

---

---

## **Sinergismo *in vitro* entre hidrazonas, ajoeno y posaconazol sobre aislados de *Cryptococcus* spp.**

Julio Vivas<sup>1</sup>, Primavera Alvarado<sup>1,2</sup>, Gonzalo Visbal<sup>3</sup>, Álvaro Álvarez-Aular<sup>3</sup>, Egle Ruiz<sup>1</sup>, Eliades Ledezma<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Físicoquímica de Parásitos, Instituto de Biología Experimental (IBE), Facultad de Ciencias,

<sup>2</sup>Laboratorio de Micología, Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela

<sup>3</sup>Laboratorio de Síntesis Orgánica y Productos Naturales, Centro de Química, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

<sup>4</sup>Centro de Investigaciones en Ciencias de la Salud (CICS), Instituto de Investigación y Desarrollo Anzoátegui, Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Núcleo Anzoátegui. Puerto La Cruz, Venezuela.

**Palabras clave:** *Cryptococcus*, susceptibilidad antifúngica, sinergismo.

**Resumen.** El objetivo de este trabajo fue estudiar la susceptibilidad *in vitro* de aislados de *Cryptococcus* spp con una nueva clase de antifúngicos, hidrazonas esteroidales y comparar su actividad antifúngica en combinación con ajoeno y posaconazol contra aislados de *Cryptococcus* spp. Se utilizaron tres aislados del género *Cryptococcus* 42794, 4050 y 44192 y se evaluaron su sensibilidad y efectos sinérgicos con las hidrazonas esteroidales, ajoeno y posaconazol, según el documento M27-A2 del CLSI. Se incluyeron las cepas *Candida albicans* (ATCC 90028) y *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) como controles. Se observó con las hidrazonas (H1, H2, H3, H4) un efecto plateau a partir de 10  $\mu$ M (CMI). Sin embargo, con la H4 se obtuvo bajo porcentaje de inhibición del crecimiento. Con el ajoeno, se obtuvieron valores de CMI de 25 y 50  $\mu$ M. El posaconazol mostró altos valores de inhibición y un valor de CMI de 6  $\mu$ M para 42794 y 44192 y un CMI de 20  $\mu$ M para el aislado 4050. Se obtuvieron efectos sinérgicos al combinar posaconazol con ajoeno, ajoeno con hidrazona 3 y posaconazol con hidrazona 3. Los valores de concentración inhibitoria fraccional fueron de 0,24; 0,16 y 0,09 respectivamente, indicando un marcado efecto sinérgico. Se obtuvieron efectos sinérgicos importantes entre el posaconazol con ajoeno, ajoeno con hidrazona 3 y posaconazol con hidrazona 3, lo cual sería muy útil para futuros estudios clínicos.

## **In vitro synergisms among hydrazones, ajoeno and posaconazole against *Cryptococcus* spp.**

*Invest Clin* 2011; 52(4): 312 - 322

**Keywords:** antifungal activity; synergisms; hidrazones; *Cryptococcus*.

**Abstract.** The aim of this study was to assess the *in vitro* susceptibility to novel antifungal compounds, the steroidal hydrazones, and to compare their antifungal activity and synergistic effects with other compounds, such as ajoeno and posaconazole on *Cryptococcus* spp isolates. Three *Cryptococcus* strains were used for this study (42794, 4050 and 44192) and their antifungal sensitivity and synergistic effects with ajoeno and posaconazole were evaluated according to the CLSI protocol number M27-A2. *Candida albicans* (ATCC 90028) and *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) were used as controls. A plateau effect with hydrazones (H1, H2, H3, H4) was observed after 10  $\mu$ M (CMI). However, with H4 only a mild inhibition on the growth was obtained. Combining hydrazone and ajoeno, CMI values between 25 and 50  $\mu$ M were obtained. The highest inhibitions values were obtained with posaconazole and a CMI value of 6  $\mu$ M for the strains 42794 and 44192, and a CMI value of 20  $\mu$ M for the strain 4050. Synergy was observed combining posaconazole with ajoeno, ajoeno with hydrazone 3 and posaconazole with hydrazone 3. Fractional inhibitory concentrations were 0.24, 0.16 and 0.09 respectively, which might indicate a synergistic effect. Important synergistic effects were obtained with posaconazole and ajoeno, ajoeno and hydrazone 3 and posaconazole with hydrazone 3, which would be very useful for clinical trials in the future.

Recibido: 20-02-2011 Aceptado: 28-07-2011

### **INTRODUCCIÓN**

La Criptococosis es una micosis sistémica oportunista que puede ser causada por dos especies de *C. neoformans*, *C. neoformans* var. *grubii* serotipo A o D, o un híbrido AD y *C. gattii*, tradicionalmente denotado por el serotipo B o C. Sin embargo, el 90% de las infecciones en el mundo son debido a las cepas de *C. neoformans* var. *grubii*. En cuanto a su tratamiento se utiliza anfotericina B y azoles tales como: fluconazol, itraconazol y voriconazol. Todos estos antifúngicos han mostrado una eficacia variable, fenómenos de resistencia y efectos colaterales no deseados (1-5).

En este trabajo se presenta una nueva clase de antifúngicos, hidrazonas esteroidales, compuestos que tienen un mecanismo de acción similar al 22,26 azasterol, es decir que, inhiben la acción de la enzima (S)-adenosil-L-metionina:  $\Delta^{24}$ -esterol metil transferasa (EMT) (6-9). Las hidrazonas presentan modificaciones estructurales, en particular, la incorporación de más de un átomo de nitrógeno en la cadena lateral del esterol, en busca de aumentar la especificidad hacia la enzima EMT y su actividad contra parásitos y hongos (10, 11).

Por otro lado, se comparó la actividad antifúngica de las hidrazonas esteroidales con otros compuestos, el ajoeno y el posa-

conazol (SCH56592). El ajoeno, un antifúngico capaz de alterar la composición de los fosfolípidos que conforman la membrana plasmática de hongos y protozoarios (7, 12, 13).

Mientras que, el posaconazol es un triazol de segunda generación, inhibidor de la enzima 14- $\alpha$ -lanosterol desmetilasa dependiente del citocromo P450. El posaconazol ha sido comparado *in vitro* con la anfotericina B, fluconazol y el itraconazol, sobre una serie de aislados del género *Cryptococcus*, demostrando una potente y consistente actividad fungicida (14, 15).

En este estudio se ensayó la actividad *in vitro* de agentes antifúngicos experimentales (hidrazonas y ajoeno) y drogas disponibles comercialmente (posaconazol), individualmente y en combinación buscando evidenciar interacciones sinérgicas frente a *Cryptococcus* spp.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos

Se utilizaron 2 cepas de *C. neoformans* var *grubbi* (42794, 4050) sensibles a fluconazol y una cepa de *C. gattii* (44192) resistente a fluconazol; los cuales fueron aisladas de pacientes, identificadas y donadas por el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Las cepas fueron mantenidas en Sabouraud dextrosa agar y posteriormente, cultivados en el medio RPMI 1640 suplementado con 2% de glucosa por 72 h de cultivo para los experimentos (16). Se incluyeron la cepa *Candida albicans* (ATCC 90028) y *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) como control.

### Agentes antifúngicos

- Ajoeno sintetizado y purificado por el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) (17).
- Posaconazol donado por el Instituto Venezolano de Investigaciones Científi-

cas (IVIC), laboratorio de Química Biológica

- Hidrazona 1: 20-hidrazona-imidazoil-2-il-5 $\alpha$ -pregnan 3 $\beta$ -ol
- Hidrazona 2: 20-hidrazona-piridin-2-il-5 $\alpha$ -pregnan 3 $\beta$ -ol
- Hidrazona 3: 22-hidrazona-imidazoil-2-il-5-colen 3 $\beta$ -ol
- Hidrazona 4: 22-hidrazona-piridin-2-il-5-colen 3 $\beta$ -ol

Las hidrazonas fueron sintetizadas y purificadas por el Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Laboratorio de Síntesis Orgánica y Productos Naturales (10, 11).

Todos los compuestos fueron disueltos en dimetilsulfoxido (DMSO, Sigma) y almacenados a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Se emplearon los antifúngicos a diferentes concentraciones y la concentración final del DMSO en los cultivos nunca fue mayor del 1%.

### Estudios de susceptibilidad a antifúngicos

Se utilizó la metodología de microdilución en caldo (según la NCCLS documento M27-A) con algunas modificaciones según se explica a continuación (18). Para realizar las pruebas de sensibilidad y sinergismo, la concentración del inóculo inicial empleado fue de  $4 \times 10^6$  cel/mL y el medio utilizado fue RPMI 1640, suplementado con 2% de glucosa y llevado a pH 7 con buffer MOPS. Se sembraron 200  $\mu\text{L}$  del cultivo por pozo y se colocaron los antifúngicos en concentraciones crecientes: ajoeno de 1 a 100  $\mu\text{M}$ , posaconazol de 0,3 a 20  $\mu\text{M}$  y las hidrazonas esteroideas de 0,1 a 30  $\mu\text{M}$ . El ensayo se llevo a cabo por triplicado en placas de microdilución de fondo plano estériles de 96 pocillos para la determinación del CMI. Las lecturas se realizaron por espectrofotometría para lograr lecturas más objetivas en un lector de Elisa (BT 2000 Microkinetics Reader, Biotek Instruments, Inc., EE.UU.) cada 24 horas por 4 días a una longitud de

onda de 492 nm. Las placas fueron mantenidas sin agitación, los ensayos se realizaron por triplicado y se tomaron los valores promedios.

#### **Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración 50% inhibitoria (CI<sub>50</sub>)**

La CMI se determinó al graficar las densidades poblacionales para las diferentes concentraciones de drogas, a un tiempo tal, que en el control se logró alcanzar al menos 4 duplicaciones es decir, a las 72h (19). La CMI es la menor concentración de la droga capaz de inhibir el crecimiento del microorganismo y la CI<sub>50</sub> es la concentración a la cual se observa el 50% de esta inhibición. Un gráfico DO versus log (antifúngico) fue elaborado para calcular el valor de CI<sub>50</sub> como se ha descrito previamente (20). También se calcularon los porcentajes de inhibición de cada antifúngico, en función del control.

#### **Efecto sinérgico**

El sinérgismo es definido como el efecto producido por una combinación de drogas, que es más efectiva que la suma de los efectos producidos por cada droga por separado. La interacción de las drogas es clasificada con el índice de la concentración inhibitoria fraccional (FICI). La fórmula para el cálculo es  $FICI = CIF_A + CIF_B$ :

$$CIF_A = (A) / CMIA \text{ y } CIF_B = (B) / CMIB$$

donde (A) es la concentración de la droga A y (B) es la concentración de la droga B cuando son usadas en combinación, cada una dividida entre el valor CMI de dicha droga cuando es usada sola (19, 20,21). El efecto es sinérgico cuando el índice obtenido es  $\leq 0,5$ ; aditivo si el índice es  $> 0,5$ ; antagónico  $> 2$ ; indiferente  $> 1$ . El efecto de la combinación de las drogas es expresado mediante la realización de los isobologramas clásicos calculados según

Hallander y col. (21). Se utilizaron las siguientes concentraciones de drogas: 1  $\mu$ M de ajoeno + 1,2  $\mu$ M de posaconazol y 0,3  $\mu$ M posaconazol + 10  $\mu$ M ajoeno; 1  $\mu$ M de hidrazona 3 + 3  $\mu$ M de ajoeno y 0,3  $\mu$ M H3 + 10  $\mu$ M ajoeno; 0,3  $\mu$ M de posaconazol + 1  $\mu$ M de hidrazona 3 y 1,2  $\mu$ M posaconazol + 0,3  $\mu$ M H3 y sus respectivos CMI.

### **RESULTADOS**

Se obtuvieron efectos dosis-dependientes para los aislados 44192, 42794 y 4050 con ajoeno, posaconazol e hidrazona 3 (Fig. 1 a, b y c). Los resultados de CMI, CI<sub>50</sub> y porcentajes de inhibición, se observan en la Tabla I. En relación a las hidrazonas se obtuvo un CMI de 10  $\mu$ M con H1, H2, H3 y H4 para los aislados 44192, 42794 y 4050. Sin embargo, se puede apreciar que con la hidrazona 1 y 3 se alcanzaron valores entre 47 a 83% de inhibición, seguidos de la hidrazona 2 con porcentajes de inhibición del 42 al 50%. En cuanto a la H4 a pesar de mostrar un CMI de 10  $\mu$ M sus porcentajes de inhibición fueron bajos del 12,2 al 33,1%. El aislado 44192 presentó la mayor susceptibilidad y altos porcentajes de inhibición con el posaconazol y con el ajoeno se encontró CMI de 25 y 50  $\mu$ M

Las cepas control *Candida albicans* y *Candida parapsilosis* mostraron CMI de 10  $\mu$ M con todas las hidrazonas, para el ajoeno fue de 20 y 40  $\mu$ M y con posaconazol de 4 y 6  $\mu$ M, respectivamente.

De todas las combinaciones de drogas realizadas solo se obtuvieron efectos sinérgicos al combinar posaconazol con ajoeno, ajoeno con hidrazona 3 y posaconazol con hidrazona 3. En la Fig. 2 (a, b y c) se observan los efectos sinérgicos obtenidos en los ensayos. En relación a los isobologramas estos se obtuvieron con las concentraciones de drogas de: 1  $\mu$ M de ajoeno + 1,2  $\mu$ M de posaconazol y 0,3  $\mu$ M posaconazol + 10  $\mu$ M ajoeno; 1  $\mu$ M de hidrazona 3 + 3  $\mu$ M de

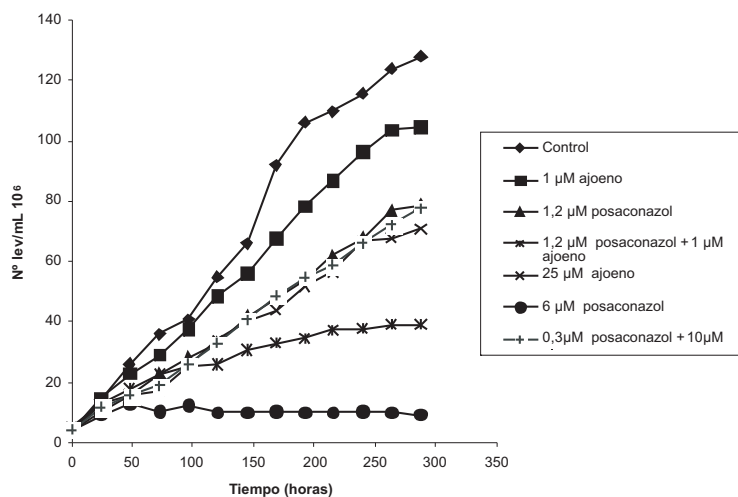


Fig. 1a. Efecto antiproliferativo del ajoeno sobre *C. neoformans* var. *gattii* (aislado 44192).

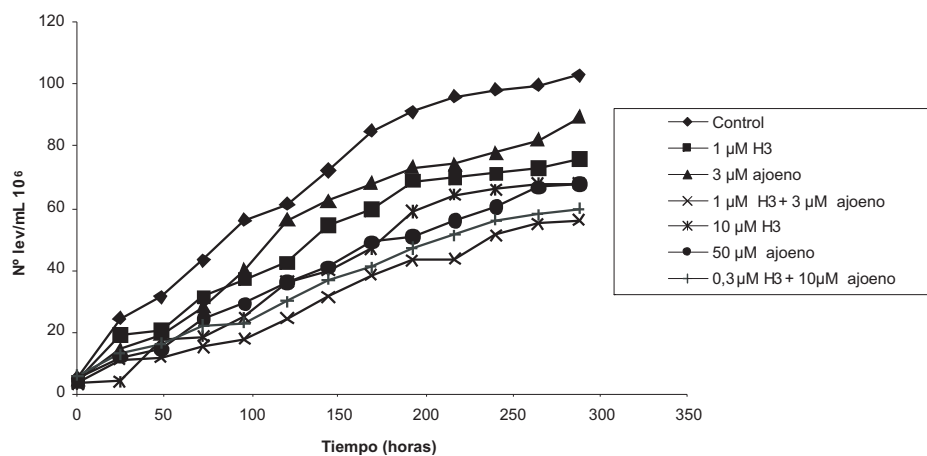


Fig. 1b. Efectos antiproliferativos del posaconazol sobre *C. neoformans* var. *neoformans* (aislado 42794).

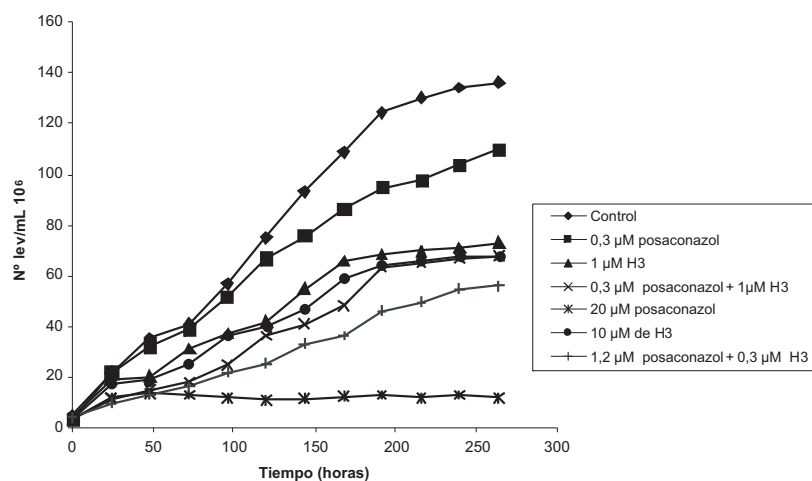


Fig. 1c. Efecto antiproliferativo de Hidrazona 3 (H3) sobre *C. neoformans* var. *neoformans* (aislado 4050).

**TABLA I**  
VALORES DE CMI, CI<sub>50</sub> Y PORCENTAJES DE INHIBICIÓN QUE SE OBTUVIERON AL ENSAYAR LOS 6 ANTIFÚNGICOS SOBRE LOS AISLADOS DE *Cryptococcus* spp, *Candida albicans* (ATCC90028) Y *Candida parapsilosis* (ATCC 22019)

Antifúngico	Aislados														
	42794		44192		4050		<i>Candida albicans</i> (ATCC 90028)		<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019)						
	CMI ( $\mu$ M)	CI50 ( $\mu$ M)	% de inhibi- ción	CMI ( $\mu$ M)	CI50 ( $\mu$ M)	% de inhibi- ción	CMI ( $\mu$ M)	CI50 ( $\mu$ M)	% de inhibi- ción	CMI ( $\mu$ M)	CI50 ( $\mu$ M)	% de inhibi- ción			
Ajoeno	50	10,1	58,5	25	12,7	38,0	25	4,3	41,3	20	4,3	86	40	10,6	70
Posaconazol	6,0	1,3	63,8	6,0	2,0	92,0	20	1,3	90,0	4	1,3	88	6	2,0	80
Hidrazona 1	10	3,0	56,1	10	0,3	75,0	10	3,0	49,0	10	3,0	69	10	3,0	66
Hidrazona 2	10	3,0	44,0	10	3,0	50,0	10	3,0	42,0	10	3,0	40	10	3,0	45
Hidrazona 3	10	0,3	61,0	10	2,4	83,0	10	3,9	47,0	10	3,9	82	10	3,9	78
Hidrazona 4	10	3,0	33,1	10	0,3	12,2	10	3,0	30	10	3,0	30	10	3,0	22

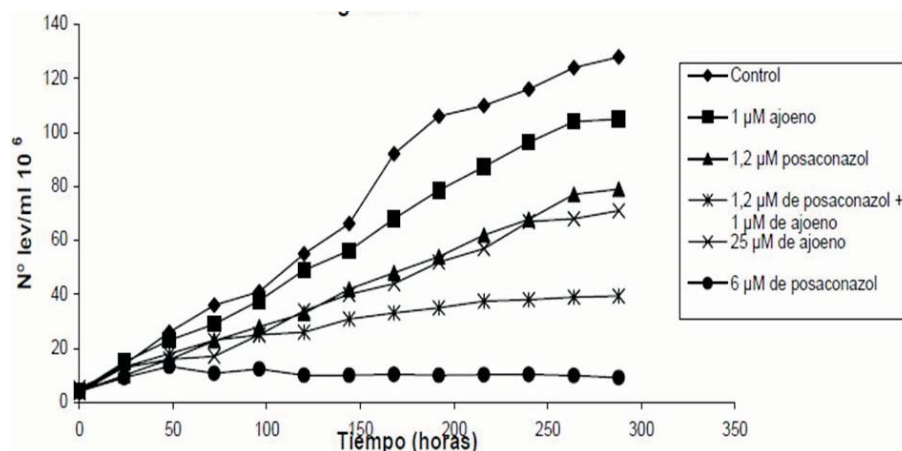


Fig. 2a. Efecto de la combinación del ajoeno y posaconazol sobre *C. gattii* (44192).

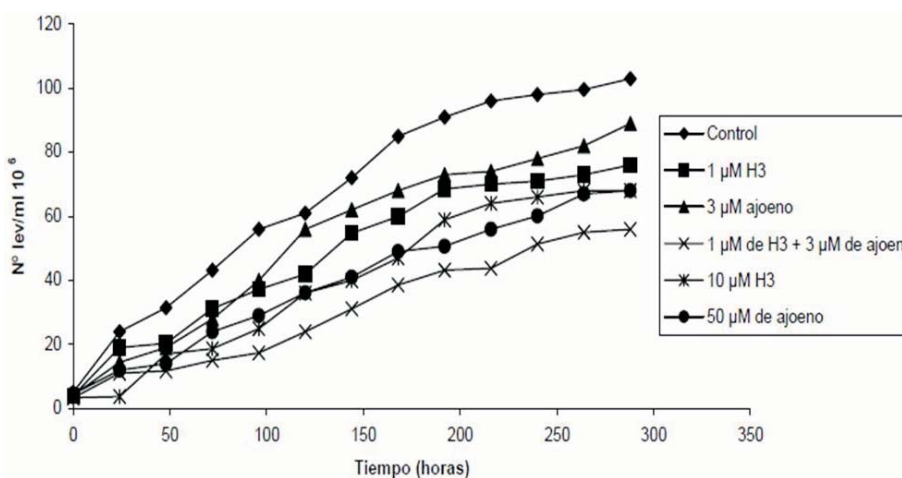


Fig. 2b. Efecto de la combinación de Hidrazona 3 y ajoeno sobre *C. neoformans* var *grubbi* (4050).

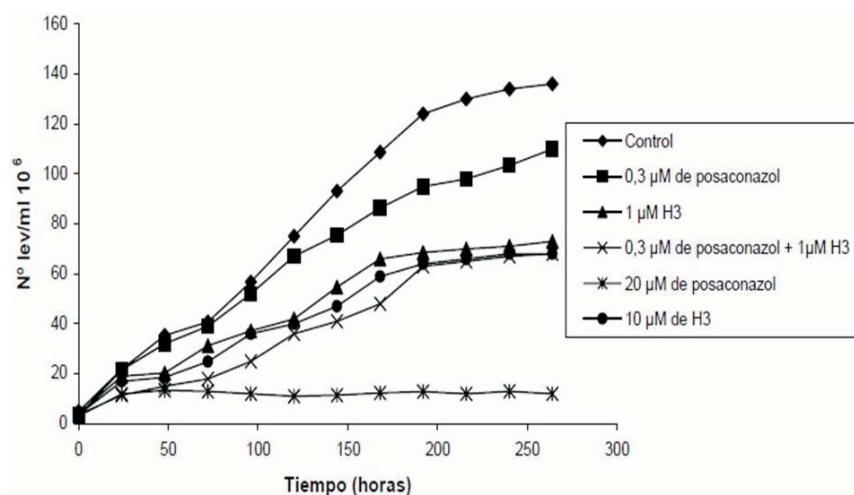


Fig. 2c. Efecto de la combinación de posaconazol e Hidrazona 3 sobre *C. neoformans* var *grubbi* (4050).

ajoeno y 0,3  $\mu\text{M}$  H3 + 10  $\mu\text{M}$  ajoeno; 0,3  $\mu\text{M}$  de posaconazol + 1  $\mu\text{M}$  de hidrazona 3 y 1,2  $\mu\text{M}$  posaconazol + 0,3  $\mu\text{M}$  H3 y sus respectivos CMI.

Los isoblogramas obtenidos mostraron curvas pronunciadamente cóncavas hacia la izquierda con valores de CIF de 0,24; 0,16 y 0,09, respectivamente (Fig. 3 a, b, c).

### DISCUSIÓN

En las levaduras del género *Cryptococcus*, se ha demostrado que las combinaciones de terapias podrían ser beneficiosas en el tratamiento de infecciones invasivas (22, 23). Por tal motivo, se requiere de una continua búsqueda de nuevos compuestos antifúngicos, así como la necesidad de explorar combinaciones de diferentes drogas que puedan tener efecto sinérgico, a los fines de disminuir la duración de las terapias actuales.

En el presente trabajo, se encontró un efecto dosis-dependiente importante con algunos de los antifúngicos ensayados, en el caso de las hidrazonas esteroidales, que actúan posiblemente como inhibidores de la EMT, los aislados ensayados mostraron sensibilidad a las drogas, obteniéndose CMI de 10 $\mu\text{M}$ .

Es importante mencionar, hasta donde se tiene conocimiento, que por primera vez se reportan los efectos de la actividad de las hidrazonas sobre *C. neoformans*. Sin embargo, las hidrazonas 2 y 4 fueron evaluadas *in vitro* contra cultivos de promastigote de *Leishmania mexicana*, encontrándose un CMI de 10 $\mu\text{M}$ . La hidrazona 2 mostró una inhibición del crecimiento de 71% en 48h y a bajas concentraciones se observó una reducción dosis dependiente de la velocidad de crecimiento celular (11).

Por otro lado, se estudio la composición de lípidos neutros en *Leishmania mexicana* bajo la acción de ambas hidrazonas, se encontró una importante disminución del

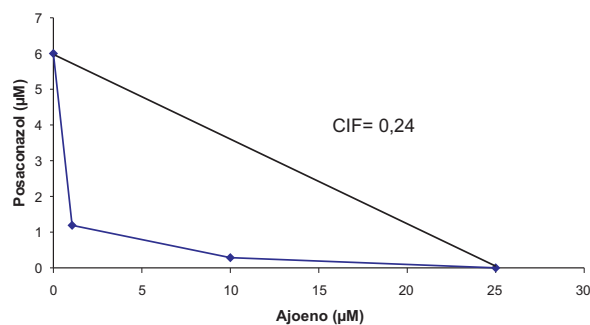


Fig. 3a. Isoblograma del posaconazol y ajoeno sobre *C. gattii* (44192).

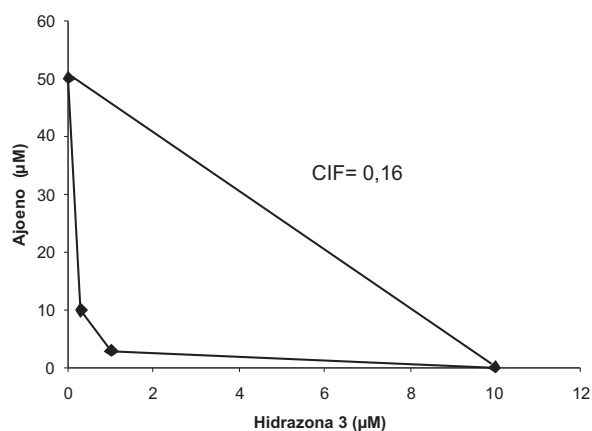


Fig. 3b. Isoblograma del ajoeno e Hidrazona 3 sobre *C. neoformans* var *grubbi* (4050).

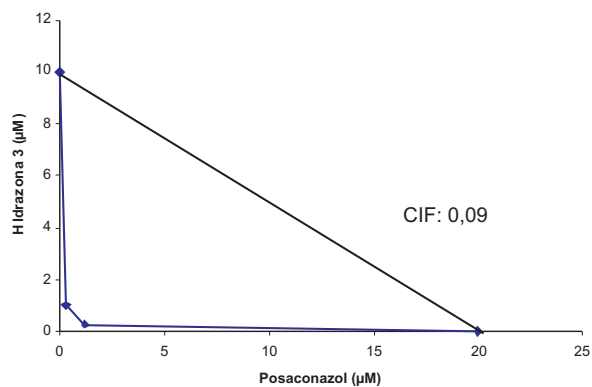


Fig. 3c. Isoblograma de la Hidrazona 3 y posaconazol sobre *C. neoformans* var *grubbi* (4050)

episterol (esterol principal en la membrana del parásito) y acumulación del colest-5,7-24-trien-3 $\beta$ -ol, demostrándose la inhi-



bición de la EMT en la síntesis de esteroides en este organismo (11).

Con relación al posaconazol se obtuvieron altos porcentajes de inhibición y los aislados *C. neoformans* var *grubbi* 42794 y *C. gattii* 44192, mostraron sensibilidad a este compuesto, expresada en valores de CMI de 6  $\mu$ M y el aislado *C. neoformans* var *grubbi* 4050 presentó un CMI de 20 $\mu$ M. Los altos valores de CMI obtenidos para el posaconazol en nuestro trabajo, pueden ser consecuencia, que los aislados provienen de pacientes que recibieron previamente tratamiento con antifúngicos azólicos, lo que pudiera haber generado ciertas formas de resistencia, como lo reportan Alves y col. (1) utilizando fluconazol.

Por otro lado, se ha demostrado que *Cryptococcus* es una levadura no fermentativa que requiere oxígeno en su crecimiento y se obtienen mejores curvas de inhibición con los cultivos en agitación continua, lo que pudo generar mayores valores de CMI (24).

En relación con el ajoeno, se obtuvieron valores de CMI elevados al compararlos con los valores de los otros antifúngicos ensayados; no obstante, para los aislados 44192 y 4050 se obtuvo una concentración de 25  $\mu$ M, la cual está por debajo de los niveles de concentración tóxica para la células de vertebrados (40  $\mu$ M) (24, 25). Estos resultados son comparables a los obtenidos por otros autores (8, 25, 26).

La actividad del ajoeno ha sido probada en diversos microorganismos, tal es el caso de: *Paracoccidioides brasiliensis* (13), *Trypanosoma cruzi* (27), *Microsporium canis* (25), *Leishmania mexicana* (12) y *Cladophialophora carrionii* (28) ha mostrado altos valores de CMI y en *M. canis* se encontró un efecto sinérgico entre ajoeno y ketoconazol (20).

El aumento de la resistencia de los hongos y efectos colaterales no deseados en los pacientes ha generado que se realicen

los ensayos de fármacos en combinación en un intento de ofrecer otras alternativas al tratamiento de estos pacientes.

La potenciación de las drogas cuando son utilizadas en combinación es debida, muy probablemente, a que actúan en diferentes rutas, esto ha sido probado en *T. cruzi* (29) en *C. neoformans* (22, 23) y otros agentes patógenos a los mamíferos.

Con respecto a los ensayos de combinación de drogas, se obtuvieron solo efectos sinérgicos al combinar posaconazol con ajoeno, ajoeno con hidrazona 3 y posaconazol con hidrazona 3. En relación a los efectos sinérgicos obtenidos con ajoeno, es importante mencionar que este compuesto modifica la fluidez de la membrana celular y esto podría facilitar la entrada de posaconazol e Hidrazona 3 (20).

Otros autores han mostrado con Posaconazol efecto sinérgico en *T. cruzi* al combinarlo con amiodarone, una droga utilizada para el tratamiento arritmico en estados crónicos de pacientes con Mal de Chagas. Encontrando que la combinación de amiodarone y posaconazol potencia el efecto, logrando obtener valores de CIF de 0,42 (29).

Los resultados obtenidos con los aislados 4050 y 44192 nos muestran un importante efecto sinérgico, con valores de CIF menores a los obtenido en *T. cruzi* con posaconazol y amiodarone (5) y parecidos al combinar ajoeno con ketoconazol en *M. canis* (12).

Finalmente, al obtener valores CIF muy por debajo de 0,5 nos muestran que estamos ante la presencia de un marcado efecto sinérgico y estas combinaciones de fármacos podría ser la base para nuevos estudios experimentales *in vivo*, donde estas combinaciones podrían ser evaluadas. Por otro lado, la inclusión de otras muestras de *Cryptococcus* resistentes a fluconazol o resistentes a otras clases de antifúngicos, podrían enriquecer la evaluación de la actividad de estas combinaciones.

## AGRADECIMIENTOS

A todo el personal del laboratorio de Fisicoquímica de Parásitos, del Instituto de Biología Experimental-UCV y al Laboratorio de Micología del Instituto de Biomedicina por el desarrollo de los estudios descritos.

## REFERENCIAS

1. **Alves S, Oliveira L, Costa JM, Lubeck I, Casali AK, Vainstein MH.** *In vitro* susceptibility to antifungal agents of clinical and environmental *Cryptococcus neoformans* isolated in southern of Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo 2001; 43: 267-270.
2. **Chayakulkeeree M, Perfect JR.** Cryptococcosis. Infect Dis Clin North Am 2006 20: 507-544.
3. **Morera-López Y, Torres-Rodríguez J, Jiménez-Cabello T, Baró-Tomas T.** *Cryptococcus gattii*: *in vitro* susceptibility to the new antifungal Albacozazole versus Fluconazole and Voriconazole. Med Mycol 2005; 43: 505-510.
4. **Pfaller MA, Messer SA, Hollis RJ, Jones RN.** *In vitro* activities of Posaconazole (SCH 56592) compared with those of Itraconazole and Fluconazole against 3,685 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45: 2862-2864.
5. **Yidiran ST, Fothergill AW, Sutton DA, Rinaldi MG.** *In vitro* susceptibilities of cerebrospinal fluid isolates of *Cryptococcus neoformans* collected during a ten-year period against Fluconazole, Voriconazole and Posaconazole (SCH56592). Mycoses 2002; 45: 378-383.
6. **Haughan PA, Chance ML, Goad LJ.** Effects of an Azasterol inhibitor of 24-trans-methylation on sterol biosynthesis and growth of *Leishmania donovani* promastigotes. Biochem J 1995; 308: 31-38.
7. **Urbina J, Visbal G, Contreras L, McLaughlin G, Docampo R.** Inhibitors of  $\Delta^{24(25)}$  sterol methyltransferase block sterol synthesis and cell proliferation in *Pneumocystis carinii*. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41: 1428-1432.
8. **Urbina J.** Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. Parasitology 1997; 114: S91-S99.
9. **Urbina JA, Vivas J, Lazard K, Molina J, Payares G, Piras MM, Piras R.** Antiproliferative effect of  $\Delta^{24(25)}$  sterol methyltransferase inhibitors on *Trypanosoma cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. Chemotherapy 1996; 42: 294-307.
10. **Rodríguez J, Bernardes C, Visbal G, Urbina J, Vercesi A, Souza W.** Sterol methenyl transferase inhibitors alter the ultrastructure and function of the *Leishmania amazonensis* mitochondrion leading to potent growth inhibition. Protist 2007; 158: 447-456.
11. **Visbal G, Marchan E, Maldonado A, Simoni Z, Navarro M.** Synthesis and characterization of platinum-sterol hydrazone complexes with biological activity against *Leishmania (L) mexicana*. J Inorg Biochem 2008; 102: 547-554.
12. **Ledezma E, Jorquera A, Bendezú H, Vivas J, Pérez G.** Antiproliferative and leishmanicidal effect of Ajoene on various *Leishmania* species: ultrastructural study. Parasitol Res 2002; 88: 748-753.
13. **San-Blas G, Urbina JA, Marchán E, Contreras LM, Sorais F, San-Blas F.** Inhibition of *Paracoccidioides brasiliensis* by Ajoene is associated with blockade of phosphatidylethanolamine biosynthesis. Microbiology 1997; 143: 1583-1586.
14. **Hossain MA, Maesaki S, Mitsutake K, Kakeya H, Sasaki E, Tomono K, Tashiro T, Kohno S.** *In vitro* and *in vivo* activities of SCH56592 against *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 44: 827-882.
15. **Perfect JR, Cox GM, Dodge RK, Schell WA.** *In vitro* and *in vivo* efficacies of the azole SCH56592 against *Cryptococcus neoformans*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40: 1910-1913.
16. **Rodríguez-Tudela J, Martínez-Suárez JV.** Defining conditions for microbroth antifungal susceptibility tests: influence of RPMI and RPMI-2% glucose on the selection of endpoint criteria. J Antimicrob Chemother 1995; 35: 739-749.

17. **Apitz-Castro R, Escalante J, Vargas R, Jain M.K.** Ajoene, the antiplatelet principle of garlic, synergistically potentiates the antiaggregatory action of prostacyclin, forskolin, indoethacin acid, dipyridamol on human platelets. *Thromb Res* 1986; 42: 303-311.
18. **National Committee for Clinical Laboratory Standards.** Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for yeasts: Approved Standard NCCLS document M27-A. Wayne, PA: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
19. **Johnson M, MacDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect J, Rex J.** Combination of antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 48(3): 693-715, 2004.
20. **Ledezma E, Maniscalchi M, Espinoza D.** Sinérgismo entre ajoeno y ketoconazol en aislamientos de *Microsporium canis*. Un estudio preliminar mediante la determinación de la concentración inhibitoria fraccional (CIF). *Rev Iberoam Micol* 2008; 25: 157-162.
21. **Hallander HO, Dornbusch K, Gezelius L, Jacobson K, Karlsson I.** Synergism between aminoglycosides and cephalosporin with antipseudomonal activity: Interaction index and killing curve method. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22: 743-752.
22. **Barchiesi F, Schimizzi AM, Caselli F, Novelli A, Fallani S, Giannini D, Arzeni D, Di Cesare S, Di Francesco LF, Fortuna M, Giacometti A, Carle F, Mazzei T, Scalise G.** Interactions between Triazoles and Amphotericin B against *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 2435-2441.
23. **Barchiesi F, Schimizzi AM, Najvar LK, Bocanegra R, Caselli F, Di Cesare S, Giannini D, Di Francesco LF, Giacometti A, Carle F, Scalise G, Graybill JR.** Interactions of Posaconazole and Flucytosine against *Cryptococcus neoformans* *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1355-1359.
24. **Rodríguez-Tudela JL, Martín-Díez F, Cuenca-Estrella M, Rodero L, Carpintero Y, Gorgojo B.** Influence of shaking on antifungal susceptibility testing of *Cryptococcus neoformans*: a comparison of the NCCLS Standard M27 medium, buffered yeast nitrogen base, and RPMI-2% glucose. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 400-404.
25. **Romero H, Vivas J, Chalbaud V, Ledezma E, Apitz-Castro R.** *In vitro* antiproliferative effect of Ajoene on *Microsporium canis*. *J Mycol Med* 2000; 10: 152-155.
26. **Vivas J, Romero H, Herrmann G, Ledezma E, Apitz-Castro R.** *In vitro* antiproliferative effect of Ajoene on *Cryptococcus neoformans*. *J Mycol Med* 2002; 12: 149-151.
27. **Urbina JA, Marchan E, Lazardi K, Visbal G, Apitz-Castro R, Gil F, Aguirre T, Piras MM, Piras R.** Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis and cell proliferation in *Trypanosoma cruzi* by Ajoene, an antiplatelet compound isolated from garlic. *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 2381-2387.
28. **Pérez-Blanco M, Hernández-Valles R, Fernández-Zeppenfeldt G, Apitz Castro R.** Ajoene and 5-Fluorouracil in the topical treatment of *Cladophialophora carrionii* chromoblastomycosis in humans: a comparative open study. *Med Mycol* 2003; 41: 517-520.
29. **Benaim G, Sanders JM, Garcia-Marchán Y, Colina C, Lira R, Caldera AR, Payares G, Sanoja C, Burgos JM, Leon-Rossell A, Concepcion JL, Schijman AG, Levin M, Oldfield E, Urbina JA.** Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with Posaconazole. *J Med Chem* 2006; 49: 892-899.