

## Parte I – Conceitos atuais em doença de Chagas humana e experimental

### 7. Quimioterapia experimental

Tania C. Araújo-Jorge  
Solange L. de Castro  
(Orgs.)

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

JORGE, TCA., and CASTRO, SL., orgs. *Doença de chagas: manual para experimentação animal* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p. Antropologia e Saúde collection. ISBN 85-85676-75-2. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.



All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-ShareAlike 3.0 Unported.

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença Creative Commons Atribuição - Uso Não Comercial - Partilha nos Mesmos Termos 3.0 Não adaptada.

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported.

## Capítulo 7



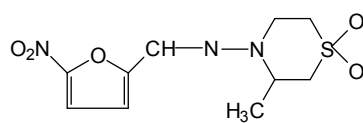
# Quimioterapia Experimental

Solange L. de Castro, Ricardo M. Santa-Rita & Marcelo Einicker-Lamas

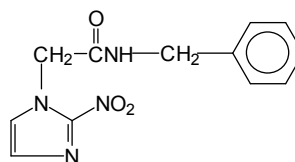
Praticamente desde a descoberta da doença de Chagas, seu tratamento vem sendo investigado. Na década de 60, o desenvolvimento de drogas contra esta doença estava relativamente atrasado em relação àquele contra infecções por outros tripanosomatídeos, sendo o *Trypanosoma cruzi* geralmente resistente a compostos ativos contra leishmanias e outros tripanosomas (Hawking, 1973). Podemos dividir o desenvolvimento da pesquisa destas drogas em duas fases, com o divisor na década de 70, quando foram descritos o nifurtimox e o benznidazol.

### 7.1 Estudos com Nifurtimox e Benznidazol

Atualmente, o tratamento da doença de Chagas está restrito a duas drogas nitro-heterocíclicas: o nitrofurano nifurtimox (Nif, Lampit, Bayer, 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino) tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) introduzido na clínica em 1965, e que teve sua produção descontinuada no Brasil, e o 2-nitroimidazol benznidazol (Bz, Radanil ou Rochagan, Roche, N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida) introduzido na década seguinte (revisto por Luquetti, 1997). Nif e Bz são ativas na fase aguda da doença de Chagas, porém têm efeito limitado sobre a forma crônica da doença (Rassi, 1982) as principais indicações destas drogas são: fase aguda da infecção, forma congênita, reativação associada com imunossupressão, infecções recentes e em situações de transfusões ou transplante de órgãos. As drogas podem também ser indicadas para o tratamento de alguns pacientes nas formas indeterminada e crônica com fraco envolvimento cardíaco. A prescrição do tratamento etiológico na fase crônica é controversa devido a dificuldades em monitorar sua eficiência terapêutica (Viotti et al., 1994) os esquemas mais utilizados de tratamento são: Nif por 60-90 dias, 8-10 mg/kg/dia em adultos e menos que 15 mg/kg/dia em crianças; Bz por 60 dias, 5 mg/kg/dia em adultos e menos de 10 mg/kg/dia em crianças. Ambas as drogas devem ser divididas em duas a três frações após as refeições. Reações adversas estão associadas a perturbações no trato digestivo como inapetência, náusea, vômito e perda de peso com Nif e dermatopatia e polineuropatia com Bz. As principais limitações das drogas são a necessidade de tempos longos de administração e efeitos colaterais (Coura, 1996; Cançado, 1997). Foram também relatadas falhas terapêuticas, provavelmente relacionadas com a variação de sensibilidade às drogas nas populações de parasitas na Américas Central e do Sul.



Nifurtimox



Benznidazol

Nif e Bz em estudos em animais experimentais o Nif, testado sobre infecções em diferentes espécies de animais, apresentou atividade dependente da cepa do parasita (Bock et al., 1969; Haberkorn & Gonnert, 1972). A análise ultra-estrutural dos amastigotas intracelulares mostrou alterações semelhantes às descritas no estudo em cultura de células (Voigt et al., 1972, 1973) bem como a indução de vacuolização, inchamento da mitocôndria e alterações de membrana parasita, além de lesões nas células cardíacas ao redor de parasitas danificados (Andrade & Freitas, 1987).

A administração de Bz a camundongos, em dose única (1 g/kg), sete dias pós-infecção (cepa Y), levou a uma queda progressiva na parasitemia, que se negativou após dez dias (Richle, 1973; Polak & Richle, 1978).

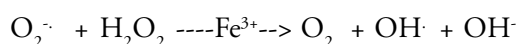
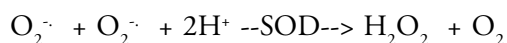
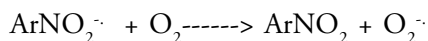
Vários estudos foram também realizados comparando-se a sensibilidade de diferentes cepas frente ao Nif e ao Bz em infecções experimentais:

- os percentuais de cura em infecções com a cepa Peru foram superiores àqueles com a cepa Colombiana, observando-se desenvolvimento de resistência ao Nif e ao Bz (Andrade et al., 1975, 1977; Andrade & Figueira, 1977);
- Brener et al. (1976), comparando as cepas Y e CL, e Andrade et al. (1985), analisando a susceptibilidade de trinta cepas de diferentes regiões, observaram uma boa correlação entre as atividades das duas drogas para uma dada cepa, indicando que os diferentes percentuais de cura estariam associados a fatores do parasita;
- analisando 47 cepas isoladas de diferentes fontes, Filardi & Brener (1987) relataram uma larga faixa de susceptibilidade ao Nif e ao Bz, correlacionada em vários casos com a região geográfica: as provenientes do sul do Brasil e da Argentina eram mais sensíveis em relação às de Minas Gerais. Essa diferença poderia estar associada a diferentes percentuais de cura de pacientes relatados na Argentina e no Brasil (Cançado & Brener, 1979).

Infectando camundongos com parasitas isolados de quatro pacientes agudos (antes do tratamento com Bz), Filardi & Brener (1987) observaram que animais que receberam parasitas provenientes dos dois pacientes tratados, considerados curados, responderam bem ao tratamento, enquanto o contrário ocorreu com aqueles infectados com parasitas dos pacientes não curados, mostrando assim correlação entre os resultados experimentais e clínicos.

Andrade et al. (1992) observaram uma correlação de 81,8% entre o resultado do tratamento de pacientes com Nif e o de camundongos recém-natos. No caso desta droga, a correlação entre as dosagens para camundongos foi baseada em Haberkorn & Gonnert (1972), que estabeleceram a equivalência entre doses de 15 ou 10 mg/kg para homens adultos e doses de 180 ou 120 mg/kg para os animais (Andrade et al., 1992).

O mecanismo de ação de Nif foi intensamente estudado pelo grupo de Do Campo (revisto em Do Campo & Moreno, 1986); a redução metabólica do grupo nitro por nitroreduases foi de fundamental importância, levando à geração de radical nitroanion. Sendo o *T. cruzi* parcialmente deficiente nos mecanismos de detoxicação, ele se torna mais susceptível a produtos de redução do oxigênio (Do Campo et al., 1976; Boveris et al., 1980; Morello, 1988).



Na presença de Nif em *T. cruzi* foram observados aumentos no consumo de  $\text{O}_2$ , na liberação de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , e na taxa de produção de ion superóxido e de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Também foi detectado o radical nitroanion na presença de NADPH em concentrações de Nif que causam efeito sobre a proliferação do parasita. A mesma estava na faixa de concentração sérica alcançada em adultos após dose única de 15 mg/kg ( $\cong 10$  mM) (Do Campo & Stoppani, 1979).

O dano oxidativo foi descartado como mecanismo de ação de Bz para *T. cruzi*, pois em concentrações semelhantes às utilizadas em estudos com Nif, nas quais a droga mostrou atividade tripanocida, não houve estímulo da geração de ion superóxido e de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Somente foi detectado radical nitroanion quando o Nif foi usado em concentrações muito superiores (10 mM) àquelas necessárias para afetar o parasita. A ação de Bz sobre *T. cruzi* poderia envolver um efeito direto sobre a síntese de macromoléculas por ligação covalente ou outras interações dos intermediários de nitroredução com componentes celulares (Polak & Richle, 1978; Goijman et al., 1985; Do Campo & Moreno, 1986), ou uma ação inibitória direta de Bz sobre a atividade catenante da DNA topoisomerase do parasita (Riou et al., 1984). Foi observada por Diaz de Toranzo et al. (1988) a ligação de Bz à DNA, lipídeos e proteínas de epimastigotas de *T. cruzi*.

Nif e Bz apresentam efeitos colaterais sérios com danos, principalmente, ao sistema nervoso central e ao trato gastrointestinal; em alguns casos o tratamento foi temporariamente suspenso ou mesmo abandonado.

Estudos em animais experimentais mostraram que potencialmente estas drogas podem produzir efeitos danosos na fertilidade e no processo reprodutivo (Hoffman, 1972; Lorke, 1972; Navarro & Nagel, 1984; Bernacchi et al., 1986; Vieira et al., 1989). O tratamento de camundongos com Nif levou a um aumento na formação de micronúcleos na medula óssea, enquanto o Bz não apresentou efeito (Gorla & Castro, 1985). Coelho tratados com Nif ou Bz (8mg/kg/dia/60 dias) apresentaram alta incidência de linfomas malignos e, no caso de Bz, em 20% dos animais foi observada atrofia testicular (Teixeira et al., 1990a,b). Por outro lado, em estudos com camundongos tratados com Bz, não foi detectado aumento na incidência de linfomas (Lima Pereira et al., 1986).

No caso de crianças chagásicas tratadas com Bz, Gorla et al. (1988) observaram um aumento nos danos ao nível de cromossomas em linfócitos periféricos. Em crianças tratadas com Nif o nível de dano genético espontâneo foi treze vezes superior às chagásicas não tratadas (Gorla et al., 1989).

## 7.2 Esquemas e Acompanhamento do Efeito de Drogas em Animais Experimentalmente Infectados

Como o *T. cruzi* infecta um grande número de células *in vitro*, o "tratamento" de culturas infectadas permite estudos quantitativos. Com quantidades pequenas de droga, é possível a detecção da atividade sobre formas intra e/ou extracelulares, bem como de sua toxicidade para a célula hospedeira. Este tipo de estudo possibilita o controle das condições experimentais. Devemos estar alertas porém para o fato de que a simplificação introduzida pelo contato direto droga/célula infectada não permite extrapolação dos resultados para situações *in vivo*, pois a influência do metabolismo e da resposta imune não podem ser avaliadas.

Entre os sistemas *in vitro* para o estudo de drogas, diferentes tipos de cultura de tecidos ou células foram utilizados (revisto em Brener, 1975, 1979 e De Castro, 1993). A abordagem *in vitro* facilita a elaboração de ensaios em animais experimentais e testes clínicos para desenvolvimento de quimioterápicos mais eficazes e menos tóxicos. Naturalmente a simplificação oferecida por esta abordagem não permite a extrapolação dos resultados para situações *in vivo*, pois, com o contato direto da droga a ser testada com a célula infectada, a influência do metabolismo e da resposta imune do hospedeiro não podem ser avaliadas.

Em experimentos com animais, a maioria dos tratamentos foi realizada com tempos muitos curtos e os resultados expressos apenas como reduções da parasitemia, mortalidade e duração da fase aguda. A introdução de esquemas de longa duração (Brener, 1961a,b) e a padronização de ensaios de acompanhamento representaram um grande avanço nessa área.

Não existe até hoje um modelo consensual claro e caracterizado no qual o efeito de um quimioterápico possa ser acompanhado nas fases aguda e crônica da infecção chagásica. No modelo de camundongo infectado por *T. cruzi* a principal característica é a existência de grandes diferenças no curso da infecção a depender da cepa de camundongo utilizada e da origem (cepa ou clone) dos parasitas (ver Capítulo 9).

O modelo clássico de estudo de quimioterapia experimental é o de camundongo albino Swiss, não isogênico, infectado com  $10^4$  tripomastigotas sanguíneos da cepa Y. Nesse modelo há alta parasitemia na segunda semana e alta mortalidade em torno da terceira semana pós infecção, claramente revertidas pelo tratamento específico.

Para estudos das fases indeterminada e crônica, é essencial que o par hospedeiro-parasita escolhido apresente as seguintes características: (a) tenha parasitemia patente, porém baixa mortalidade na fase aguda para acompanhamento nas fases indeterminada e crônica; (b) apresente curvas de parasitemia de intensidade e cinética reprodutíveis, uma vez fixados a idade e o sexo do animal, o inóculo e a via de inoculação; (c) mantenha, na fase, aguda as características clássicas básicas da infecção no camundongo: ativação policlonal, imunossupressão com apoptose, sorologia e resposta linfoproliferativa positiva para antígeno de *T. cruzi* após trinta dias de infecção e miocardite detectável, embora não necessariamente intensa. Os camundongos devem ser acompanhados por quarenta dias (fase aguda), até seis a 48 meses (fases indeterminada e crônica).

Como ponto de partida nestes estudos temos principalmente os trabalhos do grupo de Brener (Brener, 1961a,b, 1962; Filardi & Brener, 1987) e de Andrade (Andrade & Figueira, 1977; Andrade et al., 1985, 1987). Brener (1962) observou que a atividade de drogas é mais rápida e mais facilmente detectada se administrada no dia da infecção ou no dia posterior. Este autor também recomenda, no caso de nova droga, utilizar a dosagem correspondente a cerca de um quinto da  $LD_{50}$  (dose que mata 50% dos animais) administrada por dez dias consecutivos. De um modo geral o tempo de tratamento depende do modelo escolhido e, assim, da cinética de parasitemia.

Estudos preliminares, *in vivo*, de drogas tripanocidas se concentram na fase aguda e analisam apenas parasitemia e mortalidade, comparando-se animais infectados tratados e não tratados e utilizando-se os métodos descritos neste manual.

No caso de uma pré-seleção de drogas potencialmente ativas é necessário analisar mais a fundo esta atividade, utilizando além da mortalidade e da parasitemia, diferentes critérios de cura além dos acima mencionados: subinoculação de sangue em recém-nascidos, reinoculação de sangue ou homogenatos de tecidos, xenodiagnóstico, hemocultura, histologia e detecção de anticorpos específicos anti *T. cruzi* e PCR. Segundo Brener (1962), a subinoculação e o xenodiagnóstico apresentam alta eficácia e a reinoculação pode prover resultados importantes na medida que a persistência da infecção está associada com alta imunidade a superinfecções.

De um modo geral, a maioria dos estudos se apoia na cura de animais agudamente infectados, com parasitemia patente, como indicador de sucesso. Porém em infecções humanas os perfis parasitológicos, patológicos e de sensibilidade a drogas se alteram marcadamente com o progresso da infecção. Desta forma o resultado de estudos apenas com animais de fase aguda pode ser deficiente.

Mesmo em trabalhos de quimioterapia experimental utilizando os nitroheterocíclicos Nif e Bz, pouca atenção tem sido dada à resposta imune. Desta forma seria interessante o desenvolvimento de um conjunto de parâmetros indicativos do grau de ativação da resposta inflamatória, de lesão tissular, de capacidade funcional cardiovascular, de intensidade da resposta imune humoral e celular específica e inespecífica, e de expansão de células citotóxicas e/ou auto-reativas que melhor possam complementar os parâmetros parasitológicos que monitoram a carga parasitária de animais experimentalmente infectados e tratados.

### 7.3 Desenvolvimento de Novas Drogas

Como etapas cruciais no surgimento de novas drogas temos a descoberta de uma estrutura química líder, com a atividade biológica desejada, e o desenvolvimento dessa estrutura em uma forma segura e terapêuticamente efetiva (transformações químicas).

Em poucas ocasiões drogas importantes foram descobertas sem um composto líder, sendo talvez a penicilina uma das poucas exceções. A descoberta deste composto líder pode ocorrer por várias vias:

- triagem randômica: procurar atividade biológica em diferentes compostos, independentemente de sua estrutura, que invariavelmente está associada a um grande volume de triagens e com o acaso;
- triagem direcionada: realizar testes de atividade biológica, após cuidadosa escolha do composto, baseada em compostos que intuitivamente têm semelhança com um outro que apresente sinais de atividade ou que seja ativo sobre outros organismos, ou sobre enzimas ou receptores específicos;
- descoberta racional: identificar uma via metabólica, chave única e vital para o parasita; obter estrutura tridimensional do alvo ou, caso a seqüência de aminoácidos seja suficientemente semelhante a de uma proteína com estrutura conhecida, a modelagem por homologia; obter grandes quantidades de material, geralmente por clonagem; e expressão do gene do alvo. A próxima etapa é o desenho ou procura (síntese ou coleção) de inibidores específicos.

A identificação de um composto líder por qualquer abordagem leva a uma colaboração entre químicos e biólogos dentro de um processo contínuo e iterativo envolvendo: (a) isolamento ou síntese de compostos; (b) desenvolvimento de testes *in vitro* e *in vivo* adequados para análise de atividade biológica; (c) identificação de diferenças entre parasita e hospedeiro; (d) correlação de estrutura/atividade visando boa atividade biológica, permeabilidade e minimização da toxicidade para o hospedeiro; (e) expressão de alvos em quantidades que permitam estudos estruturais; (f) geração de bibliotecas de compostos com as mais diferentes estruturas.

No desenvolvimento de novas drogas, alguns grupos opõem abordagem racional *versus* abordagem empírica (Croft, 1994; Douglas, 1994; Hudson, 1994; Hunter, 1995). Ambas são necessárias mas não suficientes, uma permitindo a definição precisa e expressão de alvos e a outra permitindo a geração dos mais diversos compostos que dão um novo significado à "triagem direcionada" e fornecem esperanças para o futuro da quimioterapia parasitária. O desafio é usar ambas as abordagens para produzir drogas efetivas, baratas, de baixa (ou sem) toxicidade, alta biodisponibilidade, ativas por via oral, em número e variedade suficientes para desenvolver um arsenal que possa combater a resistência a drogas (combinações seqüenciais ou simultâneas) e funcionar também em imunossuprimidos.

## 7.4 Perspectivas da Pesquisa de Drogas Tripanocidas

A quimioterapia da doença de Chagas é uma área de pesquisa muito intensa (revisto em De Castro, 1993; Croft et al., 1997; Urbina, 1999). As indústrias farmacêuticas têm pouco interesse no desenvolvimento de quimioterápicos contra esta doença, por serem esses programas muito caros, especulativos e longos, não sendo, assim, justificados em uma base puramente comercial (Gutteridge, 1987). Cabe às instituições de pesquisa e aos governos, principalmente de países contidos nas áreas endêmicas, subsidiar este tipo de investigação.

Avanços alcançados na área de bioquímica sinalizam para enzimas glicolíticas presentes em glicosomas, bem como para a tripanotiona redutase envolvida no metabolismo antioxidante (Fairlamb & Cerami, 1992) como alvos promissores no desenvolvimento de novas drogas.

O composto alopurinol (4-hidroxipirazolo (3,4-d) pirimidina), análogo da hipoxantina, apresenta um mecanismo de ação relacionado à competição com adenosina, nucleotídeo essencial para o parasita, e ao bloqueio da síntese de novo de nucleotídeos purínicos (Hammond & Gutteridge, 1984; Marr, 1991). Este composto apresentou resultados promissores em estudos *in vitro* (revisto por Marr & Berens, 1983), levando à realização de ensaios clínicos na fase crônica da doença; os percentuais de negatização de xenodiagnóstico foram semelhantes aos obtidos com Nif e Bz, porém com menos efeitos colaterais (Sosa & Gallerano, 1988; Gallerano et al., 1990). Estudos recentes do grupo de Apt et al. (1998) demonstraram 44% de cura e 36,5% de normalização em pacientes cardiopatas tratados com alopurinol. Esta droga foi utilizada em dois casos de reativação da doença de Chagas devido a transplante cardíaco, levando à regressão de lesões cutâneas (Tomimori-Yamashita et al., 1997).

Grandes esforços estão sendo empregados na investigação do efeito de inibidores da biossíntese de ergosterol sobre *T. cruzi* (Urbina et al., 1988a,b,c, 1991, 1993, 1996, 1998). Estes compostos são usados no tratamento de doenças causadas por fungos, com o mecanismo de ação baseado na depleção de esteróis endógenos essenciais e/ou no acúmulo de intermediários tóxicos (revisto por Sheehan et al., 1999).

Um dos primeiros compostos deste grupo testado foi o ketoconazol, que se mostrou ativo sobre *T. cruzi* em estudos *in vitro* (McCabe et al., 1984; Urbina et al., 1988a). Foram observadas alterações no metabolismo de esteróis com acúmulo de produtos intermediários, em especial de precursores metilados (Urbina et al., 1988b; Goad et al., 1989). Em ensaios *in vivo* o tratamento na fase aguda levou à cura parasitológica (McCabe et al., 1983, 1987), porém na fase crônica não foi efetivo (McCabe, 1988). A combinação de ketoconazol com outros inibidores da síntese de ergosterol, como por exemplo alilamina SF-86327, lovastatina e terbinafina, mostrou um potente efeito sinérgico sobre a infecção por *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* (Urbina et al., 1988c, 1993; Maldonado et al., 1993). Em infecções experimentais, o ketoconazol não foi capaz de erradicar o parasita em animais infectados ou em pacientes chagásicos (Brener et al., 1993).

Outro composto que atua no metabolismo de esteróis é o triazol itraconazol, que se mostrou ativo em experimentos *in vitro* e *in vivo* (McCabe et al., 1986; Goad et al., 1989). Recentemente, em estudos clínicos com chagásicos crônicos, foi observada cura parasitológica em 53% dos casos com 48,2% de normalização de eletrocardiogramas (Apt et al., 1998).

Estudos com o fluconazol (ICI-195.739) mostraram sua atividade em experimentos com animais (Ryley et al., 1988). Estudos bioquímicos e ultra-estruturais sugeriram um mecanismo duplo na ação deste biazol sobre *T. cruzi*, envolvendo inibição da síntese de ergosterol ao nível da C14- $\alpha$ -desmetilase dependente de citocromo P450 e bloqueio da citocinese (Lazardi et al., 1991; Maldonado et al., 1993; Urbina et al., 1993). Este composto foi também utilizado com sucesso no tratamento de encefalite causada por reativação da doença de Chagas em um caso de paciente com Aids (Solari et al., 1993). Estudo subsequente com o isômero D(+) de fluconazol, D0870, mostrou potente atividade em pesquisas com animais experimentais nas fases aguda e crônica da doença de Chagas, sendo de trinta a cinquenta vezes mais ativo que o ketoconazol e capaz de promover de 60 a 70% de cura parasitológica (Urbina et al., 1996; Liendo et al., 1998). Esta cura foi monitorada por hemocultura, xenodiagnóstico, inoculação de homogenatos de órgãos em camundongos, hemoinoculação em camundongos jovens e PCR.

Um novo derivado triazólico, o SCH 56592 (Schering-Plough), desenvolvido como antifúngico sistêmico, mostrou ser de trinta a cem vezes mais potente *in vitro* do que o ketoconazol e o D0870 como agente antiproliferativo e inibidor da síntese de ergosterol contra *T. cruzi*. Em infecções experimentais, este composto protegeu contra a morte, produzindo de 90 a 100% de cura (Urbina et al., 1998).

A indução da resistência de *T. cruzi* a azóis, como fluconazol, e também da resistência cruzada entre ketoconazol, miconazol e itraconazol, observadas em experimentos *in vitro*, aponta para dificuldades da utilização destes compostos na clínica (Buckner et al., 1998).

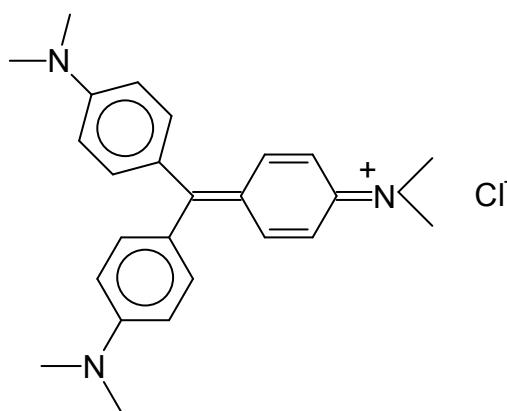
Estudos com alquil-lisofosfolípídeos têm revelado uma nova classe de compostos, promissora para o tratamento de doenças causadas por tripanosomatídeos. Na literatura temos vários relatos recentes sobre o efeito destes compostos sobre *T. cruzi*, *T. brucei* e diferentes espécies de *Leishmania* (Croft et al., 1987, 1993, 1996; Kuhlencord et al., 1992; Bourass et al., 1996; Konstantinov et al., 1997; Le Fichoux et al., 1998; Santa-Rita, 1999; Santa-Rita et al., 2000). Inclusive, a mitelfosina está sendo ensaiada no tratamento de leishmaniose visceral; 21/30 pacientes apresentaram cura, incluindo casos resistentes a antimônio (Sundar et al., 1998). O desenvolvimento destes compostos como agentes anticâncer assegura resultados sobre a farmacologia, a toxicologia e a tolerância dos mesmos em humanos, reduzindo os custos de desenvolvimento de drogas para o tratamento de doenças tropicais e, em especial, da doença de Chagas.

## 7.5 O Tratamento de Sangue Infectado

A pesquisa de drogas tripanocidas está também dirigida para compostos que possam substituir o cristal violeta como aditivo em sangue a ser transfundido. A importância epidemiológica da transmissão transfusional é importante devido ao processo de urbanização (Dias, 1992).

Devido à variação, entre vários fabricantes, na composição de violeta de genciana, este corante foi substituído por cristal violeta (seu principal componente) com forma quimicamente definida, portanto mais seguro (125 mg/500 ml sangue). Vários grupos de compostos foram ensaiados (fenotizinas, AmB, nafotquinonas, análogos trifenilmetânicos, entre outros) mas não foram capazes de substituir o cristal violeta. Os mais ativos enfrentaram problemas de toxicidade, baixa solubilidade em água e ligação a proteínas plasmáticas. Devido à dificuldade de se encontrar drogas alternativas, foi recomendado pela OMS dar continuidade à utilização de cristal violeta em serviços hemoterápicos em áreas endêmicas.

O cristal violeta não apresenta efeitos colaterais dignos de nota, porém há preocupações sobre possível toxicidade/mutagenicidade e relatos de microaglutinação de hemácias. Sua principal desvantagem é colorir o sangue, e conseqüentemente os tecidos. Seu mecanismo de ação envolve radicais livres, e o alvo principal é a mitocôndria (revisto em Gadelha et al., 1989; Do Campo, 1990).



**Cristal violeta:** cloreto de *N*-[4-[bis[4-(dimetilamino)-fenilmetileno]2,5-cyclohexadien-1-ildenol]-*N*-methylmetaminio

## Referências Bibliográficas

- ANDRADE, S. G. & FIGUEIRA, R. M. Estudo experimental sobre a ação terapêutica da droga Ro 7-1051 na infecção por diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 19:335-341, 1977.
- ANDRADE, S. G. & FREITAS, L. A. R. *Trypanosoma cruzi*: Cardiac myocells alterations due to spontaneous or therapeutically induced intracellular parasite desintegration. *Cellular and Molecular Biology*, 33:797-805, 1987.
- ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. A. & FIGUEIRA, R. M. Estudo experimental sobre a resistência de uma cepa do *Trypanosoma cruzi* ao Bay 2502. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 19:124-129, 1977.
- ANDRADE, S. G.; FIGUEIRA, R. M.; CARVALHO, M. L. & GORINI, D. F. Influência da cepa do *Trypanosoma cruzi* na resposta à terapêutica pelo Bay 2505 (Resultados de tratamento a longo prazo). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 17:380-389, 1975.



- ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B. & PONTES, A. L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bulletin WHO*, 63:721-726, 1985.
- ANDRADE, S. G.; SILVA, R. C.; SANTIAGO, M. G. & FREITAS, L. A. R. Therapeutic action of MK-436 2,5-nitroimidazole on *Trypanosoma cruzi* infections in mice: a parasitological, serological, histopathological and ultrastructural study. *Bulletin WHO*, 65:625-633, 1987.
- APT, W.; AGUILERA, X.; ARRIBADA, A.; PEREZ, C.; MIRANDA, C.; SANCHEZ, G.; ZULANTAY, I.; CORTES, P.; RODRIGUEZ, J. & JURI, D. Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 59:133-138, 1998.
- BERNACCHI, A. S.; DE CASTRO, C. R.; DIAZ DE TORANZO, E. G. & CASTRO, J. A. Effect of nifurtimox and benznidazole administration on rat testes: Ultrastructural and biochemical studies. *Experimental Molecular Pathology*, 45:245-256, 1986.
- BOCK, M.; GONERT, R. & HABERKORN, A. Studies with Bay 2502 on animals. *Boletin Chileno de Parasitologia*, 24:13-19, 1969.
- BOURASS, J.; LOISEAU, P. M. & LETOURNEUX, Y. Antileishmanial activity of rac-1-dodecyl-2-octanamido-2-deoxy-glycerophosphocholine, a new dialkylglycero-phosphocholine, *in vitro*. *Annals Tropical Medicine & Parasitology*, 90:559-561, 1996.
- BOVERIS, A.; SIES, H.; MARTINO, E. E.; DO CAMPO, R., TURRENS, J. F. & STOPPANI, A. O. M. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Journal*, 188:643-648, 1980.
- BRENER, Z. A atividade terapêutica da furaltadone, furazolidone e furadantina na infecção experimental do camundongo pelo *Trypanosoma cruzi*. *Hospital*, 60:947-951, 1961a.
- BRENER, Z. Atividade terapêutica do 5-nitro-2-furaldeído- semicarbazona nitrofurazona em esquemas de duração prolongada na infecção experimental do camundongo pelo *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 3: 43-49, 1961b.
- BRENER, Z. Chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infections. In: *Advances in Pharmacology and Chemotherapy*, 1975. NY: Academic Press, vol. 13, p. 1-44.
- BRENER, Z. Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the Western hemisphere. *Pharmacology Therapeutics*, 7:71-90, 1979.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 4:389-396, 1962.
- BRENER, Z.; CANÇADO, J. R.; GALVÃO, L. M.; DA LUZ, Z. M.; FILARDI, L. S.; PEREIRA, M. E.; SANTOS, L. M. & CANÇADO, C. B. An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88:149-153, 1993.
- BRENER, Z.; COSTA, C. A. G. & CHIARI, C. A. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 18:450-455, 1976.
- BUCKNER, F. S.; WILSON, A. J.; WHITE, T. C. & VAN VOORHIS, W. C. Induction of resistance to azole drugs in *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 42:3245-3250, 1998.
- CANÇADO, J. R. Terapêutica específica. In: *Clínica e terapêutica da doença de Chagas*. Uma abordagem prática para o clínico geral. 1997. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 323-351.
- CANÇADO, J. R. & BRENER, Z. Terapêutica. In: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 1979. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 362-424.
- COURA, J. R. Current prospects of specific treatment of Chagas' disease. *Bolletín Chileno Parasitology*, 51:69-75, 1996.
- CROFT, S. L. A rationale for antiparasite drug discovery. *Parasitology Today*, 10: 385-386, 1994.
- CROFT, S. L.; NEAL, R. A.; PENDERGAST, W. & CHAN, J. H. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochemical Pharmacology*, 36:2633-2636, 1987.
- CROFT, S. L.; NEAL, R. A.; THORNTON, E. A. & HERRMANN, D. B. J. Antileishmanial activity of the ether phospholipid ilmofosine. *Transactions Royal Society of Tropical Meidicine & Hygiene*, 87:217-219, 1993.
- CROFT, S. L.; SNOWDOWN, D. & YARDLEY, V. The activities of four anticancer alkylsophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 38:1041-1047, 1996.
- CROFT, S. L.; URBINA, J. A. & BRUN, R. Chemotherapy of human leishmaniasis and trypanosomiasis In: *Trypanosomiasis and Leishmaniasis*. 1997. Cab International, p. 245-257.
- DE CASTRO, S. L. The challenge of Chagas' disease chemotherapy: An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica*, 53:83-98, 1993.

- DIAS, J. C. Epidemiology of Chagas' disease. In: *Chagas' disease (Americam Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine*. 1992. São Paulo: ISBT, p. 49-80.
- DIAZ DE TORANZO, E. G.; CASTRO, J. A.; FRANKE DE CAZZULO, B. M. & CAZZULO, J. J. Interaction of benzimidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*, 44:880-881, 1988.
- DO CAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chemical Biological Interactions*, 73:1-27, 1990.
- DO CAMPO, R. & MORENO, S. N. J. Free radical metabolism of antiparasitic agents. *Federal Proceedings*, 45:2471-2476, 1986.
- DO CAMPO, R. & STOPPANI, A. O. M. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 197:317-321, 1979.
- DO CAMPO, R.; DE BOISO, J. F.; BOVERIS, A. & STOPPANI, A. O. M. Localization of peroxidase activity in *Trypanosoma cruzi* microbodies. *Experientia*, 32:972-975, 1976.
- DOUGLAS, K. T. Rational drug design in parasitology. *Parasitology Today*, 10:389-392, 1994.
- FAIRLAMB, A. H. & CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annual Review Microbiology*, 46:695-729, 1992.
- FILARDI, L. S. & BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas' disease. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 81:755-759, 1987.
- GADELHA, F. R.; MORENO, S. N. J.; DE SOUZA, W.; CRUZ, F. S. & DO CAMPO, R. The mitochondrion of *Trypanosoma cruzi* is a target of crystal violet toxicity. *Molecular Biochemical Parasitology*, 34:117-126, 1989.
- GALLERANO, R. H.; MARR, J. J. & SOSA, R. R. Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 43:159-166, 1990.
- GOAD, L. J.; BERENS, R. L.; MARR, J.; BEACH, D. H. & HOLZ, J. R. G. G. The activity of ketoconazole and other azoles against *Trypanosoma cruzi*: Biochemistry and chemotherapeutic action *in vitro*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 32:179-190, 1989.
- GOIJMAN, S. G.; FRASCH, A. C. C. & STOPPANI, A. O. M. Damage of *Trypanosoma cruzi* deoxyribonucleic acid by nitroheterocyclic drugs. *Biochemical Pharmacology*, 34:1457-1461, 1985.
- GORLA, N. B. & CASTRO, J. A. Micronucleus formation in bone marrow of mice treated with nifurtimox or benzimidazole. *Toxicological Letters*, 25:259-263, 1985.
- GORLA, N. B.; LEDESMA, O. S.; BARBIERI, G. & LARRIPA, I. B. Assesment of cytogenetic damage in chagasic children treated with benzimidazole. *Mutation Research*, 206:212-220, 1988.
- GORLA, N. B.; LEDESMA, O. S.; BARBIERI, G. & LARRIPA, I. B. Thirteenfold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox. *Mutation Research*, 224:263-267, 1989.
- GUTTERIDGE, W. E. New anti-protozoal agents. *International Journal of Parasitology*, 17:121-129, 1987.
- HABERKORN, A. & GONNERT, R. Animal experimental investigation into the activity of nifurtimox against *Trypanosoma cruzi*. *Arzneimittel Forschung*, 22:570-1581, 1972.
- HAMMOND, D. J. & GUTTERIDGE, W. E. Purine and pyrimidine metabolism in Trypanosomatidae. *Molecular Biochemical Parasitology*, 13:243-261, 1984.
- HAWKING, F. Chemotherapy of trypanosomiasis. In: *Experimental chemotherapy*, 1973. NY: Acad.Press, Vol. IV, p. 131-256.
- HOFFMANN, B. K. Toxicological investigations on the tolerability of nifurtimox. *Arzneimittel-Forschung*, 22:1590-1603, 1972.
- HUDSON, A. T. The contribution of empiricism to antiparasite drug discovery. *Parasitology Today*, 10:387-389, 1994.
- HUNTER, W. N. Rational drug design: A multidisciplinary approach. *Molecular Medicine Today*, 1:31-34, 1995.
- KONSTANTINOV, S. M.; KAMINSKY, R.; BRUN, R.; BERGER, M. R. & ZILLMANN, U. Efficacy of anticancer alkylphosphocholines in *Trypanosoma brucei* subspecies. *Acta tropica*, 64:145-154, 1997.
- KUHLENCORD, A.; MANIERA, T.; EIBL, H. & UNGER, C. Hexadecylphosphocholine: Oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 36:1630-1634, 1992.
- LAZARDI, K.; URBINA, J. A. & DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations induced by ICI 195,739, a bis-triazole derivative with strong antiproliferative action against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 35: 736-740, 1991.
- LE FICHOUX, Y.; ROUSSEAU, D.; FERRUA, B.; RUETTE, S.; LELIEVRE, A.; GROUSSON, D. & KUBAR, J. Short- and long-term efficacy of hexadecylphosphocholine against established *Leishmania infantum* infection in BALB/C mice. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 42:654-658, 1998.

- LIENDO, A.; LAZARDI, K. & URBINA, J. A. *In vitro* antiproliferative effects and mechanism of action of the bis-triazole D0870 and its S(-) enantiomer against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41:197-205, 1998.
- LIMA PEREIRA, F. E.; FILARDI, L. S. & BRENER, Z. Benzimidazole and nifurtimox do not increase the incidence of spontaneous lymphoma and amyloid deposition in mice treated with *Trypanosoma cruzi*. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 81 (Suppl.): 156, 1986.
- LORKE, D. Embryotoxicity studies of nifurtimox in rats and mice and study of fertility and general reproductive performance. *Arzneimittel-Forschung*, 22:1603-1607, 1972.
- LUQUETTI, A. O. Etiological treatment for Chagas disease. Technical Report. Fundação Nacional da Saúde. *Parasitology Today*, 13:127-128, 1997.
- MALDONADO, R. A.; MOLINA, J.; PAYARES, G. & URBINA, J. A. Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas' disease. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 37:1353-1359, 1993.
- MARR, J. J. Purine analogs as chemotherapeutic agents in leishmaniasis and American trypanosomiasis. *Journal Laboratory Clinical Medicine*, 118:111-119, 1991.
- MARR, J. J. & BERENS, R. L. Pyrazolopyrimidine metabolism in the pathogenic Trypanosomatidae. *Molecular Biochemical Parasitology*, 7:339-356, 1983.
- MCCABE, R. E. Failure of ketoconazole to cure chronic murine Chagas' disease. *Journal of Infectious Diseases*, 158:1408-1409, 1988.
- MCCABE, R. E.; ARAÚJO, F. G. & REMINGTON, J. S. Ketoconazole protects against infection with *Trypanosoma cruzi* in a murine model. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 32:960-962, 1983.
- MCCABE, R.; REMINGTON, J. S. & ARAÚJO, F. G. Ketoconazole inhibition of intracellular multiplication of *Trypanosoma cruzi* and protection against a lethal infection with the organism. *Journal of Infectious Diseases*, 150:594-601, 1984.
- MCCABE, R. E.; REMINGTON, J. S. & ARAÚJO, F. G. *In vitro* and *in vivo* effects of itraconazole against *Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 35:280-284, 1986.
- MCCABE, R. E.; REMINGTON, J. S. & ARAÚJO, F. G. Ketoconazole promotes parasitological cure of mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 81:613-615, 1987.
- MORELLO, A. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 90 C:1-12, 1988.
- NAVARRO, M. L. & NAGEL, R. Sperm-head abnormalities in mice induced by two antichagasic drugs. *Comparative Biology*, 3:29-32, 1984.
- POLAK, A. & RICHLE, R. Mode of action of 2-nitroimidazole derivative benzimidazol. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 72:228-232, 1978.
- RASSI, A. Tratamento etiológico da doença de Chagas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 38:277-281, 1982.
- RICHLE, R. Chemotherapy of experimental acute Chagas' disease in mice: Beneficial effect of Ro-7.1051 on parasitemia and tissue parasitism. *Le Progres Medical*, 101:282, 1973.
- RIOU, G. F.; GABILLOT, M.; DOUC-RASSY, S. & KAYSER, A. W. DNA topoisomerases of trypanosomes: inhibitory effect of some chemicals. In: *Molecular biology of host-parasite interactions*. 1984. NY: Alan R. Less, p. 279-289.
- RYLEY, J. F.; MCGREGOR, S. & WILSON, R. G. Activity of ICI 195,739 - a novel orally active bistriazole - in rodent models of fungal and protozoal infection. *Annals New York Academy of Science*, 310:328, 1988.
- SANTA-RITA, R. M. Efeito de uma nova classe de compostos sobre *Trypanosoma cruzi*: *Alquil-lisofosfolípideos*. 1999. Tese de mestrado, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz.
- SANTA-RITA, R. M.; BARBOSA, H. S.; MEIRELLES, M. N. L., & DE CASTRO, S. L. Effect of alkyllysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica*, no prelo, 2000.
- SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A. & SIBLEY, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. *Clinical Microbiological Review*, 12:40-79, 1999.
- SOLARI, A.; SAAVEDRA, H.; SEPULVEDA, C.; ODDÓ, D.; ACUÑA, G.; LABARCA, J.; MUÑOZ, S.; CUNY, G.; BRENGUES, C.; VEAS, F. & BRYAN, R. T. Successful treatment of *Trypanosoma cruzi* encephalitis in a patient with ehmfophilia and AIDS. *Clinical Infectious Diseases*, 16:255-259, 1993.
- SOSA, R. & GALLERANO, R. H. Tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica, Efectos del allopurinol. *Revista Federacion Argentina de Cardiologia*, 17:234-236, 1988.
- SUNDAR, S.; ROSENKAIMER, F.; MAKHARIA, M. K.; GOYAL, A. K.; MANDAL, A. K.; VOSS, A.; HILGARD, P. & MURRAY, H. W. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet*, 352:1821-1823, 1998.

- TAVARES, W. *Manual de quimioterápicos antiinfeciosos*. 1986. Rio de Janeiro: Ateneu, p.187.
- TEIXEIRA, A. R.; CORDOBA, J. C.; SOUTO MAIOR, I. C. & SOLORZANO, E. Chagas' disease: Lymphoma growth in rabbits treated with benznidazole. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 43:146-158, 1990b.
- TEIXEIRA, A. R.; SILVA, R.; CUNHA NETO, E.; SANTANA, J. M. & RIZZO, L. V. Malignant, non-Hodgkin's lymphomas in *Trypanosoma cruzi*-infected rabbits treated with nitroarenes. *Journal of Comparative Pathology*, 103:37-48, 1990a.
- TOMIMORI-YAMASHITA, J.; DEPS, P. D.; ALMEIDA, D. R.; ENOKIHARA, M. M.; DE SEIXAS, M. T. & FREYMULLER, E. Cutaneous manifestation of Chagas' disease after heart transplantation: Successful treatment with allopurinol. *British Journal Dermatology*, 37:626-630, 1997.
- URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas' disease: The how and the why. *Journal Molecular Medicine*, 77:332-338, 1999.
- URBINA, J. A.; LAZARDI, K.; AGUIRRE, T.; PIRAS, M. M. & PIRAS, R. Antiproliferative synergism of the allylamine SF 86-327 and ketoconazole on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 32:1237-1242, 1988c.
- URBINA, J. A.; LAZARDI, K.; AGUIRRE, T.; PIRAS, M. M. & PIRAS, R. Antiproliferative effects and mechanism of action of ICI 195,739, a novel bis-triazole derivative, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 35:730-735, 1991.
- URBINA, J. A.; LAZARDI, K.; LARRALDE, G.; AGUIRRE, T.; PIRAS, M. M. & PIRAS, R. Synergistic effects of ketoconazole and SF-86327 on the proliferation of epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Annals New York Academy of Science*, 544:357-358, 1988a.
- URBINA, J. A.; LAZARDI, K.; MARCHAN, E.; VISBAL, G.; AGUIRRE, T.; PIRAS, M. M.; PIRAS, R.; MALDONADO, R. A.; PAYARES, G. & DE SOUZA, W. Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 37:580-591, 1993.
- URBINA, J. A.; PAYARES, G.; MOLINA, J.; SANOJA, C.; LIENDO, A.; LAZARDI, M. M.; PIRAS, R. & PIRAS, M. Cure of short- and long-term experimental Chagas disease using D0870. *Science*, 273: 969-971, 1996.
- URBINA, J. A.; PAYARES, G.; CONTRERAS, L. M.; LIENDO, A.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; PIRAS, M.; PIRAS, R.; PEREZ, N.; WINCKER, P. & LOEBENBERG, D. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma cruzi*: *In vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 42:1771-1777, 1998.
- URBINA, J. A.; VIVAS, J.; RAMOS, H.; LARRALDE, G.; AGUILAR, Z. & AVILA, L. Alteration of lipid order profile and permeability of plasma membranes from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes grown in the presence of ketoconazole. *Molecular Biochemical Parasitology*, 30:185-196, 1988b.
- VIEIRA, C. L.; LAMANO-CARVALHO, T. L.; FAVARETTO, A. L.; VALENCA, M. M.; ANTUNES-RODRIGUES, I. & BARREIRA, A. A. Testes alterations in pubertal benznidazole-treated rats. *Brazilian Journal of Medical Biology*, 22:695-698, 1989.
- 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. *American Heart Journal*, 127:151-162, 1994.
- VOIGT, V. H.; BOCK, M. & GONERT, R. Ultrastructural observations on the activity of nifurtimox on the causative organism of Chagas' disease. *Arzneimittel Forschung*, 22:1586-1589, 1972.
- VOIGT, W. H.; HABERKORN, A. & GONERT, R. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen mastitogotes und amastigoter Formen von *Trypanosoma cruzi* unter dem Einfluss von Lampit. *Zeitschrift Parasitenkunde*, 41:255-267, 1973.