



# Desvelando la Disrupción de la Homeostasis del Ca<sup>2+</sup> en Tripanosomatidos como Blanco Terapéutico contra la Enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis. Reposicionamiento y uso combinado de drogas

Unveiling the disruption of the intracellular Ca<sup>2+</sup> Homeostasis in Trypanosomatids as a Therapeutic Target against Chagas Disease and Leishmaniasis. Repurposing and Drug Combinations

GUSTAVO BENAIM

## Resumen

Los parásitos *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp. generan enfermedades conocidas como enfermedad de Chagas y Leishmaniasis, respectivamente, que representan un grave problema de salud pública a nivel mundial. Los tratamientos para ambas enfermedades presentan problemas de toxicidad e ineffectividad importantes, por lo que es necesario desarrollar tratamientos más eficaces. En nuestro laboratorio hemos venido trabajando en los últimos años en la búsqueda de nuevas drogas con potencial terapéutico contra la enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis, concentrándonos en la reutilización de drogas aprobadas y utilizadas en combinación con otras. Entre las drogas con las que hemos trabajado se encuentran la miltefosina, la amiodarona y sus derivados, la pentamidina, el posaconazol y otros azoles, y el SQ 109. Este último, en Fase III para el tratamiento de la tuberculosis resistente, ha tomado mucha importancia recientemente, ya que es capaz de tener un efecto letal en varios otros organismos parásitarios, incluyendo al *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp. Un denominador común que hemos encontrado en todas estas drogas es que actúan perturbando la homeostasis intracelular del Ca<sup>2+</sup> en estos parásitos. Este hecho es relevante, ya que hemos demostrado que la regulación intracelular de este catión en tripanosomatidos parásitos difiere de manera importante respecto de la de los humanos, lo cual tiene potencial importancia desde el punto de vista terapéutico. En este trabajo revisaremos el efecto de las diferentes drogas mencionadas en cuanto a su acción tripanocida y/o leishmanicida, así como su mecanismo de acción, señalando su efecto sobre la homeostasis intracelular del Ca<sup>2+</sup>.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., Chagas, Leishmaniasis, miltefosina, amiodarona, pentamidina, posaconazol, SQ 109

## Abstract

The parasites *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. cause diseases known as Chagas disease and leishmaniasis, respectively, which represent a serious public health problem worldwide. Treatments for both diseases generate significant problems of toxicity and ineffectiveness, making it necessary to develop more efficient treatments. In our laboratory, we have been working in recent years on the search for new drugs with therapeutic potential against Chagas disease and leishmaniasis, focusing on the repurposing of approved drugs used in combination with others. Among the drugs we have worked with are miltefosine, amiodarone and its derivatives, pentamidine, posaconazole and other azoles, and SQ 109. The latter, in Phase III for the treatment of drug-resistant tuberculosis, has recently gained significant importance, as it is capable of having a lethal effect on several other parasitic organisms, including *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. A common denominator we have found in all these drugs is that they act by disrupting intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis in these parasites. This fact is relevant since we have demonstrated that the intracellular regulation of this cation in parasitic trypanosomatids differs significantly from that in humans, which implies potential therapeutic importance. In this work, we will review the effects of the different drugs mentioned in terms of their trypanocidal and/or leishmanicidal properties and their mechanisms of action, highlighting their impact on intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp., Chagas, Leishmaniasis, miltefosina, amiodarona, pentamidina, posaconazol, SQ 109

Unidad de Señalización Celular y Bioquímica de Parásitos. Instituto de Estudios Avanzados (IDEA). Laboratorio de Biofísica. Instituto de Biología Experimental. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. Correspondencia: gbenaim@gmail.com

Orcid: [0000-0002-9359-5546](https://orcid.org/0000-0002-9359-5546)

DOI: [10.5430/RFFUCV.2025.88.2.4](https://doi.org/10.5430/RFFUCV.2025.88.2.4)

Disponible: [http://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev\\_ff](https://saber.ucv.ve/ojs/index.php/rev_ff)

Recepción: 21/10/2025

Aprobación: 03/11/2025

Rev. Fac. Farmacia 88(2): 138-155. 2025

## Introducción

La enfermedad de Chagas, causada por el protozoo *Trypanosoma cruzi*, es una zoonosis endémica de América Latina, aunque en las últimas décadas ha emergido en otras regiones debido a la migración. Se estima que entre 16 y 18 millones de personas están infectadas en todo el mundo, con una carga importante en países como Bolivia, Argentina, Brasil, México y Venezuela. Actualmente, las drogas disponibles son el nifurtimox y el benznidazol, que presentan un porcentaje de cura estimado del 80% en la fase aguda de la enfermedad, siendo prácticamente ineffectivas en la fase crónica. Por otra parte, la leishmaniasis es reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las enfermedades tropicales más importantes que afectan al hombre, encontrándose difundida en más de 88 países en 4 continentes, con 350 millones de personas en riesgo, 12 millones de casos reportados con un índice aproximado de 2 millones de nuevos casos anuales, así como 57.000 muertes reportadas al año (Alvar y col., 2012; Costa-da-Silva y col., 2022). En el caso particular de la leishmaniasis visceral, se trata de una de las enfermedades tropicales más desatendidas del mundo y afecta principalmente a los países más pobres. Así, con una tasa de mortalidad del 90 % si no se trata, la leishmaniasis visceral es responsable de más de 50.000 muertes y de aproximadamente entre 200.000 y 500.000 nuevos casos de infección cada año, lo que la convierte en la segunda causa de muerte por parásitos en el mundo después de la malaria (Al-Salem y col., 2016).

En Venezuela, la leishmaniasis es endémica y difundida en todos los estados

del país. Aunque la epidemiología no está actualizada en nuestro país, entre 1955 y 2002 el Ministerio de Salud registró cerca de 50.000 casos de leishmaniasis cutánea y más de 2.000 de leishmaniasis visceral. El tratamiento actual en Venezuela se realiza mediante el uso de un antimonial pentavalente (Glucantime), de alta toxicidad, que provoca graves efectos secundarios en los órganos renales, cardíacos y hepáticos.

Los parásitos *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania* spp. generan la enfermedad de Chagas y Leishmaniasis, respectivamente. Los tratamientos quimioterapéuticos actuales aprobados para ambas enfermedades presentan importantes problemas de toxicidad en los pacientes tratados, por lo que es necesario desarrollar tratamientos más eficaces. En nuestro laboratorio, en los últimos años, hemos venido trabajando en la búsqueda de nuevas drogas con potencial terapéutico contra la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis. Nos hemos enfocado, como estrategia, en lo que se ha denominado reposicionamiento o reutilización de drogas, que consiste en intentar redescubrir viejas drogas desarrolladas para el tratamiento de distintas enfermedades, con efecto sobre otros parásitos, en particular sobre tripanosomatídios (Sbaraglini y col., 2016). Este enfoque tiene la ventaja de permitir avanzar más rápidamente en su puesta en el mercado farmacéutico, ya que se evitarían todos los estudios clínicos previos en humanos, considerando que la farmacocinética y la farmacodinámica ya han sido establecidas. Hay muy poca inversión por parte de la industria farmacéutica en estas enfermedades desatendidas, por razones estrictamente económicas. En este sentido, parece racional intentar utilizar drogas, por ejemplo, contra hongos

patógenos, cuya inversión en su desarrollo es mucho mayor, ya que cuentan con un mercado excelente en Europa y en Estados Unidos. Entre las drogas incluidas en la presente revisión se encuentran la miltefosina, la amiodarona y sus derivados, la pentamidina, el posaconazol, el itraconazol y el SQ 109 (Figura 1). Este último, un novedoso compuesto en Fase III para el tratamiento de la tuberculosis resistente, ha tomado mucha importancia recientemente, ya que es capaz de tener un efecto letal en varios otros organismos parásitarios, incluyendo a *Trypanosoma cruzi* (Veigas-Santos y col., 2015), *Leishmania mexicana* (García-García y col., 2016), *L. donovani* (Gil y col., 2020) y *Trichomonas vaginalis* (Guinancio de Souza y col., 2023).

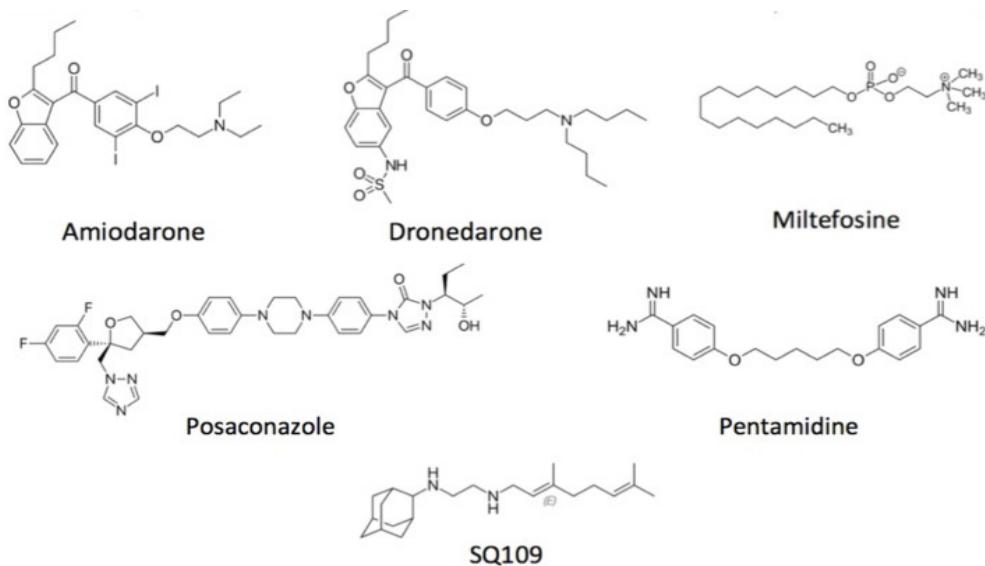
Cabe destacar entre estas drogas a los azoles como Itraconazol y posaconazol, inhibidores de la síntesis de ergosterol (Figura 1), que afectan de una manera similar a diferentes hongos y a los parásitos *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania spp.*, ya que estos patógenos poseen la misma diferencia con respecto a las células de humanos, que es la sustitución del

colesterol en sus membranas por ergosterol (Figura 2), indispensable en el desarrollo del ciclo de vida de estos organismos (Urbina y col., 1998; Benaim y col., 2006).

Algunas de las drogas mencionadas ya han perdido la patente, por lo que resultan muy económicas. Es el caso de la amiodarona (Figuras 1 y 2), un antiarrítmico de amplio uso, el cual tiene un efecto muy potente tanto *In vitro* como *in vivo*, sobre *Trypanosoma cruzi* presentando un marcado efecto sinergístico cuando se combina con el posaconazol (Benaim y col., 2006), y en el caso de *Leishmania mexicana*, cuando se suministra con miltefosina (Serrano y col., 2009b).

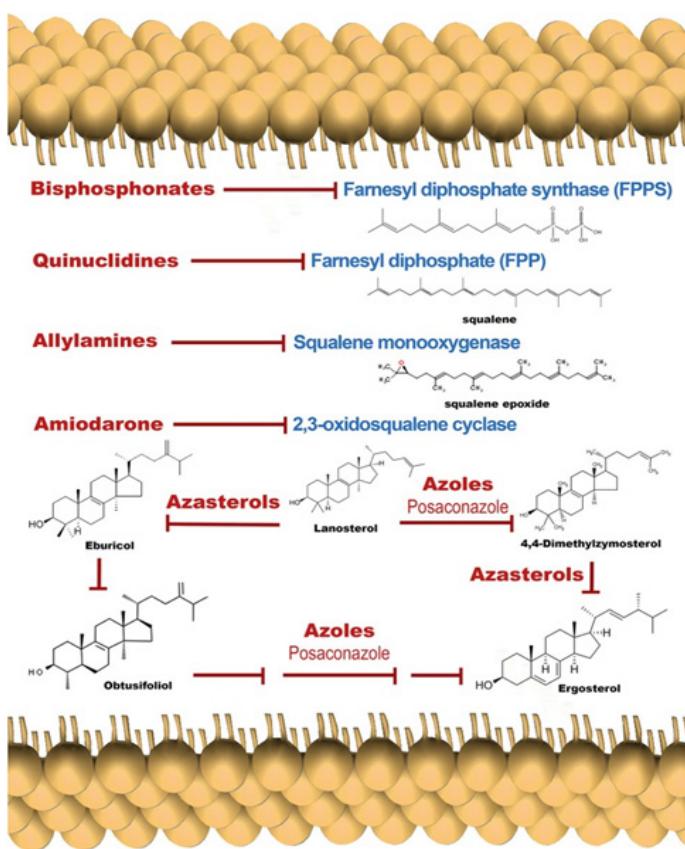
## REGULACIÓN DEL $\text{Ca}^{2+}$ EN TRIPANOSOMATIDIOS

El  $\text{Ca}^{2+}$  desempeña un papel destacado como señal en la regulación de numerosos procesos relacionados con la viabilidad de diferentes tripanosomatidios (Benaim y col., 2020). Por ejemplo, es fundamental en el proceso de invasión de la célula huésped por el parásito (Docampo y Moreno, 1996), así como en la multiplicación y la



**Figura 1.** Estructura de los distintos compuestos discutidos.

Tomado de Benaim y col., 2020, con autorización



**Figura 2.** Esquema de las vías de síntesis del ergosterol, que muestra los sitios de acción de los principales inhibidores. Tomado de Benaim y col., 2020

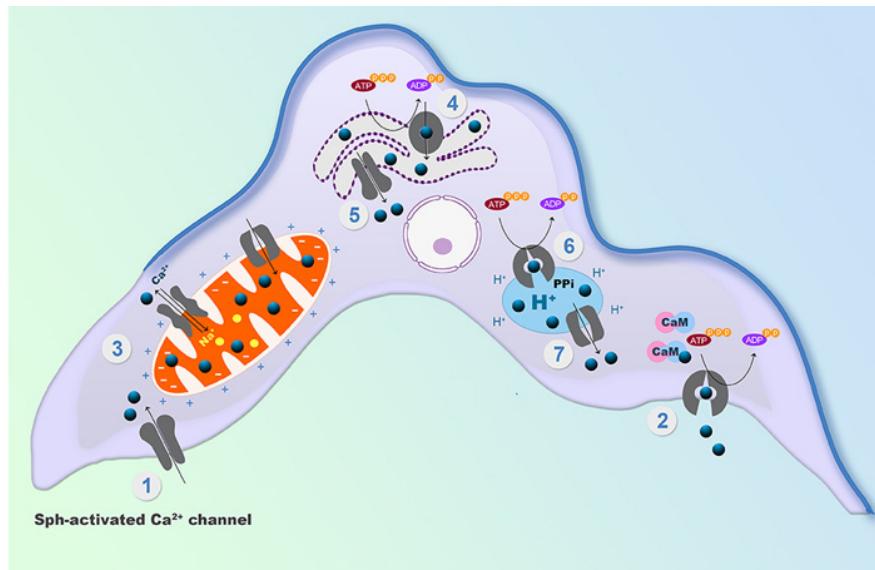
diferenciación de estos parásitos (Lammel y col., 1996) y en el establecimiento de la muerte celular programada o apoptosis (Irigoín y col., 2009). También se ha demostrado su participación directa en la regulación del volumen celular del parásito mediante la osmorregulación (Rohloff y col., 2003), entre otras funciones esenciales para la vida de estos parásitos.

En cuanto a su regulación intracelular (Figura 3) se destacan los acidocalcisosomas, los cuales han sido descritos como organelos acídicos capaces de acumular grandes cantidades de  $\text{Ca}^{2+}$  (Docampo y col., 1995; Docampo y Moreno, 2011; Benaim y García, 2011). También, el mitocondrio único gigante presente en tripanosomatídeos, que ocupa el 12% del

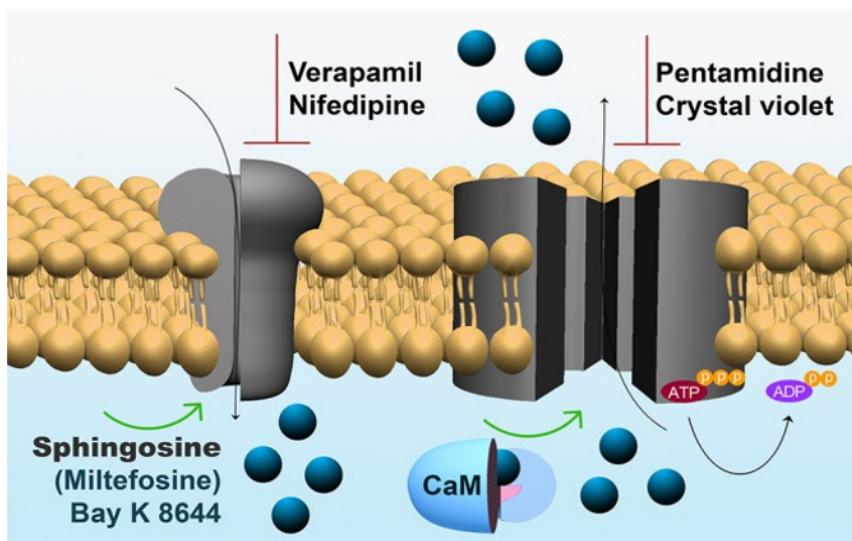
volumen celular (Figura 3) y utiliza la diferencia electroquímica de protones ( $\Delta\Psi_m$ ) existente entre su membrana interna y el interior mitocondrial para acumular  $\text{Ca}^{2+}$  con alta capacidad (Benaim y col., 1990; Docampo y col., 2021). Presenta tanto semejanzas como diferencias respecto a las mitocondrias humanas (Benaim y García, 2011; Docampo y col., 2021). El ADN mitocondrial es tan grande que puede verse con un microscopio simple. Se denomina kinetoplasto y se le atribuye el nombre a toda la familia de los tripanosomatídeos.

Como mecanismo de transporte hacia el exterior celular, estos parásitos presentan una bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  en su membrana plasmática (Figuras 3 y 4), que presenta muchas semejanzas con la PMCA (por sus siglas en inglés, *Plasma Membrane Calcium Pump*) de humanos, como la estimulación por calmodulina, proteína esencial en el papel del  $\text{Ca}^{2+}$  como señalizador universal (Figuras 3 y 4), pero también presenta diferencias fundamentales respecto a la enzima homóloga de humanos (Benaim y Romero, 1990; Benaim y col., 1991; 1993a; 1993b; Pérez-Gordónez y col., 2017).

La calmodulina (CaM) de los trypanosomatídeos merece especial atención, ya que presenta un 11% de diferencia en su composición de aminoácidos con respecto a la CaM de vertebrados (idéntica en todas las especies de este extenso Phylum), a pesar de que las dos poseen 148 aminoácidos. Esto la hace particularmente interesante, por tratarse de una proteína extremadamente bien conservada en términos evolutivos (García-Marchán y col., 2009). Sin embargo,



**Figura 3.** Representación esquemática de los mecanismos implicados en la regulación intracelular del Ca<sup>2+</sup> en los tripanosomatidios. (1) Canal de Ca<sup>2+</sup> activado por esfingosina, responsable de la entrada de Ca<sup>2+</sup> en el parásito. (2) Bomba de Ca<sup>2+</sup> de la membrana plasmática (PMCA) regulada por calmodulina, responsable de la extrusión de Ca<sup>2+</sup>. (3) Uniporte de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial (MCU) e intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> en el mitocondrio único del parásito. (4) Bomba de Ca<sup>2+</sup> tipo "SERCA" en el retículo endoplasmático. (5) Canal de Ca<sup>2+</sup> para la liberación del catión. (6) ATPasa de Ca<sup>2+</sup> de tipo PMCA, responsable de la acumulación de Ca<sup>2+</sup> en los acidocalcisomas, y (7) el receptor de IP<sub>3</sub>, responsable de la liberación de Ca<sup>2+</sup> desde los acidocalcisomas al citoplasma. Tomado de: Benaim y col., 2020, con autorización



**Figura 4.** Modelo expandido de los mecanismos de regulación de Ca<sup>2+</sup> en la membrana plasmática de los tripanosomatidios. *Izquierda:* El canal de Ca<sup>2+</sup> estimulado por esfingosina, donde se representa la activación por la miltefosina y el clásico agonista Bay K 8644, y la inhibición por nifedipina (dihidropiridina) y verapamilo (fenilalkilamina). *Derecha:* La PMCA estimulada por la CaM, donde se muestra su inhibición por pentamidina y por el cristal violeta. Tomado de Benaim y col., 2020, con autorización

las razones de estas notables diferencias no están del todo claras y merecen ser estudiadas (Benaim y García, 2011). Uno de los blancos de la CaM, bastante bien caracterizados en estos parásitos, es la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa de la membrana plasmática (PMCA) (Figuras 3 y 4). La modulación de la PMCA ha sido consistentemente observada en todos los tripanosomatidios estudiados hasta la fecha (Benaim y García, 2011), lo que sugiere un mecanismo de regulación conservado del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular en estos parásitos. Notablemente, esta ATPasa también puede ser activada indistintamente por la calmodulina (CaM) de vertebrados, lo que genera una respuesta bioquímica comparable a la inducida por la CaM autóloga, tanto cualitativa como cuantitativamente. De manera que las grandes diferencias entre estas CaMs no se explican por su acción sobre esta enzima blanco. Por lo tanto, funcionalmente este hecho parece implicar que otra proteína estimulada por CaM aún no identificada en estos parásitos, debería estar presente, explicando así las significativas diferencias evolutivas entre ambas CaMs. Desde una perspectiva terapéutica, este fenómeno representa un punto de interés estratégico, ya que la identificación y caracterización de esta enzima blanco podría permitir el diseño de inhibidores específicos que alteren la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  en el parásito sin afectar las células del hospedador. Con respecto a este punto, el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  que se menciona a continuación podría ser este blanco diferencial, ya que el ortólogo de humanos es regulado por la CaM.

Como mecanismo de entrada del  $\text{Ca}^{2+}$  al interior del citoplasma, se ha determinado que en estos parásitos existe un canal análogo al canal de  $\text{Ca}^{2+}$  sensible al potencial (VGCC tipo L, por sus siglas en inglés) presente en mamíferos (Figuras 3 y 4), pero con notables

diferencias. Entre otras, su sensibilidad al esfingolípido esfingosina y su independencia de voltaje (al menos en *T. cruzi*). Este canal fue identificado primero en *L. mexicana* (Benaim y col., 2013) y, más recientemente, en *T. cruzi*, donde se ha aislado y caracterizado electrofisiológicamente mediante la técnica de *Patch Clamp* (Rodríguez-Duran y col., 2019). También más recientemente ha sido identificado en *T. brucei* (Huang y col., 2025), y en *T. equiperdum* (Perez-Gordones y col., 2024). Este mismo año se realizó un estudio comparativo con el ortólogo de humanos, en el que se explican las dificultades inherentes al descubrimiento de este canal tan elusivo y la posible razón de su activación por miltefosina (Benaim y col., 2025), basándose en la similitud estructural con el principal activador del mismo identificado hasta el presente, la esfingosina.

Se ha demostrado que todas las drogas descritas en este trabajo ejercen su efecto parasitocida, al menos en parte, mediante la perturbación de la homeostasis intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$  en estos organismos. Esta característica ha permitido postular que los mecanismos involucrados en la regulación del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular constituyen un blanco terapéutico muy prometedor para el desarrollo de fármacos contra estas enfermedades parasitarias (Benaim y García, 2011; Benaim y col., 2020). A continuación, presentaremos una descripción de los hechos más destacados de estas drogas en distintos tripanosomatidios.

### **Posaconazol**

El posaconazol se ha mostrado como un fármaco muy prometedor. Es un derivado cuya síntesis está basada en la estructura del Itraconazol, inhibidor de la síntesis de ergosterol (Urbina y col., 1998), resultando

ser 2 órdenes de magnitud más potente que su precursor (Molina y col., 2000). De hecho, ha sido exitoso como tratamiento compasivo al menos en un caso en humanos. Se trató de una paciente argentina en España que presentaba un cuadro crítico de lupus eritematoso sistémico (enfermedad autoinmune). Cuando la paciente fue inmunosuprimida para atenuar los síntomas, desarrolló un Chagas agudo escondido que se exacerbó al inhibirse la respuesta inmune, y el posaconazol permitió la cura del paciente (Pinazo y col., 2010). Existe otro caso de tratamiento exitoso con posaconazol, también en un paciente bajo tratamiento compasivo, pero en este caso, por leishmaniasis cutánea (Paniz-Mondolfi y col., 2011).

A pesar de las grandes expectativas generadas sobre la posibilidad de utilizar este fármaco (aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) como antimicótico de amplio espectro) en la enfermedad de Chagas, los primeros estudios no fueron alentadores. Así, en un ensayo clínico diseñado para evaluar la seguridad y eficacia del posaconazol, del benznidazol y de su combinación para el tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas crónica, denominado "STOP-Chagas", los resultados obtenidos no fueron nada prometedores (Morillo y col., 2017). Aunque el estudio fue muy relevante, varios aspectos del diseño experimental y de la interpretación de los resultados merecen un análisis más detallado. Una explicación muy factible para la falta de actividad antiparasitaria del posaconazol en este ensayo en contraste con la actividad curativa demostrada anteriormente en varios modelos murinos, es que el fármaco se administró en la dosis óptima para humanos en su formulación de suspensión líquida

(400 mg, dos veces al día); las exposiciones sistémicas en humanos a esa dosis son del 10 % al 20 % de las medidas en ratones a la dosis curativa contra *T. cruzi* de 20 mg/kg al día (Urbina, 2017). Esto indica que los pacientes recibieron una dosis insuficiente de posaconazol como tratamiento contra *T. cruzi* (Urbina, 2017). Como reconocieron los investigadores (Morillo y col., 2017), el breve período de seguimiento de un año no permitió evaluar el efecto de los diferentes tratamientos en la evolución clínica a largo plazo de los pacientes, ni sus efectos a corto plazo sobre la carga parasitaria de los pacientes tratados.

### **Amiodarona y sus derivados**

La amiodarona es un antiarrítmico de clase III (Figura 1). Es un fármaco ampliamente utilizado para la restauración y el mantenimiento del ritmo sinusal en pacientes con fibrilación auricular. Actúa bloqueando los canales de potasio ( $K^+$ ), sodio ( $Na^+$ ) y calcio ( $Ca^{2+}$ ), además de ejercer un efecto antagonista sobre los receptores adrenérgicos  $\alpha$  y  $\beta$  (O'Donovan 2006; Nattel y col., 2008). La amiodarona también se ha utilizado como antiarrítmico en el tratamiento de ciertas miocardiopatías chagásicas.

Se ha demostrado que la amiodarona puede inducir la disrupción de la regulación del  $Ca^{2+}$  en *T. cruzi*, alterando el potencial electroquímico mitocondrial (Benaim y col., 2006). Este mismo efecto ha sido observado en *L. mexicana* (Serrano-Martin y col., 2013a).

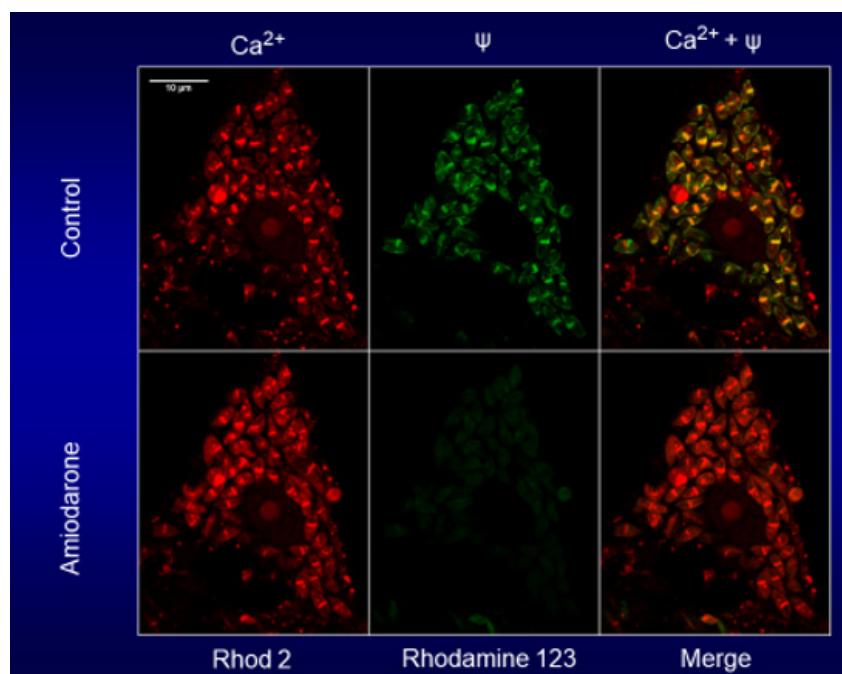
La amiodarona también tiene un marcado efecto sobre *Leishmania mexicana* (Serrano-Martin y col., 2009a), agente causal de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea, y se ha demostrado

que produce alcalinización de los acidocalcisomas de dichos parásitos. Esta perturbación de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  induce su muerte. La amiodarona también puede inhibir la síntesis de ergosterol en estos parásitos. Se ha demostrado que la amiodarona y sus derivados también tienen un marcado efecto sobre otro parásito humano, *Trichomonas vaginalis* (de Souza y col., 2022).

Los resultados con la amiodarona han sido bastante prometedores, no solo en experimentos *in vitro* sobre los parásitos o *in vivo* en ratones, sino también en experimentos realizados con perros infectados naturalmente con la enfermedad de Chagas, un modelo experimental ideal que simula con excelencia, incluyendo el nivel cardíaco, el desarrollo de la enfermedad en humanos (Madigan y col., 2018). En un estudio realizado en Texas y Louisiana, EE. En UU., sobre 121 perros infectados naturalmente con la enfermedad de Chagas, se demostró que la combinación de amiodarona con itraconazol (denominada "amiozol") fue altamente eficaz, produciendo la cura parasitológica en la gran mayoría de los casos tratados (Madigan y col., 2018). En este trabajo se utilizó itraconazol y no posaconazol, a pesar de que, como se mencionó, es más potente que su precursor. Esta decisión se dispuso considerando que el primero ya ha perdido la patente y, por lo tanto, es un fármaco muy económico, al igual que la amiodarona. Estos estudios con perros infectados pavimentan el camino para estudios clínicos en pacientes con enfermedad de Chagas que empleen la misma combinación de fármacos. De hecho, la combinación de amiodarona con itraconazol también ha sido utilizada

en humanos (aunque excepcionalmente como "tratamiento compasivo"), tanto en un caso de enfermedad de Chagas (Paniz-Mondolfi y col., 2009) como en la leishmaniasis (Paniz-Mondolfi y col., 2008), lo cual respalda ampliamente su potencial uso en ensayos clínicos contra estas infecciones.

En la búsqueda de nuevas drogas basadas en la estructura de la amiodarona, la dronedarona, un nuevo compuesto derivado de la amiodarona producida por Sanofi-Aventis, fue aprobada por la FDA como antiarrítmico en el 2009. Este compuesto posee la misma estructura que la amiodarona, con la diferencia de que no presenta los dos átomos de yodo y presenta un carácter menos hidrofóbico, lo que le confiere un perfil de seguridad mejorado y menor toxicidad. Se ha reportado la actividad anti-*T. cruzi* de éste derivado del benzofurano (Benaim y col., 2012; Benaim y Paniz-Mondolfi, 2012), demostrando que presenta un efecto antiproliferativo sobre epimastigotes ( $\text{IC}_{50}$  de 4,9  $\mu\text{M}$ ) y amastigotes en el interior de células de mamífero (células Vero) con un  $\text{IC}_{50} = 0,75 \mu\text{M}$ ), y que la acción sobre epimastigotes está mediada en parte por la alteración de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, a través de la disipación del potencial electroquímico mitocondrial y de la alcalinización de los acidocalcisomas (Figura 5). También se reportó la actividad inhibitoria de la dronedarona sobre *L. mexicana* con una  $\text{IC}_{50}$  de 115 nM sobre promastigotes y un valor correspondiente de 0,65 nM sobre amastigotes (Benaim y col., 2014). Este valor es 1000 veces menor que el observado en amastigotes de *T. cruzi*. Al igual que en este último parásito, la actividad antiparasitaria sobre promastigotes de *L. mexicana*



**Figura 5.** Efectos de la Amiodarona (AMIO) en la homeostasis del Ca<sup>2+</sup> en amastigotes de *T. cruzi*. Células Vero-infectadas fueron doblemente marcadas con Rhod-2 (rojo) y Rhodamina 123 (verde) para visualizar la concentración de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial y el potencial eléctrico transmembrana ( $\Delta\phi_m$ ), respectivamente. (A) Células de control, (B) células tratadas con 12,5  $\mu$ M de AMIO por 20 min. Se observa la drástica reducción del potencial de membrana mitocondrial inducida por AMIO y el correspondiente incremento de la concentración de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático libre en los parásitos. A la derecha se observa la yuxtaposición en la que las mitocondrias de los amastigotes en anaranjado (rojo y verde). Estos efectos no se observaron en las células del hospedador. Tomado de: Benaim y col., 2006, con autorización

está mediada por la alteración del nivel de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático, liberado desde compartimientos intracelulares. Esto se atribuyó a los dos organelos que sirven como almacenes de Ca<sup>2+</sup>: la mitocondria (que resultaba desenergizada) y los acidocalcisomas (en los que se producía su alcalinización) tras la exposición de los promastigotes a 115 nM de dronedarona. Es importante recordar que estos dos organelos están directamente relacionados, además, con la bioenergética de estos parásitos, conjuntamente con su participación directa en la regulación de la concentración del Ca<sup>2+</sup> intracelular ( $[Ca^{2+}]_i$ ). Por otra parte, se demostró que la

dronedarona, al igual que su predecesor, es capaz de inhibir la biosíntesis de ergosterol en *L. mexicana*, también a nivel de la oxidoescualeno ciclase (Benaim y col., 2014), lo que explica su potente efecto sobre esos parásitos.

Se ha demostrado que derivados de benzofuranos basados en la estructura de la amiodarona, específicamente un compuesto denominado Amioder, presentan excelentes resultados potenciales frente a estos parásitos (Pinto-Martínez y col., 2018; Martínez-Sotillo y col., 2019; Benaim y col., 2022). Asimismo, se demostró el efecto de la amiodarona, la dronedarona y del Amioder

sobre otro parásito humano, *Trichomonas vaginalis* (de Souza y col., 2022).

También ha sido demostrado que el efecto combinado de la amiodarona con el posaconazol produce un profundo efecto sinérgico, tanto *in vitro*, utilizando macrófagos infectados con amastigotes de *T. cruzi*, como *in vivo* sobre ratones infectados con estos parásitos (Benaim y col., 2006), lo cual apoya fuertemente la mencionada combinación de fármacos, como posible estrategia terapéutica, apoyando además la idea de combinar amiodarona con azoles inhibidores de la síntesis de ergosterol, como es el caso del Amiozol.

### Pentamidina

La pentamidina (4-(5-(4-carbamimidofenoxi) pentoxi benceno carboximidamida), es una diamidina aromática (Figura 1) aprobada para el tratamiento de las infecciones oportunistas causadas por el hongo *Pneumocystis carinii*. Aunque también se ha reportado un importante efecto contra *T. cruzi* y sobre *L. donovani*, causante de la leishmaniasis visceral, la forma mortal de esta infección. La pentamidina se une selectivamente al ADN kinetoplástico de estos parásitos, lo que inhibe su replicación. El uso clínico está limitado por una amplia gama de efectos adversos, entre ellos la toxicidad renal, hepática y cardíaca (Yadagiri y col., 2023). También se ha reportado que el mecanismo de acción de la pentamidina en *Leishmania* spp. se produce mediante la disrupción de la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos (Zhang y col., 2025).

Con respecto a la regulación intracelular del Ca<sup>2+</sup>, se ha demostrado que la pentamidina inhibe selectivamente

la bomba de Ca<sup>2+</sup> de la membrana plasmática (PMCA) del parásito *T. brucei*, causante de la enfermedad del sueño o tripanosomiasis africana. La pentamidina bloquea la actividad de la ATPasa de la PMCA, impidiendo la conversión de ATP en ADP necesaria para el transporte activo de Ca<sup>2+</sup>, sin inhibir significativamente la PMCA en células de mamífero (es decir, del hospedador), lo que sugiere una diferencia estructural o conformacional aprovechable para el diseño de fármacos selectivos (Benaim y col., 1993).

### SQ-109 y sus derivados

El compuesto SQ109 (N-adamantan-2-il-N'-(E)-3,7-dimetil-octa-2,6-dienil)-etano-1,2-diamina) fue desarrollado originalmente como un agente antimicobacteriano contra *Mycobacterium tuberculosis* multirresistente. Actualmente se encuentra en la fase clínica IIb/III y ha sido objeto de estudios de reposicionamiento para enfermedades parasitarias desatendidas (Sacksteder y col., 2012). Se ha demostrado que tiene un notable efecto *in vitro* sobre cultivos de *T. cruzi* (Veigas-Santos y col., 2015), *L. mexicana* (García-García y col., 2016) y *L. donovani* (Gil y col., 2020). En todos estos casos se demostró un efecto directo de esta droga sobre la mitocondria y los acidocalcisomas de estos parásitos, lo que conlleva una elevación de la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> en estos organismos (Benaim y col., 2021).

Se sintetizaron 18 derivados del SQ109, demostrándose un potente efecto de algunos de ellos tanto sobre *Mycobacterium tuberculosis* como sobre varias especies de *Trypanosoma* y *Leishmania* (Stampolaki y col., 2023).

Sin embargo, uno de los hallazgos más interesantes de este trabajo es el efecto de uno de los derivados obtenidos sobre el parásito responsable de la malaria, *Plasmodium falciparum* (Stampolaki y col., 2023). No obstante, esta ambigüedad respecto del efecto de ciertos compuestos capaces de actuar simultáneamente sobre varios parásitos parece ser bastante frecuente (Gutiérrez y col., 2023).

En un estudio muy reciente, con uno de los derivados obtenidos a partir de SQ109, se observó un efecto notable sobre *L. mexicana*, disminuyendo el IC<sub>50</sub> frente a amastigotes (fase clínicamente relevante) en tres órdenes de magnitud con respecto al valor obtenido frente a promastigotes (1,7 nM vs. 1,6 μM), y, simultáneamente, una menor toxicidad sobre macrófagos (~61 μM). Estos dos efectos combinados resultan en un índice de selectividad sorprendentemente alto para este derivado (Pandey y col., 2025), denominado MeSQ109, ya que, a diferencia de su precursor, solo presenta una metilación muy cercana al grupo adamantilo. Estos hallazgos también demuestran la importancia de desarrollar derivados a partir de la modificación química de nuevas drogas exitosas, ya que pequeños cambios en la estructura de la molécula original pueden derivar en nuevos compuestos con ventajas terapéuticas superiores.

### Miltefosina

La miltefosina, un alquil lisofosfolípido, fue utilizada originalmente para el tratamiento del cáncer de mama. Posteriormente, se ha utilizado con mucho éxito en la leishmaniasis visceral (Dorlo y col., 2012; Croft y col., 2003; de

Castro y col., 2004). Actualmente es la única droga aprobada como terapia oral para esta enfermedad (Croft y col., 2003; Croft y Engels, 2006; Urbina, 2006). Sin embargo, presenta algunas desventajas importantes, como su efecto teratogénico notable, por lo que no puede usarse en mujeres embarazadas o con sospechas de embarazo. También se ha reportado que induce resistencia en ciertos pacientes. A pesar de lo anterior, la miltefosina se considera una excelente alternativa para el tratamiento de la leishmaniasis.

En este sentido, es importante mencionar que estudios *in vivo* en modelos murinos infectados con *L. mexicana* han demostrado que la administración simultánea de miltefosina y amiodarona produce un efecto sinérgico que se traduce en una cura parasitológica del 90% (Serrano-Martín et al., 2009b). Este resultado fue validado mediante PCR directa sobre ADN extraído de las lesiones cutáneas, lo que confiere alta sensibilidad y especificidad al seguimiento terapéutico.

El mecanismo de acción postulado originalmente es la inhibición de la síntesis de fosfatidilcolina (Lira y col., 2001; Urbina, 2006), aunado a la perturbación del metabolismo de los esfingolipidos y los esteroles (Rakotomanda y col., 2007; Armitage y col., 2018). Otro efecto importante reportado para esta droga se relaciona con la inducción del proceso apoptótico, que conduce a la muerte de los parásitos. Por ejemplo, en *L. donovani* se ha demostrado que la miltefosina induce la condensación y la fragmentación del ADN, así como otras características asociadas a este proceso (Verma y Dey, 2004). Otro blanco esencial de este fármaco es el único mitocondrion presente en estos parásitos. En un trabajo pionero

se demostró que la miltefosina disminuye el consumo de oxígeno, simultáneamente con la reducción del complejo enzimático mitocondrial citocromo c-oxidasa (Luque-Ortega y Rivas, 2007), alterando la bioenergética del parásito al afectar su principal productor de energía.

A pesar de todas estas evidencias y varias otras relacionadas (Benaim y Paniz-Mondolfi, 2024), se ha demostrado más recientemente que el mecanismo de acción de la miltefosina, está más relacionado con la perturbación de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  del parásito, actuando sobre varios sistemas bioenergéticos y regulatorios de la concentración intracelular del  $\text{Ca}^{2+}$ , como la mitocondria y los acidocalcisosomas (Pinto-Martínez y col., 2018). Más importante aún, se ha demostrado que la miltefosina sustituye a la esfingosina en la inducción de la apertura del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de la membrana plasmática (Figuras 3 y 4). Este hecho no es de extrañar si se considera la extraordinaria similitud estructural y funcional, en cuanto a sus parámetros farmacocinéticos, entre ambos compuestos (Figura 6C). Hay que resaltar que la miltefosina es aún más potente en su acción sobre el canal que la misma Sph, ya que tiene un efecto máximo a una concentración de 4  $\mu\text{M}$ , mientras que el esfingolípido activa el canal a una concentración mucho mayor (entre 10 y 20  $\mu\text{M}$ ).

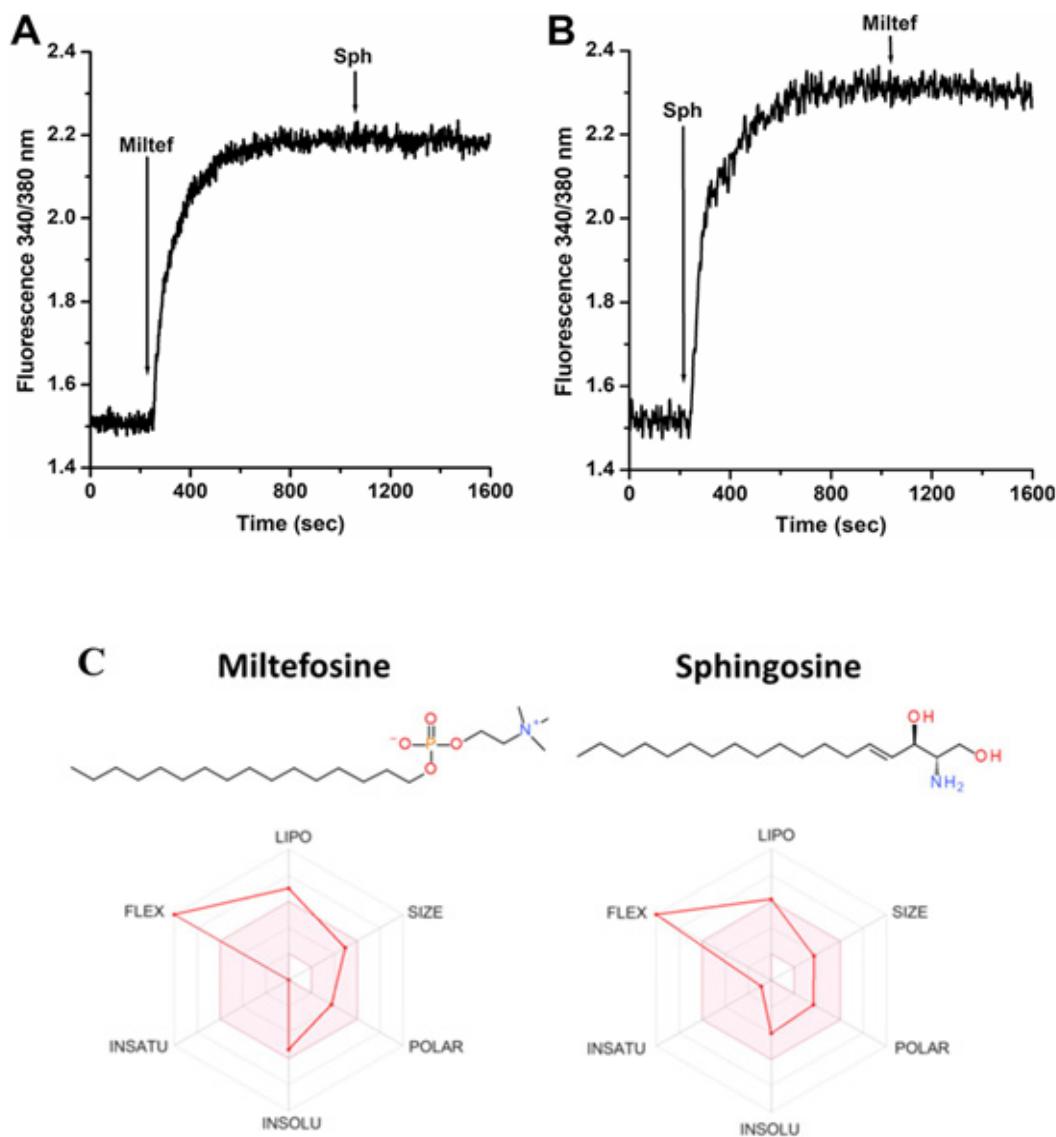
Este efecto de la miltefosina se puede observar en la Figura 6A, donde la inducción de la apertura del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  por este fármaco conlleva una rápida y sostenida elevación de la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , lo que simula perfectamente el efecto observado con Sph (Figura 6B). Estos efectos no son aditivos, lo que indica que ambos compuestos actúan sobre el mismo blanco: el canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de la

membrana plasmática. La entrada masiva de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de este canal conlleva la muerte celular al afectar también los acidocalcisosomas y la mitocondria. Estas evidencias respaldan fuertemente la búsqueda de otras moléculas similares a la Sph y a la miltefosina, capaces de activar la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de este canal, considerando su posible aplicabilidad terapéutica. De hecho, se ha demostrado que un compuesto bastante similar a la miltefosina actúa sobre la leishmaniasis cutánea y visceral y resulta más eficaz que su antecesor. Se trata de la oleifosfocolina, que, al menos en ratones, se ha demostrado como un efecto interesante y muy potente (Van Bocxlaer y col., 2023).

#### EFECTO DE LA MILTEFOSINA SOBRE EL SISTEMA INMUNE

Este punto merece especial atención, considerando que la miltefosina presenta, además de su efecto parasitocida, un complejo efecto pleiotrópico inmunomodulatorio que exacerba notablemente su potencial terapéutico (Benaim y Paniz-Mondolfi, 2024). Esto incluye un notable efecto sobre los macrófagos, en los que la leishmania establece su primer contacto para iniciar la infección. Por lo tanto, una de las poblaciones celulares más importantes en la patogénesis de la leishmaniasis son los macrófagos, que desempeñan un papel central en el establecimiento de la enfermedad.

La interacción entre los macrófagos y la leishmania es fundamental en la patogénesis de la infección, ya que sirve tanto como entorno crucial para la supervivencia, replicación y diferenciación de los parásitos, como defensa de primera línea para su eliminación. Así, en modelos



**Figura 6.** (A y B) Efecto de la miltefosina y la esfingosina (Sph) sobre la concentración de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático en promastigotes del *L. donovani*. Los promastigotes fueron cargados con Fura 2, y los compuestos indicados se añadieron en los puntos indicados por las flechas. (A) Se añadió miltefosina (4 µM) en presencia de 2 mM de CaCl<sub>2</sub> extracelular, seguido de Sph (10 µM). (B) Se añadió Sph (10 µM) y luego miltefosina (4 µM). Datos tomados de Pinto-Martínez y col., 2018, con permiso de la American Society for Microbiology. (C) Análisis de parámetros farmacocinéticos (ADME: Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) de la miltefosina y de la esfingosina. El área roja indica un espacio fisicoquímico adecuado para la bioaccesibilidad oral, obtenido a partir de los parámetros del software Swiss ADME. Lipofilicidad (LIPO): XLOGP3 entre -0,7 y +5; Peso molecular (SIZE): entre 150 y 500 g/mol; Polaridad (POLAR): TPSA entre 20 y 50 Å; Solubilidad (INSOLU): log S (ESOL) entre -6 y 0; Saturación (INSATU): fracción de carbonos en la hibridación sp<sup>3</sup> entre 0,25 y 1; Flexibilidad (FLEX): no más de 9 enlaces rotables. Datos tomados de Benaim y col. (2025)

experimentales de leishmaniasis, los macrófagos desempeñan un papel fundamental en el establecimiento de la infección (Costa-da-Silva y col., 2022).

En este sentido, es importante destacar que los macrófagos presentan versatilidad durante la leishmaniasis, diferenciándose en fenotipos distintos, M1 o M2. Los macrófagos M1 contribuyen al control de la enfermedad mediante la producción de citocinas proinflamatorias, óxido nítrico (NO) y especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que potencia las respuestas Th1 (Carneiro y col., 2016). Esta activación favorece un entorno propicio para combatir la infección. Por otro lado, los macrófagos M2 desempeñan un papel en la progresión de la enfermedad al aumentar la producción de citocinas inmunsupresoras como la IL-10 y el TGF $\beta$ , lo que favorece las respuestas Th2. Esta dualidad en la polarización de los macrófagos subraya su papel central en la coordinación de la respuesta inmunitaria durante la infección por leishmania, lo que influye en el delicado equilibrio entre la supervivencia del parásito y la defensa del huésped (Almeida y col., 2023).

Se ha demostrado que la miltefosina ejerce diversos efectos sobre la homeostasis lipídica de los macrófagos (Iacano y col., 2019), incluida la inhibición del ensamblaje del inflamasoma NLRP3, un componente crucial de la respuesta inmunitaria innata contra la leishmania. Durante la infección, estos parásitos desencadenan la activación del inflamasoma NLRP3 para restringir la replicación intracelular del parásito (Iacano y col., 2019). Curiosamente, la influencia de la miltefosina en la inhibición del ensamblaje del inflamasoma NLRP3 podría afectar a la capacidad del hospedador para montar una defensa eficaz contra

la leishmania. La intrincada interacción entre la miltefosina, la dinámica lipídica de los macrófagos y el inflamasoma NLRP3 pone de relieve la complejidad de la interacción entre el hospedador y el parásito, subrayando el potencial papel de la miltefosina en la modulación de la respuesta inmunitaria durante la infección. Al igual que en el caso de las células NK, los efectos inmunomoduladores de la miltefosina sobre los macrófagos merecen ser explorados más a fondo, ya que pueden ser clave para comprender mejor los mecanismos que subyacen a la resistencia a la miltefosina.

## Conclusiones y Perspectivas

En el presente trabajo presentamos el efecto de diferentes drogas reutilizadas con segundo propósito y de sus combinaciones, con el fin de establecer nuevas estrategias para combatir la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis. Se puede observar que todas las drogas estudiadas coinciden en la perturbación de la homeostasis intracelular del Ca $^{2+}$  de los diferentes parásitos como mecanismo de acción común, al menos parcialmente, lo cual reafirma el concepto que este sistema de regulación es clave para la sobrevivencia del parásito y debe ser observado como un blanco de acción privilegiado, más aun tomando en cuenta que presenta diferencias substanciales con respecto a las células humanas.

En particular, el éxito del tratamiento en perros infectados naturalmente con Chagas, con la combinación de amiodarona e itraconazol (Amiozol), pavimenta el camino para su utilización en humanos en un futuro que esperamos cercano. La aparición de nuevas drogas con alto

potencial terapéutico, como el SQ109 y sus derivados, también plantea nuevas posibilidades terapéuticas que deben considerarse. La miltefosina también destaca, ya que es la única demostrada hasta el presente capaz de producir un incremento notable en la  $[Ca^{2+}]_i$  de los parásitos, al activar el canal de la membrana plasmática, con consecuencias significativas sobre la mitocondria y los acidocalcisosomas, organelos directamente involucrados en la bioenergética de estos parásitos.

## Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el FONACIT (2023PGP315 y 2023PGP099) y CDCH-UCV (Proyecto Grupal 2025).

## Referencias Bibliográficas

- Almeida FS, Vanderley SER, Comberlang FC, Andrade AG, Cavalcante-Silva, LHA, Silva ES Palmeira, PHS, Amaral IPG, Keesen TSL. 2023. Leishmaniasis: Immune cells crosstalk in macrophage polarization. *Trop Med Infect Dis* 8(5):276.
- Al-Salem W, Herricks JR, Hotez PJ. 2016. A review of visceral leishmaniasis during the conflict in South Sudan and the consequences for East African countries. *Parasit Vectors* 9:460.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7: 35671.
- Armitage EG, Alqaisi AQI, Godzien J, Peña I, Mbekeani AJ, Alonso-Herranz V, López-González Á, Martín J, Gábarro R, Denny PW, Barrett MP, Barbas C. 2018. Complex interplay between sphingolipid and sterol metabolism revealed by perturbations to the *Leishmania* metabolome caused by miltefosine. *Antimicrob Agents Chemother* 62:10.
- Benaim G, Bermúdez R, Urbina J. 1990. Ca<sup>2+</sup> transport in isolated mitochondrial vesicles from *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Mol Biochem Parasitol* 39: 61-68.
- Benaim G, Romero PJ, 1990. A calcium pump in plasma membrane vesicles from *Leishmania braziliensis*. *Biochim Biophys Acta* 1027: 79-84.
- Benaim G, Losada S, Gadelha FR, Docampo R. 1991. A calmodulin-activated (Ca<sup>2+</sup>-Mg<sup>2+</sup>)-ATPase is involved in calcium transport by plasma membrane vesicles from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 280: 715-720.
- Benaim G, Cervino V, Hermoso T, Felibert P, Laurentin A. 1993a. Intracellular calcium homeostasis in *Leishmania mexicana*. Identification and characterization of a plasma membrane calmodulin-dependent Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Biol Res* 26: 141-150.
- Benaim G, Lopez-Estraño C, Docampo R, Moreno SNJ. 1993b. A calmodulin-stimulated Ca<sup>2+</sup> pump in plasma membrane vesicles from *Trypanosoma brucei*. Selective inhibition by pentamidine. *Biochem J* 296: 759-763.
- Benaim G, Sanders JM, García-Marchan Y, Colina C, Lira R, Caldera AR, Payares G, Sanoja C, Burgos JM, Leon-Rossell A, Concepcion JL, Schijman AG, Levin M, Oldfield E, Urbina JA. 2006. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconasol. *J Med Chem* 49: 892-899.
- Benaim G, García C. 2011. Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis. *Trop Biomed* 28: 471-481.
- Benaim G, Hernández-Rodríguez V, Mujica S, Plaza-Rojas L, Silva ML, Parra N, García-Marchan Y, Paniz-Mondolfi A, Uzcanga G. 2012. *In vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of dronedarone, a novel amiodarone derivative with an improved safety profile. *Antimicrob Agent Chemother* 56: 3720-3725.
- Benaim G, Paniz-Mondolfi AE. 2012. The Emerging Role of Amiodarone and dronedarone in Treatment of Chronic Chagasic Cardiomyopathy. *Nature Rev Cardiol* 9: 605-609.
- Benaim G, García-Marchán Y, Reyes C, Uzcanga G, Figarella K. 2013. Identification of a sphingosine-sensitive Ca<sup>2+</sup> channel in the plasma membrane of *Leishmania mexicana*. *Biochem Biophys Res Commun* 430:1091-1096.
- Benaim G, Casanova P, Hernández-Rodríguez V, Mujica-González S, Parra-Giménez N, Plaza-Rojas L, Concepción JL, Liu YL, Oldfield E, Paniz-Mondolfi A, Suárez AI. 2014. Dronedarone, an Amiodarone Analog with an Improved Anti-*Leishmania mexicana* Efficacy. *Antimicrob Agents Chemother* 58: 2295-2303.
- Benaim G, Paniz-Mondolfi, Sordillo E M Martinez-Sotillo N. 2020. Disruption of intracellular calcium homeostasis as a therapeutic target

- against *Trypanosoma cruzi*. Frontiers Cell Infect Microbiol 10: 46.
- Benaim G, Paniz-Mondolfi, AE Sordillo EM. 2021. Rationale for Use of Amiodarone and Its Derivatives for Treatment of Chagas' Disease and Leishmaniasis. Curr Pharm Design 27(15):1825-1833.
- Benaim G, Paniz-Mondolfi A. 2024. Unmasking the mechanism behind Miltefosine: Revealing the disruption of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis as a rational therapeutic target in leishmaniasis and Chagas disease. Biomolecules 14: 406.
- Benaim G, Calderón C, Castillo C, Pérez-Gordones MC, Serrano ML. 2025. The discovery of the Sph-gated plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  channel in trypanosomatids. A difficult path for a surprising kind of L-Type VGCC. Biophys Rev 17: 709-722.
- Carneiro PP, Conceição J, Macedo M, Magalhães V, Carvalho EM, Bacellar O. 2016. The Role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. PLoS One 11(2): e0148084.
- Costa-da-Silva AC, Nascimento DO, Ferreira JRM, Guimarães-Pinto K, Freire-de-Lima L, Morrot A, Decote-Ricardo D, Filardi AA, Freire-de-Lima CG. 2022. Immune responses in leishmaniasis: An overview. Trop Med Infect Dis 7(4):54.
- Croft SL, Seifert, K, Duchene M. 2003. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. Mol Biochem Parasitol 126:165–172.
- Croft SL, Engel J. 2006. Miltefosine - Discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. Trans Royal Soc Trop Med Hyg 100S, S4-S8.
- de Castro SL, Santa-Rita, RM, Urbina JA, Croft SL. 2004. Antiprotozoal lysophospholipid analogues: A comparison of their activity against trypanosomatid parasites and tumor cells. Rev Med Chem 4:141-151.
- De Souza TG, Benaim G, de Souza W, Benchimol M. 2022. Effects of amiodarone, amioder, and dronedarone on Trichomonas vaginalis. Parasitol Res 121 (6):1761-1773.
- Docampo R, Moreno SNJ. 1996. The role of  $\text{Ca}^{2+}$  in the process of cell invasion by intracellular parasites. Parasitol Today 12: 61-65.
- Docampo R, Vercesi AE, Huang G, Lander N, Chiurillo MA, Bertolini M. 2021. Mitochondrial  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in trypanosomes. Int Rev Cell Mol Biol 362: 261-289.
- Docampo R, Scott DA, Vercesi AE, Moreno SNJ. 1995. Intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. Biochem J 310: 1005–1012.
- Docampo R, Moreno SNJ. 2011. Acidocalcisomes. Cell Calcium 50: 113-119.
- Dorlo TPC, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ. 2012. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. J Antimicrob Chemother 67: 2576–2597.
- Huang G, Singh H, Singh P, Varshnaya RK, Hamelberg D, Wang B, Docampo R. 2025. Chemical and Genetic Validation of an Essential Calcium Entry Channel of *Trypanosoma brucei* as a Therapeutic Target. ACS Infect Dis 11(6):1741-1752.
- García-García V, Oldfield E, Benaim, G. 2016. Inhibition of *Leishmania mexicana* Growth by the Tuberculosis Drug SQ109. Antimicrob Agent Chemother 60: 6386-6389.
- García-Marchan Y, Sojo F, Rodríguez E, Zerpa N, Malavé C, Galindo-Castro I, Salerno M, Benaim G. 2009. *Trypanosoma cruzi* calmodulin: Cloning, expression and characterization. Exp Parasitol 123: 326-333.
- Gil Z, Martinez-Sotillo N, Pinto-Martinez A, Mejias F, Martinez JC, Galindo-Castro I, Oldfield E, Benaim G. 2020. SQ109 inhibits proliferation of *Leishmania donovani* disrupting the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis collapsing the mitochondrial electrochemical potential ( $\Delta\Psi_m$ ) and affecting acidocalcisomes. Parasitol Res 119: 649-65782.
- Guinancio de Souza T, Benaim G, de Souza W, Benchimol M. 2023. Effects of SQ109 on Trichomonas vaginalis. Exp Parasitol 250: 108549.
- Gutiérrez JE, Ramírez H, Fernández-Moreira E, Acosta ME, Mijares MR, De Sanctis JB, Gurská S, Džubák P, Hajdúch M, Labrador-Fagún L, Stella BG, Díaz-Pérez LJ, Benaim G, Charris JE. 2023. Synthesis, antimarial, antileishmanial, and cytotoxicity activities and preliminary In Silico ADMET studies of 2-(7-Chloroquinolin-4-yl amino) ethyl benzoate derivatives. Pharmaceuticals 16:1709.
- Iacano AJ, Lewis H, Hazen JE, Andro J, Smith JD, Gulshan K. 2019. Miltefosine increases macrophage cholesterol release and inhibits NLRP3-inflammasome assembly and IL-1 $\beta$  release. Sci Rep 9(2019):11128.
- Irigoín F, Inada NM, Fernandes MP, Piacenza L, Gadelha FA, Vercesi AE, Radi R, 2009, Mitochondrial calcium overload triggers complement-dependent superoxide-mediated

- programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 418(3): 595-604.
- Lammel EM, Barbieri MA, Silvina E, Wilkowsky SE, Bertini F, Isola ELD. 1996. *Trypanosoma cruzi*: Involvement of Intracellular Calcium in Multiplication and Differentiation. *Exp Parasitol* 83: 240-249.
- Lira R, Contreras LM, Rita RMS, Urbina JA. 2001. 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* 47:537-546.
- Luque-Ortega JR, Rivas L. 2007. Miltefosine (Hexadecylphosphocholine) inhibits Cytochrome C oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1327-1332.
- Madigan R, Majoy S, Ritter K, Concepción J L, Márquez ME, Silva SC, Zao CL, Pérez-Álvarez A, Rodríguez-Morales A, Mogollón-Mendoza AC, Scot Estep J, Benaim G, Paniz-Mondolfi AE. 2019. Successful treatment of canine Chagas' Disease using combination treatment of Amiodarone and Itraconazole. *J Am Vet Med Assoc* 255: 317-329.
- Martínez-Sotillo N, Pinto-Martínez A, Hejchman E, Benaim G. 2019. Antiproliferative effect of a benzofuran derivative based on the structure of amiodarone on *Leishmania donovani* affecting mitochondria, acidocalcisomes, and intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis. *Parasitol Int* 70:112-117.
- Molina J, Martins-Filho O, Brener Z, Romanha SJ, Loebenberg D, Urbina JA. 2000. Activities 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* 44: 1.
- Morillo CA, Waskin H, Sosa-Estani S, Del Carmen Bangher M, Cuneo C, Milesi R, Mallagray M, Apt W, Beloscar J, Gascon J, Molina I, Echeverria LE, Colombo H, Perez-Molina JA, Wyss F, Meeks B, Bonilla LR, Gao P, Wei B, McCarthy M, Yusuf S; STOP-CHAGAS Investigators. 2017. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic *T. Cruzi* Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. *J Am Coll Cardiol* 69(8):939-947.
- Nattel S, Malajic M, Fermini B, Roy D. 2008. Amiodarone: pharmacology, clinical actions, and relationships between them. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology* 3:266-280.
- Pandey AM, Malwal SR, Valladares-Delgado M, Labrador-Fagúndez L, Stella BG, Diaz-Pérez LJ, Rey-Cibati A, Singh D, Stampolaki M, Hong S, Gennis RB, Kocolouris A, Benaim G, Oldfield E. 2025. Anti-Parasitics with a triple threat: Targeting parasite enzymes, the proton motive force, and host cell-mediated killing. *ACS Infect Dis* 11(6):1539-1551.
- Paniz-Mondolfi AE, Pérez-Álvarez AM, Reyes-Jaimes O, Socorro G, Zerpa O, Slova D, Concepción JL. 2008. Concurrent Chagas' disease and borderline disseminated cutaneous leishmaniasis: The role of amiodarone as an antitrypanosomatidae drug. *Ther Clin Risk Manag* 4:659-663.
- Paniz-Mondolfi A, Pérez-Álvarez AM, Lanza G, Márquez E, Concepción JL. 2009. Amiodarone and itraconazole: a rational therapeutic approach for the treatment of chronic Chagas' disease. *Chemother* 55(4): 228-233.
- Paniz Mondolfi AE, Stavropoulos C, Gelanew T, Loucas E, Perez Alvarez AM, Benaim G, Polsky B, Schoenian G, Sordillo EM. 2011. Successful treatment of Old World cutaneous leishmaniasis due to *L. infantum* with Posaconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 55:1774-1776.
- Pérez-Gordones MC, Ramírez-Iglesias JR, Cervino V, Uzcanga G, Benaim G, Mendoza M. 2017. Evidence of the presence of a calmodulin-sensitive plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-ATPase in *Trypanosoma equiperdum*. *Mol Biochem Parasito* 213:1-11.
- Pérez-Gordones MC, Ramírez-Iglesias JR, Benaim G, Mendoza M. 2024. Molecular, immunological and physiological evidence of a sphingosine-activated plasma membrane Ca<sup>2+</sup>-channel in *Trypanosoma equiperdum*. *Parasitol Res* 123: 166-182.
- Pinazo MJ, Espinosa G, Gállego M, López-Chejade PL, Urbina JA, Gascón J. 2010. Case Report: Successful treatment with posaconazole of a patient with chronic Chagas disease and systemic lupus erythematosus. *Am J Trop Med Hyg* 82: 583-587.
- Pinto-Martinez A, Hernández-Rodríguez V, Rodríguez-Duran J, Hejchman E, Benaim G. 2018. Anti-*Trypanosoma cruzi* action of a new

- benzofuran derivative-based structure. *Exp Parasitol* 189:8-15.
- Pinto-Martínez A, Rodríguez-Durán J, Serrano-Martín X, Hernández-Rodríguez V, Benaim G. 2018. Mechanism of Action of Miltefosine on *Leishmania donovani* Involves the Impairment of Acidocalcisome Function and the Activation of the Sphingosine-Dependent Plasma Membrane  $\text{Ca}^{2+}$  Channel. *Antimicrob Agent Chemother* 62: 1-10.
- Rakotomanga M, Blanc S, Gaudin K, Chaminade P, Loiseau PM. 2007. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 51:1425-1430.
- Rodríguez-Durán J, Pinto-Martínez A, Castillo C, Benaim G. 2019. Identification and Electrophysiological Properties of a Sphingosine-dependent Plasma Membrane  $\text{Ca}^{2+}$  Channel in *Trypanosoma cruzi*. *FEBS J* 286: 3909 – 3925.
- Rohloff P, Rodrigues CP, Docampo R. 2003. Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium. *Mol Biochem Parasitol* 126: 219-230.
- O'Donovan K. 2006. Amiodarone as a class III antiarrhythmic drug. *British J Cardiac Nursing* 1:530-539.
- Sacksteder KA, Protopopova M, Barry CE, Andries K, Nacy CA. 2012. Discovery and development of SQ109: a new antitubercular drug with a novel mechanism of action. *Future Microbiol* 7: 823-837.
- Sbaraglini ML, Vanrell MC, Bellera CL, Benaim G, Carrillo C, Talevi A, Romano PS. 2016. Drug repositioning for neglected tropical protozoan diseases. *Curr Top Med Chem* 16: 2201- 2222.
- Serrano-Martín X, García-Marchan Y, Fernández A, Rodríguez N, Rojas H, Visbal G, Benaim G. 2009a. Amiodarone destabilizes the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and the biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. *Antimicrob Agent Chemother* 53:1403-1410.
- Serrano-Martín X, Payares G, DeLucca M, Martínez JC, Mendoza-León A. Benaim G. 2009b. Amiodarone and miltefosine synergistically induce parasitological cure of mice infected with *Leishmania mexicana*. *Antimicrob Agent Chemother* 53: 5108-5113.
- Stampolaki M, Malwal SR, Álvarez-Cabrera N, Gao Z, Moniruzzaman M, Babii SO, Naziris N, Rey-Cibati A, Valladares-Delgado M, Turcu AL, Baek K, Phan T, Lee H, Alcaraz M, Watson MS, Van der Watt M, Coertzen D, Efstatithiou N, Stylianakis I, Chountoulesi M, Shoen CM, Papanastasiou IP, Brea J, Cynamon MH, Birkholtz L, Kremer I, No JH, Vázquez S, Benaim G, Demetzos C, Zgurskaya H, Dick T, Oldfield E, Kolocouris AD. 2023. Synthesis and testing of analogs of the tuberculosis drug SQ109 against bacteria and protozoa: Identification of lead compounds against *Mycobacterium abscessus* and malaria. *ACS Infect Dis* 9(2):342-364.
- Urbina JA, Payares G, Contreras LM, Liendo A, Sanoja C, Molina J, Piras M, Piras R, Pérez N, Wincker P, Loebenberg D. 1998. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrob Agent Chemother* 42: 1771 – 1777.
- Urbina JA. 2006. Mechanisms of action of lysophospholipid analogues against trypanosomatid parasites. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 100S:S9 – S16.
- Urbina JA. 2017. Pharmacodynamics and Follow-Up Period in the Treatment of Human *Trypanosoma cruzi* Infections with Posaconazole. *J Am Coll Cardiol* 70(2):299 – 300.
- Van Boclaer K, Dixon J, Platteeuw JJ, Van Den Heuvel D, McArthur KN, Harris A, Alavijeh M, Croft SL, Yardley V. 2023. Efficacy of oleylphosphocholine in experimental cutaneous leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother* 78(7):1723-1731.
- Veiga-Santos P, Li K, Lameira L, de Carvalho TM, Huang G, Galizzi M, Shang N, Li Q, Gonzalez-Pacanowska D, Hernandez-Rodriguez V, Benaim G, Guo RT, Urbina JA, Docampo R, de Souza W, Oldfield E. 2015. SQ109: A New Drug Lead for Chagas Disease. *Antimicrob Agents Chemother* 59: 50- 61.
- Verma NK, Dey CS. 2004. Possible mechanism of miltefosine mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 3010- 3015.
- Yadagiri G, Singh A, Arora K, Mudavath SL. 2022. Immunotherapy and immunochemotherapy in combating visceral leishmaniasis. *Front Med* 10: 1096458.
- Zhang H, Yan R, Liu, Y, Yu M, He Z, Xiao J, Li K, Liu G, Ning Q, Li Y. 2025. Progress in antileishmanial drugs: Mechanisms, challenges, and prospects. *PLoS Negl Trop Dis* 19:e0012735m.