



Investigación traslacional en el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas

Doi: <http://dx.doi.org/10.35954/SM2014.33.1.5>

Dra. Mercedes González^a Dr. Hugo Cerecetto^b

a) Doctora en Farmacia, Prof. Agregada Química Orgánica, Facultad de Ciencias, UdeLaR

b) Doctor en Farmacia, Prof. Titular Química, Facultad de Ciencias, UdeLaR

Resumen

La enfermedad de Chagas es una de las endemias de las regiones tropicales de mayor relevancia a nivel mundial. A pesar que el agente etiológico, el protozoo Trypanosoma cruzi, fue descrito hace más de 100 años no existe en la actualidad un tratamiento farmacológico eficaz contra el microorganismo en su estado parasitario en los tejidos del paciente. Los principios activos descritos para el tratamiento etiológico han probado ser eficientes, más allá de sus relevantes efectos adversos, en la etapa aguda de la enfermedad, donde T. cruzi puede ser localizado en sangre de los pacientes. Sin embargo, la eficacia de estos mismos agentes en la etapa crónica de la enfermedad, donde el parásito se encuentra anidado en los tejidos, no ha sido probada hasta el momento. En este sentido, en los últimos 15 años se han desarrollado una serie de investigaciones traslacionales tendientes a confirmar la eficacia de algunos de estos fármacos en la etapa crónica de la enfermedad. En esta revisión se presentarán los estudios realizados con benznidazol, estudios TRAENA y BENEFIT, y con los agentes antifúngicos posaconazol, estudios CHAGASOL y STOP-CHAGAS, y el pro-fármaco de ravuconazol, E1224.

Palabras clave: ENFERMEDAD DE CHAGAS
INVESTIGACIÓN TRANSLACIONAL
BENZNIDAZOL
POSACONAZOL
RAVUCONAZOL

INTRODUCCIÓN

Casi un sexto de la población mundial sufre de enfermedades olvidadas, que suelen ser enfermedades endémicas de regiones tropicales, zonas remotas y de poblaciones empobrecidas donde los agentes etiológicos prosperan y las personas infectadas no reciben tratamientos eficaces, debido a la falta del medicamento o vacuna adecuados, de hospitales, de equipos médicos o de personal capacitado (1). Este es el caso de la enfermedad de Chagas, o Tripanosomiasis Americana, que se encuentra dentro de las 17 enfermedades olvidadas según la Organización Mundial de la Salud (2).

AGENTE ETIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS: TRYPANOSOMA CRUZI

Los organismos eucariotas unicelulares y parásitos conocidos como tripanosomatídeos, que pertenecen al orden Kinetoplastida y género Trypanosoma, infectan invertebrados, mamíferos y plantas. El ser humano es

afectado por dos tipos de tripanosomiasis de relevancia en la salud, una de ellas es la enfermedad de Chagas, presente en el continente Americano, cuyo agente etiológico es el Trypanosoma cruzi (T. cruzi) y la otra es la enfermedad del sueño, localizada en el continente Africano, siendo Trypanosoma brucei (T. brucei) el tripanosomatídeo responsable. El orden Kinetoplastida también incluye especies del género Leishmania que causan diversas formas de leishmaniosis en países tropicales y subtropicales, incluidas diferentes regiones del continente Americano (3).

El ciclo de vida del agente etiológico de la enfermedad de Chagas, el T. cruzi, incluye fundamentalmente tres estadios, que varían en su morfología, caracterizados por la posición relativa del flagelo, del kinetoplasto y del núcleo, y en la ocurrencia en el vector o en el huésped de los mismos (4). Así, la forma epimastigote es una célula fusiforme con kinetoplasto anterior al núcleo, representando la forma replicativa del parásito en el intestino del triatomíneo, en nuestro país la vinchuca,

Recibido: Junio 2014

Aceptado: Agosto 2014

E-mail de contacto: megonzal@fq.edu.uy, hcerecetto@cin.edu.uy

siendo una forma fácil de mantener en cultivo. Por otro lado, la forma tripomastigote es una célula fusiforme con kinetoplasto subterminal, constituyendo la forma infectiva y se encuentra en el torrente sanguíneo del mamífero, paciente, y en la ampolla rectal del vector. Finalmente la forma amastigote es una célula redondeada sin un flagelo emergente, encontrándose dentro de la célula del mamífero donde se multiplica, principalmente por fisión binaria, y produce la ruptura de la célula hospedera, liberándose tripomastigotes hacia el torrente sanguíneo los que nuevamente invaden cualquier célula nucleada del huésped (5,6).

LA ENFERMEDAD

La infección por el protozoario *T. cruzi* puede darse por diferentes vías. La más frecuente es la infección vectorial, por la contaminación con las heces ricas en tripomastigotes que el insecto deposita sobre la piel del mamífero inmediatamente luego de la picadura (7). No menos relevantes han sido las descripciones de infección: por transfusiones con sangre infectada, de la madre infectada al hijo en el momento del parto, por el consumo de alimentos contaminados con insectos vectores o sus heces, por la manipulación inadecuada de órganos, tejidos o muestras biológicas que contienen al parásito (8).

La enfermedad comienza usualmente como una infección aguda seguida de un proceso inflamatorio crónico que causa, en aproximadamente la cuarta parte de los pacientes, daños en el sistema nervioso autónomo del corazón y del intestino.

La enfermedad tiene altos índices de morbilidad para el enfermo crónico y han sido descritos casos de muerte súbita o infección aguda intensa en países como Colombia y Venezuela. Aunque esta distribución geográfica parece alejarse de nuestro país, en el año 1939, fue descrito el primer caso de infección aguda y muerte por el Dr. Tállice (9).

ENFERMEDAD DE CHAGAS EN EL MUNDO

Se estima que aproximadamente 8 millones de personas se encuentran infectadas en Latinoamérica y que cerca de 64 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad en los 21 países donde la enfermedad es endémica (10). Adicionalmente, con los movimientos migratorios la enfermedad ha comenzado

a ser identificada en países no endémicos de América del Norte, Europa, Asia y Australia (11-13).

ENFERMEDAD DE CHAGAS EN EL URUGUAY

En el Uruguay la primera descripción data de 1939 y es resultado del excelente trabajo del Dr. Rodolfo Tállice (14). Desde dicho hallazgo hasta la actualidad los esfuerzos sanitarios para controlar la endemia han sido muchos, mejora en la calidad de las viviendas, tamizajes en bancos de sangre, erradicación del insecto vector domiciliario (*Triatoma infestans*) (15). Con estos esfuerzos, la prevalencia de seropositividad ha disminuido en forma importante (16,17) y la descripción de nuevos casos es casi nula.

Unos de los programas más exitosos contra la enfermedad de Chagas ha sido el llevado a cabo por la Organización Panamericana de la Salud y se refiere al uso de insecticidas para la erradicación de *Triatoma infestans* (18). Así, en los países de la región, Chile, Argentina, Brasil y Uruguay, se consiguió una erradicación total o próxima a la totalidad. Sin embargo, aún se encuentran presentes otros vectores en la región (Paraguay, Bolivia y Perú).

ESTRATEGIAS TERAPÉUTICAS EN EL TRATAMIENTO ETIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Ha habido importantes esfuerzos en el desarrollo de vacunas para la enfermedad de Chagas. Sin embargo, con el escenario actual de la enfermedad en el continente Americano, o sea con programas de control vectorial-transfusional exitosos o en vías de serlo, ha sido cuestionado el desarrollo de una vacuna y se ha planteado si no resulta más conveniente invertir esfuerzos en el desarrollo de agentes inmunoterapéuticos para animales domésticos o peri-domésticos, que son los potenciales reservorios del protozoario (19). Mientras que por otro lado, se plantea que vacunas inmunoterapéuticas podrían ser una alternativa para mejorar la prognosis de la enfermedad en pacientes crónicos (20). En este sentido, ha habido un importante trabajo con antígenos atenuados provenientes de cultivos de la forma epimastigote, con cultivos con parásitos muertos de la forma tripomastigote, con fracciones subcelulares y con antígenos celulares o de la superficie celular purificados de *T. cruzi* u otros tripanosomátidos (21). Recientemente se han estudiado vacunas de ADN, el uso de ciertos

antígenos a proteínas de *T. cruzi*, por ejemplo cruzipaina (22) o trans-sialidasa de *T. cruzi* (23), o la búsqueda de vacunas activas por vía oral o en mucosas. Así, se ha demostrado que vacunas de ADN, donde genes de superficie de *T. cruzi* son insertados en un plásmido que estimulan la inmunidad de tipo 1 (24-28), producen protección total contra cepas virulentas de *T. cruzi* y son, en principio, capaces de producir antígenos durante toda la vida del individuo vacunado (29). Todos los intentos de vacunas realizados lamentablemente no producen efectos protectivos frente a una infección por *T. cruzi*, esterilidad inmunológica, eventualmente favorecen la supervivencia o previenen la muerte de los animales expuestos a cepas virulentas del parásito.

Por otro lado, las herramientas farmacológicas para el tratamiento etiológico han estado centradas principalmente en dos medicamentos, Lampit®, recientemente discontinuado por el laboratorio Bayer, donde el principio activo es nifurtimox (Figura 1) y Rochagan®, cuya patente fue cedida por el laboratorio Roche al gobierno Brasileiro y es actualmente producido por el laboratorio LAFEPE en Brasil, donde el principio activo es benznidazole (Figura 1). Estos principios activos fueron descubiertos empíricamente hace más de cuatro décadas (30), comienzos de la década del 60, y liberados al mercado sin ciertos ensayos pre-clínicos y clínicos habitualmente exigidos por los organismos reguladores de medicamentos. El uso de estos medicamentos en la fase aguda de la enfermedad está ampliamente aceptado y ha demostrado ser exitoso, sin embargo la eficacia en la fase crónica es aún controversial. Actualmente, estudios traslacionales con ambos principios activos se están llevando a cabo para confirmar la eficacia en la etapa crónica de la enfermedad de Chagas o para ser utilizados en otras tripanosomiasis. Estos estudios serán descritos en las secciones siguientes.

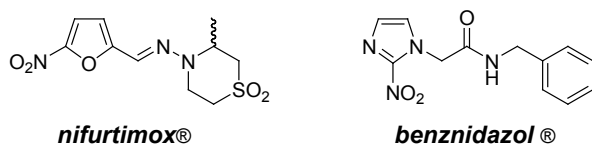


Figura 1. Estructura química de los principios activos que componen los medicamentos empleados actualmente en la enfermedad de Chagas

Por otro lado, un número significativo de candidatos a fármacos ha sido sometido a estudios subsiguientes de la fase “prototipo-líder” y también son actualmente

estudio de investigación traslacional (31). En este sentido los principios activos de mayor relevancia son los inhibidores de la biosíntesis de ergosterol, derivados de triazol, posaconazol y ravuconazol (Figura 2), descritos primariamente como agentes antifúngicos (32). Actualmente, estudios traslacionales con ambos principios activos se están llevando a cabo para confirmar la eficacia en la enfermedad de Chagas. Estos estudios serán descritos en las secciones siguientes.

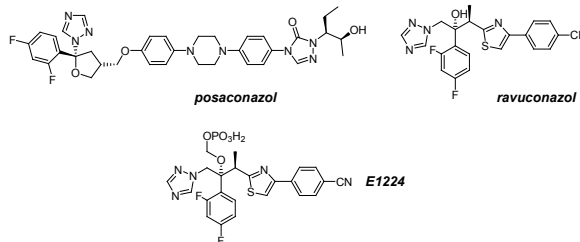


Figura 2. Estructura química de agentes antifúngicos con los que se están llevando a cabo estudios traslacionales para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas.

INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL

La investigación traslacional surge ante la necesidad de acortar la distancia entre la investigación básica y la investigación clínica. Si bien el conocimiento biomédico básico ha crecido enormemente, en referencia a los mecanismos de los procesos biológicos y de los principios activos, esto no se ha traducido en el incremento de nuevas estrategias en la práctica clínica y terapéutica (33). Por otro lado, ni los estudios de laboratorio, ni los ensayos clínicos fase I reflejan el estado real de los pacientes para poder predecir la eficacia y seguridad de un nuevo tratamiento. En este contexto surge el concepto de la investigación o la medicina traslacional como la investigación que facilita la transición de la investigación básica en aplicaciones clínicas que benefician la salud (34). Es así, que el National Institute of Health de los Estados Unidos ha reorientado su financiación destinando más de 10.000 millones de dólares a los centros de medicina traslacional (35).

En la industria farmacéutica, la expresión investigación traslacional que difiere claramente de investigación aplicada, se refiere al traslado de los conocimientos de la investigación básica a la identificación de principios activos que curen enfermedades, mediante estudios en animales y humanos. La investigación traslacional

es una investigación básica aplicada a las primeras fases del desarrollo de un medicamento, mientras que la investigación aplicada se arraiga principalmente en iniciativas industriales de índole práctica y comercial, no siempre vinculadas a lo clínico.

El objetivo es aplicar con eficiencia el conocimiento químico, de los procesos moleculares, genéticos, celulares y fisiológicos, en la búsqueda de tratamientos eficaces o de técnicas de prevención o diagnóstico, con un enfoque que en inglés se resume en la expresión *from bench to bed-side* (del laboratorio a la cabecera del enfermo).

ESTUDIOS TRASLACIONALES EN EL TRATAMIENTO ETIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

En las siguientes sub-secciones se describirán los estudios traslacionales que se están llevando a cabo en la actualidad, y que por ende aún no poseen resultados finales, con benznidazol, posaconazol y un pro-fármaco de ravuconazol.

TRAENA. ESTUDIO FASE 3

En el año 1999, por iniciativa del Instituto Nacional de Parasitología Dr. M. Fátala Chaben, Buenos Aires-Argentina, comenzó la diagramación de un estudio doble ciego que ha involucrado el tratamiento con benznidazol de cerca de 800 pacientes adultos con enfermedad de Chagas del Departamento de Clínica, Patología y Tratamiento de dicha institución y provenientes de la Ciudad de Buenos Aires y el conurbano bonaerense de la provincia de Buenos Aires, donde no existía transmisión vectorial (36). Este estudio ha sido conocido como TRAENA (TRATamiento EN pacientes Adultos).

TRAENA completó su proceso de selección e inclusión de participantes en el año 2003 realizando una evaluación médica, radiología de tórax, electrocardiograma (37) y eventualmente ecocardiograma. La población en estudio ha estado compuesta por pacientes nacidos en áreas endémicas de Argentina o países vecinos. La población en estudio, de 763 individuos sin tratamiento parasitocida previo, ha sido dividida en dos brazos: 382 participantes han recibido un placebo y 381 han recibido una dosis de benznidazol de 5mg/kg de peso, diariamente y durante 60 días. La eficacia de este principio activo, en comparación con el placebo, ha

sido evaluada considerando: mortalidad total, desarrollo de insuficiencia cardíaca, arritmias severas con compromiso hemodinámico o implante de marcapaso o cardiodesfibrilador, eventos clínicos secundarios como agrandamiento del ventrículo izquierdo detectado por ecocardiograma, nuevo evento de insuficiencia cardíaca y presentación de ACV, serología anti-T. cruzi convencional (c-ELISA), no-convencional (ELISA F294) y carga parasitaria en sangre por PCR en tiempo real (qPCR). El período de seguimiento ha variado entre 7 y 11 años.

Los resultados de TRAENA presentados en 2012 (36) han indicado que benznidazol posee un potencial efecto terapéutico con una negativización parasitológica persistente (23.3 % según lo que sugiere el ELISA F29 y 22.5 % según c-ELISA). Por otro lado, la qPCR, que ha sido positiva en el 83.4 % de los participantes al inicio del estudio, disminuyó al 27.19 % de positividad a los 9-11 años post-tratamiento.

BENEFIT. ESTUDIO FASE 3

En el año 2004, por propuesta del Instituto Dante Pazzanese de São Paulo-Brasil y del Population Health Research Institute de la Mac Master University-Canadá, comenzó el estudio multicéntrico BENEFIT (BENZnidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis Program) (ClinicalTrials.gov identificador: NCT00123916) que involucró el tratamiento con benznidazol de cerca de 3000 pacientes adultos con cardiomiopatía Chagásica de 35 centros localizados en Argentina, Brasil, Bolivia, Colombia y El Salvador (38).

BENEFIT ha sido el primer estudio multicéntrico aleatorizado, doble ciego, sobre los efectos del benznidazol administrado a una dosis de 5 mg/kg de peso, diariamente y durante 60 días, habiendo reclutado 2850 pacientes. Los parámetros utilizados para determinar la eficacia de este principio activo, en comparación con el placebo, han sido: ocurrencia de muerte, paro cardíaco recuperado, taquicardia ventricular sostenida, implantación de marcapaso o desfibrilador, falla cardíaca, infarto, embolismo sistémico o trasplante cardíaco en pacientes de enfermedad de Chagas crónica con compromiso cardíaco. El período de seguimiento ha variado entre 4 y 8 años y los últimos estudios se recogieron a mediados del 2014.

Paralelamente, se ha realizado un estudio denominado

BENEFIT Piloto. Éste ha sido también un estudio aleatorio, doble ciego, sobre los efectos de benznidazol administrado a una dosis de 5 mg/kg de peso diariamente durante 60 días. En este estudio se analizó la carga de *T. cruzi*, en sangre de los pacientes con enfermedad de Chagas crónica con compromiso cardíaco, a través de PCR cuantitativo. Los resultados hasta el momento han mostrado que un 60 % de los pacientes tuvieron PCR positivo (39). Los últimos estudios se recogieron a mediados del 2014.

CHAGASAZOL. ESTUDIO FASE 2

Este es un estudio llevado a cabo en el Hospital Vall d'Hebron de Barcelona-España (CHAGASAZOL, ClinicalTrials.gov identificador: NCT01162967) que involucró el tratamiento con posaconazol de cerca de 80 pacientes adultos con infección crónica por *T. cruzi* (40).

CHAGASAZOL ha sido un ensayo clínico aleatorio sobre la eficacia y seguridad, en comparación con benznidazol, de posaconazol administrado a dos dosis, 400 mg y 100 mg dos veces al día y durante 60 días. Mientras que benznidazol fue administrado a una dosis de 150 mg dos veces al día durante el mismo lapso. La población en estudio fue de 78 individuos. La actividad antiparasitaria del principio activo fue evaluada determinando la presencia de ADN de *T. cruzi* por PCR a tiempo real (rt-PCR). El período de evaluación fue durante el tratamiento y a los 10 meses posteriores al mismo. Adicionalmente, se determinó la absorción de posaconazol en el día 14 del tratamiento.

Los resultados de CHAGASAZOL indicaron que posaconazol posee actividad anti-*T. cruzi* en pacientes con enfermedad de Chagas crónica durante el período del tratamiento, sin embargo, el estudio post-tratamiento indica que el número de fallas en el tratamiento con posaconazol es mayor que para benznidazol (92.6 % y 80 % de fallas para la menor y máximas dosis de posaconazol, respectivamente, frente a 38.5 % de fallas con benznidazol, evidenciado por la reaparición de ADN parasitario en los 10 meses de evaluación post-tratamiento).

Los motivos de la falla de posaconazol podrían estar asociados con una relativamente baja exposición sistémica al principio activo, lo que podría ser incrementado con el aumento de la duración del tratamiento, por ejemplo 90 días, como ha sido descrito

en una cura parasitológica radical de un paciente con enfermedad de Chagas y compromiso inmunológico (41).

STOP-CHAGAS. ESTUDIO FASE 2

Este estudio que se encuentra patrocinado por Merck Sharp & Dohme Corp., es un estudio del uso oral de posaconazol en el tratamiento asintomático de la enfermedad de Chagas crónica (ClinicalTrials.gov identificador: NCT01377480; Argentina, Colombia y México).

En el diseño experimental se prevé (42) un tratamiento de 60 días de individuos dosificados oralmente en forma aleatoria con 400 mg de posaconazol dos veces al día, con un placebo de posaconazol dos veces al día, con 400 mg de posaconazol y 200 mg de benznidazol dos veces al día y con 200 mg de benznidazol y el placebo de posaconazol dos veces al día. La actividad antiparasitaria de los distintos tratamientos se valorará con qPCR a los 120 días post-tratamiento.

El reclutamiento de los individuos se ha completado en noviembre de 2013 y se esperan los primeros resultados del estudio para 2015 (43).

PRUEBA DE CONCEPTO DE E1224 PARA EL TRATAMIENTO DE PACIENTES ADULTOS CON ENFERMEDAD DE CHAGAS. ESTUDIO FASE 2

Este estudio que se encuentra patrocinado por la organización Drugs for Neglected Diseases initiative (44) con la colaboración de Eisai Co. Ltd., es un estudio del uso de E1224, un profármaco del antifúngico ravuconazol, en el tratamiento de pacientes con enfermedad de Chagas crónica indeterminada (ClinicalTrials.gov identificador: NCT01489228; Bolivia) (45). En el diseño experimental se previó un tratamiento de 60 días de individuos dosificados diariamente de forma aleatoria con 400 mg de E1224, 200 mg de E1224, un placebo y 50 mg/kg de peso de benznidazol. Un quinto grupo recibió diariamente 400 mg de E1224 pero durante 30 días. La actividad antiparasitaria de los distintos tratamientos se valoró con qPCR hasta los 10 meses post-tratamiento. Adicionalmente, se incluyeron estudios farmacocinéticos del pro-fármaco.

El reclutamiento de los individuos se completó en julio de 2011 incluyendo 231 participantes de Cochabamba y Tarija, Bolivia. El seguimiento del último paciente se completó en junio de 2013 (43).

Los resultados (43) han indicado que entre el 79 y 91 % de los individuos que recibieron E1224 presentan niveles en el qPCR por debajo del límite de detección, mientras que el 91 % lo presentan aquellos que han sido tratados con benznidazol y sólo el 26 % para los tratados con el placebo. Sin embargo, sólo un 30 % de los individuos que recibieron la mayor dosis de E1224 presentan una negativización sostenida de la parasitemia, frente a un 81 % para el tratamiento con benznidazol. Por otro lado, los efectos adversos en el tratamiento con E1224 fueron sólo ocasionales (menos del 10 % de los individuos ha presentado una elevación transitoria de la enzimas hepáticas en plasma).

OTROS ESTUDIOS TRASLACIONALES EN TRIPANOSOMIASIS

De igual forma nifurtimox (Figura 1), combinado con eflornitina, también ha estado involucrado en un estudio multicentro, aleatorio, de fase III para el tratamiento de pacientes con tripanosomiasis Africana por *Trypanosoma brucei gambiense* (46) (ClinicalTrials.gov identificador: NCT00146627).

CONCLUSIONES

Si bien algunos estudios aún no han sido informados, BENEFIT, STOP-CHAGAS y ensayos con E1224, se puede prever que prontamente la información podrá indicar sobre la eficiencia farmacológica de los principios activos estudiados en los mismos. Lo que obligará a las autoridades sanitarias de la región y al sistema médico de los centros de salud a implementar un plan de acción para el tratamiento de los enfermos en la etapa de mayor morbilidad de la enfermedad, la etapa crónica. Estas acciones farmacológicas, hacia el agente etiológico, deben obligatoriamente combinarse en una forma precisa con fármacos que permitan atenuar o revertir (47): i) las miocardiopatías, empleando diuréticos para los síntomas congestivos, fármacos antiplaquetarios o anticoagulantes para la prevención de los accidentes tromboembólicos y antiarrítmicos; ii) el dolor anginoide; iii) los síntomas digestivos, empleando vasodilatadores.

SUMMARY

Chagas disease is the most relevant worldwide endemic tropical infection. Although the causative agent, the protozoan *Trypanosoma cruzi*, has been described over 100 years ago there is not any effective pharmacological treatment for this

microorganism in its parasitic state in the patient tissues. The active compounds described for the etiological treatment have proven to be efficient beyond their relevant adverse effects in the acute phase of the disease, where *T. cruzi* is located in patient blood. However, the effectiveness of these agents in the chronic phase of the disease, where the parasite is nested in tissues, has been not proven.

In this sense, in the last 15 years, it has developed a series of translational researches tending to confirm the effectiveness of some of these drugs in the chronic phase of Chagas disease.

Herein, we will describe the trials with benznidazole, TRAENA and BENEFIT studies and with the antifungals posaconazole, CHAGAZASOL and STOP-CHAGAS studies, and the pro-drug of ravuconazole, E1224.

KEY WORDS: CHAGAS DISEASE; BENZNIDAZOL; POSACONAZOL; RAVUCONAZOL

BIBLIOGRAFÍA

- (1) The 17 neglected tropical diseases. Disponible en: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/ [Consulta 27/09/2014].
- (2) Drugs for Neglected Diseases. Chagas. Disponible en: <http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/chagas.html> [Consulta 27/09/2014].
- (3) Barret MP, Burchmore RJS, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, Krishna S. The trypanosomiasis. *Lancet* 2003; 362(9394):1469-1480.
- (4) Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA, Chagas disease. *Lancet* 2010; 375(9723):1388-1402.
- (5) Bringaud F, Rivière L, Coustou V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol* 2006;149(1):1-9.
- (6) Elias MC, da Cunha JPC, de Faria FP, Mortara RA, Freymuller E, Schenkman S. Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle. *Protist* 2007;158(2):147-5.
- (7) Sosa-Estanil S, Dri L, Touris C, Abalde S, Dell'Arciprete A, Braunstein J. Transmisión vectorial y congénita del *Trypanosoma cruzi* en Las Lomitas-Formosa. *Medicina (Bs As)*. 2009; 69(4):424-30.
- (8) Alarcón de Noya B, Colmenares C, Ruiz-Guevara R, Díaz-Bello Z, Noya O. La transmisión oral de la enfermedad de Chagas. *Revista Facultad de Medicina* 2010; 33: 78-86.

- (9) Tálce R, Miranda N, Costa R. Primer caso en el país de forma aguda mortal de enfermedad de Chagas (41° caso uruguayo) observado en el departamento de Rivera (Minas de Corrales). *Anales de la Facultad de Medicina (Montevideo)* 1939; 24: 69-78.
- (10) Salvatella R. Una visión de la enfermedad de Chagas desde su propia historia. En: *La enfermedad de Chagas a la puerta de los 100 años del conocimiento de una endemia americana ancestral*. Buenos Aires: Organización Panamericana de la Salud, Fundación Mundo Sano 2007; 19-22.
- (11) Guerri-Guttemberg RA, Guana DR, Ambrosio G, Milei J. Chagasic cardiomyopathy: Europe is not spared! *Eur Heart J* 2008; 29(21):2587-91.
- (12) Schmunis GA. Epidemiology of Chagas Disease in non endemic countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 75-85.
- (13) De Ayala AP, Pérez-Molina JA, Norman F, López Vélez R. Chagasic cardiomyopathy in immigrants from Latin America to Spain. *Emerg Infect Dis* 2009;15(4):607-8.
- (14) Soiza Larrosa A. La enfermedad de Chagas en el Uruguay: el primer hallazgo por Rodolfo Tálce. *Salud Mil* 2013; 32(1):56-64.
- (15) Dias JCP. O controle da doença de Chagas no Brasil, En: Silveira AC, editor. *El control de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur de América. Historia de una iniciativa internacional 1991/2001*, Organización Panamericana de la Salud 2002; 146-250.
- (16) Jannin J, Salvatella R. Estimación cuantitativa de la enfermedad de Chagas en las Américas. Montevideo: Organización Panamericana de la Salud, 2006.
- (17) Alfonso A, Núñez R, Porta L, Gagliano G, Piroto R, Garrone S. Prevalencia de seropositividad para *Trypanosoma cruzi* en donantes de sangre del H.C.F.F. AA, período 2005-2012. Uruguay. *Salud Mil* 2013; 32(1):28-31.
- (18) Salvatella R. El control de la enfermedad de Chagas en Uruguay, En: Silveira AC (Ed.), *El control de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur de América. Historia de una iniciativa internacional 1991/2001*, Organización Panamericana de la Salud. Universidade Federal do Triangulo Mineiro 2002; 301-316.
- (19) Parodi C, Padilla AM, Basombrío MA. Protective immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(Suppl 1):288-94.
- (20) Lannes-Vieira J, de Araújo-Jorge TC, Soeiro MdNC, Gadelha P, Corrêa-Oliveira R. The centennial of the discovery of Chagas disease: Facing the current challenges. *PLoS Negl Trop Dis* 2010; 4(6):e645.
- (21) Camargo EP. Perspectives of vaccination in Chagas disease revisited. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009;104 (Suppl 1):275-80.
- (22) Cazorla SI, Frank FM, Becker PD, Arnaiz M, Mirkin GA, Corral RS, Guzmán CA, Malchiodi EL. Redirection of the immune response to the functional catalytic domain of the cysteine proteinase cruzipain improves protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *J Infect Dis* 2010; 202(1):136-44.
- (23) Giddings OK, Eickhoff CS, Sullivan NL, Hoft DF. Intranasal vaccinations with the trans-sialidase antigen plus CpG adjuvant induce mucosal immunity protective against conjunctival *Trypanosoma cruzi* challenges. *Infect Immun* 2010; 78(3):1333-8.
- (24) Wizel B, Nunes M, Tarleton RL. Identification of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family members as targets of protective CD8+ TC1 responses. *J Immunol* 1997; 159(12):6120-30.
- (25) Wizel B, Garg N, Tarleton RL. Vaccination with trypomastigote surface antigen 1-encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 1998; 66(11):5073-81.
- (26) Costa F, Franchin G, Chioccola VLP, Ribeirão M, Schenkman S, Rodrigues MM. Immunization with a plasmid DNA containing the gene of trans-sialidase reduces *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Vaccine* 1998; 16(8):768-774.
- (27) Boscardin SB, Ramirez MI, Santori F, Yoshida N, Franco da Silveira J. DNA vaccination with a gene that encodes the glycoprotein of 82 kDa (gp82) of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 182.
- (28) Machado A, Cardoso J, Claser C, Rodrigues M, Gazzinelli R, Bruna-Romero O. Long-term protective immunity induced against *Trypanosoma cruzi* infection after vaccination with recombinant adenoviruses

encoding amastigote surface protein-2 and trans-sialidase. *Hum Gene Ther* 2006; 17(9):898-908.

(29) Sanchez-Burgos G, Mezquita-Vega RG, Escobedo-Ortegon J, Ramirez-Sierra MJ, Arjona-Torres A, Ouaiissi A, Rodrigues MM, Dumonteil E. Comparative evaluation of therapeutic DNA vaccines against *Trypanosoma cruzi* in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 50(3):333-41.

(30) Cerecetto H, González M. Chemotherapy of Chagas' disease: status and new developments. *Curr Top Med Chem* 2002; 2(11):1187-213.

(31) Cerecetto H, González M. Synthetic medicinal chemistry in Chagas' disease: Compounds at the final stage of "hit-to-lead" phase. *Pharmaceuticals* 2010; 3:810-838.

(32) Urbina JA. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz* 2009; 104: 311-318.

(33) Bermejo J, Heras M, Segovia J, Alfonso F. Translational cardiovascular medicine. Now or never. *Revista Española de Cardiología (Engl Ed)* 2009; 62: 66-68.

(34) Wehling M. Translational medicine: science or wishful thinking? *J Transl Med* 2008; 6:31.

(35) Zerhoni EA. Translational and clinical science—time for a new vision. *New Eng J Med* 2005; 353:1621-1623.

(36) Riarte A, Velázquez E, Prado N, Schijman AG, Ramírez JC, De Rissio AM, Hernández Y, Esteva M, Luna C, Sinagra A, Ruiz AM. "TRAENA" TRAtamiento EN pacientes Adultos. Una evaluación preliminar de un ensayo clínico aleatorizado con Benznidazol en la enfermedad de Chagas crónica. En: VIII Taller sobre la enfermedad de Chagas importada. Avances en el tratamiento antiparasitario. Esmon Publicidad S.A. 2012; 30-35.

(37) Kuschner E, Sgammini H, Castro R, Evequoz C, Ledesma R, Brunetto J. Evaluation of cardiac function by radioisotopic angiography, in patients with chronic Chagas cardiopathy. *Arq Bras Cardiol* 1985; 45(4):249-56.

(38) Marin-Neto JA, Rassi A, Morillo CA, Avezum A, Connolly SJ, Sosa-Estani S, Rosas F, Yusuf S. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: The BENznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *Am Heart J* 2008; 156(1):37-43.

(39) Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, Melo MF, Lima-Ferreira C, Guhl F, Sosa-Estani S, Marin-Neto JA, Morillo CA, Britto C. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. *Acta Tropica* 2013; 125:23-31.

(40) Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, Pou D, Roure S, Cabezos J, Valerio L, Blanco-Grau A, Sánchez-Montalvá A, Vidal X, Pahissa A. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *New Eng J Med* 2014; 370(20):1899-1908.

(41) Pinazo MJ, Espinosa G, Gállego M, López-Chejade PL, Urbina JA, Gascón J. Successful treatment with posaconazole of a patient with chronic Chagas disease and systemic lupus erythematosus. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82(4):583-7.

(42) A Study of the Use of Oral Posaconazole (POS) in the Treatment of Asymptomatic Chronic Chagas Disease (P05267) (STOP CHAGAS). Disponible en: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01377480> [Consulta 27/09/2014].

(43) Urbina J. Comunicación personal.

(44) 44. First placebo-controlled study in adults with Chagas disease highlights urgent need to scale up treatment for millions of patients at risk. Disponible en: <http://www.dndi.org/> [Consulta 27/09/2014].

(45) 45. Proof-of-Concept Study of E1224 to Treat Adult Patients With Chagas Disease. Disponible en: <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01489228> [Consulta 27/09/2014].

(46) Priotto G, Kasparian S, Mutombo W, Nguouama D, Ghorashian S, Arnold U, Ghabri S, Baudin E, Buard V, Kazadi-Kyanza S, Ilunga M, Mutangala W, Pohlig G, Schmid C, Karunakara U, Torreele E, Kande V. Nifurti-mox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *Lancet* 2009; 374(9683):56-64.

(47) Murcia L, Carrilero B, Saura D, Iborra MA, Segovia M. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 2013; 1(Supl.1): 26-34.