



UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Evaluación de la actividad tripanocida de  
elbasvir y glecaprevir y del efecto sobre la  
actividad de la enzima Cisteína sintasa de  
*Trypanosoma cruzi in vitro***

**Francy Milena Chavarrio Cañas**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias – Instituto de biotecnología  
Maestría en Ciencias – Microbiología  
Bogotá D. C., Colombia  
2023

**Evaluación de la actividad tripanocida de  
elbasvir y glecaprevir y del efecto sobre la  
actividad de la enzima Cisteína sintasa de  
*Trypanosoma cruzi in vitro***

**Francy Milena Chavarrio Cañas**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:  
**Magister en Ciencias – Microbiología**

Director:

PhD. Jair Alexander Téllez Meneses

Codirector:

PhD. Ibeth Cristina Romero Calderón

Línea de investigación: Biotecnología en salud

Grupos de investigación: Infecciones y Salud en el Trópico y Zajuna Jwa Samu “Semilla del conocimiento” del Cesar, grupo de enfermedades infecciosas – Pontificia Universidad Javeriana

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias- Instituto de biotecnología

Maestría en Ciencias – Microbiología

Bogotá D. C., Colombia

2023

Dedicado en memoria de Mamá Lu y mi  
querida Hayley Valeria.

## Agradecimientos

En primer lugar agradezco a mi familia, a mi padre Álvaro Chavarrio, a mis hermanos Javier Chavarrio, Alejandra Santos y José Luis Castillo, y a mi compañero de vida Nelson Alvarado, que me han acompañado y apoyado en este camino que emprendí, motivándome a continuar y culminar mi proceso de formación pese a las diversas dificultades que se presentaron. También doy gracias a mi amiga Johanna por sus consejos y motivación para seguir estudiando.

Agradezco a mis tutores de tesis, los doctores Jair Alexander Téllez Meneses e Ibeth Cristina Romero Calderón por su apoyo, motivación, acompañamiento y orientación en este camino de la ciencia, compartiendo conmigo su conocimiento y valiosa experiencia, lo cual me ha permitido evolucionar y enamorarme más de la investigación científica.

También quiero agradecer a la doctora Claudia Liliana Cuervo Patiño por haberme abierto las puertas del laboratorio de Parasitología Molecular y del grupo de Enfermedades infecciosas de la Pontificia Universidad Javeriana, donde he aprendido muchísimo y pude llevar a cabo las actividades del proyecto de investigación. Además agradezco a la doctora Claudia por sus consejos y asesorías sobre el desarrollo del proyecto.

Por un lado agradezco a la Pontificia Universidad Javeriana, la cual proporcionó la financiación y los laboratorios para el desarrollo de esta investigación. Gracias a mis compañeros del laboratorio de Parasitología Molecular, Sebastián Bravo, Daniela Cabas, Daniel Gutiérrez y Cristian Barrero, con los cuales formamos un gran equipo de trabajo y compartimos buenos momentos.

Por otro lado, agradezco a la Universidad Nacional de Colombia que me brindó los conocimientos y espacios de aprendizaje en mi formación como magister, donde conté con un selecto grupo de docentes con amplia experiencia y trayectoria en investigación.

Finalmente, agradezco a mis jefes y compañeros de trabajo, a la doctora Audith Pastrana, Levis Mestra, Jennifer Patiño, Yuliana Rojas y Paola Henao, que me apoyaron en mi

formación y permitieron ajustar mis horarios laborales para poder tomar las clases y desarrollar las actividades de la tesis. Doy gracias al profesor Silvio López Pazos de la Universidad Antonio Nariño por sus consejos, su apoyo y por motivarme a realizar un posgrado y trabajar en investigación.

# Resumen

## **Evaluación de la actividad tripanocida de elbasvir y glecaprevir y del efecto sobre la actividad de la enzima Cisteína sintasa de *Trypanosoma cruzi* *in vitro***

La enfermedad de Chagas (ECh), causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, es una enfermedad endémica y desatendida en las Américas. Debido a su compleja dinámica de transmisión, se ha convertido en un problema de salud pública en el mundo. Actualmente, se cuenta con dos medicamentos para su tratamiento, benznidazol (BNZ) y nifurtimox (NFX). Esos medicamentos distan de ser un tratamiento ideal debido a su baja eficacia durante la fase crónica, a los efectos secundarios severos que llevan a una alta tasa de abandono de la terapia, y la menor susceptibilidad que presentan algunas cepas del parásito a estos medicamentos. Esas dificultades en el tratamiento de la ECh, han llevado a la necesidad de buscar nuevas alternativas terapéuticas. En este sentido, la Cisteína sintasa de *T. cruzi* (TcCS) ha sido estudiada como potencial blanco terapéutico, sobre la cual, se han realizado análisis de biología computacional que han permitido la identificación de moléculas con una alta afinidad y estabilidad de unión al sitio activo de la TcCS, dentro de las cuales se encuentra el elbasvir (EBV) y el glecaprevir (GCV). La presente investigación tuvo como objetivo evaluar *in vitro*, la actividad tripanocida y el efecto inhibitorio de EBV y de GCV sobre la actividad de la enzima TcCS. El efecto tripanocida de los compuestos fue evaluado en los estadios tripomastigote y amastigote del parásito, la citotoxicidad en células Vero y el efecto sobre la actividad enzimática a partir de extractos de proteínas solubles del parásito. El compuesto EBV presentó actividad biológica contra *T. cruzi* con una  $CE_{50}$  de 24.22  $\mu\text{M}$  sobre el estadio tripomastigotes y una  $CI_{50}$  de 7.59  $\mu\text{M}$  sobre el amastigote; con un índice de selectividad (IS) estimado de al menos 2.06 en el estadio infectivo y de al menos 6.58 sobre el estadio intracelular. Por su parte, GCV no mostró actividad biológica contra *T. cruzi*, y su citotoxicidad fue intermedia ( $CC_{50}$ : 134.4  $\mu\text{M}$ ). Los compuestos evaluados no presentaron una inhibición selectiva de la actividad enzimática de TcCS. En conclusión, EBV presenta una actividad biológica

principalmente contra el estadio amastigote de *T. cruzi*, lo cual hace de éste un posible compuesto líder para el desarrollo de nuevos tratamientos contra la ECh.

**Palabras clave:** *Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas, cisteína sintasa, efecto tripanocida, blanco terapéutico, inhibición enzimática, elbasvir, glecaprevir.

# Abstract

## Evaluation of the trypanocidal activity of elbasvir and glecaprevir and the effect on the activity of the *Trypanosoma cruzi* cysteine synthase enzyme *in vitro*

Chagas disease (CD), caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, is an endemic and neglected disease in the Americas. Due to its complex transmission dynamics, it has become a public health problem in the world. Currently, there are two medications for its treatment, benznidazole (BNZ) and nifurtimox (NFX). These medications are far from being an ideal treatment due to their low effectiveness during the chronic phase, severe side effects that lead to a high rate of abandonment of therapy, and the lower susceptibility of some strains of the parasite to these medications. These difficulties in the treatment of CD have led to the need to search for new therapeutic alternatives. In this sense, *T. cruzi* Cysteine synthase (TcCS) has been studied as a potential therapeutic target, on which computational biology analyzes have been conducted that have allowed the identification of molecules with high affinity and stability of binding to the TcCS active site, among which are elbasvir (EBV) and glecaprevir (GCV). The aim of this research was to evaluate *in vitro*, trypanocidal activity and inhibitory effect of EBV and GCV on the activity of the TcCS enzyme. The trypanocidal effect of the compounds was evaluated in trypomastigote and amastigote stages of the parasite, cytotoxicity in Vero cells and effect on the enzymatic activity from soluble protein extracts of the parasite. The EBV compound presented biological activity against *T. cruzi* with an  $EC_{50}$  of 24.22  $\mu\text{M}$  on trypomastigote stage and an  $IC_{50}$  of 7.59  $\mu\text{M}$  on amastigote; with an estimated selectivity index (SI) of at least 2.06 in the infective stage and at least 6.58 in the intracellular stage. For its part, GCV did not show biological activity against *T. cruzi*, and its cytotoxicity was intermediate ( $CC_{50}$ : 134.4  $\mu\text{M}$ ). The compounds evaluated did not present a selective inhibition of the enzymatic activity of TcCS. In conclusion, EBV presents biological activity mainly against amastigote stage of *T. cruzi*, which makes it a possible lead compound for the development of new treatments against CD.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, Cysteine synthase, trypanocidal activity, therapeutic target, enzyme inhibition, elbasvir, glecaprevir.

# Contenido

Resumen .....	4
Abstract.....	6
Listado de figuras.....	9
Listado de tablas.....	11
Listado de abreviaturas.....	12
Introducción .....	14
1. Marco teórico y estado del arte .....	17
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	17
1.2. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .....	18
1.3. La Enfermedad de Chagas .....	20
1.4. Clínica de la enfermedad de Chagas .....	20
1.5. Tratamiento de la Enfermedad de Chagas.....	21
1.6. Susceptibilidad de <i>T. cruzi</i> a los antiparasitarios.....	23
1.7. Alternativas terapéuticas contra la enfermedad de Chagas .....	25
1.8. Cisteína sintasa como blanco terapéutico.....	27
1.9. Elbasvir y su actividad biológica.....	32
1.10. Glecaprevir y su actividad biológica .....	34
2. Objetivos.....	36
2.1. Objetivo general.....	36
2.2. Objetivos específicos .....	36
3. Metodología .....	37
3.1. Cultivo celular y parásitos .....	37
3.2. Preparación de los compuestos .....	37
3.3. Efecto tripanocida en tripomastigotes .....	38
3.4. Efecto tripanocida en amastigotes .....	39
3.5. Citotoxicidad en células Vero.....	41
3.6. Extracción de proteínas totales .....	42
3.7. Ensayos de actividad enzimática .....	43

4. Resultados .....	45
4.1. Efecto tripanocida en tripomastigotes.....	45
4.2. Efecto tripanocida en amastigotes.....	47
4.3. Efecto citotóxico e índices de selectividad.....	50
4.4. Efecto sobre la actividad enzimática de la TcCS .....	51
5. Discusión.....	55
6. Conclusiones y recomendaciones .....	62
6.1. Conclusiones.....	62
6.2. Recomendaciones.....	62
ANEXOS .....	64
A. Anexo: Metodología inducción de la expresión de la proteína recombinante rTcCS	64
B. Anexo: Resultados inducción de la expresión de la proteína recombinante.....	65
Referencias bibliográficas .....	70

# Listado de figuras

Figura 1. Estructura celular del amastigote (a), tripomastigote (b) y epimastigote (c) de <i>T. cruzi</i> .....	17
Figura 2. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> .....	19
Figura 3. Estructura química de Benznidazol y Nifurtimox.....	22
Figura 4. Vías de biosíntesis de cisteína en <i>T. cruzi</i> .....	28
Figura 5. Estructura química de Elbasvir (EBV) y de Glecaprevir (GCV).....	33
Figura 6. Esquema metodológico de los ensayos de susceptibilidad en tripomastigotes.	39
Figura 7. Esquema metodológico de los ensayos de susceptibilidad en amastigotes. ....	40
Figura 8. Esquema metodológico del ensayo de citotoxicidad en células Vero. ....	42
Figura 9. Esquema metodológico de la evaluación del efecto de EBV y GCV sobre la TcCS.....	44
Figura 10. Curvas dosis-respuestas de la actividad tripanocida de los compuestos BNZ, EBV y GCV en tripomastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	46
Figura 11. Curvas dosis-respuestas de la actividad tripanocida en amastigotes intracelulares de <i>T. cruzi</i> frente a los compuestos BNZ, EBV y GCV..	48
Figura 12. Células Vero infectadas con amastigotes intracelulares de <i>T. cruzi</i> cepa Y... .	49
Figura 13. Curva dosis-respuesta de la citotoxicidad en células Vero de los compuestos BNZ, EBV y GCV.....	51
Figura 14. Curva patrón de BSA para la cuantificación de proteínas por Bradford..	52
Figura 15. Curva patrón con L-Cys para la cuantificación de cisteína por método ninhidrina. ....	53

Figura 16. Actividad enzimática de la CS en extractos de proteínas solubles de tripomastigotes y epimastigotes de <i>T. cruzi</i> .....	54
Figura 17. Electroforesis de ADN plasmídico de células transformadas <i>E. coli</i> M15 (a) y BL21 DE3 (b) en gel de agarosa. ....	66
Figura 18. Patrón de proteínas bajo inducción con diferentes temperaturas y tiempos de incubación, en gel SDS-PAGE.....	67
Figura 19. Patrón de proteínas tras sonicación de bacterias inducidas, en gel SDS-PAGE. ....	68

## Listado de tablas

Tabla 1. Concentraciones inhibitorias 50 sobre los estadios tripomastigotes y amastigotes de <i>T. cruzi</i> , células Vero e índices de selectividad. ....	46
---	----

# Listado de abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Nombre completo</b>
<b>ADH</b>	alcohol deshidrogenasa
<b>AKR</b>	aldo-ceto reductasa
<b>BCRP</b>	Proteína de resistencia de cáncer de mama
<b>BNZ</b>	Benznidazol
<b>BSA</b>	Albumina de Suero bovino
<b>CC<sub>50</sub></b>	Concentración citotóxica media en células Vero
<b>CE<sub>50</sub></b>	Concentración efectiva media en estadio tripomastigote y en virus
<b>CI<sub>50</sub></b>	Concentración inhibitoria media en estadio amastigote y ensayos enzimáticos
<b>CRFK</b>	Crandell-Rees Feline Kidney Cell
<b>Cys</b>	Cisteína
<b>CBS</b>	Cistationina beta sintasa
<b>CGL</b>	Cistationina gamma liasa
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfoxido
<b>D.O.</b>	Densidad óptica
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EBV</b>	Elbasvir
<b>ECh</b>	Enfermedad de Chagas
<b>FDA</b>	La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos
<b>FMN</b>	Flavin mononucleótido
<b>GCV</b>	Glecaprevir
<b>INS</b>	Instituto Nacional de Salud
<b>IPTG</b>	Isopropyl $\beta$ - d-1-thiogalactopyranoside
<b>IS</b>	Índice de selectividad
<b>LB</b>	Medio Luria Bertani
<b>Lys</b>	Lisina

<b>LIT</b>	Medio infusión de hígado y triptosa
<b>MIC</b>	Concentración mínima inhibitoria
<b>MTT</b>	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
<b>NFX</b>	Nifurtimox
<b>NS3/4A</b>	Proteasa no estructural 3/4A
<b>NS5A</b>	Proteína no estructural 5A
<b>NTRI</b>	Nitroreductasa tipo I
<b>OAS</b>	O-Acetil-L-Serina
<b>OATP1B1</b>	polipéptido transportador de aniones orgánicos B1
<b>OATP1B3</b>	polipéptido transportador de aniones orgánicos B3
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>OPS</b>	Organización Panamericana de la Salud
<b>OYE</b>	vieja enzima amarilla
<b>PBS</b>	Buffer salino fosfatado
<b>P-gp</b>	Glicoproteína P
<b>PLP</b>	Piridoxal fosfato
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RPMI</b>	Medio Roswell Park Memorial Institute 1640
<b>rTcCS</b>	Cisteína sintasa de <i>Trypanosoma cruzi</i> recombinante
<b>SAT</b>	Serina acetil transferasa
<b>TcCS</b>	Cisteína sintasa de <i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>UDT</b>	Unidad discreta de tipificación
<b>VHC</b>	Virus de la hepatitis C

## Introducción

La ECh es una enfermedad tropical, desatendida y endémica en 21 países de América Latina y es considerada un problema de salud pública a nivel mundial, ya que se han presentado casos de la enfermedad en otros países y continentes tales como Estados Unidos, Canadá, Australia, Nueva Zelanda, Europa, África y Asia (Lidani et al., 2019; WHO, 2021). La ECh es causada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*, el cual es transmitido al humano mediante diferentes mecanismos como el vectorial, congénito, transfusión de sangre, trasplante de órganos y el consumo de alimentos contaminados con el parásito (WHO, 2021).

Según la OPS, se estima que más de 6 millones de personas en el mundo se encuentran infectadas con *T. cruzi*, presentando una incidencia de 30.000 casos nuevos, 8600 recién nacidos contagiados y 12.000 muertes cada año en las Américas. Sumado a ello, más de 70 millones de personas que viven en las áreas de exposición están en riesgo de contraer la infección (OPS, 2022). Se ha estimado que la atención de la ECh a nivel mundial, tiene un costo aproximado de 627 millones de dólares por año (Lee et al., 2013).

Según la OMS para el año 2010, en Colombia 437.960 personas estaban infectadas por *T. cruzi*, casi 5 millones se encontraban en riesgo de contraer la infección y más de 130 mil habían sido diagnosticadas con cardiopatía chagásica (WHO, 2015). De acuerdo con los datos epidemiológicos emitidos por el INS recientemente, en Colombia, se han reportado 31 casos confirmados de Chagas agudo con una letalidad del 6.5%, hasta el periodo epidemiológico X y 708 casos confirmados de Chagas crónico hasta el periodo epidemiológico IX del año 2023 (INS, 2023). Para el año 2017, en Colombia se calculó que el costo de la ECh fue de unos 13.1 millones de dólares, entre gastos de la atención médica de la enfermedad, la pérdida de productividad laboral y la mortalidad prematura (Olivera & Buitrago, 2020).

La ECh se desarrolla en tres fases, la fase aguda es en general asintomática, posteriormente se da la fase crónica indeterminada en la cual no hay síntomas, pero la infección puede ser detectada mediante pruebas de laboratorio. Décadas después de haber adquirido la infección, alrededor del 30% de las personas avanza a la fase crónica sintomática en la que se presenta cardiopatía y/o daño digestivo. (CDC, 2019; Teixeira et al., 2011).

Los medicamentos empleados en el tratamiento de la ECh se basan en el uso de BNZ y NFX, estos son los únicos medicamentos que han mostrado eficacia contra este parásito protozoario y que han sido habilitados para su uso clínico (Maya et al., 2007). La eficacia de los medicamentos durante la fase aguda de la enfermedad oscilan entre un 60 -100%, pero durante la fase crónica es muy baja, fluctuando entre 10 y 30%, además está contraindicado en algunos casos (Mady et al., 2008; Martín-Escolano et al., 2020). Se ha reportado que alrededor del 20% de las personas tratadas con BNZ o NFX abandonan el tratamiento debido a los efectos secundarios severos (Olivera et al., 2017). Por otra parte, se están dilucidando los mecanismos mediante los cuales algunas cepas de *T. cruzi* presentan menor susceptibilidad a estos antiparasitarios, incluyendo mecanismos de modulación de la expresión genética y alteraciones de los genes codificantes para la proteína que activa esos profármacos (Mejia et al., 2012; Wilkinson et al., 2008).

A pesar de que la ECh fue descubierta hace más de un siglo, aún no se cuenta con un tratamiento quimioterapéutico eficaz y seguro, y por ello, se ve la necesidad de encontrar nuevas moléculas con efecto contra *T. cruzi*. Actualmente, hay numerosas investigaciones en las que se están probando diferentes compuestos de origen sintético y natural sobre este parásito y han mostrado efecto tripanocida, sin embargo, en la mayoría de los casos se desconoce el mecanismo de acción de estos compuestos (Ribeiro et al., 2020). Un importante número de compuestos han presentado potencial para el desarrollo de fármacos contra la ECh, a pesar de esto son pocos los compuestos que han podido avanzar en el escalamiento a través de las fases de los estudios clínicos. Algunas de las aproximaciones que se están investigando en torno a la búsqueda de terapias alternativas incluye vacunas profilácticas y terapéuticas, combinación de fármacos, terapias de

modulación del sistema inmune e inhibidores covalentes (Kratz, 2019; Martín-Escolano et al., 2020).

En los últimos 10 años, se ha estado investigando la estrategia de inhibidores covalentes basada en la búsqueda de nuevas moléculas que ataquen blancos terapéuticos en *T. cruzi*. Se han estudiado diversos compuestos sobre la actividad de diferentes enzimas que intervienen en importantes procesos metabólicos en *T. cruzi*, como lo son Cruzipain, CYP51, tripanotiona reductasa, proteínas conteniendo bromodominios, trans-sialidasa, nitroreductasa y anhidrasa carbónica (de Oliveira et al., 2021).

La enzima CS ha sido investigada como una diana terapéutica en diferentes microorganismos patógenos como *Salmonella* sp, *Mycobacterium tuberculosis*, *Entamoeba histolytica*, *Trichomonas vaginalis*, *Leshmania* sp. y *T. cruzi*, encontrando compuestos con actividad inhibitoria sobre la CS y afectando el crecimiento de estos microorganismos (Dharavath et al., 2020; Jean et al., 2013; Magalhães et al., 2018; Pardo-rodriguez et al., 2023; Singh et al., 2013; Téllez et al., 2022). La proteína CS está implicada en la biosíntesis de cisteína, esta enzima es esencial en la supervivencia de *T. cruzi* y participa en los mecanismos de defensa de los tripanosomátidos contra el estrés oxidativo y nitrosativo (Romero et al., 2014). La enzima CS no se encuentra en mamíferos, su homólogo más cercano en humanos es la Cistationina B-sintasa (CBS), con un porcentaje de identidad del 33% (Lima et al., 2016; Marciano et al., 2012). De acuerdo con lo anterior, la CS es una enzima vital en la supervivencia de *T. cruzi* y es un potencial blanco terapéutico para el desarrollo de nuevos fármacos para el tratamiento selectivo de la ECh, es así como en esta investigación se propuso evaluar la actividad tripanocida de elbasvir (EBV) y de glecaprevir (GCV) sobre *T. cruzi* y explorar el efecto de esos compuestos sobre la actividad de la TcCS mediante ensayos de actividad enzimática *in vitro*.

# 1. Marco teórico y estado del arte

## 1.1. *Trypanosoma cruzi*

*T. cruzi* es un parásito protozoario flagelado, agente causal de la ECh, fue descubierto por el médico brasileño Carlos Chagas en 1909 (Rassi et al., 2010). *T. cruzi* es un organismo eucariota perteneciente a la clase *Kinetoplastea*, al orden *Trypanosomatida* y a la familia *Trypanosomatidae* (Schoch et al., 2020). Este parásito tiene un complejo ciclo de vida en el que se identifican tres estadios principales en diferentes hospederos. El amastigote es el estadio proliferativo en el mamífero vertebrado, el epimastigote es la forma replicativa en el insecto vector invertebrado, y el estadio tripomastigote es el estadio infeccioso, el cual puede evolucionar a partir de los epimastigotes como tripomastigote metacíclico y desde los amastigotes como tripomastigotes sanguíneos o derivados de células (Figura 1) (W. de Souza, 2009).

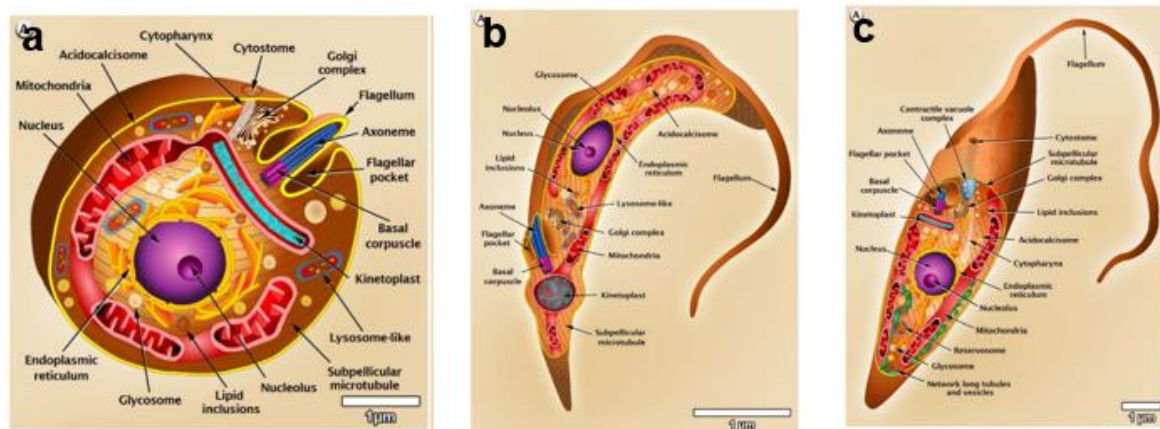


Figura 1. Estructura celular del amastigote (a), tripomastigote (b) y epimastigote (c) de *T. cruzi*. Tomado de Teixeira et al., 2012.

*T. cruzi* expresa en su superficie diferentes proteínas de membrana, entre las que se destacan mucinas y trans-sialidasas, la primera clase tiene funciones de protección del parásito, infectividad y modulación del sistema inmunológico, mientras que la segunda clase de proteínas están relacionadas con la capacidad del parásito para infectar las células del hospedero (Pech-Canul et al., 2017). Por su parte, la alta diversidad genética de *T. cruzi* ha hecho difícil la clasificación de este organismo en categorías, de acuerdo con el último consenso realizado, *T. cruzi* fue clasificado mediante genotipificación multilocus en seis Unidades Discretas de Tipificación (UDTs) TcI, TcII, TcIII, TcIV, TcV, TcVI y el genotipo TcBat (Ramírez & Hernández, 2018; Bianca Zingales et al., 2012). *T. cruzi* es un organismo principalmente diploide, su genoma está constituido por cromosomas homólogos, aunque el tamaño y el número de los cromosomas puede variar entre las diferentes cepas (B. Zingales, 2018). Se estima que el genoma diploide de *T. cruzi* varía de 112-152 Mb entre las diferentes UDTs, incluido el ADN nuclear y el del kinetoplasto (R. Souza et al., 2011). El genoma haploide de *T. cruzi* posee alrededor de 12000 genes y se estima que el 50% del genoma de este protozoo son secuencias repetitivas (El-Sayed et al., 2005).

## **1.2. Ciclo de vida de *T. cruzi***

El ciclo de vida del parásito inicia cuando el insecto vector infectado se alimenta de la sangre de un humano u otro mamífero, y a la vez excreta al parásito en forma de tripomastigote metacíclico a través de las heces sobre la piel cerca de una lesión. Los tripomastigotes metacíclicos atraviesan la piel herida o las membranas mucosas, posteriormente estos parásitos invaden las células cercan al sitio de la inoculación y en el citoplasma de estas, los parásitos se diferencian a amastigotes intracelulares (Teixeira et al., 2012). Los amastigotes se dividen mediante fisión binaria y posteriormente se diferencian a tripomastigotes. Los tripomastigotes abandonan la célula hospedera y alcanzan el torrente sanguíneo, estos parásitos viajan a través de la sangre del hospedero a otros tejidos donde infectan nuevas células en las que se diferencian en amastigotes (Tyler & Engman, 2001). Los vectores adquieren las formas de tripomastigotes sanguíneos al alimentarse de sangre de mamíferos contaminada con el parásito, las formas de tripomastigotes sanguíneos posteriormente en el intestino del insecto se diferencian a

epimastigotes. Los epimastigotes se dividen mediante fisión binaria y luego se diferencian a tripomastigotes metacíclicos en la ampolla rectal del insecto, siendo el estadio infeccioso, pero no replicativo, que es transmitido por el insecto vector a un nuevo hospedero mamífero vertebrado, cerrando el ciclo (Figura 2) (Bern, 2011; CDC, 2019).

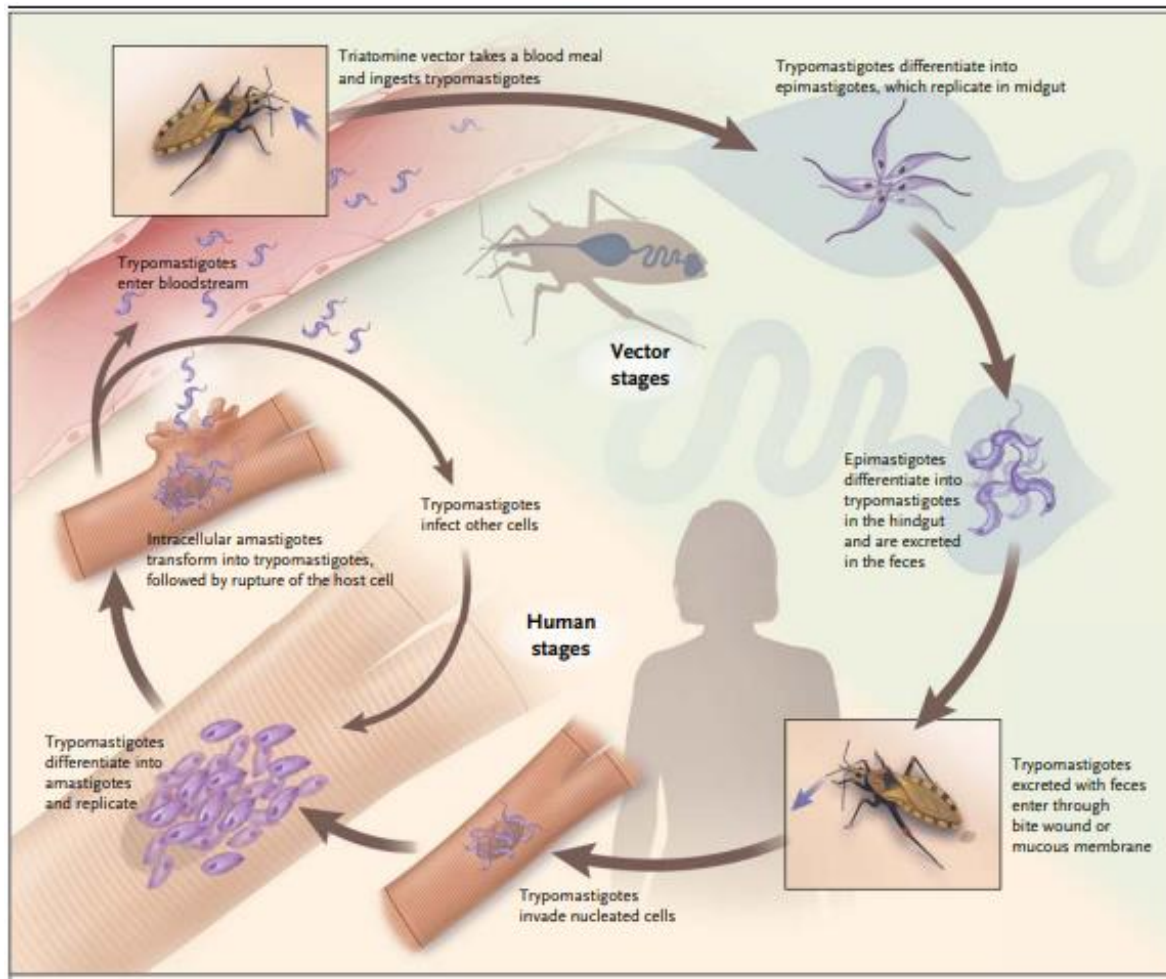


Figura 2. Ciclo de vida de *T. cruzi*. Tomado de Bern, 2011.

### **1.3. La Enfermedad de Chagas**

La ECh, también conocida como tripanosomiasis americana, es una zoonosis tropical endémica desatendida en las Américas, esta ha pasado de ser una enfermedad del área rural en Latinoamérica a ser un problema de salud pública en el mundo, hoy en día se presentan casos en varios países y continentes del mundo debido a la urbanización y a la migración (WHO, 2021). La ECh ocupa el segundo lugar después de la malaria, en el grupo de enfermedades transmitidas por vectores con mayor prevalencia y mortalidad (Maya et al., 2007). Respecto a los mecanismos de transmisión de la infección, se han reportado transmisión vectorial mediada por los triatominos, oral mediante el consumo de alimentos contaminados con el parásito, mediante transfusiones sanguíneas y trasplante de órganos de donadores infectados, se puede dar transmisión vertical de la madre al hijo durante el embarazo y mediante accidentes de laboratorio al manipular material contaminado con el parásito (Guarner, 2019; Lidani et al., 2019).

El complejo ciclo de vida de *T. cruzi* comprende su paso por diferentes animales mamíferos vertebrados e invertebrados, los animales mamíferos vertebrados funcionan como reservorios y entre ellos, los perros y los gatos, se pueden mencionar como los reservorios relevantes en el ámbito doméstico, mientras que, en el ámbito silvestre, son los roedores, armadillos y mapaches. En contraste, los animales invertebrados funcionan como vectores que transmiten la enfermedad, estos son insectos hematófagos pertenecientes principalmente a las especies *Triatoma infestans*, *T. dimidiata* y *Rhodnius prolixus* (Guarner, 2019).

### **1.4. Clínica de la enfermedad de Chagas**

La ECh se divide en tres fases las cuales son la fase aguda, fase crónica indeterminada y la fase crónica sintomática. La fase aguda dura unos 2 meses (Bern et al., 2019), la mayoría de las personas, cerca del 95%, son asintomática y menos del 5% presentan sintomatología. Los síntomas más comunes que pueden experimentar las personas

durante la fase aguda de la infección son inflamación en el sitio de lesión en la piel o chagoma, inflamación de la conjuntiva o signo de Romaña, fiebre, cefalea, dolor articular y muscular, dilatación del hígado, bazo y nódulos linfáticos. Cuando la infección ha sido adquirida mediante transmisión oral se pueden presentar síntomas como náuseas, vómito, diarrea, dolor abdominal y hemorragia gastrointestinal (Guarner, 2019; Teixeira et al., 2011). La fase aguda se puede presentar de manera severa en menos del 1% de los pacientes desarrollando miocarditis aguda, derrame pericárdico, meningoencefalitis y muerte (Nunes et al., 2013).

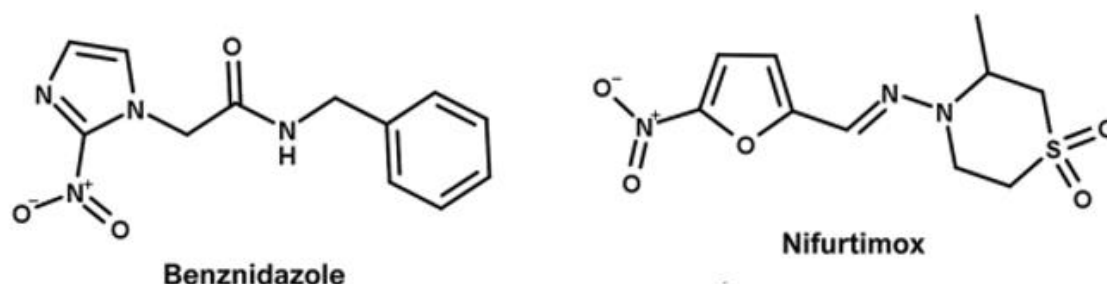
La fase crónica indeterminada puede durar entre 10 a 30 años o toda la vida, esta fase es considerada un periodo de latencia del parásito (Prata, 2001). Es caracterizada por la ausencia de sintomatología, ausencia de alteraciones en pruebas radiológicas y electrocardiograma, pero la infección por *T. cruzi* puede ser confirmada mediante pruebas serológicas o moleculares (Nunes et al., 2013).

Se estima que del 100% de las personas en fase indeterminada, el 30% avanza a fase crónica sintomática, esta fase es caracterizada por daño cardíaco, daño digestivo y neuropatía. De las personas que llegan a la fase crónica, más del 90% desarrolla problemas cardíacos como cardiomegalia, arritmias, falla cardíaca, formación de trombos y la muerte. El 5% de las personas que llegan a esta fase desarrolla síndrome de megaesófago caracterizado por alteraciones con la deglución de alimentos, o síndrome de megacolon, que se caracteriza por obstrucción total del colon, peritonitis y muerte. En la fase crónica aunque con menos frecuencia se presenta alteración de nervios simpáticos y parasimpáticos (Guarner, 2019).

## **1.5. Tratamiento de la Enfermedad de Chagas**

BNZ y NFX son los únicos medicamentos disponibles para el tratamiento clínico de la ECh que han mostrado eficacia contra *T. cruzi*. El BNZ es un derivado del 2-nitroimidazol, también conocido como N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il) acetamida (Figura 3) (Müller Kratz

et al., 2018). El BNZ es administrado en forma de profármaco requiriendo su activación por la enzima nitroreductasa tipo I del parásito (NTRI), la cual cataliza una reacción de reducción de grupo nitro a amino (Maya et al., 2007). Luego de la acción enzimática, se produce hidroxilamina, que en reacciones posteriores llevan a la producción de metabolitos intermediarios electrofílicos y puede producirse glioxal. El glioxal es un compuesto altamente reactivo que interactúa con las macromoléculas del parásito como proteínas y ácidos nucleicos formando aductos (Hall & Wilkinson, 2012).



**Figura 3.** Estructura química de Benznidazol y Nifurtimox. Tomado de Kratz, 2019.

Por su parte el NFX (Figura 3.), es un compuesto nitroheterocíclico derivado del nitrofuran, también conocido como 3-metil-4-(5'-nitrofurfuriliden-amino)-tetrahidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido (Maya et al., 2007). Al igual que BNZ, NFX es suministrado como profármaco y debe ser activado por la enzima NTRI. La reducción de NFX produce radicales libres como el peróxido de hidrogeno, los aniones superóxido y los aniones radicales nitro, los cuales generan estrés oxidativo provocando daño de la membrana celular, de la molécula de ADN e inhibe la actividad enzimática (Mady et al., 2008; Maya et al., 2007; Núñez-Vergara et al., 1997). Los mecanismos de respuesta al estrés oxidativo por *T. cruzi* son deficientes ya que carece de las enzimas catalasa y glutatión peroxidasa (Maya et al., 2007).

El tratamiento con estos medicamentos presenta varias problemáticas como son la toxicidad y la baja eficacia. Los efectos secundarios asociados a la administración de BNZ incluyen con mayor frecuencia dermatitis por hipersensibilidad y problemas digestivos, también se han evidenciado otras molestias como anorexia, cefalea, erupción cutánea,

fiebre, mialgias, artralgias, depresión, somnolencia, fatiga, y en menor frecuencia polineuritis, alteraciones hematopoyéticas, toxicidad hepática y linfomas (Olivera et al., 2017; Viotti et al., 2009). NFX está indicado en el manejo de la fase aguda de la ECh, incluida la infección congénita. Los efectos secundarios que puede ocasionar NFX son anorexia, pérdida de peso, diarrea, vomito, náuseas, dolor abdominal, cefalea, alteraciones del sueño, irritabilidad, mialgias, artralgias, fiebre, alteraciones neurológicas como polineuropatía y convulsiones, alteraciones hematológicas como leucopenia y trombocitopenia, y reacciones alérgicas en piel (Jackson et al., 2020).

La eficacia de BNZ y NFX durante la fase aguda de la infección puede variar del 80-100% en neonatos, niños y jóvenes, en cambio en adultos en fase aguda oscila entre el 65-100%. Sin embargo, la eficacia en adultos durante la fase crónica de la enfermedad es baja entre 10 - 30% (Mady et al., 2008; Martín-Escolano et al., 2020). Además, estos medicamentos presentan algunas contraindicaciones en gestantes, adultos con ECh avanzada o personas con otras enfermedades de base (Martín-Escolano et al., 2020). Otra de las dificultades que se han reportado en la terapia de la ECh es el largo periodo de tratamiento que comprenden entre 60 – 90 días, lo cual sumado a los efectos secundarios severos que inducen estos medicamentos, dan lugar a una alta tasa de abandono ( 18 - 49%) de los pacientes (Malone et al., 2021). Entre el 60-100% de los pacientes tratados con algunos de estos dos fármacos experimentan al menos un efecto secundario y se ha evidenciado mayor tolerabilidad farmacológica en niños que en adultos (Crespillo-Andújar et al., 2018; Jackson et al., 2020; Olivera et al., 2017). BNZ es el medicamento de primera línea debido a su mejor tolerancia y menor toxicidad, mientras que NFX es la segunda opción terapéutica (Crespillo-Andújar et al., 2018).

## **1.6. Susceptibilidad de *T. cruzi* a los antiparasitarios**

La enzima NTRI de *T. cruzi* activa los profármacos BNZ y NFX empleados en el tratamiento de la ECh, esta enzima es esencial en la diferenciación de *T. cruzi*. La pérdida o reducción de copias del gen codificante para la proteína NTRI, o la subexpresión de esta proteína resulta en menor de susceptibilidad a los compuestos nitroheterocíclicos (Mejía-Jaramillo

et al., 2011; Wilkinson et al., 2008). La pérdida del cromosoma que contiene el gen codificante para la NTRI o mutaciones en el gen pueden conducir a una disminución de la susceptibilidad a los fármacos, ya que las enzimas resultantes del gen mutado son incapaces de activar el BNZ. Las mutaciones del gen podrían afectar el sitio de interacción de la enzima con su cofactor flavin mononucleótido (FMN) resultando en pérdida de la actividad enzimática (Mejia et al., 2012).

Se ha encontrado que *T. cruzi* puede evadir el tratamiento quimioterapéutico mediante un estadio de latencia intracelular en el que algunos amastigotes intracelulares detienen su replicación mientras otros continúan multiplicándose. La forma de amastigote en dormancia, no replicativo, resiste la acción tripanocida de los fármacos por más de 30 días, mientras los amastigotes replicativos mueren. Así después de finalizado el tratamiento los amastigotes en dormancia activan su multiplicación o su diferenciación a tripomastigotes con el fin de reestablecer la infección. La forma de latencia de los amastigotes ha sido asociada con la falla terapéutica y la persistencia de la ECh (Sánchez-Valdéz et al., 2017).

También se ha evidenciado que la sobreexpresión de los genes codificantes para las proteínas aldo-ceto reductasa (AKR) y alcohol deshidrogenasa (ADH) incrementa la resistencia de *T. cruzi* al BNZ. La enzima AKR estaría implicada en la transformación de glioxal, metabolito tóxico tras la reducción de BNZ, a 1,2-etandiol y disminuiría el estrés oxidativo. Por su parte la enzima ADH podría metabolizar el glioxal y las especies reactivas de oxígeno (ROS), disminuyendo el estrés oxidativo mediante la unión irreversible al peróxido de hidrogeno. La sobreexpresión de AKR y ADH median la resistencia o tolerancia al BNZ en *T. cruzi* mediante la detoxificación de metabolitos intermediarios y de las ROS formados, de este modo disminuyendo el daño de las macromoléculas, organelos y membrana celular, y aumentando la supervivencia del parásito (González et al., 2017).

Además, se ha observado que la sobreexpresión de la enzima *old yellow enzyme* (OYE), una oxidoreductasa, incrementa el estrés oxidativo y el daño en el genoma, así aumentando la sensibilidad de *T. cruzi* a la acción tripanocida del BNZ. Las enzimas NTR y OYE median la activación del BNZ y la producción de metabolitos intermediarios tóxicos

como el glioxal y ROS, los cuales provocan daño del ADN y estrés oxidativo, conduciendo a la detención del ciclo celular y la muerte del parásito *T. cruzi* (García-Huertas, Mejía-Jaramillo, Machado, et al., 2017).

La menor sensibilidad de *T. cruzi* al BNZ es un proceso multigénico, ya que mediante análisis transcriptómico de parásitos sensibles y resistentes después de haber sido expuestos al BNZ, se logró caracterizar el perfil de expresión encontrando diferencias en la transcripción de 133 genes, de los cuales 40 tuvieron una baja expresión mientras 93 fueron sobreexpresados por los parásitos resistentes. Los 133 genes estuvieron involucrados en diferentes procesos como detoxificación, proteínas de unión al ARN, reparación del ADN, cinasas y oxidorreductasas (García-Huertas, Mejía-Jaramillo, González, et al., 2017).

## **1.7. Alternativas terapéuticas contra la enfermedad de Chagas**

Teniendo en cuenta las fallas que presentan los medicamentos que se usan actualmente para el tratamiento de la ECh, varias estrategias terapéuticas están siendo investigadas en la búsqueda de tratamientos alternativos, entre ellas las terapias de inmunomodulación, ya que se sabe que el daño causado al tejido cardíaco en la cardiopatía chagásica crónica no solo es responsabilidad del parásito, sino también de la exacerbada respuesta inflamatoria del sistema inmune, así que esta línea de investigación es una promisoría estrategia para explorar tratamientos contra la ECh avanzada (Santos et al., 2021).

Por otro lado, otra estrategia que se está investigando es la combinación de fármacos o sinergismo terapéutico, donde se estudian diferentes combinaciones de BNZ o NFX con otros nuevos compuestos o fármacos que se usan originalmente para el tratamiento de otra enfermedad, pero que han mostrado efecto tripanocida (Aguilera et al., 2018). Es así que se ha encontrado que combinaciones de fármacos han logrado un efecto sinérgico pues disminuyen la dosis y la duración del tratamiento, mejorando la actividad contra *T.*

*cruzi* al atacar al parásito mediante diferentes mecanismos de acción, además de disminuir la toxicidad, los costos de tratamiento y prevenir el desarrollo de resistencia (Bahia et al., 2014; Ribeiro et al., 2020; Tyers & Wright, 2019).

Otra de las alternativas terapéuticas que están siendo investigadas es el desarrollo de vacunas profilácticas y terapéuticas contra la ECh. Las vacunas son consideradas una de las estrategias más costo-efectivas en el control de las enfermedades infecciosas, por un lado, las vacunas profilácticas tienen como objetivo la prevención de la infección aguda mientras las vacunas terapéuticas están pensadas para ser administradas en combinación con tratamiento farmacológico a pacientes con seroconversión o en fase indeterminada de la ECh, con el fin de prevenir el desarrollo de la cardiopatía chagásica (Beaumier et al., 2016). Sin embargo, en la actualidad no se cuenta con ninguna vacuna y las investigaciones se encuentran en fase preclínica, diferentes plataformas de vacunas están siendo estudiadas tales como proteínas recombinantes, ADN, parásitos vivos atenuados, vector de Adenovirus, vector *Salmonella* y péptidos (Portillo et al., 2019).

Otra línea de investigación es la de inhibidores covalentes en la búsqueda de nuevas moléculas con efecto tripanocida, la cual ha permitido la identificación de dianas terapéuticas, es decir proteínas que intervienen en importantes vías metabólicas en el parásito, y en esta dirección las vías metabólicas más estudiadas han sido la glicolisis, vía de recuperación de purinas y nucleótidos, proceso de degradación de proteínas y péptidos, biosíntesis *de novo* de nucleótidos de pirimidina, síntesis de esterol y daño por estrés oxidativo. La identificación del blanco terapéutico y el uso de análisis computacional en la simulación de interacciones entre las proteínas que intervienen en importantes rutas metabólicas y de supervivencia del parásito, seleccionadas como blanco y moléculas con potencial a inhibirlas, ha permitido la identificación de compuestos promisorios para ser evaluados en ensayos preclínicos (Beltran-Hortelano et al., 2022; Ghosh et al., 2019). En la presente investigación se empleó esta última estrategia, en donde el blanco terapéutico seleccionado fue la proteína TcCS.

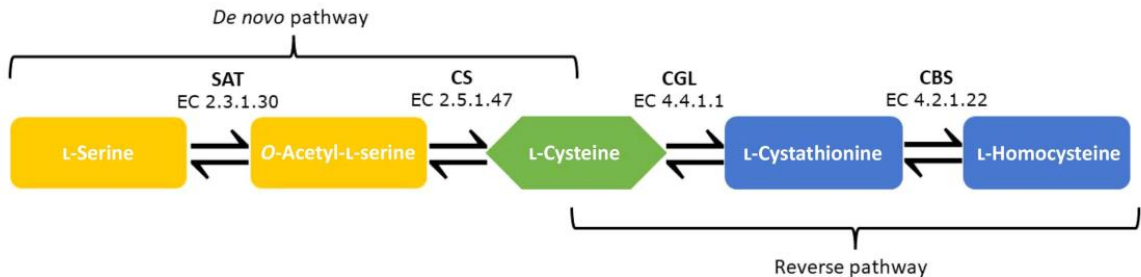
## 1.8. Cisteína sintasa como blanco terapéutico

La enzima CS, también conocida como O-acetil-L-serina sulfhidrolasa (EC 2.5.1.47), es una transferasa que cataliza la síntesis de L-Cisteína (Cys) a partir de O-acetil-L-serina (OAS). Es una proteína homodimérica dependiente del cofactor piridoxal-5-fosfato (PLP) (Marciano et al., 2012; Schnell et al., 2015). Respecto a la estructura de la TcCS, la enzima está formada por dos dominios estructurales, el dominio I conformado por 4 hélices  $\alpha$  y 4 láminas  $\beta$ , mientras que el dominio II, está constituido por 4 hélices  $\alpha$  y 6 láminas  $\beta$  (Pardo-rodriguez et al., 2023). La TcCS contiene cuatro residuos de lisina (Lys) necesarios para la actividad catalítica los cuales son: Lys41, Lys52, Lys68 y Lys200, por otra parte, los residuos que interactúan con el cofactor PLP son Lys52, Asn83, Thr188, Gly189, Thr191, Ser275, mientras que el sustrato OAS reacciona solamente con Lys52 y Asn83 (Sowerby et al., 2023).

La Cys es un aminoácido azufrado que desempeña un importante papel en la estabilidad, la estructura, la actividad catalítica y la regulación de las proteínas. Dos cisteínas pueden formar un enlace covalente disulfuro mediante la oxidación de los grupos tiol formando una cistina, este tipo de enlace les da estabilidad a las proteínas en su estructura terciaria. La Cys es una molécula precursora en la formación de glutatión, tripanotión, coenzima A, cisteamina y taurina (Nozaki et al., 2005).

*T. cruzi* puede sintetizar Cys mediante dos rutas metabólicas (Figura 4), la vía de transulfuración reversa y la vía de biosíntesis *de novo* (Nozaki et al., 2005). La síntesis de Cys mediante transulfuración reversa es catalizada por dos enzimas, CBS, que toma como sustrato la homocisteína produciendo cistationina, posteriormente la enzima Cistationina gamma liasa (CGL) toma como sustrato la cistationina y produce Cys (Marciano et al., 2012; Thomas & Surdin-Kerjan, 1997; Williams et al., 2009). Por otro lado, la vía de biosíntesis *de novo* es llevada a cabo por otras dos enzimas, la Serina acetil transferasa (SAT) que toma como sustratos L-serina y acetil coenzima A produciendo OAS, posteriormente la enzima CS toma como sustratos a OAS y sulfuro de hidrogeno

produciendo Cys (Marciano et al., 2012; Sowerby et al., 2023; Takagi & Ohtsu, 2016; Williams et al., 2009).



**Figura 4.** Vías de biosíntesis de cisteína en *T. cruzi*. En el esquema se muestran las enzimas, sustratos y productos en las vías de producción de Cys *de novo* y transulfuración reversa. Tomado de Sowerby *et al.*, 2023.

Se han encontrado diferencias en la expresión de las proteínas implicadas en la producción de Cys en los estadios de *T. cruzi*, el estadio intracelular presenta mayor expresión y actividad de la CS, lo cual sugiere que la producción de Cys en este estadio estaría a cargo de la CS en la vía de biosíntesis *de novo*. Por otro lado, se ha detectado mayor actividad de la CBS en el estadio extracelular replicativo sugiriendo que la producción de Cys en esta forma evolutiva depende de la vía de transulfuración reversa. Igualmente, se ha encontrado mayor abundancia de la proteína CGL en epimastigotes y tripomastigotes derivados de células (Marciano et al., 2012). Además de las dos rutas para la producción de Cys en *T. cruzi*, se han reportado sistemas de transporte específicos con alta afinidad por la Cys en epimastigotes, este hallazgo ha sugerido que la cantidad de Cys producida por el parásito podría no cumplir con los requerimientos necesarios y por tanto el parásito incorpora Cys del medio extracelular, siendo requerida para diversos procesos como la producción de tripanotión, mantenimiento del estado redox, fuente de nitrógeno y azufre, e incorporación postraduccional en proteínas (Canepa et al., 2009).

Adicionalmente, la Cys es precursora de glutatión, y el glutatión conjugado con la espermidina forman tripanotión, una importante molécula reconocida como antioxidante, ya que está implicada en el mantenimiento del balance redox intracelular y protege a las

células del daño por estrés oxidativo en tripanosomátidos; es decir la producción de Cys está involucrada de manera indirecta con el sistema de defensa antioxidante de los tripanosomátidos al ser el pilar sobre el cual se sintetiza el tripanotión (Nozaki et al., 2005; Romero et al., 2014).

Con todo esto, se puede afirmar que la proteína CS es un potencial blanco terapéutico porque: está ausente en mamíferos y presenta notables diferencias con su homólogo más cercano (CBS), además tiene una participación en los mecanismos de supervivencia del parásito principalmente en el estadio intracelular (Marciano et al., 2012; Nozaki et al., 2001; Romero et al., 2014; Williams et al., 2009). Adicional y debido a la creciente aparición de resistencia antimicrobiana en patógenos humanos, y a la necesidad de buscar y desarrollar nuevos antimicrobianos que inhiban moléculas blanco como las enzimas que intervienen en procesos metabólicos vitales en los patógenos principalmente multidrogoresistentes (Jubair et al., 2021), en los últimos años la enzima CS ha sido objeto de estudio como blanco terapéutico para el desarrollo de fármacos en diferentes microorganismos como *M. tuberculosis*, *Salmonella* sp, *T. vaginalis*, *E. histolytica*, *Leishmania* sp y *T. cruzi* (de Oliveira et al., 2021; Dharavath et al., 2020; Jean et al., 2013; Magalhães et al., 2018; Pardo-rodriguez et al., 2023; Singh et al., 2013).

En un estudio realizado por Jean *et al.* donde se evaluó el efecto inhibitorio y antibacterial de 30 compuestos derivados de nitro-5H-tiazolo [3,2-a] pirimidinona sobre la enzima CysK1 (CS) de *M. tuberculosis*. Se encontró que tres compuestos (4n, 5h y 5k) lograron inhibir el 50% en la actividad de la enzima CysK1 de *M. tuberculosis*. Los compuestos 5e, 4n y 5n presentaron las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) más bajas sobre el crecimiento de la bacteria tuberculosa (<10 µM). El compuesto más activo contra *M. tuberculosis* fue el 4n, ya que la  $CI_{50}$  fue de 17.7 µM (CysK1), la MIC fue de 7.6 µM y la toxicidad en células de mamífero fue baja. Así entonces, el compuesto 4n es una molécula potencial para el desarrollo de fármacos que inhiban la enzima CS limitando el crecimiento de la bacteria causante de la tuberculosis en humanos (Jean et al., 2013).

La estrategia de estudio, empleando la enzima CS como blanco terapéutico ha sido investigada en protozoos como *T. vaginalis*, agente causal de la enfermedad de transmisión sexual conocida como tricomoniasis. Singh et al. en el 2013 evaluaron diferentes moléculas como posibles inhibidores de la enzima CS de *T. vaginalis* mediante análisis *in silico*, encontrando que el compuesto ZINC01690699 (1-N, 4-N-bis [3- (1H-bencimidazol-2-il) fenil] benceno-1,4-dicarboxamida), mostró las interacciones más estables con el sitio activo de la enzima y presentó la afinidad de unión más alta hacia CS. El compuesto ZINC01690699 sería un potencial inhibidor de la enzima CS al interactuar con los residuos del sitio activo, por lo tanto, podría ser usado en el desarrollo de nuevas drogas que permitan tratar las infecciones por este protozoario resistente a los antimicrobianos (Singh et al., 2013).

La inhibición de la enzima CS también ha sido estudiada en enteropatógenos con el fin de buscar posibles fármacos alternativos para combatir resistencia antibiótica que ha surgido en organismos como *Salmonella sp.*, en esa dirección, Magalhaes *et al.* investigaron el efecto inhibitorio de diferentes compuestos basados en ácidos carboxílicos sobre la actividad de la enzima recombinante de CS en sus dos isoformas (OASS-A y OASS-B) de la bacteria *Salmonella sp.* Los resultados evidencian que el compuesto 4c (Ácido 1H-pirazol-5-carboxílico), presentó un 94% y 82% de inhibición sobre las enzimas OASS-A y OASS-B de *Salmonella sp.*, respectivamente. Además, el compuesto 4c presentó características fisicoquímicas deseables que indican potencial penetración del compuesto a través de la pared celular de las bacterias Gramnegativas. El compuesto 4c es una molécula promisorio que inhibe la actividad de la enzima CS, lo cual puede ser usado como una estrategia para el desarrollo de nuevos antibacterianos (Magalhães et al., 2018).

Otro protozoo en el que se ha investigado a la proteína CS como diana terapéutica es *E. histolytica*, agente causal de disentería amebiana, como el trabajo desarrollado por Dharavath *et al.* en el cual se determinó el efecto de 10 compuestos sobre la actividad de la enzima EhOASS (CS) de *E. histolytica*, observando que nueve de los diez compuestos ejercieron inhibición moderada de la actividad enzimática, pero el compuesto F3226-1387, presentó una fuerte actividad inhibitoria con una  $CI_{50}$  de 38  $\mu$ M. Además, se evidencio que el compuesto F3226-1387 logró reducir el crecimiento de los trofozoítos de la ameba en

un 71,6% tras 72h de incubación, aplicando el inhibidor cada 12h. Según los análisis *in silico*, el compuesto F3226-1387 no induciría efectos adversos en el hospedero. Se concluye que la enzima EhOASS juega un importante papel en el crecimiento y supervivencia de la ameba, y que el compuesto F3226-1387 es una molécula potencial para el desarrollo de una terapia contra *E. histolytica* (Dharavath et al., 2020).

Finalmente, en recientes estudios de nuestro grupo de investigación, se identificaron compuestos inhibitorios con afinidad por la enzima CS de kinetoplastidos como *Leishmania sp*, agente causal de la leishmaniasis y *T. cruzi*. En el trabajo publicado por Téllez *et al*, se estudió la interacción de diferentes compuestos con la enzima CS de *L. braziliensis* y *L. major* mediante acoplamiento molecular y simulación de dinámica molecular, en la búsqueda de compuestos inhibitorios. La molécula ZINC16524774 presentó una mejor afinidad y estabilidad en la unión a ambas enzimas diana (CSLb/CSLm) y evidenció un mayor número de interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrogeno, comparado al sustrato natural. El compuesto ZINC16524774 se presentó como una molécula con un potencial inhibitorio sobre las enzimas CS de ambas especies de *Leishmania* y efecto inhibitorio del crecimiento de ese tipo de protozoos (Téllez et al., 2022). Igualmente, mediante análisis computacional de acoplamiento y dinámica molecular fueron elegidos dos compuestos triterpénicos pentacíclicos, el acetato de lupeol y la  $\alpha$ -amirina, que mostraron mayor afinidad por las proteínas TcCS y CS de *L. major*, presentando energías de unión entre -9.4 y -10.1kcal/mol. Basados en los resultados del análisis *in silico*, se evaluó el efecto tripanocida *in vitro* de los dos compuestos, acetato de lupeol y  $\alpha$ -amirina, encontrando que el acetato de lupeol presentó moderada potencia tripanocida sobre el estadio tripomastigote con una  $CE_{50}$  de 15.82  $\mu$ g/mL, mientras que  $\alpha$ -amirina mostró moderada potencia anti-tripanosoma sobre el estadio intracelular con una  $CI_{50}$  de 9.08  $\mu$ g/mL. Los dos compuestos presentaron promisorio potencial de inhibición sobre la proteína TcCS y los resultados de los ensayos de susceptibilidad permiten evidenciar que acetato de lupeol y  $\alpha$ -amirina pueden ser explorados como candidatos para el desarrollo de fármacos para el tratamiento de la ECh (Pardo-rodriguez et al., 2023).

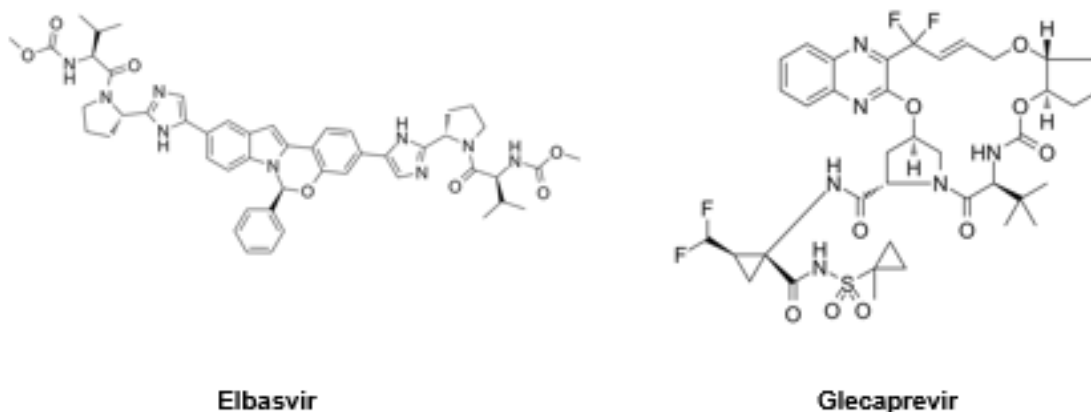
Por último, teniendo en cuenta que la TcCS presenta un porcentaje de identidad de 71,9% con la CS de *L. major* (LmCS), en otro estudio previo de nuestro grupo de investigación, la

estructura tridimensional de la proteína TcCS fue modelada por homología con base en la estructura 3D de la LmCS. Los análisis de acoplamiento molecular usando como receptor a la TcCS modelada y como ligandos, alrededor de 3000 estructuras tomadas de las bases de datos TACC y DockThor, estas estructuras incluían fármacos, compuestos sintéticos y derivados naturales. Los análisis de acoplamiento molecular permitieron seleccionar los ligandos que presentaron mayor afinidad de unión por la CS con las energías libres de unión más bajas. Los ligandos que presentaron mayor afinidad en la unión al sitio activo de la TcCS fueron EBV y GCV con energías de -11.5 kcal/mol y -11.1 kcal/mol, respectivamente. Posteriormente, se realizó simulación de dinámica molecular para conocer la estabilidad del complejo proteína-ligando en el tiempo a 100ns, la interacción de los ligandos con la proteína mostró alta estabilidad, además los ligandos mostraron formación de puentes de hidrogeno con residuos del sitio activo de la proteína, EBV y GCV formaron entre 1-4 y 1-3 puentes de hidrogeno, respectivamente. Con base en los resultados de análisis computacional de acoplamiento y dinámica molecular entre la proteína TcCS y los ligandos, se eligieron dos moléculas con promisorio efecto inhibitorio sobre la TcCS, EBV y GCV, y se decidió evaluar su efecto tripanocida *in vitro* (Pardo-Rodríguez et al. Working paper).

## 1.9. Elbasvir y su actividad biológica

EBV o MK-8742 (Figura 5), es un inhibidor de la proteína no estructural 5A (NS5A) del Virus de la Hepatitis C (VHC), la proteína NS5A está involucrada en la replicación de genoma viral y el ensamblaje de viriones. EBV es administrado en combinación con grazoprevir, inhibidor de la proteasa no estructural 3/4A (NS3/4A), en el tratamiento de las infecciones causadas por el VHC. La fórmula elbasvir/grazoprevir fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) en enero de 2016 y es distribuido comercialmente bajo nombre Zepatier® (Cada et al., 2016; Wang et al., 2021). EBV ha mostrado una potente actividad antiviral *in vitro* contra diferente genotipos del VHC, presentando  $CE_{50}$  de 0.006nM para los genotipos 1a y1b, y 0.12nM en los replicones del genotipo 3 (Liu et al., 2015).

Mediante análisis de acoplamiento *in silico* se encontró a EBV con potencial para inhibir a la ARN polimerasa dependiente de ARN RdRp de SARS-CoV-2. El efecto antiviral de EBV fue evaluado sobre dos cepas de coronavirus patógenos, SARS-CoV-2 en células Huh7 y HCoV-OC43 en células MRC-5, reportando que EBV presentó uno de los mejores resultados de actividad antiviral en SARS-CoV-2 con una  $CE_{50}$  de 23  $\mu$ M, una baja citotoxicidad y un alto índice de selectividad. Por otro lado, EBV mostró una fuerte actividad contra HCoV-OC43 con una  $CE_{50}$  de 1.5  $\mu$ M, concluyendo así que EBV es un potente fármaco para el tratamiento de infecciones causadas por los coronavirus SARS-CoV-2 y HCoV-OC43 (Milani et al., 2021).



**Figura 5.** Estructura química de Elbasvir (EBV) y de Glecaprevir (GCV). Tomado de MedChemExpress (MedChemExpress, 2023).

También se ha estado investigando el potencial de EBV como inhibidor de transportadores de glicoproteína P (P-gp), los cuales están implicados en uno de los mecanismos de resistencia de las células cancerosas al tratamiento anticáncer. Mediante ensayos *in silico* de unión de la P-gp con 512 moléculas, se seleccionaron los compuestos que presentaron las mejores energías de unión a la proteína, EBV presentó promisorio energía de unión contra la P-gp (-111.9Kcal/mol). Los investigadores concluyeron que EBV es un promisorio inhibidor de la P-gp y sugieren continuar la fase de ensayos preclínicos (Ibrahim et al., 2023).

## 1.10. Glecaprevir y su actividad biológica

GCV o ABT-493 (Figura 5), es un inhibidor de la proteasa NS3/4A del VHC, enzima implicada en el clivaje de la poliproteína viral, esta proteasa juega un importante papel en la replicación viral y en la evasión de sistema inmune (Horner & Gale, 2013). GCV es administrado en combinación con pibrentasvir, inhibidor de la proteína NS5A, para el tratamiento de las infecciones crónicas causadas por VHC, es comercializado y distribuido bajo el nombre de Mavyret™, el cual fue aprobado por la FDA en agosto de 2017 (Lamb, 2017). GCV ha sido identificado como una molécula con potente actividad antiviral en diferentes genotipos del VHC en células Huh-7, presentando un  $CE_{50}$  entre 0.21 - 4.6nM. Mediante ensayos bioquímicos se evaluó la inhibición de la actividad de enzimática de proteasas NS3/4A recombinantes de distintos genotipos del VHC en presencia de GCV, encontrando una  $CI_{50}$  entre 3.5 – 11.3nM, además se encontró que este compuesto presentó una alta selectividad por las proteasas de VHC sobre las proteasas humanas evaluadas, en las cuales se reportó una  $CI_{50} >200,000nM$  (Ng et al., 2018).

Mediante ensayos *in silico*, GCV mostró ser potencial agente antiviral contra SARS-CoV2 a través de la inhibición de la proteasa principal 6lu7 (Chtita et al., 2021). En contraste a lo anterior el papel antiviral de GCV sobre SARS-CoV-2 en células Vero E6 y A549-hACE2 se evaluó *in vitro*, reportando  $CE_{50}$  de  $>178\mu M$  y  $>94\mu M$ , respectivamente (Gammeltoft et al., 2021).

Por otra parte, se ha encontrado que GCV es capaz de inhibir transportadores de eflujo presentes en la membrana celular. La capacidad inhibitoria de GCV sobre transportadores de eflujo fue evaluada sobre membranas de vesículas expresando proteínas de eflujo *in vitro*. Se evidenció que GCV logró inhibir a los transportadores de P-gp, proteína de resistencia de cáncer de mama (BCRP), polipéptido transportador de aniones orgánicos OATP1B1 y OATP1B3, con  $CI_{50}$  de 0.33  $\mu M$ , 2.3  $\mu M$ , 0.017  $\mu M$  y 0.064  $\mu M$ , respectivamente (Kosloski et al., 2019).

Con base en la evidencia mostrada y nuestros resultados previos de afinidad por la enzima TcCS de los antivirales EBV y GCV, la presente investigación propuso profundizar en la exploración de la actividad tripanocida y del efecto de esos compuestos sobre la TcCS, visando ampliar el arsenal disponible de tratamientos para la ECh.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo general**

Evaluar la actividad tripanocida de elbasvir y glecaprevir y el efecto sobre la actividad de la enzima Cisteína sintasa de *Trypanosoma cruzi in vitro*.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Evaluar la actividad tripanocida de elbasvir y glecaprevir en diferentes estadios de *T. cruzi*.
- Determinar el efecto inhibitorio de elbasvir y glecaprevir sobre la actividad de la enzima Cisteína sintasa de *T. cruzi*.

## 3. Metodología

### 3.1. Cultivo celular y parásitos

La línea de células derivadas de riñón de mono verde africano (células Vero, ATCC CCL-81, Manassas, VA), fueron cultivadas en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Eurobio, Toulouse, France) suplementado con 10% suero fetal bovino inactivado (SFBI) (Eurobio), 2 mM de L-glutamina (Eurobio), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomina (Eurobio), 0.01 M de HEPES (Eurobio) y 1 X de aminoácidos no esenciales (Eurobio), siguiendo las especificaciones del fabricante. Las células fueron crecidas a 37°C en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> y cultivadas hasta alcanzar una monocapa semiconfluyente, para posteriormente ser infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* de la cepa Y (MHOM/BR/00/Y), correspondiente con la unidad discreta de tipificación II, UDT TcII (Pavia et al., 2012). Para la infección se empleó una relación 1:10 (célula: parásito) y posteriormente se incubaron durante 96h y se recuperaron tripomastigotes del medio de cultivo para ser utilizados en los ensayos siguientes. Por su parte, epimastigotes de la cepa Y de *T. cruzi* fueron cultivados en medio infusión de hígado y triptosa (LIT) suplementado con 15% de SFBI, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomina, a 26°C. Los parásitos fueron mantenidos en fase exponencial del crecimiento para la realización de los experimentos (Pardo-rodriguez et al., 2023; Pardo-Rodriguez et al., 2022).

### 3.2. Preparación de los compuestos

El BNZ, N-Benzyl-2-nitro-1H-imidazole-1-acetamide (Sigma-Aldrich), EBV y GCV (MedChemExpress), fueron solubilizados en dimetilsulfóxido (DMSO) ≥99.5% (Sigma-Aldrich) de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Posteriormente, los compuestos fueron diluidos en medio DMEM, la concentración máxima de DMSO por pozo fue del 1%. El compuesto EBV presentó pobre solubilidad y al tratar de realizar los ensayos en concentraciones superiores a 50 µM, el medicamento se precipitaba formando cristales al ser diluido en medio acuoso. Con el propósito de obtener una mayor solubilidad, el

medicamento fue sometido a sonicación en concentraciones superiores a 50  $\mu\text{M}$  y también se probó diluyendo el medicamento en PBS 1 X con diferentes concentraciones de DMSO, pero se evidenciaba precipitación. Finalmente, a partir de una solución de EBV a 20 mM en DMSO puro se realizó una dilución Intermedia del compuesto en DMSO puro a una concentración de 5000  $\mu\text{M}$  del compuesto, y de ahí se llevó al medio de cultivo manteniendo el DMSO al 1% y el medicamento se mantuvo soluble sin precipitación. Debido a la limitada solubilidad del compuesto EBV, la máxima concentración del compuesto evaluada en todos los experimentos fue de 50  $\mu\text{M}$ , mientras que la concentración más alta ensayada de GCV fue 100  $\mu\text{M}$ .

### **3.3. Efecto tripanocida en tripomastigotes**

Los tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y obtenidos de infección en células Vero según descrito en el numeral 3.1 de la presente sección, fueron recuperados del medio de cultivo y  $5 \times 10^5$  parásitos/pozo fueron sembrados en placas de 96 pozos en medio DMEM e incubados a 37°C con una atmósfera de 5%  $\text{CO}_2$  durante 24h en presencia de concentraciones variables de los medicamentos en estudio como se describe a continuación. La susceptibilidad de los parásitos a BNZ y a EBV fue evaluada en diluciones seriadas desde 50  $\mu\text{M}$  hasta 1.5  $\mu\text{M}$ , mientras que el GCV fue evaluado en diluciones seriadas desde 100  $\mu\text{M}$  hasta 3.1  $\mu\text{M}$ . La susceptibilidad en tripomastigotes fue evaluada mediante el conteo de parásitos viables en cámara de Neubauer utilizando azul de tripán (Sigma-Aldrich) como colorante de vitalidad. La concentración efectiva que disminuyó la población de tripomastigotes en un 50% ( $\text{CE}_{50}$ ) fue calculada a partir de los porcentajes de viabilidad usando el programa GraphPad Prism 8, mediante la construcción de una curva dosis respuesta en un análisis de regresión no lineal utilizando la ecuación  $\log(\text{inhibidor})$  vs. Respuesta normalizada – pendiente variable. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado en tres réplicas biológicas independientes (Matsuo et al., 2010; Meira et al., 2016; Moreno et al., 2018; Pardo-Rodriguez et al., 2022; Santoro et al., 2007). Como control negativo se utilizó medio DMEM suplementado pero sin medicamento, como control vehículo DMSO al 1% en medio DMEM y como control positivo se utilizó BNZ (10.88  $\mu\text{M}$ ). En la Figura 6, se puede observar un esquema metodológico general de la evaluación de la susceptibilidad en tripomastigotes.

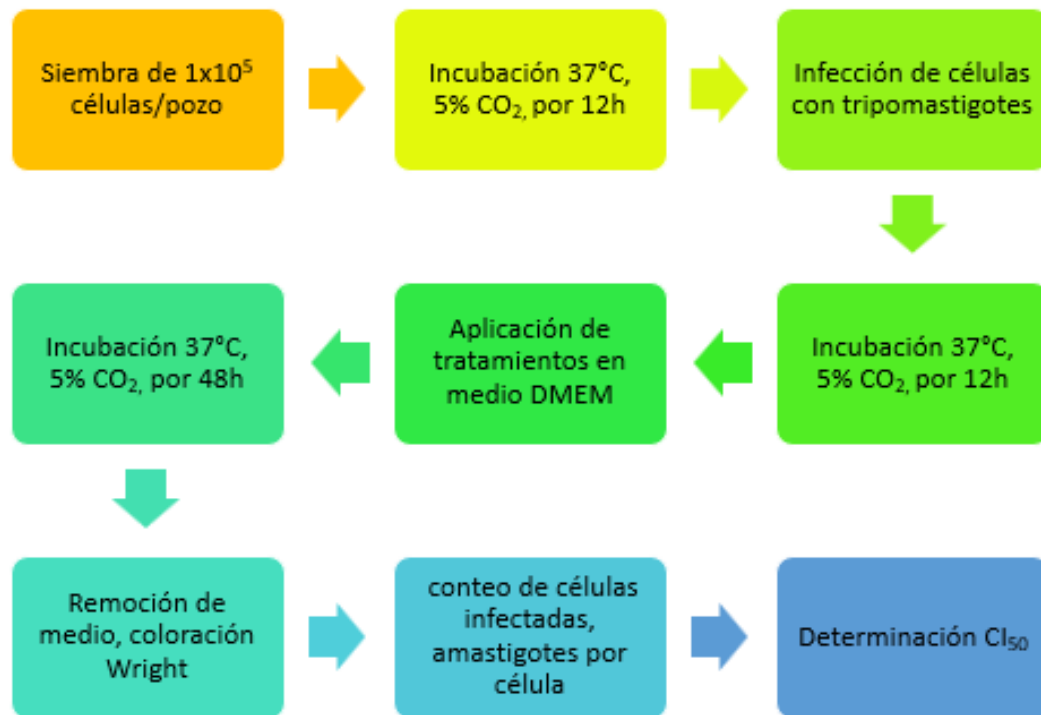


**Figura 6.** Esquema metodológico de los ensayos de susceptibilidad en tripomastigotes.

### 3.4. Efecto tripanocida en amastigotes

La evaluación del efecto tripanocida en amastigotes de los compuestos EBV y GCV se realizó empleando  $1 \times 10^5$  células/pozo sembradas en placas de 6 pozos durante 12h, posteriormente las células fueron infectadas con tripomastigotes de *T. cruzi* cepa Y en una relación 1:40 (célula: parásito) obtenidos de infecciones activas. Después de 12h de incubación, los cultivos fueron lavados con PBS 1 X (Eurobio) para eliminar los parásitos que no ingresaron a las células. Paso seguido los cultivos fueron incubados a 37°C con una atmósfera 5% CO<sub>2</sub>, durante 48h en presencia de diferentes concentraciones del medicamento en diluciones seriadas. El BNZ y GCV se emplearon concentraciones decrecientes desde 100 μM hasta 3.1 μM, mientras que para el EBV fue desde 50 μM hasta 1.5 μM. Tras 48h de incubación, las placas fueron lavadas con PBS 1 X, se dejaron secar y posteriormente fueron coloreadas con Wright (Sigma-Aldrich) disuelto en metanol. Como controles positivos y negativos se usaron los mismos descritos en el ítem 6.3. El efecto de los medicamentos sobre el estadio amastigote fue determinado calculando el porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes encontrados por células

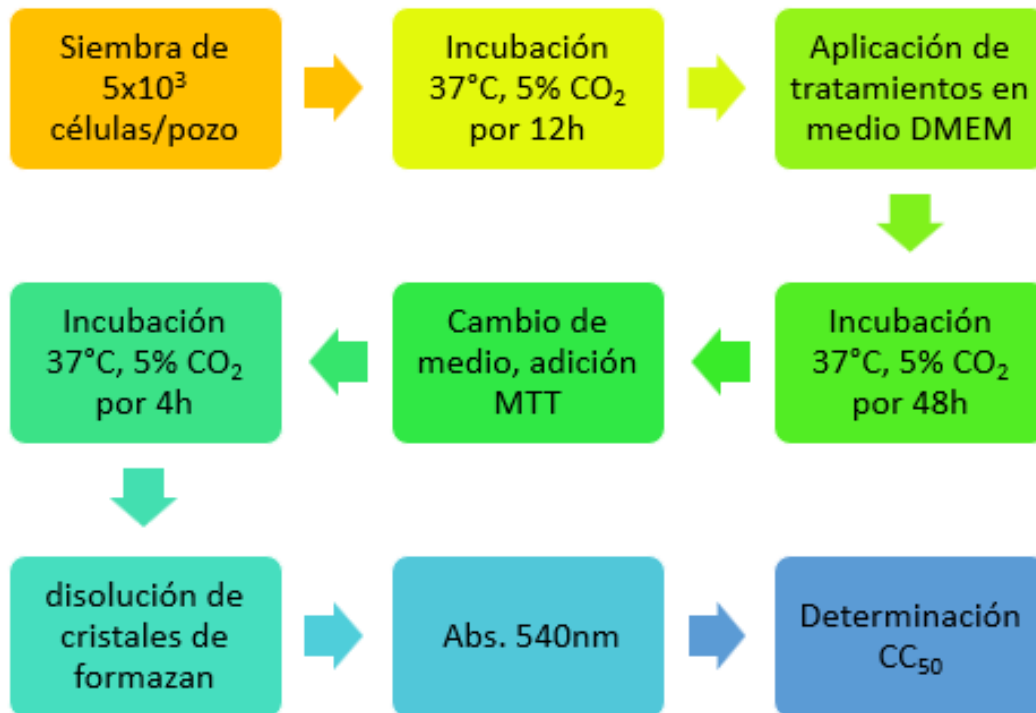
infectadas en cultivos tratados y no tratados, por conteo de 300 células distribuidas al azar usando el objetivo 100x del microscopio óptico, en esquema general del procedimiento se puede observar en la Figura 7. Todos los ensayos fueron realizados por duplicado en tres réplicas biológicas independientes (Meira et al., 2016; Moreno et al., 2018; Pardo-Rodriguez et al., 2022; Sereno et al., 2000; Téllez et al., 2019). El índice parasitario fue obtenido mediante la formula:  $((\text{No. de amastigotes en células pozos tratados} \times \% \text{ de células infectadas en pozos tratados}) / (\text{No. de amastigotes en células en pozos no tratados} \times \% \text{ de células infectadas en pozos no tratados})) \times 100$  (Sereno et al., 2000). La concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ) que redujo la infección y la población de amastigotes en un 50% fue calculado mediante la construcción de una curva dosis respuesta en un análisis de regresión no lineal de los índices parasitarios utilizando la ecuación  $\log(\text{inhibidor})$  vs. Respuesta normalizada – pendiente variable en el programa GraphPad Prism 8.



**Figura 7.** Esquema metodológico de los ensayos de susceptibilidad en amastigotes.

### 3.5. Citotoxicidad en células Vero

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron empleando  $5 \times 10^3$  células/pozo, las cuales fueron sembradas en placas de 96 pozos e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  con una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  durante 12h, posteriormente, las células fueron tratadas con diferentes concentraciones del medicamento durante 48h, en diluciones seriadas para el BNZ y el GCV desde  $250 \mu\text{M}$  hasta  $15.6 \mu\text{M}$ , y para el EBV desde  $50 \mu\text{M}$  hasta  $3.1 \mu\text{M}$ . El efecto citotóxico de los antivirales sobre las células Vero fue evaluado mediante ensayo colorimétrico Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT) (Sigma-Aldrich), tras 48h de incubación los tratamientos fueron retirados y luego se les adicionó medio RPMI 1640 (Biowest) y reactivo MTT a una concentración final de  $0.33 \text{ mg/mL}$ . Las células se incubaron por 4h en oscuridad a  $37^\circ\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$  y posteriormente los cristales de formazan se disolvieron con DMSO puro y la absorbancia fue medida a  $540\text{nm}$ , en la Figura 8 se presenta el esquema metodológico. Todos los ensayos fueron realizados por triplicado en tres réplicas biológicas independientes. Como control positivo de citotoxicidad fue usada doxorubicina  $1 \mu\text{M}$  (Sigma-Aldrich), como control vehículo fue usado DMSO al 1% en medio DMEM suplementado y como control negativo se usó medio DMEM suplementado pero sin medicamento. La concentración citotóxica media ( $\text{CC}_{50}$ ) que disminuyó la viabilidad celular en un 50%, fue calculada a partir de los porcentajes de viabilidad construyendo una curva dosis respuesta en un análisis de regresión no lineal utilizando la ecuación  $\log(\text{inhibidor})$  vs. Respuesta normalizada – pendiente variable en el programa GraphPad Prism 8. El índice de selectividad se obtuvo entre la relación de la  $\text{CE}_{50}$  en tripomastigotes, la  $\text{CI}_{50}$  en amastigotes y la  $\text{CC}_{50}$  en células Vero (Beer et al., 2016; Pardo-rodriguez et al., 2023; Pardo-Rodriguez et al., 2022).



**Figura 8.** Esquema metodológico del ensayo de citotoxicidad en células Vero.

### 3.6. Extracción de proteínas totales

Las proteínas totales fueron obtenidas a partir de epimastigotes cultivados en medio LIT, tripomastigotes obtenidos del sobrenadante de infección en células Vero, de las células Vero tripsinizadas de cultivo en medio DMEM y de bacterias *Escherichia coli* BL21 DE3 cultivadas en caldo Luria-Bertani (LB). En todos los casos las células fueron centrifugadas a 2000rpm durante 10min, posteriormente se descartó el sobrenadante y se realizó dos lavados con PBS 1X. Los pellets de células fueron lisados por repetidas aspiraciones en frío con el buffer lisis que contenía 0.25 M Sacarosa (Sigma), 0.25% Triton X-100 (Sigma), 10 mM EDTA (Sigma), y el coctel inhibidor de proteasas (Protease inhibitor cocktail kit MP Biomedicals, LLC). Luego el lisado celular se centrifugó a 12.000 xg durante 10min a 4°C. El sobrenadante fue separado a otro tubo y congelado a -80°C (Decuypere et al., 2012; Romero et al., 2014, 2015). La cuantificación de proteínas se realizó por método de

Bradford (Quick Start™ Bradford Protein Assay Bio-Rad) en microplaca midiendo las absorbancias a 595nm. Se construyó una curva patrón con albumina de suero bovino (BSA) usando las siguientes concentraciones 125, 250, 500, 750, 1000 y 1500 µg/mL, por triplicado y se graficó en el programa Microsoft Excel. Debido a la limitación para obtener grandes cantidades de amastigotes y tripomastigotes a partir de cultivos para las extracciones de proteínas, los ensayos de actividad enzimática de los dos compuestos se realizaron usando extractos de proteínas de epimastigotes teniendo en cuenta la facilidad para cultivarlos, y solo EBV fue evaluado también con extractos de tripomastigotes.

### **3.7. Ensayos de actividad enzimática**

La actividad de la enzima CS en presencia de EBV o GCV fue evaluada mediante la cuantificación de Cys producidas en reacciones usando extractos de proteínas solubles de tripomastigotes y epimastigotes cepa Y de *T. cruzi*. Las reacciones fueron llevadas a cabo de acuerdo al protocolo para determinación de la actividad enzimática de la CS establecido por Romero et al., 2014, a un volumen final de 500µL, buffer fosfato de potasio monobásico (Sigma-Aldrich) 200mM pH 7.5, el extracto de proteínas (1.0 µg/µL), piridoxal 5'-fosfato (PLP) 0.2 mM (Sigma), ditioneitol (DTT) 10 mM (Alfa Aesar) y O-Acetil-L-serina clohidrato 6.5 mM (Sigma-Aldrich) fueron incubados a 37°C por 5min, posteriormente se adicionó sulfuro de sodio (Na<sub>2</sub>S) 4 mM (PanReac Applichem) para desencadenar la reacción y se incubó a 37°C durante 30 min. Luego, la reacción fue detenida por la adición de 50 µL de ácido tricloroacético 20% (v/v) (Central Drug House), y la mezcla fue centrifugada a 12.000xg durante 5min, y el sobrenadante fue transferido a otro tubo para cuantificación de Cys (Romero et al., 2014).

Para la cuantificación de Cys se tomaron 500µL del sobrenadante de la reacción y se agregó 500µL de reactivo de ninhidrina, disolviendo 250mg de Ninhidrina AR (Central Drug House) en 20mL de ácido acético: ácido clorhídrico, en proporción 80~20 v/v. Luego, se incubó en agua hirviendo durante 10min y se enfriaron en hielo, para posteriormente adicionar 500µL de etanol al 95% (v/v). La Cys producida fue cuantificada mediante medición de la absorbancia a 560nm. Para interpolar las absorbancias a concentraciones,

se realizó una curva patrón con L-cisteína (Bio Basic) con seis concentraciones (0.01, 0.05, 0.10, 0.25, 0.5, 0.1  $\mu\text{mol/mL}$ ) y se midió con reactivo de ninhidrina, y se graficó en el programa Microsoft Excel. La producción L-Cys obtenida evaluada en términos de actividad enzimática relacionando los datos obtenidos con el tiempo de reacción (30 min) y la cantidad de proteína usada (1.0  $\mu\text{g/mL}$ ). Los ensayos fueron realizados por duplicado en dos réplicas biológicas independientes para los extractos de proteínas de provenientes de tripomastigotes, y tres réplicas biológicas independientes para los extractos de proteínas de epimastigotes. Como control negativo de la producción de Cys se emplearon extractos de proteínas de células Vero a una concentración de 1.0 $\mu\text{g/mL}$  de proteína, como control positivo extractos de *E. coli* a una concentración de 0.15 $\mu\text{g/mL}$  de proteína, como control negativo y positivo de inhibición se realizó la reacción con o sin sustrato (OAS) usando extractos de proteínas de los parásitos, respectivamente (Romero et al., 2014, 2015). En la Figura 9 se observa el esquema metodológico.

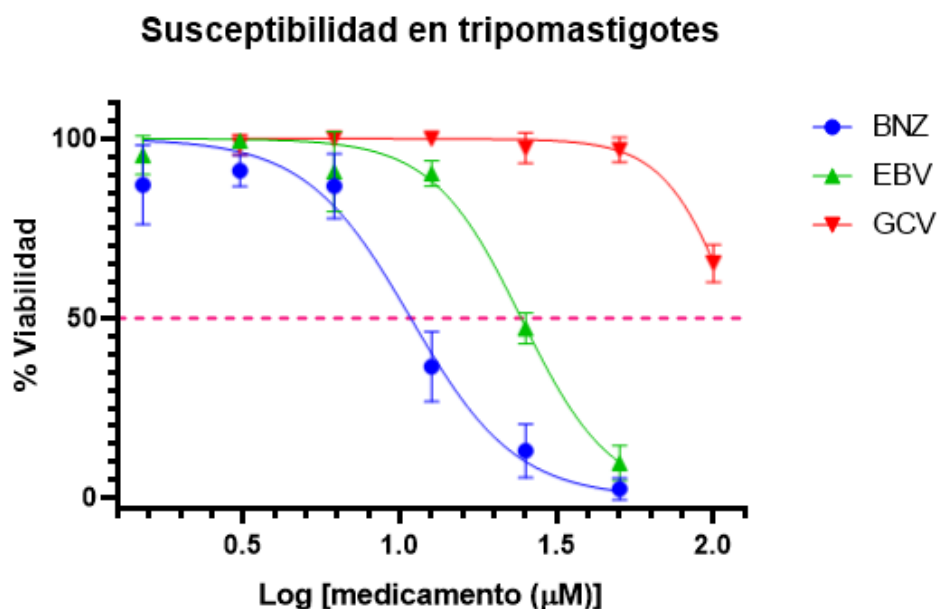


**Figura 9.** Esquema metodológico de la evaluación del efecto de EBV y GCV sobre la TcCS.

## 4. Resultados

### 4.1. Efecto tripanocida en tripomastigotes

El efecto tripanocida de GCV y EBV sobre el estadio infectivo de *T. cruzi* fue evaluado en concentraciones decrecientes desde 100  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ , respectivamente. EBV presentó efecto tripanocida sobre el estadio extracelular infectivo y los resultados muestran una curva sigmoidea en la cual se evidencia que el incremento de la dosis de EBV a partir de 12.5  $\mu\text{M}$  logró reducir el porcentaje de viabilidad de los parásitos y con la cual se pudo determinar una  $\text{CE}_{50}$  de 24.22  $\mu\text{M} \pm 1.06$  (Figura 10 y Tabla 1). Es importante destacar que el efecto tripanocida que EBV es comparable con el efecto que tiene el BNZ, a pesar de que el valor de  $\text{CE}_{50}$  obtenido con EBV es el doble respecto del BNZ,  $\text{CE}_{50}$  de 10.88  $\mu\text{M} \pm 0.58$  (Figura 10 y Tabla 1). Por otra parte, no fue posible determinar la  $\text{CE}_{50}$  de GCV, ya que la concentración más alta ensayada no disminuyó la viabilidad de los parásitos en un 50% en las dosis evaluadas, por tanto, el valor de  $\text{CE}_{50}$  para el GCV fue establecido como mayor a 100  $\mu\text{M}$  (Figura 10 y Tabla 1). Al evaluar los demás controles, no hubo diferencia entre el control negativo y el control vehículo (DMSO 1%). La morfología de los tripomastigotes y su movimiento se vio afectado por BNZ entre las concentraciones de 12.5  $\mu\text{M}$  – 50  $\mu\text{M}$ , mientras que con el EBV, estas características de los parásitos se vieron afectadas a las concentraciones de 25  $\mu\text{M}$  y 50  $\mu\text{M}$ .



**Figura 10.** Curvas dosis-respuestas de la actividad tripanocida de los compuestos BNZ, EBV y GCV en tripomastigotes de *T. cruzi*. Logaritmo de la concentración del medicamento ( $\mu\text{M}$ ) vs. Porcentaje de viabilidad. --- 50% de viabilidad. La gráfica representa la media de los resultados y la desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes. BNZ: benznidazol, EBV: elbasvir, GCV: glecaprevir.

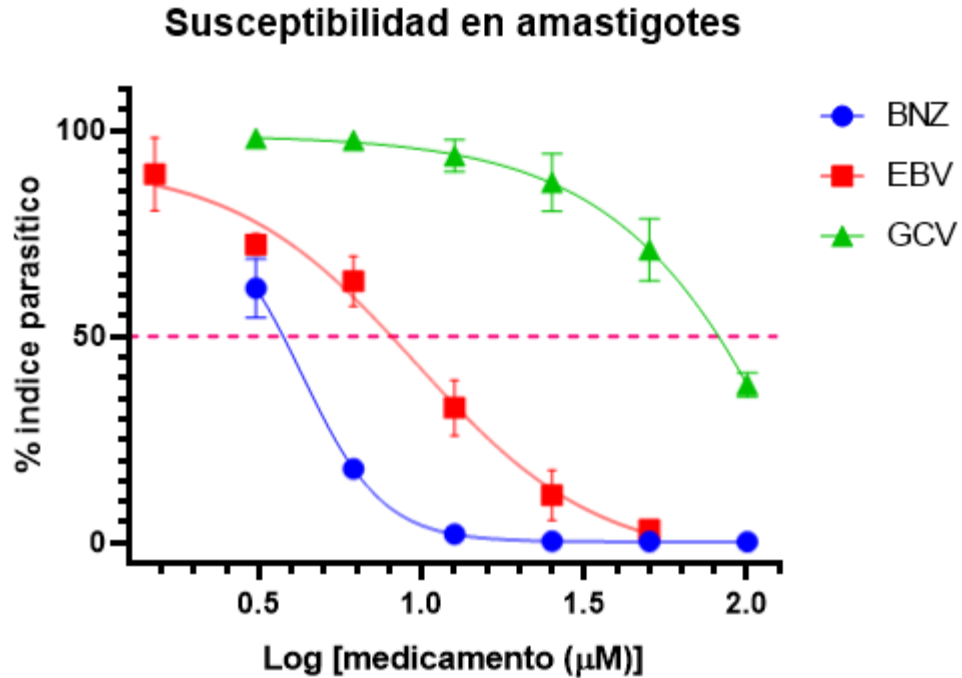
**Tabla 1.** Concentraciones inhibitorias 50 sobre los estadios tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*, células Vero e índices de selectividad.

Medicamento	Tripas	Amas	Células Vero	IS	
	CE <sub>50</sub> $\mu\text{M}^a$	CI <sub>50</sub> $\mu\text{M}^a$	CC <sub>50</sub> $\mu\text{M}^a$	Tripas	Amas
<b>BNZ</b>	10.88 $\pm$ 0.58	3.63 $\pm$ 0.31	>250	>22.97	>68.87
<b>EBV</b>	24.22 $\pm$ 1.06	7.59 $\pm$ 1.56	>50	>2.06	>6.58
<b>GCV</b>	>100	78.40 $\pm$ 4.47	134.4 $\pm$ 13.07	ND	1.71

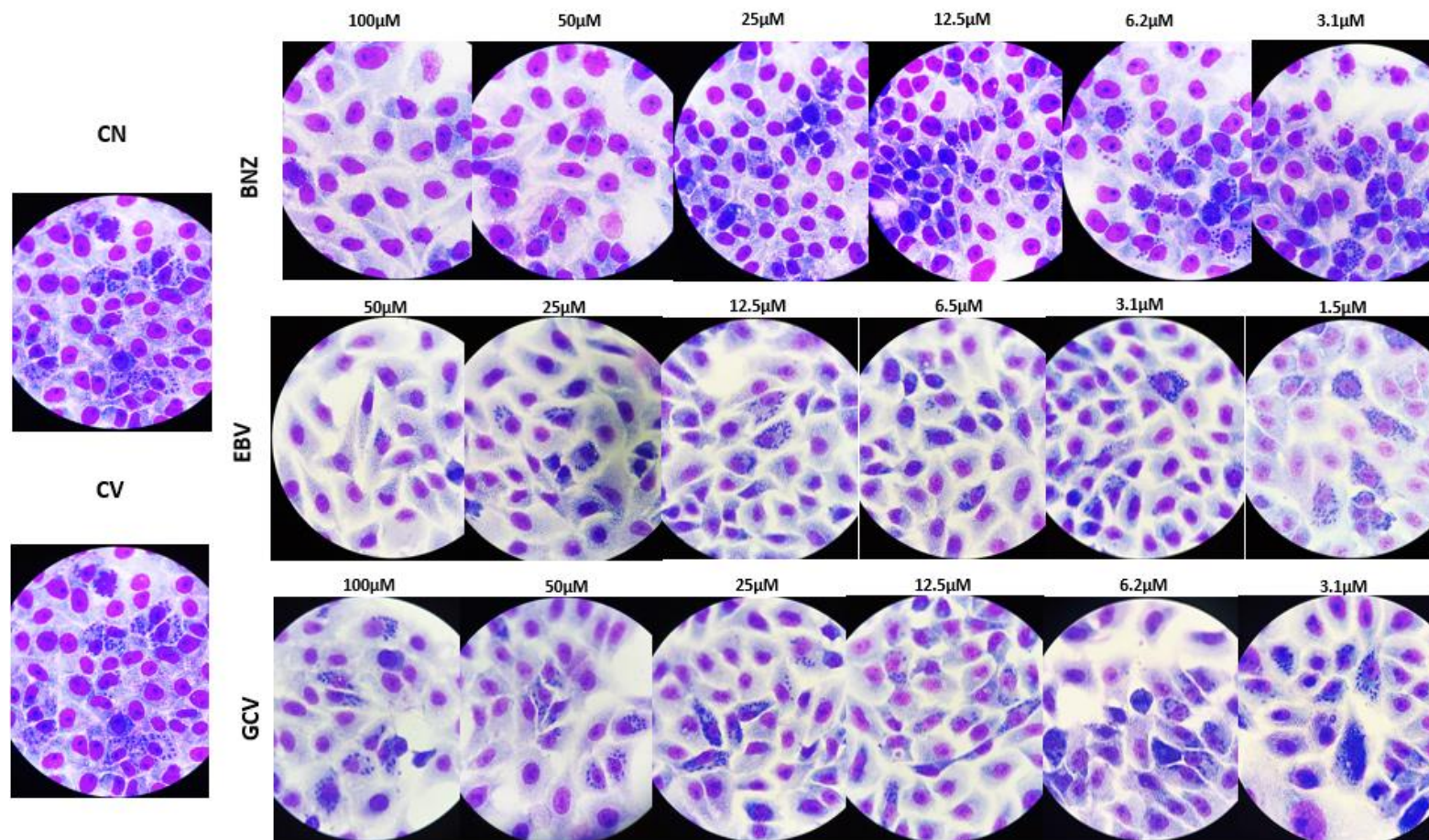
a: los resultados son medias de tres réplicas biológicas independientes con la desviación estándar. ND: no determinado, tripas: tripomastigotes, amas: amastigotes, IS: índice de selectividad. EBV: elbasvir, GCV: glecaprevir, BNZ: benznidazol.

## 4.2. Efecto tripanocida en amastigotes

El efecto tripanocida sobre el estadio intracelular de *T. cruzi* fue evaluado en el modelo de infección de células Vero. Los porcentajes de índices parasitarios (IP) fueron obtenidos relacionando los porcentajes de infección y el número de amastigotes en células infectadas de las células tratadas y no tratadas como se describió en la sección de metodología. El BNZ, usado como control positivo, mostró una  $CI_{50}$  de  $3.63 \mu\text{M} \pm 0.31$  (Figura 11 y Tabla 1). Los resultados obtenidos de la evaluación de EBV sobre el estadio intracelular mostraron una curva dosis-respuesta de tipo sigmoide donde se observa que el incremento de la dosis del medicamento disminuyó el IP, la concentración más baja evaluada,  $1.5 \mu\text{M}$ , logró reducir el IP en un 10%, mientras la concentración de  $12.5 \mu\text{M}$  redujo el IP en más de un 60% y la concentración más alta ensayada,  $50 \mu\text{M}$ , redujo el IP en más de un 90% (Figura 11). Con estos datos fue posible establecer una  $CI_{50}$  de  $7.59 \mu\text{M} \pm 1.56$  (Tabla 1), este medicamento consiguió reducir el porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes en células infectadas (Figura 12). Por otro lado, GCV disminuyó el índice parasitario en más de un 50% a la concentración más alta evaluada de  $100 \mu\text{M}$  (Figura 11), con lo cual fue posible establecer una  $CI_{50}$  de  $78.40 \mu\text{M} \pm 4.47$  (Tabla 1). No se observaron diferencias entre los resultados del control negativo y el control vehículo (DMSO 1%).



**Figura 11.** Curvas dosis-respuestas de la actividad tripanocida en amastigotes intracelulares de *T. cruzi* frente a los compuestos BNZ, EBV y GCV. Logaritmo de la concentración del medicamento (µM) vs. Porcentaje del Índice parasitario. --- 50% del índice parasitario. La gráfica representa la media de los resultados y la desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes. BNZ: benznidazol, EBV: elbasvir, GCV: glecaprevir.

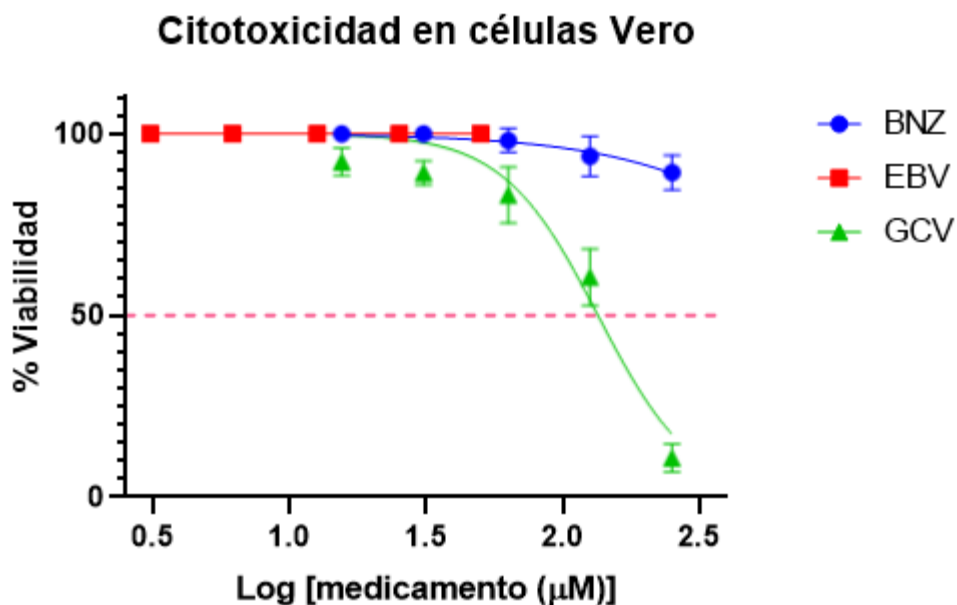


**Figura 12.** Células Vero infectadas con amastigotes intracelulares de *T. cruzi* cepa Y. Las células fueron infectadas y tratadas con diferentes concentraciones ( $\mu\text{M}$ ) de los medicamentos. CN: control negativo, CV: control vehículo, BNZ: benznidazol, EBV: Elbasvir y GCV: Glecaprevir. Las células fueron coloreadas con Wright y visualizadas al microscopio óptico con el objetivo de 100X.

### 4.3. Efecto citotóxico e índices de selectividad

La citotoxicidad de BNZ y GCV en células Vero fue evaluada en diluciones seriadas decrecientes desde 250  $\mu\text{M}$  y para el EBV fue evaluada desde 50  $\mu\text{M}$ . Con el fin de comparar los IS de los medicamentos estudiados se probó la citotoxicidad de BNZ, siendo uno de los medicamentos utilizados actualmente para el tratamiento de la ECh. No fue posible establecer la  $\text{CC}_{50}$  de BNZ y EBV, ya que estos compuestos no redujeron la viabilidad de las células en más de un 15% a la concentración más alta evaluada. Por tanto, la  $\text{CC}_{50}$  se estableció como mayor que 250  $\mu\text{M}$  para BNZ y mayor a 50  $\mu\text{M}$  para el EBV (Figura 13 y Tabla 1). En contraste, las concentraciones de GCV ensayadas sobre las células Vero mostraron una curva dosis-respuesta de tipo sigmoide, ya que conforme incrementó la dosis del medicamento, se incrementó el efecto del compuesto disminuyendo la viabilidad de las células Vero, presentando así una citotoxicidad intermedia con valores de  $\text{CC}_{50}$  de 134.4  $\mu\text{M} \pm 13.07$  (Figura 13 y Tabla 1).

Los IS fueron obtenidos de la relación entre las  $\text{CE}_{50}$  en tripomastigotes y  $\text{CI}_{50}$  en amastigotes contra los valores de  $\text{CC}_{50}$  en células Vero. El EBV presentó un IS de al menos 2.06 en el estadio extracelular infeccioso, mientras que el IS en el estadio intracelular fue de al menos 6.58 (Tabla 1). Es decir, el estadio intracelular presentó mayor susceptibilidad al efecto de EBV que el estadio tripomastigote. En lo relacionado a GCV, no se pudo determinar los IS en tripomastigotes debido a la no actividad tripanocida, pero en amastigotes se estableció un IS de 1.71 (Tabla 1). Los IS obtenidos en los diferentes estadios de *T. cruzi* fueron mayores en el estadio intracelular; sin embargo, no fueron lo suficientemente altos para superar los obtenidos por el medicamento de referencia usado, el BNZ, que presentó valores de IS de al menos de 22.91 y de al menos 68.87 en tripomastigotes y amastigotes, respectivamente (Tabla 1).

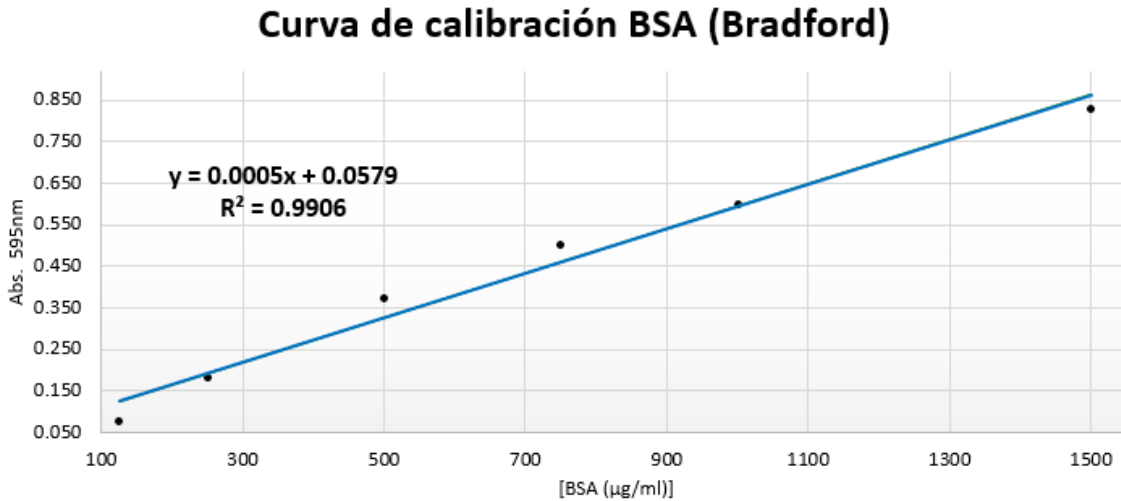


**Figura 13.** Curva dosis-respuesta de la citotoxicidad en células Vero de los compuestos BNZ, EBV y GCV. Logaritmo de la concentración del medicamento (μM) vs. porcentaje de viabilidad. --- 50% de viabilidad. La gráfica representa la media de los resultados y la desviación estándar de tres réplicas biológicas independientes. BNZ: benznidazol, EBV: elbasvir, GCV: glecaprevir.

#### 4.4. Efecto sobre la actividad enzimática de la TcCS

De acuerdo con los resultados obtenidos del análisis computacional empleando técnicas de acoplamiento y de dinámica moleculares, donde se tomó como blanco terapéutico o receptor a la enzima TcCS, y se encontró a los ligandos EBV y GCV con promisorio efecto inhibitorio sobre esta proteína mediante la unión al sitio activo, y con la idea de explorar el posible mecanismo de acción de EBV, el medicamento que presentó actividad biológica sobre *T. cruzi*, se decidió explorar a nivel *in vitro* el efecto de los medicamentos EBV y GCV sobre la actividad de la TcCS usando extractos de proteínas solubles de los parásitos. La evaluación del efecto EBV y GCV sobre la actividad de la enzima fue llevada a cabo en concentraciones decrecientes desde 50 μM y 100 μM, respectivamente, en reacciones usando extractos de proteínas solubles de tripomastigotes y epimastigotes de *T. cruzi*. Tras obtener los extractos de proteínas, estos fueron cuantificados mediante la técnica de

Bradford utilizando una curva de calibración con seis concentraciones de BSA, con un límite de linealidad de 1500 µg/mL y un coeficiente de correlación de 0.9906 como se muestra en la Figura 14.

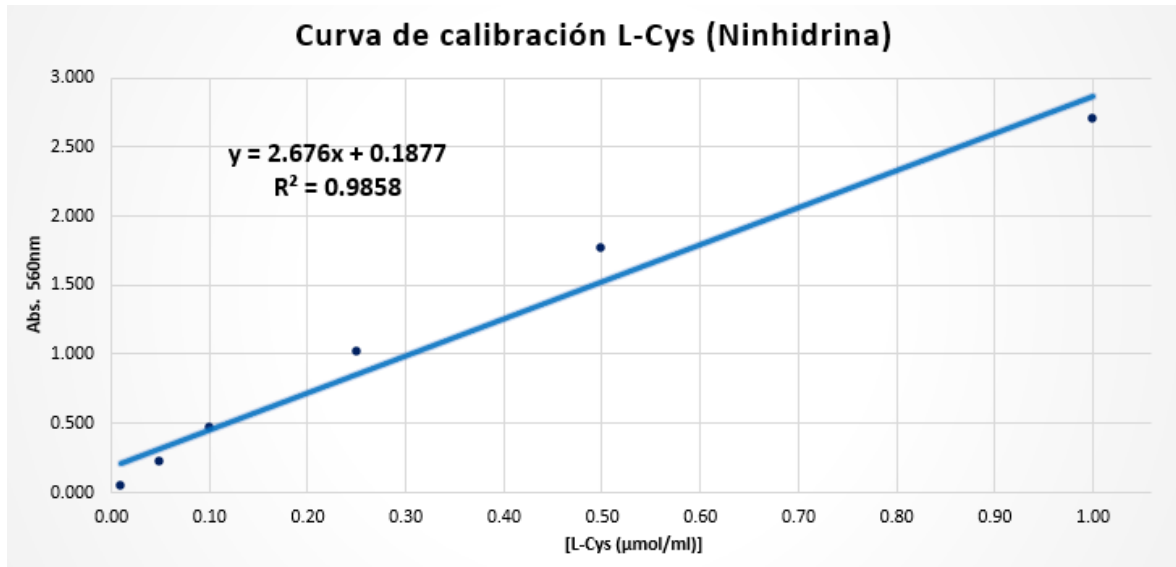


**Figura 14.** Curva patrón de BSA para la cuantificación de proteínas por Bradford. La gráfica muestra la absorbancia a 595nm versus la concentración de la proteína en µg/mL. Se muestra la ecuación obtenida que permitió interpolar las Absorbancias a concentraciones de proteína en µg/mL. R<sup>2</sup>: coeficiente de correlación.

De igual forma, la cuantificación de Cys producida en las reacciones enzimáticas se realizó por medio de una curva patrón de L-Cys con seis concentraciones y con un límite de linealidad de 1 µmol/mL, y un coeficiente de correlación de 0.9858 como se muestra en la Figura 15.

El efecto de EBV y GCV sobre la actividad enzimática se estimó teniendo en cuenta los valores de producción de Cys a partir de las muestras de extractos de proteínas de los parásitos sin medicamento (control negativo de inhibición) y comparándolos con los valores de los extractos de proteínas de los parásitos en presencia de los medicamentos. Es importante resaltar, que los valores de producción de Cys fluctuaron entre 0.05 y 0.07 µmol min<sup>-1</sup> mg proteína<sup>-1</sup> en las diferentes concentraciones evaluadas para EBV en el estadio

tripomastigote y epimastigote (Figura 16). Con el GCV se obtuvieron valores entre 0.05 y 0.07  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg prote\u00edna}^{-1}$  en las diferentes concentraciones evaluadas en el estadio epimastigote.



**Figura 15.** Curva patr\u00f3n con L-Cys para la cuantificaci\u00f3n de ciste\u00edna por m\u00e9todo ninhidrina. La grafica muestra la absorbancia a 560nm versus la concentraci\u00f3n de L-Cys ( $\mu\text{mol/mL}$ ). Se muestra la ecuaci\u00f3n obtenida que permiti\u00f3 interpolar las Absorbancias a concentraciones de Cys en  $\mu\text{mol/mL}$ .  $R^2$ : coeficiente de correlaci\u00f3n.

Al analizar los resultados obtenidos en los extractos de prote\u00ednas solubles de los diferentes estadios de *T. cruzi* en presencia del compuesto EBV y en el estadio epimastigote para el GCV, no se observ\u00f3 un efecto inhibitorio de la actividad de la enzima TcCS, pues los porcentajes de inhibici\u00f3n fluctuaron entre 0 y 15%; de igual forma, no se evidenci\u00f3 una reducci\u00f3n de la actividad dosis dependiente de la concentraci\u00f3n de cada compuesto (Figura 16). Mediante an\u00e1lisis One-way ANOVA en el programa GraphPad prisma, se logr\u00f3 determinar que no hubo diferencias significativas entre la actividad enzim\u00e1tica de TcCS con EBV o GCV en los extractos de las prote\u00ednas de los par\u00e1sitos, ni tampoco entre las diferentes concentraciones de cada medicamento.



## 5. Discusión

La baja seguridad, la poca eficacia y la alta tasa de abandono del tratamiento contra la ECh, especialmente durante la fase crónica de la enfermedad, ha llevado a la necesidad de investigar alternativas terapéuticas y a la búsqueda de nuevas moléculas con efecto tripanocida (Pérez-Molina et al., 2021). En este sentido, la estrategia de reposicionamiento de fármacos utilizando diferentes herramientas *in silico* ofrece grandes ventajas, como la disminución del tiempo y el costo en el desarrollo de nuevos fármacos, menor toxicidad, porque el fármaco debe presentar un perfil de seguridad aceptable y se deben conocer sus propiedades farmacocinéticas (Breckenridge & Jacob, 2019; Ekins et al., 2011).

A la fecha, no se reporta en la literatura antecedentes acerca del estudio de EBV y GCV como agentes antiparasitarios, la investigación de estos compuestos se ha centrado en su efecto antiviral, donde estos compuestos son usados actualmente en el tratamiento de las infecciones crónicas causadas por el VHC, ya que su mecanismo de acción se basa en la inhibición de las proteínas virales NS5A y NS3/4A, respectivamente (Cada et al., 2016; Lamb, 2017).

Con base en los resultados previos de *screening* virtual realizados por nuestro grupo de investigación, en la presente investigación se evaluó la actividad tripanocida y el efecto inhibitorio sobre la enzima TcCS de los antivirales EBV y GCV, a nivel *in vitro* (Pardo-Rodríguez *et al.* Working paper).

De acuerdo con los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad tripanocida de EBV sobre los dos estadios de *T. cruzi* responsables de la infección en el mamífero, se puede clasificar este compuesto como una molécula con una buena actividad tripanocida, según las escalas propuestas por Bero y colaboradores para la clasificación de moléculas

con actividad biológica sobre otros protozoos patógenos como *Plasmodium falciparum*, *Leishmania mexicana* y *Trypanosoma brucei*, puesto que la  $CI_{50}$  del compuesto fue  $\leq 20$   $\mu\text{g/mL}$ , siendo que para el EBV en el presente estudio fue de 6.69  $\mu\text{g/mL}$  (7.59  $\mu\text{M}$ ) sobre el estadio intracelular (Bero et al., 2009, 2011). Igualmente, al hablar de moléculas con alta potencia contra patógenos responsables de enfermedades tropicales, Isah y colaboradores sugieren que dichas moléculas deben tener un  $CI_{50} \leq 10$   $\mu\text{g/mL}$ , valor cercano al obtenido con EBV (Isah et al., 2016). Así mismo, el EBV podría considerarse una molécula selectiva al presentar un valor de IS de al menos 6.58 (Tabla 1), cuando el efecto es medido sobre el estadio intracelular del parásito, pues teniendo en cuenta lo descrito por Valencia y colaboradores, un compuesto selectivo es aquel que presenta una relación entre la eficacia y la toxicidad  $\geq 3$  (Valencia et al., 2011). En adición, es importante resaltar que según lo observado sobre el estadio infectivo extracelular, el EBV presentó una moderada actividad tripanocida, con una  $CE_{50}$  de 21.36  $\mu\text{g/mL}$  (24.22  $\mu\text{M}$ ), de acuerdo a lo indicado en otras investigaciones, donde los rangos de moléculas con esa denominación fluctúan entre 21 a 60  $\mu\text{g/mL}$  (Bero et al., 2009, 2011).

Por otro lado, con miras a continuar en el escalamiento de moléculas con efecto tripanocida contra *T. cruzi*, algunos investigadores proponen criterios para continuar con el estudio de las moléculas activas a la fase de estudios preclínicos en modelo *in vivo*, donde en esas investigaciones se indica que los valores de  $CI_{50}$  y  $CE_{50}$  deberían ser menores de 3.8  $\mu\text{M}$  o 1  $\mu\text{g/mL}$  y los IS deberían ser superiores a 10 o incluso superior a 50, sin embargo, para EBV los resultados obtenidos en la presente investigación respecto a los valores  $CI_{50}$  y  $CE_{50}$  obtenidos en los dos estadios del parásito, fueron mayores a los indicados anteriormente (3.8  $\mu\text{M}$  o 1  $\mu\text{g/mL}$ ) y los valores de IS en ambos casos no se pudieron establecer con precisión por falta de solubilidad del compuesto EBV, con lo cual, antes de continuar en el escalamiento de EBV, se debería pensar en estrategias que puedan incrementar su solubilidad en agua, con el fin de poder evaluar la citotoxicidad a concentraciones superiores de 50  $\mu\text{M}$ , contemplando como una posibilidad, la reformulación química de EBV, analizando modificaciones químicas para la síntesis de moléculas análogas a EBV y continuar con su evaluación *in vitro* en modelos biológicos (Chatelain, 2015; Nwaka & Hudson, 2006; Pink et al., 2005; Romanha et al., 2010).

Por su parte, GCV no presentó actividad biológica contra ninguno de los dos estadios de *T. cruzi* evaluados, presentando una  $CI_{50}$  de 78.4  $\mu\text{M}$  en estadio intracelular y  $CE_{50}$  mayor de 100  $\mu\text{M}$  en el estadio extracelular infeccioso (Bero et al., 2009, 2011; Chatelain, 2015; Isah et al., 2016; Pink et al., 2005; Romanha et al., 2010). Además, GCV mostró una citotoxicidad intermedia sobre células Vero con valores de  $CC_{50}$  de 134.4  $\mu\text{M}$  (Gammeltoft et al., 2021).

Como ya se ha mencionado previamente, EBV presentó una limitada solubilidad en medio acuoso, y empleando diferentes estrategias no fue posible mantener solubilidad por encima de 50  $\mu\text{M}$ , por ello esta fue la máxima concentración evaluada en la citotoxicidad de células Vero. La baja solubilidad de EBV ha sido reportada en otras investigaciones, en donde la concentración máxima evaluada fue de 5  $\mu\text{M}$  (Huličiak et al., 2022). Igualmente, se ha reportado que la solubilidad de este compuesto puede mejorar a pH ácido (pH: 5) (European Medicines Agency, 2016; Pijnenburg et al., 2020). La baja solubilidad del EBV impidió determinar los IS con precisión y por tanto, se reportan valores de IS de al menos 2.06 y 6.58 en los estadios tripomastigote y amastigote, respectivamente. Los resultados de citotoxicidad de EBV en células Vero mostraron una tendencia no citotóxica y a pesar de que no fue posible evaluar concentraciones superiores a 50  $\mu\text{M}$ , los datos obtenidos se correlacionan con otras investigaciones en las que EBV ha sido clasificado como un compuesto con baja citotoxicidad (Cook et al., 2021; Milani et al., 2021). En concordancia con lo anterior, la citotoxicidad del Elbasvir ha sido probada en células de fibroblastos de pulmón humano (MRC-5), reportando una baja citotoxicidad con una  $CC_{50}$  mayor de 1000  $\mu\text{M}$  (Milani et al., 2021). Adicional, la citotoxicidad del compuesto EBV ha sido evaluada en células derivadas de riñón de felino Crandell-Rees (CRFK) y el compuesto fue calificado por los autores como una molécula esencialmente no citotóxica, presentando una citotoxicidad del 4.9% a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  (Cook et al., 2021). Retomando la idea de que la citotoxicidad de EBV pudiera ser baja, la selectividad del compuesto podría ser mayor en tripomastigotes y amastigotes, lo que permitiría postular a este compuesto como una molécula "hit", precursora de moléculas líderes, con potencial actividad biológica y alta selectividad contra *T. cruzi* (Chatelain, 2015; Pink et al., 2005; Valencia et al., 2011).

El desarrollo de nuevos estudios con el EBV debería encaminarse hacia el incremento de su solubilidad, lo que permitiría estudiar su citotoxicidad a mayores concentraciones. En ese sentido, diversos estudios demuestran que la exploración continua de compuestos con actividad tripanocida a través de reformulación química pueden llegar a ser moléculas altamente promisorias para el desarrollo de nuevos tratamientos contra la ECh; ese es el caso de análogos del BNZ, cuyos estudios están actualmente en desarrollo por otros grupos de investigación y los cuales han avanzado hasta la fase *in vivo* (De Andrade et al., 2015, Leite et al., 2018).

Teniendo en cuenta los análisis *in silico* realizados previamente por nuestro grupo de investigación en la búsqueda de moléculas con potencial efecto tripanocida utilizando como diana terapéutica la enzima TcCS y los resultados de los ensayos *in vitro* de la presente investigación, nos permiten postular al EBV como un hit experimental, que mediante modificaciones químicas, podría conducir al desarrollo un compuesto candidato potencial para el tratamiento de la ECh.

Al analizar los resultados de susceptibilidad en los diferentes estadios de *T. cruzi* a los compuestos EBV y GCV, se evidencia que el estadio intracelular fue más sensible que el estadio infectivo extracelular al efecto del EBV, eso podría explicarse por la expresión diferencial de proteínas que presenta cada estadio, ya que su complejo ciclo de vida requiere la habilidad del parasito para adaptarse a diferentes ambientes en distintos hospederos (Salassa & Romano, 2019). Esta habilidad de adaptación está dada por los diferentes patrones de expresión de proteínas, los cuales modifican las características morfológicas, metabólicas, la función biológica y la defensa antioxidante de cada estadio (Atwood et al., 2005; Berná et al., 2017; Li et al., 2016; Minning et al., 2009; Romero et al., 2015; Silber et al., 2009). Teniendo en cuenta lo que se conoce acerca del mecanismo de acción del EBV en su efecto antiviral sobre VHC, relacionado con la inhibición de la proteína NS5A implicada en la replicación viral (Wang et al., 2021) y sumado a otras investigaciones que sugieren que el mecanismo antiviral de este compuesto sobre SARS-CoV-2, estaría relacionado con la inhibición de proteínas implicadas en la replicación viral como la ARN polimerasa (Balasubramaniam & Reis, 2020), la mayor susceptibilidad de los amastigotes a este compuesto estaría relacionada a la posible inhibición de la replicación

del ADN en los parásitos, dado que los amastigotes son replicativos, mientras los tripomastigotes no.

Al ser los amastigotes un estadio intracelular, se podría plantear que la oxidación de EBV por la Citocromo P450 (CYP3A) de las células hospederas (European Medicines Agency, 2016; Wang et al., 2021), pudiera generar metabolitos tóxicos que explicaran la mayor susceptibilidad del amastigote al medicamento. Adicional a la posible participación de células hospederas en una eventual oxidación del EBV, la diferencia en la susceptibilidad de EBV sobre los amastigotes y los tripomastigotes, puede estar relacionada con una expresión diferencial de transportadores tipo P-gp, que le permitan al parásito sacar el medicamento al medio extracelular evadiendo así su actividad tripanocida, como se ha reportado en otros modelos de resistencia farmacológica en *T. cruzi* (Cada et al., 2016; Campos et al., 2013; Wang et al., 2021). Todas estas hipótesis pueden estimular futuras investigaciones para ser dilucidadas.

En atención a que TcCS juega un importante papel en la respuesta de los tripanosomátidos frente al estrés oxidativo (Romero et al., 2014, 2015) y a que estudios previos han mostrado que el estadio intracelular de *T. cruzi* y *L. braziliensis* parece ser más dependiente de la actividad de la CS en la ruta de biosíntesis *de novo* de cisteína, por la mayor expresión de CS en estos estadios, mientras que los estadios tripomastigote y epimastigote en *T. cruzi* y los promastigotes de *L. braziliensis* serían más dependientes de la actividad de la CBS en la ruta de transulfuración reversa para la producción de ese aminoácido (Marciano et al., 2012; Romero et al., 2015), se propuso evaluar si el efecto tripanocida de EBV observado en el estadio amastigote, estaría asociado con un efecto inhibitorio de los antivirales sobre la actividad enzimática de la CS .

A los antivirales EBV y GCV, seleccionados como moléculas promisorias mediante ensayos computacionales previos, se les evaluó el efecto inhibitorio de la actividad enzimática de la TcCS *in vitro* en extractos de proteínas solubles de tripomastigotes y epimastigotes. Contrario a lo esperado ninguno de los dos medicamentos evaluados ejerció efecto inhibitorio de la actividad enzimática a las concentraciones evaluadas con

los compuestos EBV y GCV, ya que la actividad enzimática de la CS, medida por la producción de cisteína en presencia de los compuestos, fue comparable a la del control negativo. Sin embargo, hay que tener en cuenta que los ensayos de actividad enzimática fueron realizados con extractos de proteínas solubles de los parásitos en los que habían otras proteínas diferentes a CS, que pudieron haber unido el compuesto, disminuyendo así, su afinidad de unión a CS, generando un posible efecto enmascarante de la inhibición de la actividad enzimática, lo que hace necesario seguir trabajando en la obtención de la proteína recombinante rTcCS, con el fin de darle mayor especificidad a las reacciones enzimáticas y de este modo conocer el efecto de EBV sobre la TcCS real.

La mayor susceptibilidad del estadio intracelular a EBV entonces, podría estar relacionado a la inhibición de proteínas involucradas en la replicación del ADN, metabolismo de macromoléculas o transporte transmembranal (Berná et al., 2017). Sumado a ello, el EBV no presenta dificultad para ingresar a la célula y alcanzar los agentes infecciosos blanco como lo son las partículas virales, o en el caso del modelo intracelular evaluado en la presente investigación, parásitos en forma de amastigotes intracelulares, ya que se distribuye en todos los tejidos e ingresa a la célula mediante transportadores tipo P-gp presentes en la membrana celular de las células hospederas (Cada et al., 2016). La falta de inhibición de la actividad de la enzima TcCS por el EBV y el GCV, puede ser debida a la poca o baja interacción que presentan estos compuestos con residuos de aminoácidos a los que se unen el sustrato natural (OAS) y el cofactor (PLP) como la Asn83 (Sowerby et al., 2023), con la cual resultados de la simulación de dinámica molecular realizado previamente en nuestro grupo mostraron una ocupación menor del 10% para los dos compuestos (Pardo-Rodríguez et al. Working paper).

Es importante destacar que los niveles de producción de Cys obtenidos de los ensayos de actividad enzimática de la TcCS en extractos de proteínas de epimastigotes y tripomastigotes, son comparables a los reportados por Romero y colaboradores, donde la actividad de la TcCS en extractos de epimastigotes y tripomastigotes estuvo en torno a 0.14 y 0.02  $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg proteína}^{-1}$ , respectivamente (Romero et al., 2014). Con el fin de darle mayor especificidad a la evaluación de la actividad enzimática, se intentó producir la proteína recombinante TcCS, sin embargo, no fue posible obtenerla, en la sección de

anexos se explica la metodología y los resultados obtenidos de la inducción de la expresión de la proteína recombinante (Anexo A y B, ver páginas 64-69).

EBV mostró actividad biológica contra *T. cruzi* y de acuerdo con los reportes de su uso en humanos para otros tratamientos, presenta un mejor perfil de seguridad comparado con BNZ y NFX, medicamentos actualmente usados para el tratamiento de la ECh, los cuales presentan frecuentes efectos adversos, lo que conlleva a un alto porcentaje de abandono terapéutico. Por su parte, el EBV administrado en combinación con grazoprevir bajo el nombre comercial de Zepatier, ha mostrado efectos adversos menos severos en pacientes con Hepatitis C tratados con el medicamento, entre los efectos adversos reportados se encuentran: astenia (21%), cefalea (15%), náuseas (8%), insomnio (4%), diarrea (6%) y vómito (4%) (Asselah et al., 2020; Jackson et al., 2020; Merck Sharp & Dohme Corp., 2016; Xia et al., 2020). En algunos estudios se ha reportado una tasa de abandono del 0.6% al tratamiento con Zepatier, comparado con estudios en los que se ha encontrado una interrupción del tratamiento del 8.7% y 26.2% de los pacientes tratados con BNZ y NFX, respectivamente (European Medicines Agency, 2016; Jackson et al., 2020).

## 6. Conclusiones y recomendaciones

### 6.1. Conclusiones

El compuesto EBV presentó actividad contra *T. cruzi in vitro*, donde el estadio intracelular mostró mayor susceptibilidad que el estadio infectivo.

EBV debe ser reconsiderado o reformulado químicamente buscando mejorar su actividad tripanocida y su pobre solubilidad, antes de pensar en avanzar a la fase de ensayos preclínico *in vivo*, sin embargo, EBV puede ser considerado como una molécula líder en el estudio del diseño de fármacos contra la ECh.

El compuesto GCV no presentó actividad biológica contra *T. cruzi* en ninguno de los dos estadios estudiados, como tampoco efecto sobre la actividad de la enzima TcCS.

De acuerdo con los hallazgos, el mecanismo de acción puede no estar directamente relacionado con la inhibición de la enzima TcCS, por tanto, se deben explorar otras vías como posibles mecanismos de acción inducidos por el fármaco.

### 6.2. Recomendaciones

La estrategia de screening virtual profundo empleando análisis de acoplamiento y dinámica molecular, debe seguir siendo empleada con el propósito de reducir tiempos en la identificación de moléculas líderes con posible actividad tripanocida.

Reconsiderar químicamente a EBV o moléculas análogas, ya que por su actividad tripanocida puede ser considerado como una molécula líder para el estudio de diseño de medicamentos contra la ECh.

Estudiar estrategias de solubilidad para la evaluación de la citotoxicidad de EBV en concentraciones mayores de 50  $\mu$ M.

Investigar el posible mecanismo de acción de EBV sobre *T. cruzi* mediante la implementación de estudios de metabolómica que permitan identificar vías como la síntesis de lípidos, generación de ROS, interacción con ADN, bloqueo de mitosis, necrosis, apoptosis y autofagia.

Explorar el posible sinergismo terapéutico de la combinación de fármacos BNZ+EBV y NFX+EBV, ya que EBV podría estar potenciando el efecto tripanocida de los medicamentos que se utilizan actualmente contra la ECh al atacar al parásito mediante diferentes mecanismos de acción.

Evaluación de la actividad tripanocida de EBV sobre diferentes cepas o aislamientos de *T. cruzi* y sobre diferentes modelos celulares *in vitro* o estudios *in vivo*.

Examinar estrategias para obtener la proteína recombinante TcCS en la fase soluble evitando su acumulación en cuerpos de inclusión o usando técnicas renaturación de la proteína a partir de cuerpos de inclusión, con el fin de conservar la actividad enzimática. La obtención de una proteína recombinante permitirá la exploración de las moléculas mejoradas del EBV o de nuevas moléculas con efecto tripanocida y que han presentado alta afinidad por la TcCS en estudios *in silico* realizados constantemente por nuestro grupo de investigación.

# ANEXOS

## A. Anexo: Metodología inducción de la expresión de la proteína recombinante rTcCS

El plásmido con el inserto del gen codificante para la TcCS, contenido en el vector pET21a+ (Novagen) denominado pET21a+TcCS, fue clonado por miembros del grupo de investigación en un trabajo previo (Romero et al., 2014, 2015). Células termocompetentes de *Escherichia coli* cepa M15 o BL21 DE3 fueron transformadas con el plásmido pET21a-TcCS mediante choque térmico a 42°C por 30 segundos, posteriormente se incubó durante 2h, en agitación a 37°C en caldo LB sin antibióticos, paso seguido las bacterias fueron sembradas en agar LB con antibióticos, ampicilina 100ug/mL y kanamicina 25ug/mL para la cepa M15 y ampicilina 100ug/mL para la cepa BL21 DE3, se incubó durante toda la noche a 37°C (Qiagen, 2011; Romero et al., 2014, 2015).

La transformación de las bacterias con el plásmido pET21a-TcCS fue verificado mediante selección de colonias en el agar LB con antibióticos, su posterior cultivo en el caldo LB, extracción de ADN plasmídico (kit Zyppy™ Plasmid Miniprep), digestión con enzimas de restricción XhoI y NdeI (Promega), y electroforesis de ADN digerido en gel de agarosa para visualizar el fragmento de ADN liberado correspondiente al gen TcCS. Además la presencia del gen en el vector fue confirmado mediante secuenciación.

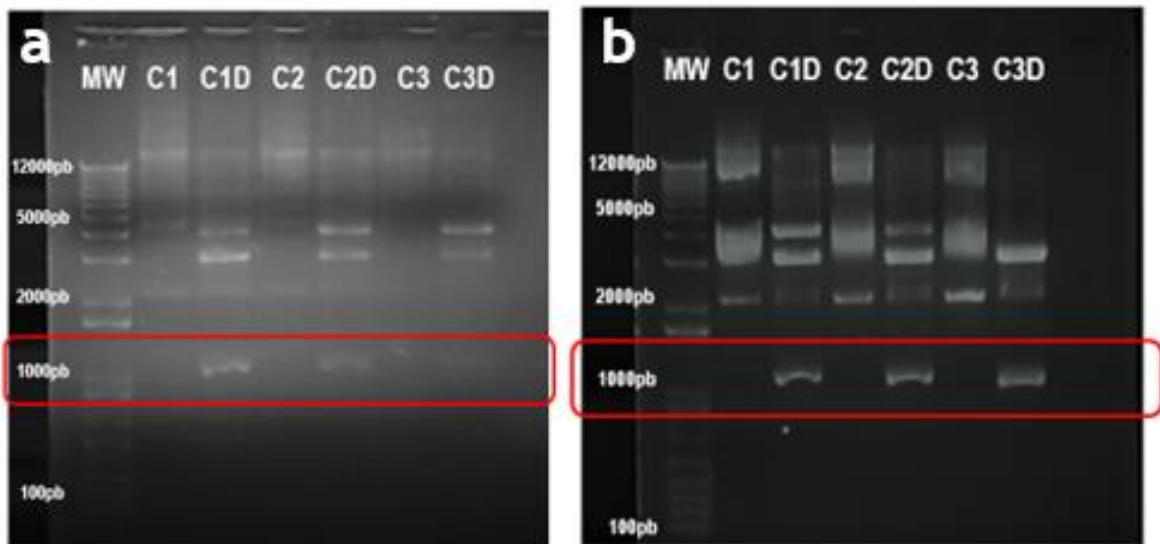
El pre-inóculo de bacterias transformadas fue cultivado en 10ml de caldo LB con antibióticos a 37°C toda la noche. Después el inóculo fue transferido a medio LB fresco y se cultivó hasta alcanzar la D.O.<sub>600nm</sub> 0.6, momento en el cual le fue adicionado el inductor isopropylthio-β-galactoside (IPTG) (Sigma-Aldrich) en diferentes concentraciones 0.5mM, 1mM, 1.5mM y 2mM. Tras la aplicación del inductor los cultivos fueron incubados a 37°C o 15°C, los tiempos de incubación evaluados estuvieron desde las 2 hasta las 23h. Posteriormente cultivos fueron centrifugados a 4500 xg durante 10min y los pellets fueron

conservados a -20°C. Los pellets bacterianos fueron sonicados para provocar la lisis celular y liberación de la proteína recombinante, posteriormente los lisados fueron centrifugados a 16000 xg, y fueron separadas las fracciones soluble (sobrenadante) e insoluble (pellet). La inducción de la expresión de la proteína rTcCS fue visualizada mediante electroforesis en gel de acrilamida bajo condiciones desnaturalantes SDS-PAGE (Romero et al., 2014, 2015). El marcador de peso molecular utilizado fue Opti-protein XL Maker (Applied Biological Materials Inc.).

## **B. Anexo: Resultados inducción de la expresión de la proteína recombinante**

La transformación de las cepas bacterianas *E. coli* M15 y BL21 (DE3) con el plásmido pET21a+ TcCS fue confirmada mediante digestión de ADN plasmídico y electroforesis en gel de agarosa, donde se evidencia un fragmento de ADN a la altura de 1000pb correspondiente al gen codificante para la enzima TcCS (Figura 17), de acuerdo a la secuencia de ADN reportada en la base de datos TriripDB el gen TcCS tiene una longitud de 999pb (C3747\_76g156), el fragmento del ADN de la TcCS insertado en el vector pET21a+ tenía una longitud de 991pb. La secuenciación del plásmido pET21a+ TcCS permitió obtener un fragmento de 1025b y su análisis en “blastn” encontró una identidad del 96% del fragmento secuenciado con el gen codificante para la enzima TcCS cepa CL Brener (XM\_800100.1), con lo cual se confirma que el plásmido contiene el gen deseado.

Tras la confirmación de la transformación, diferentes variables fueron evaluadas en la inducción de la expresión de la proteína rTcCS, ya que ciertas condiciones de cultivo pueden incrementar la expresión de genes, como menores temperaturas, mayores tiempos de incubación y bajas concentraciones de IPTG. Buscando el sistema más apropiado para inducir la expresión de la proteína recombinante se probaron dos cepas de *E. coli*, sin embargo, para la expresión de genes en un vector pET (promotor T7) se recomienda la cepa BL21 (DE3), ya que a esta bacteria se le ha eliminado los genes codificantes para las proteasas Lon y OmpT, lo cual la hace incapaz de degradar proteínas foráneas (Gopal & Kumar, 2013).

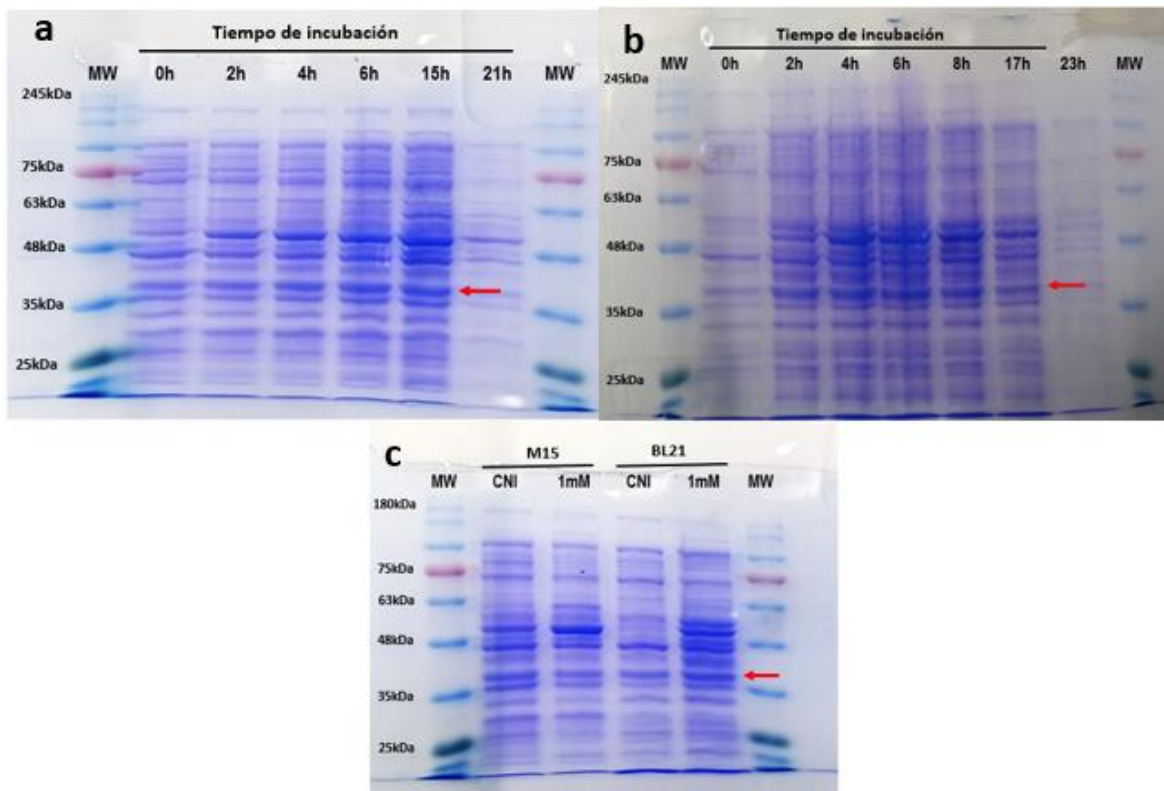


**Figura 17.** Electroforesis de ADN plasmídico de células transformadas *E. coli* M15 (a) y BL21 DE3 (b) en gel de agarosa. MW: marcador de peso molecular ADN. C1, C2 y C3: ADN plasmídico sin digerir de las colonias 1, 2 y 3. C1D, C2D y C3D: ADN plasmídico digerido de las colonias 1, 2 y 3. El recuadro en rojo indica las tres bandas correspondientes al fragmento de ADN esperado del gen de la cisteína sintasa de *T. cruzi* en las colonias transformadas.

La proteína TcCS está formada por 332 residuos de aminoácidos y el peso molecular estimado es de 35kDa (Fyfe et al., 2012; Lima et al., 2016; Romero et al., 2014). Inicialmente la inducción de la expresión de la proteína rTcCS se realizó bajo diferentes concentraciones del inductor, a 37°C, durante 2h en las dos células hospederas, pero no se observó diferencia entre los tratamientos inducidos comparado al control no inducido, lo cual llevo a pensar que el periodo de incubación para la inducción de la rTcCS habría sido muy corto (resultados no mostrados) y por tanto se decidió prolongar el tiempo y probar diferentes temperaturas de incubación.

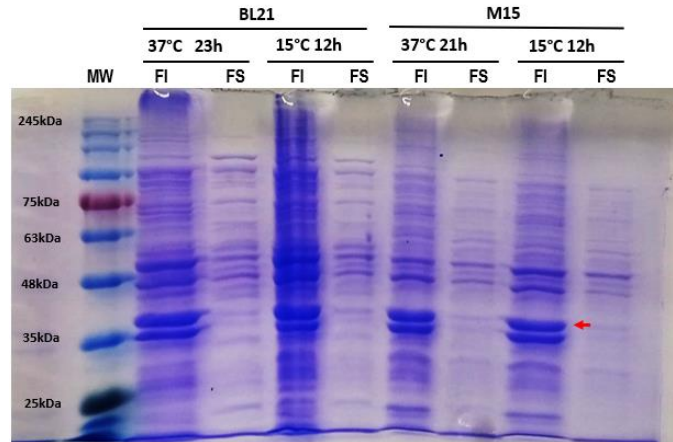
Posteriormente se evaluó la expresión de la proteína rTcCS a una concentración de 1mM de IPTG, a 37°C durante más de 20h de incubación en los dos sistemas heterólogos, M15 y BL21 DE3 (Figura 18 a y b), evidenciando en ambos casos una banda por encima de los

35kDa que se fue pronunciando a través del tiempo, la cual correspondería a la proteína rTcCS. Además, se decidió evaluar la producción de la proteína recombinante a 15°C durante 12h utilizando una concentración del inductor de 1mM en las dos cepas, como se observa en la Figura 18c parece no haberse inducido la sobreexpresión de la proteína recombinante ya que no se evidencia diferencia en el patrón de proteínas inducido comparado con el no inducido a 35kDa para la cepa M15. Sin embargo, como se observa en la Figura 18c hay una banda más pronunciada por encima de los 35kDa comparada con el control no inducido, que indicaría la producción de la CS recombinante en la cepa BL21 DE3.



**Figura 18.** Patrón de proteínas bajo inducción con diferentes temperaturas y tiempos de incubación, en gel SDS-PAGE. MW: marcador de molecular para proteínas. CNI: control no inducido. (a) patrón de proteínas en el tiempo después de inducir la expresión con 1mM de IPTG a 37°C en la bacteria M15. (b) patrón de proteínas en el tiempo después de inducir la expresión con 1mM de IPTG a 37°C en la bacteria BL21 DE3. (c) patrón de proteínas antes y después de la inducción con 1mM de IPTG en bacterias M15 y BL21,

incubadas a 15°C por 12h. Las flechas rojas indican el peso esperado (35kDa) para la proteína rTcCS.



**Figura 19.** Patrón de proteínas tras sonicación de bacterias inducidas, en gel SDS-PAGE. MW: marcador de peso molecular para proteínas. FI: fracción insoluble o pellet tras sonicación. FS: fracción soluble o sobrenadante tras sonicación. Se muestran las proteínas en las dos cepas inducidas con 1mM de IPTG, a 37°C o 15°C, después de 12h, 21h o 23h de incubación. La flecha roja indica el peso molecular esperado (35kDa) que corresponde a la proteína recombinante.

Posteriormente se decidió determinar en qué fracción estaría quedando la proteína recombinante, en fracción soluble o insoluble como resultado de la formación de cuerpos de inclusión, por tanto, se realizó sonicación de los pellets bacterianos inducidos con el fin de lisar las bacterias y liberar las proteínas. En la Figura 19 se evidencia dos bandas pronunciadas en torno a los 35kDa que corresponderían a la proteína rTcCS, a pesar de las diferentes condiciones manejadas en el cultivo, la proteína parecía estar quedando en cuerpos de inclusión, ya que las bandas pronunciadas se observan solo en la fracción insoluble. Para confirmar que en efecto las bandas pronunciadas a la altura de 35kDa correspondieran a la rTcCS se debía realizar un Western Blot utilizando anticuerpo anti-His tag, pero desafortunadamente no se contó con la disponibilidad de este insumo. Por otro lado si la proteína estaba quedando atrapada en cuerpos de inclusión se habría dificultado su obtención, ya que tendrían que usarse técnicas bajo condiciones desnaturalantes que podrían afectar su actividad catalítica y en ese caso no ser funcional

para los ensayos enzimáticos. Por tanto se decidió replantear los ensayos y evaluar el efecto de los compuestos sobre la actividad de la enzima TcCS usando extractos de proteínas solubles de *T. cruzi*, y futuras investigaciones podrían retomar los experimentos para confirmar la expresión de la proteína recombinante, y en dado caso buscar estrategias para evitar que la proteína quede en cuerpos de inclusión.

# Referencias bibliográficas

- Aguilera, E., Varela, J., Serna, E., Torres, S., Yaluff, G., De Bilbao, N. V., Cerecetto, H., Alvarez, G., & González, M. (2018). Looking for combination of benzimidazole and trypanosoma cruzitriosephosphate isomerase inhibitors for chagas disease treatment. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 113(3), 153–160. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170267>
- Asselah, T., Pol, S., Hezode, C., Loustaud-Ratti, V., Leroy, V., Ahmed, S. N. S., Ozenne, V., Bronowicki, J. P., Larrey, D., Tran, A., Alric, L., Nguyen-Khac, E., Robertson, M. N., Hanna, G. J., Brown, D., Asante-Appiah, E., Su, F. H., Hwang, P., Hall, J. D., ... Serfaty, L. (2020). Efficacy and safety of elbasvir/grazoprevir for 8 or 12 weeks for hepatitis C virus genotype 4 infection: A randomized study. *Liver International*, 40(5), 1042–1051. <https://doi.org/10.1111/liv.14313>
- Atwood, J. A., Weatherly, D. B., Minning, T. A., Bundy, B., Cavola, C., Opperdoes, F. R., Orlando, R., & Tarleton, R. L. (2005). Microbiology: The Trypanosoma cruzi proteome. *Science*, 309(5733), 473–476. <https://doi.org/10.1126/science.1110289>
- Bahia, M. T., De Figueiredo Diniz, L. D. F., & Mosqueira, V. C. F. (2014). Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 23(9), 1225–1237. <https://doi.org/10.1517/13543784.2014.922952>
- Balasubramaniam, M., & Reis, R. J. S. (2020). Computational target-based drug repurposing of elbasvir, an antiviral drug predicted to bind multiple SARS-CoV-2 proteins. *ChemRxiv: The Preprint Server for Chemistry*. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12084822>
- Beaumier, C. M., Gillespie, P. M., Strych, U., Hayward, T., Hotez, P. J., & Bottazzi, M. E. (2016). Status of vaccine research and development of vaccines for Chagas disease. *Vaccine*, 34(26), 2996–3000. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.03.074>
- Beer, M. F., Frank, F. M., Germán Elso, O., Ernesto Bivona, A., Cerny, N., Giberti, G., Luis Malchiodi, E., Susana Martino, V., Alonso, M. R., Patricia Sülsen, V., & Cazorla, S. I. (2016). Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids isolated from Stevia

- satureiifolia var. satureiifolia. *Pharmaceutical Biology*, 54(10), 2188–2195.  
<https://doi.org/10.3109/13880209.2016.1150304>
- Beltran-Hortelano, I., Alcolea, V., Font, M., & Pérez-Silanes, S. (2022). Examination of multiple *Trypanosoma cruzi* targets in a new drug discovery approach for Chagas disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 58, 116577.  
<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2021.116577>
- Bern, C. (2011). Antitrypanosomal Therapy for Chronic Chagas' Disease. *New England Journal of Medicine*, 365(13), 1258–1259. <https://doi.org/10.1056/nejmc1108653>
- Bern, C., Messenger, L. A., Whitman, J. D., & Maguire, J. H. (2019). Chagas disease in the united states: A public health approach. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(1), 1–42.  
<https://doi.org/10.1128/CMR.00023-19>
- Berná, L., Chiribao, M. L., Greif, G., Rodriguez, M., Alvarez-Valin, F., & Robello, C. (2017). Transcriptomic analysis reveals metabolic switches and surface remodeling as key processes for stage transition in *trypanosoma cruzi*. *PeerJ*, 2017(3), 1–32.  
<https://doi.org/10.7717/peerj.3017>
- Bero, J., Ganfon, H., Jonville, M. C., Frédérich, M., Gbaguidi, F., DeMol, P., Moudachirou, M., & Quetin-Leclercq, J. (2009). In vitro antiplasmodial activity of plants used in Benin in traditional medicine to treat malaria. *Journal of Ethnopharmacology*, 122(3), 439–444. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.02.004>
- Bero, J., Hannaert, V., Chataigné, G., Hérent, M. F., & Quetin-Leclercq, J. (2011). In vitro antitrypanosomal and antileishmanial activity of plants used in Benin in traditional medicine and bio-guided fractionation of the most active extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 137(2), 998–1002. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.07.022>
- Breckenridge, A., & Jacob, R. (2019). Overcoming the legal and regulatory barriers to drug repurposing. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 18(1), 1–2.  
<https://doi.org/10.1038/nrd.2018.92>
- Cada, D. J., Editor, F., & Kim, A. P. (2016). *Elbasvir / Grazoprevir*. 51(8), 665–686.  
<https://doi.org/10.1310/hpj5108>
- Campos, M. C. O., Castro-Pinto, D. B., Ribeiro, G. A., Berredo-Pinho, M. M., Gomes, L. H. F., Da Silva Bellieny, M. S., Goulart, C. M., Echevarria, Á., & Leon, L. L. (2013). P-

- glycoprotein efflux pump plays an important role in *Trypanosoma cruzi* drug resistance. *Parasitology Research*, 112(6), 2341–2351. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3398-z>
- Canepa, G. E., Bouvier, L. A., Miranda, M. R., Uttaro, A. D., & Pereira, C. A. (2009). Characterization of *Trypanosoma cruzi* L-cysteine transport mechanisms and their adaptive regulation. *FEMS Microbiology Letters*, 292(1), 27–32. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01467.x>
- CDC, C. of D. C. and P. (2019). *Parasites - American Trypanosomiasis (also known as Chagas Disease)*. <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/>
- Chatelain, E. (2015). Chagas disease drug discovery: Toward a new era. *Journal of Biomolecular Screening*, 20(1), 22–35. <https://doi.org/10.1177/1087057114550585>
- Chtita, S., Belhassan, A., Aouidate, A., Belaidi, S., Bouachrine, M., & Lakhlifi, T. (2021). Discovery of Potent SARS-CoV-2 Inhibitors from Approved Antiviral Drugs via Docking and Virtual Screening. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 24(3), 441–454. <https://doi.org/10.2174/1386207323999200730205447>
- Cook, S. E., Vogel, H., Castillo, D., Olsen, M., Pedersen, N., & Murphy, B. G. (2021). Investigation of monotherapy and combined anticoronaviral therapies against feline coronavirus serotype II in vitro. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 24(10), 943–953. <https://doi.org/10.1177/1098612X211048647>
- Crespillo-Andújar, C., Chamorro-Tojeiro, S., Norman, F., Monge-Maillo, B., López-Vélez, R., & Pérez-Molina, J. A. (2018). Toxicity of nifurtimox as second-line treatment after benznidazole intolerance in patients with chronic Chagas disease: when available options fail. *Clinical Microbiology and Infection*, 24(12), 1344.e1-1344.e4. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.06.006>
- De Andrade, P., Galo, O. A., Carvalho, M. R., Lopes, C. D., Carneiro, Z. A., Sesti-Costa, R., De Melo, E. B., Silva, J. S., & Carvalho, I. (2015). 1,2,3-Triazole-based analogue of benznidazole displays remarkable activity against *Trypanosoma cruzi*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(21), 6815–6826. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.10.008>
- de Oliveira, R. G., Cruz, L. R., Mollo, M. C., Dias, L. C., & Kratz, J. M. (2021). Chagas Disease Drug Discovery in Latin America—A Mini Review of Antiparasitic Agents

- Explored Between 2010 and 2021. *Frontiers in Chemistry*, 9(October), 1–7. <https://doi.org/10.3389/fchem.2021.771143>
- de Souza, W. (2009). Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(SUPPL. 1), 89–100. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900014>
- Decuypere, S., Vanaerschot, M., Brunker, K., Imamura, H., Müller, S., Khanal, B., Rijal, S., Dujardin, J. C., & Coombs, G. H. (2012). Molecular mechanisms of drug resistance in natural leishmania populations vary with genetic background. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001514>
- Dharavath, S., Vijayan, R., Kumari, K., Tomar, P., & Gourinath, S. (2020). Crystal structure of O-Acetylserine sulfhydrylase (OASS) isoform 3 from *Entamoeba histolytica*: Pharmacophore-based virtual screening and validation of novel inhibitors. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 192, 112157. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112157>
- Ekins, S., Williams, A. J., Krasowski, M. D., & Freundlich, J. S. (2011). In silico repositioning of approved drugs for rare and neglected diseases. *Drug Discovery Today*, 16(7–8), 298–310. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2011.02.016>
- El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Bartholomeu, D. C., Nilsson, D., Aggarwal, G., Tran, A. N., Ghedin, E., Worthey, E. A., Delcher, A. L., Blandin, G., Westenberger, S. J., Caler, E., Cerqueira, G. C., Branche, C., Haas, B., Anupama, A., Arner, E., Åslund, L., Attipoe, P., ... Andersson, B. (2005). The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of chagas disease. *Science*, 309(5733). <https://doi.org/10.1126/science.1112631>
- European Medicines Agency. (2016). *Zepatier: Assessment Report* (Vol. 44, Issue May). [https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zepatier-epar-public-assessment-report\\_en.pdf](https://www.ema.europa.eu/en/documents/assessment-report/zepatier-epar-public-assessment-report_en.pdf)
- Fyfe, P. K., Westrop, G. D., Ramos, T., Müller, S., Coombs, G. H., & Hunter, W. N. (2012). Structure of *Leishmania major* cysteine synthase. *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications*, 68(7), 738–743. <https://doi.org/10.1107/S1744309112019124>
- Gammeltoft, K. A., Zhou, Y., Hernandez, C. R. D., Galli, A., Offersgaard, A., Costa, R.,

- Pham, L. V., Fahnøe, U., Feng, S., Scheel, T. K. H., Ramirez, S., Bukh, J., & Gottwein, J. M. (2021). Hepatitis c virus protease inhibitors show differential efficacy and interactions with Remdesivir for treatment of SARS-CoV-2 in Vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *65*(9), 1–24. <https://doi.org/10.1128/AAC.02680-20>
- García-Huertas, P., Mejía-Jaramillo, A. M., González, L., & Triana-Chávez, O. (2017). Transcriptome and Functional Genomics Reveal the Participation of Adenine Phosphoribosyltransferase in Trypanosoma cruzi Resistance to Benznidazole. *Journal of Cellular Biochemistry*, *118*(7), 1936–1945. <https://doi.org/10.1002/jcb.25978>
- García-Huertas, P., Mejía-Jaramillo, A. M., Machado, C. R., Guimarães, A. C., & Triana-Chávez, O. (2017). Prostaglandin F2 $\alpha$  synthase in trypanosoma cruzi plays critical roles in oxidative stress and susceptibility to benznidazole. *Royal Society Open Science*, *4*(9). <https://doi.org/10.1098/rsos.170773>
- Ghosh, A. K., Samanta, I., Mondal, A., & Liu, W. R. (2019). Covalent Inhibition in Drug Discovery. *ChemMedChem*, *14*(9), 889–906. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201900107>
- González, L., García-Huertas, P., Triana-Chávez, O., García, G. A., Murta, S. M. F., & Mejía-Jaramillo, A. M. (2017). Aldo-keto reductase and alcohol dehydrogenase contribute to benznidazole natural resistance in Trypanosoma cruzi. *Molecular Microbiology*, *106*(5), 704–718. <https://doi.org/10.1111/mmi.13830>
- Gopal, G. J., & Kumar, A. (2013). Strategies for the production of recombinant protein in escherichia coli. *Protein Journal*, *32*(6), 419–425. <https://doi.org/10.1007/s10930-013-9502-5>
- Guarner, J. (2019). Chagas disease as example of a reemerging parasite. *Seminars in Diagnostic Pathology*, *36*(3), 164–169. <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2019.04.008>
- Hall, B. S., & Wilkinson, S. R. (2012). Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *56*(1), 115–123. <https://doi.org/10.1128/AAC.05135-11>
- Horner, S. M., & Gale, M. (2013). Regulation of hepatic innate immunity by hepatitis C virus. *Nature Medicine*, *19*(7), 879–888. <https://doi.org/10.1038/nm.3253>

- Huličiak, M., Vokřál, I., Holas, O., Martinec, O., Štaud, F., & Červený, L. (2022). Evaluation of the Potency of Anti-HIV and Anti-HCV Drugs to Inhibit P-Glycoprotein Mediated Efflux of Digoxin in Caco-2 Cell Line and Human Precision-Cut Intestinal Slices. *Pharmaceuticals*, 15(2). <https://doi.org/10.3390/ph15020242>
- Ibrahim, M. A. A., Abdeljawaad, K. A. A., Jaragh-Alhadad, L. A., Oraby, H. F., Atia, M. A. M., Alzahrani, O. R., Mekhemer, G. A. H., Moustafa, M. F., Shawky, A. M., Sidhom, P. A., & Abdelrahman, A. H. M. (2023). Potential drug candidates as P-glycoprotein inhibitors to reverse multidrug resistance in cancer: an in silico drug discovery study. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 1–16. <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2176360>
- INS, I. N. de S. (2023). *Informe de evento: CHAGAS*. <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Paginas/Info-Evento.aspx>
- Isah, M. B., Ibrahim, M. A., Mohammed, A., Aliyu, A. B., Masola, B., & Coetzer, T. H. T. (2016). A systematic review of pentacyclic triterpenes and their derivatives as chemotherapeutic agents against tropical parasitic diseases. *Parasitology*, 143(10), 1219–1231. <https://doi.org/10.1017/S0031182016000718>
- Jackson, Y., Wyssa, B., & Chappuis, F. (2020). Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas' disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(3), 690–696. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz473>
- Jean, V., Poyraz, Ö., Saxena, S., Schnell, R., Yogeewari, P., Schneider, G., & Sriram, D. (2013). Discovery of novel inhibitors targeting the Mycobacterium tuberculosis O-acetylserine sulfhydrylase (CysK1) using virtual high-throughput screening. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 23(5), 1182–1186. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2013.01.031>
- Jubair, N., Rajagopal, M., Chinnappan, S., Abdullah, N. B., & Fatima, A. (2021). Review on the Antibacterial Mechanism of Plant-Derived Compounds against Multidrug-Resistant Bacteria (MDR). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/3663315>
- Kosloski, M. P., Bow, D. A. J., Kikuchi, R., Wang, H., Kim, E. J., Marsh, K., Mensa, F., Kort, J., & Liu, W. (2019). Translation of in vitro transport inhibition studies to clinical drug-drug interactions for glecaprevir and pibrentasvir. *Journal of Pharmacology and*

- Experimental Therapeutics*, 370(2), 278–287. <https://doi.org/10.1124/jpet.119.256966>
- Kratz, J. M. (2019). Drug discovery for chagas disease: A viewpoint. *Acta Tropica*, 198(July). <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105107>
- Lamb, Y. N. (2017). Glecaprevir/Pibrentasvir: First Global Approval. *Drugs*, 77(16), 1797–1804. <https://doi.org/10.1007/s40265-017-0817-y>
- Lee, B. Y., Bacon, K. M., Bottazzi, M. E., & Hotez, P. J. (2013). Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *The Lancet. Infectious Diseases*, 13(4), 342–348. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(13\)70002-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(13)70002-1)
- Leite, D. I., Fontes, F. de V., Bastos, M. M., Hoelz, L. V. B., Bianco, M. da C. A. D., de Oliveira, A. P., da Silva, P. B., da Silva, C. F., Batista, D. da G. J., da Gama, A. N. S., Peres, R. B., Villar, J. D. F., Soeiro, M. de N. C., & Boechat, N. (2018). New 1,2,3-triazole-based analogues of benznidazole for use against *Trypanosoma cruzi* infection: In vitro and in vivo evaluations. *Chemical Biology and Drug Design*, 92(3), 1670–1682. <https://doi.org/10.1111/cbdd.13333>
- Li, Y., Shah-Simpson, S., Okrah, K., Belew, A. T., Choi, J., Caradonna, K. L., Padmanabhan, P., Ndegwa, D. M., Temanni, M. R., Corrada Bravo, H., El-Sayed, N. M., & Burleigh, B. A. (2016). Transcriptome Remodeling in *Trypanosoma cruzi* and Human Cells during Intracellular Infection. *PLoS Pathogens*, 12(4), 1–30. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005511>
- Lidani, K. C. F., Andrade, F. A., Bavia, L., Damasceno, F. S., Beltrame, M. H., Messias-Reason, I. J., & Sandri, T. L. (2019). Chagas disease: From discovery to a worldwide health problem. *Journal of Physical Oceanography*, 49(6), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>
- Lima, C. R., Carels, N., Guimaraes, A. C. R., Tufféry, P., & Derreumaux, P. (2016). In silico structural characterization of protein targets for drug development against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Molecular Modeling*, 22(10). <https://doi.org/10.1007/s00894-016-3115-9>
- Liu, R., Curry, S., McMonagle, P., Yeh, W. W., Ludmerer, S. W., Jumes, P. A., Marshall, W. L., Kong, S., Ingravallo, P., Black, S., Pak, I., DiNubile, M. J., & Howe, A. Y. M. (2015). Susceptibilities of genotype 1a, 1b, and 3 hepatitis C virus variants to the NS5A inhibitor elbasvir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(11), 6922–6929.

<https://doi.org/10.1128/AAC.01390-15>

- Mady, C., Ianni, B. M., & de Souza, J. L. (2008). Benznidazole and Chagas disease: Can an old drug be the answer to an old problem? *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 17(10), 1427–1433. <https://doi.org/10.1517/13543784.17.10.1427>
- Magalhães, J., Franko, N., Annunziato, G., Welch, M., Dolan, S. K., Bruno, A., Mozzarelli, A., Armao, S., Jirgensons, A., Pieroni, M., Costantino, G., & Campanini, B. (2018). Discovery of novel fragments inhibiting O-acetylserine sulphhydrylase by combining scaffold hopping and ligand-based drug design. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 33(1), 1444–1452. <https://doi.org/10.1080/14756366.2018.1512596>
- Malone, C. J., Nevis, I., Fernández, E., & Sanchez, A. (2021). A rapid review on the efficacy and safety of pharmacological treatments for chagas disease. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 6(3). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed6030128>
- Marciano, D., Santana, M., & Nowicki, C. (2012). Functional characterization of enzymes involved in cysteine biosynthesis and H<sub>2</sub>S production in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 185(2), 114–120. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.07.009>
- Martín-Escolano, J., Medina-Carmona, E., & Martín-Escolano, R. (2020). Chagas Disease: Current View of an Ancient and Global Chemotherapy Challenge. *ACS Infectious Diseases*, 6(11), 2830–2843. <https://doi.org/10.1021/acscinfecdis.0c00353>
- Matsuo, A. L., Silva, L. S., Torrecilhas, A. C., Pascoalino, B. S., Ramos, T. C., Rodrigues, E. G., Schenkman, S., Caires, A. C. F., & Travassos, L. R. (2010). In vitro and in vivo trypanocidal effects of the cyclopalladated compound 7a, a drug candidate for treatment of Chagas' disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(8), 3318–3325. <https://doi.org/10.1128/AAC.00323-10>
- Maya, J. D., Cassels, B. K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti, N., Ferreira, A., & Morello, A. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 146(4), 601–620. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.03.004>
- MedChemExpress. (2023). *Master of Bioactive Molecules*.

<https://www.medchemexpress.com/>

- Meira, C. S., Barbosa-Filho, J. M., Lanfredi-Rangel, A., Guimarães, E. T., Moreira, D. R. M., & Soares, M. B. P. (2016). Antiparasitic evaluation of betulinic acid derivatives reveals effective and selective anti-*Trypanosoma cruzi* inhibitors. *Experimental Parasitology*, 166, 108–115. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.04.007>
- Mejía-Jaramillo, A. M., Fernández, G. J., Palacio, L., & Triana-Chávez, O. (2011). Gene expression study using real-time PCR identifies an NTR gene as a major marker of resistance to benznidazole in *Trypanosoma cruzi*. *Parasites and Vectors*, 4(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-169>
- Mejia, A. M., Hall, B. S., Taylor, M. C., Gómez-Palacio, A., Wilkinson, S. R., Triana-Chávez, O., & Kelly, J. M. (2012). Benznidazole-resistance in *trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *Journal of Infectious Diseases*, 206(2), 220–228. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis331>
- Merck Sharp & Dohme Corp. (2016). *ZEPATIER- elbasvir and grazoprevir tablet, film coated*. [https://www.merck.com/product/usa/pi\\_circulars/z/zepatier/zepatier\\_pi.pdf](https://www.merck.com/product/usa/pi_circulars/z/zepatier/zepatier_pi.pdf)
- Milani, M., Donalisio, M., Bonotto, R. M., Schneider, E., Arduino, I., Boni, F., Lembo, D., Marcello, A., & Mastrangelo, E. (2021). Combined in silico and in vitro approaches identified the antipsychotic drug lurasidone and the antiviral drug elbasvir as SARS-CoV2 and HCoV-OC43 inhibitors. *Antiviral Research*, 189, 105055. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2021.105055>
- Minning, T. A., Weatherly, D. B., Atwood, J., Orlando, R., & Tarleton, R. L. (2009). The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-370>
- Moreno, É. M., Leal, S. M., Stashenko, E. E., & García, L. T. (2018). Induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* by *Lippia alba* essential oils and their major and synergistic terpenes (citral, limonene and caryophyllene oxide). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2293-7>
- Müller Kratz, J., Garcia Bournissen, F., Forsyth, C. J., & Sosa-Estani, S. (2018). Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. In *Expert Review of Clinical Pharmacology* (Vol. 11, Issue 10). Taylor & Francis.

<https://doi.org/10.1080/17512433.2018.1509704>

- Ng, T., Tripathi, R., Dekhtyar, T., Krishnan, P., Schnell, G., Beyer, J., Mcdaniel, K. F., & Ma, J. (2018). In Vitro Antiviral Activity and Resistance Profile of the Next-Generation HCV NS3-4A Protease Inhibitor Glecaprevir. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 62(1), 1–16.
- Nozaki, T., Ali, V., & Tokoro, M. (2005). Sulfur-containing amino acid metabolism in parasitic protozoa. In *Advances in Parasitology* (Vol. 60, Issue 05). Elsevier Masson SAS. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(05\)60001-2](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(05)60001-2)
- Nozaki, T., Shigeta, Y., Saito-Nakano, Y., Imada, M., & Kruger, W. D. (2001). Characterization of transsulfuration and cysteine biosynthetic pathways in the protozoan hemoflagellate, *Trypanosoma cruzi*: Isolation and molecular characterization of cystathionine  $\beta$ -synthase and serine acetyltransferase from trypanosoma. *Journal of Biological Chemistry*, 276(9), 6516–6523. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009774200>
- Nunes, M. C. P., Dones, W., Morillo, C. A., Encina, J. J., & Ribeiro, A. L. (2013). Chagas disease: An overview of clinical and epidemiological aspects. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(9), 767–776. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2013.05.046>
- Núñez-Vergara, L. J., Squella, J. A., Aldunate, J., Letelier, M. E., Bollo, S., Repetto, Y., Morello, A., & Spencer, P. L. (1997). Nitro radical anion formation from nifurtimox. Part 1: Biological evidences in *Trypanosoma cruzi*. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 43(1), 151–155. [https://doi.org/10.1016/S0302-4598\(96\)05188-4](https://doi.org/10.1016/S0302-4598(96)05188-4)
- Nwaka, S., & Hudson, A. (2006). Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(11), 941–955. <https://doi.org/10.1038/nrd2144>
- Olivera, M. J., & Buitrago, G. (2020). Economic costs of Chagas disease in Colombia in 2017: A social perspective. *International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 91, 196–201. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.11.022>
- Olivera, M. J., Cucunubá, Z. M., Valencia-Hernández, C. A., Herazo, R., Agreda-Rudenko, D., Flórez, C., Duque, S., & Nicholls, R. S. (2017). Risk factors for treatment interruption and severe adverse effects to benznidazole in adult patients with Chagas disease. *PLoS ONE*, 12(9), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0185033>

- OPS, O. P. de la S. (2022). *Chagas disease*.  
<https://www.paho.org/en/documents/factsheet-chagas-disease-americas-public-health-workers>
- Pardo-rodriguez, D., Cifuentes-I, A., Bravo-espejo, J., Romero, I., Robles, J., Cuervo, C., Mej, S. M., & Tellez, J. (2023). *Lupeol Acetate and  $\alpha$ -Amyrin Terpenes Activity against Trypanosoma cruzi: Insights into Toxicity and Potential Mechanisms of Action*.
- Pardo-Rodriguez, D., Lasso, P., Mateus, J., Mendez, J., Puerta, C. J., Cuéllar, A., Robles, J., & Cuervo, C. (2022). A terpenoid-rich extract from *Clethra fimbriata* exhibits anti-*Trypanosoma cruzi* activity and induces T cell cytokine production. *Heliyon*, 8(3).  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e09182>
- Pavia, P. X., Thomas, M. C., López, M. C., & Puerta, C. J. (2012). Molecular characterization of the short interspersed repetitive element SIRE in the six discrete typing units (DTUs) of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, 132(2), 144–150. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.06.007>
- Pech-Canul, Á. D. L. C., Monteón, V., & Solís-Oviedo, R. L. (2017). A Brief View of the Surface Membrane Proteins from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Parasitology Research*, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/3751403>
- Pérez-Molina, J. A., Crespillo-Andújar, C., Bosch-Nicolau, P., & Molina, I. (2021). Trypanocidal treatment of Chagas disease. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (English Ed.)*, 39(9), 458–470. <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2020.04.012>
- Pijnenburg, D. W. M., van Seyen, M., Abbink, E. J., Colbers, A., Drenth, J. P. H., & Burger, D. M. (2020). Pharmacokinetic similarity demonstrated after crushing of the elbasvir/grazoprevir fixed-dose combination tablet for HCV infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(9), 2661–2665. <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa230>
- Pink, R., Hudson, A., Mouriès, M. A., & Bendig, M. (2005). Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature Reviews Drug Discovery*, 4(9), 727–740. <https://doi.org/10.1038/nrd1824>
- Portillo, S., Zepeda, B. G., Iniguez, E., Olivas, J. J., Karimi, N. H., Moreira, O. C., Marques, A. F., Michael, K., Maldonado, R. A., & Almeida, I. C. (2019). A prophylactic  $\alpha$ -Gal-based glycovaccine effectively protects against murine acute Chagas disease. *Npj Vaccines*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s41541-019-0107-7>

- Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infectious Diseases*, 1(2), 92–100. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00065-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00065-2)
- Qiagen. (2011). *QIA express® Ni-NTA Fast Start Handbook For purification and detection of recombinant Sample & Assay Technologies QIAGEN Sample and Assay Technologies* (Issue July). file:///C:/Users/fmile/Downloads/EN-QIAexpress-Ni-NTA-Fast-Start-Handbook (2).pdf
- Ramírez, J. D., & Hernández, C. (2018). Trypanosoma cruzi I: Towards the need of genetic subdivision?, Part II. *Acta Tropica*, 184, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.05.005>
- Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Ribeiro, V., Dias, N., Paiva, T., Hagström-Bex, L., Nitz, N., Pratesi, R., & Hecht, M. (2020). Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 12(November 2019), 7–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.11.004>
- Romanha, A. J., de Castro, S. L., Soeiro, M. de N. C., Lannes-Vieira, J., Ribeiro, I., Talvani, A., Bourdin, B., Blum, B., Olivieri, B., Zani, C., Spadafora, C., Chiari, E., Chatelain, E., Chaves, G., Calzada, J. E., Bustamante, J. M., Freitas-Junior, L. H., Romero, L. I., Bahia, M. T., ... Andrade, Z. de A. (2010). In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(2), 233–238. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000200022>
- Romero, I., Téllez, J., Romanha, A. J., Steindel, M., & Grisard, E. C. (2015). Upregulation of cysteine synthase and cystathionine  $\beta$ -synthase contributes to Leishmania braziliensis survival under oxidative stress. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 59(8), 4770–4781. <https://doi.org/10.1128/AAC.04880-14>
- Romero, I., Téllez, J., Yamanaka, L. E., Steindel, M., Romanha, A. J., & Grisard, E. C. (2014). Transsulfuration is an active pathway for cysteine biosynthesis in Trypanosoma rangeli. *Parasites and Vectors*, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-197>
- Salassa, B. N., & Romano, P. S. (2019). Autophagy: A necessary process during the Trypanosoma cruzi life-cycle. *Virulence*, 10(1), 460–469.

<https://doi.org/10.1080/21505594.2018.1543517>

- Sánchez-Valdéz, F. J., Padilla, A., Wang, W., Orr, D., & Tarleton, R. (2017). Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. *BioRxiv*, 1–20. <https://doi.org/10.1101/235762>
- Santoro, G. F., Cardoso, M. G., Guimarães, L. G. L., Freire, J. M., & Soares, M. J. (2007). Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). *Parasitology*, 134(11), 1649–1656. <https://doi.org/10.1017/S0031182007002958>
- Santos, E. de S., Silva, D. K. C., Reis, B. P. Z. C. dos, Barreto, B. C., Cardoso, C. M. A., Ribeiro dos Santos, R., Meira, C. S., & Soares, M. B. P. (2021). Immunomodulation for the Treatment of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy: A New Approach to an Old Enemy. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11(November), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.765879>
- Schnell, R., Sriram, D., & Schneider, G. (2015). Pyridoxal-phosphate dependent mycobacterial cysteine synthases: Structure, mechanism and potential as drug targets. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1854(9), 1175–1183. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.11.010>
- Schoch, C. L., Ciufo, S., Domrachev, M., Hotton, C. L., Kannan, S., Khovanskaya, R., Leipe, D., Mcveigh, R., O'Neill, K., Robbertse, B., Sharma, S., Soussov, V., Sullivan, J. P., Sun, L., Turner, S., & Karsch-Mizrachi, I. (2020). NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools. *Database : The Journal of Biological Databases and Curation*, 2020. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>
- Sereno, D., Holzmüller, P., & Lemesre, J. L. (2000). Efficacy of second line drugs on antimonyl-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Acta Tropica*, 74(1), 25–31. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(99\)00048-0](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(99)00048-0)
- Silber, A. M., Tonelli, R. R., Lopes, C. G., Cunha-e-Silva, N., Torrecilhas, A. C. T., Schumacher, R. I., Colli, W., & Alves, M. J. M. (2009). Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 168(1), 102–108. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.07.006>
- Singh, S., Sablok, G., Farmer, R., Singh, A. K., Gautam, B., & Kumar, S. (2013). Molecular

- dynamic simulation and inhibitor prediction of cysteine synthase structured model as a potential drug target for trichomoniasis. *BioMed Research International*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/390920>
- Souza, R., Lima, F., Barros, R. M., Cortez, D. R., Santos, M. F., Cordero, E. M., Ruiz, J. C., Goldenberg, S., Teixeira, M. M. G., & da Silveira, J. F. (2011). Genome size, karyotype polymorphism and chromosomal evolution in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS ONE*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023042>
- Sowerby, K., Freitag-Pohl, S., Murillo, A. M., Silber, A. M., & Pohl, E. (2023). Cysteine synthase: multiple structures of a key enzyme in cysteine synthesis and a potential drug target for Chagas disease and leishmaniasis. *Acta Crystallographica Section D Structural Biology*, 79(6), 518–530. <https://doi.org/10.1107/S2059798323003613>
- Takagi, H., & Ohtsu, I. (2016). *L -Cysteine Metabolism and Fermentation in Microorganisms*. <https://doi.org/10.1007/10>
- Teixeira, A., Hecht, M., Guimaro, M., Sousa, A., & Nitz, N. (2011). Pathogenesis of chagas' disease: Parasite persistence and autoimmunity. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(3), 592–630. <https://doi.org/10.1128/CMR.00063-10>
- Teixeira, Benchimol, M., Crepaldi, P. H., & de Souza, W. (2012). Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001749>
- Téllez, J., Amarillo, A., Suarez, C., Cardozo, C., Guerra, D., Ochoa, R., Muskus, C., & Romero, I. (2022). Prediction of potential cysteine synthase inhibitors of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania major* parasites by computational screening. *Acta Tropica*, 225(October 2021). <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.106182>
- Téllez, J., Romero, I., Romanha, A. J., & Steindel, M. (2019). Drug transporter and oxidative stress gene expression in human macrophages infected with benznidazole-sensitive and naturally benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites treated with benznidazole. *Parasites and Vectors*, 12(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3485-9>
- Thomas, D., & Surdin-Kerjan, Y. (1997). Metabolism of sulfur amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(4), 503–

532. <https://doi.org/10.1128/membr.61.4.503-532.1997>
- Tyers, M., & Wright, G. D. (2019). Drug combinations: a strategy to extend the life of antibiotics in the 21st century. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 141–155. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0141-x>
- Tyler, K., & Engman, D. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, 31(5–6), 472–481. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9)
- Valencia, L., Muñoz, D. L., Robledo, S. M., Echeverri, F., Arango, G. J., Vélez, I. D., & Triana, O. (2011). Trypanocidal and cytotoxic activity of extracts of Colombian plants. *Biomedica*, 31(4), 552–559. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i4.426>
- Viotti, R., Vigliano, C., Lococo, B., Alvarez, M. G., Petti, M., Bertocchi, G., & Armenti, A. (2009). Side effects of benznidazole as treatment in chronic Chagas disease: Fears and realities. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 7(2), 157–163. <https://doi.org/10.1586/14787210.7.2.157>
- Wang, S. J., Huang, C. F., & Yu, M. L. (2021). Elbasvir and grazoprevir for the treatment of hepatitis C. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 19(9), 1071–1081. <https://doi.org/10.1080/14787210.2021.1874351>
- WHO, W. H. O. (2015). Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Relevé Épidémiologique Hebdomadaire / Section d'hygiène Du Secrétariat de La Société Des Nations = Weekly Epidemiological Record / Health Section of the Secretariat of the League of Nations*, 90(6), 33–43.
- WHO, W. H. O. (2021). *Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)*. 2021. [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)#:~:text=secondary thrombotic strokes.,Treatment,the cases of congenital transmission.](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)#:~:text=secondary thrombotic strokes.,Treatment,the cases of congenital transmission.)
- Wilkinson, S. R., Taylor, M. C., Horn, D., Kelly, J. M., & Cheeseman, I. (2008). A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(13), 5022–5027. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711014105>
- Williams, R. A. M., Westrop, G. D., & Coombs, G. H. (2009). Two pathways for cysteine

biosynthesis in *Leishmania major*. *Biochemical Journal*, 420(3), 451–462.  
<https://doi.org/10.1042/BJ20082441>

Xia, H., Lu, C., Wang, Y., Zaongo, S. D., Hu, Y., Wu, Y., Yan, Z., & Ma, P. (2020). Efficacy and Safety of Direct-Acting Antiviral Therapy in Patients With Chronic Hepatitis C Virus Infection: A Real-World Single-Center Experience in Tianjin, China. *Frontiers in Pharmacology*, 11(May), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00710>

Zingales, B. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, 184(April 2017), 38–52. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>

Zingales, Bianca, Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G., & Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 12(2), 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>