

Nuevos avances en el tratamiento específico de la enfermedad de Chagas*

Julio A. Urbina

Centro de Bioquímica y Biofísica.
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas. Caracas. Venezuela
Drugs for Neglected Diseases Initiative. Ginebra. Suiza

Correspondencia:

Julio A. Urbina
Laboratorio de Química Biológica
Centro de Biofísica y Bioquímica
Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas
Altos de Pipe, Km. 11,
Carretera Panamericana
Apartado 21827
Caracas 1020, Venezuela
E-mail: jaurbina@mac.com

Resumen

Aunque la relevancia del tratamiento antiparasitario en el manejo de la enfermedad de Chagas en la fase aguda es plenamente aceptada, su relevancia en la fase crónica ha sido motivo de controversia. Sin embargo, recientes estudios sobre la patogénesis de esta dolencia han llevado a un consenso creciente en el sentido de que la eliminación del agente etiológico, *Trypanosoma cruzi*, de los pacientes infectados sería un requisito necesario y suficiente para frenar la evolución de la enfermedad en todas sus fases y evitar sus serias consecuencias a largo plazo. Desafortunadamente, los tratamientos específicos actualmente disponibles para esta parasitosis (nifurtimox y benznidazol) poseen una eficacia limitada en la fase crónica y frecuentes efectos colaterales indeseables, que pueden llevar a la interrupción del tratamiento. Actualmente se adelantan varios nuevos enfoques para el tratamiento específico de la dolencia, basados en el notable avance de nuestro conocimiento de la bioquímica y fisiología del *T. cruzi* en los últimos 25 años, que prometen ser mucho más eficaces contra el parásito y tolerables para el paciente. Entre los agentes más prometedores se encuentran inhibidores específicos de la biosíntesis de ergosterol, específicamente nuevos derivados triazólicos que bloquean la C14 α demetilasa de esteroides. Entre los agentes más avanzados de este tipo están el posaconazol (Schering-Plough), recientemente registrado en EUA y la UE como antimicótico sistémico y el ravuconazol (Eisai Chemical Company). Tales compuestos pueden entrar en pruebas clínicas en pacientes con enfermedad de Chagas a corto plazo (5 años). Otros compuestos que podrían entrar en desarrollo clínico en la próxima década, incluyen inhibidores de proteasas específicas del parásito (cruzipaina) y bisfosfonatos, inhibidores de la enzima farnesildifosfato sintetasa y/o hexoquinasa del parásito. Finalmente, enfoques quimioterapéuticos más recientes incluyen inhibidores de la tripanotión reductasa, hipoxantina-guanina fosforibosil-transferasa, prenil-transferasa de proteínas, biosíntesis de fosfolípidos e inhibidores de la biosíntesis de ergosterol que actúan a nivel de escualeno sintetasa y oxidoescualeno ciclasa. Tales compuestos también han iniciado desarrollo preclínico, pero su desarrollo clínico se estima en el medio o largo plazo (10 a 15 años).

Palabras clave: Chagas. Posaconazol. Ravuconazol. Cruzipaina. Bifosfonatos. Ergosterol.

Summary

Although the importance of antiparasitic treatment for the management of acute phase Chagas disease is widely accepted, its relevance in the chronic phases remains controversial. Recent studies about the pathogenesis of this disease have brought certain consensus in the sense that the elimination of the etiological agent, *Trypanosoma cruzi*, in infected patients is required and sufficient to stop the evolution of the disease in all its phases and to avoid serious, long-term consequences. Unfortunately, the specific treatments actually available against this parasite (nifurtimox and benznidazol) have limited efficacy in the chronic phase, and frequently

*Este artículo es una versión actualizada y ampliada de un documento presentado en la reunión del Grupo Científico de Trabajo sobre Enfermedad de Chagas del programa TDR de la Organización Mundial de la Salud, que tuvo lugar en Buenos Aires, Argentina, del 17 al 20 de Abril, 2005.

have undesirable side effects that can interrupt or limit their use for treatment.

Over the last 25 years, notable advances in our knowledge about the biochemistry and physiology of *T. cruzi* have led to several new perspectives for treating Chagas disease that promise to be both more effective against the parasite and more tolerable for patients. Among the most promising new treatments are agents that specifically inhibit the biosynthesis of ergosterol and new derivatives called triazolic that block the C14 sterol α demethylase. Among these more advanced agents, is posaconazole (Schering-Plough), that has been recently registered in Europe and the United States as systemic antimycotic and also ravuconazole (Eisai Chemical Company). These compounds will enter into clinical trials with Chagas patients in the near future (about 5 years). Other drugs that could enter the clinical development process within the next decade include protease inhibitors specific to the parasite (cruzipain) and biphosphonate, inhibitors of the farnesyl-diphosphate synthetase enzyme and/or hexoquinase of the parasite. Finally, novel chemotherapeutic approaches include inhibitors of: tripano-tion reductase, hypoxanthine guanine phosphoribosyl-transferase, prenyl-transferase proteins, biosynthesis of phospholipids and of ergosterol biosynthesis that act at the level of squalene synthetase and oxidosqualene cyclase enzymes. These products are also in the preclinical development phase, but their timeline is expected to be medium or long term (10 to 15 years).

Key words: Chagas. Posaconazole. Ravuconazole. Cruzipain. Biphosphonates. Ergosterol.

Relevancia del tratamiento etiológico en el manejo de la enfermedad de Chagas

De acuerdo con la OMS, la enfermedad de Chagas continua provocando la mayor carga de morbi-mortalidad de origen parasitario en el continente Americano, a pesar de importantes avances en el control de la transmisión vectorial y transfusional de su agente etiológico, el *Trypanosoma cruzi*^{1,2}. La emigración de grandes contingentes de latinoamericanos a los Estados Unidos de América y Europa ha trasladado esta dolencia a zonas no endémicas, donde empieza a ser percibido como un potencial problema de salud pública³⁻⁶. No hay vacunas disponibles para la prevención de esta infección y la perspectiva actual sobre el eventual desarrollo de las mismas es incierta^{7,8}.

Aunque la participación del *T. cruzi* en la patogénesis de la fase aguda de la enfermedad de Chagas es ampliamente aceptada^{7,9}, el papel del parásito en el origen de las características manifestaciones patológicas de la fase crónica ha sido muy controvertido^{8,10-13}. Desde los años 70 del siglo pasado numerosos estudios habían concluido que las manifestaciones patológicas presentes en la fase crónica de la dolencia, incluyendo la miocardiopatía chagásica, son de origen principalmente autoinmune^{11,12}. Dicha hipótesis se basó principalmente en la aparente ausencia de parásitos en las características lesiones inflamatorias presentes en el miocardio y tracto gastro-intestinal de pacientes crónicos de enfermedad de Chagas. Se postula que tales procesos inflamatorios

resultarían del "mimetismo molecular" entre antígenos parasitarios y ciertos componentes de los tejidos del huésped^{11,12}, así como por liberación de autoantígenos resultante de la citolisis inducida por el parásito intracelular^{13,14}. De acuerdo a dicha hipótesis, luego de que los procesos autoinmunes se establecen en el hospedero, la persistencia del parásito no jugaría un papel determinante en la patogénesis de la enfermedad y aunque el tratamiento anti-parasítico fuera exitoso, este no conllevaría a un mejoramiento clínico de los pacientes. Esta conceptualización de hecho desestimuló el desarrollo de nuevos agentes tripanocidas por décadas, al considerarse estos irrelevantes^{15,16}.

Sin embargo, la hipótesis del origen autoinmune de la enfermedad de Chagas ha sido seriamente cuestionada por los resultados de estudios más recientes, resumidos en diversos artículos^{8,16}, que han concluido que la persistencia del parásito, combinada con un desbalance del sistema inmune que puede incluir procesos autoinmunes, es una condición necesaria y suficiente para generar y mantener los procesos inflamatorios que subyacen en las lesiones presentes en la etapa crónica de la enfermedad^{8,16-18}. Tales hallazgos indicarían que la eliminación del *T. cruzi* de los pacientes infectados sería un prerrequisito para detener la evolución de la enfermedad y evitar sus consecuencias terminales. *Así pues, el consenso que prevalece actualmente es que esta dolencia debe ser tratada como una enfermedad parasitaria, no autoinmune*^{8,16,19,20}.

Tratamientos etiológicos disponibles para la enfermedad de Chagas y sus limitaciones

Las drogas actualmente usadas para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas son el nitrofurano nifurtimox (Lampit®, Bayer) y el nitroimidazol benznidazol (Rochagan®, Radanil®, Roche), cuya actividad anti-*T. cruzi* fue descubierta empíricamente hace más de tres décadas. El nifurtimox actúa por vía de la reducción del grupo nitro a radicales nitroaniónicos, que a su vez reaccionan con el oxígeno molecular para generar metabolitos reducidos del mismo, altamente tóxicos (radicales superóxido, peróxido e hidróxilo). Docampo, *et al.* han demostrado que el *T. cruzi* es deficiente en algunos de los mecanismos de detoxificación de metabolitos de oxígeno, particularmente del peróxido de hidrógeno, y es por ello más susceptible al estrés oxidativo que las células de vertebrados²¹. El benznidazol parece actuar por una vía diferente, resultante de la reacción de sus derivados nitroreducidos con macromoléculas como DNA, RNA, proteínas y posiblemente lípidos insaturados²¹. *Todo ello indica que la actividad antiparasítica de estos compuestos esta indisolublemente asociada a su toxicidad hacia el hospedero vertebrado.*

Ambas drogas son activas en la fase aguda (hasta un 80% de éxitos terapéuticos, definidos como cura parasitológica radical indicada por negativización de todas las pruebas parasitológicas y serológicas⁹, así como en la fase crónica temprana de la enfermedad (típicamente niños y adolescentes, hasta 60% de curaciones)^{20,22-24}, aunque hay datos recientes que discrepan de tales resultados^{25,26}. Más aún, la eficacia antiparasítica de los compuestos varía según la región geográfica, probablemente como resultado de la diferente susceptibilidad intrínseca a las drogas de las cepas del *T. cruzi* que circulan en diferentes zonas endémicas^{9,27}.

Asimismo, estos compuestos presentan frecuentemente efectos colaterales deletéreos, que incluyen anorexia, vómitos, polineuropatía periférica y dermatopatía alérgica, que pueden obligar a la interrupción del tratamiento⁹. Sin embargo, la mayor limitación de los tratamientos actualmente disponibles en su baja eficacia ($\geq 80\%$ de fracasos terapéuticos) en la fase crónica establecida de la enfermedad, que es la presentación clínica más frecuente actualmente en Latino América⁹. Esta conclusión, inicialmente basada en la persistencia de la serología anti-*T. cruzi* y la evolución clínica de los pacientes tratados, ha sido recientemente confirmada usando métodos de PCR²⁸⁻³¹.

Las razones de la marcada diferencia en la eficacia de estas drogas en las dos fases de la enfermedad no están claras aún, pero posiblemente resulten de la inadecuada farmacocinética de estos compuestos frente a la ubicación de los parásitos en tejidos profundos en la fase crónica de la infección^{32,33}. Aún así, algunos estudios han demostrado que el tratamiento antiparasítico con benznidazol en pacientes crónicos, aunque incapaz de inducir cura parasitológica en la mayoría de los pacientes, frenó el desarrollo de cambios electrocardiográficos y el deterioro del cuadro clínico de los pacientes³⁴⁻³⁶. Tales resultados son compatibles con la hipótesis de la persistencia parasitológica como factor primario desencadenante de las lesiones características de esta fase de la dolencia, pues al reducirse (sin necesariamente eliminarse) la carga parasitaria de los tejidos debería bajar la severidad de los procesos inflamatorios^{8,34,35}. Esta interpretación ha recibido un apoyo experimental directo en un estudio en un modelo murino de la enfermedad³⁷. En base a esos hallazgos un grupo de expertos reunidos en 1998 en Rio de Janeiro, Brasil, produjo un conjunto de recomendaciones para el tratamiento específico de pacientes seropositivos para *T. cruzi* (Oficina Panamericana de la Salud/ Organización Mundial de la Salud, documento OPS/HCP/HCT140/99). Sin embargo, aunque existe un amplio consenso en el sentido de que todos los pacientes seropositivos deben recibir tratamiento específico para eliminar o reducir su carga parasitaria, muchos médicos mantienen serias reservas con relación al uso de nifurtimox o benznidazol en pacientes crónicos, debido a la desfavorable relación riesgo/beneficio de esas drogas.

Nuevos enfoques para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas

Inhibidores de biosíntesis de ergosterol

Estudios recientes han demostrado de forma consistente que el *T. cruzi*, como la mayoría de los hongos y levaduras patógenas, requiere de esteroides específicos para mantener su viabilidad y capacidad de proliferación a lo largo de todo su ciclo vital y que inhibidores específicos de la biosíntesis de ergosterol (IBE) son potentes agentes antiproliferativos contra este parásito, tanto in vitro como in vivo^{16,33}. Sin embargo, otros estudios han mostrado que IBE comercialmente disponibles, como el ketoconazol, itraconazol o terbinafina, son incapaces de erradicar el *T. cruzi* de humanos o animales con infecciones crónicas o detener el progreso de la dolencia, indicando que su actividad in vivo es tripanostática, no tripanocida^{16,33}. Una excepción son los estudios de Apt y colaboradores en Chile, quienes reportan que el itraconazol, aunque incapaz de curar parasitológicamente a los pacientes, puede retardar

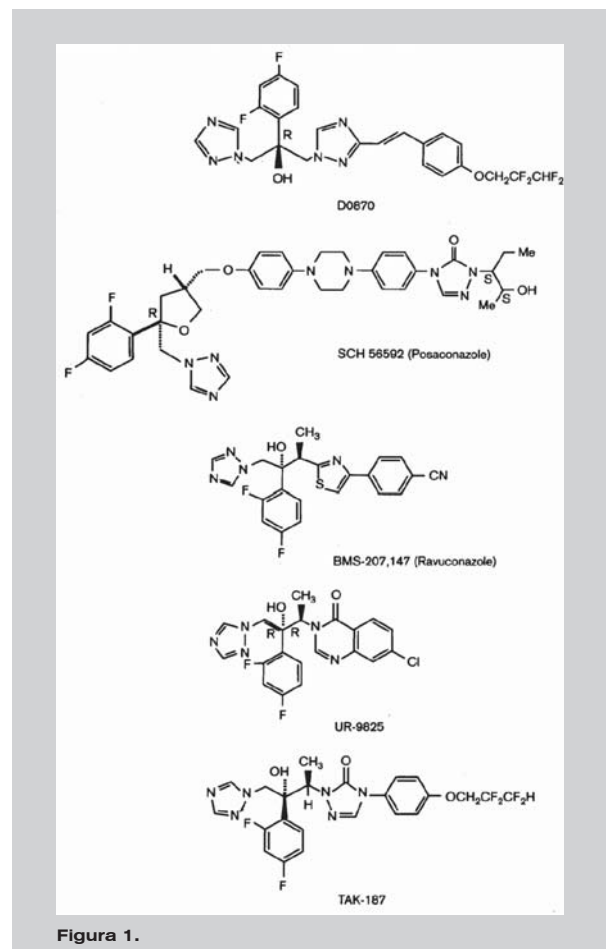


Figura 1.

o detener la progresión del compromiso cardiaco de los mismos^{38,39}. La discrepancia con los resultados obtenidos en otras partes del continente puede ser probablemente explicada por la mayor susceptibilidad a la droga de las cepas de *T. cruzi* que circulan en el área endémica chilena, también observada con el alopurinol^{38,39}.

Por otro lado, estudios en la última década han demostrado que nuevos derivados triazólicos, inhibidores de la C14 α demetilasa de esteroides (un citocromo P-450, CYP51) en hongos y levaduras (Figura 1), como D0870 (Zeneca Pharmaceuticals, Macclesfield, Reino Unido) y posaconazol (SCH 56592, Schering-Plough Research Institute, Kenilworth, N.J., EUA), son capaces de inducir cura parasitológica radical en modelos murinos de enfermedad de Chagas, tanto aguda como crónica^{16,33,40}, siendo los primeros compuestos capaces de curar infecciones crónicas de este parásito en animales. Más aún, los compuestos demostraron ser activos contra cepas de *T. cruzi* naturalmente resistentes a nifurtimox y/o benznidazol, incluso si el hospedero estaba inmunosuprimido^{16,33,41,42}. Un estudio más reciente demostró que la actividad anti-*T. cruzi* del posaconazol en un modelo murino de enfermedad de Chagas aguda es mucho menos dependiente del interferon- γ que la del benznidazol⁴³.

La actividad tripanocida in vivo de estos compuestos ha sido atribuida a su potente y selectiva actividad intrínseca contra el parásito (las concentraciones mínimas inhibitorias contra la forma amastigote intracelular, cultivada en células de mamífero in vitro, esta en el rango nanomolar a sub-nanomolar^{44,45}), así como a propiedades farmacocinéticas apropiadas para esta aplicación (grandes volúmenes de distribución y largos tiempos de eliminación)^{15,16,33,46}. El posaconazol (Figura 1), un análogo estructural del itraconazol, tiene un amplio espectro antimicótico⁴⁶, una notable eficacia como antimicótico sistémico en animales experimentales y humanos⁴⁶⁻⁵² y un excelente perfil de seguridad, aun en tratamientos prolongados^{47,50,53}. En base a esos estudios, el compuesto fue aprobado en el 2005 por la Unión Europea y Australia para el tratamiento de micosis sistémicas invasivas refractarias y en el 2006 por la Federal Drug Administration de los EUA para la profilaxis de aspergilosis y candidiasis invasivas y para el tratamiento de candidiasis orofaríngeas resistentes al fluconazol y/o itraconazol, por lo que es un candidato obvio a corto plazo para estudios clínicos en pacientes con enfermedad de Chagas.

Posteriormente, otros triazoles (Figura 1) como TAK-187 (Takeda Chemical Industries, Osaka, Japon)^{54,55}, UR-9825 (albaconazol, Uriach y Compañía, Barcelona, España)^{56,57} y ravuconazol (ER-30346; BMS 207,147, Eisai Chemical Company, Tsukuba, Japon)⁵⁸, también han demostrado ser tripanocidas, tanto in vitro como in vivo. TAK-187 es un triazol con largos tiempos de vida media en

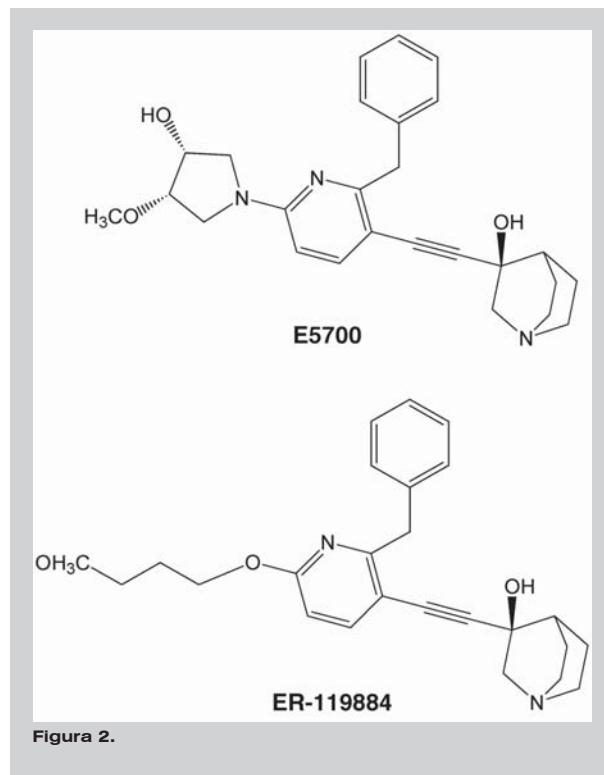
varios mamíferos y una actividad antimicótica de amplio espectro, que tiene una potente actividad anti-*T. cruzi* in vitro e, igual que el posaconazol, es capaz de curar infecciones agudas y crónicas en ratones, aun cuando la cepa infectante es refractaria al tratamiento con nifurtimox o benznidazol⁵⁴; en un trabajo más reciente se demostró que este compuesto es significativamente superior al benznidazol en la prevención de daño cardiaco en un modelo murino de enfermedad de Chagas⁵⁹. UR-9825 es otro potente inhibidor de la C14 α demetilasa de esteroides en hongos y protozoarios y tiene una notable actividad anti-*T. cruzi* in vitro⁵⁶. Aunque su corto tiempo de vida media (<0.5 h) en ratones no permitió evaluar su actividad en modelos murinos de la enfermedad, un estudio reciente en un modelo canino demostró que el compuesto puede curar infecciones establecidas de la virulenta cepa Y, sin aparente toxicidad a las dosis terapéuticas, aunque también se encontró resistencia natural a la droga con la cepa Berenice-78⁵⁷.

Finalmente, el ravuconazol es un triazol desarrollado originalmente por Eisai Company en Japon y luego por Bristol-Myers Squibb en los EUA como antimicótico sistémico con una potente actividad anti-*T. cruzi* in vitro, aunque su actividad in vivo en modelos murinos fue limitada debido a inadecuadas propiedades farmacocinéticas de la droga en ratones⁵⁸. Sin embargo, tales resultados no niegan su potencial utilidad para el tratamiento de la enfermedad de Chagas humana pues la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de los amastigotes intracelulares por este compuesto (1 nM) es 1.000 a 5.000 veces más baja que los niveles obtenidos en plasma a dosis terapéuticas contra hongos en humanos y el tiempo de vida media es ≥ 120 h^{60,61}. El desarrollo como antimicótico sistémico del compuesto ha sido ahora retomado por Eisai Company y se adelantan estudios en modelos caninos de enfermedad de Chagas, como un prelude para posibles pruebas clínicas en humanos (Bahia, M.T. y Urbina, J.A., en progreso). La mayoría de estos compuestos han completado sus estudios preclínicos como agentes anti-*T. cruzi* y la totalidad han completado estudios de farmacocinética y seguridad en humanos, como paso previo a su desarrollo clínico como antimicóticos. *Así pues, dependiendo de la conclusión de acuerdos económicos y legales con las empresas que originalmente desarrollaron estos compuestos como antimicóticos, los nuevos triazoles podrían entrar en desarrollo clínico para el tratamiento de enfermedad de Chagas humana a corto plazo (5 años).*

Asociado a esta línea es el descubrimiento reciente de que el anti-arrítmico amiodarona, la droga más frecuentemente usada para el tratamiento sintomático de pacientes crónicos de enfermedad de Chagas con compromiso cardiaco, tiene también acción directa contra el *T. cruzi*⁶². Algunos estudios habían demostrado que la amiodarona tiene acción antimicótica selectiva^{63,64}. En

los trabajos sobre la acción antiparasítica de la amiodarona se pudo demostrar que ésta inhibe totalmente la proliferación tanto de la forma epimastigote extracelular como la de los amastigotes intracelulares cultivados in vitro, a concentraciones menores que la que se alcanzan en los tejidos a dosis terapéuticas de la droga y que el compuesto potencia la acción del posaconazol sobre el parásito⁶². Estudios in vivo demostraron una acción directa de la amiodarona sobre el *T. cruzi* en varios modelos murinos de enfermedad de Chagas aguda y la inducción de cura parasitológica radical cuando se combina con el posaconazol. Estudios sobre el mecanismo de acción de la droga indicaron que la amiodarona afecta la homeostasis de calcio del parásito, pero también inhibe la síntesis de ergosterol a nivel de la lanosterol sintetasa (oxidescualeno ciclasa), así como que el posaconazol también afecta la homeostasis de calcio del parásito. Esos hallazgos sugieren la potenciación mútua de las drogas e indican que el tratamiento con amiodarona en pacientes con enfermedad de Chagas crónica y compromiso cardiaco podría tener el beneficio insospechado de reducir la carga parasitaria e incrementar la eficacia de los tratamientos antiparasíticos específicos⁶².

Otro prometedor grupo de IBE son los inhibidores de la escualeno sintetasa (SQS). SQS cataliza el primer paso específico para la síntesis de esteroides y ha sido el objeto de un gran número de estudios, tanto en el sector académico como en el industrial, como un potencial blanco de nuevos agentes hipocolesterolémicos, que tendrían significativas ventajas sobre las estatinas actualmente disponibles^{65,66}. Esta enzima ha sido recientemente validada químicamente con un blanco quimioterapéutico en *T. cruzi* y *Leishmania mexicana*, usando el inhibidor prototipo 3-(bifenil-4-il)-3-hidroxi-quinuclidina (BPQ-OH)⁶⁷. Ulteriores estudios demostraron que los compuestos E5700 and ER-119884 (Figura 2), dos nuevos derivados quinuclidínicos inhibidores de SQS que están siendo desarrollados como agentes reductores de colesterol y triglicéridos en humanos por Eisai Company (Figura 2), tienen una potente y selectiva actividad anti-*T. cruzi* in vitro y uno de ellos (E5700), fue capaz de suprimir completamente la parasitemia y conferir protección total contra la muerte en un modelo murino de enfermedad de Chagas fulminante⁶⁸; este es el primer reporte de la actividad como anti-infectivo de un inhibidor de SQS suministrado oralmente. Aunque estos compuestos y otras aril-quinuclidinas son también inhibidores de la SQS de mamíferos⁶⁷⁻⁷⁰, su selectiva actividad antiparasítica in vitro e in vivo se explica por la capacidad de las células hospedadoras de compensar la reducción de la síntesis endógena de colesterol incrementando la expresión de los receptores de LDL de la membrana plasmática y tomar este esteroide del plasma sanguíneo o del medio de cultivo⁷¹. En contraste, el parásito no puede compensar de manera análoga la inhibición de la síntesis de sus esteroides endógenos (ergosterol y análogos),



pues no hay cantidades apreciables de los mismos en las células hospedadoras o el medio extracelular. Sin embargo, el requerimiento de algunos órganos esenciales como las gónadas (en particular los testículos) de síntesis endógena de colesterol para sostener la producción de hormonas sexuales e inducir la gametogénesis^{72,73} plantea una limitación fundamental para el uso prolongado de inhibidores de SQS que actúen sobre la enzima del hospedero y sugiere que el uso de los mismos como anti-infectivos probablemente requerirá el desarrollo de compuestos selectivos para la enzima del parásito.

Nuevos estudios han avanzado en esta área, delineando algunas relaciones estructura-actividad para la inhibición de la SQS de parásitos por derivados quinuclidínicos⁷⁴. Más recientemente se clonó el gen codificante para la SQS de *T. cruzi* y se obtuvo una efectiva expresión heteróloga del mismo en *E. coli*⁷⁵. La enzima recombinante, truncada en los extremos C- y N-terminal, es soluble y completamente activa, apropiada para la evaluación de gran número de inhibidores: de una primera colección de compuestos se pudieron identificar varios con actividad selectiva contra la SQS y la forma amastigote intracelular del parásito⁷⁵. En base a esas consideraciones, el desarrollo clínico de inhibidores de SQS para el tratamiento de la enfermedad de Chagas sólo puede esperarse a mediano plazo (10 años).

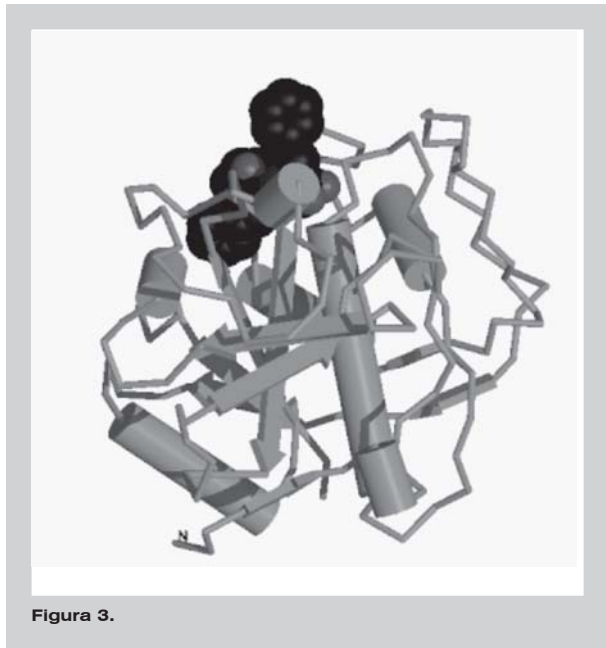


Figura 3.

Otro desarrollo reciente de interés en esta área es la validación de la oxidoescualeno ciclasa (OSC o lanosterol sintetasa) como un nuevo blanco terapéutico en *T. cruzi* y parásitos relacionados⁷⁶⁻⁷⁸. Buckner y asociados⁷⁶ han demostrado que ciertos inhibidores de la OSC son potentes y selectivos agentes anti-*T. cruzi* in vitro. Aunque no se han publicado resultados in vivo en la literatura científica, una patente reciente de los mismos autores describe una serie de inhibidores de SQS como eficaces agentes para el tratamiento de enfermedades parasitarias, incluyendo la enfermedad de Chagas en varios modelos animales (U.S Patent WO0076316⁷⁹). *Dado este limitado desarrollo pre-clínico, el desarrollo clínico de inhibidores de OSC para el tratamiento de la enfermedad de Chagas sólo puede esperarse a largo plazo (10 a 15 años).*

Un desarrollo muy reciente en este campo (Gerpe, *et al*, en prensa) es la síntesis y caracterización biológica de derivados heteroalílicos del 5-nitrofurano, que tienen un mecanismo de acción dual contra el *T. cruzi*: inducción de stress oxidativo por vía del grupo nitrofurano (similar al producido por nifurtimox) e inhibición de la síntesis de ergosterol por acción del grupo heteroalil sobre la enzima escualeno epoxidasa (similar a la acción de la terbinafina). Los compuestos tienen potente acción contra ambas formas proliferativas del *T. cruzi* (epimastigotes extracelulares y amastigotes intracelulares), con valores de IC₅₀ en el rango sub-micromolar y elevada selectividad, sugiriendo una novedosa estrategia quimioterapéutica contra el parásito.

Inhibidores de cisteína-proteasas (cruzipaína)

T. cruzi contiene elevadas cantidades de una cisteína-proteasa análoga a la catepsina L, que ha sido denominada cruzipaína (también conocida como gp51/57 o cruzaina, en su forma recombinante) y es responsable de la mayor parte de la actividad proteolítica de este parásito en todos los estadios de su ciclo de vida^{80,81}. Inhibidores selectivos de esta proteasa son capaces de bloquear la proliferación tanto de la forma extracelular (epimastigotes) como de los amastigotes intracelulares, así como de impedir la metacicloogénesis (transformación de epimastigotes a tripomastigotes metacíclicos), lo que indica que la proteína tiene funciones esenciales en el ciclo de vida del parásito^{80,81}. El gen codificante para esta proteína (que presenta un elevado número de copias en el genoma del parásito) ha sido clonado, secuenciado y expresado heterológicamente. La estructura tridimensional de la proteína recombinante, en ausencia y presencia de inhibidores, ha sido determinada usando cristalografía de rayos-x (Figura 3) y a partir de la misma y de consideraciones sobre el mecanismo de la enzima se han diseñado inhibidores específicos, como la N-metil-piperazina-urea-F-hF-vinyl-sulfona-fenil, también conocido como CRA-3316 o K-777 (Figura 4a).

Este compuesto y análogos son capaces de reducir drásticamente la parasitemia e incrementar la sobrevida en modelos murinos de enfermedad de Chagas, con baja toxicidad⁸². Estudios más recientes han indicado que K-777 puede prevenir daño cardíaco en un modelo canino de enfermedad de Chagas (aunque no erradica la infección)⁸³ y es capaz de inducir cura parasitológica en ratones genéticamente inmunosuprimidos (deficientes en recombinasa, Rag(-/-)) con infecciones agudas y crónicas por *T. cruzi*⁸⁴. En el 2002, Celera Genomics anunció que el instituto *One World Health (IOWH)* y los *National Institutes of Health* habían iniciado el desarrollo del K-777 como un nuevo tratamiento potencial para la enfermedad de Chagas, pero en el 2005 este desarrollo se paró por problemas de hepatotoxicidad y dificultades en la síntesis del compuesto (<http://www.oneworldhealth.org/diseases/chagas.php>).

Se han descrito otras moléculas que inhiben la cruzipaína, con potente y selectiva actividad anti-*T. cruzi* in vitro^{85,86}. Entre ellas se encuentran inhibidores no peptídicos de la enzima, basados en la estructura de la tio-semicarbazona (Figura 4b), para los cuales se ha hecho un estudio detallado de correlación estructura-actividad, racionalizada en términos de la estructura y mecanismo de la enzima⁸⁶. Estos compuestos son activos contra la forma amastigote intracelular del *T. cruzi* a concentraciones nanomolares in vitro⁸⁶ y su simplicidad y bajo costo de síntesis los hacen ideales como punto de partida para el desarrollo de nuevos agentes tripanocidas. En conclusión,

este conjunto de resultados indica que la cruzipaina es un atractivo blanco quimioterapéutico rigurosamente validado en el *T. cruzi* y esta percepción es consistente con el reciente registro, por grupos independientes, de una serie de patentes de inhibidores de cruzipaina como potenciales agentes para el tratamiento de la enfermedad de Chagas⁷⁹. En base a la información disponible en este momento en la literatura científica y de patentes sobre el grado de avance del desarrollo preclínico de estos compuestos, su desarrollo clínico para el tratamiento de la enfermedad de Chagas puede esperarse a medio plazo (10 años).

Inhibidores del metabolismo del pirofosfato

Los parásitos del orden Kinetoplastida (que incluyen a los *Trypanosomatidae*), así como aquellos pertenecientes al orden Apicomplexa (*Toxoplasma*, *Plasmodium*) contienen organelas especializadas en el almacenamiento de calcio y polifosfatos, denominados acidocalcisomas, no presentes en la mayoría de las células de vertebrados^{87,88}. La toma y descarga de Ca^{2+} hacia y desde la matriz del acidocalcisoma es controlada por una serie de mecanismos que incluyen una Ca^{2+} ATPasa, un intercambiador Na^+/H^+ , bombas de protones energizadas por ATP y pirofosfato inorgánico (PPI), así como por pirofosfatasas específicas^{87,88}. Polifosfatos de cadena corta (principalmente el PPI y trifosfato inorgánico), están involucrados en la respuesta de este organismo al estrés osmótico, así como en el mantenimiento del estatus energético del parásito^{87,88}. Los bisfosfonatos, análogos metabólicamente inertes del PPI, se acumulan selectivamente en *T. cruzi* y otros Tripanosomatídeos (probablemente por su afinidad por los acidocalcisomas) y pueden inhibir enzimas esenciales del parásito involucradas en el metabolismo de pirofosfato inorgánico y orgánico, como la farnesil-difosfato sintetasa (FPPS)^{89,90}, SQS⁹¹ o bombas de protones dependientes de PPI.

Entre esos compuestos, los N-alquil-bisfosfonatos (Figura 5), inhibidores específicos de la FPPS que son ampliamente usados actualmente en humanos para el manejo de problemas de resorción ósea como la osteoporosis y la enfermedad de Paget⁹², tienen también una potente y selectiva acción contra el *T. cruzi*, tanto *in vitro* como *in vivo*⁹³⁻⁹⁵. Sin embargo, aunque se ha reportado que el pamidronato (Aredia®, Novartis) puede inducir cura parasitológica radical en un modelo murino de leishmaniasis cutánea⁹⁶, no se objetivaron curas parasitológicas completas en un estudio con risedronato (Actonel®, Procter & Gamble) en un modelo murino de enfermedad de Chagas aguda⁹⁵, probablemente debido al carácter diseminado de la infección, las propiedades farmacocinéticas del compuesto y el corto período de tratamiento (7 días) utilizado.

Un desarrollo más reciente en este campo se basa en el descubrimiento que en *T. cruzi* la hexoquinasa, la primera enzima específica de la ruta glicolítica, no esta sometida a

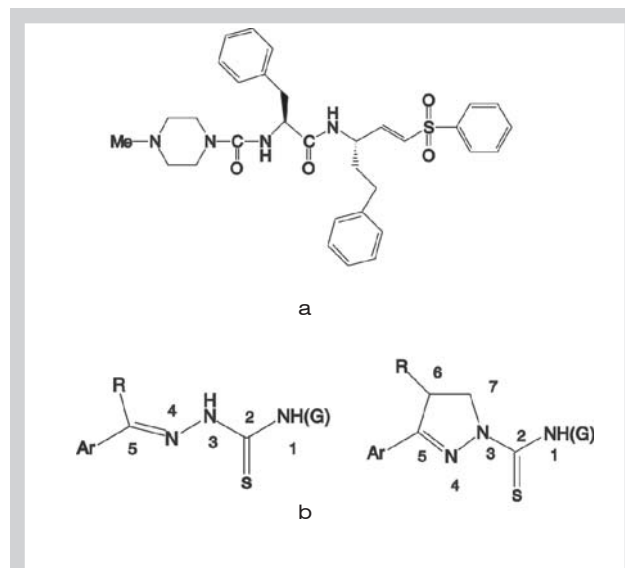


Figura 4a y Figura 4b.

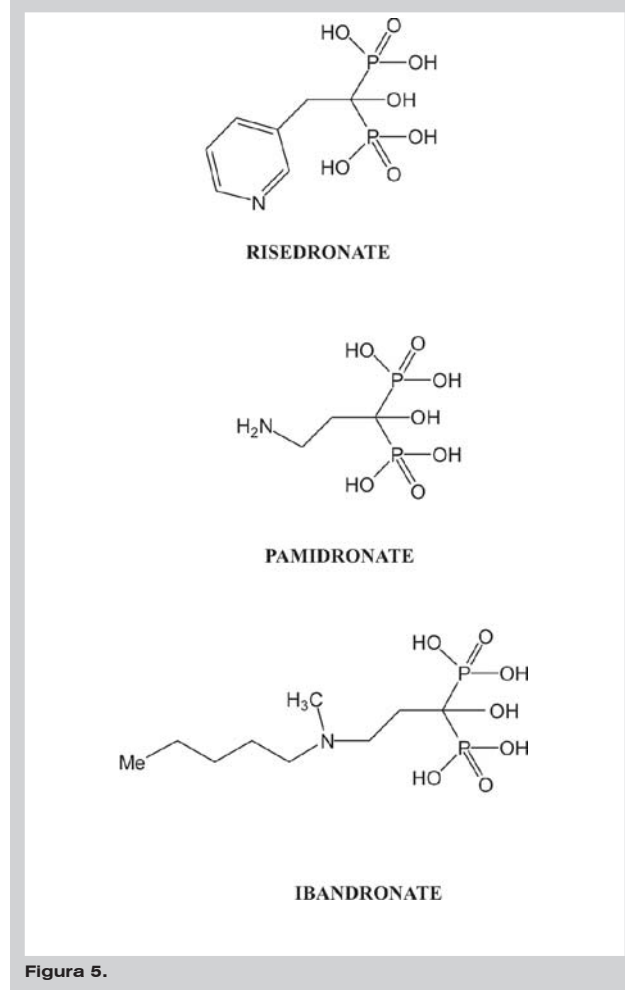


Figura 5.

la regulación por su producto D-glucosa-6-fosfato como ocurre en vertebrados, bacterias y levaduras pero es fuertemente inhibida por el PP⁹⁷⁻⁹⁹. Esto llevó a la identificación de una nueva familia de bisfosfonatos, diferentes a los ya conocidos inhibidores de la FPPS, que son potentes y específicos inhibidores de la hexoquinasa, el metabolismo energético y la proliferación del parásito^{100,101}.

Aunque los bisfosfonatos ya aprobados para uso en humanos (osteoporosis) y los nuevos inhibidores de hexoquinasa del parásito son compuestos-guía prometedores para el desarrollo de antiparasíticos de amplio espectro, su eventual desarrollo para esta nueva aplicación probablemente requiera nuevas formulaciones de los compuestos existentes (incluyendo pro-drogas), con propiedades farmacocinéticas más apropiadas. *En base a esas consideraciones, el desarrollo clínico de los bisfosfonatos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas sólo puede esperarse a medio plazo (10 años).*

Inhibidores de la síntesis y metabolismo del tripanotión

Trabajos independientes de varios grupos ha identificado las enzimas involucradas en la síntesis y metabolismo redox del tripanotión (N¹,N⁸-bis(glutacionil)-espermidina, (Figura 6) como potenciales blancos quimioterapéuticos en Tripanosomatídeos patógenos¹⁰². Esta ruta bioquímica es única de protozoarios del orden Kinetoplastida, en los cuales cumple funciones análogas a las del glutatión y la glutatión reductasa de otras células, en el mantenimiento del estado redox de los grupos tío^{102,103}. Los genes de todas las enzimas de esta ruta bioquímica han sido clonados, expresados heterológamente y las estructuras tridimensionales de todas las enzimas determinadas por cristalografía de rayos-X (Figura 5). Asimismo, varias enzimas de la ruta, incluyendo la tripanotión reductasa (TR) y la tripanotión sintetasa han sido validadas genéticamente

como esenciales para estos parásitos¹⁰². El diseño y prueba de inhibidores específicos de la TR esta en progreso y se han identificado varias familias de compuestos que son potentes inhibidores de la enzima pura y del crecimiento del *T. cruzi* *in vitro*¹⁰³⁻¹⁰⁶, pero hay pocos estudios sobre la acción de tales compuestos como agentes anti-parasíticos *in vivo*. Entre los estudios publicados, se demostró que la tioridazina y análogos, conocidos inhibidores de la TR *in vitro* son capaces de reducir la parasitemia, incrementar la sobrevivencia y prevenir daño cardíaco en modelos murinos de enfermedad de Chagas aguda¹⁰⁶⁻¹¹⁰, pero no se pudo obtener cura parasitológica de los animales y la selectividad de la acción del compuesto sobre la TR no esta demostrada. *Dado este limitado desarrollo preclínico, el desarrollo clínico de inhibidores de TR para el tratamiento de la enfermedad de Chagas sólo puede esperarse a largo plazo (10 a 15 años).*

Inhibidores de la captura de purinas

Los parásitos tripanosomatídeos son organismos absolutamente deficientes en la síntesis de novo de las purinas, por lo que deben obtener estos compuestos esenciales del hospedero o medios de cultivo. Una enzima esencial en este proceso es la hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT), un blanco bioquímico validado en estos organismos¹¹¹. El alopurinol (4-hidroxi-pyrazol-(3,4d)-pirimidina) ha sido usado por décadas en humanos para el tratamiento de la gota, pues es transformado en vertebrados al oxipurinol, que es potente inhibidor de la xantina oxidasa. En Tripanosomatídeos, que no tienen xantina oxidasa, el alopurinol actúa como un análogo de purinas y es incorporado, vía HGPRT, a los ácidos nucleicos, lo que conlleva a un bloqueo secuencial en la síntesis de ADN, ARN y proteínas¹¹¹. Se ha demostrado que este compuesto es un potente inhibidor del crecimiento de *T. cruzi* *in vitro*, pero *in vivo* se ha encontrado que hay fuertes diferencias en la susceptibilidad de diferentes cepas del parásito a la droga¹¹¹. La eficacia del alopurinol en el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas en humanos ha sido controvertida. Estudios pioneros en Brasil encontraron que el compuesto era ineficaz aun en la fase aguda de la infección¹¹², lo cual fue confirmado por un estudio multicéntrico en pacientes crónicos llevado a cabo durante 1992 en Argentina, Brasil y Bolivia bajo los auspicios de la Organización Mundial de la Salud, el cual fue interrumpido por la patente ineficacia terapéutica del compuesto^{113,114}. De nuevo, los estudios de Apt y colaboradores en Chile reportan resultados discrepantes con los obtenidos en otras partes del continente: de acuerdo con estos autores el alopurinol, suministrado a 8.5 mg/kg/d durante 60 días a pacientes en fase crónica, aunque incapaz de inducir cura parasitológica, pudo prevenir (75% de los casos) o revertir (49% de los casos) el desarrollo de anomalías electrocardiográficas, en un seguimiento de 9 años^{98,99}.

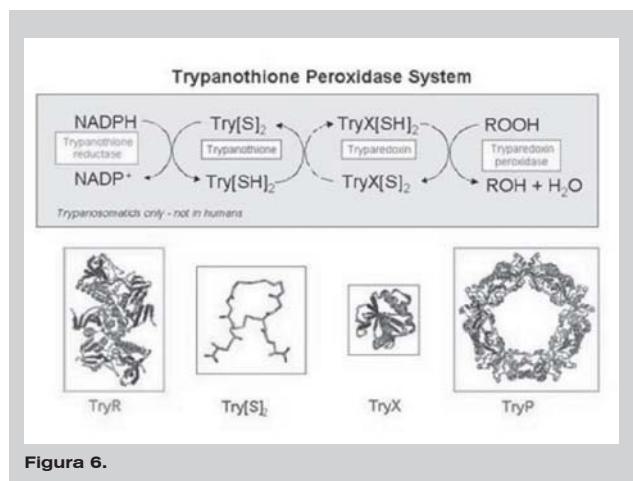


Figura 6.

Freyman y colaboradores¹¹⁵, usando la estructura cristalográfica de la HGPRT del *T.cruzi* en una conformación análoga a la del estado de transición de la reacción y un programa de reconocimiento molecular flexible, identificaron 22 compuestos in silico, 16 de los cuales demostraron ser potentes inhibidores de la HGPRT pura y 8 de ellos efectivos agentes antiproliferativos contra la forma amastigote intracelular del parásito, in vitro¹¹⁵. No se ha probado la actividad de esos compuestos in vivo. *Dado este limitado desarrollo preclínico, el desarrollo clínico de nuevos inhibidores de HGPRT para el tratamiento de la enfermedad de Chagas sólo puede esperarse a largo plazo (10 a 15 años).*

Inhibidores de la síntesis de fosfolípidos

Los análogos de lisofosfolípidos (ALP) incluyen una amplia gama de compuestos metabólicamente estables, entre los cuales se encuentran alquil-fosfocolinas como la hexadecil-fosfocolina (miltefosina) y alquil-glicero-fosfocolinas como el ET-18-OCH₃ (edelfosina) y la ilmo-fosina (Figura 7). Estos compuestos se han desarrollado como agentes anticancerosos¹¹⁶⁻¹¹⁹, pero también han demostrado ser potentes y específicos agentes antiparasitarios, particularmente contra Tripanosomatídeos como *Leishmania* y *T.cruzi*, in vitro e in vivo¹¹⁹. La indicación de estos compuestos para el tratamiento de varias formas de cáncer ha sido limitada por graves efectos adversos a nivel gastrointestinal a las dosis requeridas para lograr eficacia terapéutica¹¹⁶⁻¹¹⁹.

En contraste, la miltefosina usada por vía oral en el tratamiento de la leishmaniasis visceral humana tiene alta eficacia y bajos efectos colaterales, incluso en infecciones causadas por cepas de *L. donovani* resistentes a los antimoniales. Este hallazgo ha sido considerado como uno de los más importantes avances en la quimioterapia antiparasitaria en las últimas décadas¹²⁰⁻¹²⁴. El compuesto ha sido registrado (Impavido®) para el tratamiento etiológico de esta dolencia en India y Alemania, así como de la leishmaniasis cutánea en Colombia^{120,121}.

El mecanismo de acción de estos compuestos es complejo, pero estudios en *T. cruzi* indican que un mecanismo primario es la inhibición selectiva de la síntesis de fosfatidil-colina (PC), que en estos organismos ocurre por una vía metabólica (N-metilación de la fosfatidil-etanolamina o ruta de Brenner-Greenberg) diferente a la usada en mamíferos, donde el precursor es CDP-colina (ruta de Kennedy)¹²⁵⁻¹²⁷. Más recientemente, el mismo mecanismo ha sido confirmado contra *Leishmania donovani*¹²⁸. Ulteriores estudios han demostrado que estos compuestos inducen apoptosis en los parásitos^{129,130}, probablemente secundaria a la inhibición de la síntesis de la PC y esfingomielina^{118,127}. Adicionalmente, se ha demostrado que la inhibición de la síntesis de PC inducida en estos parásitos

por los análogos de fosfolípidos esta acompañada por una marcada alteración en la síntesis de esteroides^{125,126,128} y que su combinación con IBE tiene efectos sinérgicos sobre las formas proliferativas de *T.cruzi*^{125,126}.

Sin embargo, aunque la actividad anti-*Leishmania* de la miltefosina es muy potente y selectiva in vivo, el compuesto es menos eficaz en modelos murinos de enfermedad de Chagas, probablemente por inadecuadas propiedades farmacocinéticas^{119,123}. *En base a esas consideraciones, el desarrollo clínico de análogos de miltefosina para el tratamiento de la enfermedad de Chagas sólo puede esperarse a medio plazo (5-10 años).*

Conclusiones

En los últimos 25 años se ha avanzado de forma importante en nuestro conocimiento de la bioquímica y biología celular del *T.cruzi* y organismos relacionados como el *Trypanosoma brucei* y varios miembros del género *Leishmania*, incluyendo el secuenciamiento del genoma completo de esos organismos¹³¹⁻¹³⁴. Estos logros son producto principalmente del esfuerzo del sector académico, con financiamiento público. En principio pues, todos los posibles blancos quimioterapéuticos en estos parásitos son ahora accesibles, pero en el caso del *T.cruzi* la situación es aún más avanzada pues se han validado varios blancos químicamente, genéticamente o de ambas formas, siendo los mejor caracterizados la biosíntesis de ergosterol, cruzipaina, el metabolismo de pirofosfato y el del tripanotión.

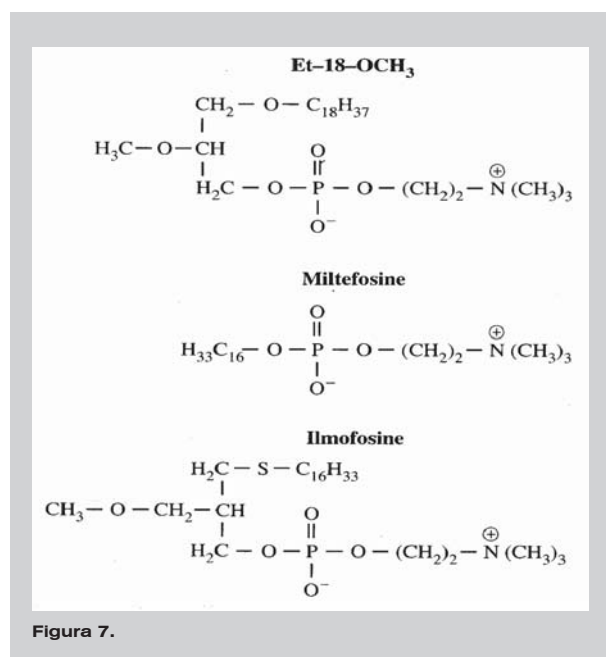


Figura 7.

Aun así, las únicas drogas disponibles actualmente para los pacientes de enfermedad de Chagas siguen siendo las mismas disponibles desde los años 60 y 70 del siglo pasado, con sus bien conocidas limitaciones. La razón de este lento desarrollo de los conocimientos básicos hacia productos farmacéuticos usables reside fundamentalmente en la falta de estímulos económicos para la industria farmacéutica dentro del modelo prevalente de desarrollo de drogas con fines de lucro y de la ausencia, hasta fecha reciente, de modelos alternativos para ese fin. El costo estimado actual para el desarrollo de una droga que alcance el mercado de los países desarrollados es del orden de 800 millones de \$ EUA¹³⁵ y refleja el elevado número de fracasos en el desarrollo de compuestos candidatos a drogas (particularmente en las pruebas clínicas), los elevados costos inherentes a los sistemas de salud de los países industrializados y el continuo declive de la productividad de esta industria, que ha bajado por más de un orden de magnitud en el último cuarto de siglo¹³⁶.

Para las enfermedades tropicales, que afligen a poblaciones humanas con muy bajos recursos económicos, los resultados de este modelo han sido catastróficos: apenas el 1% de los fármacos registrados en ese mismo período fueron para el tratamiento de dolencias principalmente prevalentes en zonas tropicales¹³⁷⁻¹³⁹ y el 90% de la inversión en investigación y desarrollo en la industria se destina a productos farmacéuticos y cosméticos demandados por el 10% de la población mundial con recursos adecuados o abundantes, lo que es obviamente un fracaso, tanto de la economía de mercado como de las políticas públicas en los países endémicos¹³⁷⁻¹³⁹.

Sin embargo, el costo del desarrollo de medicamentos en países en vías de desarrollo no tiene que ser tan elevado como en los países desarrollados y en reconocimiento de este hecho han surgido en años recientes varias iniciativas para el desarrollo de drogas sin fines de lucro, que reúnen los esfuerzos del sector público y el privado y entre las que se encuentran la Drug for Neglected Diseases initiative (DNDi, www.dndi.org), Medicines for Malaria Venture (MMV, www.mmv.org) y el Institute for One World Health (IOWH, www.oneworldhealth.org), junto al programa de Investigación y Docencia en Enfermedades Tropicales (TDR) de la Organización Mundial de la Salud. Estas iniciativas están desarrollando nuevos modelos para el desarrollo de medicamentos que se apoyan en el sector académico internacional, en alianzas estratégicas con el sector industrial público y privado y en los servicios de salud de los países endémicos, donde los costos de investigación y servicios son mucho más bajos^{122,140}. Tales iniciativas constituyen actualmente la opción más realista para atacar las enormes necesidades de medicamentos en los países en desarrollo.

Bibliografía

1. W.H.O. Control of Chagas Disease. *Technical Reports Series* 2002;905: 1-109.
2. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* 2006;22:583-8.
3. Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi A Jr, Marin-Neto JA, Dantas RO, et al. Evaluation and treatment of chagas disease in the United States: a systematic review. *Jama* 2007;298:2171-81.
4. Maguire JH. Chagas' disease--can we stop the deaths? *N Engl J Med* 2006;355:760-1.
5. Chagas' disease--an epidemic that can no longer be ignored. *Lancet* 2006;368:619.
6. Riera C, Guarro A, Kassab HE, Jorba JM, Castro M, Angrill R, et al. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Europe (Spain): a case report. *Am J Trop Med Hyg* 2006;75:1078-81.
7. Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 1997;114:103-10.
8. Tarleton RL. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol* 2001;31:550-4.
9. Cançado JR. Criteria of Chagas disease cure. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94(Sup.1):331-6.
10. Tarleton RL, Zhang, L. Chagas disease ethiology: Autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today* 1999;15:94-9.
11. Kaili J, Cunha-Neto E. Autoimmunity in Chagas Disease Cardiomyopathy: Fulfilling the Criteria at Last? *Parasitol Today* 1996;12:396-9.
12. Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N, et al. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: Biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci (U.S.A.)* 1995;92:3541-5.
13. Engman DM, Leon JS. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta Tropica* 2002;81:123-32.
14. Leon JS, Engman DM. The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease. *Front Biosci* 2003;8:e315-322.
15. Urbina JA. Parasitological Cure of Chagas Disease: Is it Possible?, Is it Relevant? *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94:Sup.1:349-55.
16. Urbina JA, Docampo R. Specific Chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology* 2003;19:495-501.
17. Marin-Neto JA, Cunha-Neto E, Maciel BC, Simoes MV. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. *Circulation* 2007;115:1109-23.
18. Schijman AG, Vigliano CA, Viotti RJ, Burgos JM, Brandariz S, Lococo BE, et al. *Trypanosoma cruzi* DNA in cardiac lesions of Argentinean patients with end-stage chronic chagas heart disease. *Am J Trop Med Hyg* 2004, 70:210-20.
19. Luquetti AO. Etiological treatment of Chagas disease. The National Health Foundation of Brazil. *Parasitol Today* 1997;13:127-8.
20. Sosa Estani S, Segura EL. Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the undetermined phase. Experience and current guidelines in Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999;94(Sup.1):363-5.
21. Docampo R. Sensitivity of Parasites to Free Radical Damage by Antiparasitic Drugs. *Chem Bio Interactions* 1990;73:1-27.
22. de Andrade ALS, Zicker F, Oliveira RM, Silva SA, Luquetti A, Travassos LR, et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet* 1996;348:1407-1413.
23. de Andrade ALS, Zicker F, Rassi A, Rassi, AG, Oliveira RM, Silva SA, et al. Early electrocardiographic abnormalities in *Trypanosoma cruzi*-seropositive children. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:530-4.
24. Sosa-Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yamportis C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:526-9.
25. Silveira CAN, Castillo E, Castro C. Avaliação do tratamento específico para o *Trypanosoma cruzi* em crianças, na evolução da fase indeterminada. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000;33:191-6.
26. Solari A, Ortiz S, Soto A, Arancibia C, Campillay R, Contreras M, et al. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children with nifurtimox: a 3-year follow-up study. *J Antimicrob Chemother* 2001;48:515-9.

27. Andrade SG, Rassi A, Magalhães JB, Ferrioli Filho F, Luquetti AO. Specific chemotherapy of Chagas' disease: a comparison between the response in patients and experimental animals infected with the same strains. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 1992;86:624-6.
28. Añez N, Carrasco H, Parada H, Crisante G, Rojas A, Fuenmayor C, et al. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg* 1999;60:726-32.
29. Braga MS, Lauria-Pires L, Argañaraz ER, Nascimento RJ, Teixeira ARL. Persistent infections in chronic Chagas disease patients treated with anti-Trypanosoma cruzi nitroderivatives. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2000;42:157-61.
30. Britto C, Silveira C, Cardoso MA, Marques P, Luquetti A, Macedo V, Fernandes O. Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001;96:823-6.
31. Lauria-Pires L, Braga MS, Vexenat AC, Nitz N, Simoes-Barbosa A, Tinoco DL, Teixeira ARL. Progressive chronic Chagas disease ten years after treatment with anti-Trypanosoma cruzi nitroderivatives. *Am J Trop Med Hyg* 2000;63:111-8.
32. Urbina JA. Chemotherapy of Chagas' Disease: The How and The Why. *J Mol Med* 1999;77:332-8.
33. Urbina JA. Chemotherapy of Chagas Disease. *Curr Pharm Design* 2002;8:287-95.
34. Bahia-Oliveira LMG, Gomes JAS, Cançado JR, Ferrari TC, Lemos EM, Luz ZMP, et al. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of Trypanosoma cruzi infection 14-30 years ago. *J Infect Dis* 2000;182:634-8.
35. Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: Clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J* 1994;127:151-62.
36. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med* 2006;144:724-34.
37. Garcia S, Ramos CO, Senra JF, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, et al. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1521-8.
38. Apt W, Arribada A, Zulantay I, Sanchez G, Vargas SL, Rodriguez J. Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the regression and prevention of electrocardiographic abnormalities during 9 years of follow-up. *Ann Trop Med Parasitol* 2003;97:23-9.
39. Apt W, Aguilera X, Arribada A, Pérez C, Miranda C, Sánchez G, et al. Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:133-8.
40. Urbina JA, Payares G, Molina J, Sanoja C, Liendo A, Lazard K, et al. Cure of Short and Long Term Experimental Chagas Disease using D0870. *Science* 1996;273:969-971.
41. Molina J, Urbina JA, Gref R, Brener Z, Rodrigues Junior JM. Cure of experimental Chagas' disease by the bis-triazole D0870 incorporated into 'stealth' polyethyleneglycol-poly(lactide) nanospheres. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:101-4.
42. Molina J, Martins-Filho O, Brener Z, Romanha AJ, Loeberberg D, Urbina JA. Activity of the Triazole Derivative SCH 56592 (Posaconazole) Against Drug-Resistant Strains of the Protozoan Parasite Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi in Immunocompetent and Immunosuppressed Murine Hosts. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:150-5.
43. Ferraz ML, Gazzinelli RT, Alves RO, Urbina JA, Romanha AJ. The Anti-Trypanosoma cruzi Activity of Posaconazole in a Murine Model of Acute Chagas' Disease Is Less Dependent on Gamma Interferon than That of Benznidazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1359-64.
44. Silva DT, de Meirelles Mde N, Almeida D, Urbina JA, Pereira MC. Cytoskeleton reassembly in cardiomyocytes infected by Trypanosoma cruzi is triggered by treatment with ergosterol biosynthesis inhibitors. *Int J Antimicrob Agents* 2006;27:530-7.
45. Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* 2003;19:495-501.
46. Aperis G, Mylonakis E. Newer triazole antifungal agents: pharmacology, spectrum, clinical efficacy and limitations. *Expert Opin Investig Drugs* 2006;15:579-602.
47. Ullmann AJ, Cornely OA, Burchardt A, Hachem R, Kontoyiannis DP, Topelt K, et al. Pharmacokinetics, safety, and efficacy of posaconazole in patients with persistent febrile neutropenia or refractory invasive fungal infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:658-66.
48. Greenberg RN, Mullane K, van Burik JA, Raad I, Abzug MJ, Anstead G, et al. Posaconazole as salvage therapy for zygomycosis. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:126-33.
49. Gubbins PO, Krishna G, Sansone-Parsons A, Penzak SR, Dong L, Martinho M, Anaissie EJ. Pharmacokinetics and safety of oral posaconazole in neutropenic stem cell transplant recipients. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:1993-9.
50. Raad II, Graybill JR, Bustamante AB, Cornely OA, Gaona-Flores V, Afif C, et al. Safety of long-term oral posaconazole use in the treatment of refractory invasive fungal infections. *Clin Infect Dis* 2006;42:1726-34.
51. Gilman AL, Serrano A, Skelley J, Zwick D. Successful treatment of pulmonary zygomycosis with posaconazole in a recipient of a haploidentical donor stem cell transplant. *Pediatr Blood Cancer* 2006;47:959-63.
52. Vehreschild JJ, Kruger K, Kurzai O, Wickenhauser C, Behringer K, Tox U, Cornely O A. Salvage therapy of refractory chronic disseminated candidiasis in a patient with acute myeloid leukaemia and secondary prophylaxis during allogeneic stem cell transplantation. *Mycoses* 2006;49 Suppl 1:42-7.
53. Negroni R, Helou SH, Petri N, Robles AM, Arechavala A, Bianchi MH. Case study: posaconazole treatment of disseminated phaeoophomycosis due to Exophiala spinifera. *Clin Infect Dis* 2004;38:e15-20.
54. Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Molina J, Lira R, Brener Z, Romanha AJ. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant Trypanosoma cruzi strains. *Intern J Antimicrob Agents* 2003;21:39-48.
55. Corrales M, Cardozo R, Segura MA, Urbina JA, Basombrio MA. Efficacy of TAK-187, a long lasting ergosterol biosynthesis inhibitor, in preventing cardiac damage in a murine model of Chagas disease. A comparative study with benznidazole. *Antimicrob Agents Chemother* 2005, en prensa.
56. Urbina JA, Lira R, Visbal G, Bartolí J. In Vitro Antiproliferative Effects and Mechanism of Action of the New Triazole Derivative UR-9825 Against the Protozoan Parasite Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi. *Antimicrob Agents Chemother* 2000;44:2498-502.
57. Guedes PM, Urbina JA, de Lana M, Afonso LC, Veloso VM, Tafuri WL, et al. Activity of the new triazole derivative albaconazole against Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi in dog hosts. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:4286-92.
58. Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Lira R, Romanha AJ. In vitro and in vivo activities of ravuconazole on Trypanosoma cruzi, the causative agent of Chagas disease. *Intern J Antimicrob Agents* 2003;21:27-38.
59. Corrales M, Cardozo R, Segura MA, Urbina JA, Basombrio MA. Comparative efficacies of TAK-187, a long-lasting ergosterol biosynthesis inhibitor, and benznidazole in preventing cardiac damage in a murine model of Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:1556-60.
60. Andes D, Marchillo K, Stamstad T, Conklin R. In vivo pharmacodynamics of a new triazole, ravuconazole, in a murine candidiasis model. *Antimicrob Agents Chemother* 2003;47:1193-9.
61. Mikamo H, Yin XH, Hayasaki Y, Shimamura Y, Uesugi K, et al. Penetration of ravuconazole, a new triazole antifungal, into rat tissues. *Chemotherapy* 2002;48:7-9.
62. Benaim G, Sanders JM, Garcia-Marchan Y, Colina C, Lira R, Caldera AR, et al. Amiodarone Has Intrinsic Anti-Trypanosoma cruzi Activity and Acts Synergistically with Posaconazole. *J Med Chem* 2006;49:892-9.
63. Gupta SS, Ton VK, Beaudry V, Rulli S, Cunningham K, Rao R. Antifungal activity of amiodarone is mediated by disruption of calcium homeostasis. *J Biol Chem* 2003;278:28831-9.
64. Courchesne WE. Characterization of a novel, broad-based fungicidal activity of the antiarrhythmic drug amiodarone. *J Pharmacol Exper Therapeutics* 2002;300:195-9.

65. Tansey TR, Shechter I. Squalene synthase: structure and regulation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 2001;65:157-95.
66. Menys VC, Durrington PN. Squalene synthase inhibitors. *Br J Pharmacol* 2003;139:881-2.
67. Urbina JA, Concepcion JL, Rangel S, Visbal G, Lira R. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol* 2002;125:35-45.
68. Urbina JA, Concepcion JL, Caldera A, Payares G, Sanoja C, Otomo T, Hiyoshi H. In vitro and in vivo activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2379-87.
69. Ishihara T, Kakuta H, Moritani H, Ugawa T, Yanagisawa I. Synthesis and Biological Evaluation of Quinuclidine Derivatives Incorporating Phenothiazine Moieties as Squalene Synthase Inhibitors. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2004;52:1204-9.
70. Ward WHJ, Holdgate GA, Freeman S, McTaggart F, Girdwood PA, Davidson RG, et al. Inhibition of squalene synthase in vitro by 3-(biphenyl-4-yl)-quinuclidine. *Biochem Pharmacol* 1996;51:1489-501.
71. Goldstein JL, Brown MS. The Cholesterol Quartet. *Science* 2001;292:1310-2.
72. Tacer KF, Haugen TB, Baltsen M, Debeljak N, Rozman D. Tissue-specific transcriptional regulation of the cholesterol biosynthetic pathway leads to accumulation of testis meiosis-activating sterol (T-MAS). *J Lipid Res* 2002;43:82-9.
73. Majdic G, Parvinen M, Bellamine A, Harwood HJ Jr, Ku WW, Waterman MR, Rozman D. Lanosterol 14 α -demethylase (CYP51), NADPH-cytochrome P450 reductase and squalene synthase in spermatogenesis: late spermatids of the rat express proteins needed to synthesize follicular fluid meiosis activating sterol. *J Endocrinol* 2000;166:463-74.
74. Orenes Lorente S, Gomez R, Jimenez C, Cammerer S, Yardley V, de Luca-Fradley K, et al. Biphenylquinuclidines as inhibitors of squalene synthase and growth of parasitic protozoa. *Bioorg Med Chem* 2005;13:3519-29.
75. Sealey-Cardona M, Cammerer S, Ruiz Pérez LM, Gilbert IH, Urbina JA, Gonzalez-Pacanowska D. Kinetic characterization of squalene synthase from *Trypanosoma cruzi*: selective inhibition by quinuclidine derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, en prensa.
76. Buckner FS, Griffin JH, Wilson AJ, Van Voorhis WC. Potent anti-*Trypanosoma cruzi* activities of oxidosqualene cyclase inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1210-5.
77. Buckner FS, Nguyen LN, Joubert BM, Matsuda SP. Cloning and expression of the *Trypanosoma brucei* lanosterol synthase gene. *Mol Biochem Parasitol*. 2000;110: 399-403.
78. Joubert BM, Buckner FS, Matsuda SP. Trypanosome and animal lanosterol synthases use different catalytic motifs. *Org Lett* 2001;14:1957-60.
79. Urbina JA. New chemotherapeutic approaches for the treatment of Chagas disease (American Trypanosomiasis). *Expert Op Ther Pat* 2003;13:661-9.
80. Cazzulo JJ. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Curr Top Med Chem* 2002;2:1261-71.
81. Caffrey CR, Scory S, Steverding D. Cysteine proteinases of trypanosoma parasites: novel targets for chemotherapy. *Curr Drug Targets* 2000;1:155-62.
82. Engel JC, Doyle PS, Hsieh I, McKerrow JH. Cysteine protease inhibitors cure experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* 1998;188:725-34.
83. Barr SC, Warner KL, Kornreic BG, Piscitelli J, Wolfe A, Benet L, et al. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005;49:5160-1.
84. Doyle PS, Zhou YM, Engel JC, McKerrow JH. A cysteine protease inhibitor cures chagas' disease in an immunodeficient-mouse model of infection. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:3932-9.
85. Caffrey CR, Schanz M, Nkemgu-Njinkeng J, Brush M, Hansell E, Cohen FE, et al. Screening of acyl hydrazide proteinase inhibitors for antiparasitic activity against *Trypanosoma brucei*. *Intern J Antimicrob Agents* 2002;19:227-31.
86. Du X, Guo C, Hansell E, Doyle PS, Caffrey CR, Holler TP, et al. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. *J Med Chem* 2002;45:2695-707.
87. Docampo R, Moreno SNJ. The acidocalcisome. *Mol Biochem Parasitol* 2001;33:151-9.
88. Docampo R, de Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol* 2005;3:251-61.
89. Martin MB, Arnold W, Heath HT 3rd, Urbina JA, Oldfield E. Nitrogen-containing Bisphosphonates as Carbocation Transition State Analogs for Isoprenoid Biosynthesis. *Biochem Biophys Res Comm* 1999;263: 754-8.
90. Montalvetti A., Bailey BN, Martin MB, Severin GW, Oldfield E, Docampo R. Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. *J Biol Chem* 2001;276:33930-7.
91. Urbina JA, Concepcion JL, Caldera A, Lira R, Payares G, Sanoja C. In Vitro and In Vivo Activities of ER-27856, a Novel Squalene Synthase Inhibitor, Against *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *ICAAC Abstracts* 2002;42:LB-25-20.
92. Rodan GA, Martin TJ. Therapeutic approaches to bone diseases. *Science* 2000;289:1508-14.
93. Docampo R, Moreno SNJ. Bisphosphonates as chemotherapeutic agents against *Trypanosomatid* and Apicomplexan parasites. *Curr Drug Targets-Infect Disord* 2001;1:51-61.
94. Garzoni LR, Caldera A, Meirelles MNL, de Castro SL, Docampo R, Meints GA, et al. Selective in vitro effects of the farnesyl pyrophosphate synthase inhibitor risedronate on *Trypanosoma cruzi*. *Intern. J. Antimicrob. Agents* 2004;23:273-85.
95. Garzoni LR, Waghbi MC, Baptista MM, de Castro SL, Meirelles MNL, Britto C, et al. Antiparasitic activity of risedronate in a murine model of acute Chagas' disease. *Intern J Antimicrob Agents* 2004;23:286-90.
96. Rodríguez N, Bailey BN, Martin MB, Oldfield E, Urbina JA, Docampo R. Radical cure of experimental cutaneous leishmaniasis by the bisphosphonate pamidronate. *J Infect Dis* 2002;186:138-40.
97. Caceres AJ, Portillo R, Acosta H, Rosales D, Quinones W, Avilan L, et al. Molecular and biochemical characterization of hexokinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 2003;126:251-62.
98. Urbina JA, Crespo A. Regulation of energy metabolism in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes. I. Hexokinase and phosphofructokinase. *Mol Biochem Parasitol* 1984;11:225-39.
99. Racagni GE, Machado de Domenech EE. Characterization of *Trypanosoma cruzi* hexokinase. *Mol Biochem Parasitol* 1983;9:181-8.
100. Sanz-Rodriguez CE, Concepcion JL, Pekarar S, Oldfield E, Urbina JA. Bisphosphonates as inhibitors of trypanosoma cruzi hexokinase: Kinetic and metabolic studies. *J Biol Chem* 2007;282:12377-87.
101. Hudock MP, Sanz-Rodriguez CE, Song Y, Chan JM, Zhang Y, Odeh S, et al. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* Hexokinase by Bisphosphonates. *J Med Chem* 2006;49:215-23.
102. Schmidt A, Krauth-Siegel RL. Enzymes of the trypanothione metabolism as targets for antitrypanosomal drug development. *Curr Top Med Chem* 2002;2:1239-59.
103. Salmon-Chemin L, Buisine E, Yardley V, Kohler S, Debreu MA, Landry V, et al. 2- and 3-substituted 1,4-naphthoquinone derivatives as subversive substrates of trypanothione reductase and lipamide dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: synthesis and correlation between redox cycling activities and in vitro cytotoxicity. *J Med Chem* 2001;44:548-65.
104. Gutierrez-Correa J, Fairlamb AH, Stoppani AO. *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase is inactivated by peroxidase-generated phenothiazine cationic radicals. *Free Radic Res* 2001;34:363-78.
105. Li Z, Fennie MW, Ganem B, Hancock MT, Kobaslija M, Rattendi D, et al. Polyamines with N-(3-phenylpropyl) substituents are effective competitive inhibitors of trypanothione reductase and trypanocidal agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2001;11:251-4.
106. Rivarola HW, Paglini-Oliva PA. *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors: phenothiazines and related compounds modify experimental Chagas' disease evolution. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord* 2002;2:43-52.

107. Rivarola HW, Bustamante JM, Lo Presti S, Fernandez AR, Enders JE, Gea S, *et al.* Trypanosoma cruzi: chemotherapeutic effects of clomipramine in mice infected with an isolate obtained from an endemic area. *Exp Parasitol* 2005;111:80-6.
108. Lo Presti MS, Rivarola HW, Bustamante JM, Fernandez AR, Enders JE, Fretes R, *et al.* Thioridazine treatment prevents cardiopathy in Trypanosoma cruzi infected mice. *Int J Antimicrob Agents* 2004;23:634-6.
109. Rivarola HW, Fernandez AR, Enders JE, Fretes R, Gea S, Paglini-Oliva P. Effects of clomipramine on Trypanosoma cruzi infection in mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2001;95:529-33.
110. Rivarola HW, Fernandez AR, Enders JE, Fretes R, Gea S, Suligoy M. *et al.* Thioridazine treatment modifies the evolution of Trypanosoma cruzi infection in mice. *Ann Trop Med Parasitol* 1999;93:695-702.
111. Stoppani AOM. Quimioterapia de la Enfermedad de Chagas. *Medicina* 1999;59(Supl II):147-65.
112. Lauria-Pires L, de Castro CN, Emanuel A, Prata A. Ineffectiveness of allopurinol in patients in the acute phase Chagas of Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 1988;21:79-0.
113. WHO. Tropical Disease Research. Twelfth Programme Report, UNDP/World Bank/World Health Organization Programme for Research and Training in Tropical Diseases; 0 ed., 1995;129-33.
114. Rassi A, Luquetti AO, Rassi A Jr, Rassi GG, Rassi SG, Da Silva IG, Rassi AG. Specific treatment for Trypanosoma cruzi: lack of efficacy of allopurinol in the human chronic phase of Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg* 2007;76:58-61.
115. Freymann DM, Wenck MA, Engel JC, Feng J, Focia PJ, Eakin AE, Craig SP. Efficient incorporation of inhibitors targeting the closed active site conformation of HPRT from Trypanosoma cruzi. *Chem Biol* 2000;7:957-68.
116. Ruitter GA, Verheij M, Zerp SF, van Blitterswijk WJ. Alkyl-lysophospholipids as anticancer agents and enhancers of radiation-induced apoptosis. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001;49:415-9.
117. Unger C, Fleer EA, Kotting J, Neumuller W, Eibl H. Antitumoral activity of alkylphosphocholines and analogues in human leukemia cell lines. *Prog Exp Tumor Res* 1992;34:25-32.
118. Wieder T, Reutter W, Orfanos CE, Geilen CC. Mechanisms of action of phospholipid analogs as anticancer compounds. *Prog Lipid Res* 1999;38:249-59.
119. de Castro SL, Santa-Rita RM, Urbina JA, Croft SL. Antiprotozoal lysophospholipid analogues: a comparison of their activity against trypanosomatid parasites and tumor cells. *Mini Rev Med Chem* 2004;4:141-51.
120. Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Bhattacharya SK, Rai M. Oral miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006;100 S1:S26-33.
121. Bhattacharya SK, Jha TK, Sundar S, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, *et al.* Efficacy and tolerability of miltefosine for childhood visceral leishmaniasis in India. *Clin Infect Dis* 2004;38:217-21.
122. Croft SL, Barrett MP, Urbina JA. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitol* 2005;21:508-12.
123. Croft SL, Seifert K, Duchene M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. *Mol Biochem Parasitol* 2003;126:165-72.
124. Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* 2003;19:502-8.
125. Lira R, Contreras LM, Rita RM, Urbina JA. Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite Trypanosoma cruzi: potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. *J Antimicrob Chemother* 2001;47:537-46.
126. Santa-Rita RM, Lira R, Barbosa HS, Urbina JA, de Castro SL. Anti-proliferative synergy of lysophospholipid analogues and ketoconazole against Trypanosoma cruzi (Kinetoplastida: Trypanosomatidae): cellular and ultrastructural analysis. *J Antimicrob Chemother* 2005;55:780-4.
127. Urbina JA. Mechanisms of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatid parasites. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006;100(Suppl 1): S9-S16.
128. Rakotomanga M, Blanc S, Gaudin K, Chaminade P, Loiseau PM. Miltefosine affects lipid metabolism in Leishmania donovani promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:1425-30.
129. Verma NK, Dey CS. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of Leishmania donovani. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:3010-5.
130. Paris C, Loiseau PM, Bories C, Breard J. Miltefosine induces apoptosis-like death in Leishmania donovani promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:852-9.
131. El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, *et al.* Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 2005;309:404-9.
132. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN *et al.* The Genome Sequence of Trypanosoma cruzi, Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science* 2005;309:409-15.
133. Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C, Blandin G, Renauld H, Bartholomeu DC, *et al.* The Genome of the African Trypanosome Trypanosoma brucei. *Science* 2005;309:416-22.
134. Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M. *et al.* The Genome of the Kinetoplastid Parasite, Leishmania major. *Science* 2005;309:436-42.
135. Preziosi P. Science, pharmacoeconomics and ethics in drug R&D: a sustainable future scenario? *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:521-6.
136. Booth B, Zimmel R. Prospects for productivity. *Nat Rev Drug Discov* 2004;3:451-6.
137. Pécoul B, Chirac P, Trouiller P, Pinel J. Access to essential drugs in poor countries. A lost battle? *JAMA* 2002;281:361-7.
138. Trouiller P, Olliaro P, Torreele E, Orbinski J, Laing R, Ford N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. *Lancet* 2002;359:2188-94.
139. Trouiller P, Torreele E, Olliaro P, White N, Foster S, Wirth D, Pecoul B. Drugs for neglected diseases: a failure of the market and a public health failure? *Trop Med Int Health* 2001;6:945-51.
140. Morel CM, Acharya T, Broun D, Dangi A, Elias C, Ganguly NK, *et al.* Health innovation networks to help developing countries address neglected diseases. *Science* 2005;309:401-4.