

QUIMIOTERAPIA DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

ANDRES O.M. STOPPANI

Centro de Investigaciones Bioenergéticas, Facultad de Medicina - CONICET, Universidad de Buenos Aires

Resumen Se han ensayado numerosos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas (trpanosomiasis americana) pero, hasta ahora, ninguno ha resultado absolutamente eficaz. Esos fármacos se pueden clasificar en los siguientes grupos: a) tripanocidas eficaces *in vitro* y en el modelo murino, de uso clínico aceptado (Nifurtimox, Benznidazole); b) tripanocidas eficaces *in vitro* y en el modelo murino, de uso clínico discutible (azoles, Anfotericina B Allopurinol, Allopurinol ribosidos, primaquina); c) tripanocidas activos sobre el *T. cruzi* en el modelo murino y también *in vitro*: Alquilisofosfolípidos, 5-amino-imidazol-4-carboxamidas, bisbencilquinolinas, fenotiazinas, Gossipol e, inhibidores de la cruzipaina, d) tripanocidas *in vitro*: sin otra actividad documentada, actinomicina D, acridinas, Cristal Violeta (violeta de genciana), diterpenos (de *Mikania sp*), N,N'-dimetil-2-propen-1-amina, epoxidientiol carbamato, fenazina metolsulfato, fenoxi-fenoxil fármacos, guanil hidrazonas, olivacina, piridin-azolato betainas, Proadifen, quelantes de Fe, *o*-naftoquinonas (β -lapachona), quinoides (miconidina, tingenona), sesquiterpeno (de *Lychophora sp*); sesquiterpeno lactonas, tetrahydrocarbazoles, DL- α -trifluorometilarginina, trifenilmetanos (colorantes). El Nifurtimox y el Benznidazole se caracterizan por (a) ser efectivos en la fase aguda de la infección chagásica pero no en la fase crónica; (b) la relación entre su acción y las cepas de *T. cruzi* infectante, que pueden ser susceptibles o resistentes al fármaco; (c) su acción genotóxica en bacterias; (d) producir efectos adversos ("no deseados") en el paciente chagásico y producir daño celular en diferentes órganos de animales de experimentación (hígado, testículo, adrenales, placenta, etc.); (e) generar radicales libres del oxígeno, que aparentemente determinan la acción tripanocida y los efectos tóxicos. Los azoles inhiben la enzima esteroil-C14 $\Delta^{24(25)}$ -demetilasa, inhibición que previene la síntesis del ergosterol en tripanosomas. En el modelo murino, los azoles reducen la parasitemia y prolongan la sobrevida de los ratones infectados, pero no curan al paciente chagásico. El Allopurinol y sus derivados inhiben la síntesis de nucleótidos púricos y de DNA en el *T. cruzi*; suprimen la parasitemia y prolongan la sobrevida de los ratones infectados pero su efecto puede ser transitorio y no curan la infección humana. Los inhibidores de la cruzipaina son eficaces en las fases aguda y crónica de la infección chagásica en el ratón pero no se ha informado su eficacia en clínica. Las fenotiazinas actúan selectivamente sobre la tripanotona reductasa, enzima específica de tripanosomatídeos, efecto que puede iniciar una quimioterapia racional de la enfermedad de Chagas. Las fenotiazinas reducen la parasitemia en el ratón pero falta información sobre una acción terapéutica en el hombre. Se analiza la metodología para el desarrollo de mejores fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Abstract *The chemotherapy of Chagas disease.* To date, Chagas disease has defied all attempts to develop an efficient and safe chemotherapy. Drugs effective on *T. cruzi* as trypanocidal agents may be classified as (a) drugs of extensive clinical use: Nifurtimox and Benznidazole; (b) drugs of restricted clinical use: azoles (e.g. Ketoconazole, Econazole; Miconazole); Amphotericin B; Allopurinol, Allopurinol ribosides and Primaquine; (d) drugs effective on *T. cruzi* and in experimental Chagas disease (murine model): alkylsophospholipids; 5-amino-imidazole-4-carboxamides; bisbenzyl-isoquinolines; cruzipain (crucein) inhibitors; Gossipol; phenothiazines; d) drugs effective *in vitro* without other reported effects, acridines, actinomycin D, Crystal Violet (gentian violet), diterpenes (*Mikania obtusata*); N,N'-dimethyl-2-propen-1-amine, epoxidienthiol carbamates, Fe-chelators, guanil hydrazones, *o*-naphthoquinones (β -lapachone); quinoids (miconidine; tingenone); Olivacine, phenazine methosulfate, phenoxi-phenoxyl drugs, Proadifen, pyridinium azolate betaines, sesquiterpenes (*Lychophora sp*), sesquiterpene lactones, tetrahydrocarbazoles, DL- α -trifluoromethylarginine, triphenylmetane dyes. It is generally agreed that Nifurtimox and Benznidazole (a) are effective on acute Chagas' disease, but may not be effective in the chronic phase; (b) their effect depends on the susceptibility of *T. cruzi* strains to the drug; (c) they produce adverse effects in patients that may prevent prolonged treatments; they are genotoxic and produce biochemical damage in the mammalian tissues. Redox-cycling of Nifurtimox and Benznidazole generates "reactive oxygen species" which explain the biological effects. At variance with the mammalian host, *T. cruzi* is deficient in antioxidant enzymes which are essential to prevent oxidative damage. Azoles are effective inhibitors of *T. cruzi* growth *in vitro* and *in vivo* since they inhibit sterol C14- $\Delta^{24(25)}$ demethylase, an enzyme catalysing ergosterol production. Azoles reduce parasitemia and extend the survival of infected mice but do not produce parasitological cure and their clinical effectiveness is questionable.

Allopurinol allopurinol ribosides and related compounds inhibit *T. cruzi* hypoxanthine-guanine ribosyl transferase, thus preventing the synthesis of adenylic and guanylic acids and also DNA. They reduce parasitemia and negativize xenodiagnosis but these effects may not be permanent, which invalidates their clinical use. Cysteine-protease inhibitors recognize *T. cruzi* protease (cruzipain, crucein) active site, thus allowing a covalent linkage with the inhibitor. These peptide inhibitors are effective in acute and chronic murine models. Phenothiazines inhibit trypanothione reductase and a specially favoured fit is a small 2-substitued 2-chloro and 2-trifluoromethyl with a remote hydrophobic patch. The essential phenothiazine nucleus can adopt more than one inhibitory orientation in its binding site. Phenothiazines are promising trypanocidal agents for the treatment of Chagas'disease. The methodology for developing new drugs for the treatment of Chagas'disease is discussed.

Key words: Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, Chemotherapy Nifurtimox, Benznidazole, Azols, Allopurinol, β -Lapachona, *o*-Naftoquinonas, Gossipol, Cruzipaina, Fenotiazinas, Tripanotiona reductasa.

La enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) es una endemia que afecta a millones de personas lo que causa importantes problemas sanitarios, económicos y sociales para los países afectados. Se han propuesto dos alternativas para erradicar la endemia cha-gásica. La primera consiste en la prevención de la transmisión por eliminación del insecto vector (la vinchuca) y por esterilización de sangre portadora utilizada para transfusión. La segunda, consiste en la quimioterapia de los pacientes infectados, con fármacos absolutamente eficaces, eliminando así al reservorio humano del *T. cruzi* y al mismo tiempo, curando al paciente. Los procedimientos propuestos se complementan. Campañas de erradicación del vector se realizan desde hace varios años, con éxitos importantes pues en Uruguay, Chile y Brasil, la transmisión se ha reducido substancialmente¹. Por el contrario, la cura parasitológica de los pacientes chagásicos, no ha tenido el mismo éxito. A pesar del tiempo transcurrido desde el descubrimiento de Chagas (1909), todavía no se dispone de una quimioterapia eficaz para todas las formas clínicas de la enfermedad. Se puede decir que el *Trypanosoma cruzi*, el agente causal, ha desafiado todos los intentos para su eliminación pues los medicamentos utilizados actualmente, el Nifurtimox (Lampit) y el Benznidazol (Radanil), son de relativa eficacia. Por otra parte, tampoco existen fármacos o vacunas para prevenir la enfermedad. Una información detallada que permite apreciar la evolución histórica del conocimiento sobre la quimioterapia de la enfermedad de Chagas se encuentra en las Referencias²⁻¹³.

A) Tripanocidas antichagásicos

Los fármacos ensayados como antichagásicos se pueden clasificar de la siguiente manera: a) fármacos con utilidad clínica reconocida: Nifurtimox y Benznidazole; b) fármacos efectivos en modelos experimentales *in vivo*, sin aplicación clínica generalizada: Ketoconazole, Itraconazole, Allopurinol, pirazol-pirimidinas, Anfotericina B; c) fármacos efectivos en modelos experimentales con utilidad clínica previsible: péptidos inhibidores de la cisteína-proteasa del *T. cruzi* (cruzipaina, cruceína); fenotiazinas; d) fármacos efectivos sobre el *T. cruzi*, en

su medio de cultivo o en células de organismos huéspedes, *in vitro*: *o*-naftoquinonas y otros que se considerarán oportunamente; e) fármaco con acción tripanocida *in vitro*, utilizado para esterilizar sangre infectada; Cristal Violeta (Violeta de Genciana). A continuación se examina la problemática inherente a cada uno de esos medicamentos.

B) Nifurtimox y Benznidazole

El Nifurtimox (3-metil-N-[(5-nitro-2-furfuril) metilene]-4-tiomorfolinoamina-1,1-dioxido; (Fig. 1)¹⁴, y el Benznidazole (2-nitro-N-(fenilmetil)-1H-imidazol-1-acetamida; (Fig. 2)¹⁵, reemplazaron a otros nitrofuranos como la furdantina, la nitrofurazona y la furaltadona, menos activos como agentes tripanocidas². Numerosos clínicos han utilizado al Nifurtimox y al Benznidazole desde su introducción en la terapéutica antichagásica hasta comienzos de la presente década (Tabla 1). Entre ellos se deben destacar a Cichero¹⁶, Lugones¹⁷, Cerisola¹⁸, Prata¹⁹ y Cançado²⁰ por su acción pionera. A esa acción se agregaron otros meritorios investigadores²¹⁻²³. En general, se

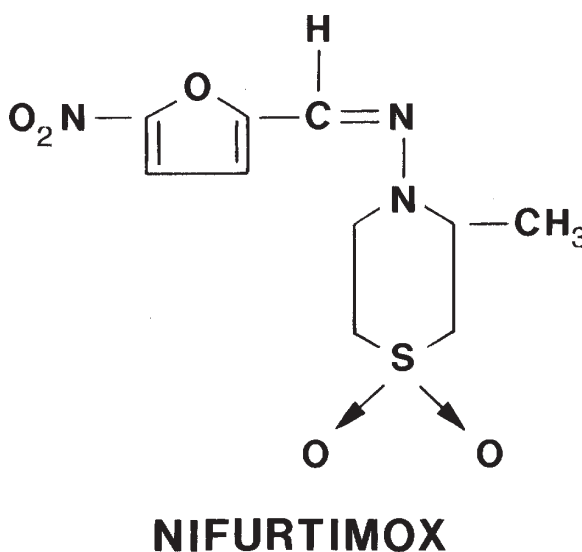
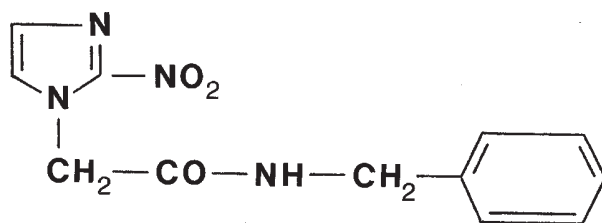


Fig. 1.- Estructura del Nifurtimox.



BENZNIDAZOLE

Fig. 2.— Estructura del Benzimidazole.

TABLA 1.— Indices terapéuticos del Nifurtimox y el Benzimidazol en la enfermedad de Chagas

Fármaco	Forma clínica de la enfermedad	Xenodiagnóstico negativo en pacientes tratados (%)
Nifurtimox	Aguda	38 ^a ; 50 ^b ; 81 ^c ; 60 ^d ; 53 ^e
	Crónica	100 ^g ; 97 ^f ; 85 ^g ; 96 ^h ; 100 ⁱ ; 40 ^j ; 33 ^k
Benzimidazol	Aguda	87 ⁿ
	Crónica	93 ⁿ ; 83 ^o

Datos informado por: ^a Rassi; ^b Prata; ^c Cerisola; ^d Cerisola; ^e Ferreira; ^f Ejden; ^g Meekelt; ^h Scherone; ⁱ Rabinovich; ^j Cerisola; ^k Neves da Silva; ^l Ferreira; ^m Prata; ⁿ Barclay y ^o Galleano según Storino y Milei (Ref. 3).

acepta que el Nifurtimox y el Benznidazol son eficaces en la fase aguda de la infección chagásica pero lo son menos en la fase crónica pues a menudo, no producen cura parasitológica^{2, 3}. Los efectos terapéuticos del Nifurtimox y del Benznidazole en la infección chagásica humana, presentan diferencias notables, lo que ha motivado controversias. Esas diferencias se explicarían, en parte por la existencia de cepas de *T. cruzi* con distinta susceptibilidad (o resistencia) a los fármacos, lo que constituye un problema biológico de gran interés. Por ejemplo, las cepas Tulahuen, Y y P son susceptibles al Nifurtimox mientras que las cepas Sonya y Colombiana no lo son²⁴. Las diferentes respuestas del *T. cruzi* a los fármacos sugieren la existencia de diferencias moleculares entre las varias cepas del parásito. Entre esas propiedades moleculares se encuentran las dependientes de las isoenzimas y de los marcadores genéticos. Andrade y col.^{25,26} y Murta y col.²⁷ han efectuado un análisis comparativo de numerosas cepas de *T. cruzi*, utilizando como marcadores el zimodema constituido por alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, fosfo-glucomutasa y glucosa-6-P deshidrogenasa (Andrade) y el mismo zimodema, mas la "enzima mágica", el DNA amplificado (RAPD); sondas génicas para la glicoproteína F, la hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPR); el gene del RNA ribosómico y el gene del mini-exon (MEX) (Murta). De los estudios de Andrade y col.^{25, 26} resultaron dos grupos de tripanosomas, uno susceptible y otro resistente al Benzni-

dazole lo que permitió establecer una correlación con relevancia clínico-terapéutica. De las observaciones de Murta y col.²⁷, sobre un mayor número de cepas, resultaron varios grupos según el marcador utilizado. Esos grupos respondieron a los quimioterápicos en forma característica para cada grupo. Parece oportuno sugerir, que la susceptibilidad/resistividad de la cepa infectante sea investigada antes de iniciar la quimioterapia. Para ello será necesaria la investigación molecular de las cepas infectantes en nuestro país. Se debe agregar que poblaciones silvestres de *T. cruzi* pueden contener, formas susceptibles y resistentes a los quimioterápicos antichagásicos, de manera que la destrucción de las formas susceptibles por los fármacos, lleva a la producción de formas resistentes²⁸. Los epimastigotes resistentes transmiten esa propiedad a los amastigotes correspondientes²⁹. De esta manera, la resistencia al fármaco se hace extensiva a todos los parásitos infectantes^{30, 31}. En algunos organismos (*Trichomonas*, *Giardia* y *Entamoeba*), la resistencia a los nitroimidazoles se explica por una deficiencia en enzimas reductoras del grupo nitro, por ejemplo, la piruvato-ferredoxina oxido-reductasa. No existen estudios similares en el *T. cruzi*.

Otro motivo de incertidumbre en la determinación de efectividad de las drogas antichagásica lo constituye la definición del criterio de "curación". En la mayoría de los trabajos realizados antes de 1994, la negatividad del xenodiagnóstico fue criterio valedero. También se utilizaron y/o se utilizan la observación hematológica, el hemocultivo y las pruebas biológicas (inmunofluorescencia). Estudios mas recientes utilizando técnicas de Biología Molecular (PCR) para detectar fragmentos de DNA o RNA en sangre de pacientes chagásicos ha demostrado la positividad de esas reacciones en casos con xenodiagnóstico negativo o sea que, a pesar de la ausencia de tripomastigotes en sangre circulante, existirían amastigotes en los tejidos de esos pacientes. Ello significaría que, de atenerse a los métodos tradicionales, la efectividad del medicamento antichagásico estaría sobrevalorada.

Tanto el Nifurtimox como el Benznidazole producen efectos adversos ("no deseados") en pacientes tratados con esos fármacos, mas con el primero que con el segundo^{32, 33}. Las manifestaciones tóxicas pueden incluir temblores, náuseas, vómitos, pérdida de peso, polineuropatías, eritema, etc., según el fármaco utilizado³². Revisiones exhaustivas de los efectos adversos del Nifurtimox y el Benznidazole se reseñan en las Referencias^{2, 3, 33}. Esos efectos conspiran contra la aceptación de los nitro-fármacos por el paciente chagásico. La toxicidad de esos fármacos se ha confirmado en modelos experimentales. Así, se han comprobado acciones genotóxicas en *Salmonellas*³⁴⁻³⁶, que correlacionan con la actividad tripanocida *in vitro*. Por otra parte, tanto el Nifurtimox como el Benznidazole producen radicales o moléculas

citotóxicas en los tejidos de animales de experimentación³⁷⁻⁴³ y presumiblemente en el hombre. Entre esos efectos se pueden mencionar a) la oxidación del glutatión (GSH) en el hígado^{44, 45}; b) aumento en la producción de lipoperóxidos⁴⁶⁻⁴⁸; c) daño bioquímico y/o histológico del testículo, las adrenales, el ovario y la placenta de la rata⁴⁹⁻⁵²; d) modificación del DNA tisular⁵³. El nifurtimox y el Benzimidazole pueden producir alteraciones neurológicas^{54, 55}, efectos clastogénicos en los niños⁵⁶ y linfomas en la rata⁵⁷. Estos efectos adversos no son compatibles con tratamientos prolongados con esos fármacos.

Mecanismo de acción

El Nifurtimox y el Benzimidazole, actúan sobre el genoma del *T. cruzi*. Ambos inhiben la síntesis de DNA, del RNA y de las proteínas⁵⁸⁻⁶¹. También aceleran la degradación de esas macromoléculas. El aislamiento del DNA nuclear o cinetoplasto de tripanosomas incubados con Nifurtimox o Benzimidazole permite comprobar roturas ("strand-breaks") en las cadenas nucleotídicas del DNA. La Figura 3 muestra el efecto del Nifurtimox sobre la estructura del DNA del *T. cruzi*. En ese experimento, epimastigotes marcados con timidina tritiada se incubaron con Nifurtimox a la concentración indicada en la figura. Terminada la incubación, se extrajo el DNA celular se lo sometió a electroforesis y se determinó la radiactividad de las fracciones aisladas. El DNA proveniente de los epimastigotes incubados con Nifurtimox originó un pico de altura proporcional a la concentración de Nifurtimox, pico que no se observó en el DNA testigo. La rotura del DNA representó al daño causado por el Nifurtimox y/o sus productos metabólicos citotóxicos⁶² entre ellos, los radicales libres del oxígeno⁶³. La modificación del DNA también podría representar a la inhibición de las enzimas encargadas de mantener la integridad del DNA, como las topoisomerasas⁶⁴. La existencia de mecanismos reparadores fisiológicos del DNA dañado se probó eliminando al Nifurtimox del medio de incubación (Figura 3; experimento B) y reincubando los epimastigotes en medio normal sin droga. En esas condiciones, no se observó el pico indicador de la fragmentación del DNA.

El Nifurtimox y el Benzimidazole pueden ejercer su toxicidad por varios mecanismos a saber: (a) acción directa del radical nitroanión^{47, 65-70} sobre moléculas susceptibles, entre ellas el DNA; (b) generación de radicales libres del oxígeno, que con el Nifurtimox sería el agente citotóxico principal^{7, 63, 70-72} y (c) producción, por reducción de moléculas reactivas (los derivados nitroso e hidroxilamina) cuya citotoxicidad es conocida; d) inhibición directa de la enzima⁷³. La reducción univalente de los nitrocompuestos implica las reacciones siguientes: (1) captura del electrón por el grupo nitro, que se convierte en radical nitro anión (Reacción 1); en esta reacción el NADPH es el dador de electrones; (2) producción del radical anión

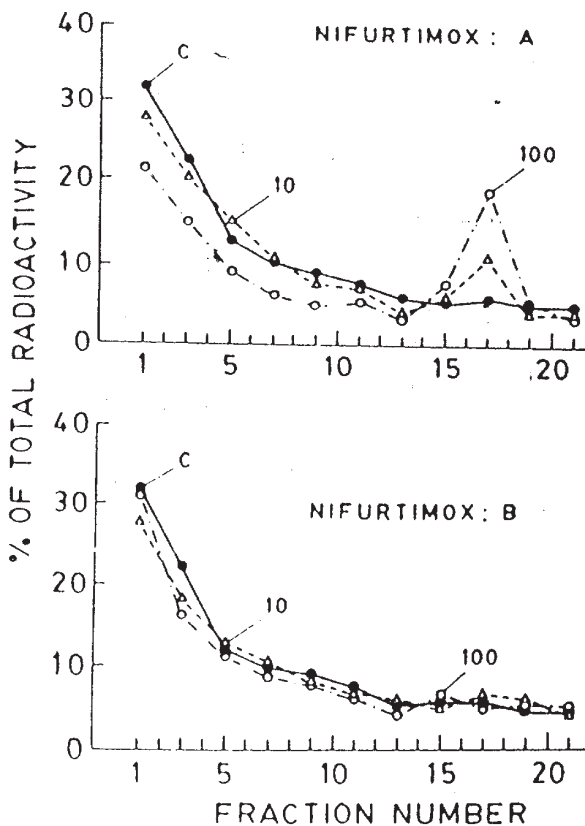
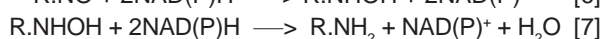
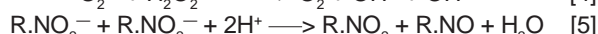
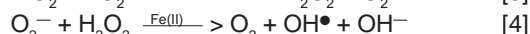
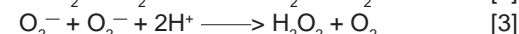
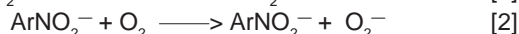


Fig. 3.— Daño al DNA cinetoplasto del *T. cruzi* por el Nifurtimox. Experimento A: epimastigotes con DNA marcado con $[^3\text{H}]$ -timidina se incubaron durante 3 hr en medio de cultivo sin o con Nifurtimox en las concentraciones indicadas en la Figura. Terminada la incubación se extrajo el DNA y se analizó por electroforesis. Las fracciones aisladas (numeradas según la abscisa), se caracterizaron por su radiactividad. Experimento B: los epimastigotes preincubados con Nifurtimox según A, se lavaron con medio de cultivo fresco, se reincubaron durante 24 hr con el mismo medio y se determinó la radiactividad del DNA como en el experimento A. Los picos de las curvas indican la fragmentación del DNA. Condiciones experimentales según Goijman y *col.*^{59,60}.

superóxido, por oxidación del radical nitroanión (Reacción 2); (3) el radical anión superóxido dismuta, gene-



rando peróxido de hidrógeno, reacción catalizada por la superóxido dismutasa (Reacción 3); (4) el anión superóxido y el peróxido de hidrógeno, en presencia de

Fe(II), reaccionan formando radical hidroxilo (OH•), muy tóxico (Reacción 4). Esta serie de reacciones requiere la intervención de varias enzimas, en primer término (Reacción 1) flavoproteínas como la NADPH citocromo P450 reductasa, la dihidrolipoamida deshidrogenasa mitocondrial^{71,72}, que actúan como “nitro reductasas”. La Reacción 3 es catalizada por la superóxido dismutasa. Las Reacciones 6 y 7 también dependen de nitroreductasas^{68,69}. Se debe notar que la velocidad de la Reacción 2 está limitada por la concentración del oxígeno en el medio. Si esta es alta, como ocurre con sistemas operando en condiciones aeróbicas, la producción de “especies reactivas” del oxígeno transcurre según las Reacciones 2-4. En cambio, si la tensión de oxígeno es baja, como ocurre en la profundidad de los tejidos en condiciones fisiológicas, la Reacción 2 es relativamente lenta lo que favorece la dismutación del radical nitroanión (Reacción 5) generando así al nitroso-derivado. El nitrosofurano, en presencia de un sistema reductor forma la hidroxilamina correspondiente (R.NHOH; Reacción 6). Por último, una reducción similar lleva a la producción del amino derivado (R.NH₂; Reacción 7). Reacciones similares ocurren con los nitroimidazoles, representados por el Benznidazole^{66,69}. Los nitroso e hidroxilamino derivados de los nitrofuranos o nitroimidazoles son conocidos por su toxicidad. Las Reacciones 1-7 pueden ocurrir tanto en el *T. cruzi* como en el organismo huésped, lo que explicaría la toxicidad de los nitroderivados para ambos. Sin embargo, el *T. cruzi* es un organismo deficientes en enzimas antioxidantes, por ejemplo, catalasa y superóxido dismutasa^{74,75}, lo que no ocurre con el huésped^{70,73}. Esta diferencia determina un mayor efecto de los fármacos en el parásito. Los productos de la reducción de los nitroimidazoles, tanto el radical nitroanión como los derivados nitroso e hidroxilamina, pueden reaccionar con el DNA formando aductos⁷⁷ que facilitan la rotura de las cadenas nucleotoides. Esos efectos se sumarían a los del superóxido y del radical hidroxilo.

Relación estructura/actividad

La molécula del Nifurtimox está constituida por dos grupos, el nitrofurano y la tetrahidromorfolina (Figura 1). El primero es el que interviene en la reacción redox para formar el nitroanión, precursor inmediato de los radicales libres del oxígeno. El grupo tetrahidromorfolina ejerce una función moduladora esencial de esa actividad⁷⁸ por medio de la distribución de electrones en la molécula. Se han sintetizado numerosos análogos del Nifurtimox⁷⁹⁻⁸² en los cuales se reemplazó la tetrahidromorfolina por heterociclos aromáticos (pirrol, imidazol, triazol, indol) y también por grupos alifáticos^{83,84}. La mayoría de los nuevos derivados fueron mas activos que el Nifurtimox como generadores de radicales libres^{85,86} pero también serían mas mutagénicos que el Nifurtimox³⁶, lo que des-

aconseja su uso terapéutico. Cuando los nuevos nitrofuranos se ensayaron sobre la parasitemia de ratones inoculados con *T. cruzi*, esos nitrofuranos fueron menos eficaces que el Nifurtimox y con algunos de ellos la parasitemia aumentó⁷⁸ lo que significaría que esos fármacos podrían producir efectos inmunosupresores.

En resumen, numerosas investigaciones en Argentina, Brasil, Chile y otros países han llevado a aceptar el uso de los nitrocompuestos en la forma aguda de la enfermedad de Chagas, con importantes reservas sobre su uso en la forma crónica. La producción de efectos adversos (“no deseados”) y la existencia de cepas de *T. cruzi* resistentes al Nifurtimox y el Benznidazole imponen la necesidad de desarrollar nuevos fármacos que los reemplacen.

C) Azoles

Los azoles constituyen un conjunto de fármacos caracterizados por poseer un heterociclo nitrogenado (imidazol; triazol, etc) en su estructura (Figuras 4 y 5). Son fungistáticos, frecuentemente utilizados para el tratamiento de candidiasis y otras micosis. En 1964 Abitbol y col.⁸⁷ obtuvieron resultados positivos con la Anfotericina B en pacientes chagásicos de los cuales 4 negativizaron el xenodiagnóstico. Sin embargo, el tratamiento de la en-

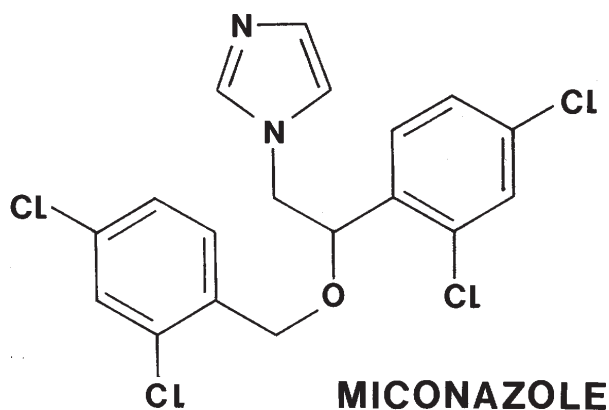


Fig. 4.- Estructura del Miconazole.

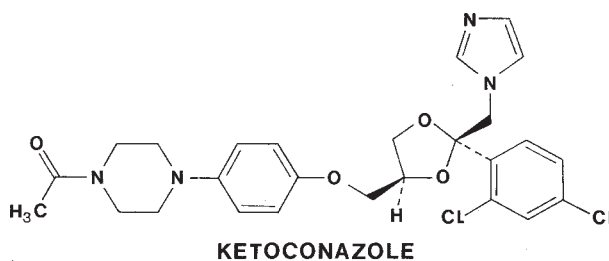


Fig. 5.- Estructura de Ketoconazole.

TABLA 2.— Efectos de Azoles sobre la multiplicación y la síntesis de ergosterol en *T. cruzi*

Compuesto	Autores	Efectos
Anfotericina B	Abitbol y col. (1964)	Reduce la parasitemia <i>in vitro</i> ; puede tener actividad terapéutica en pacientes chagásicos (fase aguda) ⁸⁷ .
Miconazole	Docampo y col. (1981)	Inhibe la multiplicación del <i>T. cruzi in vitro</i> . Disminuye el ergosterol ⁸⁸ .
Econazole	Docampo y col. (1981)	Inhibe la multiplicación del <i>T. cruzi in vitro</i> . Disminuye el ergosterol ⁸⁸ .
Ketoconazole cura	McCabe y col. (1984;1987)	Inhibe la multiplicación intracelular, previene la infección y parasitológicamente al ratón ^{89,90} .
Ketoconazole	Beach y col. (1986)	Inhibe la síntesis de esteroides ⁹¹ .
Ketoconazole	Urbina y col. (1988)	Altera la permeabilidad de las membranas y disminuye la síntesis de esteroides en <i>T. cruzi</i> ⁹² .
Ketoconazole y Terbinafina	Lagardi y col. (1990)	Produce alteraciones estructurales; disminuye la síntesis de ergosterol ⁹³
Ketoconazole, Terbinafina y Lovastation	Maldonado y col. (1993)	Inhiben la multiplicación del <i>T. cruzi in vitro</i> y la síntesis de esteroides. Modelo murino: reduce la parasitemia. La combinación de los tres fármacos puede tener utilidad terapéutica ⁹⁴ .
Ketoconazole y Lovastatina	Brener y col. (1993)	No cura infección chagásica crónica ⁹⁵ .
Anfotericina B	De Castro y col. (1993)	Efectos diferentes en amastigotes, tripomastigotes y epimastigotes ⁹⁶ .
Sinefungina	Avila y col. (1993)	Inhibe la multiplicación del <i>T. cruzi in vitro</i> ⁹⁷
Ketoconazole y Provastatina	Urbina y col. (1995)	Inhibe la síntesis de esteroides en <i>T. cruzi</i> ⁹⁸ .
D0870	Urbina y col. (1996)	Modelo murino: reduce la parasitemia; prolonga la supervivencia ¹⁰⁰ .
Triazoles	Kolting y Hitchcock (1997)	Inhibidores del crecimiento del <i>T. cruzi</i> ; Review 101.
Itraconazole y Allopurinol	Abt y col. (1998)	No curan la cardiopatía chagásica en todos los pacientes tratados ⁹⁹ .

fermedad de Chagas con Anfotericina B no se repitió, posiblemente por la toxicidad de ese micostático. En 1981 Docampo y col.⁸⁸ comprobaron que el Miconazole (Figura 4) y el Econazole inhiben el crecimiento del *T. cruzi in vitro* y modifican su contenido en esteroides, en particular de ergosterol, un esteroide vegetal cuya presencia en el *T. cruzi* es notable. La Tabla 2 resume, los resultados obtenidos con los azoles, especialmente con Ketoconazole. La mayor parte de esos estudios se realizaron *in vitro* e *in vivo*, utilizando el modelo murino de la enfermedad de Chagas. La acción antiparasitaria se manifestó en todos los ensayos⁸⁹⁻⁹⁴. La asociación del Ketoconazole con la Terbinafina o con la lovastatina, inhibidores de la síntesis de esteroides, resultó eficaz *in vivo* obteniéndose suma de efectos en un número importante de observaciones. Los azoles modifican el metabolismo de los esteroides en el *T. cruzi*, inhibiendo la enzima C14 $\Delta^{24(25)}$ -esteroide metiltransferasa⁹⁸. Como consecuencia de esa inhibición, no se forma ergosterol lo que altera la permeabilidad de las membranas del tripanosoma^{92,98}. La Anfotericina B⁹⁶ y la sinefungina⁹⁷ producen *in vitro* efectos similares. Contrariamente a los resultados experimentales, el ensayo en

pacientes chagásicos del Ketoconazole mas Lovastatina⁹⁵ o del Itraconazole mas Allopurinol⁹⁹, no dio resultados convincentes. Mas recientemente han aparecido los bis-triazoles antichagásicos, el ICI-195739 y su enantiomero D-0870^{100,101}. Como antichagásicos, estos fármacos son mas activos que la sinefungina, pero será necesario esperar los ensayos complementarios para establecer su utilidad clínica.

En resumen, si bien algunos azoles como el Econazole, el Ketoconazole y el itraconazol, son parcialmente eficaces como antichagásicos, el éxito de la quimioterapia de la enfermedad de Chagas con azoles está supeditado a los resultados que se obtengan con los nuevos bis-triazoles.

D) Allopurinol y pirazol pirimidinas

El *T. cruzi* es un organismo incapaz de sintetizar purinas (adenina; guanina), pero es capaz de sintetizar pirimidinas (timina; citosina y citacilo). La importación de bases púricas por el *T. cruzi* depende de un transporte es-

pecífico en el que participan quinasas. Por lo tanto, para sintetizar los nucleótidos que constituyen el DNA y el RNA, el *T. cruzi* debe utilizar purinas pre-formadas por el organismo huésped^{102,103}, de manera que, la síntesis de nucleosidos y nucleótidos por el parásito es un buen blanco terapéutico¹⁰⁴. El *T. cruzi* utiliza la adenina, y la hipoxantina para sintetizar ácido adenilico (AMP) mientras que la guanina y la xantina son utilizadas para sintetizar ácido guanilico (GMP). La conversión de la xantina y la hipoxantina en las bases aminadas depende de enzimas específicas que utilizan al adenil succinato como dador del grupo anión¹⁰⁵. Esas enzimas podrían también constituir blancos terapéuticos. Por otra parte, la síntesis de los nucleótidos púricos es catalizada por la hipoxantina-fosforibosil transferasa y enzimas similares que, pueden utilizar también sustratos no-fisiológicos, por ejemplo, el Allopurinol (4-hidroxi-pirazol-(3,4d)-pirimidina) y otras pirazol pirimidinas. Como consecuencia de esas

reacciones se forman nucleosidos y nucleótidos no-fisiológicos, que son tóxicos para el parásito pues inhiben la síntesis de los nucleótidos fisiológicos y por consiguiente, la del DNA y el RNA. Esas inhibiciones tienen consecuencias farmacológicas, que se expresan como inhibición de la multiplicación *in vitro*, la reducción de la parasitemia y la prolongación de la supervivencia de los ratones infectados según el modelo murino. La Tabla 3 resume los estudios realizados con Allopurinol y otras pirazol-pirimidinas, cuyas referencias¹⁰⁶⁻¹²³ incluyen la acción tripanostática (o tripanocida) de esos fármacos. La administración oral de los nucleótidos del Allopurinol o de las pirimidinas análogas también disminuye la parasitemia de ratones infectados pero no produce cura parasitológica. La acción tripanocida varía según la estructura de la base nitrogenada. La síntesis de nucleosidos o nucleótidos artificiales con diferentes pirimidinas, entre ellos 3'-azido-3'-deoxitimidina, (cono-

TABLA 3.- Efectos del Allopurinol y pirazolopirimidinas sobre el *T. cruzi*

Compuesto	Autores	Efectos
Allopurinol	Marr y col. (1978)	Forma nucleótidos y se incorpora al RNA. Toxicidad <i>in vitro</i> ; inhibe el crecimiento del <i>T. cruzi in vitro</i> ¹⁰⁶ .
Allopurinol	Avila y Avila (1981)	Modelo murino: reduce la parasitemia y prolonga la supervivencia. Inhibe el crecimiento del <i>T. cruzi in vitro</i> ¹⁰⁷ .
Allopurinol	Berens y col. (1982)	Forma pseudo nucleótidos e inhibe el crecimiento en cultivos (tripo- y epimastigotes) ¹⁰⁸ .
Pirazol pirimidina	Marr y Berens (1983)	Erradica la infección en cultivo de células ¹⁰⁹ .
4-Aminopirazol pirimidina	Avila y col. (1983)	Modelo murino: reduce de la parasitemia y prolonga de la supervivencia. Inhibe el crecimiento <i>in vitro</i> ¹¹⁰ .
Pirazol pirimidina ribósidos	Berens y col. (1984)	Ensayo en diferentes cepas de <i>T. cruzi in vitro e in vivo</i> : inhiben el crecimiento ¹¹¹ .
Allopurinol y pirazol pirimidinas	Avila y col. (1984)	Cepas susceptibles y cepas resistentes de <i>T. cruzi</i> ¹¹² .
Allopurinol ribósido; Formicina B	Croft y Neal (1985)	Modelo murino: prolonga la supervivencia; no cura la infección ¹¹³ .
Bases púricas	Guimaraes y Gutteridge (1986)	Inhibición del transporte de purinas en <i>T. cruzi</i> ¹¹⁴ .
Bases púricas	Guimaraes y Gutteridge (1987)	Inhibición del transporte en <i>T. cruzi</i> ¹¹⁵ .
Pirazol pirimidina-ribósidos; Formicina B	Avila y col. (1987)	Ribosidos análogos del allopurinol ribósidos; inhiben el crecimiento del <i>T. cruzi in vitro</i> . La Formicina B inhibe <i>in vitro e in vivo</i> ¹¹⁶ .
Guanina- y guanosina- ribósidos	Avila y col. (1987)	Modelo murino: prolongan el tiempo de supervivencia. La Formicina B es activa ¹¹⁷ .
Pirazol pirimidina-ribósidos	Avila y Avila (1987)	Transporte defectuoso en tripanosomas resistentes ¹¹⁸ .
Bases pirimidínicas	Gonzalez y col. (1988)	Inhiben el crecimiento del <i>T. cruzi in vitro</i> ¹¹⁹ .
Hipoxantina	Van Buren y col. (1988)	Inhibición del transporte en tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> por Nifurtimox o Benzimidazole ¹²⁰ .
Allopurinol	Gallerano y col. (1991)	Efectos discordantes en chagásicos crónicos ¹²¹ .
Zidovidina y otros ribósidos	Nakajima-Shimae (1996)	Inhiben el crecimiento del <i>T. cruzi in vitro</i> ¹²² .
Análogos de bases 6 púricas	Eakin y col. (1997)	Inhibe la hipoxantina-ribosil transferasa; los sustituyentes en y 8 de la purina son críticos ¹²³ .

cido como Zidovudina) produce nucleótidos con acción terapéutica antichagásica. El ensayo de 59 análogos de la purina como inhibidores de la hipoxantina-ribosil transferasa permitió sintetizar 8 moléculas con gran afinidad por la transferasa¹²³, estructuras caracterizadas por los grupos sustituyentes en las posiciones 6 y 8 de la purina. El Nifurtimox y el Benznidazole inhiben el transporte de purinas a través de las membranas celulares, lo que puede contribuir a la acción terapéutica¹²⁰.

El Allopurinol y sus derivados han sido ensayados para el tratamiento de las diferentes formas clínicas de la enfermedad de Chagas¹²². Para obtener efectos notables se requieren dosis relativamente altas de Allopurinol lo que puede producir intolerancia. El tratamiento reduce la parasitemia en forma que puede ser total y también negativiza el xenodiagnósticos¹²¹. Sin embargo, esos efectos suelen ser transitorios y al cabo de cierto tiempo, la sintomatología reaparece. Según Storino y col.³, el uso clínico de las purinas requiere respuestas adecuadas a varios interrogantes, a saber: (1) ¿son tripanocidas o tripanostáticos?; (2) ¿cuál es la dosis eficaz y la duración del tratamiento?; (3) ¿en que momentos del tratamiento se negativizan o se re-positivizan las reacciones serológicas?; (4) ¿que importancia tienen las cepas de *T. cruzi* resistentes al Allopurinol y análogos?

En resumen, el conocimiento del metabolismo de las purinas en *T. cruzi* ha permitido proponer nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Sin embargo, hasta ahora no se ha logrado una purina o pirimidina como fármaco eficaz para la cura parasitológica de la enfermedad. Nuevos estudios sobre los mecanismos metabólicos del parásito parecen ser necesarios.

E) Inhibidores de cisteína proteasas (cruzipaina, cruzaina)

El *T. cruzi* se caracteriza por poseer una cisteína-proteasa, la cruzipaina (GP59/51) que constituye una fracción importante de las proteínas celulares¹²⁴. La enzima se asemeja a la papaina y tiene 35-45% de homología

con una catepsina I. La Tabla 4 reseña estudios recientes sobre la cruzipaina y sus inhibidores¹²⁵⁻¹²⁹. La cruzipaina se encuentra en todas las formas del parásito, tiene función metabólica esencial y es necesaria para la transformación de amastigotes en tripomas-tigotes. Además intervendría en la penetración de los tripomastigotes en las células del huésped^{126,127}. La estructura de la cruzipaina y de su gene la califican como blanco para posibles quimioterápicos¹²⁶ especialmente, por la reactividad del tiol de la cisteína, susceptible a inhibidores específicos (diazometano y fluorometil acetona)¹²⁸. Péptidos sintéticos o seudopéptidos ligados a grupos diazo o cetona forman una unión estable con el tiol en el centro activo de la enzima. Cuando la estructura peptídica del inhibidor satisface la especificidad molecular del centro activo de la cruzipaina, se forma un compuesto covalente cruzipaina-inhibidor, catalíticamente inactivo. Estudios con varios péptidos sintéticos han demostrado que los inhibidores más potentes son aquellos que poseen grupos hidrofóbicos voluminosos en la posición P1 (primer residuo vecino al diazometano) y un residuo aromático próximo. Los parásitos afectados por esos inhibidores muestran la membrana plasmática rota, mitocondrias hinchadas y cromatina desorganizada. Los efectos citotóxicos de los péptidos inhibidores de la cruzipaina en amastigotes cultivados¹²⁹ también se observan *in vivo*, en el modelo murino¹³⁰. Seudopéptidos constituidos por fenilalanina y homofenilalanina, ligados a fluorometilacetona, previenen la muerte de ratones infectados con una dosis letal de *T. cruzi*. Algunos ratones son curados parasitológicamente mientras que otros pasan al Chagas crónico. Es llamativo que estos últimos ratones tratados nuevamente con el seudopéptido también curan. Amastigotes aislados del corazón de los ratones chagásicos tratados con el seudopéptido presentaron las mismas alteraciones estructurales que los amastigotes aislados de *T. cruzi in vitro*. En cambio, los péptidos no producen patologías en el huésped animal. Se puede ver que los péptidos inhibidores de la cruzipaina perturban la capacidad del *T. cruzi* para invadir miofibras y bloquean la multiplicación de los amastigotes intracelulares.

TABLA 4.— Efectos de inhibidores de cisteína-proteasas (cruzipaina o cruzein) sobre el *T. cruzi*

Autores	Efecto
Bontempi y col. (1984)	Presencia de cruzipaina en <i>T. cruzi</i> ¹²⁴ .
Ashall y col. (1990)	Fluorometil cetona péptidos ligados inhiben la multiplicación del <i>T. cruzi</i> ¹²⁵
Meirelles y col. (1992)	Previenen la invasión de las células del huésped y detienen el desarrollo intracelular del <i>T. cruzi</i> ¹²⁶
Harth y col. (1993)	Detienen la multiplicación intracelular y la transmisión intercelular del <i>T. cruzi</i> ¹²⁷
McKerrow y col. (1995)	Constituyen un modelo para drogas antiparasitarias resultantes del diseño molecular ¹²⁸ .
Engel y col. (1998)	Curan la infección chagásica experimental ¹²⁹ .
Engel y col. (1998)	Alteran la estructura y la función del complejo de Golgi en el <i>T. cruzi</i> ¹²⁸

En resumen, la obtención de péptidos inhibidores de la cisteína-proteasa constituye un avance significativo para la quimioterapia de la enfermedad de Chagas por la capacidad de esos péptidos (o seudopéptidos) para curar el Chagas crónico y por su inocuidad para el organismo huésped. Esos péptidos podrían constituir el fármaco de elección para el tratamiento de todas las formas de la enfermedad.

F) Gossipol

El Gossipol es un polifenol dialdehído extraído de las semillas de algodón que se ha utilizado como inhibidor reversible de la espermatogénesis, para controlar la fertilidad. Tiene otras acciones, a saber: a) es genotóxico y produce alteraciones en el DNA atribuidas a la producción de radicales libres del oxígeno¹³¹; b) modifica la actividad mitocondrial en levaduras y células de mamíferos¹³²; c) inhibe la flavoproteína ribosido reductasa que tiene función esencial en la formación de desoxirribonucleótidos para la síntesis del DNA¹³³. Blanco y col.¹³⁴⁻¹³⁹ han estudiado la acción tripanocida del Gossipol en *T. cruzi* comprobando la inhibición de deshidrogenasas del parásito (α -hidroxiácido, L-glutamato y glucosa-6-P deshidrogenasa) y de la enzima "málica". En ratones infectados con *T. cruzi*, el Gossipol reduce la parasitemia y prolonga la sobrevida pero no produce la curación parasitológica¹³⁹. Estas observaciones sugieren la conveniencia de ensayar otros polifenoles, más activos y específicos que el Gossipol, como antichagásicos.

G) *o*-Naftoquinonas

Las *o*-naftoquinonas constituyen un grupo de sustancias con múltiples aplicaciones en medicina. La β -lapachona es una *o*-naftoquinona extraída de la corteza del lapacho¹⁴⁰ con acción inhibitoria efectiva sobre el crecimiento de tripanosomas (incluso el *T. cruzi*), fibroblastos y varias especies de células tumorales¹⁴⁰⁻¹⁴⁵. Schaffner-Sabba y col.¹⁴⁶ sintetizaron una serie de *o*-naftoquinonas con estructura similar a la β -lapachona (quinonas CG), que resultaron inhibitorias de la multiplicación de células tumorales y también antivirales. Una característica metabólica de la β -lapachona y sus análogos es su capacidad para participar en reacciones redox y generar radicales libres del oxígeno^{143,147-149}. En las reacciones subsiguientes se forma la dihidro- β -lapachona (hidroquinona). Para iniciar estas reacciones se requiere un dador de electrones (NADPH) y el catalizador correspondiente que puede ser la NADPH-citocromo P450 reductasa microsomal. El anión superóxido formado como consecuencia del ciclo redox de la *o*-naftoquinona origina la producción de H₂O₂ y del radical hidroxilo (Reacciones 3 y 4) y a este último se puede atribuir la citotoxicidad de las naftoquinonas^{5, 7}. Cuando se trans-

fieren dos electrones como en la reacción catalizada por la DT-diaforasa, el producto inmediato es la hidroquinona, una molécula relativamente estable y por lo tanto de baja toxicidad. Otro grupo de *o*-naftoquinona similares a la β -lapachona los constituyen las mansononas extraídas de la corteza de un árbol africano *Mansonia altissima*. Estas quinonas tienen propiedades similares a la β -lapachona, pues generan "especies reactivas" del oxígeno por ciclo redox y son citotóxicas¹⁵⁰. Una diferencia importante entre las reacciones catalizadas por la NADPH-citocromo P450-reductasa y por la DT-diaforasa está determinada por el producto de la reducción de la quinona. Cuando se transfiere un electrón (por la reductasa), se forma la semiquinona, muy reactiva. En cambio, cuando se transfieren dos electrones (por la diaforasa) se forma la hidroquinona, relativamente estable. La reacción de la diaforasa tiene lugar en el hígado y constituye un mecanismo de desintoxicación muy eficaz de las *o*-naftoquinonas, pues las hidroquinonas pueden formar conjugados fácilmente eliminables.

La β -lapachona y varios otros compuestos quinoídes^{151,152} son potentes inhibidores del crecimiento *in vitro* de tripanosomatídeos, como el *T. cruzi*, *C. fasciculata* y *Leptomonas seymouri*^{141,146}. La Figura 6 ilustra la acción de la quinona CG 8-935 sobre la multiplicación del *T. cruzi* en su medio de cultivo. Esa acción concuerda con la inhibición de la síntesis del DNA, el RNA y de las proteínas del parásito^{151,153}, como lo muestra la disminución de la incorporación de los correspondientes precursores tritiados. Otros efectos característicos de la β -lapachona,

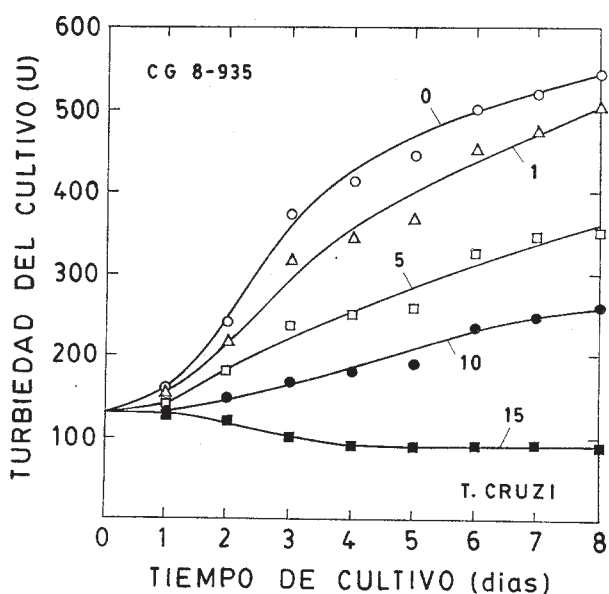


Fig. 6.— Inhibición del crecimiento del *T. cruzi* por la *o*-naftoquinona CG 8-935. Condiciones experimentales según Molina Portela y col.^{144,145}. Los números indican la concentración µM de quinona.

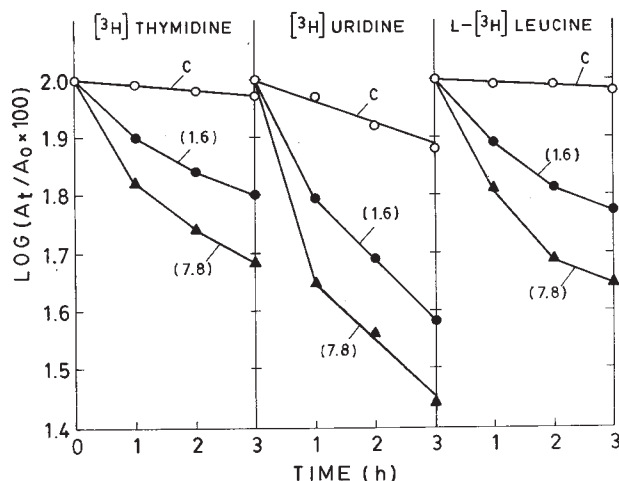


Fig. 7.— Degradación del DNA, RNA y proteínas de *T. cruzi* por el β -lapachona. Epimastigotes incubados con [3 H]-timidina, [3 H]-uridina y [3 H]-leucina se lavaron con medio de cultivo fresco y se reincubaron con β -lapachona a la concentración indicada en la Figura. La radiactividad residual en los epimastigotes se midió a los tiempos indicados en la abscisa. Condiciones experimentales según Gojman y Stoppani¹⁴⁴.

son la degradación del DNA, RNA y proteínas celulares¹⁵⁰⁻¹⁵¹, detectada por la disminución de la radiactividad de esas macromoléculas previamente marcadas con precursores tritiados (Figura 7).

El efecto inhibitor del crecimiento del *T. cruzi* por las *o*-naftoquinonas se obtiene con concentraciones relativamente bajas de quinona (Figuras 6 y 7) lo que facilitaría una posible aplicación terapéutica de las mismas dado que la concentración de β -lapachona de 100 μ M sería tolerables para el hombre. Sin embargo, no existen datos que demuestran una acción de las *o*-naftoquinonas *in vivo*. Esta falencia se podría explicar por la aludida reducción de las *o*-naftoquinonas a hidroquinona por la DT-diaforasa del huésped lo que determinaría una rápida disminución de la concentración de quinona en la sangre y los tejidos, a niveles no adecuados para una terapia tripanocida. Esa reacción contrarestaría posibles efectos tóxicos, resultantes de la reducción univalente de las *o*-naftoquinonas por los mecanismos hepáticos generadora de radicales libres¹⁵⁴⁻¹⁵⁵.

La investigación de la acción tripanocida de las *o*-naftoquinonas, si bien no ha tenido consecuencias inmediatas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, ha generado interés en la actividad de esas quinonas como citostáticos, para el tratamiento de tumores¹⁵⁶⁻¹⁶². Este resultado inesperado, cualquiera sea su aplicación ulterior, justifica plenamente las investigaciones sobre la acción de las *o*-naftoquinonas en tripanosomatídeos.

H) Actividad tripanocida de moléculas orgánicas y productos naturales

La necesidad de desarrollar nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas impulsó la investigación de un número importante de presuntos agentes tripanocidas, cuyos resultados no han trascendido a la prueba clínica. Algunos de esos ensayos se realizaron utilizando el modelo murino de la enfermedad pero la mayoría de ellos se realizó sobre tripanosomas *in vitro*. A continuación, se reseñan los resultados de esas investigaciones, a las que se hace referencia por el nombre de la molécula utilizada. Dada su heterogeneidad, esas estructuras se ordenan por el año de publicación de los resultados correspondientes. Llama la atención que muchos presuntos tripanocidas han sido estudiados en los últimos diez años lo que manifiesta un significativo interés por desarrollar una nueva quimioterapia de la enfermedad de Chagas. La falta de información sobre los mecanismos moleculares de esas acción sugiere interesantes líneas de investigación que correspondería aprovechar, por la información que se obtendría para el desarrollo de nuevos fármacos anticha-gásicos y también para un mejor conocimiento de la bioquímica del *T. cruzi*.

Moléculas activas en el modelo murino

Verapamil (1989): previene la resistencia de los epimastigotes al Nifurtimox¹⁶³. Verapamil (1989 y 1996): revierte la resistencia al Nifurtimox durante el Chagas agudo y mejora la evolución del Chagas crónico^{164,165}. Bencil-5-aminoimidazol-4-carboxamidas (1991): los derivados más activos son la 1-(4-clorobencil) y el 1-(3,4-diclorobencil)-5-aminoimidazol-4-carboxamidas. Reducen la parasitemia durante la fase aguda de la infección chagásica. Algunos análogos son más activos que el Nifurtimox¹⁶⁶. Alquillisofofolípidos (1996): suprimen la parasitemia del ratón infectado; actúan *in vitro* sobre epimastigotes en macrófagos a concentración de 0.2-5 μ M¹⁶⁷. Primaquina y análogos (1996): reducen la parasitemia del ratón infectado. Algunos de los derivados son más activos que la Primaquina misma y el Nifurtimox¹⁶⁸. Bisbencilisoquinolinas (1997): los alcaloides curina y cycleanina negativizan la parasitemia y prolongan la supervivencia de ratones inoculados con cepas Y (insensible al Benznidazole) o CL de *T. cruzi*; bloquean los canales del Ca¹⁶⁹. 8-Aminoquinolinas (1997): algunos derivados reducen la parasitemia de ratones durante la fase aguda de la infección chagásica; el grupo sustituyente en la posición 8 es crítico para la actividad de las 8-aminoquinolinas; son activas por vía oral¹⁷⁰. Protriptilina (1997): la N-metil-5H-dibenzocicloheptene-5-propamina; reduce la parasitemia del ratón infectado;

es tres veces mas activas que el Nifurtimox y podría actuar como inhibidor de la tripanotona reductasa¹⁷¹. Nitrobenzofuranos (1998): reducen la parasitemia en el ratón infectado; algunos compuestos son mas activos que el Nifurtimox¹⁷².

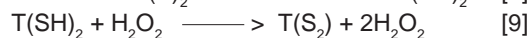
Moléculas activas in vitro (sin información sobre otras actividades)

Fenantridina (carbidium) (1966): inhibe la multiplicación del *T. cruzi*; es menos activo que el Nifurtimox¹⁷³. Bromuro de etidio (1978): inhibe la síntesis de DNA cinetoplástico (mitocondrial)¹⁷⁴. Fenazina metosulfato (1978): inhibe la multiplicación del *T. cruzi* y produce superóxido¹⁷⁵. Olivacina (pirido-carbazol)(1978): inhibe la síntesis de macromoléculas en epimastigotes; altera la respiración y la ultraestructura del *T. cruzi*¹⁷⁶. Complejos de Rh (III) y Pt (II) (1986): inhiben el crecimiento del *T. cruzi*¹⁷⁷. Primaquina y análogos (1986): estimulan la respiración y la producción de radical hidroxilo por fracciones del *T. cruzi*; tienen actividad similar al Nifurtimox¹⁷⁸. Tetrahydrocarbazoles (1987): inhiben la multiplicación del *T. cruzi* en medio de cultivos¹⁷⁹; pueden reemplazar al Cristal Violeta para esterilizar muestras de sangre. t-Butil-4-hidroxianisol (1988): los antioxidantes fenotóxicos son activos sobre *T. cruzi* y sobre células tumorales¹⁸⁰. Acridinas (1988): 9-amino-9-oxo- y 9-tioacridinas inhiben la síntesis de DNA, RNA y proteínas en *T. cruzi in vitro*; disminuyen la parasitosis en la células HELA¹⁸¹. Derivados del Trifenilmetano (1988): el derivado 2-benzotienilbis-1,4-dimetilaminofenil es el mas activo, con CI_{50} de 1.0 o 2 ng/ml para la inhibición de la multiplicación y de la síntesis de DNA, respectivamente¹⁸². Piridinio azolato betainas (1990): inhiben la multiplicación del *T. cruzi*; algunos son mas activos que el Nifurtimox¹⁸³. Actino-micina D (1991): inhibe la multiplicación del *T. cruzi* en macrófagos, la síntesis del DNA y la penetración de los tripomastigotes en células del huésped¹⁸⁴. Thiadiazinas (1992): son activas sobre amastigotes de *T. cruzi* y Trichomonas¹⁸⁵. DL- α -difluorometilarginina (1992): inhibe la multiplicación intracelular del *T. cruzi* pero no inhibe la transformación de tripomastigotes en amastigotes; inhibe específicamente la arginina decarboxilasa y disminuye la infectividad del *T. cruzi* en el ratón¹⁸⁶. Sesquiterapeno lactonas (guanolides) (1993): la dehidrozaluzanina C inhibe la multiplicación del *T. cruzi* en concentraciones de 2.5 a 50 mg/ml¹⁸⁷. Ajoeno (1993): producto natural aislado del ajo, inhibe la síntesis de fosfolípidos y la proliferación del *T. cruzi*¹⁸⁸. Bisbencilisoquinolinas y quinonas (1994): los alcaloides, dafnandrina, dafnolina, isocodenrina, girocarpina, limacina y feantina, en concentración de 250 ng/ml lisan los tripomastigotes de *T. cruzi*¹⁸⁹. Guanil hidrazonas (1995): inhiben la multiplicación del *T. cruzi in vitro*; las mas activas no ligan protones y tienen

sustituyentes en posición orto; algunas son mas activas que el Cristal Violeta¹⁹⁰. Diterpenos de Mikania obtusata (1995): inhiben la multiplicación del *T. cruzi*; son responsables de la acción de los extractos de Mikania¹⁹¹. Quelantes (1995): los complejantes de los Cu(II) y Fe(II) representado por Dietilamino-N-carbo-diamidapiperidina-N-carboditioato (5 mg/ml) inhiben 50-70% el crecimiento del *T. cruzi*; algunos son mas activos que el Benzimidazole¹⁹². Psoralen (1996): bajo luz ultravioleta inactiva al *T. cruzi* en muestras de sangre; útil para esterilizar sangre para transfusiones¹⁹³. Epoxidientiolcarbonato y fenoxifenoxietil tetrahidropiraniol eter (1996): inhibe la multiplicación del *T. cruzi* en macrófagos¹⁹⁴. Sesquiterpenos de *Lychnophora sp* (1996): las lactonas goyazenolido, eremantholido, lychnofolidos y el ácido lychnofico inhiben la multiplicación del *T. cruzi*; la actividad es igual o superior a la del Violeta de Genciana¹⁹⁵. N,N-dimetil-2-propen-1-aminas (1996): inhiben la multiplicación del *T. cruzi*; a concentración: 10-60 mM (con epimastigotes) y 40-220 μ M (con tripomastigotes)¹⁹⁶. Fenoxifenoxil-aldehido isoprenoides (Fenoxicarb) (1997): inhiben la multiplicación del *T. cruzi*; IC_{50} de los compuestos (mas activos) 66 y 78 μ M, respectivamente¹⁹⁷. Anilinoacridinas (1997): la inhibición del crecimiento de *T. cruzi* depende de la estructura¹⁹⁸. Benzamidinas (1997): inhiben el crecimiento de *T. cruzi* y *Leishmanias*¹⁹⁹. Proadifen (1998): inhibe la motilidad de los epimastigotes y su multiplicación en células Vero; activas sobre tripomastigotes y amastigotes; D_{50} 50-250 nM; actividad variable según la cepa²⁰⁰ de *T. cruzi*²⁰⁰.

I) Tripanotona y tripanotona reductasa: perspectivas terapéuticas

Una característica bioquímica de los tripanosomatídeos, en particular, del *T. cruzi* es la presencia de tripanotona (N^1, N^8 -bis (glutacionil) espermidina; Figura 8)²⁰¹. En esos organismos la tripanotona cumple funciones similares a las del glutatión en el organismo huésped, pues interviene en reacciones redox dependientes de NADPH



(Reacción 8) donde $T(S)_2$ y $T(SH)_2$ son las formas disulfuro y dihidro de la tripanotona, respectivamente (Figura 8). La Reacción 8 es catalizada por la flavoenzima tripanotona reductasa, enzima que ha sido aislada, purificada, cristalizada y cuya estructura se ha determinado por cristalografía de rayos X²⁰²⁻²⁰⁵. Asociada a la tripanotona peroxidasa (reacción 9) constituye un eficaz sistema desintoxicante de hidroperóxidos en tripanosomatídeos²⁰⁵. La Figura 9 ilustra la operación del sistema tripanotona reductasa/tripantona peroxidasa. La

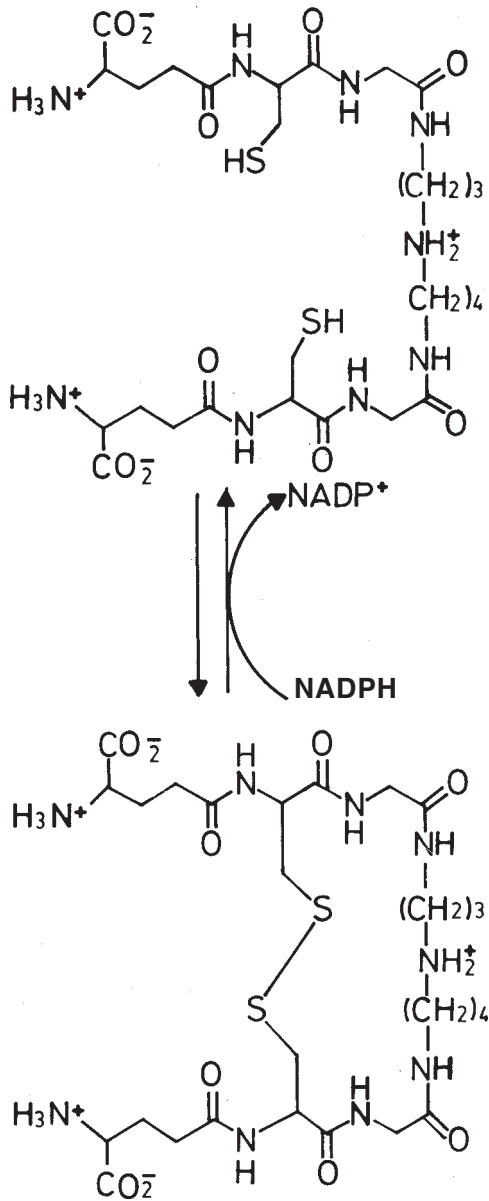


Fig. 8.- Estructura de la tripanotona.

tripanotona tiene importantes funciones en los tripanosomas y las leishmanias, a saber (a) asociada a las enzimas tripanotona reductasa y tripanotona peroxidasa, es un factor esencial para el mantenimiento de la homeostasis intracelular de los tioles²⁰⁶; (b) contribuye a la estructura de proteínas dependientes de grupos disulfuro; (c) actúa como antioxidante frente a radicales libres del oxígeno, a los peróxidos y los hidroperóxidos; (d) interviene en la desintoxicación de xenobióticos, como sustrato de la tripanotona-S-transferasa; (e) compleja metales pesados, ejerciendo una acción antitóxica; (f) contribuye al mantenimiento del nivel fisiológico de las

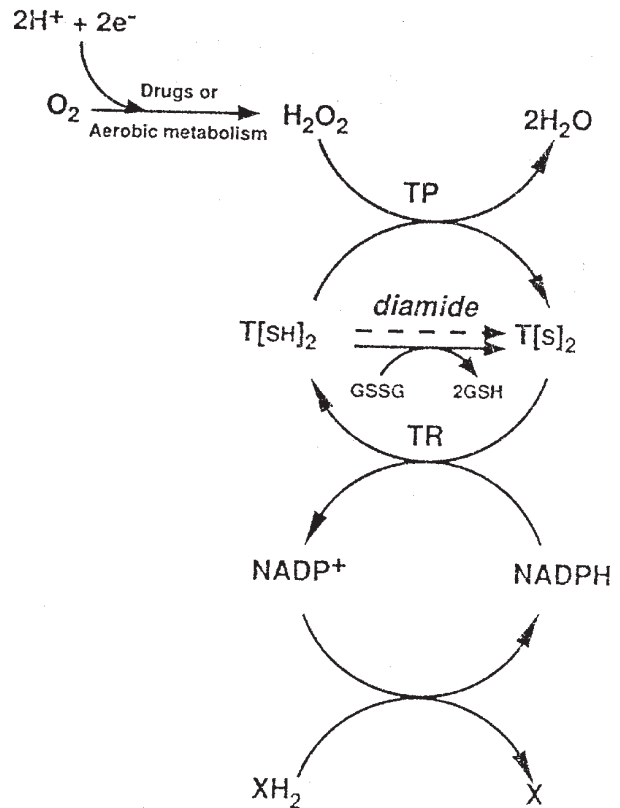


Fig. 9.- Función metabólica antioxidante de la tripanotona reductasa (TR) y la tripanotona peroxidasa (TP): $T(SH)_2$ y $T(S)_2$, dihidrotripanotona y tripanotona disulfuro; la diamide impide la conversión no-fisiológica de $T(SH)_2$ en $T(S)_2$. Según Referencia 203.

poliaminas, al utilizarlas como su constituyentes o liberarlas por hidrólisis de la N-glutationil espermidina.

La presencia de tripanotona reductasa en el *T. cruzi* posibilita el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. En primer lugar, la tripanotona reductasa reacciona con moléculas como el Nifurtimox y las *o*-naftoquinonas, que generan radicales libres del oxígeno (ver esas reacciones en las secciones correspondientes). Esos radicales contribuyen a la toxicidad de sus generadores ("reacciones suicidas"²⁰⁷). En segundo lugar, la tripanotona reductasa forma complejos inactivos con moléculas como la mepacrina²⁰⁸ o los análogos de la espermidina²⁰⁹. Por último, el modelado molecular del centro activo de la tripanotona reductasa ha permitido el diseño de potentes inhibidores como las fenotiazinas y las diazepinas²¹⁰⁻²¹⁴. Sin embargo, moléculas con gran afinidad por la tripanotona reductasa del *T. cruzi* pueden tener efectos adversos en el paciente chagásico, entre ellos el daño mitocondrial que también ocurre en el *T. cruzi*²¹⁵, la acción neuroléptica y efectos

antioxidantes o pro-oxidante^{216, 217}. La presencia de tripanotona en el *T. cruzi* abre otra posibilidad terapéutica basada en la inhibición de la síntesis de tripanotona. Esa inhibición se logra con derivados en la espermidina, como los fosfonatos y los fosfoamidatos²¹⁸. Todavía no se conocen estudios que permitan valorar la utilidad clínica de esas moléculas.

La tripanotona reductasa es un importante blanco para quimioterápicos antichagásica dada la exclusividad de su presencia en los tripanosomatídeos, especialmente en los patógenos para el hombre y los animales (*T. cruzi*, *T. brucei* sp). Se conoce la reacción de la tripanotona con arsenicales trivalentes, como el melarsopol y el melarsen. La tripanotona reductasa es inhibida por generadores de radicales libres del oxígeno, como los producidos por el Nifurtimox y las naftoquinonas, lo que contribuye a la explicación de la acción de esos fármacos. Algunos citostáticos (BCNU) son inhibidores de la tripanotona reductasa. La obtención de tripanotona reductasa pura, por ingeniería genética, ha permitido conocer su estructura tridimensional y en base a ese conocimiento se pueden diseñar moléculas capaces de unirse a la enzima con alta afinidad, inhibiendo su actividad. Dada las funciones de la tripanotona en la desintoxicación de peróxidos generados por el metabolismo de fármacos en el *T. cruzi*, la inhibición de la reductasa permitiría daño celular irreversible y por lo tanto, la obtención de las moléculas inhibitoras es actualmente un objetivo racional prioritario para lograr fármacos específicos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

J) Metodología de la investigación quimioterápica

Como epílogo de esta revisión parece oportuno una referencia a la metodología mas adecuada para obtener fármacos para el tratamiento y la prevención de la enfermedad de Chagas. El método tradicional, que se puede definir como "método empírico" fue creado y aplicado por P. Ehrlich, el fundador de la quimioterapia, a fines del siglo pasado. Consiste en ensayar un gran número de moléculas orgánicas sobre el agente patógeno *in vivo*²¹⁹. Tuvo algunos éxitos notables, como los arsenicales trivalentes contra la *Spirochaeta pallida* (*Treponema pallidum*), agente causal de la sífilis, pero fracasó en el caso de las tripanomiasis tropicales. Este método es complejo y costoso, pues requiere ensayar las presuntas moléculas activas en gran número de animales de experimentación (ratas, ratones, monos, etc.). Por otra parte, requiere la síntesis y/o el ensayo de muchas moléculas orgánicas para reconocer a la mas activa. El método moderno, al que se puede denominar "método racional", consiste en identificar un blanco molecular en el organis-

mo patógeno que correlacione con una función esencial para ese organismo^{220, 221}. Ese blanco puede ser una macromolécula (DNA, RNA, proteínas), una enzima o un receptor. Objetivos reconocidos en el *T. cruzi* para desarrollar nuevos fármacos antichagásicos son (entre paréntesis, moléculas guía) los siguientes²²⁰: 1) la enzima tripanotona reductasa, (Nifurtimox, Benznidazole); 2) la enzima nucleosido fosforil transferasa (pirazol pirimidina); 3) la enzima purina-fosforibosil transferasa (Allopurinol) y la enzima C14 Δ ^{24, 25} esterol demetilasa (azoles). A esos blancos se pueden agregar las cisteína-proteasa cuyos inhibidores específicos son los péptidos o pseudo péptidos ligados a reactivos de tioles. El conocimiento siempre creciente de la estructura de numerosas macromoléculas y el análisis cristalográfico por rayos X de esas moléculas y sus complejos así como la disponibilidad de computadoras con alta capacidad para procesar datos y reproducirlos gráficamente, ha permitido obtener valiosa información sobre posibles agentes terapéuticos que se suelen denominar "moléculas guías" y también optimizar la información sobre moléculas conocidas. El "modelado molecular" para caracterizar ligandos específicos para proteínas o receptores, requiere: a) el conocimiento de la estructura tridimensional de la proteína; b) la determinación de la complementariedad del ligando con la subregión, sitio o área activa del receptor, en función de formas moleculares, hidrofobicidad, puentes de hidrógeno, cargas electrostáticas y los campos de fuerza²²¹. Sin embargo, media un largo proceso entre los hallazgos moleculares y la producción industrial de un nuevo fármaco. Un inhibidor enzimático muy promisor puede ser tóxico, teratogénico, metabólicamente inestable, difícil de sintetizar o excesivamente costoso para la industria farmacéutica. La producción de drogas para poblaciones relativamente pequeñas o de bajo nivel económico, es desechada o postergada, lo que ha llevado a considerar como "drogas huérfanas" a las destinadas al tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Agradecimientos: Este trabajo fue realizado con financiamiento de CEDIQUIFA (Argentina), Swedish Agency for Research with Developing Countries-SAREC (Estocolmo-Suecia) a través de la Profesora M. Paulino de la Facultad de Química de la Universidad de la República (Montevideo-Uruguay) y la Fundación Alberto J. Roemmers (Argentina). MG Gutiérrez y MAE Verón prestaron eficaz ayuda técnica.

Bibliografía

1. Moncayo A: Progress towards the elimination of transmission of Chagas disease in Latin America. *Wild Hlth Statist Quart* 1997; 50: 195-8.
2. Cançado JR, Brener Z: Terapeutica. In: Trypanosoma cruzi e doença de Chagas, (eds), Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, 1979; pp. 362-424.
3. Storino RA, Gallerano R, Sosa R: Tratamiento antiparasitario específico. In: Enfermedad de Chagas, (eds.), Bue-

- nos Aires, Mosby-Doyma Argentina S. A., 1994; pp 557-68.
4. Fairlamb A: Biochemistry of trypanosomiasis and rational approaches to chemotherapy. *Trends Biochem Sci* 1982; 7: 249-53.
 5. Stoppani AOM: Rational approaches to Chagas' disease chemotherapy. In: New strategies for orphan drugs, (ed.), Accademia Nazionale delle Scienze, detta dei XL, Roma, 1986; pp. 125-39.
 6. Marr JJ, Docampo R: Chemotherapy for Chagas' disease: a perspective of current therapy and considerations for future research. *Rev Infect Dis* 1986; 8: 884-903.
 7. Docampo R, Moreno SNJ: Free radical metabolism of antiparasitic agents. *Fed Proc* 1986; 45: 2471-6.
 8. Morello A, Aldunate J, Letelier ME, Repetto Y: Bases bioquímicas de la acción de drogas antichagásicas. *Arch Biol Med Exp* 1988; 21: 93-9.
 9. Castro GD, Castro JA: Formación de especies químicas reactivas en la biotransformación de xenobióticos y toxicología. *Toxicol* 1988; 22: 221-38.
 10. De Castro SL: The challenge of Chagas disease chemotherapy. An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 1993; 53: 83-98.
 11. De Castro SL, Pinto MCFR, Pinto AV: Screening of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi*. 1 Establishing a structure/activity relationship. *Microbios* 1994; 78: 83-90.
 12. Stoppani AOM, Paulino M, Dubin M: Oxygen radicals and the chemotherapy of Chagas disease: an overview. *Ciência e Cultura* 1996; 48: 75-85.
 13. Frayha GJ, Smyth JD, Gobert JG, Savel J: The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. *Gen Pharmac* 1997; 28: 273-99.
 14. Haberkorn A, Gönnert R: Animal experimental investigations in the activity of nifurtimox against *Trypanosoma cruzi*. *Arzneim Forsch/Drug Res* 1972; 22: 1570-81.
 15. Polak A, Richle R: Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole. *Ann Trop Med Parasitol* 1978; 72: 45-54.
 16. Cichero JA, Segura E, Quatrochi JC: Evolución clínico-parasitológica y tolerancia a la droga de 33 niños con infección chagásica crónica tratados con Bay 2502. *Bol Chil Parasitol* 1969; 24: 59-62.
 17. Lugones HS, Peralta F, Canal Feijóo DC, De Marteleur AEA: Evolución de la sintomatología clínica y la función hepática en la enfermedad de Chagas aguda tratada con Bay 2502. *Bol Chil Parasitol* 1969; 24: 19-24.
 18. Cerisola JA: Evolución serológica de pacientes con enfermedad de Chagas aguda tratados con Bay 2502. *Bol Chil Parasitol* 1969; 24: 54-9.
 19. Prata A, Macedo V, Santos I, Cerisola JA, Silva N: Tratamento da doença de Chagas pelo nifurtimox (Bayer 2502). *Rev Soc Brasil Med Trop* 1975; 6: 297-308.
 20. Cançado JR, Salgado AA, Batista SM, Chiari C: Segundo ensaio terapêutico com o nifurtimox na doença de Chagas. *Revista Goiana de Medicina* 1976; 22: 203-33.
 21. Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura E: Treatment of chronic Chagas disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *Am Heart J* 1994; 127: 151-62.
 22. Segura MA, Molina de Raspi E, Basombrio MA: Reversibility of muscle and heart lesions in chronic, *Trypanosoma cruzi* infected mice after late trypanomicidal treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1994; 89: 213-6.
 23. Dictar M, Sinagra A, Verón MT, Luna C, Dengra C, De Rissio A, et al: Recipients and donors of bone marrow transplants suffering from Chagas disease: management and preemptive therapy of parasitemia. *Bone Marrow Transpl* 1998; 21: 391-3.
 24. Neal RA, van Bueren J: Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* in vivo and in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1988; 82: 709-14.
 25. Andrade V, Brodskyn C, Andrade SG: Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1983; 77: 796-9.
 26. Andrade SG, Rassi A, Magalhaes JB, Filho FF, Luquetti AO: Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strain. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992; 86: 624-6.
 27. Murta SMF, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ: Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol* 1998; 93: 203-14.
 28. Murta SMF, Romanha AJ: *In vivo* selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitol* 1998; 116: 165-71.
 29. Nirdé P, Larroque C, Barnabé C: Drug-resistant epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* and persistence of this phenotype after differentiation into amastigotes. *CRAcadSciParis, Sciences de la vie* 1995; 318: 1239-44.
 30. Nozaki T, Engel JC, Dvorak JA: Cellular and molecular biological analyses of nifurtimox resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55: 111-7.
 31. Marra UD: Tolerancia de la tolerancia medicamentosa de la nitrofurazona, levofuraltadona y el preparado Bay 2502. *Bol Chil Parasitol* 1969; 24: 38-42.
 32. Laplumé H, Barousse AP, Cabrera H: Efectos indeseables de Nifurtimox y Benznidazol. *Medicina (Buenos Aires)* 1982; 42: 223.
 33. Castro JA, Diaz de Toranzo EG: Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas Disease). *Biomed Environ Sci* 1988; 1: 19-33.
 34. Nagel R, Nepomnaschy I: Mutagenicity of 2 anti-chagasic drugs and their metabolic deactivation. *Mutat Res* 1983; 117: 237-42.
 35. Nagel R: Genotoxicity studies with two antichagasic drugs. *Mutat Res* 1987; 191: 17-20.
 36. Alejandro-Durán E, Claramunt RM, Sanz D, Vilaplana MJ, Molina P, Pueyo C: Study on the mutagenicity of nifurtimox and eight derivatives with the L-arabinose resistance test of *Salmonella typhimurium*. *Mutat Res* 1988; 206: 193-200.
 37. González-Martin G, Ponce G, Inostroza V, González M, Paulos C, Guevara A: The disposition of nifurtimox in the rat isolated perfused liver: effect of dose size. *J Pharm Pharmacol* 1993; 45: 72-4.
 38. Docampo R, Mason P, Mottley C, Muniz RPA: Generation of free radicals induced by nifurtimox in mammalian tissues. *J Biol Chem* 1981; 256: 10930-3.
 39. Moreno SNJ, Mason RP, Docampo R: Reduction of nifurtimox and nitrofurantoin to free radical metabolites by rat liver mitochondria. *J Biol Chem* 1984; 259: 6298-305.
 40. Moreno SNJ, Docampo R, Mason RP, Leon W, Stoppani AOM: Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Arch Biochem Biophys* 1982; 218: 585-91.
 41. Masana M, de Toranzo EGD, Castro JA: Reductive metabolism and activation of benznidazole. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 1041-5.
 42. Masana M, Toranzo EGD, Castro JA: Studies on nifurtimox nitroreductase in liver and other rat tissues. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1984; 270: 4-10.

43. Castro GD, Lopez A, Castro JA: Evidence for hydroxyl free radical formation during paraquat but not for nifurtimox liver microsomal biotransformation. A dimethyl-sulfoxide scavenging study. *Arch Toxicol* 1988; 62: 355-8.
44. Docampo R, Dubin M, Martino EE, Moreno SNJ, Stoppani AOM: Influencia del nifurtimox sobre el contenido en glutatión del hígado y de la bilis en la rata. *Medicina (Buenos Aires)* 1983; 43: 33-40.
45. Dubin M, Moreno SNJ, Martino EE, Docampo R, Stoppani AOM: Increased biliary secretion and loss of hepatic glutathione in rat liver after nifurtimox treatment. *Biochem Pharmacol* 1983; 32: 483-7.
46. Dubin M, Goijman SG, Stoppani AOM: Effect of nitroheterocyclic drugs on lipid peroxidation and glutathione content in rat liver extract. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 3419-23.
47. Docampo R, Moreno SNJ, Stoppani AOM: Nitrofurán enhancement of microsomal electron transport, superoxide anion production and lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 1981; 207: 316-24.
48. Castro GD, Castro JA: Studies on pentane evolution by rats treated with nifurtimox or benznidazole. *Toxicology* 1985; 35: 319-26.
49. Bernacchi AS, de Castro CR, de Toranzo EGD, Castro JA: Effects of nifurtimox or benznidazole administration on rat testes: ultrastructural observations and biochemical studies. *Exp Mol Pathol* 1986; 45: 245-56.
50. de Castro CR, de Toranzo EGD, Bernacchi AS, Carbone M, Castro JA: Ultrastructural alterations in ovaries from nifurtimox or benznidazole-treated rats: their relation to ovarian nitroreductive biotransformation of both drugs. *Exp Mol Pathol* 1989; 50: 385-97.
51. de Castro CR, de Toranzo EGD, Carbone M, Castro JA: Ultrastructural effects of nifurtimox on rat adrenal cortex related to reductive biotransformation. *Exp Mol Pathol* 1990; 52: 98-108.
52. de Castro CR, Díaz de Toranzo EG, Castro JA: Benznidazole-induced ultrastructural alterations in rat adrenal cortex. Mechanistic studies. *Toxicology* 1992; 74: 223-32.
53. Gorla N, Díaz Gómez MI, Castro JA: Interaction of benznidazole reactive metabolites with rat liver deoxyribonucleic acid and nuclear proteins. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1986; 280: 22-31.
54. Flores-Vieira CLL, Barreira AA: Experimental benznidazole encephalopathy: clinical-neurological alterations. *J Neurol Sci* 1997; 150: 3-11.
55. Flores-Vieira CLL, Chimelli L, Fernandes RMF, Barreira AA: Experimental benznidazole encephalopathy: electroencephalographic and morphological alterations. *J Neurol Sci* 1997; 150: 13-25.
56. Moya PR, Trombotto GT: Enfermedad de Chagas: efecto clastogénico de nifurtimox y benznidazol en niños. *Medicina (Buenos Aires)* 1988; 48: 487-91.
57. Teixeira ARL, Calixto MA, Teixeira ML: Chagas disease: carcinogenic activity of the antitrypanosomal nitroarenes in mice. *Mutat Res* 1994; 305: 189-96.
58. Gugliotta JL, Tanowitz HB, Wittner M, Soeiro R: *Trypanosoma cruzi*: inhibition of protein synthesis by nitrofurán SQ 18,506. *Exp Parasitol* 1980; 49: 216-24.
59. Goijman SG, Stoppani AOM: Effects of nitroheterocyclic drugs on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Pharmacol* 1985; 34: 1331-6.
60. Goijman SG, Frasc ACC, Stoppani AOM: Damage of *Trypanosoma cruzi* deoxyribonucleic acid by nitroheterocyclic drugs. *Biochem Pharmacol* 1985; 34: 1457-61.
61. Gonzalez NS, Cazzulo JJ: Effects of trypanocidal drugs on protein biosynthesis in vitro and in vivo by *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 2873-7.
62. González-Martin G, Paulos C, Guevara A, Ponce G: Disposition of nifurtimox and metabolite activity against *Trypanosoma cruzi* using rat isolated perfused liver. *J Pharm Pharmacol* 1994; 46: 356-9.
63. Docampo R, Stoppani AOM: Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. *Arch Biochem Biophys* 1979; 197: 317-21.
64. Sims P, Gutteridge WE: Mode of action of a 5-nitrofurán drug (SQ18506) against *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol* 1979; 9: 61-7.
65. Youngman RJ, Osswald WF, Elstner EF: Crypto - OH radical production by nitrofurantoin. *Biochem Pharmacol* 1982; 31: 603-6.
66. Kedderis GL, Miwa GT: The metabolic activation of nitroheterocyclic therapeutic agents. *Drug Metab Rev* 1988; 19: 33-62.
67. Ames JR, Ryan MD, Kovacic P: Mechanism of antibacterial action: electron transfer and oxy radicals. *Free Radical Biol Med* 1986; 2: 377-91.
68. Edwards DI: Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms.I.Mechanisms of action. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31: 9-20.
69. Edwards DI: Nitroimidazole drugs-action and resistance mechanisms.II.Mechanisms of resistance. *J Antimicrob Chemother* 1993; 31: 201-10.
70. Docampo R, Moreno SNJ, Stoppani AOM, Leon W, Cruz FS, Villalta F, et al: Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Pharmacol* 1981; 30: 1947-51.
71. Sreider CM, Grinblat L, Stoppani AOM: Catalysis of nitrofurán redox-cycling and superoxide anion production by heart lipoamide dehydrogenase. *Biochem Pharmacol* 1990; 40: 1849-57.
72. Grinblat L, Sreider CM, Stoppani AOM: Superoxide anion production by lipoamide dehydrogenase redox-cycling: effect of enzyme modifiers. *Biochem Int* 1991; 23: 83-92.
73. Grinblat L, Sreider CM, Stoppani AOM: Nitrofurán inhibition of yeast and rat tissue glutathione reductase. *Biochem Pharmacol* 1989; 38: 767-72.
74. Boveris A, Stoppani AOM: Hydrogen peroxide generation in *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 1977; 33: 1306-1308.
75. Boveris A, Sies H, Martino EE, Docampo R, Turrens JF, Stoppani AOM: Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 1980; 188: 643-8.
76. Chance B, Sies H, Boveris A: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.
77. Kedderis GL, Argenbright LS, Miwa GT: Covalent interaction of 5-nitroimidazoles with DNA and protein in vitro: mechanism of reductive activation. *Chem Res Toxicol* 1989; 2: 146-9.
78. Nieto M, Claramunt RM, Basombrio MA, Stoppani AOM: Essential role of the tetrahydrothiazine group of nifurtimox for activity on *Trypanosoma cruzi* in mice. *Rev Arg Microbiol* 1991; 23: 200-3.
79. Mester B, Claramunt RM, Elguero J: NMR studies in the heterocyclic series XXX-Carbon-13 NMR study of 5-nitrofurán derivatives. *Magn Reson Chem* 1987; 25: 737-9.
80. Mester B, Elguero J, Claramunt RM, Castanys S, Mascaro ML, Osuna A, et al: Activity against (*i*)*Trypanosoma cruzi* of new analogues of nifurtimox. *Arch Pharm (Weinheim)* 1987; 320: 115-20.
81. Mester B, Hikichi N, Hansz M, Paulino de Blumenfeld M: Quantitative structure activity relationships of 5-nitrofurán derivatives. *Chromatographia* 1990; 30: 191-4.
82. Mester B, Claramunt RM, Elguero J, Atienza J, Gomez Barrio A, Escario JA: Research for new antichagasic

- drugs. *Chem Pharm Bull Tokyo* 1991; 39: 1990-3.
83. Cerecetto H, Mester B, Onetto S, Seoane G: Formal potentials of new analogues of nifurtimox: relationship to activity. *Farmaco* 1992; 47: 1207-13.
 84. Caracelli I, Stamato FMLG, Mester B, Paulino M, Cerecetto H: A new analogue of nifurtimox. *Acta Cryst* 1996; C52: 1281-2.
 85. Fernández Villamil SH, Dubin M, Brusa MA, Durán RP, Perissinotti LJ, Stoppani AOM: Generation of radical anions of nifurtimox and related nitrofurans by ascorbate. *Free Rad Res Comms* 1990; 10: 351-60.
 86. Paulino-Blumenfeld M, Hansz M, Hikichi N, Stoppani AO M: Electronic properties and free radical production by nitrofurans. *Free Rad Res Comms* 1992; 16: 207-15.
 87. Abitbol R, Boris E, Pinlats E, Podesta D, Maranon J, Gori C: Accion terapeutica de la anfotericina B en la enfermedad de Chagas aguda. *Bol Chil Parasitol* 1964; 19: 132-4.
 88. Docampo R, Moreno SNJ, Turrens JF, Katzin AM, Gonzalez-Cappa SM, Stoppani AOM: Biochemical and ultrastructural alterations produced by miconazole and econazole in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1981; 3: 169-80.
 89. McCabe RE, Remington JS, Araujo FG: Ketoconazole inhibition of intracellular multiplication of *Trypanosoma cruzi* and protection of mice against lethal infection with the organism. *J Infect Dis* 1984; 150: 594-601.
 90. McCabe RE, Remington JS, Araujo FG: Ketoconazole promotes parasitological cure of mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 613-5.
 91. Beach DH, Goad LJ, Holz GG: Effects of ketoconazole on sterol biosynthesis by *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 136: 851-6.
 92. Urbina JA, Vivas J, Ramos H, Larralde G, Aguilar Z, Avilán L: Alteration of lipid order profile and permeability of plasma membranes from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes grown in the presence of ketoconazole. *Mol Biochem Parasitol* 1988; 30: 185,96.
 93. Lazard K, Urbina JA, de Souza W: Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34: 2097-105.
 94. Maldonado RA, Molina J, Payares G, Urbina JA: Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas Disease. *Antimicrob Agents Chemother* 1993; 37: 1353-9.
 95. Brener Z, Cançado JR, Galvao LM, da Luz MP, Filardi L, Pereira ES, et al: An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1993; 88: 149-53.
 96. de Castro SL, Soeiro MNC, Higashi KO, Meirelles MNL: Differential effect of amphotericin B on the three evolutive stages of *Trypanosoma cruzi* and on the host cell-parasite interaction. *Braz J Med Biol Res* 1993; 26: 1219-29.
 97. Avila JL, Avila A, Polegre MA: Inhibitory effects of sinefungin and its cyclic analog on the multiplication of *Trypanosoma cruzi* isolates. *Am J Trop Med Hyg* 1993; 48: 112-9.
 98. Urbina JA, Vivas J, Visbal G, Contreras LM: Modification of the sterol composition of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by $\Delta^{24(25)}$ -sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with ketoconazole. *Mol Biochem Parasitol* 1995; 73: 199-210.
 99. Abt W, Aguilera X, Arribada A, Perez C, Miranda C, Sanchez G, et al: Treatment of chronic Chagas disease with itraconazole and allopurinol. *Am J Trop Med Hyg* 1998; 59: 133-8.
 100. Urbina JA, Payares G, Molina J, Sanoja C, Liendo A, Lazard K, et al: Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using D0870. *Science* 1996; 273: 969-71.
 101. Koltin Y, Hitchcock CA: The search for a new triazole antifungal agents. *Curr Opin Chem Biol* 1997; 1: 176-82.
 102. Davies MJ, Ross AM, Gutteridge WE: The enzymes of purine salvage in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* and *Leishmania mexicana*. *Parasitol* 1983; 87: 211-7.
 103. Hammond DJ, Gutteridge WE: Purine and pyrimidine metabolism in the trypanosomatidae. *Mol Biochem Parasitol* 1984; 13: 243-61.
 104. Christopherson RI, Lyons SD: Potent inhibitors of de novo pyrimidine and purine biosynthesis as chemotherapeutic agents. *Med Res Rev* 1990; 10: 505-48.
 105. Spector T, Berens RL, Marr JJ: Adenylosuccinate synthase and adenylosuccinate lyase from *Trypanosoma cruzi*. Specificity studies with potential chemotherapeutic agents. *Biochem Pharmacol* 1981; 31: 225-9.
 106. Marr JJ, Berens RL, Nelson DJ: Antitrypanosomal effect of allopurinol: conversion *n vivo* to aminopyrazolopyrimidine nucleotides by *Trypanosoma cruzi*. *Science* 1978; 201: 1018-20.
 107. Avila JL, Avila A: *Trypanosoma cruzi*: allopurinol in the treatment of mice with experimental acute Chagas disease. *Exp Parasitol* 1981; 51: 204-8.
 108. Berens RL, Marr JJ, Steele da Cruz F, Nelson DJ: Effect of allopurinol on *Trypanosoma cruzi*: metabolism and biological activity in intracellular and bloodstream forms. *Antimicrob Agents Chemother* 1982; 22: 657-61.
 109. Marr JJ, Berens RL: Pyrazolopyrimidine metabolism in the pathogenic trypanosomatidae. *Mol Biochem Parasitol* 1983; 7: 339-56.
 110. Avila JL, Avila A, Muñoz E, Monzón H: *Trypanosoma cruzi*: 4-aminopyrazolopyrimidine in the treatment of experimental Chagas' disease. *Exp Parasitol* 1983; 56: 236-40.
 111. Berens RL, Marr JJ, Looker DL, Nelson DJ, LaFon SW: Efficacy of pyrazolopyrimidine ribonucleosides against *Trypanosoma cruzi*: studies *in vitro* and *in vivo* with sensitive and resistant strains. *J Infect Dis* 1984; 150: 602-11.
 112. Avila JL, Avila A, Monzón H: Differences in allopurinol and 4-aminopyrazolo(3,4-d) pyrimidine metabolism in drug-sensitive and insensitive strains of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1984; 44: 51-60.
 113. Croft SL, Neal RA: The effect of allopurinol ribonucleoside and formycin B on *Trypanosoma cruzi* infections in mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79: 517-8.
 114. Guimaraes RC, Gutteridge WE: Uptake of purine bases by *Trypanosoma cruzi* culture epimastigote. *Braz J Med Biol Res* 1986; 19: 339-50.
 115. Guimaraes RC, Gutteridge WE: Purine base uptake in *Trypanosoma cruzi*: adaptations and effects of inhibitors. *Braz J Med Biol Res* 1987; 20: 1-10.
 116. Avila JL, Polegre MA, Robins RK: Biological action of pyrazolopyrimidine derivatives against *Trypanosoma cruzi*. Studies *in vitro* and *in vivo*. *Comp Biochem Physiol* 1987; 86C: 49-54.
 117. Avila JL, Rojas T, Avila A, Polegre MA, Robins RK: Biological activity of analogs of guanine and guanosine against american *Trypanosoma* and *Leishmania* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 1987; 31: 447-51.
 118. Avila JL, Avila A: Defective transport of pyrazolopyrimidine ribosides in insensitive *Trypanosoma cruzi* wild strains is a parasite-stage specific and reversible characteristic. *Comp Biochem Physiol* 1987; 87B: 489-95.
 119. Gonzalez AM, Castanys S, Osuna A: Inhibitory effect of new pyrimidine bases on *Trypanosoma cruzi*. *Arch Pharm (Weinheim)* 1988; 322: 843-6.

120. van Bueren J, Cenini P, Neal RA: Effect of nifurtimox or benznidazole on the uptake of radioactive hypoxanthine by blood stream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Med Sci Res* 1988; 16: 1207-8.
121. Gallerano RH, Marr JJ, Sosa RR: Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease [published erratum]. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 44: 580.
122. Nakajima-Shimada J, Hirota Y, Oaki T: Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells by purine and pyrimidine analogs. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2455-8.
123. Eakin AE, Guerra A, Focia PJ, Torres-Martinez J, Craig III SP: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase from *Trypanosoma cruzi* as a target for structure-based inhibitor design: crystallization and inhibition studies with purine analogs. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41: 1686-92.
124. Bontempi E, Franke de Cazzulo BM, Ruiz AM, Cazzulo JJ: Purification and properties of an acidic protease from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol* 1984; 77B: 599-604.
125. Ashall F, Angliker H, Shaw E: Lysis of trypanosomes by peptidyl fluoromethyl ketones. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 170: 923-9.
126. Meirelles MN, Juliano L, Carmona E, Silva SG, Costa EM, Murta ACM, et al: Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. 1992; 52: 175-84.
127. Harth G, Andrews N, Mills AA, Engel JC, Smith R, McKerrow JH: Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 58: 17-24.
128. Mc Kerrow JH, McGrath ME, Engel JC: The cysteine proteases of *Trypanosoma cruzi* as a model for anti-parasite drug design. *Parasitol Today* 1995; 11: 279-82.
129. Engel JC, Doyle PS, Palmer J, Hsieh I, Bainton DF, McKerrow JH: Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci* 1998; 111: 597-606.
130. Engel JC, Doyle PS, Hsieh I, McKerrow JH: Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* 1998; 188: 725-34.
131. Zaidi R, Hadi SM: Interaction of gossypol with DNA. *Toxicol in Vitro* 1992; 6: 71-76.
132. Bugeja V, Charles G, Collier D, Wilkie D: Primary mitochondrial activity of gossypol in yeast and mammalian cells. *Biochem Pharmacol* 1988; 37: 4217-24.
133. McClarty GA, Chan AK, Creasey DC, Wright JA: Ribonucleotide reductase: an intracellular target for the male antifertility agent, gossypol. *Biochem Biophys Res Commun* 1985; 133: 303-5.
134. Montamat EE, Burgos C, Gerez de Burgos NM, Rovai LE, Blanco A: Inhibitory action of gossypol on enzymes and growth of *Trypanosoma cruzi*. *Science* 1982; 218: 288-9.
135. Blanco A, Aoki A, Montamat EE, Rovai LE: Effect of gossypol upon motility and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool* 1983; 30: 648-51.
136. Gerez de Burgos NM, Burgos C, Montamat EE, Rovai LE, Blanco A: Inhibition by gossypol of oxidoreductases from *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Pharmacol* 1984; 33: 955-9.
137. Burgos C, Gerez de Burgos NM, Rovai LE, Blanco A: In vitro inhibition by gossypol of oxidoreductases from human tissues. *Biochem Pharmacol* 1986; 35: 801-4.
138. Rovai LE, Aoki A, Gerez de Burgos NM, Blanco A: Effect of gossypol on trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool* 1990; 37: 280-6.
139. Olcina MA, Blanco A: Effects of gossypol on mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* 1990; 40: 219-26.
140. D'Albuquerque IL, Maciel MCN, Schuler AR, de Araujo M do C, Medeiros Maciel G, Cavalcanti M da SB, et al: Preparação e primeiras observações sobre as propriedades antibióticas e antineoplásicas das naftoquinonas homólogos inferiores na série da 2-hidróxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona (lapachol). *Revta Inst Antibiot Univ Recife* 1972; 12: 31-40.
141. Cruz FS, Docampo R, de Souza W: Effect of b-lapachone on hydrogen peroxide production in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 1978; 35: 35-40.
142. Lopez JN, Cruz FS, Docampo R, Vasconcellos ME, Sampaio MCR, Pinto AV, et al: In vitro and in vivo evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol* 1978; 72: 523-31.
143. Docampo R, Lopes JN, Cruz JS, De Souza W: *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural and metabolic alterations of epimastigotes by β -lapachone. *Exp Parasitol* 1977; 42: 142-9.
144. Molina Portela MP, Pahn EM de, Galeffi C, Stoppani AOM: Efecto de orto-naftoquinonas lipofílicas sobre el crecimiento y la producción de peróxidos por *Leptomonas seymouri* y *Crithidia fasciculata*. *Rev Arg Microbiol* 1991; 23: 1-14.
145. Molina Portela MP, Fernandez Villamil SH, Perissinotti LJ, Stoppani AOM: Redox cycling of o-naphthoquinones in trypanosomatids. Superoxide and hydrogen peroxide production. *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 1875-82.
146. Schaffner-Sabba K, Schmidt-Ruppin KH, Wehrli W, Schuerch AR, Wasley JWF: b-lapachone: synthesis of derivatives and activities in tumor models. *J Med Chem* 1984; 27: 990-4.
147. Boveris A, Docampo R, Turrens JF, Stoppani AOM: Effect of b-lapachone on superoxide anion and hydrogen peroxide production by *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 1978; 175: 431-9.
148. Boveris A, Stoppani AOM, Docampo R, Cruz FS: Superoxide anion production and trypanocidal action of naphthoquinones on *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol* 1978; 61C: 327-9.
149. Molina Portela MP, Stoppani AOM: Redox cycling of b-lapachone in the presence of dihydroliipoamide and oxygen. *Biochem Pharmacol* 1996; 51: 275-83.
150. Fernández Villamil SH, Dubin M, Galeffi C, Stoppani AOM: Effects of mansonones on lipid peroxidation, P-450 monooxygenase activity, and superoxide anion generation by rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 1990; 40: 2343-51.
151. Gojman SG, Turrens JF, Marini-Bettolo GB, Stoppani AOM: Effect of tingenone, a quinonoid triterpene on growth and macromolecule biosynthesis in *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 1985; 41: 646-8.
152. Schwarcz de Tarlovsky MN, Gojman SG, Molina Portela MP, Stoppani AOM: Effect of isoxazolyl naphthoquinoneimines on growth and oxygen radical production by *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*. *Experientia* 1990; 46: 502-5.
153. Gojman SG, Stoppani AOM: Effects of b-lapachone, a peroxide-generating quinone, on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Arch Biochem Biophys* 1985; 240: 273-80.
154. Dubin M, Fernandez Villamil SH, Stoppani AOM: Inhibition of microsomal lipid peroxidation and cytochrome P-450-catalyzed reactions by b-lapachone and related naphthoquinones. *Biochem Pharmacol* 1990; 39: 1151-60.
155. Fernández Villamil SH, Dubin M, Molina Portela MP, Perissinotti LJ, Brusa MA, Stoppani AOM: Semiquinone production by lipophilic o-naphthoquinones. *Redox Report* 1997; 3: 245-52.
156. Li CJ, Averboukh L, Pardee AB: b-lapachone, a novel DNA

- topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. *J Biol Chem* 1993; 268: 22463-8.
157. Li CJ, Zhang LJ, Dezube BJ, Crumpacker CS, Pardee AB: Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 1839-42.
 158. Degrassi F, De Salvia R, Berghella L: The production of chromosomal alterations by b-lapachone, an activator of topoisomerase I. *Mutat Res* 1993; 288: 263-7.
 159. Boothman DA, Pardee AB: Inhibition of radiation-induced neoplastic transformation by b-lapachone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86: 4963-7.
 160. Boothman DA, Trask DK, Pardee AB: Inhibition of potentially lethal DNA damage repair in human tumor cells by b-lapachone, an activator of topoisomerase I. *Cancer Res* 1989; 49: 605-612.
 161. Planchon SM, Wuerzberger S, Frydman B, Witiak DT, Hutson P, Church DR, et al: β -Lapachone-mediated apoptosis in human promyelocytic leukemia (HL-60) and human prostate cancer cells: A p53-independent response. *Cancer Res* 1995; 55: 3706-11.
 162. Glen VL, Hutson PR, Kehrl NJ, Boothman DA, Wilding G: Quantitation of β -lapachone and 3-hydroxy-b-lapachone in human plasma samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1997; 692: 181-6.
 163. Neal RA, van Bueren J, McCoy NG, Iwobi M: Reversal of drug resistance in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* by verapamil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1989; 83: 197-8.
 164. Tanowitz HB, Morris SA, Weiss LM, Bilezikian JP, Factor SM, Wittner M: Effect of verapamil on the development of chronic experimental Chagas disease. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 41: 643-9.
 165. Tanowitz HB, Wittner M, Chen B, Huang H, Weiss LM, Christ GJ, et al: Effects of verapamil on acute murine Chagas' disease. *J Parasitol* 1996; 82: 814-9.
 166. Chabala JC, Waits VB, Ikeler T, Patchett AA, Payne L, Peterson LH, et al: 1-(Substituted)benzyl-5-aminoimidazole-4-carboxamides are potent orally inhibitors of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Experientia* 1991; 47: 51-3.
 167. Croft SL, Snowden D, Yardley V: The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J Antimicrob Chemother* 1996; 38: 1041-7.
 168. Kinnamon KE, Poon BT, Hanson WL, Waits VB: Primaquine analogues that are potent anti-*Trypanosoma cruzi* agents in a mouse model. *Ann Trop Med Parasitol* 1996; 90: 467-74.
 169. Fournet A, Ferreira M-E, Rojas de Arias A, Schinini A, Nakayama H, Torres S, et al: The effect of bisbenzylisoquinoline alkaloids on *Trypanosoma cruzi* infections in mice. *Int J Antimicrobial Agents* 1997; 8: 163-70.
 170. Kinnamon KE, Poon BT, Hanson WL, Waits VB: Evidence that 8-aminoquinolines are potentially effective drugs against Chagas disease. *Ann Trop Med Parasitol* 1997; 91: 147-52.
 171. Kinnamon KE, Poon BT, Hanson WL, Waits VB: In pursuit of drugs for American Trypanosomiasis: evaluation of some «standards» in a mouse model. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 216: 424-8.
 172. Kinnamon KE, Poon BT, Hanson WL, Waits VB: *Trypanosoma cruzi*: a novel chemical class (nitrobenzofurans) active against infections in mice (*Mus musculus*). *Exp Parasitol* 1998; 89: 251-6.
 173. Brener Z: Chemotherapeutic studies in tissue cultures infected with *Trypanosoma cruzi*: the mode of action of some active compounds. *Ann Trop Med Parasitol* 1966; 60: 445.
 174. Docampo R, Boiso JF de, Stoppani AOM: Tricarboxylic acid cycle operation at the kinetoplast-mitochondrion complex of *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta* 1978; 502: 466-76.
 175. Docampo R, Cruz FS, Muniz RPA, Esquivel DMS, de Vasconcelos MEL: Generation of free radicals from phenazine methosulfate in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Acta Trop* 1978; 35: 221-8.
 176. Leon L, Vasconcelos ME, Leon W, Cruz FS, Docampo R, de Souza W: *Trypanosoma cruzi*: effect of olivacine on macromolecular synthesis, ultrastructure, and respiration of epimastigotes. *Exp Parasitol* 1978; 45: 151-9.
 177. Ruiz-Pérez LM, Osuna A, Castanys S, Gamarro F, Craiunescu D, Doadrio A: Evaluation of the toxicity of Rh(III) and Pt(II) complexes against *Trypanosoma cruzi* culture forms. *Arzneim Forsch/Drug Res* 1986; 36: 13-6.
 178. Ohara A, Alves MJM, Colli W, Filardi LS, Brener Z: Primaquine can mediate hydroxyl radical generation by *Trypanosoma cruzi* extracts. *Biochem Biophys Res Commun* 1986; 135: 1029-34.
 179. Albonico SM, Assem ME, Benages IA, Montiel AA, Pizzorno MT, Docampo R, et al: Synthetic trypanocides: growth-inhibiting properties of new 1,2,3,4-tetrahydrocarba-zoles on *Trypanosoma cruzi*. *Rev Arg Microbiol* 1987; 19: 121-4.
 180. Ferreira J, Coloma L, Fones E, Letelier ME, Repetto Y, Morello A, et al: Effects of t-butyl-4-hydroxyanisole and other phenolic antioxidants on tumoral cells and *Trypanosoma* parasites. *FEBS Lett* 1988; 234: 485-8.
 181. Osuna A, Ruiz-Perez LM, Gamarro F, Rodriguez-Santiago JI, Castanys S, Sharples D, et al: New antiparasitic agents. Comparison between trypanocidal activities of some acridine derivatives against *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Chemotherapy* 1988; 34: 127-33.
 182. de Diego C, Avendaño C: Effect of heterocyclic analogues of triphenylmethane dyes against *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol* 1988; 82: 235-41.
 183. Alcalde E, Dinarés I, Elguero J, Frigola J, Osuna A, Castanys S: Pyridinium azolate betaines and their derivatives: a new class of antiprotozoal agents. *Eur J Med Chem* 1990; 25: 309-19.
 184. Queiroz da Cruz M, Bräscher HM, Vargens JR, Oliveira-Lima A: Effect of actinomycin D on *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 1991; 47: 89-92.
 185. Atienza J, Martínez-Díaz RA, Gómez Barrio, Escario JA, Herrero A, Ochoa C, et al: Activity assays of thiadiazine derivatives on *Trichomonas vaginalis* and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Chemotherapy* 1992; 38: 441-6.
 186. Yakubu MA, Basso B, Kierszenbaum F: DL- α -difluoromethylarginine inhibits intracellular *Trypanosoma cruzi* multiplication by affecting cell division but not trypomastigote-amastigote transformation. *J Parasitol* 1992; 78: 414-9.
 187. Fournet A, Muñoz V, Roblot F, Hocquemiller, Cavé A, Gantier J-C: Antiprotozoal activity of dehydrozaluzanin C, a sesquiterpene lactone isolated from *Munnozia maronii* (Asteraceae). *Phytother Res* 1993; 7: 111-5.
 188. Urbina JA, Marchan E, Lazard K, Visbal G, Apitz-Castro R, Gil F, et al: Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis and cell proliferation in *Trypanosoma cruzi* by ajoene, an antiplatelet compound isolated from garlic. *Biochem Pharmacol* 1993; 45: 2381-7.
 189. Rojas de Arias A, Inchausti A, Ascurrat M, Fleitas N, Rodriguez E: In vitro activity and mutagenicity of bisbenzylisoquinolines and quinones against *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Phytother Res* 1994; 8: 141-4.
 190. Messeder JC, Tinoco LW, Figueroa-Villar JD, Souza EM, Santa Rita R, de Castro SL: Aromatic guanil hydrazones:

- synthesis, structural studies and *n vitro* activity against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorg Medicinal Chem Letter* 1995; 5: 3079-84.
191. Alves TMA, Chaves PPG, Santos LMST, Nagem TJ, Murta SMF, Ceravolo IP, et al: A diterpene from *Mikania obtusata* active on *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med* 1995; 61: 85-6.
 192. Rodrigues RR, Lane JE, Carter CE, Bogitsh BJ, Singh PK, Zimmerman LJ, et al: Chelating agent inhibition of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes *In vitro*. *J Inorg Biochem* 1995; 60: 227-88.
 193. Gottlieb P, Margolis-Nunno H, Robinson R, Shen L-G, Chimezie E, Horowitz B, et al: Inactivation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote forms in blood components with a psoralen and ultraviolet A light. *Photochem Photobiol* 1996; 63: 562-5.
 194. Rodriguez JB, Zhong L, Docampo R, Gross EG: Biological evaluation of two potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes against the intracellular form of the parasite. *Bioorg Medicinal Chem Letter* 1996; 6: 2783-6.
 195. de Oliveira AB, Saúde DA, Perry KSP, Duarte DS, Raslan DS, Boaventura MAD, et al: Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. *Phytother Res* 1996; 10: 292-5.
 196. de Conti R, Santa Rita RM, de Souza EM, Melo PS, Haun M, de Castro SL, et al: In vitro trypanocidal activities of a novel series of N,N-dimethyl-2-propen-1-amine derivative. *Microbios* 1996; 85: 83-7.
 197. Schwartzapel AJ, Zhong L, Docampo R, Rodriguez JB, Gros EG: Design, synthesis, and biological evaluation of new growth inhibitors of *Trypanosoma cruzi* (epimastigotes). *J Med Chem* 1997; 40: 2314-22.
 198. Gamage S, Figgitt DP, Wojcik SJ, Ralph RK, Ransijn A, Mael J, et al: Structure-activity relationships for the antileishmanial and antitrypanosomal activities of 1'-substituted 9-anilinoacridines. *J Med Chem* 1997; 40: 2634-42.
 199. Canto-Cavalheiro MM, Echevarria A, Araujo CAC, Bravo MF, Santos LHS, Jansen AM, et al: The potential effects of new synthetic drugs against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. *Microbios* 1997; 90: 51-60.
 200. Franke de Cazzulo BM, Bernacchi A, Esteva MI, Ruiz MA, Castro JA, Cazzulo JJ: Trypanocidal effect of SKF525A, proadifen, on different developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)* 1998; 58: 415-8.
 201. Fairlamb AH, Cerami A: Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annu Rev Microbiol* 1992; 46: 695-729.
 202. Sullivan FX, Walsh CT: Cloning, sequencing, overproduction and purification of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1991; 44: 145-8.
 203. Walsh C, Bradley M, Nadeau K: Molecular studies on trypanothione reductase, a target for antiparasitic drugs. *Trends Biochem Sci* 1991; 16: 305-9.
 204. Schirmer RH, Müller JG, Krauth-Siegel L: Disulfide-reductase inhibitors as chemotherapeutic agents: the design of drugs for trypanosomiasis and malaria. *Angew Chem Int Ed Engl* 1995; 34: 141-54.
 205. Krauth-Siegel RL, Schöneck R: Trypanothione reductase and lipoamide dehydrogenase as targets for a structure-based drug design. *FASEB J* 1995; 9: 1138-46.
 206. Carnieri EGS, Moreno SNJ, Docampo R: Trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* different stages. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 61: 79-86.
 207. Henderson GB, Ulrich P, Fairlamb AH, Rosenberg I, Pereira M, Sela M, et al: «Subversive» substrates for the enzyme trypanothione disulphide reductase; alternative approach to chemotherapy of Chagas' disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 5374-5378.
 208. Jakoby EM, Schlichting I, Lantwin CB, Kabsch W, Krauth-Siegel RL: Crystal structure of the *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase-mepacrine complex. *Protein-Struct Funct Genet* 1996; 24: 73-80.
 209. O'Sullivan MC, Dalrymple DM, Zhou Q: Inhibiting effects of spermidine derivatives on *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase. *J Enzym Inhib* 1996; 11: 97-114.
 210. Gocke E: Review of the genotoxic properties of chlorpromazine and related phenothiazines. *Mutat Res* 1996; 366: 9-21.
 211. Seebeck D, Gehr P: Trypanocidal action of phenothiazines in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 1983; 9: 197-208.
 212. Garforth J, Yin H, McKie JH, Douglas KT, Fairlamb AH: Rational design of selective ligands for trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Structural effects on the inhibition by dibenzazepines based on imipramine. *J Enzym Inhib* 1997; 12: 161-73.
 213. Chan C, Yin H, Garforth J, McKie JH, Jaouhari R, Speers P, et al: Phenothiazine inhibitors of trypanothione reductase as potential antitrypanosomal and antileishmanial drugs. *J Med Chem* 1998; 41: 148-56.
 214. Fernandez AR, Fretes R, Rubiales S, Lacuara JL, Paglini-Oliva P: Trypanocidal effects of promethazine. *Medicina (Buenos Aires)* 1997; 57: 59-63.
 215. Lacuara JL, de Barioglio SR, de Oliva PP, Bernacchi AS, de Culasso AF, Castro JA, et al: Disruption of mitochondrial function as the basis of the trypanocidal effect of trifluoperazine on *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 1991; 47: 612-6.
 216. Babson JR, Gavitt NE, Dougherty JM: Chlorpromazine protection against Ca²⁺-dependent and oxidative cell injury. *Biochem Pharmacol* 1994; 48: 1509-17.
 217. Jeding I, Evans PJ, Akanmu D, Dexter D, Spencer JD, Aruoma OI, et al: Characterization of the potential antioxidant and pro-oxidant actions of some neuroleptic drugs. *Biochem Pharmacol* 1995; 49: 359-65.
 218. Chen S, Lin C-H, Kwon DS, Walsh CT, Coward JK: Design, synthesis and biochemical evaluation of phosphonate and phosphonamide analogs of glutathionylspermidine as inhibitors of glutathionylspermidine synthetase/amidase from *Escherichia coli*. *J Med Chem* 1997; 40: 3842-50.
 219. Travis AS: Paul Ehrlich: a hundred years of chemotherapy 1891-1991. In: London the Biochemist, (ed.), The Biochemical Society 1991; pp. 9-12.
 220. Wang CC: Validating targets for antiparasite chemotherapy. *Parasitol* 1997; 114: S31-S44.
 221. Verlinde CLMJ, Hol WGJ: Structure-based drug design: progress, results and challenges. *Structure* 1994; 2: 577-87.