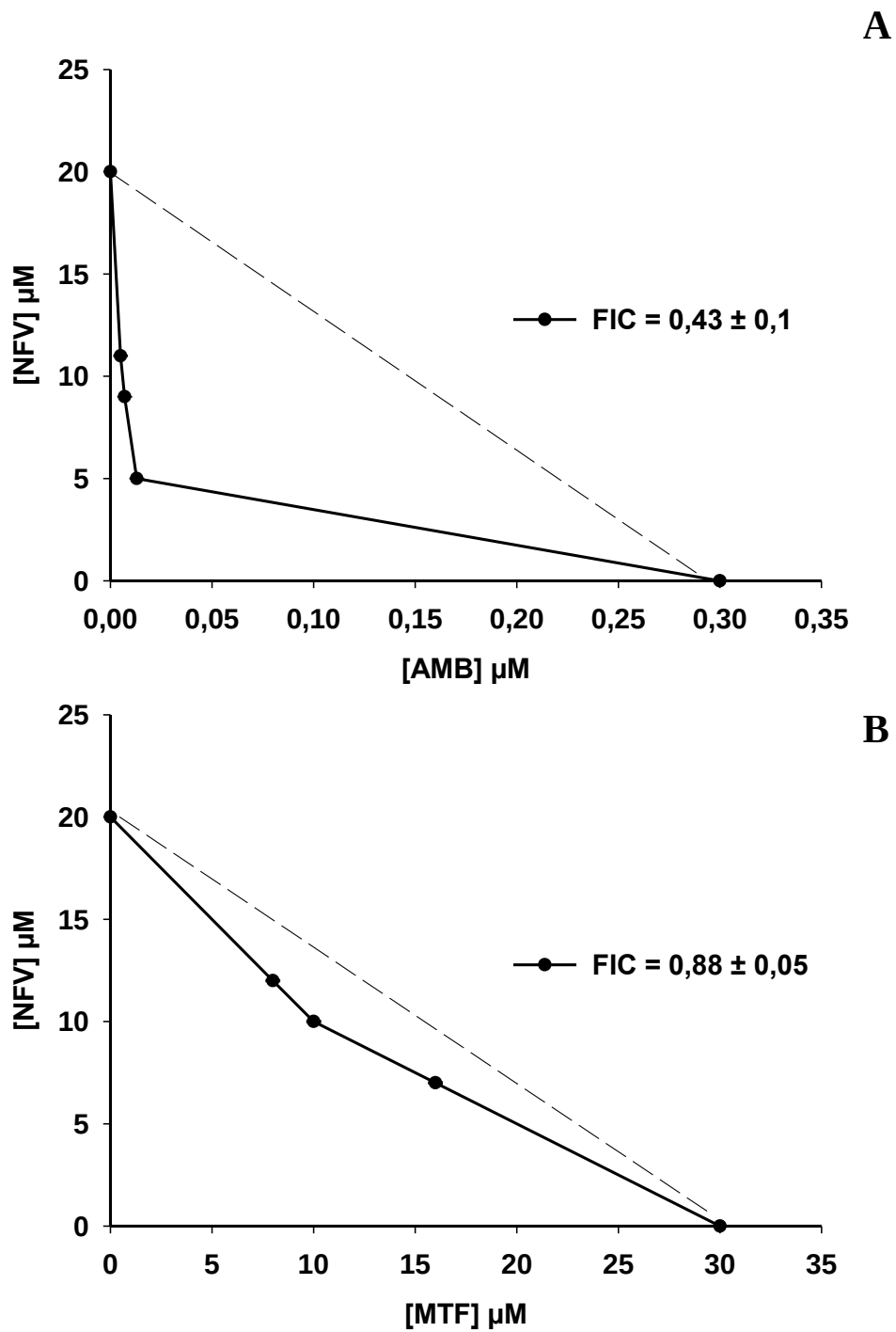


Figura 9. Isobologramas de la combinación de NVF+AMB (A) y NVF+MTF (B) sobre la proliferación *in vitro* de promastigotes de *L. donovani*. La inhibición de la infección se evaluó *in vitro* como se indica en materiales y métodos. La línea punteada representa un efecto aditivo teórico entre las drogas, mientras que la línea sólida muestra un efecto sinérgico de la combinación. Los resultados mostrados corresponden a tres experimentos independientes.

1.3.3 Efecto del Nelfinavir, la Anfotericina B y la Miltefosina sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos murinos por amastigotes de *L. donovani*

Se estudió el efecto del NFV, la AMB y la MTF sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos murinos de la línea celular J774 por amastigotes de *L. donovani*. Los compuestos evaluados en este trabajo presentaron un efecto dosis-dependiente, capaz de reducir el porcentaje de infección de los macrófagos por amastigotes del parásito (Tabla 5, Figura 10). El NFV disminuyó notablemente el porcentaje de infección de las células hasta un 8% de infección respecto al control sin tratamiento, estimándose un IC₅₀ de $0,89 \pm 0,15 \mu\text{M}$ para el antirretroviral. Es importante señalar que se alcanzó cerca del 90% de inhibición a concentraciones mayores a $6 \pm 1,89 \mu\text{M}$ para el NFV (Figura 10).

La AMB resultó ser el compuesto más eficiente, con un IC₅₀ estimado de $6,1 \times 10^{-4} \pm 2,3 \times 10^{-4} \mu\text{M}$, mientras que la MTF presentó un IC₅₀ de $2,90 \pm 0,13 \mu\text{M}$ (Tabla 5). A medida que aumenta la concentración de ambos compuestos, el porcentaje de infección de los macrófagos disminuye considerablemente, alcanzando un MIC de $0,01 \pm 3,1 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ para la AMB y de $10 \pm 1,28 \mu\text{M}$ para la MTF.

Tabla 5. Efecto del NFV, la AMB y la MTF sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos murinos de la línea celular J774 por amastigotes de *L. donovani*.

Compuesto	<i>Amastigotes</i>	
	IC ₅₀ (μM)	MIC (μM)
NFV	$0,89 \pm 0,15$	$6 \pm 1,89$
AMB	$6,1 \times 10^{-4} \pm 2,3 \times 10^{-4}$	$0,01 \pm 3,1 \times 10^{-3}$
MTF	$2,90 \pm 0,13$	$10 \pm 1,28$

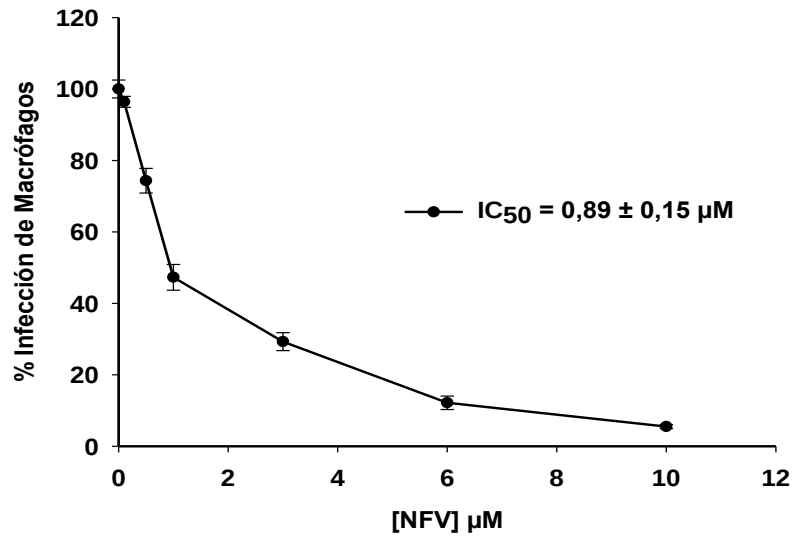
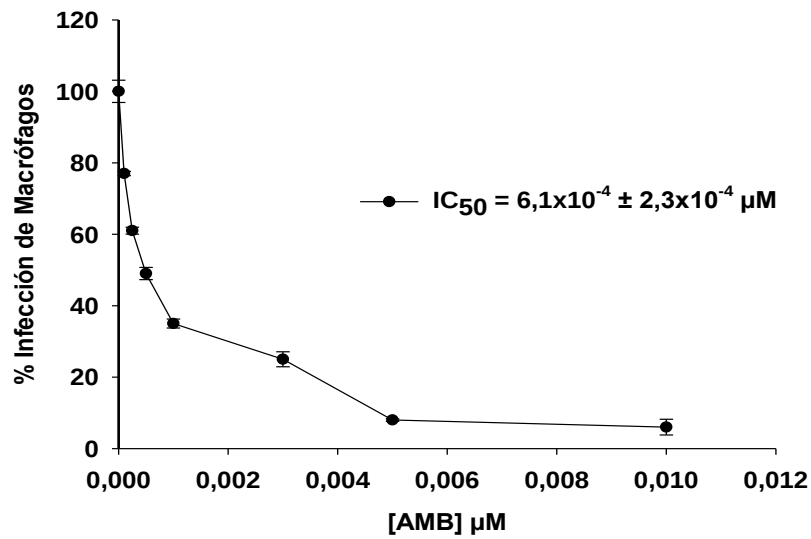
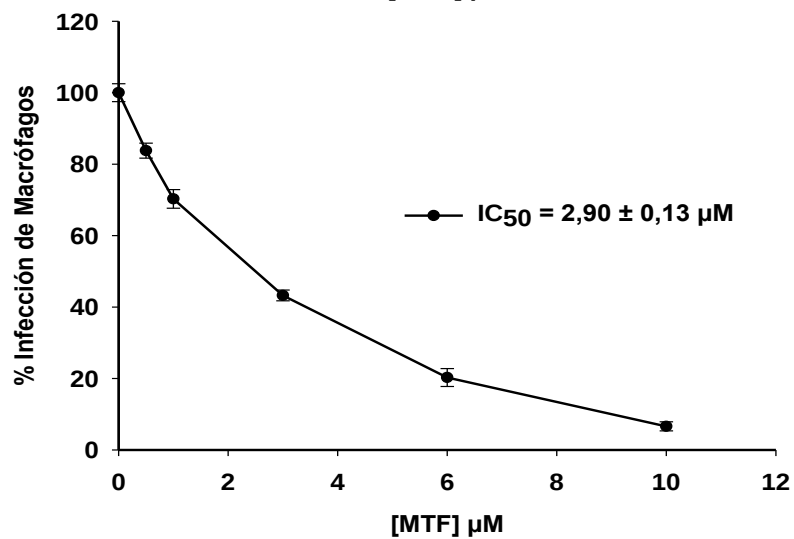
A**B****C**

Figura 10. Efecto del NFV (A), AMB (B) y MTF (C) sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos de la línea celular J774 por amastigotes de *L. donovani*. La inhibición de la infección de macrófagos se evaluó *in vitro* como se indica en materiales y métodos. Los datos mostrados son el resultado de tres experimentos independientes.

1.3.4 Efecto de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF sobre el porcentaje de infección in vitro de macrófagos por amastigotes de L. donovani

El efecto de la combinación de estos compuestos también se evaluó sobre el porcentaje de infección *in vitro* por amastigotes intracelulares de *L. donovani*. El valor FIC obtenido para las combinaciones de NFV+AMB ensayadas fue de $0,32 \pm 0,09$ y de $0,57 \pm 0,01$ para la combinación de NFV+MTF (Figura 11, Tabla 6).

En ambos casos se obtuvieron FIC menores a 0,5 y se alcanzaron porcentajes de inhibición superiores al 90% (Tabla 6), así como una marcada reducción de la cantidad de amastigotes presentes por célula, clasificando dichas combinaciones como sinérgicas. Adicionalmente, se observaron isobolas cóncavas, característica de una interacción sinérgica entre los compuestos (Figura 11).

Es importante señalar que el valor de FIC obtenido para la combinación de NFV+AMB es menor al obtenido con la combinación de NFV+MTF (Figura 11), al igual que ocurre con el valor de FIC de la combinación de NFV+AMB sobre los promastigotes de *L. donovani* (Figura 9).

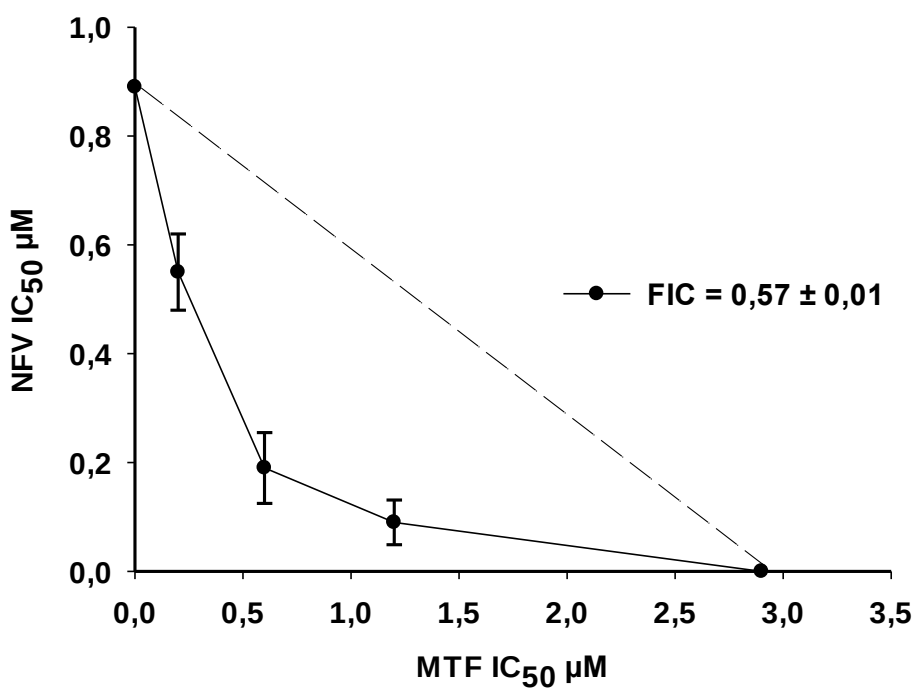
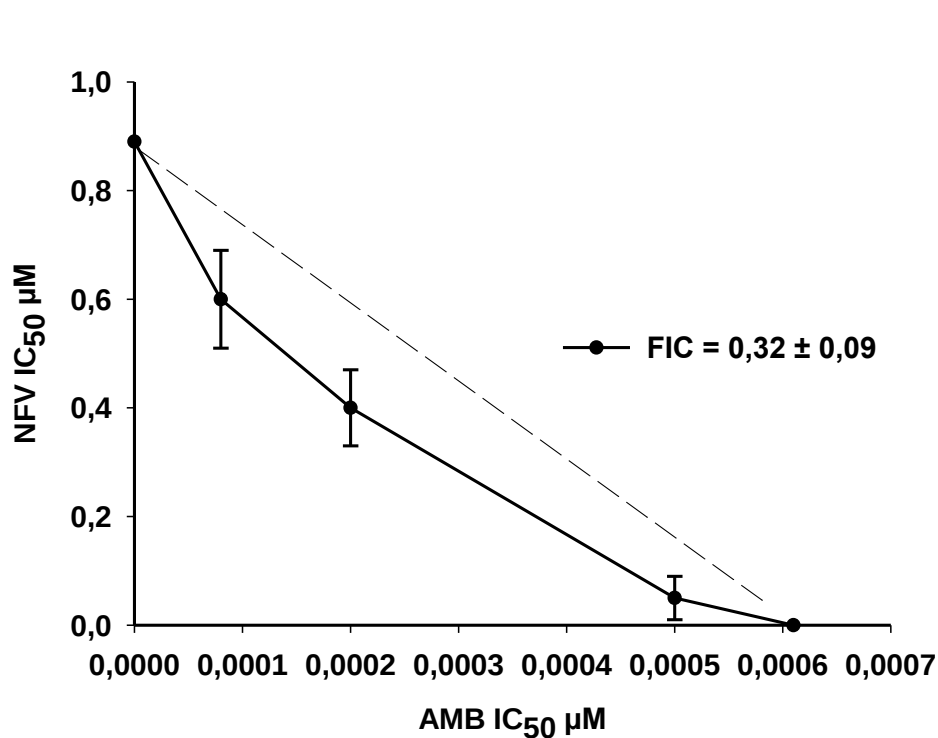


Figura 11. Isobologramas de la combinación de NFV+AMB (A) y NFV+MTF (B) sobre la infección *in vitro* de macrófagos de la línea celular J774 por amastigotes de *L. donovani*. La inhibición de la infección se evaluó *in vitro* como se indica en materiales y métodos. La línea punteada representa un efecto aditivo teórico entre las drogas, mientras que la línea sólida muestra un efecto sinérgico de la combinación. Los resultados mostrados corresponden a tres experimentos independientes.

Tabla 6. Efecto de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos murinos de la línea celular J774 por amastigotes de *L. donovani*.

COMPUESTOS	Concentración (µM)	% Infección ± DE	% Inhibición de la infección	Nº Amastigotes/cél ± DE	FIC ± DE
CONTROL	-	100 ± 0,3	-	5 ± 2	-
NFV+AMB	0,6 NFV + 8x10 ⁻⁵ AMB	10 ± 1	90	1 ± 0,8	0,32 ± 0,09
	0,4 NFV + 2x10 ⁻⁴ AMB	8 ± 1	92	1 ± 1	
	0,05 NFV + 5x10 ⁻⁴ AMB	7 ± 2	93	2 ± 2	
NFV+MTF	0,55 NFV + 0,2 MTF	10 ± 2	91	1 ± 0,5	0,57 ± 0,01
	0,19 NFV + 0,6 MTF	7 ± 1	93	2 ± 1	
	0,09 NFV + 1,2 MTF	7 ± 2	93	1 ± 0,8	

CAPITULO II

**Estudio de la susceptibilidad *in vitro* e *in vivo* de *Leishmania infantum*
hacia la combinación del NFV+AMB y del NFV+MTF**

II.1 OBJETIVO ESPECÍFICO

Evaluar el efecto de la combinación de NFV+AMB y NFV+MTF sobre el porcentaje de infección de macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7 por amastigotes de 3 cepas de diferente virulencia de *L. infantum* y sobre la reducción de la carga parasitaria en ratones BALB/c infectados con *L. infantum* (MCAN/ES/98/LLM-724).

II.2 MATERIALES Y MÉTODOS

II.2.1 Cultivo de parásitos

Para los ensayos *in vitro* con *L. infantum*, se utilizaron tres cepas extraídas de diferentes individuos ubicados en distintas localidades de Madrid (España). La cepa MCAN/ES/98/LLM-724 fue obtenida de un canino con LV sin tratamiento antiparasitario. La cepa MHOM/PT/09/LLM-1708 fue aislada de un paciente inmunocompetente con leishmaniasis cutánea. Por último, la cepa MHOM/ES/15/LLM-2284 fue extraída de un paciente coinfectado con VIH sin tratamiento para ambas infecciones. Las cepas MCAN/ES/98/LLM-724 y MHOM/ES/15/LLM-2284 se obtuvieron a partir de aspirados de médula ósea mientras que, la cepa MHOM/PT/09/LLM-1708 fue obtenida a partir de una biopsia de piel.

Todas las cepas de *L. infantum* se cultivaron en medio bifásico Novy-McNeal-Nicolle (NNN) y RPMI-1640 (Lonza Bio-Whittaker, Suiza) a 27°C suplementado con 10% de SFB (Sigma Aldrich, St. Louis, MO), 100 UI/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 2 mM de L-glutamina (Lonza Bio-Whittaker, Suiza) a 27 °C.

II.2.2 Cultivo de macrófagos murinos

Se cultivaron macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7, en frascos T25 de 25 cm³ en medio RPMI-1640 con 10% de SFB, 100 UI/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 2 mM 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 se realizaron cada 3 días, cuando los cultivos celulares se encontraban en confluencia.

II.2.3 Infección de macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7

Se infectaron macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7 con promastigotes de *L. infantum* (MCAN/ES/98/LLM-724, MHOM/ES/15/LLM-2264 y MHOM/ES/15/LLM-2284) respectivamente, en fase estacionaria de crecimiento. Para ello, 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, 100 UI/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina y 2 mM 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 5 horas bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados rápidos con medio RPMI-1640 fresco y se mantuvieron el cultivo bajo las mismas condiciones.

II.2.4 Efecto de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF sobre el porcentaje de infección in vitro de macrófagos murinos por amastigotes de L. infantum

Para evaluar el efecto de los compuestos individuales y en combinación sobre el porcentaje de infección de macrófagos murinos, se añadieron las diferentes concentraciones a evaluar a macrófagos previamente infectados por amastigotes de *L. infantum* y se incubaron a 37 °C y a una atmósfera de 5% de CO₂ durante 48 horas.

Para el conteo y visualización de los amastigotes intracelulares se aplicó la tinción Giemsa (Merck Millipore, USA), siguiendo el protocolo descrito en la sección 3.6 del capítulo I. De igual forma, se realizó el conteo del número de macrófagos infectados y no infectados para determinar el porcentaje de infección y de los amastigotes intracelulares presentes en 100 macrófagos en los cultivos tratados y no tratados utilizando el objetivo de inmersión (100x) de un microscopio óptico. Los resultados fueron graficados utilizando el programa *Sigmaplot 12.0* y para el cálculo del IC₅₀ se utilizó la función “*Four Parameter Logistic Curve*”.

Se ensayó el efecto de los compuestos solos y combinados sobre la reducción de la infección por *L. infantum*. El intervalo de concentraciones evaluadas de los compuestos solos fue de 1 a 10 µM para el NFV y la MTF y de 0,001 a 0,01 µM para la AMB. Para evaluar el efecto de la combinación de los compuestos, se establecieron concentraciones por debajo de los IC₅₀ de cada uno de los compuestos previamente calculados sobre las diferentes cepas de *L. infantum*. Las concentraciones ensayadas para ambas combinaciones sobre el porcentaje de infección de macrófagos por amastigotes de *L. infantum* se encuentran en la Tabla 7. Finalmente, se procedió a construir los isobogramas de cada combinación empleando el programa *Sigmaplot 12.0* y se realizó

el cálculo del FIC mediante la fórmula descrita en la Figura 7 empleando los IC₅₀ combinados de cada compuesto.

Tabla 7. Concentraciones ensayadas de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos de la línea celular RAW 264.7 por amastigotes de diferentes cepas de *L. infantum*.

Cepa	Combinación	
	NFV+AMB (μM)	NFV+MTF (μM)
MCAN/ES/98/LLM-724	0,31 + 4x10 ⁻⁴	0,29 + 0,21
	0,18 + 6,5x10 ⁻⁴	0,12 + 0,61
	0,09 + 1x10 ⁻³	0,05 + 1
MHOM/PT/09/LLM-1708	1,2 + 5x10 ⁻⁴	1 + 0,6
	0,75 + 8x10 ⁻⁴	0,8 + 0,8
	0,5 + 1,2x10 ⁻⁴³	0,6 + 1,2
MHOM/ES/15/LLM-2284	1 + 5x10 ⁻⁴	1,5 + 0,25
	0,5 + 8x10 ⁻⁴	1 + 0,5
	0,25 + 1x10 ⁻³	0,5 + 1

II.2.5 Estudio *in vivo* de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF en ratones BALB/c infectados con *L. infantum*

Para evaluar el efecto *in vivo* de la combinación del nelfinavir con la anfotericina B y la miltefosina, se emplearon ratones BALB/c infectados con *L. infantum* (MCAN/ES/98/LLM-724), a los cuales se les aplicó el tratamiento combinado de los compuestos con sus respectivos controles. Una vez culminado el tratamiento, se extrajo el hígado y el bazo para realizar la cuantificación de las cargas parasitarias mediante PCR a tiempo real.

II.2.5.1 *Infección y tratamiento de ratones BALB/c*

Se emplearon ratones machos y hembras de 7 a 8 semanas de edad, los cuales fueron infectados con una densidad de parásitos de 1×10^8 promastigotes de *L. infantum* (MCAN/ES/98/LLM-724) en fase estacionaria de crecimiento por vía intraperitoneal, en un volumen máximo de 200 μ l. Transcurridos los 15 días post-infección, se inició el tratamiento con los compuestos los cuales fueron administrados por vía intraperitoneal por 15 días consecutivos. Se prepararon soluciones “stock” de cada compuesto, a partir de los cuales se realizaron diluciones en solución salina estéril al 0,85%, empleado como vehículo de los compuestos.

Los ratones fueron distribuidos en 8 grupos descritos a continuación. Cuatro grupos de 5 ratones correspondieron al control de la infección sin tratamiento y a los tratamientos solos: 5 mg/kg/día del NFV, 5 mg/kg/día de la MTF y 1 mg/kg/día de la AMB. Dos grupos de 8 ratones correspondientes a los tratamientos de las combinaciones de 5 mg/kg/día NFV + 5 mg/kg/día MTF y 5 mg/kg/día del NFV + 1 mg/kg/día AMB. Un grupo de 3 ratones para el control del vehículo de las drogas (solución salina al 0,85%) y un grupo de 2 ratones para el control sin infección.

Una vez culminado el tratamiento, se procedió al sacrificio de los animales. Para ello, se anestesiaron los ratones con isofluorano y se sacrificaron por dislocación cervical. Se extrajo el hígado y bazo en condiciones de esterilidad, para la cuantificación de la carga parasitaria de cada una de las muestras.

II.2.5.2 *Procesamiento de los órganos*

Una vez obtenido el hígado y el bazo se procedió a procesar cada órgano de manera individual en condiciones de esterilidad siguiendo el protocolo descrito por Carrillo y col., 2014 y Cunha y col., 2013, con ligeras modificaciones.

Se maceraron ambos órganos utilizando un separador celular (BD Falcon ®) y se recogió el contenido celular en tubos falcón de 50 ml de capacidad. Para el hígado, se procedió a centrifugar la suspensión celular a 250 *g* a 4°C por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 20 ml de PBS (Gibco, Paisley, UK). Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente hasta que se formen dos fases. Se tomó 2 ml de la suspensión celular de la fase superior en un tubo nuevo y se añadió 2 ml de PBS. Se procedió a realizar el conteo en un contador de células automático TC10 (BioRad®). Finalmente, se ajustó el número de células a 10×10^6 células/ml en un volumen de 1 ml, se centrifugó a 4000 *g* por 8 minutos, se descartó el sobrenadante y se almacenó a - 20 °C hasta su uso (Carrillo y col., 2014; Cunha y col., 2013).

Para el bazo, se procedió a centrifugar la suspensión celular a 250 *g* a 4 °C por 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 1 ml en tampón de lisis de eritrocitos y se incubó por 5 minutos. Transcurrido el tiempo de incubación, se añadió 8 ml de PBS y se centrifugó a 250 *g* a 4 °C por 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 1 ml de medio RPMI. Se procedió a realizar el conteo en un contador de células automático TC10 (BioRad®). Finalmente, se ajustó el número de células a 10×10^6 células/ml en un volumen de 500 µl y se almacenó a - 20 °C hasta su uso (Carrillo y col., 2014; Cunha y col., 2013).

II.2.5.3 Extracción de ADN de las muestras de hígado y bazo

El ADN de las muestras fue extraído utilizando fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (Merck Millipore, USA) empleando el protocolo descrito por Carrillo y col., 2014 y Cunha y col., 2013.

Se tomó 200 µl de la muestra y se agregó 400 µl de NET10 (10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8), 40 µl de SDS al 10% y 2 µl de proteinasa K (20 mg/ml) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) incubándose por 1 hora a 70 °C. Una vez transcurrido el tiempo, se centrifugó a 10000 *g* por 6 minutos. Se añadió 500 µl de fenol/cloroformo y se centrifugó nuevamente a 10000 *g* por 6 minutos. Se recuperó la fase acuosa en un tubo nuevo con 500 µl de cloroformo/alcohol isoamílico. Se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones, se recuperó la fase acuosa y se agregó 700 µl de etanol absoluto, 30 µl de acetato de sodio 3M incubándose por 20 minutos a – 70 °C. Se centrifugó de nuevo, se descartó el sobrenadante y se añadió 1 ml de etanol al 70%. Finalmente, se centrifugó nuevamente y se descartó el sobrenadante. El sedimento se dejó secar a temperatura ambiente, resuspendiéndose en 100 µl de agua estéril y almacenándose a -20 °C. Se cuantificó el ADN total empleando un Nanodrop ND-1000 (SpectoPhotometer) de cada una de las muestras obtenidas en ambos órganos (Carrillo y col., 2014; Cunha y col., 2013).

II.2.5.4 Cuantificación de la carga parasitaria

La determinación de la carga parasitaria de *Leishmania sp.* en las muestras de hígado y bazo se realizó mediante PCR a tiempo real (PCR-RT o qPCR) utilizando como

blanco de amplificación una región del gen del kinetoplasto de *Leishmania sp.* (Mary y col., 2004; Miro y col., 2009).

Para ello, se utilizó como primers, K1 (5'-CTTTTCTGGTCCTCCGGGTAGG) y K2 (5'-CCACCCGGCCCTATTTTACACCAA-3'), los cuales amplifican una región de 300 pb del kinetoplasto de *Leishmania sp.* (Mary y col., 2004). Según la muestra, se tomó entre 100 y 400 ng de ADN, que sirvieron de templado, en un total de 20 µl de reacción del kit LightCycler FastStar ADN Master SYBR Green I empleando el equipo LightCycler 2.0 (Roche Applied Science, Germany) con una temperatura final de alineamiento de 65 °C, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para la cuantificación de la carga parasitaria, se empleó un control de ADN de 10⁴ parásitos, obtenido a partir de una curva de calibración de concentraciones crecientes de ADN de *Leishmania sp.* disuelto en ADN de ratón (Mary y col., 2004; Miro y col., 2009).

II.2.5.5 Uso de Animales y Estatus Éticos

Se emplearon ratones BALB/c los cuales fueron criados y mantenidos en cabinas IVC con alimento estéril y bebida *ad libitum*, en el Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) de Madrid- España. Todos los experimentos fueron llevados a cabo en concordancia con el Comité Ético de Animales del ISCIII, siguiendo los lineamientos de la Guía de Salud de Animales de la Autoridades Nacionales Españolas, según las declaraciones de la directiva del Parlamento y Consejo Europeo.

II.2.5.6 *Análisis Estadístico*

Se utilizó el programa *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software, USA) para los análisis estadísticos de los ensayos *in vivo*. Los resultados fueron presentados como las medias $\pm$ la desviación estándar (DE). Para la comparación de las diferencias estadísticamente significativas, se utilizó la prueba paramétrica *t* de Student de dos colas o la prueba no paramétrica de Mann-Whitney de dos colas, según la distribución de los datos, con un intervalo de confianza del 95%. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

II.3 RESULTADOS

II.3.1 Efecto del Nelfinavir, la Anfotericina B y la Miltefosina sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos murinos por amastigotes de *L. infantum*

Se procedió a evaluar el efecto del NFV, AMB y MTF sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos (RAW 264.7) por amastigotes de 3 diferentes cepas de *L. infantum*. Dichos compuestos presentaron un efecto inhibitorio dosis-dependiente sobre el porcentaje de infección (Figura 12), encontrándose que el NFV y la MTF, tienen una mayor efectividad sobre la cepa MCAN/ES/98/LLM-724, estimándose un IC₅₀ de $0,42 \pm 0,24 \mu\text{M}$ para el NFV y de $1,52 \pm 0,26 \mu\text{M}$ para la MTF (Tabla 8). La AMB presentó una menor efectividad sobre la misma cepa, registrándose un IC₅₀ de $8,29 \times 10^{-3} \pm 1,43 \times 10^{-3} \mu\text{M}$. Para el resto de las cepas estudiadas (MHOM/PT/09/LLM-1708 y MHOM/ES/15/LLM-2284), se encontraron susceptibilidades similares hacia los tres compuestos evaluados de manera individual (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto del NFV, AMB y MTF sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7 por amastigotes de diferentes cepas de *L. infantum*.

Cepas	NFV		AMB		MTF	
	IC ₅₀ μM	MIC μM	IC ₅₀ μM	MIC μM	IC ₅₀ μM	MIC μM
MCAN/ES/98/LLM-724	$0,42 \pm 0,24$	6 ± 1	$8,29 \times 10^{-3} \pm 1,40 \times 10^{-3}$	$0,01 \pm 1 \times 10^{-3}$	$1,52 \pm 0,26$	10 ± 1
MHOM/PT/09/LLM-1708	$1,92 \pm 0,89$	10 ± 1	$2,17 \times 10^{-3} \pm 6 \times 10^{-4}$	$0,01 \pm 1 \times 10^{-3}$	$2,60 \pm 1,4$	10 ± 1
MHOM/ES/15/LLM-2284	$2,09 \pm 0,71$	10 ± 1	$2,08 \times 10^{-3} \pm 1,53 \times 10^{-3}$	$0,01 \pm 1 \times 10^{-3}$	$1,90 \pm 0,87$	10 ± 1

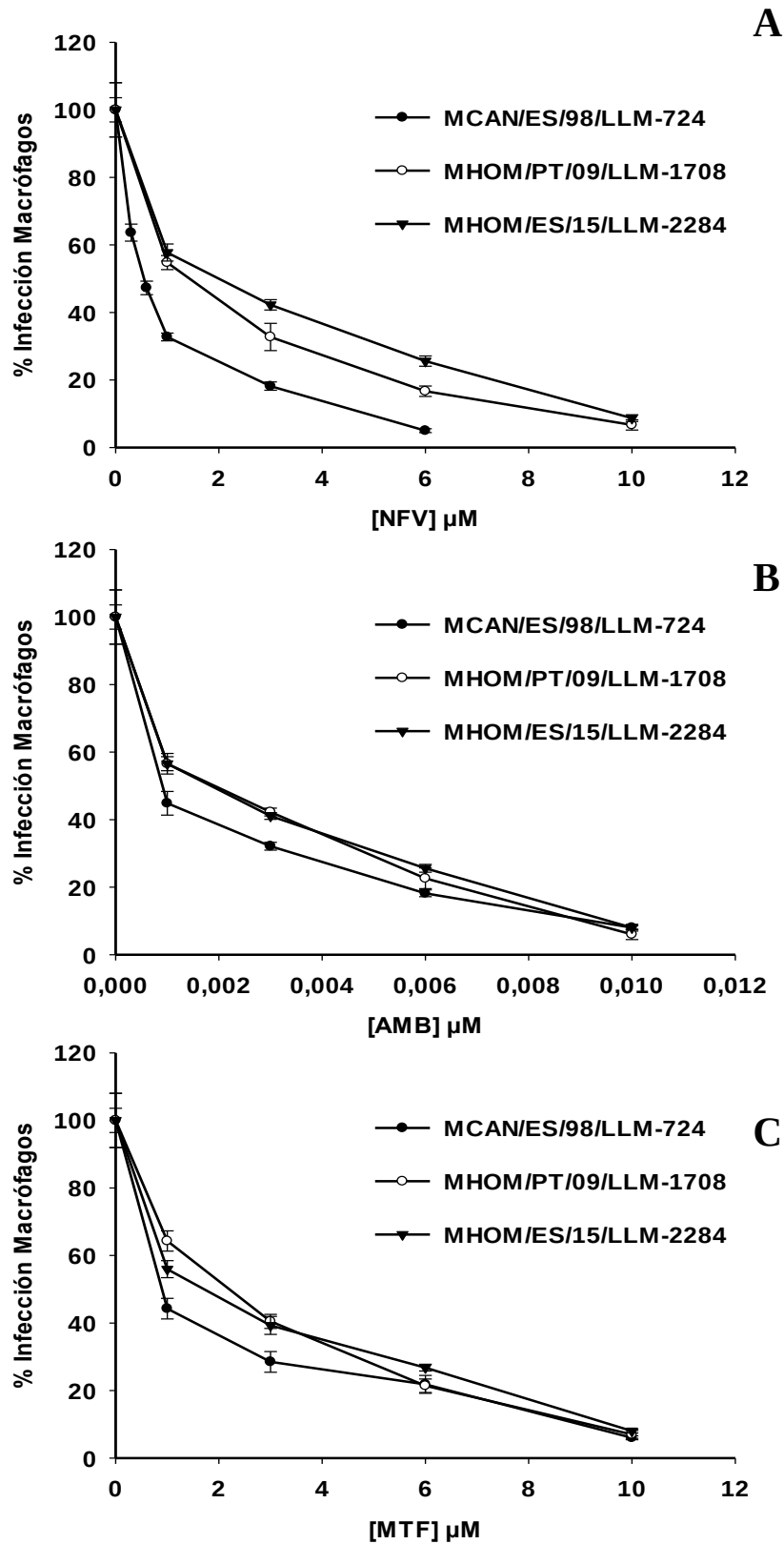


Figura 12. Efecto del NFV (A), AMB, (B) y MTF (C) sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos de la línea celular RAW 264.7 por amastigotes de diferentes cepas de *L. infantum*. La inhibición de la infección se evaluó *in vitro* como se indica en materiales y métodos. Los datos mostrados son el resultado de tres experimentos independientes.

Se puede observar que a concentraciones superiores a $6 \pm 1 \mu\text{M}$ del NFV se alcanza cerca del 90% de inhibición del porcentaje de infección de los macrófagos por la cepa MCAN/ES/98/LLM-724, estableciéndose este valor como el MIC. No obstante, para la AMB y la MTF, los MIC estimados fueron de $0,01 \pm 1 \times 10^{-3} \mu\text{M}$ y $10 \pm 1 \mu\text{M}$, respectivamente. Para las otras cepas estudiadas, MHOM/PT/09/LLM-1708 y MHOM/ES/15/LLM-2284, el MIC estimado para el NFV y la MTF fue de $10 \pm 1 \mu\text{M}$ y para la AMB de $0,01 \pm 1 \times 10^{-3} \mu\text{M}$.

II.3.2 Efecto de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF sobre el porcentaje de infección in vitro de macrófagos murinos por amastigotes de L. infantum

Con el fin de evaluar si la eficacia de los compuestos aumenta cuando se usan en conjunto, se determinaron los valores FIC para las todas combinaciones de compuestos ensayadas sobre *L. infantum*. Se encontraron valores de FIC menores a 0,5 para ambas combinaciones de compuestos sobre las tres cepas de *L. infantum*., clasificando la interacción entre los compuestos como un sinergismo fuerte (Figura 13). De las tres cepas estudiadas, la cepa obtenida del paciente inmunodeprimido (MHOM/ES/2015/LLM-2284) resultó ser más sensible a ambos tratamientos combinados, con valores de FIC de $0,16 \pm 0,06$ para la combinación de NFV+AMB y de $0,2 \pm 0,1$ para la combinación de NFV+MTF. Mientras que, con las otras dos cepas se encontraron valores de FIC similares, alrededor de 0,25 para ambas combinaciones, a excepción de la combinación de NFV+AMB sobre MCAN/ES/98/LLM-724 ($0,48 \pm 0,2$) (Tabla 9).

Adicionalmente, se lograron alcanzar porcentajes de inhibición de la infección mayores al 90%, cuando las drogas fueron utilizadas en combinación a concentraciones por debajo tanto de sus IC_{50} como de los MIC correspondientes (Tabla 8 y 9), así como

también una reducción del número de amastigotes por célula. Al construir los isobogramas de cada combinación, se obtuvieron isóbulas cóncavas características de un efecto sinérgico entre los compuestos (Figura 13).

Tabla 9. Efecto de las combinaciones del NFV+AMB y NFV+MTF sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7 por amastigotes de diferentes especies de *L. infantum*.

Cepas	NFV+AMB					NFV+MTF				
	[μM]	% Infección ± DE	% Inhibición de la infección	N° Amast ± DE	FIC ± DE	[μM]	% Infección ± DE	% Inhibición de la infección	N° Amast ± DE	FIC ± DE
MCAN/ES/98/ LLM-724	CONTROL	100 ± 3	-	2 ± 0,1	0,48 ± 0,2	CONTROL	100 ± 3	-	2 ± 0,1	0,25 ± 0,1
	0,31 NFV + 4x10 ⁻⁴ AMB	14 ± 2	90	1 ± 0,2		0,29 NFV + 0,21 MTF	15 ± 3	95	1 ± 0,3	
	0,18 NFV + 6,5x10 ⁻⁴ AMB	15 ± 2	91	1 ± 0,5		0,12 NFV + 0,61 MTF	12 ± 3	88	1 ± 0,2	
	0,09 NFV + 1x10 ⁻³ AMB	14 ± 1	93	1 ± 0,1		0,05 NFV + 1 MTF	12 ± 2	89	1 ± 0,2	
MHOM/PT/09/ LLM-1708	CONTROL	100 ± 6	-	1 ± 0,3	0,23 ± 0,05	CONTROL	100 ± 6	-	1 ± 0,3	0,30 ± 0,08
	1,2 NFV + 5x10 ⁻³ AMB	15 ± 1	91	1 ± 0,1		1 NFV + 0,6 MTF	17 ± 1	93	1 ± 0,1	
	0,75 NFV + 8x10 ⁻⁴ AMB	13 ± 2	89	1 ± 0,2		0,8 NFV + 0,8 MTF	15 ± 2	89	1 ± 0,3	
	0,5 NFV + 1,2x10 ⁻³ AMB	13 ± 1	88	1 ± 0,1		0,6 NFV + 1,2 MTF	9 ± 1	91	1 ± 0,1	
MHOM/ES/15/ LLM-2284	CONTROL	100 ± 6	-	2 ± 0,6	0,16 ± 0,06	CONTROL	100 ± 6	-	2 ± 0,6	0,2 ± 0,1
	1 NFV + 5x10 ⁻⁴ AMB	14 ± 1	91	1 ± 0,3		1,5 NFV + 0,25 MTF	14 ± 2	91	1 ± 0,3	
	0,5 NFV + 8x10 ⁻⁴ AMB	12 ± 1	90	1 ± 0,1		1 NFV + 0,5 MTF	12 ± 1	90	1 ± 0,2	
	0,25 NFV + 1x10 ⁻³ AMB	7 ± 1	93	1 ± 0,1		0,5 NFV + 1 MTF	14 ± 1	89	1 ± 0,1	

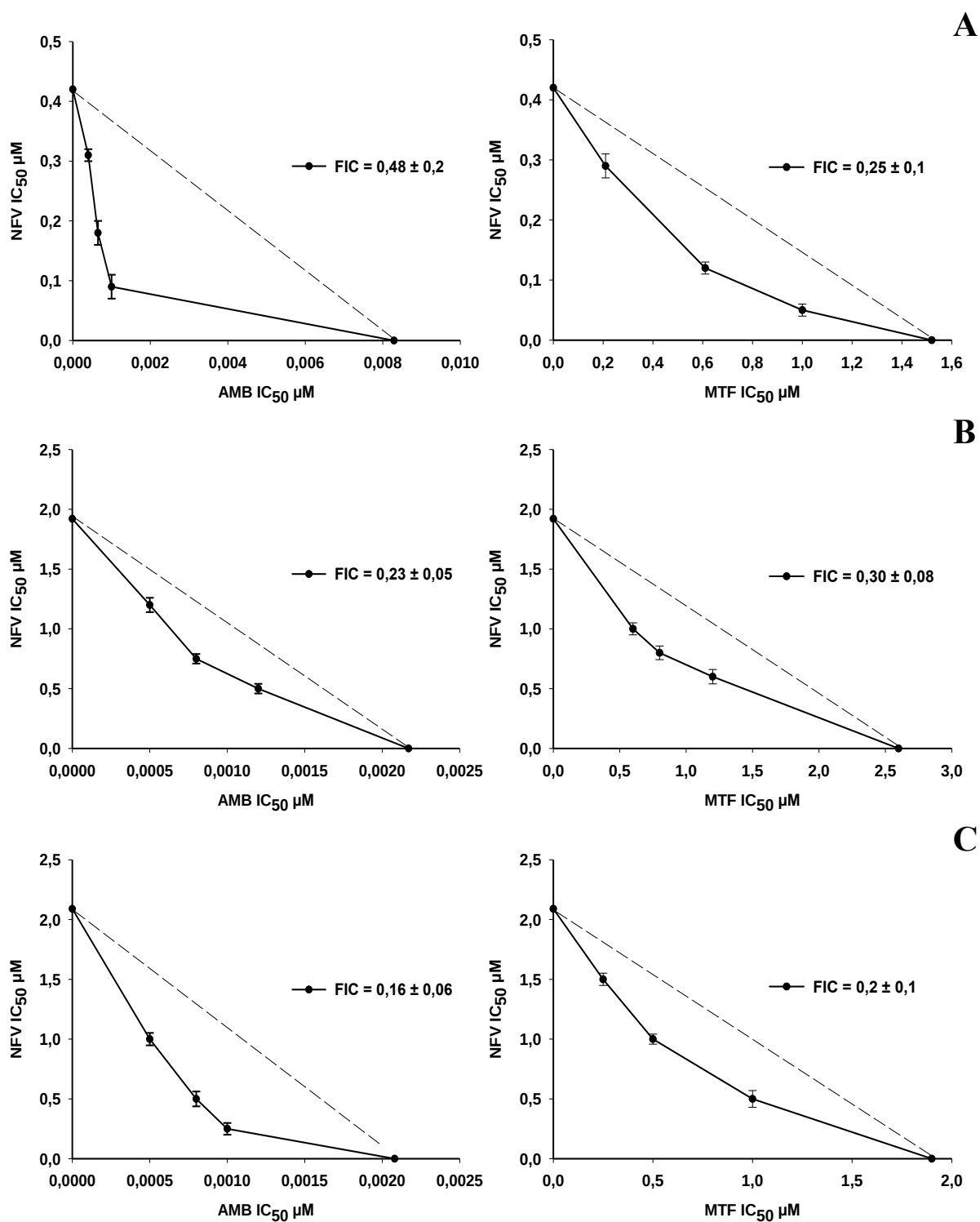


Figura 13. Isobologramas de la combinación de NVF+AMB y NVF+MTF sobre la infección *in vitro* de macrófagos murinos de la línea celular RAW 261.7 por amastigotes de *L. infantum*. (A) MCAN/ES/98/LLM-724, (B) MHOM/PT/09/LLM-1708 y (C) MHOM/ES/15/LLM-2284. La línea punteada representa un efecto aditivo teórico entre las drogas, mientras que la línea sólida muestra un efecto sinérgico de la combinación. Los resultados mostrados corresponden a tres experimentos independientes.

II.3.3 Efecto de la combinación del NFV+AMB y NFV+MTF en ratones BALB/c infectados con L. infantum

Se evaluó la eficacia terapéutica de la combinación del NFV con la AMB y la MTF en ratones BALB/c infectados con *L. infantum* (MCAN/ES/98/LLM-724 (Figura 14). Al evaluar el tratamiento con los compuestos sin combinar se encontró que la dosis utilizada para el tratamiento con el NFV (5 mg/kg), la AMB (1mg/kg) y la MTF (5 mg/kg) fueron capaces de reducir las cargas parasitarias en hígado (Figura 14A) y bazo (Figura 14B). Se encontró una reducción de la carga parasitaria producida por el NFV del 61% en hígado y de 64% en bazo. Con el tratamiento de la AMB se obtuvo una reducción de la carga parasitaria casi en un 100% en ambos órganos, mientras que en el caso del tratamiento con la MTF, se obtuvo una reducción de la carga parasitaria del 77% y 76%, respectivamente.

Al analizar el tratamiento con la combinación de los compuestos, se encontró una reducción de la carga parasitaria con la combinación de 5 mg/kg NFV + 1 mg/kg AMB similar al obtenido con el tratamiento individual de la AMB (1 mg/kg) sobre ambos órganos. Por otro parte, con la combinación de 5 mg/kg NFV + 5 mg/kg MTF, la reducción de la carga parasitaria fue del 89% en hígado y de 84% en bazo, superior a la observada con los tratamientos individuales del NFV y la MTF (5 mg/kg cada uno) en hígado y bazo, sugiriendo un posible aumento del efecto terapéutico de estos compuestos al emplearlo en conjunto sobre la reducción de la carga parasitaria.

Al realizar el análisis estadístico, se encontraron diferencias significativas entre el grupo control sin tratamiento y los grupos tratados sobre ambos órganos. En el caso del tratamiento con los compuestos solos, se encontraron diferencias estadísticamente significativas con los tratamientos del NFV (* $p < 0.05$), y la MTF (* < 0.05). Con el tratamiento combinado, se obtuvo un * $p < 0.05$ en hígado para las dos combinaciones

ensayadas y en bazo sólo con la combinación de NFV+MTF (** $p < 0.01$). Adicionalmente, es importante señalar que no se observó una reducción de la carga parasitaria sobre el grupo tratado sólo con solución salina al 0,85%, empleado como vehículo de las drogas.

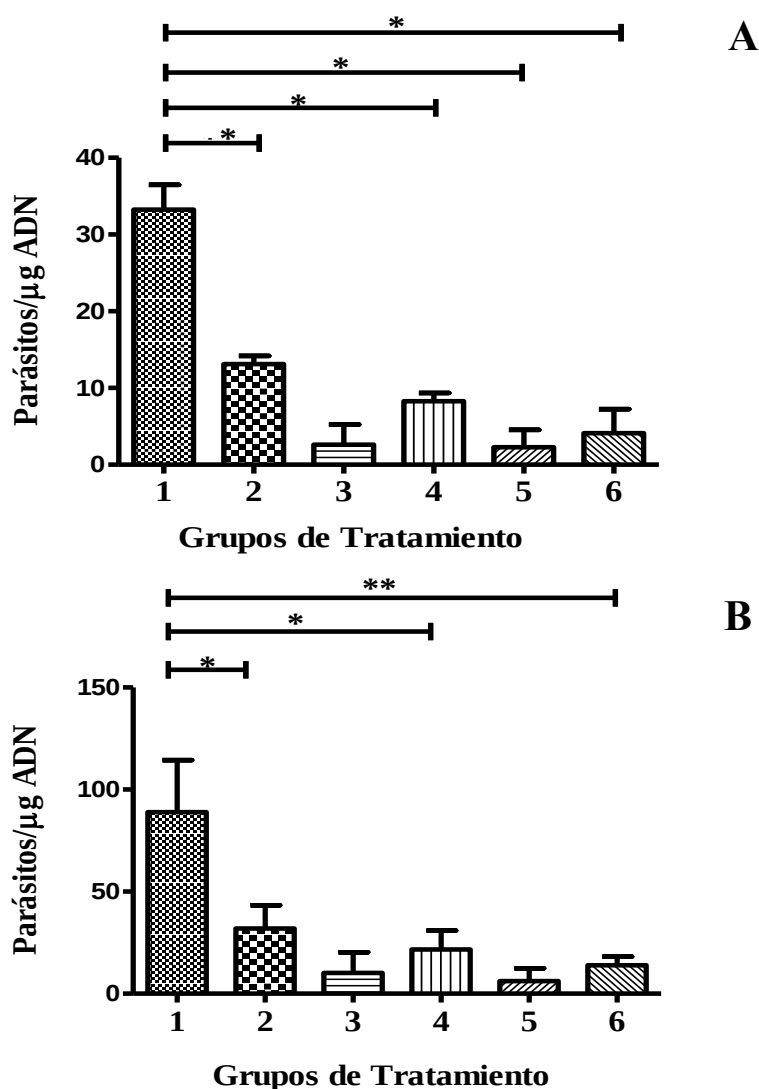


Figura 14. Estimación de las cargas parasitarias en hígado (A) y bazo (B) en ratones BALB/c infectados con *L. infantum*. (1) Control sin tratamiento, (2) 5 mg/kg NFV, (3) 1 mg/kg AMB, (4) 5 mg/kg MTF, (5) 5 mg/kg NFV + 1 mg/kg AMB y (6) 5 mg/kg NFV + 5 mg/kg MTF. Se puede observar como el tratamiento con los compuestos solos y combinados, redujeron significativamente la carga parasitaria en ambos órganos, respecto al grupo control sin tratamiento. Se encontraron diferencias significativas entre el grupo control sin tratamiento y el grupo tratado sólo con NFV (* $p < 0.05$) y con MTF (* $p < 0.05$) en hígado y bazo. Con el tratamiento combinado, se obtuvo un * $p < 0.05$ en hígado para las dos combinaciones ensayadas y en bazo sólo con la combinación de NFV + MTF (** $p < 0.01$).

4. DISCUSIÓN

La leishmaniasis fue reportada como una infección oportunista en pacientes infectados con el VIH durante la expansión de la epidemia del virus, afectando en la actualidad a más de 30 países a nivel mundial (Alvar y col., 2008; Diro y col., 2014). En la coinfección *Leishmania*/VIH, la gran mayoría de la morbilidad y mortalidad se produce en pacientes que presentan LV (Van Griensven y Diro, 2010; Raes y col., 2007). Las manifestaciones clínicas iniciales de la LV son similares en pacientes VIH-negativos y VIH-positivos. No obstante, en pacientes coinfectados es posible encontrar la presencia del parásito en órganos atípicos, modificándose el curso de la infección por *Leishmania*, generando una alta probabilidad de fracaso terapéutico y altas tasas de recaída de la enfermedad (Cruz y col., 2006; David y Craft, 2009; Michel y col., 2011).

En este contexto, existe la urgente necesidad de establecer un tratamiento específico y eficaz para los pacientes coinfectados con *Leishmania*/VIH. Es importante acotar que los tratamientos que están siendo aplicados en la actualidad, han sido elegidos de manera azarosa, y que además, el 75% de estos pacientes sufren recaídas de la enfermedad cualquiera sea el tratamiento elegido. Este panorama plantea la necesidad de realizar estudios científicamente diseñados con resultados experimentales sólidos, para determinar cuál o cuáles podrían ser los fármacos más apropiados a administrar de manera exitosa en los pacientes afectados.

Son muchos los ensayos clínicos que se han realizado hasta la fecha en la búsqueda de un tratamiento leishmanicida eficaz en pacientes VIH-positivos (Laguna y col., 1994; Omollo y col., 2011; Rybniker y col., 2010; Wasunna y col., 2016). Uno de los hallazgos más relevantes y que podría emplearse para hacer recomendaciones firmes respecto al posible tratamiento de pacientes coinfectados *Leishmania*/VIH, es el efecto

leishmanicida que presentan los antirretrovirales empleados en la terapia HAART (Pozio y Gómez, 2005). En los últimos años, se ha estudiado a profundidad el efecto *in vitro* que tienen los IP's del VIH sobre diferentes especies de *Leishmania*, encontrándose que estos fármacos inhiben de forma dosis-dependiente el crecimiento *in vitro* de promastigotes y amastigotes axénicos, además de disminuir el porcentaje de infección de macrófagos. Adicionalmente, se han descrito cambios ultraestructurales y morfológicos en el parásito, asociados a la presencia de estos compuestos en los cultivos (Savoia y col., 2005; Santos y col., 2009; Trudel, y col., 2008; Valdivieso y col., 2010; Van Griensven y col., 2013).

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

Se ha reportado que el NFV es el antirretroviral que presenta un mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento *in vitro* de ambos morfotipos del parásito, 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; Van Griensven y col., 2013). Adicionalmente, presenta una mayor afinidad hacia el dominio RP de la Ddi1-like de *Leishmania* (Perteguer y col., 2012; Serrano y col., 2012). Las concentraciones efectivas del NFV en el plasma sanguíneo se encuentran alrededor de los 7 μM , suficiente para inhibir el crecimiento del virus (IC_{50} 14 nM) (Andrews y col., 2006). No obstante, el efecto leishmanicida de este antirretroviral sobre *L. donovani* y *L. infantum*, especies causantes de las manifestaciones viscerales, se encuentra entre 0,42 y 11 μM .

Esta diferencia de susceptibilidades entre el parásito y el virus, plantea ciertos inconvenientes en el momento de diseñar un esquema terapéutico, que incluya a los antirretrovirales en el tratamiento de la leishmaniasis (Van Griensven y col., 2013).

Tomando en cuenta que la combinación de fármacos que actúan de manera sinérgica, logra potenciar el efecto terapéutico de cada compuesto, y además, se logra minimizar las dosis requeridas, el desarrollo de resistencia y reducir el período de tratamiento (Alvar y col., 2008; Van Griensven y col., 2014), la OMS ha sugerido la aplicación de este esquema terapéutico no sólo para el tratamiento de la leishmaniasis, sino también en pacientes coinfectados con el VIH (OMS, 2010; 2017). Considerando esta recomendación, al conocimiento de que el NFV es el antirretroviral más efectivo contra ambos morfotipos de *Leishmania* y que la LV, causada por *L. donovani* y *L. infantum*, es la forma clínica más común en la coinfección por *Leishmania*/VIH, nos propusimos en el presente trabajo, estudiar el posible efecto sinérgico del NFV al combinarlo con la AMB y con la MTF sobre *L. donovani* y *L. infantum*.

Los resultados obtenidos, muestran una inhibición dosis-dependiente de los compuestos sin combinar sobre la proliferación *in vitro* de promastigotes y sobre el porcentaje de infección de macrófagos por amastigotes de *L. donovani*. De acuerdo a la especie del parásito ensayada la concentración del NFV que inhibe el 50% de la proliferación *in vitro* de promastigotes de *Leishmania*, se encuentra entre 9 y 26 μM (Valdivieso y col., 2010; Van Griensven y col., 2013). El IC_{50} del NFV reportado en este trabajo fue de 10,93 μM para promastigotes de *L. donovani*, valor comprendido dentro del rango reportado, y además, es cercano al encontrado por Valdivieso y col., (2010) sobre la misma especie (IC_{50} de 14,10 μM). En otras especies del parásito como *L. mexicana*, se ha reportado un IC_{50} de 13,83 μM sobre promastigotes del parásito (Mejías y col., 2015). Por otra parte, el IC_{50} del NFV sobre la infección *in vitro* de macrófagos

murinos por amastigotes de *L. donovani*, fue de 0,89 μM , en contraste con el efecto reportado sobre *L. mexicana* (IC_{50} de 0,5 μM), evidenciando a la especie *L. mexicana* como más sensible al tratamiento por el antirretroviral (Mejías y col., 2015).

En cuanto a las drogas leishmanicidas, la AMB resultó ser el compuesto más eficiente (Corral y col., 2014; Seifert y Croft, 2006; Trinconi y col., 2014), con un IC_{50} de 0,091 μM sobre promastigotes de *L. donovani*, similar al reportado por Mbongo y col., 1998. En estudios previos de la AMB sobre amastigotes intracelulares, se ha reportado un IC_{50} de 0,033 μM sobre *L. amazonensis* (Morais-Texeira y col., 2014) y de 0,0012 μM para *L. mexicana* (Mejías y col., 2015), valores al menos 10 veces mayores al encontrado en este trabajo sobre *L. donovani* (IC_{50} de 0,00061 μM). Otras cepas de *L. donovani* diferentes a la empleada en este trabajo, como MHOM/ET/67/L82 (Seifert y Croft, 2006) y MHOM/SD/43/124 (Corral y col., 2014a), también han resultado ser más sensibles al tratamiento por AMB en comparación con otras especies del parásito.

En cuanto al tratamiento con la MTF, el IC_{50} reportado en este trabajo es de 11,27 μM sobre promastigotes y de 2,90 μM sobre amastigotes de *L. donovani* mientras que, en otros trabajos se ha reportado un IC_{50} de la MTF comprendido entre 1 y 15 μM sobre promastigotes y amastigotes de diferentes especies de *Leishmania*, incluyendo *L. infantum* y *L. amazonensis* (Seifert y Croft, 2006; Serrano-Martín y col., 2009a).

Al evaluar la combinación del NFV+AMB y del NFV+MTF sobre la proliferación *in vitro* de promastigotes de *L. donovani*, se obtuvieron valores de FIC menor a 0,5 para la combinación de NFV+AMB (0,43) y menor a 1 para la combinación de NFV+MTF (0,88), clasificando ambas combinaciones como sinérgicas. Específicamente, la combinación con AMB resultó ser clasificada como sinérgico fuerte y la combinación con MTF como sinérgico moderado (Figura 8). Con ambas combinaciones se obtuvieron isoblogramas con isóbulas cóncavas, siendo la isóbola de

la combinación de NFV+AMB más pronunciada que la combinación de NFV+MTF. En contraste con los hallazgos reportados por nuestro grupo de investigación sobre la proliferación *in vitro* de promastigotes de *L. mexicana* (MHOM/BZ/82/Be1-21), la combinación de NFV+AMB ha sido reportada como sinergismo moderado (FIC = 0,59) mientras que, la combinación de NFV+MTF se clasificó como aditiva (FIC = 1) (Mejías y col., 2015). Estos resultados sugieren que ambas combinaciones parecieran ser más efectivas sobre *L. donovani*, al menos sobre el morfotipo promastigote del parásito. Adicionalmente, la combinación de NFV+AMB pareciera ser más eficaz que la combinación con NFV+MTF sobre promastigotes de *L. donovani* y *L. mexicana*.

La combinación de estos compuestos también fue evaluada sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos murinos de la línea celular J774 por amastigotes de *L. donovani*. Se encontró que la combinación de NFV+AMB pareciera ser más eficiente, FIC = 0,32, que la combinación con NFV+MTF (FIC = 0,57), con isóbulas cóncavas para las dos combinaciones, clasificándose ambas como sinérgicas (Figura 11). En amastigotes intracelulares de *L. mexicana*, se ha reportado valores de FIC de 0,61 y 0,85 para las combinaciones de NFV+AMB y NFV+MTF, respectivamente, mayores a los FIC encontrados sobre amastigotes intracelulares de *L. donovani*. Adicionalmente, se obtuvieron isóbulas cóncavas para ambas combinaciones, tanto en promastigotes como amastigotes de *L. donovani* (Figura 9 y 11).

De esta manera se podría afirmar que el tratamiento combinado de NFV+AMB resulta ser más eficaz que la combinación de NFV+MTF sobre *L. donovani* y *L. mexicana*, siendo *L. donovani* más sensible al tratamiento. Este resultado es de gran importancia, tomando en cuenta que *L. donovani* causa manifestaciones viscerales de la enfermedad, la forma clínica más común observada en pacientes coinfectados con VIH.

Adicionalmente, es interesante resaltar que la forma amastigote del parásito resultó ser más sensible que la forma promastigote, hacia el tratamiento solo y combinado. Este resultado es de gran interés debido a que el amastigote es el morfotipo de relevancia fisiológica. Algunos investigadores sugieren que la diferencia de susceptibilidad hacia los compuestos entre los dos morfotipos, puede deberse a posibles modificaciones bioquímicas que ocurren en la superficie del parásito durante el proceso de transformación, exponiendo blancos de acción del compuesto en la forma amastigote no accesibles o ausentes en la forma promastigote. También se ha postulado que en el caso de los amastigotes intracelulares puede generarse una mayor concentración de la droga en la vacuola parasitófora. Estas diferencias de susceptibilidad también ha sido observada con otros fármacos utilizados comúnmente contra la leishmaniasis (Benaim y col., 2006; Corral y col., 2012; 2014a).

Estas diferencias de sensibilidades que presentan las especies de *Leishmania* al tratamiento con compuestos solos o combinados podrían deberse a múltiples factores aún en discusión. Actualmente se manejan varias hipótesis; en principio los fármacos deben superar las barreras de las membranas plasmáticas del macrófago, de la vacuola parasitófora y del amastigote, para poder alcanzar su blanco de acción y ejercer su acción leishmanicida. El compuesto podría difundir a través de la membrana plasmática o bien ingresar al interior celular mediante transportadores de membrana. Diferencias o variaciones en la composición de la membrana plasmática o una disminución en la expresión del transportador, pueden presentarse en diferentes especies del parásito (dos Santos y col., 2013; Zufferey y col., 2003). Esto se podría traducir en una mayor o menor accesibilidad de un determinado fármaco al blanco de acción del mismo. Tomando en cuenta que la AMB es un compuesto que induce una rápida respuesta en el parásito debido a su acción a nivel de la membrana plasmática, estos cambios de composición en

la membrana, pudiesen explicar las diferencias de sensibilidades observadas (dos Santos y col., 2013).

La especie del parásito estudiada en esta oportunidad, *L. donovani*, es el agente etiológico causante de la LV en el continente Africano y en Asia. En estas regiones son precisamente donde se presenta una mayor prevalencia de casos de coinfección con el VIH. En este sentido los resultados obtenidos en este trabajo podrían ser de gran utilidad, dado que se encontró una mayor susceptibilidad de esta especie hacia el tratamiento combinado del antirretroviral con los compuestos leishmanicidas, lo cual abre la posibilidad de aplicar tratamientos más específicos y posiblemente más eficaces en estas regiones.

Si bien los casos de coinfección *Leishmania*/VIH de mayor prevalencia son los causados por *L. donovani* provenientes de la región africana y asiática, en Europa la LV en pacientes coinfectados es causada por *L. infantum*. Ambas especies presentan características distintivas, que establecen un cuadro clínico muy diferente. En la región europea, particularmente, España y Portugal, se ha registrado el mayor número de casos asintomáticos de LV; no obstante, al ocurrir la coinfección con el VIH, la infección por *Leishmania* se vuelve sintomática, caracterizándose además por ser muy virulenta y presentar una menor tasa de respuesta terapéutica. Esto ocurre, no sólo por la presencia de ambos patógenos sino también, por la capacidad que tiene dicha especie de permanecer en el individuo sin mostrar síntomas, logrando adaptarse a la respuesta del sistema inmunológico del individuo (Carrillo y col., 2014; Kumay y Nylen, 2012).

Por esta razón, en el presente trabajo también se planteó estudiar la posible potenciación del efecto leishmanicida del NFV al combinarlo con la AMB y la MTF, sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7 por amastigotes de *L. infantum*. En este caso, se propuso evaluar el efecto de las

combinaciones sobre tres cepas del parásito obtenidos de diferentes individuos de Madrid-España: un canino con LV (MCAN/ES/98/LLM-724), un paciente con LC (MHOM/PT/15/LLM-1708) y un paciente coinfectado con VIH sin tratamiento para ambas infecciones (MHOM/ES/15/LLM-2284); dichas cepas representan los 3 grupos de pacientes afectados por *L. infantum* más importantes. Se incluyó una cepa proveniente de un canino tomando en cuenta que estos mamíferos actúan como reservorios del parásito dentro del ciclo zoonótico de *L. infantum*, además de ser una cepa de referencia internacional (MCAN/ES/98/LLM-724). También se incluyó en nuestro estudio una cepa proveniente de una paciente inmunocompetente (MHOM/PT/15/LLM-1708) y un paciente inmunodeprimido (MHOM/ES/15/LLM-2284), considerando las diferencias de virulencia que se han reportado en parásitos aislados de pacientes coinfectados o no con el VIH.

En primer lugar se evaluó el efecto de los compuestos sin combinar sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos murinos por amastigotes de *L. infantum*. Los resultados obtenidos muestran una inhibición dosis-dependiente de los compuestos sobre la infección de las células. La cepa MCAN/ES/98/LLM-724 resultó ser más sensible al tratamiento por el antirretroviral (IC_{50} de 0,42 μ M), mientras que las otras dos cepas presentaron una sensibilidad similar (IC_{50} entre 1 y 2 μ M). Si se comparan estos resultados con el efecto observado del NFV sobre otras especies de *Leishmania*, se observa que el antirretroviral presenta una acción diferencial sobre diferentes especies del parásito, presentando una sensibilidad creciente en *L. infantum* en el canino > *L. mexicana* > *L. donovani* > *L. infantum* en humanos.

En contraste con estos resultados, el tratamiento con la AMB resultó ser menos eficaz sobre la misma cepa de *L. infantum* en el canino (MCAN/ES/98/LLM-724) (IC_{50} de 0,0082 μ M), mientras que, con las otras dos cepas de humanos se obtuvieron valores

de IC₅₀ similares (IC₅₀ de 0,002 µM). Al contrario de lo que ocurre con el tratamiento con NFV, *L. donovani* resultó ser más sensible al tratamiento con la AMB (IC₅₀ de 0,00061 µM) en comparación con *L. infantum* (IC₅₀ entre 0,002 y 0,008 µM) y *L. mexicana* (IC₅₀ de 0,0012 µM) (Mejías y col., 2015). Tanto la manifestación visceral como la cutánea pueden encontrarse simultáneamente en caninos; a diferencia de los humanos, donde se observan manifestaciones cutáneas y viscerales por separado. Por tanto, los síntomas clínicos y la respuesta al tratamiento empleado en caninos son diferentes en humanos; esto pudiese estar relacionado con la biología del canino como reservorio del parásito, donde el sistema inmune y el estado nutricional son características determinantes en la infección por *Leishmania*.

Por último en cuanto al tratamiento con la MTF, se reportó que *L. mexicana* presenta una mayor sensibilidad al tratamiento (IC₅₀ de 1 µM) (Serrano-Martín y col., 2009a) en comparación con *L. donovani* y con las tres cepas de *L. infantum* evaluadas en este trabajo. Otras cepas de *L. donovani* como MHOM/ET/67/L82 (Seifert y Croft, 2006) y de *L. infantum* como MHOM/BR/70/BH46 (Morais-Teixeira y col., 2014) han presentado una menor sensibilidad hacia la MTF.

Al evaluar el efecto de las combinaciones de NFV+AMB y NFV+MTF sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos murinos por amastigotes de *L. infantum*, los resultados revelaron que ambas combinaciones producen un efecto inhibitorio mayor al encontrado cuando se utilizan los compuestos de manera individual, sobre las tres cepas de *L. infantum* empleadas en este trabajo.

Ambas combinaciones se clasificaron como sinérgicas con valores de FIC relativamente similares, todas menores a 0,5 y con isóbulas cóncavas (Tabla 9, Figura 13). Se encontraron valores de FIC más bajos para ambas combinaciones (0,16 para NFV+AMB y 0,2 para NFV+MTF) para la cepa proveniente del paciente

inmunodeprimido (MHOM/ES/15/LLM-2284), en comparación con la cepa del canino y del paciente inmunocompetente. Para la cepa proveniente del canino (MCAN/ES/98/LLM-724) se obtuvo un FIC de 0,48 para NFV+AMB y de 0,25 para NFV+MTF, mientras que para la cepa MHOM/PT/09/LLM-1708 se obtuvieron FIC de 0,23 y 0,30, respectivamente.

De esta manera, se demuestra claramente la potenciación del efecto inhibitorio del NFV al emplearlo en combinación con AMB ó MTF, al igual que ocurre con el tratamiento combinado en *L. donovani* y *L. mexicana* (Mejías y col., 2015). Además de potenciar el efecto leishmanicida del NFV al emplearlo en combinación, es importante mencionar que también se logró reducir las dosis necesarias del NFV a concentraciones en el rango nanomolar. Tomando en cuenta que la concentración del antirretroviral en el plasma sanguíneo se encuentra alrededor de 7 μ M (Andrews y col., 2006), al emplearlo en conjunto con AMB o MTF se reducen las dosis requeridas para inhibir el crecimiento del parásito de alrededor de 1 μ M a 300 nM.

Ahora bien, si comparamos los FIC obtenidos para las combinaciones ensayadas sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos murinos por amastigotes de *L. donovani* y *L. infantum* encontradas en este trabajo, en general se obtuvieron FIC ligeramente menores sobre *L. infantum* en comparación con *L. donovani*, lo cual podría sugerir una mayor sensibilidad de *L. infantum* hacia el tratamiento combinado. Adicionalmente, los resultados obtenidos en *L. mexicana*, sugieren que esta especie causante de manifestaciones cutáneas presenta una menor sensibilidad al tratamiento con las combinaciones de NFV+AMB ó NFV+MTF en comparación con las especies que causan LV.

Como ya se había mencionado estas diferencias de susceptibilidades entre las especies podrían ser causadas por diversos factores. Entre ellos, se mencionó las

variaciones en la composición de la membrana plasmática y/o la expresión de los transportadores de membrana, afectando con ello el ingreso de la droga al interior celular. Otro de las hipótesis que se manejan es el grado de diversidad genética que presentan las numerosas especies de *Leishmania sp.*, que le pudiesen permitir responder de manera diferencial a la presión selectiva de una droga. En presencia de la droga, el parásito es capaz de activar la expresión de ciertos genes que le permiten responder a los cambios a los cuales está siendo sometido producto del tratamiento con la droga. Ha sido reportado que *L. infantum* presentan un mayor grado de diversidad genética en comparación con *L. donovani*, incluso en cepas pertenecientes a una misma región geográfica, lo cual podría ser una explicación a la mayor sensibilidad observada sobre *L. infantum* (Alvar y col., 2008; Sundar y col., 2007; Van Griensven y col., 2014). De igual forma, dicha variabilidad genética también podría estar relacionada con la capacidad de una especie en producir manifestaciones cutáneas o viscerales de la enfermedad. Tomando en cuenta que *L. infantum* es capaz de producir ambas manifestaciones clínicas, es interesante haber encontrado una mayor sensibilidad de esta especie al tratamiento combinado con el antirretroviral.

Por otra parte, es importante mencionar que aunque se emplearon diferentes líneas celulares de macrófagos murinos para las infecciones *in vitro* con las diferentes especies del parásito, J774 para *L. donovani* y RAW 264.7 para *L. infantum*, no se observaron diferencias producto del uso de estas células, encontrándose porcentajes de infección entre el 70 y el 75% para los dos tipos celulares. Ambas líneas celulares se encuentran bien establecidas y su uso es recomendado para la evaluación de diferentes eventos celulares.

Se han estudiados algunas combinaciones *in vitro* de AMB con otros compuestos leishmanicidas como la paromomicina (Morais-Teixeira y col., 2014), la sitamaquina

(Carvalho y col., 2011), la nitazoxanida (Mesquita y col., 2014), la alicina (Corral y col., 2014a) y el tamoxifen (Trinconi y col., 2014) sobre diferentes especies de *Leishmania*. La combinación de la AMB con la paromomicina presenta un efecto sinérgico (FIC = 0,46) sobre la reducción de la infección de amastigotes de *L. infantum*, pero aditivo (FIC > 1) si se combina con el glucantime (Morais-Teixeira y col., 2014). Mientras que, la combinación de AMB con NFV sobre amastigotes de *L. donovani* (FIC = 0,32) y *L. infantum* (FIC < 0,5) ensayada en este trabajo, resultó ser más efectiva.

Las combinaciones con la sitamaquina y la nitazonaxida resultaron ser aditivas sobre el crecimiento del parásito mientras que, la combinación con la alicina y el tamoxifen fue sinérgica (Corral y col., 2012; Mesquita y col., 2014). La alicina es un producto natural presente en plantas de la familia *Alliaceae*, el cual ha mostrado tener una gran variedad de efectos farmacológicos, entre ellos actividad bactericida, fungicida y antiprotozoaria (*Leishmania sp.* y *Plasmodium sp.*) (McClure y col., 1996; Wagg y col., 2010; Corral y col., 2012). La combinación de la alicina con la AMB resultó ser sinérgica sobre el crecimiento de promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. infantum* y *L. donovani*, con valores de FIC menores a 1 (0,75 y 0,89, respectivamente) (Corral y col., 2012). Estos valores de FIC son, al menos, 2 veces mayores a los obtenidos en este trabajo, cuando aplicamos la combinación del NFV+AMB o NFV+MTF sobre el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos murinos por amastigotes de *L. donovani* y *L. infantum*.

Por otra parte, la combinación de la AMB con el tamoxifen, un modulador selectivo del receptor de estrógenos empleado en el tratamiento de cáncer de mamá (Trinconi y col., 2014), el cual ha mostrado actividad leishmanicida sobre promastigotes y amastigotes de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. chagasi*, y en infecciones experimentales de LC (Miguel y col., 2008; 2009), presenta un efecto sinérgico sobre

amastigotes de *L. amazonensis*, con un FIC estimado de 0,74 (Trinconi y col., 2014). Al emplear la combinación de la AMB con este compuesto, se logra disminuir las concentraciones del antibiótico y con ello reducir la toxicidad. Nuevamente los valores de FIC obtenidos en este trabajo son menores a los obtenidos por otros autores empleando otras combinaciones de drogas.

Se ha demostrado que la MTF actúa sinérgicamente con otros fármacos leishmanicidas como el pentostam, sobre la infección de macrófagos por amastigotes de *L. donovani* (Seifert y col., 2011) así como, con otros compuestos sintéticos prometedores como agentes leishmanicidas como la sitamaquina (Carvalho y col., 2011) y la nitazoxanida (Mesquita y col., 2014). No obstante, la sinergia observada con cada una de esas combinaciones, sobre la infección *in vitro* de macrófagos murinos por amastigotes intracelulares, es relativamente baja ($FIC > 0,5$), en comparación con los FIC obtenidos en este trabajo sobre el morfotipo de interés clínico. En estudios realizados por nuestro laboratorio demuestran un efecto sinérgico entre compuestos naturales de la familia de las 4-ariloxi-7-cloroquinolinas con la AMB ó la MTF, logrando potenciar el efecto leishmanicida de los compuestos con valores de FIC alrededor de 0,7 (Valdivieso y col., 2018).

Otros compuestos como los derivados de aril-quinuclidina, que inhiben la escualeno sintasa en la vía de síntesis del ergosterol los cuales fueron desarrollados originalmente como agentes reductores del colesterol, también tienen efectos antiproliferativos potentes contra *L. amazonensis* y otros tripanosomatideos como *T. cruzi* (Rodrigues y col., 2005; Urbina y col., 2004), además de presentar un efecto sinérgico con el itraconazol y el posaconazol sobre amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* con valores de FIC de 0,17 y 0,11, respectivamente (de Macedo-Silva y col., 2015). En *T. cruzi*, también se ha demostrado el efecto sinérgico de la

amiodarona+posaconazol (Benaim y col., 2006; Veiga-Santos y col., 2012) y de la mevinolina, un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril-coenzima A reductasa, con el ketoconazol con valores de FIC < 0,5 sobre amastigotes intacelulares del parásito (Benaim y col., 2006; Urbina y col., 1993; Veiga-Santos y col., 2012).

Hasta el momento no se había sido evaluado el efecto leishmanicida de la combinación del NFV, el antirretroviral más eficaz sobre *Leishmania*, en combinación con otras drogas leishmanicidas, siendo este trabajo pionero en al área. En estudios realizados por Costa y col. (2016), se analizó el efecto de la combinación de algunos antirretrovirales, tanto inhibidores de la transcriptasa reversa como inhibidores de la proteasa del VIH con la MTF, sobre la proliferación de promastigotes y sobre la infección *in vitro* de macrófagos por amastigotes de *L. infantum*. Estos investigadores encontraron un ligero aumento del efecto inhibitorio del efavirenz, un inhibidor de la transcriptasa reversa, al combinarlo con la MTF sobre promastigotes y amastigotes intracelulares (Costa y col., 2016).

En otros agentes patógenos como *Cryptosporidium sp* y *Plasmodium sp*, se han ensayado combinaciones de antirretrovirales de la familia de los inhibidores de la proteasa del VIH en combinación con otras drogas (Hommer y col., 2003; Skinner-Adams y col., 2007). En el caso de *Cryptosporidium sp*, se ensayó la combinación del amprenavir, indinavir, NFV, ritonavir y saquinavir en combinación con la paromomicina, encontrando un mayor efecto antiproliferativo de los inhibidores cuando se utiliza en combinación sobre este agente patógeno. De todas las combinaciones estudiadas, los autores reportan que la combinación de la paromomicina con el NFV y el ritonavir fueron las más eficaces (Hommer y col., 2003). En *Plasmodium falciparum*, se ha reportado un incremento del efecto antiparasitario *in vitro* de la cloroquina y la mefloquina, cuando se utilizan en

combinación con saquinavir y ritonavir, incluso en cepas resistentes, siendo más eficaz la combinación con ritonavir (Skinner-Adams y col., 2007).

Luego de analizar la información anteriormente reportada, podríamos sugerir que las combinaciones de compuestos utilizadas en este trabajo parecieran ser eficaces sobre *Leishmania*, en comparación con las combinaciones de compuestos que se han ensayado hasta ahora, al igual que ocurre con los trabajos realizados por de Macedo-Silva y col. (2015) y Serrano-Martín y col. (2009a) sobre *Leishmania sp.* y de Urbina y col. (1993) y Benaim y col. (2006) sobre *T. cruzi*, donde los FIC obtenidos son menores a 0,5. Adicionalmente es de interés resaltar, que se logró alcanzar cerca del 90% de inhibición del crecimiento del parásito a concentraciones menores a las empleadas de manera individual, potenciándose así el efecto leishmanicida del NFV al realizar las combinaciones en conjunto con la AMB o la MTF.

Para poder entender la naturaleza de la interacción entre los compuestos que se emplean en combinación es necesario considerar el mecanismo de acción de cada uno de ellos (Pérez-Acuña, 2008; Romand y col., 1996). La potenciación del efecto terapéutico de los compuestos empleados en conjunto, puede darse cuando ambos compuestos afectan una misma ruta bioquímica en diferentes puntos o bien cuando afectan rutas bioquímicas diferentes que son esenciales para la sobrevivencia del agente patógeno (Wagg y col., 2010). De esta manera, al emplear la combinación de dos fármacos que actúen de manera sinérgica, es posible potenciar el efecto terapéutico, lo cual podría explicar por qué algunas combinaciones de compuestos se ven más favorecidas que otras (Hommer y col., 2003; Skinner-Adams y col., 2007).

En *Leishmania sp.*, además de la inhibición de la Ddi1 del parásito por acción del NFV (White y col., 2011; Perteguer y col., 2012), Kumar y col. (2010) ha demostrado que este antirretroviral 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 electroquímico mitocondrial, eventos característicos de la apoptosis. Sin embargo, el tratamiento de los amastigotes axénicos con inhibidores de las caspasas no fue capaz de disminuir el contenido de ADN nuclear fragmentado en parásitos tratados con el 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, producto del tratamiento de los parásitos en cultivos con el NFV, lo cual conduce a la liberación de la endonucleasa G. Estos hallazgos proporcionan una visión más completa del mecanismo de muerte celular inducido por NFV en *L. donovani* (Kumar y col., 2010). Adicionalmente, trabajos realizados en colaboración con el Laboratorio de Bioquímica y Señalización de Parásitos del IDEA, han demostrado que el NFV es capaz de producir una rápida despolarización del potencial electroquímico mitocondrial en promastigotes de *L. mexicana* (13 μM) y *L. donovani* (10 μM) y que además, las combinaciones del NFV+AMB y del NFV+MTF producen una mayor despolarización de la membrana mitocondrial a concentraciones más bajas.

Como ya se ha mencionado, el mecanismo de acción de la AMB, se basa en su alta afinidad por el ergosterol, principal esteroide en *Leishmania*, lo cual altera la permeabilidad de la membrana del parásito, produciendo la formación de poros que resulta en la lisis celular (Ramos y col, 1996; Roberts y col., 2003; Van Griensven y col., 2014). Este fármaco ejerce la acción más potente de todas las drogas leishmanicidas; el efecto de la AMB puede apreciarse en menos de 24 horas de tratamiento en cultivos *in vitro* (Van Griensven y col., 2014; Wasunna y col., 2016). Por esta misma razón, es el compuesto que presenta una mayor toxicidad en el organismo, por lo cual es de sumo interés disminuir su toxicidad bien sea empleando formulaciones lipídicas o

combinándola con otras drogas menos tóxicas pero igual de eficientes (Van Griensven y col., 2014).

Por último, se ha reportado que la MTF es capaz de alterar la síntesis de fosfatidilcolina, así como de afectar la homeostasis intracelular del Ca^{+2} , induciendo la entrada de este ión desde el exterior celular, gracias a la activación de un canal de Ca^{+2} regulado por voltaje, presente en la membrana plasmática (Serrano-Martín y col., 2009; Verma y Dey, 2004; Pinto y col., 2018). A nivel mitocondrial, la MTF inhibe de manera dosis-dependiente la actividad de la citocromo c oxidasa, enzima que participa en la cadena transportadora de electrones, lo que origina una reducción del potencial electroquímico mitocondrial y un significativo declive de los niveles de ATP intracelular, produciendo la muerte celular similar a la apoptosis (Luque-Ortega y Rivas, 2007). También se ha demostrado que la MTF aumenta los niveles de las especies reactivas de oxígeno, lo que conduce a un aumento del estrés oxidativo, alterándose el metabolismo de las poliaminas y el potencial mitocondrial, liberándose el citocromo c y la superóxido dismutasa A mitocondrial produciendo finalmente la fragmentación del ADN nuclear.

Si se analiza el efecto de la combinación del NFV y la AMB sobre el parásito, la AMB presenta un rápido efecto a nivel de la membrana plasmática aún a concentraciones muy bajas, generando poros y desestabilizando la estructura, lo cual podría facilitar de alguna manera el acceso del NFV al interior celular para ejercer su acción leishmanicida más eficazmente, bien sea sobre los blancos que se han postulado actualmente, a nivel mitocondrial o sobre la división del parásito, o bien sobre otro blanco de acción aún sin estudiar. De esta manera se podría explicar porque la combinación del NFV+AMB resulta más eficaz, y además se podría postular que la combinación de NFV con AMB

logra potenciar el efecto antiparasitario del antirretroviral gracias a la acción de los compuestos sobre diferentes rutas bioquímicas.

En el caso de la combinación del NFV+MTF, ambos compuestos presentan un efecto más tardío en comparación con la AMB. No obstante, la MTF es capaz de inhibir el crecimiento del parásito mediante diferentes vías bioquímicas estudiadas hasta ahora, entre ellas inhibiendo la actividad de la citocromo c oxidasa afectando el potencial mitocondrial y la inhibición de la síntesis de fosfatidilcolina; en el caso del NFV también se ha postulado que presenta un efecto a nivel mitocondrial conduciendo a liberación de la endonucleasa G. De este modo, el uso combinado del NFV con la MTF podría llevar a un rápido colapso del potencial mitocondrial, lo cual se traduce finalmente en la muerte del parásito, lo cual conlleva a sugerir que se logra potenciar el efecto leishmanicida de ambos compuestos gracias a su acción sobre una misma ruta bioquímica. Adicionalmente, se ha sugerido que el NFV es capaz de bloquear la división celular, específicamente a nivel de la citocinesis, al inhibir la actividad de la Ddi1-like *Leishmania* involucrada en el proceso de la separación de las cromátidas hermanas durante la duplicación. Esta potenciación producto del uso de la combinación de estos compuestos puede ser más o menos efectiva de acuerdo a las características intrínsecas de cada especie del parásito, como ya se ha discutido anteriormente. Estos hallazgos son de gran importancia, tomando en cuenta, que se logró reducir las dosis necesarias del antirretroviral, a concentraciones más cercanas a la concentración efectiva del NFV sobre el virus.

Los ensayos *in vitro* si bien son útiles para evaluar la actividad leishmanicida de compuestos nuevos así como de combinaciones con otros compuestos, no es posible estudiar los aspectos farmacocinéticos y farmacodinámicos de los compuestos empleados, por lo tanto no son siempre predictivos de las interacciones *in vivo* y además

no permiten evaluar posibles efectos adversos que pudiesen presentarse por el uso de los compuestos (Croft y Coombs, 2003; Mesa-Arango y col., 2012). No obstante, el conocimiento obtenido sobre las interacciones entre fármacos en sistemas *in vitro* son de gran utilidad a la hora de identificar posibles combinaciones que pudiesen actuar de manera sinérgica en un modelo *in vivo*. Considerando que las combinaciones de compuestos evaluadas en este trabajo resultaron ser sinérgicas en el sistema *in vitro* ensayado, se planteó realizar una primera aproximación del efecto de las combinaciones de NFV+AMB y NFV+MTF en ratones BALB/c infectados con *L. infantum* (MCAN/ES/98/LLM-724).

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran, como era de esperar, que el tratamiento en monoterapia de la AMB y MTF en ratones con LV, fue capaz de inhibir la carga parasitaria casi en un 100% con la AMB sobre ambos órganos y 77% y 76% con la MTF sobre hígado y bazo, respectivamente, respecto al grupo control sin tratamiento (Figura 14). En el caso del tratamiento con el NFV se obtuvo una inhibición del 61% en hígado y de 64% en bazo de la carga parasitaria, demostrándose por primera vez el efecto antiparasitario de este antirretroviral en un modelo *in vivo* de LV. En cuanto al tratamiento con la combinación de los compuestos se obtuvieron porcentajes de inhibición de la carga parasitaria casi del 100% para la combinación de NFV+AMB sobre ambos órganos y de 89% (* $p < 0,05$) en hígado y de 84% en bazo (** $p < 0,01$) para la combinación de NFV+MTF.

En el caso de la combinación de NFV+AMB no es posible afirmar si el tratamiento combinado resultó en un aumento del efecto terapéutico del NFV. Esto se debe a que la dosis administrada de la AMB (1 mg/kg) en monoterapia eliminó la carga parasitaria casi en un 100%. Al combinar NFV+AMB, empleando las mismas dosis usadas en el tratamiento individual, también se eliminó aproximadamente el 100% de la

carga parasitaria. Este resultado pudo deberse al efecto leishmanicida de la AMB y no a la combinación con el NFV, por esta razón, no se puede concluir la existencia de una potenciación del efecto leishmanicida del antiretroviral. Sería necesario emplear dosis más bajas de la AMB para evaluar si realmente existe un efecto sinérgico al combinarla con el NFV.

En cuanto al tratamiento combinado de 5 mg/kg NFV + 5 mg/kg MTF, se observó una reducción de la carga parasitaria de 89% en hígado y 84% en bazo, en el grupo de ratones tratados con la combinación de NFV+MTF. En este caso, se podría afirmar que se observó una potenciación del efecto leishmanicida del NFV al emplearlo en combinación con la MTF, sobre la reducción de la carga parasitaria del hígado y bazo.

Se han reportado numerosos estudios de combinación de compuestos en modelos experimentales de LV empleando ratones o hámster. Entre ellos se pueden mencionar los ensayos de la combinación de la MTF con AMB, pentostam y paromomicina (Seifert y col., 2006), de la alicina con AMB (Corral y col., 2014) y de nitroquinolinas con MTF (Nakayama y col., 2011) sobre infecciones experimentales de *L. donovani* y *L. infantum*. No obstante, la mayoría de estas combinaciones resultaron ser aditivas en la reducción de las cargas parasitarias, a excepción de la combinación de la MTF+AMB y de la MTF+paromomicina (Seifert y col., 2006) que resultaron en un ligero aumento del efecto terapéutico de la MTF sobre *L. donovani* al emplearla en combinación.

Hasta el momento, no se han estudiado las interacciones farmacocinéticas y farmacodinámicas que pudiesen presentarse entre los fármacos NFV+AMB y NFV+MTF. El NFV es metabolizado por el citocromo P450 y además es sustrato del CYP2C19, por lo cual puede presentar interacciones bioquímicas desfavorables con otros fármacos generando toxicidad y disminución del efecto terapéutico (Pai y Nahata., 1999; Wilkinson, 2005). Se ha recomendado evitar la administración del NFV con otros

fármacos como fungizidas de la familia de los azoles, algunos anticoagulantes y otros IP's del VIH, ya que pueden generar interacciones farmacocinéticas clínicamente significativas (Dooley y col., 2008; Piscitelli y col., 2001; Randic y Di Carlo, 1997). Sin embargo, no hay información sobre interacciones farmacocinéticas con la AMB ó la MTF.

Para la AMB, se han realizado estudios con otros fármacos antirretrovirales, como atazanavir, darunavir, ritonavir y lopinavir, y los resultados sugieren que no deben producirse interacciones clínicamente relevantes. Por lo tanto, no existe una contraindicación reportada para la administración conjunta de antirretrovirales con AMB. En cuanto a la MTF, el metabolismo de este fármaco no depende de las isoenzimas CYP; adicionalmente no se han reportado interacciones clínicamente importantes con otros fármacos incluyendo los antirretrovirales. No obstante, puede existir la posibilidad de que se produzca una alteración en la biodisponibilidad de MTF, pero no existe evidencia clínica disponible (Dorlo y col., 2012; Mehuys y col., 2012).

Por otro lado, también es importante evaluar los efectos secundarios que presentan los fármacos a emplear en combinación, debido a que si estos presentan los mismos efectos secundarios como náuseas, problemas gastrointestinales y vómitos, no van a presentar una buena tolerabilidad en el paciente. No obstante, algunos de estos efectos secundarios son leves y además podrían reducirse al emplearse en combinación debido a que las dosis a emplear serían menores. Estos estudios son de gran importancia en vías de validar el uso de las combinaciones de drogas en fase clínica, de manera de asegurar una buena tolerabilidad y eficiencia del efecto terapéutico.

Hasta la fecha no se había realizado ningún ensayo *in vivo* de la combinación de antirretrovirales con otros compuestos leishmanicidas. Por tanto, son pioneros nuestros estudios sobre el efecto de la combinación de antirretrovirales con drogas leishmanicidas

en un modelo murino, y además, es la primera vez que se reporta la potenciación del efecto antiproliferativo de un antirretroviral con la MTF en un modelo *in vivo* de LV.

Los resultados obtenidos en este trabajo, dan soporte a la aplicación de terapias combinadas como una de las alternativas quimioterapéuticas con mayor proyección en la actualidad, para mejorar el tratamiento contra la leishmaniasis, en pacientes coinfectados o no con el VIH. Los resultados son prometedores, en particular la combinación de antirretrovirales como el NFV con otras drogas leishmanicidas, al potenciar el efecto antiparasitario del antirretroviral empleado en conjunto con la AMB y la MTF. Por otro lado, la administración combinada de un fármaco como el NFV que presenta un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de dos agentes patógenos distintos, antiparasitaria y antiviral, podría disminuir la duración y los costos del tratamiento, beneficiando en gran medida su aplicación y alcance del mismo. Si bien es necesario el estudio de la combinación de estos compuestos en fase clínica con la finalidad de validar su uso en el tratamiento de pacientes con leishmaniasis y coinfectados con el VIH, se trata de compuestos que se encuentran disponibles en el mercado y además, se conocen sus propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas, su tolerabilidad en el organismo y sus efectos secundarios. Más aún es muy ventajoso emplear combinaciones de fármacos ya aprobados para su administración en pacientes.

5. CONCLUSIONES

- Las combinaciones del NFV+AMB y del NFV+MTF, presentan un efecto sinérgico sobre la proliferación *in vitro* de promastigotes y la reducción del porcentaje de infección de macrófagos murinos por amastigotes de *L. donovani*. De igual forma se observó una disminución del número de amastigotes por células, presentes en las vacuolas lisosomales.
- Tomando en cuenta los resultados, la combinación de NFV+AMB reduce de manera más eficaz la proliferación de *L. donovani* que la combinación de NFV+MTF.
- Las combinaciones de NFV+AMB y de NFV+MTF se clasificaron como sinérgicas sobre *L. infantum*, al reducir el porcentaje de infección *in vitro* de macrófagos murinos.
- La cepa de *L. infantum* proveniente del paciente inmunosuprimido resultó ser más sensible al tratamiento con ambas combinaciones en comparación con las otras cepas. La cepa del paciente inmunocompetente presentó susceptibilidades similares con los dos tratamientos combinados mientras que, la cepa del canino resultó ser menos sensible al tratamiento de NFV+AMB.
- Se demuestra por primera vez el efecto leishmanicida *in vivo* del NFV al reducir la carga parasitaria en hígado y bazo de ratones BALB/c infectados con *L. infantum*.
- El tratamiento con la combinación NFV+MTF en ratones BALB/c infectados con *L. infantum*, logró potenciar el efecto leishmanicida del antirretroviral reduciendo las cargas parasitarias en hígado y bazo.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Albrecht, H. 1998. Leishmaniosis: new perspective on an underappreciated opportunistic infection. *AIDS*. **12**: 2225-226.
2. Albrecht, H., Sobottka, C., Emminger, H., Jablonowski, G., Just, A., Stoehr, T., Kubin, B., Salzberger, T., Van Lunzen, J. 1996. Visceral leishmaniasis emerging as an important opportunistic infection in HIV-infected persons living in areas nonendemic for *Leishmania donovani*. *Arch Pathol Lab Med*. **120**: 189-198.
3. Alfonso, Y., Monzote, L. 2011. HIV Protease Inhibitors: Effect on the opportunistic protozoan parasites. *J Open Med Chem*. **5**: 40-50.
4. Al-Mohammed, H. I., Chance, M. L., Bates, P. A. 2005. Production and characterization of stable amphotericin-resistant amastigotes and promastigotes of *Leishmania mexicana*. *J Antimicrob Chemother*. **49**: 3274–3280.
5. Alvar, J., Aparicio, P., Aseffa, A., Den, Boer, M., Cañavate, C., Dedet, J. P., Gradoni, L., Ter Horst, R., López-Vélez, R., Moreno, J. 2008. The relationship between leishmaniasis and AIDS: the second 10 years. *Clin microbiol*. **21**: 334-359.
6. Alvar, J., Cañavate, C., Gutiérrez-Solar, B., Jiménez, M., Laguna, F., López-Vélez, R., Molina, R., Moreno, J. 1997. *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the First 10 Years. *J Microb*. **10**: 298-310.
7. Alvar, J., Croft, S., Olliaro, P. 2006. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol*. **61**: 223–74.
8. Alvar, J., Gutiérrez-Solarm B., Molina, R., López-Vélez, R., García-Camacho, A. 1992. Prevalence of *Leishmania* infection among AIDS patients. *Lancet*. **339**: 142-149.
9. Alvar, J., Vélez, I., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., Boer, M., WHO Leishmaniasis Control Team. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS ONE*. **7**: 671-683.
10. Andreani, G., Lodge, R., Richard, D., Tremblay, M. J. 2012. Mechanisms of interaction between protozoan parasites and HIV. *Current Op in HIV and AIDS*. **7**: 276-282.

11. 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. *J Antimicrob Chemother.* **50**: 634-648.
12. Aree, A., Estirado, A., Ordobas, M., Sevilla, S., García, N. 2013. Re-emergence of leishmaniasis in Spain: community outbreak in Madrid, Spain, 2009 to 2012. *Euro Surveill.* **18**: 205-216.
13. Armijos, R.X., Weigel, M.M., Calvopiña, M., Mancheno, M., Rodríguez, R. Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica.* **9**:153-160.
14. Azzam, R. 2006. Impaired complement-mediated phagocytosis by HIV type-1-infected human monocyte-derived macrophages involves a cAMP-dependent mechanism. *AIDS Res Hum Retrs.* **7**: 619–29.
15. Benaïm, G., García-Marchán, Y., Reyes, C., Uzcanga, G., Figarella, K. 2013. Identification of a sphingosine-sensitive Ca⁺² channel in the plasma membrane of *Leishmania mexicana*. *Biochem Biophys Res Commun.* **430**: 1091-1096.
16. Benaïm, G., López-Estraño, C., Docampo, R., Moreno, S. 1993. A calmodulin-stimulated Ca⁺² pump in plasma-membrane vesicles from *Trypanosoma brucei*; selective inhibition by pentamidine. *Biochem J.* **296**: 759-763. 1993.
17. Benaïm, G., Sanders, J. M., Garcia-Marchan, Y., Colina, C., Lira, R., Caldera, A. R., Payares, G., Sanoja, C., Burgos, J. M., Leon-Rossell, A., Concepción, J. L., Schijman, A. G., Levin, M., Oldfield, E., Urbina, J. A. 2006. Amiodarone has an intrinsic Anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J Med Chem.* **49**: 892-899.
18. Bentwich, Z. 2003. Concurrent infections that rise the HIV viral load. *J HIV Ther.* **8**: 72–75.
19. Bernal, F. 2016. Pharmacology of antiretroviral. *Rev Med Clin Condes.* **27**: 682-697.
20. Bernier, R. 1995. Activation of human immunodeficiency virus type 1 in monocytoïd cells by the protozoan parasite *Leishmania donovani*. *J Virol.* **11**: 7282-7285.

21. Bonfante-Garrido, R., Barroeta, S. 2002. Leishmaniasis y *Leishmania* en América, con especial referencia a Venezuela. 1era Edición. Barquisimeto, Edo. Lara, Venezuela.
22. Bourgeois, N., Bastien, P., Reynes, J., Makinson, A., Rouanet, I. 2010. Active chronic visceral leishmaniasis in HIV-1-infected patients demonstrated by biological and clinical long-term follow-up of 10 patients. *HIV Med.* **11**: 670–673.
23. Carrillo, E., Jimenez, M., Sanchez, C., Cunha, J., Martins, M, da Pixaia, A., Moreno, J. 2014. Protein malnutrition impairs the immune response and influences the severity of infection in a hamster model of chronic visceral leishmaniasis. *PLoS ONE.* **9**: 1-10.
24. Carvalho, L., Luque-Ortega, J., López-Martin, C., Castanys, S., Rivas, L. Gamarro, F. 2011. The 8-aminoquinolines analogue sitamaquine causes oxidative stress in *Leishmania donovani* promastigotes by targeting succinate dehydrogenase. *J Antimicrob Chemother.* **42**: 4204-4210.
25. Chungu, C. N., Owate, J., Pamba, H. O., Donno, L. 1990. Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. *Trop Med Hygiene.* **84**: 221-225.
26. Colomba, C., Saporito, L., Vitale, F., Reale, S., Vitale, G. 2009. Cryptic *Leishmania infantum* infection in Italian HIV infected patients. *BMC Infect Dis.* **9**: 199-208.
27. Corral, M. J., González-Sánchez, E., Cuquerella, M., Alunda, J. M. 2014a. *In vitro* synergistic effect of amphotericin B and allicin on *Leishmania donovani* and *L. infantum*. *J Antimicrob Chemother.* **58**: 1596-1602.
28. 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*. *Exp Parasitol.* **132**: 475-482.
29. Corral, M. J., Serrano, D. R., Moreno, I., Torrado, J. J., Domínguez, M., Alunda, J.M. 2014b. Efficacy of low doses of amphotericin B plus allicin against experimental visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother.* **12**: 3268-3274.
30. Costa, S., Machado, M., Cavadas, C., Sousa, M. 2016. Antileishmanial activity of antiretroviral drugs combined with miltefosine. *Parasitol Res.* **8**: 51-55.

31. Cota, G., de Sousa, M., Oliveira, T., Rabello, A. 2013. Efficacy of anti-*Leishmania* therapy in visceral leishmaniasis among HIV infected patients: A systematic review with indirect comparison. *Negl Trop Dis.* **7**: 2195-2202.
32. Croft, S. L., Coombs, G. H. 2003. Leishmaniasis–current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* **19**: 502–508.
33. Croft, S. L., Sundar, S., Fairlamb, A. H. 2006. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol.* **19**: 111–126.
34. Croft, S.L., Neal, R.A., Pendergast, W., Chan, J.H. 1987. The activity of alkyl phosphocholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochem Pharmacol.* **36**: 2633-2636
35. Cruz, I., Morales, M. A., Noguer, I., Rodríguez, A., Alvar, J. 2002. *Leishmania* in discarded syringes from intravenous drug users. *Lancet.* **359**: 1124-1125.
36. Cruz, I., Nieto, J., Moreno, J. 2006. *Leishmania*/HIV coinfections in the second decade. *J Med Res.* **123**: 357–388.
37. Cunha, J., Carrillo, E., Sánchez, C., Cruz, I., Moreno, J., Codeiro-da-Silva, A. 2013. Characterization of the biology and infectivity of *Leishmania infantum* viscerotropic and dermatropic strains isolated from HIV+ and HIV- patients in the murine model of visceral leishmaniasis. *P Vector.* **6**: 122-135.
38. Cunningham, A. 2002. Parasitic adaptive mechanism in infection by *Leishmania*. *Ex Mol Pathol.* **72**: 132-141.
39. David, C.V., Craft, N. 2009. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther.* **6**: 491-502.
40. Davis A., Kedzierski L. 2005. Recent advances in antileishmanial drug development. *Curr Opin Invest Drugs.* **6**: 163-169.
41. De Clercq, E. 2009. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *J Antimicrob Chemother.* **33**: 307-320.
42. de Lima, E.B., Porto, C., da Motta, J.O., Sampaio, R.N. 2007. Treatment of American cutaneous leishmaniasis. *An Bras Dermatol.* **82**: 111–124.

43. De Lima, H., Borges, R., Escobar, J., Convit, J 2011. Leishmaniasis cutánea americana en Venezuela: un análisis clínico epidemiológico a nivel nacional y por entidad federal, 1988-2007. *Bol Mal Salud Amb.* **50**: 283–99.
44. de Macedo-Silva, S.T., Visbal, G., Urbina, J.A., de Souza, W., Rodrigues, J.C. 2015. Potent In Vitro Antiproliferative Synergism of Combinations of Ergosterol Biosynthesis Inhibitors against *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* **59**: 6402-6418.
45. De Oliveira, C., Brodskyn, C. 2012. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Front Immunol.* **3**: 145-149.
46. De Trez, C., Brait, M., Leo, O., Aebischer, T., Torrentera, F.A., Carlier, Y., Muraille, E. 2009. Myd88-dependent *in vivo* maturation of splenic dendritic cells induced by *Leishmania donovani* and other *Leishmania* species. *In Immun.* **72**: 824-832.
47. Deniau, M., Cañavate, C., Faraut-Gambarelli, F., Marty, P. 2003. The biological diagnosis of leishmaniasis in HIV-infected patients. *Ann Trop Med Parasitol.* **97**: 115–133.
48. Desjeux, P., Alvar, J. 2003. *Leishmania*/HIV co-infections: epidemiology in Europe. *Ann Trop Med Parasitol.* **97**: 3–15.
49. Diro, E., Lynen, L., Ritmeijer, K., Boelaert, M., Hailu, A., Van Griensven, J. 2014. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in East Africa. *PLoS ONE.* **8**: 2869-2879.
50. Docampo, R., Gadelha, F.R., Moreno, S.N., Benaim, G., Hoffmann, M.E., Vercesi, A. 1993. Disruption of Ca^{2+} homeostasis in *Trypanosoma cruzi* by crystal violet. *J Eukaryotic Microbiol.* **40**: 311-316.
51. Dooley, K.E., Flexner, C., Andrade, A.S. 2008. Drug interactions involving combination antiretroviral therapy and other anti-infective agents: repercussions for resource-limited countries. *J Infect Dis.* **198**: 948–961.
52. Dorlo, T.P., Balasegaram, M., Beijnen, J.H., de Vries, P.J. 2012. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother.* **67**: 2576–2597.

53. Dos Santos, M., Marcia, S., Andrade, R., Gunther, T., Floeter-Winter, L. 2013. Transbilayer Dynamics of Phospholipids in the Plasma Membrane of the *Leishmania* Genus. *PLoS One*. **8**: 1-7.
54. Durand, R. 1998. *Leishmania infantum*: lack of parasite resistance to amphotericin-B in a clinically resistant visceral leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother*. **42**: 2141–2143.
55. Espada, R., Valdespina, S., Alfonso, C., Rivas, G., Ballesteros, M.P., Torrado, J. 2008. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *Int J Pharm*. **361**: 64-69.
56. Feliciangeli, M. D., Delgado, O., Suárez, B., Chiurillo, M. A. 2005. The burden of the *Leishmania chagasi/infantum* infection in a closed rural focus of visceral leishmaniasis in Lara state, west-central Venezuela. *Trop Med Int Health*. **10**: 444-449.
57. Fenske, S., Stellbrink, H.J., Albrecht, H., Greten, H. 1991. Visceral leishmaniasis in an HIV-infected patient: clinical features and response to treatment. *Klin Wochenschr*. **69**: 793–796.
58. Frézard, F., Schettini, D.A., Rocha, O.G., Demicheli, C. 2005. Liposomas: propiedades físicoquímicas y farmacológicas, aplicaciones en quimioterapia basadas en el antimonio. *Quim Nova*. **28**: 511–518.
59. Friedrich, K., Vieira, F.A., Porrozzi, R., Marchevsky, R.S., Miekeley, N., Grimaldi, G.J., Paumgarten, F. 2012. Disposition of antimony in rhesus monkeys infected with *Leishmania braziliensis* and treated with meglumine antimoniate. *J Toxicol Environ Health*. **75**: 63–75.
60. Garg, R. 2009. *Leishmania infantum* amastigotes enhance HIV-1 production in cocultures of human dendritic cells and CD4 T cells by inducing secretion of IL-6 and TNF-alpha. *PLoS Negl Trop Dis*. **35**: 441- 451.
61. Garg, T., Trudel, N., Trembley, M.J. 2007. Consequences of the natural propensity on *Leishmania* and HIV-1 infection. *Curr Med Chem. Trend Parasitol*. **7**: 317-324.
62. Gossage, S. M., Rogers, M. E., Bates, P. A. 2003. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. *J Parasitol*. **33**: 1027-1034.

63. Guerin, P.J., Olliaro, P., Sundar, S. 2002. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis.* **2**: 494–501.
64. Guiguemde, R. T., Sawadogo, O. S., Bories, C., Traore, K. L., Nezien, D., Nikiema, L., Pratlong, F., Marty, P., Houin, R., Deniau, M. 2003. *Leishmania major* and HIV co-infection in Burkina Faso. *Trans Soc Trop Med.* **97**: 168–169.
65. Haldar, A.K., Sen, P., Roy, S. 2011. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. *Mol Biol Int.* **12**: 1–23.
66. Hallander, H. O., Dornbusch, K., Gezelius, L., Jacobson, K., Karlsson, I. 1982. Synergism between aminoglycosides and cephalosporins with antipseudomonal activity: interaction index and killing curve method. *J Antimicrob Chemother.* **22**: 743–752.
67. Henke, J.J., Engelmann, B., Kutscher, G., Nssner, J., Engel, R., Voegeli, D., Leibfritz, J. 1999. Changes of intracellular calcium, fatty acids and phospholipids during miltefosine-induced apoptosis monitored by fluorescence and ¹³C NMR-spectroscopy. *Anticancer Res.* **19**: 4027–4032.
68. Hernández, D. E., Oliver, M., Martínez, C., Planas, G. 1995. Visceral leishmaniasis with cutaneous and rectal dissemination due to *Leishmania braziliensis* in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Int J Dermatol.* **34**: 114–115.
69. 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*. *J Antimicrob Chemother.* **52**: 359–364.
70. 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*. *J Antimicrob Chemother.* **52**: 359–364.
71. Jarvis, J. N., Lockwood, D. N. 2013. Clinical aspects of visceral leishmaniasis in HIV infection. *Curr Opin Infect Dis.* **26**: 1–9.
72. Kaye, P., Scott, P. 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* **9**: 604–615.

73. Kim, D.H., Chung, H.J., Bleys, J., Ghohestani, R.F. 2009. Is paromomycin an effective and safe treatment against cutaneous leishmaniasis? A meta-analysis of 14 randomized controlled trials. *PLoS Negl Trop Dis*. **3**: 1-10.
74. Kumar, D., Kulshrestha, A., Singh, R., Salotra, P. 2009. *In vitro* susceptibility of field isolates of *Leishmania donovani* to miltefosine and amphotericin B: correlation with sodium antimony gluconate susceptibility and implications for treatment in areas of endemicity. *J Antimicrob Chemother*. **53**: 835–38.
75. 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. *Neglec Trop Dis*. **4**: 42-50.
76. Kumar, R., Nylen, S. 2012. Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Frontiers in immunology*. *Inmmunol*. **3**: 251.259.
77. Lachaud, L. 2009. Parasite susceptibility to amphotericin-B in failures of treatment for visceral leishmaniasis in patients co-infected with HIV type 1 and *Leishmania infantum*. *Clin Infect Dis*. **48**: 16–22.
78. Laguna, F., López-Vélez, R., Pulido, F., Salas, A., Torre-Cisneros, J. 1999. Treatment of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a randomized trial comparing meglumine antimoniate with amphotericin B in a Spanish HIV *Leishmania* Study Group. *AIDS*. **13**: 1063–1069.
79. Laguna, F., López-Vélez, R., Soriano, V., Montilla, P., Alvar, J., González-Lahoz, J. M. 1994. Assessment of allopurinol plus meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis in patients infected with HIV. *J Infect*. **3**: 255-259.
80. Laguna, F., Videla, S., Jiménez-Mejias, M., Sirera, G., Torre-Cisneros, J. 2003. Amphotericin B lipid complex versus meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis in patients infected with HIV: a randomized pilot study. *J Antimicrob Chemother*. **52**: 464–468.
81. Lima, I. P., Muller, M. C., Holanda, T. A. 2013. Human immunodeficiency virus/*Leishmania infantum* in the first foci of urban American visceral leishmaniasis: clinical presentation from 1994 to 2010. *Rev Soc Bras Med Trop*. **46**: 156–160.

82. Lindoso, J. A., Fernandes, G., Cruz, A. M., Goto, H., Silveira, A. A., Sierra, G. A., De Sousa-Gomes, N., Santos-Oliveira, J., Rabello, A. 2014. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in Latin America. *PLoS ONE*. **8**: 3136-2845.
83. Lira, R., Contreras, L.M., Santa-Rita, R.A, Urbina, J. 2001. Mechanism of action of antiproliferative alkyl-lysophospholipids against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: Potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. *J Antimicrob Chemother*. **47**: 537–546.
84. Liu, M., Chen, M., Yang, Z. 2017. Design of amphotericin B oral formulation for antifungal therapy. *J Drug Delivery*. **24**: 1-9.
85. López-Vélez, R. 2003. The impact of highly active antiretroviral therapy (HAART) on visceral leishmaniasis in Spanish patients who are co-infected with HIV. *A Trop Med Parasitol*. **97**: 143-147.
86. Luque-Ortega, J.R., Rivas, L. 2007. Miltefosine (hexadecylphosphocoline) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother*. **51**: 327-1332.
87. Lux, H., Heise, N., Klenner, T., Hart, D.T., Oppendoes, F.R. 2000. Ether-lipid (alkyl-phospholipids analog) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogs in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*. **111**: 1–14.
88. Lyon, S., Veeken, H., Long, J. 2003. Visceral leishmaniasis and HIV in Tigray, Ethiopia. *Trop Med Int Health*. **8**: 733–739.
89. Maltezou, H. C. 2008. Visceral leishmaniasis: advances in treatment. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. **3**: 192–98.
90. Mary, C., Faraut, F., Lascombe, L., Dumon, H. 2004. Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity. *J Microbiol*. **42**: 5249-5255.
91. Mbongo, P.M., Loiseau, D.G., Craciunescu, M., Robert-Gero, C. 1998. Synergistic effect of Ir(COT)-pentamidine alizarin red and pentamidine, amphotericin B, and paromomycin on *Leishmania donovani*. *Acta Tropica*. **70**: 239–245.

92. McClure, D. C., Noland, L. L., Zatyra, S. A. 1996. Antileishmanial properties of *Allium sativum* extracts and derivatives. *Acta Horticulturae*. **426**: 183-191.
93. Mehuys, E., Dupond, L., Petrovic, M., Christiaens, T., Van Bortel, L., Adriaens, E. 2012. Medication management among home-dwelling older patients with chronic diseases: possible roles for community pharmacists. *Nutr Health Aging*. **16**: 721-726.
94. Mejías, F., Torrealba, C., Dagger, F., Valdivieso, E. 2015. Efecto del NFV en combinación con AMB y MTF sobre *Leishmania mexicana*. Informe Métodos de Investigación. Escuela de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.
95. Mengistu, G., Ayele, B. 2007. Visceral leishmaniasis and HIV co-infection in patients admitted to Gondar University Hospital, North West Ethiopia. *Ethiop J Health Dev*. **21**: 53–60.
96. Merson, M.H., O'Malley, J., Serwadda, D., Apisuk, C. 2008. The history and challenge of HIV prevention. *Lancet*. **372**: 475–488.
97. Mesa-Arango, A. C., Scorzoni, L., Zaragoza, O. 2012. Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Microbiol*. **3**: 286-291.
98. 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.
99. Michel, G., Pomares, C., Ferrua, B., Marty, P. 2011. Importance of worldwide asymptomatic carriers of *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) in human. *Acta Tropica*. **119**: 69-75.
100. Miguel, D.C., Yokoyama-Yasunaka, J.K., Uliana, S.R. 2008. El tamoxifeno es eficaz en el tratamiento de infecciones por *Leishmania amazonensis* en ratones. *PLoS Negl Trop Dis*. **2**: 24-31.
101. Miguel, D.C., Zauli-Nascimento, R.C., Yokoyama-Yasunaka, J.K., Katz, S., Barbieri, C.L., Uliana, S.R. 2009. Tamoxifeno como potencial agente antileishmanial: eficacia en el tratamiento de infecciones por *Leishmania braziliensis* y *Leishmania chagasi*. *J Antimicrob Chemother*. **63**: 365 – 368.

102. Milano, S. 2012. IL-15 in human visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Clin Exp Immunol*. **127**: 360–365.
103. Miro, G., Oliva, G., Cruz, I., Cañavate, C., Mortarino, M., Vischer, C., Bianciardi, P. 2009. Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Vet Dermatol*. **6**: 397-404.
104. Molina, R., Gradoni, L., Alvar, J. 2003. HIV and the transmission of *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol*. **97**: 29–45.
105. Monge-Maillo, B., López-Vélez, R. 2013. Therapeutic Options for Visceral Leishmaniasis. *Drugs*. **73**: 1863–1888.
106. Monge-Maillo, B., Norman, F., Cruz, I., Alvar, J., López-Vélez, R. 2014. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in the Mediterranean Region. *PLoS ONE*. **8**: 3021-3029.
107. Morais-Teixeira, E., Gallupo, M.K., Rodrigues, L.F., Romanha, A.J., Rabello A. 2014. *In vitro* interaction between paromomycin sulphate and four drugs with leishmanicidal activity against three New World *Leishmania* species. *J Antimicrob Chemother*. **69**: 150-154.
108. Moreno, J., Cañavate, C., Chamizo, C., Laguna, F., Alvar, J. 2000. HIV–*Leishmania infantum* co-infection: humoral and cellular immune responses to the parasite after chemotherapy. *Trans R Soc Trop Med*. **94**: 328–332.
109. Moreno, M., Ortega-Moreno, M., Belizario, D., Galindo, W., Zerpa, O. 2016. Epidemiología de la leishmaniasis visceral en el estado Nueva Esparta – Venezuela. Período 1995 – 2015. *Dermatol Venez*. **54**: 17-23.
110. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for celular growth and survival: Aplication to proliferacion and cytotoxicity assay. *J Immunol*. **65**: 55-63.
111. Mougneau, E., Bihl, F., Glaichenhaus, N. 2011. Cell biology and immunology of *Leishmania*. *Immunol Rev*. **240**: 286–296.
112. Musa, A. M., Younis, B., Fadlalla, A., Royce, C., Balasegaram, M. 2010. Paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis in Sudan: a randomized, open-label, dose-finding study. *PLoS Negl Trop Dis*. **4**: 12-21.

113. Neal, R. A., Allen, S., McCoy, N., Olliaro, P., Croft, S. L. 1995. The sensitivity of *Leishmania* species to aminosidine. *J Antimicrob Chemother.* **35**: 577-584.
114. Nguewa, P., Fuertes, M., Cepeda, M., Iborra, S., Carrio, J., Valladares, B., Alonso, C., Pérez, J. 2005. Pentamidine is an antiparasitic and apoptotic drug that selectively modifies ubiquitin. *Chem Biodivers.* **2**: 1387-1400.
115. Nylen, S., Sacks, D. 2007. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trend Immunol.* **28**: 378–384.
116. Okwor, I., Uzonna, J. 2013. The immunology of *Leishmania*/HIV co-infection. *Inmunol Res.* **56**: 163-171.
117. Olivier, M. 2003. The pathogenesis of *Leishmania*/HIV coinfection: cellular and immunological mechanisms. *Ann Trop Med Parasitol.* **97**: 79–98.
118. Olliaro, P.L., Taylor, W. 2003. Antimalarial compounds: from bench to bedside. *J Exp Biol.* **206**: 3753-3759.
119. Omollo, R., Alexander, N., Edwards, T., Khalil, E., Younis, B., Abuzaid, A., Wasunna, M., Njoroge, N., Kinoti, D., Kirigi, G., Dorlo, T., Ellis, S., Balasegaram, M., Musa, A. 2011. Safety and Efficacy of miltefosine alone and in combination with sodium stibogluconate and liposomal amphotericin B for the treatment of primary visceral leishmaniasis in East Africa: study protocol for a randomized controlled trial. *Trials.* **12**: 166-176.
120. Ortega, M. E., Moreno, D., Lugo, A., Belizario, D., Galindo, W., Guevara, J. R., Zerpa, O. 2013. Coinfección *Leishmania*/VIH: clínica y epidemiología en Venezuela. Período 2000-2013. *Dermatol Venez.* **51**: 20-25.
121. Ostry, B., Uranw, B., Rija, S. 2015. Transmission of *Leishmania donovani* in the Hills of Eastern Nepal, an Outbreak Investigation in Okhaldhunga and Bhojpur Districts. *PLoS Negl Trop Dis.* **9**: 1-17.
122. Oullette, M., Orummelsmith, J., Papadopoulou, B. 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance* **7**: 257-266.
123. Pai, V.B., Nahata, M.C. 1999. Nelfinavir mesylate: a protease inhibitor. *Ann Pharmacother.* **33**: 325–339.

124. Paris, C., Loiseau, P. M., Bories, C., Breard, J. 2004. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Antimicrob Chemother.* **48**: 852-859.
125. Pérez-Acuña, F. 2008. Interacciones de drogas anti-hipertensivas. *Revista Latinoamericana de Hipertensión.* **3**: 1856-1865.
126. Perteguer, M.J., Gómez-Puertas, P., Cañavate, C., Dagger, F., Gárate, T., Valdivieso, E. 2012. Ddi1-like protein from *Leishmania major* is an active aspartyl proteinase. *Cell Stress Chap.* **18**: 171-181.
127. Petter, A., Shetty-Lee, A., Kofler, G., Huemer, H.P., Larcher, C. 2011. Visceral leishmaniasis in an AIDS patient on successful antiretroviral therapy: failure of parasite eradication despite increase in CD4⁺ T-cell count but low CD8⁺ T-cell count. *Scand J Infect Dis.* **33**: 236–238.
128. Pintado, V., Martín-Rabadan, P., Rivera, M. L., Moreno, S., Bouza, E. 2001. Visceral leishmaniasis in human immunodeficiency virus (HIV)-infected and non-HIV infected patients. *Med.* **80**: 54–73.
129. Pinto, A., Rodríguez-Durán, J., Serrano-Martin, X., Hernández, V., Benaim, G. 2018. Mechanism of action of miltefosine on *Leishmania donovani* involves the impairment of acidocalcisomes function and the activation of the sphingosine-dependent plasma membrane Ca²⁺ channel. *Antimicrob Agents Chemother.* **16**: 1-10.
130. Piscitelli, S.D., Gallicano, K.D. 2001. Interactions among Drugs for HIV and Opportunistic Infections. *N Engl J Med.* **344**: 984-996.
131. Podinovskaia, M., Descoteaux, A. 2015. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol.* **10**: 111-129.
132. Pozio, E., Gómez, M., 2005. The Impact of HIV-protease inhibitors on opportunistic parasites. *Trends Parasitol.* **21**: 58–63.
133. Raes, G., Beschin, A., Ghassabeh, G. H., De Baetselier, P. 2007. Alternatively activated macrophages in protozoan infections. *Curr immunol.* **19**: 454-459.

134. Rakotamanga, M., Blanc, S., Gaudin, K., Chaminade, P., Loiseau, P.M. 2007. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* **51**: 1425-1430.
135. 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. *J Antimicrob Chemother.* **38**: 1079-1084.
136. Ramos, H., Valdivieso, E., Gamargo, M., Dagger, F., Cohen, B. E. 1996. Amphotericin B kills unicellular *Leishmania* by forming aqueous pores permeable to small cations and anions. *J Membr Biol.* **152**: 65-75.
137. Randic, S., Di Carlo, F.J. 1997. Human cytochrome P450 enzymes: a status report summarizing their reactions, substrates, inducer, and inhibitors. *Rug Meta Rev.* **29**: 413-580.
138. Ribera, E., Tusetb, M., Martín, B., del Cachob, E. 2011. Characteristics of antiretroviral drugs. *Infect Microbiol Clin.* **29**: 362-391.
139. Rijal, S., Yardley, V., Chappuis, F. 2007. Antimonial treatment of visceral leishmaniasis: are current *in vitro* susceptibility assays adequate for prognosis of *in vivo* therapy outcome?. *Microbes Infect.* **9**: 529–535.
140. Ritmeijer, K. 2013. Old and new treatments for HIV/VL co-infection. In: Proceedings of the Fifth World Leishmaniasis Congress, Porto de Galhinas, Brazil.
141. 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. *Mol Biochem Parasitol.* **33**: 129-142.
142. Robertson, G., Field, J., Goodwin, B., Bierach, S., Tran, M., Lehnert, A., Liddle, C. 2003. Transgenic mouse models of human CYP3A4 gene regulation. *Mol Pharmacol.* **64**: 42-50.
143. Rodrigues, J.C., Urbina, J.A., de Souza, W. 2005. Antiproliferative and ultrastructural effects of BPQ-OH, a specific inhibitor of squalene synthase, on *Leishmania amazonensis*. *Exp Parasitol.* **111**: 230–238

144. 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 Chemother.* **40**: 2015-2020.
145. Romera, C., I., Larisgoitiaa, A., Trovato A., Escudero, V., Bellón, J. M., Sanjurjo-Saéz, S. 2011. Indicación de uso de los antirretrovirales de última generación en la práctica clínica actual. *Farm Hosp.* **1**: 14-22.
146. Rybniker, J., Goede, V., Mertens, J., Ortmann, M., Kulas, W., Kochanek, M., Arribas, J., Fatkenheuer, J. 2010. Treatment of visceral leishmaniasis with intravenous pentamidine and oral fluconazole in an HIV-positive patient with chronic renal failure — a case report and brief review of the literature. *J Infec Dis.* **14**: 522–525.
147. Saint-Pierre-Chazalet, M., Brahim, B., Le Moyec, M., Bories, L., Rakotomanga, C., Loiseau, M. 2009. Membrane sterol depletion impairs Miltefosine action in wild-type and miltefosine-resistant *Leishmania donovani* promastigotes. *J Antimicrob Chemother.* **64**: 993–1001.
148. 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.
149. Savoia, D., Alice, T., Tovo, P. A. 2005. Antileishmanial activity of HIV peptidase inhibitors. *J Antimicrob Chemother.* **26**: 92-94.
150. Seifert, K., Croft, SL. 2006. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. *J Antimicrob Chemother.* **50**: 73-79
151. Seifert, K., Munday, J., Syeda, T., Croft, S. 2011. *In vitro* interactions between simaquine and amphotericin B, sodium stibogluconate, miltefosine, paromomycin and pentamidine against *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother.* **66**:850-885.
152. 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.

153. Serrano-Martín, X., Payares, G., De Lucca, M., Martínez, J.C., Mendoza-León, A., Benaim, G. 2009. Amiodarone and miltefosine act synergistically against *Leishmania mexicana* and can induce parasitological cure in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother.* **53**: 5108-5111.
154. Shokri, A., Emamic, S., Fakharb, M., Hosseini, S., Masoud T., Keighobadic, M. 2017. In vitro antileishmanial activity of novel azoles (3-imidazolylflavanones) against promastigote and amastigote stages of *Leishmania major*. *Acta Tropica.* **167**: 73-79.
155. Sindermann, H., Croft, S.L., Engel, K.R., Bommer, W., Eibl, H.J., Unger, C. 2004. Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol.* **193**: 173-80.
156. 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. *J Antrimicrob Chemother.* **51**: 759-762.
157. Soto, J., Soto, P. 2006. Estado actual y futuro de la terapia anti-leishmaniásica en Colombia. *Biomédica.* **26**: 194-206.
158. Stebbing, J., Gazzard, B., Douek, D.C. 2004. Where does HIV live?. *J Med.* **18**: 1872-1880
159. Stork, D., Pett, S., Marriott, D., Harkness, J. 2006. Post-kala-azar dermal leishmaniasis due to *Leishmania infantum* in a human immunodeficiency virus type 1-infected patient. *J Clin Microbiol.* **44**: 1178–1180.
160. Sundar, S., Jha, T. K., Thakur, C. P. 2007. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. *J Med.* **356**: 2571-2581.
161. Sundar, S., Murray, H.W. 2005. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. *Bull World Health Organ.* **83**: 394–95.
162. Tomioka, H., Tatano, Y., Maw, W.W., Sano, C., Kanehiro, Y., Shimizu, T. 2012. Characteristics of suppressor macrophages induced by mycobacterial and protozoal infections in relation to alternatively activated M2 macrophages. *Clin Devel Immunol* **12**: 63-67.

163. Torrado, J.J., Espada, R., Ballesteros, M.P., Torrado-Santiago, J. 2008. Amphotericin B formulations and drug targeting. *J Pharm Sci.* **97**: 2405-2425.
164. Traviezo, L. E. 2012. Diversidad de flebotominos en una zona endémica de leishmaniasis visceral americana en Venezuela. *Rev Peru Med Exp Salud Pública.* **29**: 503-508.
165. Trinconi, C., Reimão, J., Yasunaka, Y., Danilo, C., Silva R. B. 2014. Combination Therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* **58**: 2608-2614.
166. Trudel, N., Garg, R., Messier, N. 2008. HIV-1 peptidase inhibitors significantly reduce intracellular survival of *Leishmania* species that cause visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* **198**: 1292-1299.
167. Urbina, J.A., Concepción, J.L., Caldera, A., Payares, G., Sanoja, C., Otomo, T., Hiyoshi, H. 2004. *In vitro* and *in vivo* activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* **48**: 2379–2387.
168. Urbina, J.A., Lazard, K., Marchan, E., Visbal, G., Aguirre, T., Piras, M.M., Piras, R., Maldonado, R.A. Payares, G., de Souza, W. 1993. Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrob Agents Chemother.* **37**: 580–591.
169. Uzonna, J.E. 2001. Immune elimination of *Leishmania major* in mice: implications for immune memory, vaccination, and reactivation disease. *J Immunol.* **167**: 6967–6974.
170. Valdivieso, E., Dagger, F., Rascón, A. 2007. *Leishmania mexicana*: identification and characterization of an aspartil proteinase activity. *Ex Parasitol.* **116**: 77-82.
171. Valdivieso, E., Mejías, F., Torrealba, C., Benaim, G., Kouznetsov, V., Sojo, F., Rojas-Ruiz, F., Arvelo, F., Dagger, F. 2018. *In vitro* 4-Aryloxy-7-chloroquinoline derivatives are effective in mono- and combined therapy against *Leishmania donovani* and induce mitochondrial membrane potential disruption. *Acta Tropica.* **183**: 36-42.

172. 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.* *Exp Parasitol.* **126**: 557-563.
173. Van Griensven, J., Carrillo, E., López-Vélez, R., Moreno, J. 2014. Leishmaniasis in immunosuppressed individuals. *Clin Microbiol Infect.* **20**: 286-299.
174. Van Griensven, J., Diro, E. 2012. Visceral leishmaniasis. *Infect Dis Clin.* **26**: 309–322.
175. Van Griensven, J., Diro, E., López-Vélez, R., Boelaert, M., Lynen, L. 2013. HIV-1 protease inhibitors for treatment of visceral leishmaniasis in HIV-coinfected individuals. *Lancet Infect Dis* **13**: 251–259.
176. Veiga-Santos, P., Barrias, E.S., Santos, J.F., de Barros-Moreira, T.L., de Carvalho, T.M., Urbina, J.A., de Souza, W. 2012. Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Antimicrob Agents.* **1**: 61–71.
177. Vercesi, A. E., Docampo, R. 1992. Ca^{+2} transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca^{2+} pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential *in situ*. *Biochem J.* **284**: 463-467.
178. Verma, N.K., Dey, C.S. 2004. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *J Antimicrob Chemother.* **48**: 3010-3015.
179. Volmer, A.A., Szpilman, A., Carreira, E. 2010. Synthesis and biological evaluation of anphotericin B derivatives. *Nat Prod Rep.* **9**: 1329-1349.
180. Wagg, T., Gelhaus, C., Rath, J., Stich, A., Leippe, M., Schirmeister, T. 2010. Allicin and derivatives are cysteine protease inhibitors with antiparasitic activity. *Bio Med Chem.* **20**: 5541-5543.
181. Wasunna, M., Njenga, S., Balasegaram, M., Alexander, N., Omollo, R., Edwards, T., Dorlo, T. C., Musa, B., Hassan, M., Ali, S., Elamin, M., Kirigi, G., Juma, R., Kip, A., Schoone, G., Hailu, A., Olobo, J., Ellis, S., Robert, S., Wells, S., Khilil, A., Strub, N., Alves, F., Musa, M. 2016. Efficacy and safety of ambisome in combination with sodium stibogluconate or miltefosine and miltefosine monotherapy for African visceral leishmaniasis: phase II randomized trial. *PLoS Negl Trop Dis.* **13**: 1-18.

182. Wasunna, M.K. 2005. A phase II dose-increasing study of sitamaquine for the treatment of visceral leishmaniasis in Kenya. *J Trop Med Hyg.* **73**: 871–876.
183. White, R.E., Powel, I., Berry, C. 2011. HIV proteinase inhibitors target the Ddi1-like protein of Leishmania parasites. *FASEB.* **25**: 1729-1736.
184. WHO. 2008. Report of the Fifth Consultative Meeting on *Leishmania*/HIV Co-infection. Addis Ababa, Ethiopia.
185. WHO. 2010. Control of the Leishmaniasis. In: WHO Technical Report Series 949: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of leishmaniasis. Geneva, Switzerland.
186. WHO. 2017. Global leishmaniasis update, 2006–2015: a turning point in leishmaniasis surveillance. **38**: 557–565.
187. Wilkinson, G. 2005. Drug metabolism and variability among patients in drug response. *N Engl J Med.* **352**: 2211-2221.
188. Wolday, D., Akuffo, H., Demessie, A., Britton, S. 1999. Role of *Leishmania donovani* and its lipophosphoglycan in CD4⁺ T-cell activation-induced human immunodeficiency virus replication. *Infect Immun.* **67**: 5258–5264.
189. Yeates, C. 2002. Sitamaquine. *Curr Opin Drug Discov.* **87**: 1446-1456.
190. Zerpa, O., Ulrich, M., Borges, R., Rodriguez, V., Centeno, M., Negron, E., Belizario, D., Convit, J. 2003a. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela. *Rev Panam Salud Pública.* **13**: 239–245
191. Zerpa, O., Ulrich, M., Borges, R., Rodríguez, V., Centeno, M., Negrón, E. 2005. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela. *Rev Panam Salud Pública.* **13**: 239-245.
192. Zerpa, O., Ulrich, M., Convit, J., Benítezm, M., Blancom, B., Feliciangeli, D., Negrón, E., Rodríguez, N., Sánchez, M., Tapia, F.J., García, B. 2003b. Programa Control de la Leishmaniasis Visceral en Venezuela. *SA Instituto de Biomedicina UCV-MPPS*, Caracas, Venezuela.

193. Zhao, C. 2006. In primary human monocyte-derived macrophages exposed to human immunodeficiency virus type 1, does the increased intracellular growth of *Leishmania infantum* rely on its enhanced uptake?. *J Gen Virol.* **87**: 1230–1295.
194. Zufferey, R., Allen, S., Barron, T., Sullivan, D.R., Denny, P.W. 2003. Ether phospholipids and glycosylinositolphospholipids are not required for amastigote virulence or for inhibition of macrophage activation by *Leishmania major*. *J Biol Chem.* **278**: 44708–44718.