

Efecto *in vitro* del antirretroviral tipranavir sobre taquizoitos de *Toxoplasma gondii*

In vitro activity of antiretroviral tipranavir against *Toxoplasma gondii* tachyzoites

Rachel Ramos Granja,^I Yenisey Alfonso,^{II} Raymundo Cox,^{II} Lianet Monzote Fidalgo^{II}

^I Hospital Clínicoquirúrgico "Hermanos Ameijeiras". La Habana, Cuba.

^{II} Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". La Habana, Cuba.

RESUMEN

La introducción de la terapia antirretroviral de alta eficiencia ha conllevado a una disminución en la frecuencia de neurotoxoplasmosis en personas con VIH. Experimentalmente se demostró que los antirretrovirales inhibidores de proteasas pueden tener además una acción directa sobre el parásito, en este caso *Toxoplasma gondii*. El objetivo es evaluar la actividad antitoxoplasma *in vitro* del tipranavir, un antirretroviral inhibidor de proteasa de tercera generación. Para ello se determinó la inhibición del crecimiento causada por el tipranavir sobre taquizoitos intracelulares de *Toxoplasma gondii*, así como su citotoxicidad frente a macrófagos residentes en el peritoneo de ratones OF-1. En paralelo, se evaluaron el atazanavir, la sulfadiazina y pirimetamina como fármacos de referencia. El tipranavir mostró actividad inhibitoria frente a taquizoitos de *T. gondii*, con una CI_{50} de $21,2 \pm 3,0 \mu\text{M}$, la cual fue similar ($p > 0,05$) a la obtenida con la sulfadiazina ($CI_{50} = 23,3 \pm 3,6 \mu\text{M}$) y mayor ($p < 0,05$) que el atazanavir ($CI_{50} = 2,8 \pm 0,7 \mu\text{M}$) y la pirimetamina ($CI_{50} = 1,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$). Sin embargo, mostró un valor de CC_{50} ($105,9 \pm 10,0 \mu\text{M}$) superior ($p < 0,05$) con respecto a los fármacos de referencia (atazanavir ($CC_{50} = 25,0 \pm 0,5 \mu\text{M}$), sulfadiazina ($CC_{50} = 25,2 \pm 3,2 \mu\text{M}$) y pirimetamina ($CC_{50} = 4,4 \pm 1,2 \mu\text{M}$). En conclusión, este trabajo describe por primera vez la actividad *in vitro* del tipranavir sobre taquizoitos de *T. gondii*.

Palabras clave: tipranavir; taquizoitos; *Toxoplasma gondii*.

ABSTRACT

The introduction of highly efficient antiretroviral therapy has brought about a decrease in the frequency of neurotoxoplasmosis among people with HIV. It was demonstrated experimentally that protease inhibitor antiretrovirals may also have a direct action against the parasite, in this case *Toxoplasma gondii*. The purpose of the study was to evaluate the antitoxoplasma activity *in vitro* of tipranavir, a third-generation protease inhibitor antiretroviral. To achieve this aim, determination was made of the growth inhibition caused by tipranavir in *Toxoplasma gondii* intracellular tachyzoites, as well as its cytotoxicity against macrophages living in the peritoneum of OF-1 mice. Additionally, evaluation was conducted of atazanavir, sulfadiazine and pyrimethamine as reference drugs. Tipranavir displayed inhibitory activity against *T. gondii* tachyzoites, with a IC_{50} of $21.2 \pm 3.0 \mu M$, similar ($p > 0.05$) to the one obtained with sulfadiazine ($IC_{50} = 23.3 \pm 3.6 \mu M$) and higher ($p < 0.05$) than atazanavir ($IC_{50} = 2.8 \pm 0.7 \mu M$) and pyrimethamine ($IC_{50} = 1.2 \pm 0.2 \mu M$). However, its CC_{50} value ($105.9 \pm 10.0 \mu M$) was higher ($p < 0.05$) than that of the reference drugs atazanavir ($CC_{50} = 25.0 \pm 0.5 \mu M$), sulfadiazine ($CC_{50} = 25.2 \pm 3.2 \mu M$) and pyrimethamine ($CC_{50} = 4.4 \pm 1.2 \mu M$). This is the first time a description is provided of the *in vitro* activity of tipranavir against *T. gondii* tachyzoites.

Keywords: tipranavir; tachyzoites; *Toxoplasma gondii*.

Toxoplasma gondii es un protozoo parásito que se encuentra distribuido mundialmente y se estima que al menos un tercio de la población pudiera haber estado infectado con el parásito.^{1,2} Generalmente, en personas con un sistema inmunitario normal, el parásito es eliminado con las primeras líneas de defensa del organismo. No obstante, en algunos de estos casos puede ocurrir que el microorganismo infecte al individuo, se enquiste y evada a la inmunidad y no afecte durante ese estadio al hospedero. Sin embargo, si el hospedero se inmunodeprime, los quistes se destruyen y liberan al exterior miles de taquizoitos, los cuales pueden desencadenar los primeros síntomas. Por estos motivos, la toxoplasmosis como enfermedad es desarrollada por los grupos más vulnerables de la población como son los infantes, los ancianos y las personas viviendo con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).^{3,4}

Los fármacos que se utilizan para controlar esta enfermedad son tratamientos agresivos y en algunos casos ineficientes, sobre todo en embarazadas y personas con VIH.⁵ En el caso particular de estas últimas, la toxoplasmosis constituye una de las infecciones oportunistas que se diagnostican en Cuba.⁶ Sin embargo, con el advenimiento de la terapia antirretroviral de alta eficiencia (TARGA) se observó una disminución en la frecuencia de la enfermedad en estos pacientes. Una posible causa está dada por la disminución de la carga viral que conlleva al restablecimiento del sistema inmunológico, pero experimentalmente se demostró que los antirretrovirales (ARV) inhibidores de proteasas (IP) pueden tener además una acción directa sobre el parásito.^{5,7}

En estudios previos de laboratorio, se observó que seis ARV-IP (atazanavir, fosamprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir y saquinavir) fueron capaces de

inhibir el crecimiento *in vitro* de taquizoitos de *T. gondii*.⁸ El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad antitoxoplasma *in vitro* de otro ARV-IP, el tipranavir (Fig.), el cual es un ARV-IP de tercera generación.

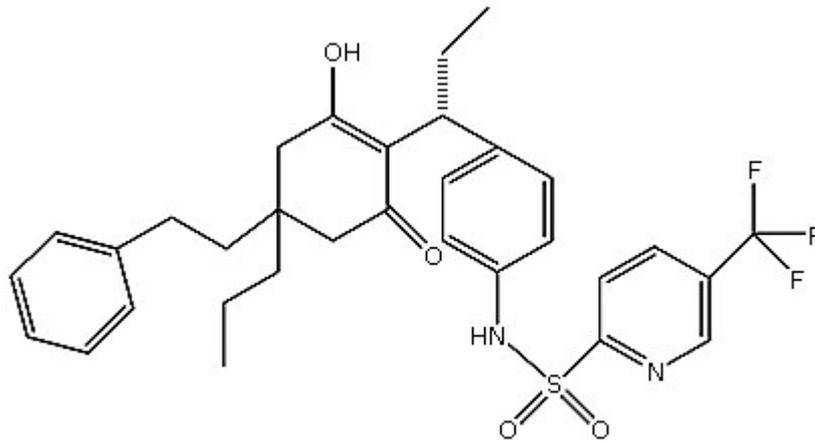


Fig. Estructura química del tipranavir.

Parásitos: Se utilizaron taquizoitos de la cepa virulenta RH de *T. gondii*, la cual fue mantenida a través de pasajes en ratones OF-1 por vía intraperitoneal cada 3 o 4 días. Los taquizoitos fueron obtenidos por lavados peritoneales con solución salina estéril (SSE) al momento de su utilización.

Fármacos: En este estudio se utilizó el tipranavir obtenido de Catalent Pharma Solutions (LLC, Petersburg, EUA) y como fármacos de referencia el atazanavir (Bristol-Myers Squibb, EUA), la sulfadiazina y la pirimetamina (Ipca Laboratories Ltd, India). Todos los productos fueron disueltos en dimetilsulfóxido (DMSO) a una concentración final de 10 mg/mL y guardados a 4 °C hasta el momento de su uso.

Actividad frente a taquizoitos intracelulares de *T. gondii*: Macrófagos residentes en la cavidad peritoneal de ratones Swiss Webster fueron colectados en medio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, Mo, EUA) suplementado con antibióticos (100 mg de estreptomycin/mL y 100 U de penicilina/mL, y se sembraron a 3×10^5 células/mL en una placa de cultivo de 24 pozos (Costar®, EUA) con lamínulas y se incubaron durante 2 h a 37 °C en 5 % de CO₂. Las células no adheridas se eliminaron y a continuación, se añadieron taquizoitos de *T. gondii* en una proporción de 1:3 parásito/macrófagos, y los cultivos se incubaron durante 1 h en las mismas condiciones. Posteriormente, los parásitos extracelulares fueron eliminados, se añadieron cada uno de los fármacos en forma independiente y se realizaron diluciones seriadas 1:2 de manera tal que se evaluaron concentraciones entre 3,1 y 25 µg/mL. Se incluyó además un control negativo que fue tratado con DMSO. Luego de 48 h de incubación bajo las condiciones descritas anteriormente, se determinó el porcentaje de macrófagos infectados. Para ello, se eliminó el sobrenadante, las células y parásitos fueron fijados en metanol absoluto, se tiñeron con Giemsa, y se examinaron bajo el microscopio óptico a 1 000x con aceite de inmersión. El porcentaje de macrófagos infectados fueron determinados mediante conteo de 1 000 células y se determinó el porcentaje de infección con respecto a los controles negativos.⁸ Se realizaron dos réplicas de cada concentración y se determinó el valor de concentración inhibitoria media (CI₅₀) a partir de las curvas de correlación lineal de concentración-porcentaje de infección. Finalmente, los resultados se expresaron como la media y la desviación estándar de dos réplicas realizadas por separado.

Citotoxicidad frente a macrófagos peritoneales de ratones OF-1: Macrófagos residentes en el peritoneo de ratones Swiss Webster fueron colectados y sembrados (3×10^5 células/mL) en placas de cultivo de 96 pozos (Costar®, EUA) como se describió anteriormente. Después de 2 h de incubación a 37 °C y 5 % de CO₂ fueron tratados con los fármacos a concentraciones desde 6,35 hasta 100 µg/mL, durante 48 h. La actividad se determinó usando 15 µL de una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolio) (MTT, SIGMA, St. Louis, MO, EUA) a 5 mg/mL preparada en el momento de su uso. Las placas fueron incubadas 4 h adicionales bajo las mismas condiciones, se eliminó el sobrenadante y los cristales de tetrazolio fueron disueltos en 100 µL de DMSO. La absorbancia se midió en un lector (EMS Reader MF Versión 2.4-0) a 560 y 630 nm como referencia.⁹ Finalmente, se determinó la concentración citotóxica media (CC₅₀) a partir de las curvas de correlación lineal de concentración-respuesta. Posteriormente, se calculó el índice de selectividad (IS) mediante la división de la CC₅₀ entre la CI₅₀ frente a trofozoitos.

El efecto y citotoxicidad *in vitro* del tipranavir y los fármacos de referencia sobre el crecimiento de taquizoitos de *T. gondii* y macrófagos residentes en el peritoneo se muestran en la tabla, respectivamente. Puede apreciarse que el tipranavir en concentraciones µM, presenta similar actividad ($p > 0,05$) frente a *T. gondii* comparada con la sulfadiazina, aunque fue menor estadísticamente significativa ($p < 0,05$) que el atazanavir y la pirimetamina. Sin embargo, mostró un valor CC₅₀ superior ($p < 0,05$) con respecto a la sulfadiazina y la pirimetamina, con un mayor IS. Sin embargo, aunque resultó menos tóxico del atazanavir con diferencias significativas ($p < 0,05$), mostró menor IS.

Tabla. Actividad *in vitro* del tipranavir y los fármacos de referencia sobre el crecimiento de taquizoitos de *T. gondii* y macrófagos peritoneales de ratones OF-1

Productos	<i>T. gondii</i> CI ₅₀ ^a ± DE ^b		Macrófagos CC ₅₀ ^c ± DE		IS ^d
	µg/mL	µM	µg/mL	µM	
Tipranavir	12,4 ± 1,8	21,2 ± 3,0	61,4 ± 5,8	105,9 ± 10,0	5
Atazanavir ^e	2,0 ± 0,4	2,8 ± 0,7	17,6 ± 0,4	25,0 ± 0,5	9
Sulfadiazina ^e	5,8 ± 0,9	23,3 ± 3,6	6,3 ± 0,8	25,2 ± 3,2	1
Pirimetamina ^e	0,3 ± 0,01	1,2 ± 0,2	1,1 ± 0,3	4,4 ± 1,2	4

^a CI₅₀: concentración de los compuestos que causa el 50 % de inhibición del crecimiento de taquizoitos intracelulares de *T. gondii*.

^b DE: desviación estándar.

^c CC₅₀: concentración de los productos que causan 50 % de mortalidad de macrófagos peritoneales de ratones OF-1.

^d IS: índice de selectividad calculado mediante la división de CC₅₀ macrófagos / CI₅₀ *T. gondii* (µM).

^e Fármacos de referencia.

Estudios previos experimentales, demostraron las potencialidades *in vitro* de los ARV-IP, que se utilizan en los pacientes VIH, sobre *T. gondii*.⁸ En este caso, se estudia el tipranavir, una dihidropirona no peptídica que fue aprobado en el 2005 para el tratamiento de personas con VIH.¹⁰ Este compuesto presenta mayor potencia ya que evade las barreras genéticas de resistencia del VIH comparado con

otros IP de primera y segunda generación, fundamentalmente debido a su flexibilidad estructural.^{11,12}

En la literatura científica se pueden encontrar diferentes estudios relacionados con *Toxoplasma*/VIH en Cuba. Estos reportes se enfocan principalmente en la clínica, patogénesis, diagnóstico y tratamiento.^{6,13} Sin embargo, los estudios básicos desde el punto de vista farmacológico son escasos. Recientemente, se demostró las potencialidades de los ARV-IP frente a diversos protozoos parásitos^{5,14} como es el caso de *Plasmodium*,¹⁵ *Leishmania*,^{16,17} *Trypanosoma*,¹⁸ *Trichomonas*¹⁹ y *Giardia*.¹⁹ Específicamente, no se encontraron estudios relacionados con la actividad del tipranavir frente a *T. gondii*. Sin embargo, frente a diferentes cepas de *Plasmodium falciparum* el tipranavir mostró actividad *in vitro* con valores de CI₅₀ entre 12 y 21 μM.²⁰ Esos resultados concuerdan con los informados en este trabajo, posiblemente debido a que *Plasmodium* y *Toxoplasma* son protozoos intracelulares de la familia Apicomplexa.

En el presente estudio, pudo comprobarse que el tipranavir es capaz de inhibir el crecimiento *in vitro* de taquizoitos intracelulares de *T. gondii* con mayor potencia que la sulfadiazina, fármaco que se utiliza para el tratamiento de la toxoplasmosis. Sin embargo, mostró menor actividad que los ARV-IP estudiados anteriormente, los cuales presentaron valores de CI₅₀ entre 2,0 a 10,7 μM, incluido el atazanavir que fue estudiado en paralelo como referencia en este trabajo.⁸ En general, todos los ARV-IP, están basados en el principio "peptidomimético", ya que actúan como un recaptador bioquímico y mimetizan la unión del péptido normal del VIH para la proteasa viral, interfiriendo de esta manera en una etapa esencial del ensamblaje de nuevos viriones y en la diseminación del virus. Sin embargo, los ARV-IP anteriormente informados con actividad sobre *T. gondii* estructuralmente son péptidos, a diferencia del tipranavir que es no-peptídico.⁷

Hasta el momento, no ha sido estudiado el mecanismo por el cual los ARV-IP ejercen su actividad sobre *T. gondii*. Sin embargo, los ARV-IP fueron diseñados para inhibir la aspártico-proteasa VIH-1.²¹ En este sentido, investigaciones preliminares en protozoos indican que las proteasas de algunos parásitos pudieran ser también el blanco molecular de estos ARV-IP. Por ejemplo, en parásitos del género *Leishmania* se propuso que la efectividad de los ARV-IP a nivel molecular está asociada a la acción directa sobre la actividad aspártico-peptidasa;¹⁶ mientras que en *Plasmodium* se evidenció en estudios enzimáticos el papel de estos IP sobre la inhibición de las enzimas conocidas como plasmepsinas II and IV.²² Estudios adicionales a nivel molecular que expliquen el mecanismo de acción de los ARV-IP sobre *T. gondii* deben ser realizados, en particular relacionados con la inhibición de enzimas aspártico-proteasas. En el caso de *Toxoplasma*, se han identificado seis genes que codifican para aspártico proteasas, las cuales juegan un importante papel en diversas funciones vitales del ciclo de vida del parásito que incluyen (i) la invasión de las células hospederas y tejidos, (ii) la degradación de mediadores inmunológicos del hospedero, y (iii) la hidrólisis de proteínas para su nutrición.²³

En conclusión, este trabajo demuestra por primera vez la actividad *in vitro* del tipranavir sobre taquizoitos de *T. gondii*. Las potencialidades farmacológicas observadas, su moderada citotoxicidad, junto a sus propiedades farmacocinéticas como es la permeabilidad celular, justifica su futura exploración como un probable fármaco frente a esta parasitosis. En paralelo, pudiera complementar el diseño y desarrollo de nuevos IP con actividad específica sobre este protozoo.

CONFLICTO DE INTERESES

No se presenta conflicto de intereses.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Robert-Gangneux F, Dardé ML. Epidemiology of and diagnostic strategies for toxoplasmosis. *Clin Microbiol Rev.* 2012 [cited 14 Jun 17]; 25:264-96. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22491772>
2. Kaufer FJ, Carral LA, Messina MT, Schneider MV, Méndez M, Herrera L, et al. Prevalencia de anticuerpos anti *Toxoplasma gondii* en hemodonantes en la Ciudad de Buenos Aires, desde 1967 a 2017. *Medicina (Buenos Aires).* 2017 [cited 14 Jun 17]; 77(6): 475-80. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0025-76802017000600005
3. Machala L, Maly M, Beran O, Lilich D, Kodym P. Incidence and clinical and immunological characteristics of primary *Toxoplasma gondii* infection in HIV-infected patients. *Int J Infect Dis.* 2013 [cited 14 Jun 17]; 17:e892-e896. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23669277>
4. Kodym P, Maly M, Beran O, Lilich D, Machala RH, Holub M. Immunological and clinical characteristics of reactivation of latent *Toxoplasma gondii* infection in HIV-infected patients. *Epidemiol Infect.* 2014 [cited 14 Jun 17]; 1-8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24850323>
5. Neville AJ, Zach SJ, Wang X, Larson JJ, Judge AK, Davis LA, Vennerstrom JL, Davis PH. Clinically available medicines demonstrating anti- *Toxoplasma* activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015 [cited 14 Jun 17]; 59:7161-9. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26392504>
6. Alfonso Y, Fraga J, Fonseca C, Jiménez N, Pinillos T, Dorta-Contreras AJ, et al. Molecular diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cerebrospinal fluid from AIDS patients. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2009 [cited 14 Jun 17]; 6:2. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19267913>
7. De Clercq E. Anti-HIV drugs: 25 compounds approved within 25 years after the discovery of HIV. *Int J Antimicrob Agents.* 2009 [cited 14 Jun 17]; 33:307-20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19108994>
8. Monzote L, Rodríguez M, Alfonso Y, Cox R. Antiretroviral activity of protease inhibitors against *Toxoplasma gondii*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 2013 [cited 14 Jun 17]; 55:65-7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23328729>
9. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M. An improved MTT assay. *J Immunol Methods.* 1993 [cited 14 Jun 17]; 157:203-7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8423364>
10. Piacenti FJ. An Update And Review Of Antiretroviral Therapy. *Pharmacother.* 2006 [cited 14 Jun 17]; 26:1111-33. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16863488>

11. de Mendoza C, Morelló J, Garcia-Gascó P, Rodríguez-Novoa S, Soriano V. Tipranavir: a new protease inhibitor for the treatment of antiretroviral-experienced HIV-infected patients. *Expert Opin Pharmacother*. 2007 [cited 14 Jun 17];8:839-50. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17425479>
12. Fernández Montero JV, Barreiro P, Soriano V. HIV protease inhibitors: recent clinical trials and recommendations on use. *Expert Opin Pharmacother*. 2009 [cited 14 Jun 17];10:1615-29.
13. González-Morales T, Bacallo-Gallestey J, García-Santana CA, Molina-García JR. Prevalence of *Toxoplasma gondii* antibodies in a population of pregnant women in Cuba. *Gac Med Mex*. 1995 [cited 14 Jun 17];131:499-50. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8768594>
14. Alfonso Y, Monzote L. HIV Protease Inhibitors: Effect on the Opportunistic Protozoan Parasites. *Open Med Chem J*. 2011 [cited 14 Jun 17];5:40-50. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21629510>
15. Machado M, Sanches-Vaz M, Cruz JP, Mendes AM, Prudêncio M. Inhibition of *Plasmodium* Hepatic Infection by Antiretroviral Compounds. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 [cited 14 Jun 17];7:329. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28770176>
16. Santos LO, Vitório BS, Branquinha MH, Pedroso e Silva CM, Santos ALS, d'Avila-Levy CM. Nelfinavir is effective in inhibiting the multiplication and aspartic peptidase activity of *Leishmania* species, including strains obtained from HIV-positive patients. *J Antimicrob Chemother*. 2013 [cited 14 Jun 17];68:348-53. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23109184>
17. Costa S, Machado M, Cavadas C, do Céu Sousa M. Antileishmanial activity of antiretroviral drugs combined with miltefosine. *Parasitol Res*. 2016 [cited 14 Jun 17];115(10):3881-7. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27249967>
18. Sangenito LS, Menna-Barreto RFS, d'Avila-Levy CM, Santos ALS, Branquinha MH. Decoding the Anti-*Trypanosoma cruzi* Action of HIV Peptidase Inhibitors Using Epimastigotes as a Model. *PLoS ONE*. 2014 [cited 14 Jun 17];9:e113957. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25464510>
19. Dunn LA, Andrews KT, McCarthy JS, Wright JM, Skinner-Adams TS, Upcroft P, et al. The activity of protease inhibitors against *Giardia duodenalis* and metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Int J Antimicrob Agents*. 2007 [cited 14 Jun 17];29:98-102. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17137752>
20. Peatey CL, Andrews KT, Eickel N, MacDonald T, Butterworth AL, Trenholme KL, et al. Antimalarial Asexual Stage-Specific and Gametocytocidal Activities of HIV Protease Inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 [cited 14 Jun 17];54:1334-7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20028821>
21. Dash C, Kulharni A, Dunn B, Rao M. Aspartic peptidase inhibitors: implications in drug development. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2003 [cited 14 Jun 17];38:89-119. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12749695>
22. Andrews KT, Fairlie DP, Madala PK, Ray J, Wyatt DM, Hilton PM, et al. Potencies of Human Immunodeficiency Virus Protease Inhibitors *in vitro* against *Plasmodium*

falciparum and *in vivo* against murine malaria. Antimicrob Agents Chemother. 2006 [cited 14 Jun 17]; 50:639-48. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16436721>

23. Shea M, Jäkke U, Liu Q, Berry C, Joiner KA, Soldati-Favre D. A family of aspartic proteases and a novel, dynamic and cell-cycle-dependent protease localization in the secretory pathway of *Toxoplasma gondii*. Traffic. 2007 [cited 14 Jun 17]; 8:1018-34. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17547703>

Recibido: 30 de octubre de 2017.

Aprobado: 13 de abril de 2018.

Lianet Monzote Fidalgo. Departamento de Parasitología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Autopista Novia del Mediodía Km 6 ^{1/2}. CP 601, municipio Lisa, La Habana, Cuba.
Correo electrónico: monzote@ipk.sld.cu