

AVANCES EN LA IDENTIFICACIÓN DE BLANCOS TERAPÉUTICOS Y EL DISEÑO RACIONAL DE FÁRMACOS CONTRA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS*

Itzhel García-Torres, Ruy Pérez-Montfort

Departamento de Bioquímica y Biología Estructural. Instituto de Fisiología Celular. Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito Exterior S/N. Ciudad Universitaria, Coyoacán, 04510. México D.F. Correo E: garcia.itzhel@gmail.com, ruy@ifc.unam.mx

RESUMEN

La enfermedad de Chagas, es considerada una de las enfermedades tropicales más olvidadas que afecta a más de 10 millones de personas alrededor del mundo. A más de 100 años de su descubrimiento, no se ha encontrado un fármaco que sea eficaz contra esta enfermedad en cualquiera de sus dos principales etapas. Se han realizado numerosos estudios alrededor del mundo enfocados en la selección de blancos potenciales para el desarrollo de fármacos contra la enfermedad de Chagas. En este trabajo realizamos una revisión acerca de estos estudios, haciendo énfasis en aquéllos basados en las diferencias presentadas en el metabolismo de *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico de esta enfermedad, con respecto al de su hospedero mamífero. Mediante el análisis detallado de estas diferencias metabólicas, se han revelado un importante número de blancos potenciales para el desarrollo de nuevos fármacos. De manera prometedora, el diseño racional de fármacos con base en el conocimiento de estas moléculas, ha permitido que algunos de estos nuevos compuestos, se encuentren en las primeras fases preclínicas.

ABSTRACT

Chagas disease affects over 10 million people around the world, and it is considered one of the most neglected tropical diseases. Even though this disease was discovered more than 100 years ago, there is not an effective drug against Chagas in any of its two main stages. There are several studies around the world focused on the selection of potential targets for drug development against Chagas disease. In this work, we made a revision of these attempts with emphasis in those works based on the metabolic differences between *Trypanosoma cruzi* (the etiological agent of chagas disease) and its mammalian host. As a result of the detailed analysis of these metabolic differences, a great number of potential targets for rational drug design have been revealed, and some of the most promising molecules designed are now being tested in early preclinical studies.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas es considerada por la Organización Mundial de la Salud como parte de las 13 enfermedades tropicales más olvidadas, entre las que también se encuentran la enfermedad del sueño y varios tipos de leishmaniasis. Esta enfermedad representa un problema tanto de salud como económico principalmente para varios

países de Latinoamérica. La enfermedad de Chagas también llamada tripanosomiasis americana es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, que fue descubierto por el médico brasileño Carlos Chagas en 1909. A pesar de que han transcurrido un poco más de 100 años después del descubrimiento de la enfermedad, se han recuperado DNA de *T. cruzi* de momias humanas en estudios paleontológicos que demuestran que

PALABRAS

CLAVE:

Enfermedad de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, blanco terapéutico, diseño racional de fármacos

KEY WORDS:

Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, therapeutic target, rational drug design

este parásito afecta al humano desde hace aproximadamente 9,000 años (1). Por otro lado, a pesar de que el primer reporte de la enfermedad la hizo el Dr. Chagas, existen indicios que sugieren que Carlos Darwin pudo haber contraído la enfermedad en la expedición que hizo a Sudamérica en 1835, ya que hace una descripción muy importante de la chinche besucona (vector del parásito), además de que hay evidencia que demuestra que presentó síntomas característicos de la enfermedad (2)

De acuerdo a datos de la Organización Mundial de la Salud actualizados en el 2010 (www.who.int) se estima que alrededor de 10 millones de personas se encuentran infectadas con *Trypanosoma cruzi*. Latinoamérica es la región endémica de la enfermedad de Chagas en donde se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad más de 25 millones de personas; se estima que, en el 2008, se presentaron más de 10,000 muertes debido a esta parasitosis. Esta enfermedad está asociada en forma importante con condiciones de vivienda de pobreza extrema. Los principales países afectados tienen altos índices de pobreza, y entre ellos se incluye México. La importancia de esta enfermedad a nivel mundial, ha hecho que numerosos grupos de investigación enfoquen sus esfuerzos a la identificación de blancos potenciales, así como al desarrollo de nuevos fármacos; ambos aspectos se repasarán a lo largo de esta revisión.

2. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS Y CICLO DE VIDA DE T. CRUZI

La enfermedad de Chagas técnicamente es una zoonosis; los reservorios naturales del parásito son una gran variedad de marsupiales y mamíferos del continente americano. La infección se transmite al humano por los insectos hematófagos del género *Reduviidae*. A pesar de que se han identificado más de 130 especies de triatomas capaces de transmitir el parásito al humano, tres de ellas son las más importantes, *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata*.

Esta parasitosis también puede ser transmitida por medios que no involucran al insecto vector, ya sea por transfusiones sanguíneas, o de la madre al hijo recién nacido, a través de la sangre. La transmisión del parásito debido a transfusiones es del 10-20%, dependiendo de la concentración de parásitos en la sangre infectada y de otros factores, como por ejemplo, la cepa del parásito. La frecuencia de transmisión congénita, es de un 5% y también depende de la cepa del parásito, así como del estado inmunológico de las madres, entre otros factores.

El parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) es un tripanosomátido del género Kinetoplastea. El ciclo de vida de *T. cruzi* es bastante complejo, (Fig. 1); involucra varias etapas de desarrollo tanto dentro del parásito como del insecto vector, el cual no parece verse afectado por la infección del parásito. Las formas celulares que se identifican en el hospedero mamífero son los tripomastigotes en su forma sanguínea, que no son replicativos, y los amastigotes intracelulares replicativos; mientras que, en el insecto vector se encuentran epimastigotes replicativos y tripomastigotes metacíclicos en su forma infectiva.

La enfermedad de Chagas se presenta en tres fases principales: la aguda, la indeterminada y la crónica. La fase aguda afecta comúnmente a niños y se presenta dos meses después de la infección. Durante esta fase los parásitos se multiplican como amastigotes intracelulares en los macrófagos y células tisulares en el sitio de la mordedura del insecto. En muchos de los casos, en esta fase no se presentan síntomas, o se presenta un conjunto de signos y síntomas tales como fiebre, dolores musculares, malestar generalizado, sudoración excesiva, lesiones en la piel (chagoma), inflamación de nódulos linfáticos y conjuntivitis (signo de Romana). También se puede presentar un aumento de tamaño del hígado y bazo, falla cardíaca debido a la inflamación del miocardio y en pocos casos se presentan complicaciones cerebrales, tales como meningoencefalitis. Debido a los síntomas leves, el diagnóstico puede ser determinado en solo un 10% de los casos.

En la fase indeterminada los pacientes son asintomáticos y los parásitos desaparecen del torrente sanguíneo, pero pueden ser detectados en el músculo liso y cardíaco. En muchos de los casos la enfermedad no avanza de esta fase, pero en el 30% de ellos hay una evolución hacia la fase crónica. Esta etapa se presenta con patologías graves del sistema cardíaco como arritmias severas, así como trombosis arterial y venosa. Comúnmente los pacientes con enfermedad cardíaca debido a la enfermedad de Chagas presentan un fuerte dolor en el pecho. El daño cardíaco comúnmente es biventricular. A nivel de tracto digestivo se presenta un aumento de tamaño en el esófago y colón lo que se conoce como megaesófago y megacolón, respectivamente. (3)

Desde la década de los setentas, los fármacos de elección para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el Nifurtimox y el Benznidazol. Ambos fármacos son compuestos heterocíclicos nitrogenados con un grupo nitro unido a un furano o a un anillo imidazol, respectivamente. Estos agentes funcionan como pro-fármacos y activan a

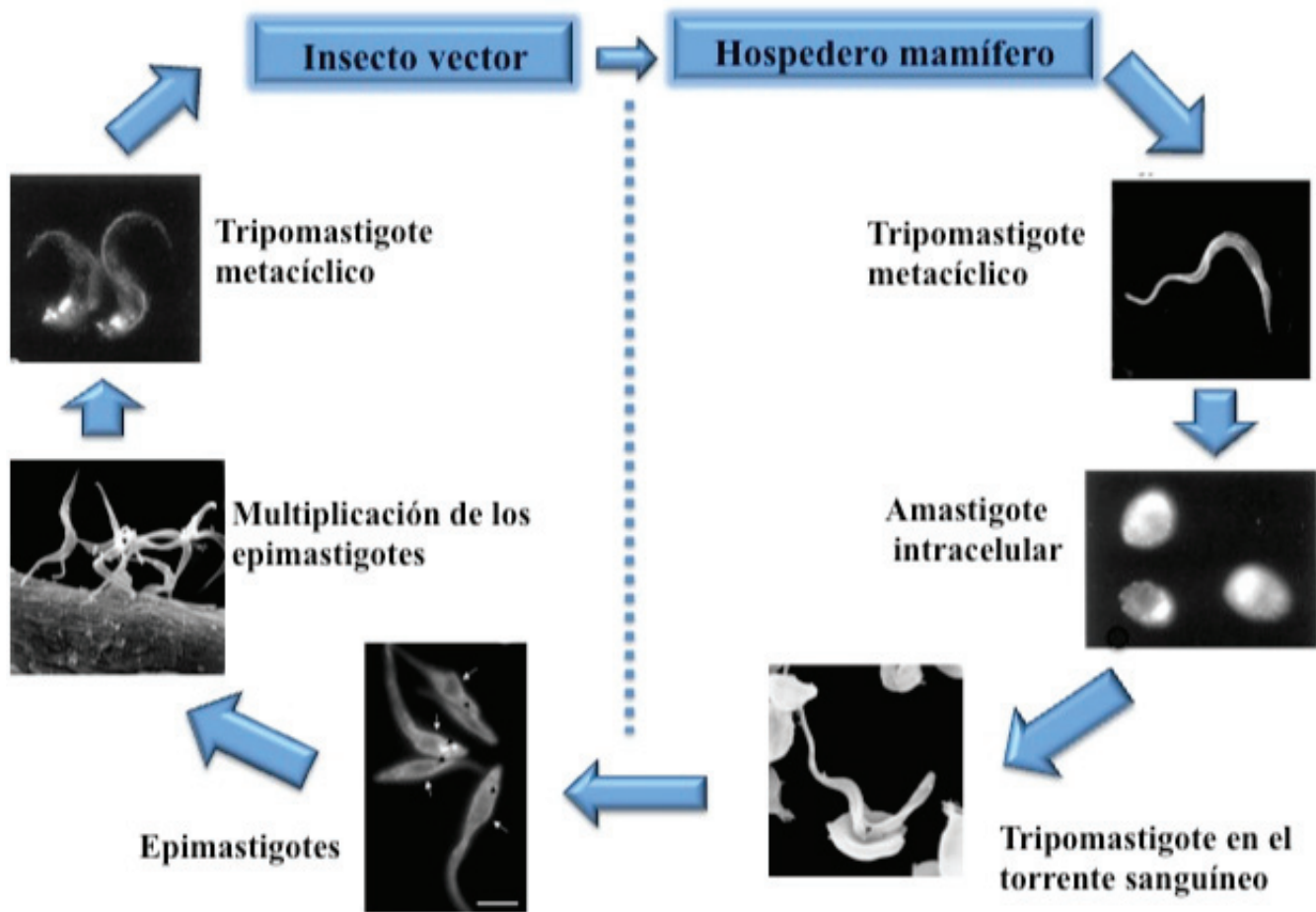


Figura 1. Ciclo de vida de *T. cruzi*. En el hospedero mamífero se encuentran los tripanomastigotes no replicativos y los amastigotes intracelulares replicativos, mientras que en el insecto vector se encuentran epimastigotes replicativos y tripomastigotes metacíclicos en su forma infectiva.

las nitroreductasas generando efectos citotóxicos. El mecanismo de acción del Nifurtimox involucra la producción de radicales libres, aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y metabolitos electrofílicos que afectan al parásito (4). El Benznidazol actúa inhibiendo la síntesis de proteínas y la cadena respiratoria y, se ha demostrado que los metabolitos reducidos de este fármaco unidos covalentemente a macromoléculas interaccionan con el DNA del parásito (5). Desafortunadamente, ambos fármacos solo son eficientes en la fase aguda de la enfermedad o bien en aquellos pacientes que presentan reincidencias de la infección por estar inmunosuprimidos. Este tratamiento se encuentra contraindicado en mujeres embarazadas y en pacientes con insuficiencia renal o hepática. La terapia no es del todo exitosa, debido que se produce toxicidad sistémica y efectos adversos especialmente en adultos, entre los que se encuentran pérdida de peso, náuseas, vómito, leucopenia, trombocitopenia, agranulocitosis, alteraciones dermatológicas,

como dermatitis, y, dentro las más severas, se encuentran las polineuropatías dependientes de dosis (6). También se ha reportado diferencia en la susceptibilidad a estos fármacos, dependiendo de la cepa del parásito involucrada (7).

Hasta el momento no existe algún fármaco que sea eficaz en ambas fases de la enfermedad y que además no presente efectos colaterales. De esta necesidad surgen diversos estudios a lo largo del mundo con el único propósito de encontrar el blanco terapéutico ideal y el compuesto inhibidor específico contra *T. cruzi* que no altere el metabolismo del hospedero mamífero.

3. ALGUNAS DIFERENCIAS NOTABLES ENTRE TRYPANOSOMA CRUZI Y SU HOSPEDERO MAMÍFERO

Existen diferencias importantes en el metabolismo de tripanosomátidos con respecto a su hospedero mamífero; estas peculiaridades cobran vital impor-

tancia para el diseño racional de fármacos especie-específicos, interfiriendo en el metabolismo del parásito sin afectar el del huésped mamífero. A nivel de metabolismo energético existe una diferencia notable, ya que en los tripanosomátidos gran parte de la glicólisis se lleva a cabo dentro del glicosoma, organelo especializado de origen peroxisomal. Ocho de las diez enzimas que participan en la vía se encuentran compartimentalizadas en este organelo, (Fig. 2). De manera interesante, se ha encontrado que las enzimas glicolíticas que se encuentran compartimentalizadas en el glicosoma poseen puntos isoeléctricos mayores con respecto a sus homólogas encontradas en el citosol de las células de mamífero (8). Existe una clasificación, en donde se agrupan a diversos parásitos de acuerdo a su metabolismo energético (9). *T. cruzi* fue clasificado en el grupo 4 al que pertenecen aquellos parásitos con las capacidades metabólicas más complejas. En esta categoría también se encuentran la forma procíclica de *T. brucei* y todas las etapas en el mamífero y en el hospedero de *Leishmania spp.* Estos

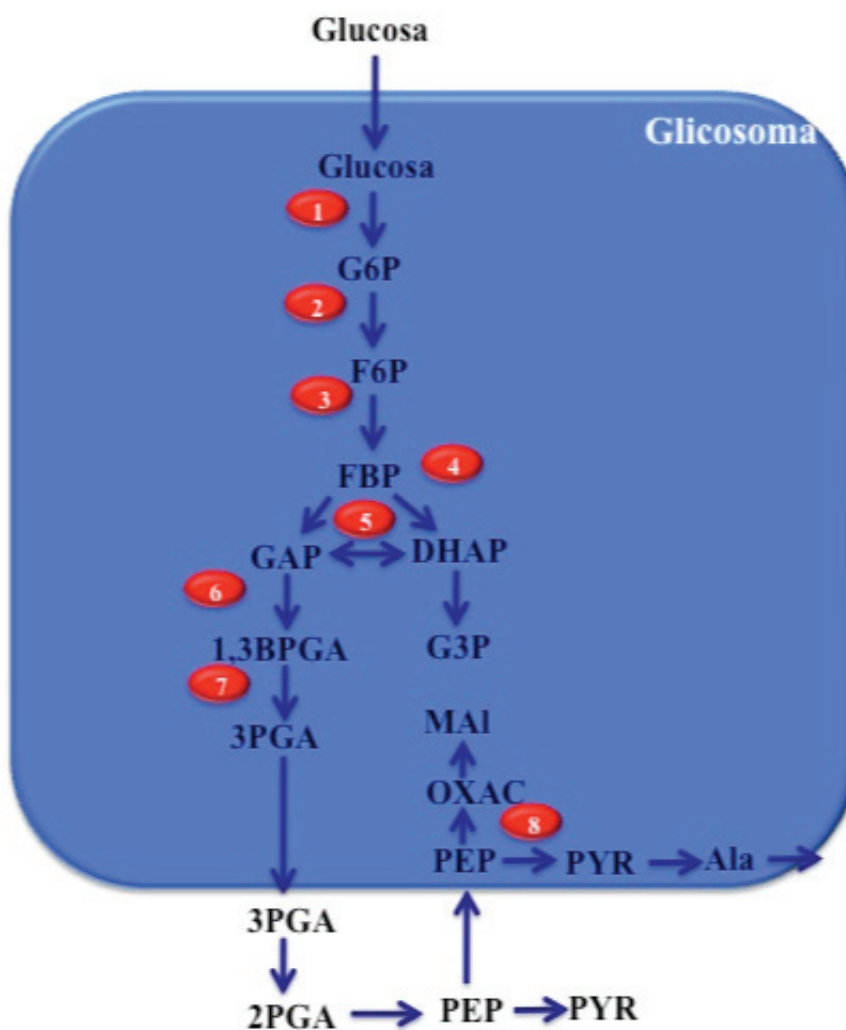
tripanosomátidos no son dependientes únicamente de la glucosa para la obtención de energía, poseen un metabolismo mitocondrial complejo y, además de glucosa, también pueden degradar aminoácidos. Así mismo, utilizan la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa para la obtención de ATP.

Los tripanosomátidos, a diferencia de sus hospederos, obtienen parte importante de su energía de la hidrólisis del pirofosfato inorgánico (PPi), la cual genera de 10 a 15 veces más energía que el ATP. El PPi se distribuye a través de la célula pero se concentra en los acidocalcisomas. Existen enzimas que se encargan de la hidrólisis del PPi, entre las que se encuentran la pirofosfatasa translocadora de protones en los acidocalcisomas y la piruvato fosfato dicinasa en el glicosoma. Por ser exclusivas del metabolismo de estos parásitos, resultan blancos importantes para el desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios.

Existen dos sistemas exclusivos de tripanosomátidos, los cuales han sido objeto de numerosos estudios para el desarrollo de nuevos fármacos. El

Figura 2. Enzimas glicolíticas compartimentalizadas en el glicosoma de *T. cruzi*.

1. Hexocinasa,
2. Glucosa-fosfato isomerasa,
3. Fosfofructo cinasa,
4. Fructosa bifosfato aldolasa,
5. Triosa fosfato isomerasa,
- 6.- Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa,
7. Fosfoglicerato cinasa,
8. Piruvato fosfato dicinasa.



tripanotión y el sistema de la tripanotión reductasa se encuentran exclusivamente en los protozoarios del género Kinetoplastea y reemplazan al glutatión intracelular y al sistema glutatión reductasa que constituye el mecanismo principal del sistema de reducción tiol. Así mismo, el sistema de la glioxalasa está íntimamente relacionada con la ruta del tripanotión y la tripanotión reductasa, ya que en conjunto se encargan de la detoxificación del metilglioxal, metabolito citotóxico y mutagénico generado inevitablemente en la glicólisis. La glioxalasa de parásitos protistas cobra importancia como blanco para el diseño de fármacos por el hecho de que utiliza como catión divalente el níquel, mientras que la enzima de eucariotes utiliza como cofactor al zinc; de igual manera existen diferencias importantes en el sitio catalítico entre la glioxalasa de los tripanosomátidos y su contraparte en mamíferos (10).

Otro de los blancos terapéuticos de gran importancia, y exclusivos de *T. cruzi*, es la cruzipaina, proteasa específica de este parásito que se encuentra expresada en todas las fases de su ciclo de vida. Es similar a la cathepsina y es la responsable de la actividad proteolítica a lo largo de la vida de este parásito (11). Existen numerosos estudios que pretenden dilucidar el mecanismo de acción de esta proteasa con el fin de encontrar algún inhibidor capaz de inactivarla, con la consecuente muerte del parásito.

T. cruzi, al igual que muchos hongos y levaduras, requiere esteroides específicos para la viabilidad y proliferación celular en todas las etapas de su ciclo de vida (12). Por muchos años se creyó que los tripanosomátidos, al igual que células de mamíferos, sintetizaban colesterol, ya que crecían en medios suplementados con tejido de corazón o cerebro. Gracias a importantes estudios bioquímicos se llegó a la conclusión de que los tripanosomátidos sintetizaban ergosterol en lugar de colesterol por lo cual, la vía de síntesis del ergosterol se considera una ruta metabólica importante en los hongos y en los miembros del orden Trypanosomatida y ha sido un blanco importante de inhibición.

Con la liberación de los genomas completos de *T. cruzi*, *T. brucei* y *Leishmania major*, se pudieron identificar, respectivamente, 171, 156 y 179 secuencias que codifican protein-cinasas; esto ha permitido comparar estas enzimas con las correspondientes en el humano, con la finalidad de poder identificar y validar algunos posibles blancos terapéuticos. Las protein-cinasas son reguladoras importantes de muchos eventos celulares como el control transcripcional, la progresión del ciclo celular y la diferenciación, por lo que han cobrado importancia como blanco para el diseño de fár-

macos para el tratamiento de un gran variedad de enfermedades y síndromes. El genoma de las protein-cinasas de los tripanosomátidos corresponde a un tercio del total de protein-cinasas en el humano, por lo que difiere en numerosos aspectos al de su hospedero mamífero (13).

4. ALGUNOS BLANCOS TERAPÉUTICOS ESTUDIADOS PARA EL DISEÑO DE FÁRMACOS CONTRA LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

4.1 Enzimas que se encuentran compartimentalizadas en el glicosoma

La compartimentalización de ocho de las diez enzimas glicolíticas en el glicosoma de los tripanosomátidos es una característica muy relevante que ha permitido llevar a cabo numerosos estudios de las enzimas involucradas. La hexocinasa es la primer enzima en la vía glicolítica, en *T. cruzi* (TcHK); esta enzima no se inhibe por su principal regulador en vertebrados, la D-Glucosa 6 -fosfato. Estudios recientes demuestran la inhibición no competitiva de la TcHK por el difosfato inorgánico (PPi) con una K_i de 500 μM . Se ha identificado una familia de análogos del PPi metabólico, llamados bifosfonatos, que son inhibidores potentes y selectivos de la TcHK, además de inhibir la proliferación de amastigotes en cultivo. Se encontraron tres compuestos: el (9-etil-9H-3-carbazolil)-amino-metileno-1,1-bifosfonato, $IC_{50} = 0.81 \mu\text{M}$, el (3-bromo-fenil)-amino metileno-1,1-bifosfonato, $IC_{50} = 0.95 \mu\text{M}$ y el (2-(piridin-4-il)-1-hidroxietano-1,1-bifosfonato, $IC_{50} = 12.7 \mu\text{M}$, que inhiben a la TcHK de manera mixta y no competitiva; además de presentar un efecto selectivo contra la forma intracelular amastigote. Estos compuestos tienen un ligero efecto en el crecimiento de células de una línea celular humana por lo que representan una novedosa clase de agentes antiparasitarios que inhiben de manera selectiva la actividad de la hexocinasa (14).

Una de las enzimas glicolíticas glicosomales más estudiadas, es la triosafosfato isomerasa (TIM) que cataliza la interconversión entre la dihidroxiacetona fosfato y el gliceraldehído 3-fosfato. Existen numerosos estudios de la TIM de *T. cruzi* (TcTIM) ya que posee algunas peculiaridades y diferencias con respecto a la TIM de humano (HuTIM). El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de ambas enzimas presentan un identidad del 52%, (Fig. 3). La TcTIM, enzima catalíticamente activa sólo en su forma dimérica, ha sido propuesta como blanco para el diseño de fármacos; particularmente se ha tenido gran interés en la interfase, que se encuentra entre los dos monómeros, y que está constituida por 32 aminoácidos. Si bien los sitios

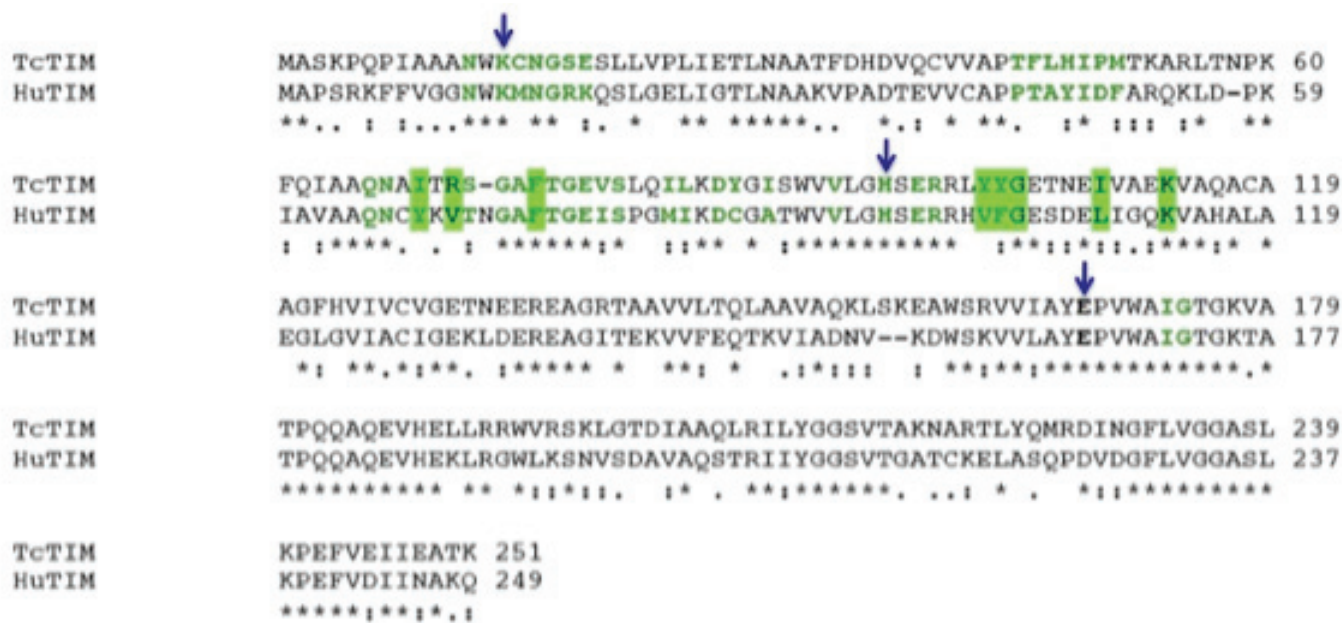


Figura 3. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las triosasfosfato isomerasas de *T. cruzi* (TcTIM) y Humano (HuTIM). Ambas enzimas poseen un 52% de identidad. Con flechas se indican los aminoácidos del sitio catalítico, en verde los aminoácidos de la interfase y resaltados en verde los aminoácidos de la cavidad hidrofóbica de la interfase. El alineamiento se llevó a cabo utilizando el programa Clustal W.

catalíticos son altamente conservados, las interfases de los oligómeros lo son menos, por lo que estas regiones pueden ser utilizadas como blancos para el diseño de fármacos. En la interfase de TcTIM existe una cavidad hidrofóbica conformada por 8 aminoácidos. En HuTIM, solo tres de los ocho residuos en esta cavidad son idénticos a los de TcTIM (Fig 3). Partiendo de estas diferencias se han sintetizado algunos compuestos derivados de benzotiazoles con resultados prometedores. Entre los compuestos más eficaces se encuentra el 6,6'-benzotiazol-2,2'-diamina que, en concentraciones del orden micromolar, causa inactivación reversible en TcTIM y las TIM de *T. brucei* (TbTIM) y de *L. mexicana* (LmTIM). Estas TIM comparten un 82% de identidad en los residuos de la interfase y un 88% en la cavidad hidrofóbica, y no así con las TIM con una cavidad hidrofóbica diferente, entre las cuales se encuentra HuTIM (15). Otro compuesto que ha resultado eficaz en la inhibición específica de TcTIM es la ditiodianilina (DTDA), se requiere de una concentración de 260 nM para inhibir la actividad de TcTIM, mientras que la actividad de TbTIM, LmTIM y HuTIM a estas concentraciones se mantiene intacta. Este compuesto resultó también eficaz en la inhibición del crecimiento de *E. coli* transformada con un plásmido con el gen de TcTIM reemplazando a la TIM bacteriana, lo que demostró que la DTDA es capaz de atravesar membranas biológicas. Utilizando concentraciones que van desde

4 a 8 μM provocó la muerte de epimastigotes de *T. cruzi*. A pesar de que este compuesto presenta varios efectos citotóxicos, puede servir como molécula líder en la búsqueda de nuevos compuestos con actividad tripanosomacida debido a su efecto específico en TcTIM y a las interacciones que provoca en la estructura de la enzima (Fig. 4), (16).

Con el fin de buscar moléculas que interfirieran con la interfase del dímero de la TIM, en un estudio reciente se probó la inhibición de la actividad de TcTIM con una biblioteca de 230 compuestos de diferentes quimotipos. Se identificaron cuatro tipos de compuestos: 1,2,6-tiadiazinas, fenazinas, 5,9-dióxidos y tiazoles, que presentaron mayor selectividad por la TcTIM que la HuTIM. Se probó la actividad de estos compuestos contra *T. cruzi* y la fenazina 5,9-dióxido fue el más eficaz en matar a *T. cruzi* (17).

La gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de tripanosomátidos también presenta importantes diferencias con respecto a la GAPDH humana. La GAPDH cataliza la fosforilación oxidativa del gliceraldehído 3-fosfato a 1-3 difosfoglicerato en presencia de NAD^+ y fosfato inorgánico. El análisis de las estructuras cristalográficas de las GAPDH de *T. brucei*, *L. mexicana*, *T. cruzi* y del humano revelaron diferencias sobresalientes alrededor del sitio de unión del NAD^+ . La GAPDH de humano, así como la de tripanosomátidos, poseen una región en la cual se puede acomodar el

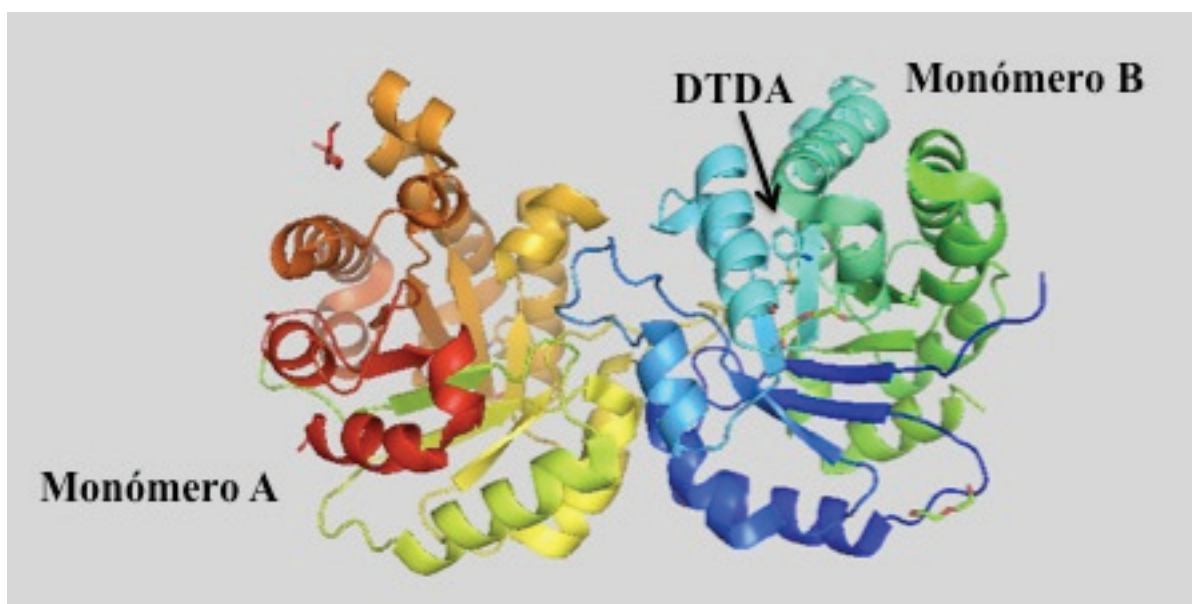


Figura 4. Localización del DTDA (2,2-ditiodianilina) en la estructura cristalográfica de TcTIM. La figura se preparó utilizando el programa PYMOL con las coordenadas depositadas en el PDB con el código 2OMA.

grupo hidrofóbico N⁶ de la adenosina. Estos sitios son idénticos en estas dos enzimas, excepto que la cavidad en la enzima de los tripanosomátidos es más hidrofóbica que la de la enzima del humano. Una de las sustituciones que contribuyen de manera importante a una mayor hidrofobicidad es la de una valina en la posición 113 en la enzima humana que corresponde a una leucina en la GAPDH de tripanosomátidos. De esta manera se diseñaron compuestos análogos a adenosina con el propósito de bloquear selectiva y competitivamente la unión del NAD⁺ a las GAPDH de los tripanosomátidos. De manera particular el análogo de adenosina N6-(1-naftalenmetil)-2'-(3-clorobenzamida) inhibió el crecimiento de cultivos de amastigotes de *T. cruzi* con una ED₅₀ de 3 μM (18).

Partiendo del hecho de que el control de la infección por *T. cruzi* en el huésped mamífero es dependiente de la activación de macrófagos y de la producción de óxido nítrico (NO), con la consecuente destrucción del parásito, se han diseñado novedosos compuestos de rutenio, que contienen donadores de NO, a los que se les ha evaluado sus efectos en cultivos celulares, en modelos animales de la enfermedad de Chagas y en su eficacia para inhibir la actividad de la GAPDH de *T. cruzi*. Los compuestos de rutenio más eficaces fueron cis-[Ru(NO)(bpy)2imN](PF₆)₃, cis-[Ru(NO)(bpy)21-miN](PF₆)₃ y cis-[Ru(NO)(bpy)2SO₃](PF₆)₃ con porcentajes de inhibición del 85 al 97% a una concentración de 200 μM. Los valores de IC₅₀ para estos compuestos son de 89, 97 y 153 μM,

respectivamente. La eficacia de estos compuestos no solo fue a nivel de la actividad de la GAPDH, si no que también son letales para cultivos de tripanosomátidos, epimastigotes y células infectadas con el parásito en su forma amastigote. De igual manera, se sugiere que el mecanismo de acción de estos compuestos de rutenio puede ser mediante la S-nitrosilación de la cisteína 166 del sitio catalítico de la GAPDH de *T. cruzi* (19).

Muchas de las rutas metabólicas que se llevan a cabo en el glicosoma, son dependientes de la producción de PPI. La hidrólisis del PPI por las pirofosfatasas libera mucha energía que permite que se lleven a cabo reacciones con alto consumo de energía, sin embargo no se ha detectado actividad de pirofosfatasa, ni en la forma sanguínea de *T. brucei*, ni en amastigotes de *T. cruzi*. En algunos parásitos, incluyendo los tripanosomátidos, se ha encontrado la enzima piruvato fosfato dicinasa (PPDK). Se ha confirmado la localización de la TcPPDK en el glicosoma y, además, al no detectarse pirofosfatasa en la fracción glicosomal, se ha pensado que la TcPPDK solo trabaja en la dirección de consumo de fosfoenol piruvato (PEP) y PPI (20).

4.2 El sistema del tripanotión, la tripanotión reductasa y la glioxalasa

El tripanotión, junto con la tripanotión reductasa, sustituye al sistema del glutatión/glutatión reductasa (GSH/GR) y ambos se encargan de las funciones antioxidantes que regulan el balance tiol-

redox en los tripanosomátidos. Así como otros organismos, estos parásitos se encuentran expuestos a especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo que la ausencia de la ruta de la GR, que se encuentra en el huésped mamífero, convierte a las enzimas involucradas en el metabolismo del tripanotión en blancos potenciales para el desarrollo de fármacos especie-específicos contra tripanosomátidos. La biosíntesis del tripanotión involucra dos reacciones: en primer lugar se lleva a cabo la síntesis del conjugado glutationil-espermidina, con la consecuente síntesis del tripanotión en una segunda reacción. En *T. brucei*, la espermidina se sintetiza a partir de la ornitina vía la putrescina que, subsecuentemente, se coordina con el GSH para dar origen a la glutationil-espermidina y posteriormente al tripanotión. De manera peculiar, en epimastigotes de *T. cruzi*, no hay síntesis de novo de las poliaminas a partir de precursores aminoacídicos, por lo que se importa cadaverina y putrescina del exterior para ser convertidos via espermidina, o aminopropilcadaverina, en tripanotión y homotripanotión, respectivamente. En el parásito *Crithidia fasciculata* se han identificado dos enzimas involucradas en la síntesis del tripanotión: la glutationil-espermidina sintetasa y la tripanotión sintetasa (21). De manera contraria a lo encontrado en *C. fasciculata*, en *T. cruzi* se reportó que una sola enzima: la tripanotión sintetasa (TcTryS), lleva a cabo tanto la síntesis de la glutationil-espermidina, como la formación del tripanotión, y, además, se demostró que esta enzima tiene una doble función de sintetasa y amidasa capaz de hidrolizar tripanotión, homotripanotión y glutationil-espermidina, actividades que no se han observado en ningún tripanosomátido. Debido a lo antes descrito, esta enzima resulta un blanco importante para el diseño de nuevos fármacos específicos contra *T. cruzi* (22). La TcTryS tiene un amplio rango de especificidad de sustratos, ya que puede sintetizar tripanotión mediante la conjugación de glutatión con otras poliaminas fisiológicas diferentes a la espermidina; esto resulta favorable para el parásito ya que, como se mencionó antes, en *T. cruzi* no se lleva a cabo síntesis de novo de poliaminas. Esta característica resulta importante en el diseño de fármacos, ya que se pueden diseñar inhibidores del metabolismo tripanotión utilizando el esqueleto de poliaminas (23).

Otra enzima involucrada en el equilibrio redox es la tripanotión reductasa (TryR) la cual, en *T. cruzi*, también presenta diferencias notables en la especificidad de sustrato comparada con la glutatión reductasa del huésped mamífero. Existen varios estudios tomando como base la estructura de esta enzima en la que se han identificado algunos compuestos con potencial actividad antiparasitaria

contra *T. cruzi*. Utilizando un método híbrido, que combina el análisis de similitudes de ligandos y docking computacional, se pudo identificar una biblioteca de 603 moléculas con posible unión a la TryR. Con 19 de ellas se hicieron estudios de inhibición de la actividad TryR de *T. cruzi* y *T. brucei*, obteniendo valores de IC₅₀ menores a 100 μ M. Estos compuestos pertenecen a quimotipos con actividad antitripanosomal que no se habían reportado antes tales como: dibenzotiepinas, dibenzooxatiepinas, dibenzoditiepinas, y tiazatetraciclo, 2,4,6-trioxohexahidropirimidinas (24).

El sistema de la glioxalasa se encuentra también involucrado en la detoxificación de los tripanosomátidos. Está constituido por dos enzimas, glioxalasa I (GLO1) y glioxalasa II (GLO2); ambas enzimas requieren de un cofactor tiol para llevar a cabo su función. Este sistema enzimático se encarga principalmente de la detoxificación del metil glioxal, un α -oxoaldehído altamente tóxico, que se genera como subproducto en la glucólisis y en el metabolismo de la treonina, con capacidad citotóxica, citostática y mutagénica (10). Se han identificado las glioxalosas de *T. brucei* (TbGLO2 (25)), *L. major* (LmGLO1 (26)), y *T. cruzi* (TcGLO1, (27)). Las tres son enzimas que dependen del tripanotión para su actividad y utilizan como cofactor níquel, mientras que la enzima homóloga en el humano utiliza Zinc. En el extremo aminoterminal de la glioxalasa de los tripanosomátidos existe un residuo de histidina conservado, que indica que posee el sitio de unión a níquel, mientras que, en la enzima del humano y del ratón se encuentra una glutamina en la misma posición, la cual confiere la selectividad por zinc (10). Si bien TcGLO1 utiliza preferencialmente níquel para activarse, a diferencia de LmGLO1 y TbGLO2, utiliza otros cationes divalentes como cobalto, manganeso y zinc (nombrados en orden de preferencia). Esta versatilidad probablemente se deba a la diferente biodisponibilidad de cofactores metálicos en las células del hospedero mamífero o en el insecto vector. TcGLO1 tiene una especificidad por sustrato mucho mayor por hemitioacetales de tripanotión y glutationilespermidina que por hemitioacetales de glutatión, que son los sustratos de elección de la glioxalasa de humano. De estos dos sustratos, TcGLO1 tiene mayor afinidad por los aductos de glutationilespermidina de metilglioxal o feniloxal. Esta especificidad de sustrato, y la diferencia con las especificidades de la enzima humana, se relaciona directamente con las diferencias estructurales encontradas en el sitio activo. Los aminoácidos involucrados en la especificidad de la glioxalasa humana por hemiacetales de glutatión se encuentran en un asa formada entre los residuos Pro 102 y Val

109; cuatro de estos residuos no se encuentran en la correspondiente región de la glioxalasa I de los tripanosomátidos. La ausencia conservada de estos residuos está directamente relacionada con la especificidad de la glioxalasa I en parásitos por hemiacetales de tripanotión (26). Debido a la alta afinidad de la TcGLO1 por los aductos de glutatiónil-espermidina se probó el efecto inhibitorio de la (S)-4-Bromobencil-glutatio-nil-espermidina, la cual presentó una inhibición competitiva con respecto al hemitioacetal tripanotión. Esta inhibición es 10 veces mayor comparada con la enzima homóloga en *L. major*. A partir del esqueleto de la glutatiónil-espermidina, se pueden diseñar moléculas eficaces para la inhibición específica de la TcGLO1 (27).

4.3 Proteasa específica de *T. cruzi*: la cruzipaína

Uno de los blancos terapéuticos más estudiados en contra de la enfermedad de Chagas es la cruzipaína, una cisteín-proteasa miembro de la familia

papaína C1. Se ha comprobado que esta proteasa es crítica para la viabilidad del parásito, además de cumplir una función muy importante en la capacidad del parásito para invadir tejidos y evadir la respuesta inmune. Esta proteasa se expresa en todas las etapas del ciclo de vida de *T. cruzi*, pero su localización varía de acuerdo a la etapa. En el epimastigote, la proteasa se encuentra en el lisosoma, en el amastigote se encuentra tanto en el lisosoma como en la superficie del parásito. Uno de los inhibidores más estudiados, que, incluso, se encuentra actualmente en estudios preclínicos, es el K777, (Fig. 5A). Se ha probado que el blanco selectivo del K777 es la cruzipaína y que resulta efectivo para curar infecciones por *T. cruzi* en modelos en ratones de infección aguda y no aguda, de igual manera tiene un efecto importante en la disminución del daño cardíaco en perros. Al escalar las dosis utilizadas en estos modelos para estimar la dosis que puede ser usada en el humano se predijo que aproximadamente una dosis oral de 10 mg/kg durante 14-30 días puede ser efectivo para

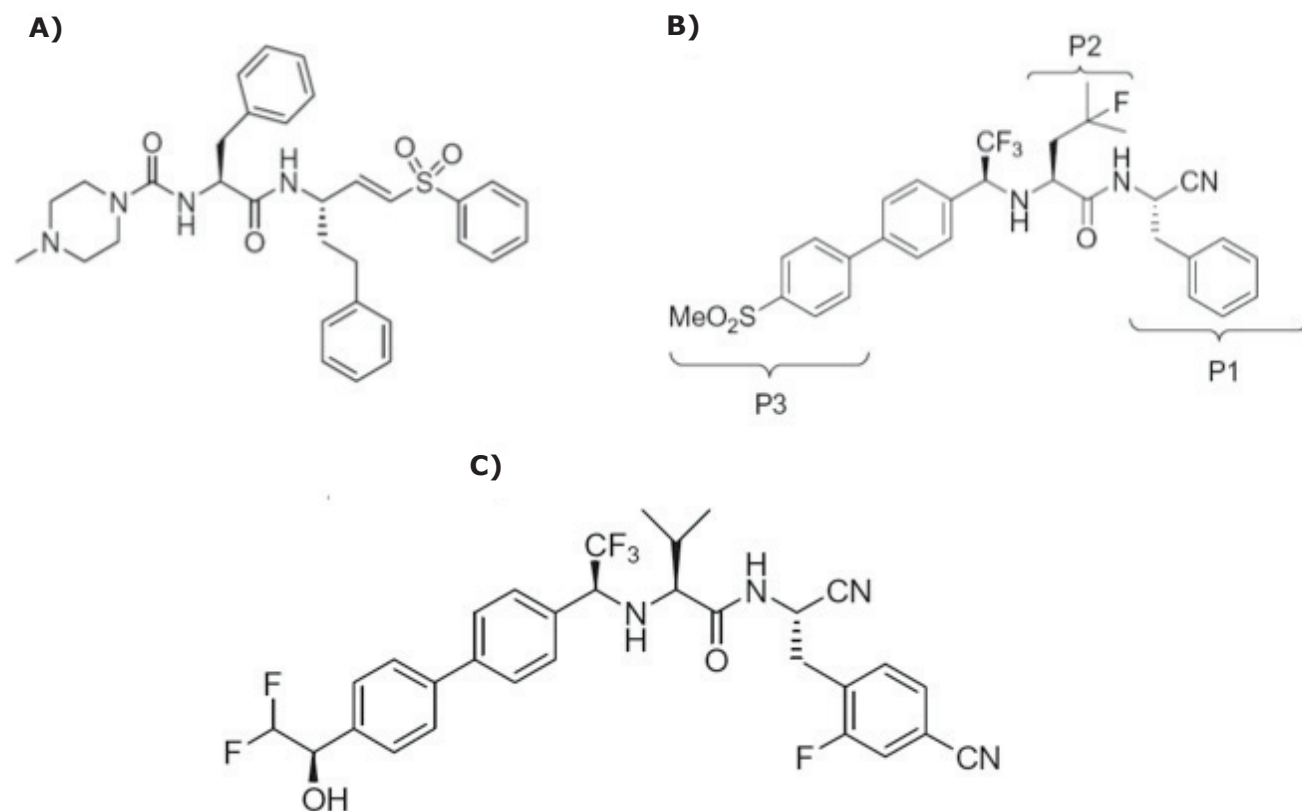


Figura 5. Fórmulas químicas desarrolladas de compuestos inhibidores específicos de la cruzipaína de *T. cruzi*. Panel A: Estructura del inhibidor K777 de la cruzipaína N-metilpiperazina-Fenilalanina-homoFenilalanina-vinilsulfona-fenil. Panel B: Esqueleto de inhibidores reversibles de la cruzipaína con 3 porciones P1, P2 y P3 que equivalen a sustituyentes diferentes. Panel C: Estructura del inhibidor reversible más efectivo de la cruzipaína reportado por Beaulieu C., et al 2010 (30).

implantar un régimen terapéutico contra la enfermedad de Chagas. En el 2005, se detuvieron los estudios para establecer como fármaco de elección al K777 debido a que en estudios de toxicidad, se presentó una importante elevación de la alanina aminotransferasa (ALT) que indica hepatotoxicidad. A partir de este año el NIAID (siglas en inglés del Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas) ha empezado la producción de grandes cantidades de este compuesto con el fin de iniciar estudios de fase I en humanos voluntarios sanos (28).

Existen varios estudios enfocados a identificar inhibidores irreversibles que se unan covalentemente a la proteasa. Estos inhibidores contienen grupos electrofílicos entre los cuales se encuentran las peptidildiazometilcetonas, peptidilfluorometilcetonas y peptidil vinil sulfonas. Estos inhibidores son capaces de bloquear la diferenciación del parásito en las distintas fases de su ciclo de vida. El derivado vinil sulfónico, la N-piperazina-Fenil-hFenil-vinil sulfona fenil resultó ser un excelente inhibidor de la cruzipaína, ya que provocó la muerte de los parásitos mediante la inducción de la acumulación de la proteasa no procesada en el aparato de Golgi. A su vez este compuesto fue probado *in vivo* en modelos murinos de la enfermedad (11). Desafortunadamente los inhibidores irreversibles también inhiben las cisteína-proteasas del huésped por lo que pudieran presentar severos efectos adversos relacionados con la unión covalente a estas proteasas. Algunos otros grupos de investigación han desarrollado inhibidores reversibles específicos a la cruzipaína. La cruzipaína se relaciona directamente con la familia de las catepsinas. Tomando como esqueleto inhibidores reversibles no básicos de las catepsinas, se han identificado potentes inhibidores reversibles para la cruzipaína. El esqueleto de esta serie de inhibidores se muestra en la figura 5 B, esta estructura se dividió en tres porciones que se ilustran como P1, P2 y P3 y se estudió cual era la naturaleza ideal de los sustituyentes en cada posición. Se demostró que la presencia de un motivo parecido a la fenilalanina era muy importante y el mejor sustituyente fue el 4-ciano-2fluoro-fenilalanina, que presentó un incremento de ocho veces en potencia con respecto a la fenilalanina no sustituida. El mejor sustituyente en la posición P3 fue el 4-metanosulfonil bifenilo. Estudios previos habían demostrado que los grupos funcionales posicionados en P2 determinaban la selectividad entre la cruzipaína y las catepsinas (29). El mejor sustituyente en esta posición resultó ser una valina con una potencia de 2 nM y una selectividad de 80 veces por la cruzipaína sobre las catepsinas humanas L, B y F. Una vez seleccionados los mejo-

res sustituyentes en P1, P2 y P3; el inhibidor más potente (en el rango nanomolar), selectivo y eficaz contra la cruzipaína se muestra en la figura 5C, con él se han hecho estudios de biodisponibilidad en perros y ratas con excelentes resultados. El compuesto presenta tiempos de vida media en ambas especies de 5.2 y 4.6 horas, respectivamente. Este compuesto resulta un buen candidato para estudios posteriores en el diseño de inhibidores reversibles y específicos contra la cruzipaína (30).

4.4 La ruta de biosíntesis del ergosterol

Los esteroides son los principales constituyentes de las membranas celulares, esenciales para su estructura y función. En las células de mamífero el colesterol es el principal esteroide que constituye las membranas, mientras que en otros organismos como hongos y protozoos predominan otro tipo de esteroides. En el caso de los tripanosomátidos se sintetiza ergosterol en lugar de colesterol. La ruta de la síntesis de esteroides en estos parásitos ha tomado gran importancia en el diseño de fármacos antiparasitarios. En esta ruta metabólica se producen una clase especial de esteroides, entre los que se incluye el ergosterol y otros 24 metil-esteroides que son importantes para el crecimiento y viabilidad de los parásitos y, aún más importante, estas rutas no se encuentran en el hospedero mamífero. Los epimastigotes de *T. cruzi* contienen alrededor de 40% de ergosterol y ergosta-5,7-dien-3 β -ol y una cantidad apreciable, alrededor del 30% de estigmasta-5,7-dien-3 β -ol, y estigmasta-5,7,22-trien-3 β -ol. En el amastigote, no hay producción de esteroides 5,7 y son sustituidos por ergosta-7-en-3 β -ol y 24-etilidonacolest-7-en-3 β -ol.

Existen muchos fármacos que interfieren el ruta de biosíntesis de esteroides, incluso algunos de ellos se utilizan para disminuir los niveles de colesterol en los humanos. Cobran importancia aquéllos fármacos que con fines antiparasitarios inhiben la síntesis de esteroides sin afectar la correspondiente ruta en el humano. Tal es el caso de las alilaminas, inhibidores de la escualeno epoxidasa, de las cuales el principal ejemplo es la terbinafina que inhibe a la escualeno epoxidasa, con la consecuente disminución del ergosterol. Otro ejemplo son los azosteroides que inhiben a la esteroide aminotransferasa; sin embargo se ha demostrado que estos compuestos tienen efectos supresores, pero no curativos, en contra de las infecciones de *T. cruzi* en humanos o en animales experimentales y son incapaces de detener la progresión de la enfermedad (31).

En los últimos años se han desarrollado nuevos derivados triazólicos como el D0870 y el posaconazol (POS), que son inhibidores selectivos del

citocromo P450 dependiente de la C14 α -lanosterol desmetilasa (CYP51), y se ha encontrado que tienen actividad antiparasitaria en modelos murinos de la enfermedad de Chagas tanto en sus fase aguda como crónica (32). Además, estos compuestos son capaces de erradicar las cepas resistentes de *T. cruzi* contra nitrofurano y nitroimidazol en ratones infectados. Otros estudios con el POS, que es un análogo estructural del itraconazol, demostraron que este compuesto es capaz de erradicar los amastigotes intracelulares en cultivos de cardiomiocitos sin efecto alguno en el ensamblaje del citoesqueleto en las células del hospedero (33). El POS fue registrado en el 2005 en la Unión Europea y en Australia como alternativa en el tratamiento y en 2006 en los Estados Unidos de América para ser usado en la profilaxis de infecciones fúngicas; en el 2010 comenzaron los estudios clínicos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, convirtiéndose en el primer fármaco diseñado racionalmente que se encuentra en estudios clínicos para el tratamiento de esta enfermedad. Algunos otros triazoles como el TAK-187 (Takeda Chemical Company), el UR-9825 (Uriach & Company) y el ravuconazol (ER-30346, EisaiCo.;BMS207,147; Bristol Myers Squibb) presentaron actividad tripanosomacida tanto *in vitro* como *in vivo*. El más efectivo de los tres es el TAK-187, que es capaz de curar la enfermedad en sus dos fases, aún en las cepas resistentes a nitrofurano y nitroimidazol. Los otros dos derivados triazólicos poseen tiempos cortos de vida media en modelos animales por lo que son fármacos supresores, pero no curativos, de la enfermedad de Chagas (34).

Recientemente, se reportó una nueva clase de inhibidores de CYP51, enzima que cataliza la conversión de lanosterol a ergosterol. Estos compuestos fueron diseñados con base en el esqueleto de N-[4-piridil]-formamida, que fue obtenida a partir de los estudios estructurales de CYP51 de *Mycobacterium tuberculosis*. Uno de estos compuestos fue capaz de erradicar amastigotes intracelulares crecidos en cultivos de macrófagos de ratón (35). Debido a que el porcentaje de identidad entre la CYP51 de *M. tuberculosis* y la correspondiente en *T. cruzi* es tan solo del 27%, fue necesario obtener la estructura cristalográfica de CYP51 de tripanosomátidos. En un estudio del 2010 se reportaron las estructuras de CYP51 de *T. cruzi* y *T. brucei*, que revelaron importantes aspectos estructurales de la unión de 2 de los inhibidores más importantes de esta enzima: el Posoconazol (POS) y el Fluconazol. Ambos compuestos se unen al sitio activo de CYP51 mediante la coordinación del grupo hemo con el nitrógeno aromático del anillo triazólico, además de múltiples interacciones de van der Waals y de

tipo hidrofóbico. De manera importante en el sitio de unión de los inhibidores se forma un puente hidrofóbico constituido por 42 aminoácidos, en donde se encontraron importantes diferencias que definen la selectividad de estos compuestos. Tal es caso de los aminoácidos 209 y 462 que, en los tripanosomátidos, corresponden a prolina y valina, respectivamente, mientras que en CYP51 de humano ambos aminoácidos son histidinas (36).

Otra clase de compuestos que interfieren en la biosíntesis de esteroides son los inhibidores de la escualeno sintasa (SQS, de sus siglas en inglés Squalene synthase). Esta enzima cataliza el primer paso en la biosíntesis del esteroide y ha sido validada como un blanco quimioterapéutico en *T. cruzi* y *L. mexicana* (37). Aunque algunos compuestos han resultado potentes en su actividad anti-*T. cruzi*, también son potentes inhibidores de la SQS de mamíferos, de tal forma que se requieren inhibidores específicos de la SQS de tripanosomátidos. En este sentido, en un estudio reciente se reportó la clonación del gen de la SQS de *T. Cruzi*, que fue sobreexpresada y purificada a partir de células de *E. coli*, y ha sido utilizada en la identificación de inhibidores de la SQS (38). El compuesto llamado WC-9 (4-fenoxi fenoxi etiltiocianato), actúa inhibiendo selectivamente la SQS de *T. cruzi* (39).

Un acercamiento muy interesante en este campo es la generación de moléculas con doble función, debido a que en su estructura poseen dos farmacóforos: por un lado un radical nitrofurano que permite la generación de radicales libres y una porción heteroalil que inhibe la escualeno epoxidasa con la consecuente acumulación de escualeno (40). Estos compuestos resultaron ser muy activos contra las formas intracelulares y extracelulares del parásito y aún más potentes que el nifurtimox y la terbinafina presentando valores de ID₅₀ aproximados a 2.0 μ M (41).

4.5 La liberación del genoma de *T. cruzi* y estudios en proteincinasas como blancos terapéuticos


Las proteín-cinasas (PK de sus siglas en inglés Protein Kinases) regulan gran variedad de eventos celulares. Con la liberación de los genomas completos de los tripanosomas, se han podido identificar 171 secuencias que codifican para PK en el genoma de *T. cruzi*. Estas enzimas se han clasificado en siete grandes grupos para facilitar su estudio, de los cuales el más abundante en los tripanosomátidos es la familia de las CMGC, cinasas que incluyen a las cinasas dependientes de Ciclina (CDK), a las cinasas activadas por mitógeno (MAP-cinasas), a las glucógeno sintasas cinasas (GSK)

y a las cinasas con actividad parecida a las CDK (CDK-like). En el genoma de *T. cruzi* se encontraron 10 secuencias que codifican para CDK, que son dependientes de ciclina para su activación (13). La actividad de las CDK en *T. cruzi* está regulada tanto por ciclinas como por fosforilación, de la misma manera que en el humano. Solo dos de estas CDK han sido caracterizadas, TzCRK1 y TzCRK3, y se ha demostrado que interactúan con ciclinas del mamífero confirmando su naturaleza de cinasas dependientes de ciclina (42).

La CK1 es una cinasa que pertenece al grupo de las casein cinasas y que se ha identificado en *T. cruzi*; tiene importancia por el hecho de que es selectivamente inhibida por derivados del purvalanol B, mientras que la CK1 de mamífero no es este compuesto en ninguno de los tejidos probados (43). Los derivados del purvalanol si inhiben a la CK1 de mamífero pero con una potencia 1000 veces menor que la CK1 de *L. mexicana* y *T. cruzi*. Estos hechos definen a la CK1 de *T. cruzi* como un blanco importante para el desarrollo de nuevos fármacos.

5. CONCLUSIONES

Han pasado más de 100 años del descubrimiento de la enfermedad de Chagas y alrededor de 70 años de que se comenzaron los estudios para encontrar fármacos eficaces contra esta enfermedad. Hasta el momento, los dos fármacos de elección no son eficaces en las dos fases de la enfermedad, además de presentar importantes efectos

secundarios. A lo largo de estos años, se han identificado numerosos blancos potenciales para el desarrollo de nuevos fármacos antiparasitarios mediante atractivas estrategias y acercamientos experimentales novedosos. La propia naturaleza de *T. cruzi* ha permitido un avance importante en esta búsqueda, los estudios más sobresalientes se centran en las diferencias que presenta este parásito con respecto a su hospedero mamífero. Es importante resaltar que de estas diferencias, las más exploradas incluyen las enzimas glucolíticas compartimentalizadas en el glicosoma, el sistema del tripanotión, la cruzipaína y la síntesis del ergosterol. Estos estudios han permitido caracterizar a la perfección, tanto estructural como cinéticamente un sinúmero de enzimas como la TIM o la GAPDH y explorar variedad de bibliotecas de fármacos con actividad específica para la CYP51 o la SQS. Por ejemplo, entre los estudios más avanzados se encuentran los estudios en fases preclínicas del K777 y su inhibición específica de la cruzipaína. Con la liberación del genoma de *T. cruzi* en el 2005 se inició una nueva era de investigación en la enfermedad de Chagas, que permite la comparación de genomas completos para identificar blancos potenciales con fines terapéuticos. Esta búsqueda no ha concluido, la generación de cepas resistentes a los fármacos de elección mantienen alertas a los grupos de investigación a lo largo del mundo, en busca del fármaco ideal contra la enfermedad de Chagas. 

REFERENCIAS

1. Aufderheide AC, W Salo M, Madden J, Streit J, Buikstra F, Guhl B, Arriaza C, Renier L, E Wittmers, Jr., G Fornaciari, M Allison (2004) A 9000-year record of Chagas' disease. Proc Natl Acad Sci USA 101:2034-2039.
2. Bernstein RE (1984) Darwin's illness: Chagas' disease resurgens. J R Soc Med 77(7): 608-609.
3. Wilkinson SR, Kelly JM.(2009) Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. Expert Rev Mol Med 11:e31.
4. Maya J, Cassels B, Iturriaga-Vasquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, Ferreira A, Morello A (2006) Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 146:601-620.
5. Faundez M, Pino L, Letelier P, Ortiz C, López R, Seguel C, Ferreira J, Pavani M, Morello A, Maya JD (2005) Buthionine sulfoximine increases the toxicity of nifurtimox and benznidazole to *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob Agents Chemother 49:126-130.
6. Apt W (2010) Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. Drug Design, Development and Therapy 4:243-253.
7. Murta SM, Krieger MA, Montenegro LR, Campos FF, Probst CM, Avila AR, Muto NH, de Oliveira RC, Nunes LR, Nirdé P, Bruna-Romero O, Goldenberg S, Romanha AJ (2006): Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 146, 151-162.

8. de Souza W (2002). Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol Res* 88:1013-1025.
9. Tielens AG, van Hellemond JJ (2009) Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. *Trends Parasitol* 25:482-90.
10. Chauhan SC, Padmanabhan PK, Madhubala R (2008) Glyoxalase pathway of trypanosomatid parasites: a promising chemotherapeutic target. *Curr Drug Targets* 9:957-965.
11. Jose Cazzulo J, Stoka V, Turk V (2001) The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des* 7:1143-1156
12. Urbina JA (2009) Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1:311-318.
13. Naula C, Parsons M, Mottram JC (2005) Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. *Biochim Biophys Acta* 1754:151-159.
14. Sanz-Rodríguez CE, Concepción JL, Pekerar S, Oldfield E, Urbina JA (2007). Bisphosphonates as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* hexokinase: kinetic and metabolic studies. *J Biol Chem* 282:12377-12387.
15. Olivares-Illana V, Pérez-Montfort R, López-Calahorra F, Costas M, Rodríguez-Romero A, Tuena de Gómez-Puyou M, Gómez Puyou A (2006) Structural differences in triosephosphate isomerase from different species and discovery of a multitypanosomatid inhibitor. *Biochemistry* 45:2556-2560.
16. Olivares-Illana V, Rodríguez-Romero A, Becker I, Berzunza M, García J, Pérez-Montfort R, Cabrera N, López-Calahorra F, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A (2007) Perturbation of the dimer interface of triosephosphate isomerase and its effect on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis* 1(1): e01. doi:10.1371/journal.pntd.0000001.
17. Alvarez G, Aguirre-López B, Varela J, Cabrera M, Merlino A, López GV, Lavaggi ML, Porcal W, Di Maio R, González M, Cerecetto H, Cabrera N, Pérez-Montfort R, de Gómez-Puyou MT, Gómez-Puyou A (2010). Massive screening yields novel and selective *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase dimer-interface-irreversible inhibitors with anti-trypanosomal activity. *Eur J Med Chem* 45:5767-5772.
18. Aronov AM, Suresh S, Buckner FS, Van Voorhis WC, Verlinde CL, Opperdoes FR, Hol WG, Gelb MH (1999) Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 96:4273-4278.
19. Silva JJ, Guedes PM, Zottis A, Balliano TL, Nascimento Silva FO, França Lopes LG, Ellena J, Oliva G, Andricopulo AD, Franco DW, Silva JS (2010) Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and in vitro/in vivo trypanocidal activity. *Br J Pharmacol* 160:260-269.
20. Acosta H, Dubourdiou M, Quiñones W, Cáceres A, Bringaud F, Concepción JL (2004) Pyruvate phosphate dikinase and pyrophosphate metabolism in the glycosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 138:347-356.
21. Smith K, Nadeau K, Bradley M, Walsh C, Fairlamb AH (1992) Purification of glutathionylspermidine and trypanothione synthetases from *Crithidia fasciculata*. *Protein Sci* 1:874-883.
22. Oza SL, Tetaud E, Ariyanayagam MR, Warron SS, Fairlamb AH (2002) A single enzyme catalyses formation of Trypanothione from glutathione and spermidine in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 277:35853-35861.
23. Ariyanayagam MR, Oza SL, Mehlert A, Fairlamb AH (2003) Bis(glutathionyl)spermine and other novel trypanothione analogues in *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 278:27612-27619.
24. Perez-Pineiro R, Burgos A, Jones DC, Andrew LC, Rodriguez H, Suarez M, Fairlamb AH, Wishart DS (2009) Development of a novel virtual screening cascade protocol to identify potential trypanothione reductase inhibitors. *J Med Chem* 52:1670-1680.
25. Irsch T, Krauth-Siegel RL (2004) Glyoxalase II of African trypanosomes is trypanothione-dependent. *J. Biol. Chem* 279:22209-22217.
26. Vickers TJ, Greig N, Fairlamb AH (2004) A trypanothione-dependent glyoxalase I with a prokaryotic ancestry in *Leishmania major*. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 101:13186-13191.
27. Greig N, Wyllie S, Vickers TJ, Fairlamb AH (2006) Trypanothione-dependent glyoxalase I in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* 400:217-223.
28. McKerrow JH, Doyle PS, Engel JC, Podust LM, Robertson SA, Ferreira R, Saxton T, Arkin M, Kerr ID, Brinen LS, Craik CS (2009) Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 104 Suppl 1:263-269.
29. Gauthier JY, Chauret N, Cromlish W, Desmarais S, Duong le T, Falgueyret JP, Kimmel DB, Lamontagne S, Léger S, LeRiche T, Li CS, Massé F, McKay DJ, Nicoll-Griffith DA, Oballa RM, Palmer JT, Percival MD, Riendeau D, Robichaud J, Rodan GA, Rodan SB, Seto C, Thérien M, Truong VL, Venuti MC, Wesolowski G, Young RN, Zamboni R, Black WC (2008) The discovery of odanacatib (MK-0822), a selective inhibitor of cathepsin K. *Bioorg Med Chem Lett* 18:923-928.
30. Beaulieu C, Isabel E, Fortier A, Massé F, Mellon C, Méthot N, Ndao M, Nicoll-Griffith D, Lee D, Park H, Black WC (2010) Identification of potent and reversible cruzipain inhibitors for the treatment of Chagas disease. *Bioorg Med Chem Lett* 20:7444-7449.
31. Urbina JA (2002) Chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des* 8:287-95.

32. Urbina JA, Docampo R (2003) Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol* 19:495-501.
33. Silva DT, de Nazareth S L de Meirelles M, Almeida D, Urbina JA, Pereira MC (2006) Cytoskeleton reassembly in cardiomyocytes infected by *Trypanosoma cruzi* is triggered by treatment with ergosterol biosynthesis inhibitors. *Int J Antimicrob Agents* 27:530-537.
34. Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Molina J, Lira R, Brener Z, Romanha AJ (2003). Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. *Int J Antimicrob Agents* 21:39-48.
35. Chen CK, Doyle PS, Yermalitskaya LV, Mackey ZB, Ang KK, McKerrow JH, Podust LM (2009). *Trypanosoma cruzi* CYP51 inhibitor derived from a *Mycobacterium tuberculosis* screen hit. *PLoS Negl Trop Dis* 3(2):e372.
36. Chen CK, Leung SS, Guilbert C, Jacobson MP, McKerrow JH, Podust LM (2010) Structural characterization of CYP51 from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* bound to the antifungal drugs posaconazole and fluconazole. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e651.
37. Urbina JA, Concepcion JL, Caldera A, Payares G, Sanoja C, Otomo T, Hiyoshi H. (2004). In vitro and in vivo activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* 48:2379-2387.
38. Sealey-Cardona M, Cammerer S, Jones S, Ruiz-Pérez LM, Brun R, Gilbert IH, Urbina JA, González-Pacanowska D (2007) Kinetic characterization of squalene synthase from *Trypanosoma cruzi*: selective inhibition by quinuclidine derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 51:2123-2129.
39. Urbina JA, Concepcion JL, Montalvetti A, Rodriguez JB, Docampo R (2003) Mechanism of action of 4-phenoxyphenoxyethyl thiocyanate (WC-9) against *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother* 47:2047-50.
40. Gerpe A, Odreman-Nuñez I, Draper P, Boiani L, Urbina JA, González M, Cerecetto H (2007) Heteroallyl-containing 5-nitrofuranes as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents with a dual mechanism of action. *Bioorg Med Chem* 16:569-577.
41. Gerpe A, Alvarez G, Benítez D, Boiani L, Quiroga M, Hernández P, Sortino M, Zaccchino S, González M, Cerecetto H (2009) 5-Nitrofuranes and 5-nitrothiophenes with anti-*Trypanosoma cruzi* activity and ability to accumulate squalene. *Bioorg Med Chem* 17:7500-7509.
42. Gómez EB, Santori MI, Laría S, Engel JC, Swindle J, Eisen H, Szankasi P, Téllez-Iñón MT (2001) Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Cdc2p-related protein kinase 1 and identification of three novel associating cyclins. *Mol Biochem Parasitol* 113:97-108.
43. Knockaert M, Gray N, Damiens E, Chang YT, Grellier P, Grant K, Fergusson D, Mottram J, Soete M, Dubremetz JF, Le Roch K, Doerig C, Schultz P, Meijer L (2000) Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors. *Chem Biol* 7:411-422.