

Marcadores de resistencia en Leishmania:

Susceptibilidad in vitro a drogas leishmanicidas vs. retención de calceína en aislados de pacientes

Resistance markers in Leishmania: in vitro susceptibility to leishmanicidal drugs vs. calcein retention isolated from patients

Maritza Padrón-Nieves^{1,3}
Alicia Ponte-Sucre^{2,3}

¹ Doctor en Farmacología. Cátedra de Farmacología y Toxicología.

² Doctor en Farmacología. Cátedra de Fisiología Humana.

³ Escuela Luis Razetti. Instituto de Medicina Experimental. Facultad de Medicina. Universidad Central de Venezuela.

Autor de correspondencia: Maritza Padrón-Nieves. Oficina 204. Instituto de Medicina Experimental.
Telf: (58-212) 605-3665. Fax: (58-212) 693-4351. e-mail: mpadron43@gmail.com

Recibido: 28/10/2013

Aceptado: 18/11/2013

Resumen

La identificación de quimio-resistencia con marcadores celulares fáciles de cuantificar no ha sido descrita en *Leishmania*. En este trabajo comparamos la susceptibilidad in vitro a drogas leishmanicidas vs. la retención intracelular de calceína, una medida indirecta de la actividad de los transportadores MDR1 y MRP1, en parásitos aislados de pacientes con Leishmaniasis Cutánea Difusa con fracaso terapéutico a Glucantime. Estos hallazgos los comparamos con resultados obtenidos de especies de referencia. Encontramos que el ensayo de susceptibilidad a drogas leishmanicidas, es fácil, rápido y reproducible, mas no necesariamente predictivo de fenotipo quimio-resistente. Por otra parte, la detección fluorimétrica de retención de calceína permitió diferenciar a los aislados de acuerdo a su capacidad de expresar los diferentes transportadores ABC. En conclusión, esta última metodología podría incorporarse al esquema seguido hasta ahora para el diagnóstico y tratamiento de la leishmaniasis, como predictiva del éxito de la terapia leishmanicida.

Palabras clave: *Leishmania*, susceptibilidad a fármacos, quimio-resistencia, retención de calceína, transportador ABC.

Abstract

Chemo-resistance screening with cell markers is easy to quantify but has not been implemented for leishmaniasis. In this paper we compared the in vitro susceptibility to classical and experimental drugs with calcein retention by parasites isolated from patients with Diffuse Cutaneous Leishmaniasis, suffering chemotherapeutic failure to Glucantime. Calcein is a natural ABC transporter substrate and its accumulation reflects the activity of MDR1 and MRP1 transporters. The results were compared with those obtained from WHO-reference *Leishmania* strains. Our results suggest that the screening of *Leishmania* promastigotes drug susceptibility is easy, fast and reproducible, but not necessarily predictive of the chemo-resistant phenotype. Moreover, the results demonstrate that the evaluation of calcein retention differentiates the studied isolates according to their ability to express different ABC transporters and suggest that this methodology could be part of a scheme for diagnosis and treatment of leishmaniasis as predictive of leishmanicidal therapy.

Key words: *Leishmania*, drugs susceptibility, Chemo-resistance, calcein retention, ABC transporters.

Introducción

Leishmaniasis es el término descriptor de las expresiones clínicas de la enfermedad causada por un parásito intracelular obligado de las células del sistema fagocítico monocitario del género *Leishmania* (L.)¹. En Venezuela, la leishmaniasis cutánea (98,8 % de los casos) es endémica². Para su tratamiento, el fármaco de elección es el antimonio de meglumina^{3,4} (Glucantime®, de Aventis), o la Ulamina, fabricada

en Venezuela, con propiedades similares al Glucantime⁵. Su administración intramuscular dolorosa, la duración del tratamiento (varias semanas) y los efectos secundarios, limitan el éxito de esta terapia. Otros aspectos a considerar son el fracaso terapéutico en algunos pacientes así como las recidivas. Alternativamente y desde los años 80 en Venezuela se usa la inmunoterapia⁶.

La quimio-resistencia, definida como la disminución de la eficacia del medicamento en una población previamente susceptible, es una de las causas del fracaso terapéutico en la leishmaniasis⁷. La quimio-resistencia puede ser natural o innata (p.e. *L. braziliensis* al ketoconazol); o adquirida, al seleccionar parásitos con características que les permiten sobrevivir en presencia de la droga al ser expuestos reiteradamente a dosis sub-óptimas de fármacos^{1,8}. Al igual que en células de mamíferos, en *Leishmania* este fenómeno implica la disminución de la acumulación celular de fármacos debido a la sobre-expresión de transportadores ABC (por ATP Binding Cassette) responsables de la eliminación efectiva de desechos celulares, toxinas ambientales y otros xenobióticos^{9,10}. El primer transportador ABC descrito (y el más estudiado) fue el ABCB1 (glicoproteína P, P-gp, MDR) cuyos sustratos son drogas hidrofóbicas, catiónicas o neutras¹¹. Posteriormente fueron identificados el ABCC1 (MRP, por su siglas en inglés, Multidrug Resistance-associated Protein) para drogas aniónicas¹² y el ABCG2 (MXR, Mitoxantrone Resistance Protein o BCRP, Breast Cancer Resistance Protein) para drogas hidrofóbicas¹¹. En *Leishmania*, Ouellette y colaboradores¹³ fueron pioneros al describir el círculo H, una estructura extracromosomal que contiene genes para los transportadores ABCC, cuyo aumento en su expresión está asociado a la resistencia a drogas en *Leishmania*.

Los mecanismos de quimio-resistencia para un fármaco específico pueden ser múltiples y no ser exclusivos para un tipo de droga. Esto sugiere que diversos sistemas contribuyen a la preservación de este fenotipo celular. Por ejemplo, la expresión de marcadores de metaciclógenésis, así como de transportadores asociados a la incorporación de nutrientes disminuye en *Leishmania* quimio-resistente⁸. Adicionalmente, la actividad de enzimas del metabolismo de la glucosa y los amino ácidos está alterada, al igual que los niveles de metabolitos involucrados en la homeostasis redox como pterina y tripanotona, y la actividad de la enzima dihidrofolato-reductasa / timidilato-sintetasa⁸. Estos cambios sugieren que el monitoreo de la quimio-resistencia debería incluir la determinación de marcadores celulares tal y como fue propuesto por Croft y colaboradores en 2006¹.

La alternativa actual para determinar este fenotipo en las especies de *Leishmania* utiliza el modelo in vitro macrófago-amastigote. Su uso permite correlacionar la respuesta clínica a los medicamentos y la disminución cuantitativa de la tasa de infección de los macrófagos a concentraciones crecientes de las drogas. Sin embargo, esta técnica es laboriosa y de alto costo, condiciones que desestimulan su aplicación en el laboratorio de rutina. Debido al aumento de la incidencia de casos de leishmaniasis con fracaso terapéutico, urge entonces identificar marcadores de resistencia fáciles de utilizar en el laboratorio de rutina, para guiar la terapia leishmanicida.

En nuestro estudio, pionero en Venezuela, evaluamos si la acumulación de calceína diferencia a los aislados de acuer-

do a su capacidad de expresar los transportadores ABC, y comparamos los resultados con aquellos que determinan la susceptibilidad de los parásitos a drogas clásicas y experimentales leishmanicidas. La prueba fluorescente que utiliza calceína acetoximetilada (calceína/AM-no fluorescente) es útil para demostrar quimio-resistencia mediada por transportadores ABC en parásitos y otras células¹⁴. La calceína/AM difunde a través de las membranas celulares, es degradada por esterases endógenas y es transformada en calceína fluorescente. Si los transportadores ABC están sobre-expresados en la célula, eliminan la calceína, la cual no se acumula en el interior celular, y disminuye la fluorescencia intracelular¹⁵. El uso de inhibidores específicos para cada tipo de transportador permitió determinar la contribución de cada uno de ellos al fenotipo quimio-resistente. Nuestros resultados sugieren que esta metodología podría incorporarse al esquema seguido hasta ahora para el diagnóstico y tratamiento de la leishmaniasis.

Métodos

Se utilizaron especies de referencia certificadas por la Organización Mundial de la Salud: *Leishmania (V.) braziliensis* (MHOM/BR/84/LTB300), *Leishmania (L.) mexicana* (MHOM/BR/82/Bel21), *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) y parásitos aislados de lesiones de tres pacientes con Leishmaniasis Cutánea Difusa con fracaso terapéutico al tratamiento con Glucantime (VE2000MM, VE98MR y VE96ZC). Su historia clínica se describe en la Tabla I. Los aislados se mantuvieron en nitrógeno líquido hasta su uso, se descongelaron según protocolos convencionales y para su crecimiento fueron sub-cultivados en medio semisólido de agar-sangre/medio glucosado bajo criterios establecidos.

Se evaluó la susceptibilidad de los promastigotes de las especies de referencia a las drogas *leishmanicidas* [pentamidina (0 a 150 μM) y anfotericina-B (0 a 10 μM)] y no leishmanicidas [glibenclamida (0 a 100 μM)]. Los parásitos (1×10^7 células ml^{-1}) se sembraron y se incubaron a temperatura ambiente (TA). La droga se añadió al segundo día; se determinó la densidad celular en las siguientes 24, 48 y 72 h. Se construyeron curvas dosis respuesta y se estableció la GI_{50} , parámetro propuesto por el National Cancer Institute para fijar la concentración de droga que causa 50 % de inhibición del crecimiento celular. Su cálculo corrige el valor encontrado en base a la densidad celular a tiempo cero para cada droga¹⁶. Al determinar la GI_{50} para cada especie de referencia y para cada droga calculamos el porcentaje de crecimiento de cada aislado en presencia concentraciones de 3 a 7 veces el GI_{50} de pentamidina (12,5 μM), anfotericina-B (1 μM) y glibenclamida (100 μM).

Se evaluó la retención basal de calceína en alícuotas de 100 μl (4×10^8 células ml^{-1}). Para ello se utilizó el protocolo del kit Vybrant™ optimizado en el laboratorio¹⁷. La retención de calceína fue medida como fluorescencia específica en un espectrofluorímetro Perkin Elmer Victor Wallac (Finlandia) a $\lambda_{\text{em}} = 517 \text{ nm}$ ($\lambda_{\text{ex}} = 494 \text{ nm}$). La glibenclamida es un in-

hibidor de transportadores MRP1 y además de canales de potasio I_{kr} ^{17,18}. La ciclosporina-A es un bloqueador de amplio espectro, no competitivo, preferencialmente para transportadores MDR1, aunque afecta transportadores MRP1¹⁹. El verapamil es un inhibidor selectivo de los transportadores ABC-MDR1²⁰. El uso de estas drogas permitió evidenciar el (o los) tipos de transportadores expresados en las diferentes especies de *Leishmania* evaluadas en este trabajo.

El análisis estadístico de los datos se realizó con los programas Microsoft Excel 2002® y Graph-Pad Prism5®. Los valores se presentaron como la media \pm el error estándar de al menos tres experimentos realizados por duplicado.

Resultados

Inicialmente establecimos la susceptibilidad in vitro de las especies de referencia estudiadas. Para ello determinamos la GI_{50} para, pentamidina, anfotericina-B y glibenclamida. En la Tabla II comparamos los valores de GI_{50} obtenidos 72 h luego de añadir cada droga, en cada especie utilizada. Los resultados demuestran que las especies de referencia son más susceptibles a anfotericina-B que a pentamidina y confirman que glibenclamida es un agente leishmanicida moderado; adicionalmente, y sugieren que la GI_{50} es un indicador confiable de la susceptibilidad diferencial de los promastigotes a los compuestos.

Para analizar si los aislados provenientes de pacientes con fracaso terapéutico al Glucantime expresan un fenotipo quimio-resistente se escogieron concentraciones entre tres y siete veces mayor al GI_{50} de las drogas utilizadas y se determinó su efecto sobre el crecimiento de los parásitos durante tres días. Los datos se resumen en la Tabla III. En la misma se demuestra que LTB300 y LTB0016 presentan un porcentaje de supervivencia a altas concentraciones de las drogas (cercasas al GI_{90}) que no superan un 30 %. Por su parte, el porcentaje de supervivencia de Bel 21 a concentraciones equivalentes de los compuestos se mantuvo entre un 25 y un 50 %, lo que sugiere que ésta es la especie menos sensible de todas las de referencia utilizada en este trabajo. Mas aún, al comparar estos resultados con los datos de los aislados de pacientes encontramos que: (a) los tres aislados sobreviven en presencia de 100 mM glibenclamida en porcentajes superiores al 40 %; (b) los aislados VE2000MM y VE98MR son susceptibles a 12,5 μ M pentamidina con porcentajes de supervivencia cercanos al 30%, mas no así VE96ZC quien tiene un porcentaje de supervivencia de 58%; finalmente (c) los tres aislados sobrevivieron en porcentajes iguales o superiores a un 50% en presencia de altas concentraciones de 1 μ M anfotericina-B.

Para constatar si estos resultados, obtenidos de aislados provenientes de pacientes con fracaso terapéutico al Glucantime nos permitían determinar si los parásitos expresaban un fenotipo quimio-resistente, evaluamos en los mismos la acumulación de

calceína en presencia y ausencia de los inhibidores específicos de los transportadores, glibenclamida, ciclosporina-A y verapamil. La Tabla IV resume las concentraciones inhibitorias 50 (CI_{50}) calculadas para cada especie de referencia y cada aislado en presencia de cada inhibidor utilizado, e incluye resultados previos para LTB0016¹⁷. Los resultados demuestran que: a) ninguno de los aislados se comporta similar a LTB300; b) las concentraciones de glibenclamida, ciclosporina-A y verapamil necesarias para inhibir en un 50 % la funcionalidad de los transportadores en los aislados son menores que las necesarias para ejercer el mismo efecto en las especies de referencia; c) VE2000MM y LTB0016 son insensibles a ciclosporina-A en el rango de concentración explorado (hasta mM); d) VE98MR y VE96ZC se comportan de forma similar, y al igual que Bel 21 son insensibles al verapamil en el rango explorado. Estos resultados confirman que los sistemas de transporte de drogas expresados en especies de *Leishmania* son sensibles de forma diferencial a los inhibidores utilizados. Finalmente, la susceptibilidad aumentada a inhibidores de transportadores ABC de los aislados de pacientes con fracaso terapéutico a Glucantime, sugiere un aumento de la expresión y de la funcionalidad de estos transportadores en los aislados estudiados con respecto a las especies de referencia.

Discusión

El aumento de la incidencia de casos de leishmaniasis con fracaso quimioterapéutico resalta la urgencia de identificar marcadores de resistencia fáciles de utilizar en el laboratorio de rutina, a fin de identificar los parásitos que expresen este fenotipo y que permitan guiar la terapia leishmanicida hacia un pronóstico de éxito.

En nuestro estudio, pionero en Venezuela, hemos evaluado la acumulación de calceína como un marcador celular de fácil implementación en el laboratorio clínico, potencialmente útil para identificar fenotipos quimio-resistentes y predictiva en el éxito de la terapia leishmanicida. Para ello, comparamos la susceptibilidad a drogas leishmanicidas de parásitos aislados de pacientes con fracaso terapéutico a Glucantime, con la capacidad de los parásitos de estos aislados de acumular calceína, substrato de los transportadores ABC.

De acuerdo a las características clínicas de los pacientes (ver Tabla I) se constata que VE2000MM y VE98MR pertenecen a la especie *L. amazonensis*, mientras que VE96ZC pertenece a la especie *L. mexicana*. Al evaluar la susceptibilidad in vitro de los parásitos a dos agentes leishmanicidas (anfotericina-B y pentamidina), y a una sulfonilurea (glibenclamida) determinamos la GI_{50} (Tabla II) para cada compuesto y cada especie de referencia. Los resultados encontrados nos permitieron corroborar la reproducibilidad de los datos acorde con valores descritos en la literatura^{21,22}. Posteriormente, determinamos la supervivencia de los parásitos de los aislados a concentraciones 3-7 veces superiores a las

necesarias para alcanzar la GI_{50} en las especies de referencia. Los datos encontrados, sugieren que los aislados son susceptibles a pentamidina en un rango de concentración similar al que afecta el crecimiento de las especies de referencia y demuestran que los parásitos de los aislados, son menos susceptibles a anfotericina-B que sus especies de referencia. Finalmente, los datos indican que las especies de *L. amazonensis* aisladas de pacientes son menos susceptibles a glibenclamida que su homóloga referencial, mientras que ambas, *L. mexicana* (de referencia y aislada), tienen una susceptibilidad similar a esta droga. Nuestros datos indican que la susceptibilidad de los aislados de pacientes a altas concentraciones de drogas es un parámetro medianamente confiable en la identificación de aislados potencialmente susceptibles y/o quimio-resistentes.

Seguidamente evaluamos la acumulación de calceína por los parásitos aislados de pacientes y lo comparamos con los niveles evidenciados en especies de referencia. Paralelamente, identificamos los tipos de transportadores ABC. Esta determinación constituye una medida indirecta de la funcionalidad de los transportadores MDR1 y MRP1 en muchos tipos celulares¹⁸. Nuestros datos demuestran que los parásitos expresan constitutivamente transportadores MDR1, tal y como ha sido demostrado previamente^{14,17}. Sin embargo, los aislados presentan una sensibilidad diferencial a ciclosporina-A y verapamil. Así, la ciclosporina-A aumenta la retención de calceína en *L. mexicana* VE96ZC y *L. amazonensis* VE98MR mas no en *L. amazonensis* VE2000MM. En la especie de referencia de *L. amazonensis* (LTB0016) la ciclosporina-A -hasta concentraciones mM-, no aumenta la extrusión de calceína¹⁷. Estos datos, sugieren que sólo en uno de los aislados de *L. amazonensis* (VE98MR) hay una inducción de la expresión y la funcionalidad de transportadores MDR, motivado posiblemente por la presión ejercida por el tratamiento con Glucantime.

Por otra parte, todos los aislados al igual que las especies de referencia respondieron a glibenclamida. *L. amazonensis* VE2000MM y VE98MR, al igual que su homóloga de referencia LTB0016, fueron susceptibles pero a concentraciones menores. *L. mexicana* VE96ZC presentó una susceptibilidad similar a la de su homóloga referencial Bel 21. Estos datos permiten inferir la expresión y funcionalidad aumentada de transportadores tipo MRP1 en los parásitos (sólo *L. amazonensis*) aislados de pacientes.

Finalmente el verapamil, aumentó significativamente la retención de calceína en los parásitos (*L. amazonensis*) VE2000MM, datos que sugieren que la expresión de los transportadores MDR1, selectivamente inhibidos por este compuesto, fue inducida sólo en este aislado. Resultados similares han sido descritos en *L. amazonensis* LTB0016¹⁷. El análisis funcional de estos resultados nos permite concluir que: LTB0016, con supervivencia comprometida en presencia de glibenclamida, pentamidina y anfotericina-B, expresa transportadores MDR1 de alta afinidad y MRP1 de

baja afinidad. Bel 21, con supervivencia comprometida en presencia de anfotericina-B expresa transportadores MDR1 de mediana afinidad y MRP1 de baja afinidad. Por su parte, VE2000MM y VE98MR con supervivencia comprometida en presencia pentamidina, expresan transportadores MDR1 de baja afinidad (con sensibilidad diferencial a verapamil y a ciclosporina-A) y MRP1 de baja afinidad, y VE96ZC cuya supervivencia no está comprometida en ningún caso (siempre mayor o igual a 50%) expresa transportadores MDR1 y MRP1 de baja afinidad. Sorprendentemente, este es el paciente que sanó al usar Glucantime e inmunoterapia.

Estos resultados sugieren que (a) el ensayo de susceptibilidad en promastigotes de *Leishmania* es fácil, rápido y reproducible, más no predictivo de la resistencia a antimoniales, ni otros leishmanicidas ya que la célula de interés para la infección en humanos es el amastigote, (b) la evaluación de la acumulación de calceína como indicativo de la funcionalidad de los transportadores ABC tiene un papel limitado en la determinación de las causas del fracaso terapéutico en leishmaniasis. La validación de estos datos en una población mayor confirmaría la utilidad de esta metodología como parte de una batería de análisis discriminatorios del fenotipo quimio-resistente. En el laboratorio de Fisiología Molecular existe el equipo necesario para esta prueba por lo cual, podría ofrecer sus servicios para realizar los análisis respectivos como un ensayo especial.

Agradecimientos

Al CDCH-UCV, la Coordinación de Investigación de la Facultad de Medicina y la Fundación Alejandro de Humboldt, Alemania, los financiamientos recibidos: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad Central de Venezuela (UCV), PI 09-00-7115-2008, PG 09-007378-2008, Programa de Asistencia a Eventos ICC-09-0022-2012. Coordinación de Investigación de la Facultad de Medicina UCV, CI-ADM-134/2009. Fundación Alejandro de Humboldt, Alemania. Los parásitos fueron donados por la Dra Noris Rodríguez, Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela (UCV) y por el Dr. Lionel Schnur, Universidad de Jerusalén.

Referencias

1. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. Clin Microbiol Rev 2006; 19: 111-26.
2. Rodríguez N, De Lima H, Aguilar CM, et al. Molecular epidemiology of cutaneous leishmaniasis in Venezuela. Trans R Soc Trop Med Hyg 2002; 96: S1/105-09.
3. Zerpa O, Ulrich M, Borges R, et al. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Venezuela. Rev Panam Salud Publica. 2003; 13:239-45.
4. Navarro P, Colmenares LA, Rosales R, Postalain A, Coraspe V, Silva S. Tratamiento de la leishmaniasis tegumentaria americana con meglumina. Informed 2009; 11: 73-78.

5. Vázquez de Ricciardi L. Terapéutica antileishmania: revisando el pasado, el presente y el futuro. *Gac Med Caracas*, 2009; 117: 93-111.
6. Convit J, Castellanos PL, Rondón A, Pinardi M, Ulrich M, Castes M, Bloom B, García L. Immunotherapy versus Chemotherapy in localised cutaneous leishmaniasis. *Lancet* 1987; 1: 401-05.
7. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. Technical report series. 949. Geneva, 2010
8. Ponte-Sucre A. Physiological consequences of drug resistance in Leishmania and their relevance for chemotherapy. *Kinetoplastid Biol Dis* 2003; 28: 2-14.
9. Blackmore CG, Mc Naughton PA, van Ven HW. Multidrug transporters in prokaryotic and eukaryotic cells: physiological functions and transport mechanisms. *Mol Membr Biol* 2001; 18: 97-103.
10. Leslie E, Deeley R, Cole S. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2 and BCRP (ABCG2) in tissue defense. *Toxicol. Appl Pharmacol* 2005; 204: 216-237.
11. Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters *Nature* 2007; 446: 749-57.
12. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, et al. Overexpression of a transporter gene in multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 1992; 258: 1650-54.
13. Ouellette M, Fase-Fowler F, Borst P. The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. *EMBO J* 1990; 9: 1027-33.
14. Essodaigui M, Broxterman HJ, Garnier-Suillerot A. Kinetic analysis of calcein and calcein-acetoxymethyl ester efflux mediated by the multidrug resistance protein and P-glycoprotein. *Biochemistry* 1998; 37: 2243-50.
15. Essodaigui M, Frezard F, Moreira ES, et al. Energy-dependent efflux from *Leishmania promastigotes* of substrates of the mammalian multidrug resistance pumps. *Mol Biochem Parasitol* 1999; 100: 73-84.
16. National Cancer Institute. Special Concentration Parameters GI50, TGI, and LC50. 2011. consultado el 01-04-2011. Disponible en: http://dtp.nci.nih.gov/docs/compare/compare_methodology.html.
17. Machuca C, Rodríguez A, Herrera M et al. Metabolic adaptations induced by resistance to an ABC transporter blocker glibenclamide in *Leishmania amazonensis*. *Exp Parasitol* 2006; 114:1-9.
18. Inagaki N, Gono T, Clement JP 4th, et al. Reconstitution of IKATP: an inward rectifier subunit plus the sulfonylurea receptor. *Science*. 1995; 270:1166-70
19. Qadir M, O'Loughlin KL, Fricke SM, et al. Cyclosporin A is a broad-spectrum multidrug resistance modulator. *Clin Cancer Res*. 2005; 11: 2320-6. Natera S, Machuca C, Padrón-Nieves M, et al. Proficiency of drug-resistant parasites. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29: 637-42.
20. Golstein PE, Boom A, van Geffel J, Jacobs P, Masereel B, Beauwens R. P-glycoprotein inhibition by glibenclamide and related compounds. *Pflugers Arch* 1999; 437: 652-60.
21. Lunardi F, Guzela M, Rodrigues AT, et al. Trypanocidal and leishmanicidal properties of substitution-containing chalcones. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47: 1449-51
22. Lima NMF, Correia CS, León LL, et al. Antileishmanial activity of lapachol analogues. *Mem Inst Osw Cruz* 2004; 99: 757-61.

Esta Revista se publica bajo el auspicio del
Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico,
UCV

Aumenta la visibilidad de tus investigaciones
Ingresa a saber.ucv.ve

