



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Estudio *in silico* e *in vitro* de la peroxirredoxina mitocondrial de
Trypanosoma cruzi (TcMPX)

TESIS QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA
LUCIO RIVERA SANTIAGO

DIRECTOR DE TESIS
DRA. BERTHA JOSEFINA ESPINOZA GUTIÉRREZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

COMITÉ TUTOR
DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DR. MARCO AURELIO RODRIGUEZ MONROY
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“La madre naturaleza es una asesina en serie, nadie la supera, y es la más creativa. Pero como todo asesino en serie, siente el irrefrenable deseo de que la atrapen, ¿de qué sirven esos fantásticos crímenes si nadie se lleva el mérito? De modo que va dejando migas. Lo más difícil es reconocerlas e interpretarlas y a veces lo que creías que era el aspecto más brutal y activo de la enfermedad, resulta que es su talón de Aquiles. Y a ella le encanta esconder su flaquezas”

Agradecimientos técnicos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, al Programa de posgrado Doctorado en Ciencias Biomédicas con mención especial a la Dra. Aurea Orozco Rivas y al Instituto de Investigaciones Biomédicas con mención especial a las Dras. Patricia Ostrosky Shejet de Wegman María Imelda López Villaseñor por el apoyo y las facilidades brindadas durante el desarrollo de esta tesis.

A mi tutora la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez por su experiencia, asesoría, guía, conocimiento y sobretodo una excelente persona, ya que gracias a ella pude culminar este trabajo.

Al M. en C. Ignacio Martínez por su apoyo técnico en el cultivo de epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*, cultivo de células, modelos de infección y ensayos de resistencia a fármacos.

Al Dr. Miguel Tapia Rodríguez, por su valiosa asesoría técnica para la captura fotográfica en el microscopio óptico en la Unidad de Microscopía del IIB.

Al Dr. Ruben Arroyo Olarte por su apoyo técnico en el diseño de morfollinos y uso de bases de datos de secuencias.

Al Dr. Alfonso León del Río por su apoyo técnico en el uso del fotodocumentador y en el préstamo y uso del espectrofotómetro.

A mi comité tutorial el Dr. Marco Aurelio Rodríguez Monroy y el Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés que gracias a su tutoría, enseñanzas y observaciones se logró este proyecto.

A los miembros del jurado de examen cuyas sugerencias y comentarios ayudaron a mejorar y enriquecer este trabajo:

Dr. Jesús Aguirre Linares (presidente)
Dr. Ruy Enrique Pérez Montfort (Vocal)
Dra. Martha Legorreta Herrera (Vocal)
Dr. Abraham Landa Piedra (Vocal)

Este trabajo se realizó con el financiamiento y el apoyo del programa CONAHCYT Ciencia de Frontera 160671.

Agradezco la beca para terminación de tesis y obtención del grado académico del programa CONAHCYT Ciencia de Frontera 160671.

Este trabajo se realizó con el financiamiento y el apoyo del programa DGAPA, PAPIIT IN211723.

Este trabajo se realizó con el financiamiento y el apoyo del programa Nuevas Alternativas de Tratamiento para Enfermedades Infecciosas (NUATEI)

Agradezco al programa de apoyo a los estudios de posgrado PAEP por su apoyo para la asistencia e inscripción a congresos.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca número CVU 266855 otorgada por cinco años (Enero 2014-Enero 2019) para la realización de mis estudios de posgrado.

También se agradece especialmente a la beca otorgada por el Fondo Sr. Carlos Espinosa Fuentes.

Agradecimientos personales

A mi familia: padres y hermanos, quienes estuvieron involucrados en esta empresa y agradezco infinitamente por haberme apoyado tanto durante tanto tiempo a pesar de las dificultades que se fueron presentando en el camino.

A la Dra. Bertha que se arriesgó conmigo, hubo cambio de proyecto, pandemia, accidentes y sin embargo jamás tiró la toalla mis infinitas gracias a ella y admiración como gran investigadora y persona.

A Nacho que siempre estuvo ahí jalándome las orejas, pero sobre todo apoyándome en el laboratorio y gracias a él sacamos varios textos juntos.

A mis compañeros de laboratorio con los cuales hicieron ameno el trabajo de laboratorio y en ellos encontré el apoyo para desestresarme y siempre me apoyaron para seguir adelante: Esteban, Karlita, Pau, Dehesa, Cris, Andy, Faby, Edgar, Luis, Joselin, Carlos, Liss, Mafer.

A mis amigos de biomédicas Jules, Rafa, Isa, Andrés, Alex, Vania que siempre estuvieron ahí, en los momentos difíciles se movilizaron para defender causas justas.

A los posdoc Ruben, Rouss y Roberto que gracias a sus enseñanzas y consejos pude sacar adelante el trabajo.

A los amigos de toda la vida que siempre estuvieron ahí Will, Juan, Angel, Javier, Erick que me apoyaron y aun me siguen apoyando, esta tesis es para ustedes.

A los que me vieron crecer desde la carrera Adriana, Chemo, Pingu, Greñas, Lucho y que me siguen honrando con su amistad.

Índice

Introducción	1
Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana)	1
Tratamiento	2
Vector transmisor	4
Agente etiológico	5
Ciclo de vida	7
Estrés oxidante en <i>T. cruzi</i>	10
Defensa antioxidante	
Las superóxido dismutasas de hierro (FeSOD)	12
Sistema Tripanotión peroxidasa	13
Triparredoxinas	14
Peroxirredoxinas	15
Peroxirredoxina dependiente de ascorbato	19
Peroxirredoxinas dependientes de glutatión I y II	19
Peroxirredoxina citosólica	20
Peroxirredoxina mitocondrial	21
Antecedentes	24
Justificación	27
Objetivos	28
Materiales y métodos	29
Cultivos de parásitos	29
Purificación de tripomastigotes metacíclicos	29
Ensayo de lisis por Complemento	30
Clonación de TcMPX	30
Análisis <i>in silico</i> de TcMPX QRO de <i>T. cruzi</i>	31
Alineamiento y análisis por Neighbor Joining	31
Modelaje molecular de peroxirredoxina TcMPX	31
Obtención de DNA antisentido (morpholino)	32
Reducción de la expresión de TcMPX	32

Extractos totales	33
<i>Análisis de proteínas por electroforesis vertical en geles de acrilamida (SDS-PAGE)</i>	33
<i>Western Blot</i>	34
Ensayos de susceptibilidad al estrés oxidativo	34
Evaluación morfológica	35
Ensayo de viabilidad	35
Detección de ROS	36
Detección de proteínas carboniladas	36
Detección de lípidos peroxidados	29
Ensayo de resistencia a fármacos (Benznidazol y Tioestrepton)	37
Ensayo de infección en células Vero	38
Resultados	41
Secuencia de la peroxirredoxina mitocondrial de <i>T. cruzi</i> cepa Qro	41
TcMPX es una proteína altamente conservada en <i>T. cruzi</i>	41
TcMPX es reconocido por un anticuerpo anti-PRX humano	46
Reducción de la expresión de la TcMPX	47
La reducción de TcMPX hace más sensible a <i>T. cruzi</i> contra el estrés oxidante	48
La reducción de TcMPX modifica la actividad metabólica de <i>T. cruzi</i>	49
La reducción de TcMPX aumenta la producción de ROS	51
La reducción de TcMPX aumenta la carbonilación de proteínas	52
La reducción de TcMPX aumenta la lipoperoxidación	53
Efecto de benznidazol en la morfología en parásitos reducidos en la expresión de PRX	54
Efecto de benznidazol en la movilidad en parásitos modificados	55
Efecto de benznidazol en el crecimiento en parásitos reducidos en la expresión de MPX	57
TcMPX participa en la infección a células Vero	57

Efecto del Tioestreptón en <i>T. cruzi</i>	61
Efecto sinérgico de Tioestreptón con benznidazol sobre <i>T. cruzi</i>	61
Discusión	63
Conclusiones	69
Perspectivas	70
Referencias	71
Producción científica	
Anexo	

Abreviaturas

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
Bz	Benznidazol
C_P	Cisteína peroxidática
C_R	Cisteína reducida
CRIT	Proteína inhibidora del receptor C2 del complemento
CRT	Calreticulina
DCF-DA	Diclorofluoresceína diacetato
DMEM	Dullbeco's medium eagle modified
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNPH	2,4 dinitro-fenilhidrazina
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FeSOD	Superóxido dismutasas de hierro
FF	Fully Folded
GSH	Glutación
HRP	Peroxidasa de rabano
IFN	Interferón
iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
MOI	Multiplicity of infection
MPO	Mieloperoxidasas
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
Nfx	Nifurtimox

NJ	Neighbor joining
NO	Óxido Nítrico
NO₂	Dióxido de nitrógeno
NTR	Nitrorreductasas
O₂^{•-}	Anión superóxido
OH	Hidroxilo
ONOO⁻	Peroxinitrito
PAMP	Patrones Moleculares Asociados a Patógenos
PBS	Búfer de fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPP	Vía de las pentosas fosfato
Px	Peroxirredoxina
RE	Retículo endoplásmico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SOD	Superóxido dismutasas
T[SH]₂	Tripanotión
TAU	Medio Orina Artificial de Triatomino
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TcAPX	Peroxirredoxina dependiente de ascorbato
TcCPX	Peroxirredoxina citosólica
TcGPX	Peroxirredoxina dependiente de glutatión
TcMPX	Peroxirredoxina mitocondrial
TcMPX	Peroxirredoxina mitocondrial de <i>T. cruzi</i>
HSP	Proteínas de choque térmico

TNF	Factor de necrosis tumoral
TryX	Triparredoxina
TS	Tiostreptón
TXN	Triparredoxina peroxidasa

Resumen

Trypanosoma cruzi, el agente causal de la enfermedad de Chagas, expresa enzimas conocidas como peroxirredoxinas en todos los estadios y cuya función es desintoxicar a los agentes oxidantes, como las especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas moléculas se consideran factores de virulencia y posibles dianas terapéuticas, aunque no existe un fármaco específico contra ellas. La peroxirredoxina mitocondrial (TcMPX) es importante en la desintoxicación de ROS, tiene un papel importante en la infectividad de *T. cruzi*. Sin embargo, se desconocen sus características estructurales y no se han propuesto posibles inhibidores. El objetivo de este trabajo fue describir en detalle algunas características estructurales de la TcMPX de la cepa Querétaro del parásito y comparar su estructura con varias peroxirredoxinas tanto humanas como de otras cepas de *T. cruzi* para encontrar posibles similitudes, inhibirla mediante el uso de un oligo antisentido (morfolino), evaluar los efectos morfo-fisiológicos de estos parásitos modificados y por último, reposicionar al antibiótico Tioestreptón como una potencial molécula inhibidora de la TcMPX. Se encontró que, además del sitio activo característico de una peroxirredoxina 2-cys, esta proteína tiene un posible motivo transmembrana y motivos involucrados en la resistencia a la hiperoxidación. El modelo de homología sugiere una gran similitud estructural con la peroxirredoxina 3 humana (PRX3). Esta similitud se corroboró mediante el reconocimiento cruzado utilizando un anticuerpo anti-PRX humana. Además, utilizando acoplamiento molecular se encontró que el Tioestreptón, un potente inhibidor de la PRX3 humana, podría unirse a TcMPX y afectar su función. Por otra parte, mediante el uso de morfolino, se logró inhibir 50% de la expresión de TcMPX en epimastigotes y tripomastigotes. Esta reducción hizo más sensibles a los parásitos al estrés oxidante en comparación con parásitos no modificados, exhiben una resistencia menor a diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno. Estos parásitos sensibles muestran cambios estructurales y fisiológicos como pérdida de la arquitectura típica, inhibición en el crecimiento de epimastigotes, carbonilación de proteínas, peroxidación de lípidos, disminución en la actividad metabólica, incremento en la producción de ROS y reducción en la

infectividad a células Vero. Lo que demuestra la importancia de esta molécula en la desintoxicación y como factor de virulencia. También, nuestros resultados muestran que Tioestreptón reduce la proliferación de epimastigotes de *T. cruzi*, tripomastigotes derivados de células y tripomastigotes sanguíneos mostrando al mismo tiempo baja citotoxicidad en células Vero. También demostramos un efecto sinérgico sobre el parásito empleando Tioestreptón y Beznidazol. Por último, se discute la conveniencia de buscar alternativas de tratamiento contra *T. cruzi* mediante el reposicionamiento de compuestos como el Tioestreptón y establecer los mecanismos de interacción de TcMPX con otras moléculas importantes para la supervivencia de *T. cruzi*.

Introducción

Enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis americana)

La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana es un problema de salud pública que afecta entre 6 y 7 millones de personas, principalmente en América Latina (OMS 2021). Esta enfermedad es causada por el protozoo hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, se transmite a diferentes mamíferos, incluido el humano. Esta zoonosis fue descrita por primera vez en el año 1909 por el médico brasileño Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas. En los inicios del descubrimiento de esta enfermedad se creía endémica de Brasil; sin embargo, con el pasar de las décadas se reportaron casos en todo Sudamérica, América central y el sur de Estados Unidos (Rassi *et al.*, 2010). Existen diversas maneras de contraer la enfermedad: por vía oral, congénita, transfusión sanguínea, trasplante de órganos y accidentes de laboratorio; sin embargo, la principal es la transmisión vectorial (CDC, 2022).

La enfermedad de Chagas puede manifestarse en dos fases: aguda y crónica. En la fase aguda la parasitemia es detectable bajo el microscopio, los síntomas suelen ser leves e inespecíficos, estos pueden manifestarse como fiebre, malestar general, hepatoesplenomegalia y linfocitosis atípica. En algunos casos, puede presentarse un nódulo cutáneo (chagoma) o un edema palpebral prolongado e indoloro (signo de Romaña) en el sitio de la inoculación (Bern, 2015). La gran mayoría de las infecciones agudas nunca se detectan. En menos del 1% de las infecciones, la fase aguda es grave y potencialmente mortal debido a meningoencefalitis o miocarditis. Esta forma más severa incluye miocarditis fulminante que resulta en una amplia gama de anomalías electrocardiográficas y ecocardiográficas, e incluso la muerte secundaria a insuficiencia cardíaca congestiva (Murillo-Godínez, 2018). La fase aguda tiene una duración aproximada entre 6 y 8 semanas, las primeras líneas de defensa inmune están conformadas por macrófagos y células dendríticas que reconocen al parásito mediante patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), este reconocimiento da lugar a la

activación de estas células y la posterior producción de IL-12. La IL-12 induce la síntesis de IFN- γ (Andrade y Andrews *et al.*, 2004), TNF y óxido nítrico (NO), lo que contribuye a la eliminación del parásito (Andrade y Andrews 2005). Estas citocinas proinflamatorias favorecen el reclutamiento de células T, preferentemente linfocitos CD8⁺ que son fundamentales para el control de los parásitos- (Tarleton, 2015).

Los síntomas de la infección aguda se resuelven en las subsecuentes semanas o meses después de la infección. Una vez que esto sucede, la persona entra en una fase crónica o indeterminada de la enfermedad de Chagas, caracterizada por una parasitemia indetectable a medida que los parásitos invaden los tejidos diana. Se desarrollan anticuerpos específicos contra *T. cruzi*; sin embargo, esta respuesta no elimina al parásito y para la mayoría de los pacientes esta fase indeterminada dura toda la vida. La fase sintomática crónica aparece años, o incluso décadas después de la infección, alrededor del 30% progresa hacia un daño orgánico detectable. La manifestación más grave y frecuente es la anomalía electrocardiográfica crónica que produce una afectación cardíaca que puede verse hasta en un 20-30% de todos los casos, seguida de daño al aparato digestivo en un 5-20%, y una forma mixta (cardíaca y digestiva) en un 5-20% (Rassi *et al.*, 2010). Las características de la miocardiopatía chagásica son variables, el hallazgo más común es la miocardiopatía dilatada acompañada de anomalías del sistema de conducción. Las manifestaciones eléctricas incluyen bloqueo de rama derecha, bloqueo fascicular anterior izquierdo, disfunción del nódulo sinusal y arritmias ventriculares. Las anomalías estructurales pueden incluir aneurismas del ventrículo izquierdo y embolia secundaria como resultado de la formación de trombos e insuficiencia cardíaca (Pino-Marín *et al.*, 2021). El diagnóstico de la enfermedad se confirma por serología positiva, detección del parásito por xenodiagnóstico, hemocultivo, o por PCR.

Tratamiento

Los fármacos actualmente disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son el nifurtimox (Nfx) y el benznidazol (Bz). Estos fármacos se

introdujeron hace más de 50 años. El Bz es un compuesto heterocíclico que contiene un grupo nitro unido a un anillo de imidazol. El Bz se activa por medio de la actividad enzimática de las nitroreductasas (NTR) del parásito y tiene actividad citotóxica sobre éste (Wilkinson y Kelly *et al.*, 2009). Existen dos hipótesis acerca del mecanismo de catálisis. La primera sugiere que está mediada por actividad enzimática de NTR tipo II que reduce un electrón después de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). La segunda, propone que existe un proceso mediado por la nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), en el que las NTR tipo I reducen los residuos de 2-nitroimidazol de Bz a hidroxilamina en una transferencia de dos electrones. La hidroxilamina se convierte en dialdehído-glioxal, un producto altamente reactivo que forma compuestos moleculares complejos de enlaces covalentes con ADN, ARN, proteínas y tioles de bajo peso molecular (Patterson & Wailley 2014).

Nfx es capaz de inducir la formación de $O_2^{\cdot-}$ (anión superóxido) producido por fracciones mitocondriales de *T. cruzi*; además también es capaz de iniciar la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en los parásitos, por esto se propone que la acción tripanocida del Nfx está mediada por los productos parciales reducidos del oxígeno (Docampo & Stoppani, 1979). El segundo mecanismo de acción propuesto es mediante la reducción de un electrón catalizada por la NTR tipo II (NTR-II), produciendo un radical nitrofurano, que en condiciones aeróbicas da como resultado la regeneración del grupo nitro y la producción de $O_2^{\cdot-}$ que dismutan a H_2O_2 y O_2 catalizadas por superóxido dismutasas (SOD) en una reacción controlada por difusión (McCord & Fridovich, 1969). A partir de la formación de aductos de glioxal-guanosina, se bloquea la síntesis de nuevas hebras de ADN, mientras que los aductos de glioxal-tiol inhiben el sistema antioxidante de *T. cruzi*, haciendo que sea altamente susceptible al daño oxidativo (Trochine *et al.*, 2014).

Sin embargo, la eficacia de Nfx y Bz se restringe a las fases iniciales de la enfermedad y no son adecuados para el tratamiento de casos crónicos ya que pueden provocar diversos efectos colaterales (Goldenberg, 2022); además, existe correlación entre las características genéticas del parásito y la resistencia al Bz y Nfx, lo que hace a algunas cepas del parásito más resistentes a estos fármacos (Martínez *et al.*, 2013).

Vector transmisor

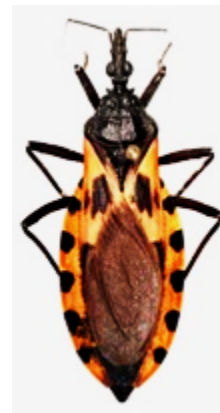
Los principales vectores de la enfermedad de Chagas son insectos hematófagos popularmente conocidos como chinches besuconas con más de 157 especies reportadas en el mundo (Alevi *et al.*, 2021). Estos insectos pertenecen al orden Hemiptera, suborden Heteroptera, familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. Las principales especies asociadas a la infección con *T. cruzi* son: *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y en México *T. dimidiata*, el complejo *Phyllosoma*, *T. hestakeri* y *T. recurva* (Espinoza *et al.* 2013; Rojo-Medina *et al.*, 2018) (Figura 1).



Triatoma infestans



Rhodnius prolixus



Triatoma pallidipennis

Figura 1. Diferentes especies de triatominos de importancia médica distribuidos en el Continente Americano. De izquierda a derecha *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Triatoma pallidipennis*.

Imágenes tomadas de https://es.wikipedia.org/wiki/Triatoma_infestans#/media/Archivo:Triatoma_infestans_-_ZSM.jpg, <http://saberesciencias.com.mx/2016/05/11/enfermedades-transmitidas-por-insectos-en-puebla/>, <https://entomologytoday.org/tag/rhodnius-prolixus/>. Lucio

Estos vectores tienen un periodo de vida de 15 meses aproximadamente, miden entre 2-4 cm de largo, presentan el cuerpo dividido en tres regiones: cabeza, tórax y abdomen. Los triatominos son hematófagos, por lo que buscan fuentes de alimentación a través de quimio y termo receptores. Estos tienen un desarrollo hemimetábolo, poseen una fase de huevo, cinco estadios ninfales y una fase adulta. La alimentación con sangre ocurre en todos los estadios después de la eclosión y suelen alimentarse por las noches. El insecto se alimenta cerca de las uniones mucocutáneas como, los párpados o las comisuras de la boca (de aquí que el nombre común “chinche besucona”). Durante la alimentación, la sangre ingerida ejerce un efecto mecánico sobre el aparato excretor y *T. cruzi* se libera en las heces del insecto. El hospedero al sentir prurito se rasca, produciéndose micro abrasiones e internalizando las heces que contienen al parásito en las zonas cercanas a la alimentación (Echeverría y Morillo 2019).

El insecto transmisor prospera en condiciones de vivienda precarias (paredes de barro o carrizo, techos de paja o presencia de animales de corral), por lo que las personas que viven en áreas rurales corren mayor riesgo de infectarse. Los programas en salud pública implementan métodos para prevenir la transmisión como fumigaciones, conocimiento del vector por la población y detección oportuna de la enfermedad. anterior, ha disminuido el número de nuevas infecciones, y en algunas áreas de Sudamérica, han detenido la transmisión del parásito por parte de los insectos vectores. La tasa de infectividad parece variar entre las especies de triatominos y se ha demostrado que, aunque las especies domésticas son de gran importancia en la transmisión del parásito, son los vectores silvestres los que tienen mayores niveles de infectividad (Secretaría de Salud México, 2018)

Agente etiológico

T. cruzi es un parásito protozoario caracterizado por la presencia de un flagelo y una sola mitocondria en la que se sitúa el cinetoplasto, un orgánulo especializado que contiene ADN. Su clasificación taxonómica es la siguiente:

Dominio: *Eukarya*
Reino: *Protozoa*
Subreino: *Eozoa*
Phylum: *Euglenozoa*
Subphylum: *Glycomonada*
Clase: *Kinetoplastea*
Subclase: *Metakinetoplastina*
Orden: *Trypanosomatida*
Familia: *Trypanosomatidae*
Género: *Trypanosoma*
Especie: *Trypanosoma cruzi*

Tomado de Taxonomía de *T. cruzi*. Guiry MD, 2022.
Algaebase

Este organismo pasa por tres estadios que poseen distintas características morfológicas y fisiológicas y que se identifican por la posición relativa del cinetoplasto en relación con el núcleo celular y del flagelo.

Los amastigotes son estadios intracelulares de forma redonda miden aproximadamente 25 μm de longitud y 2 μm de diámetro. Esta forma se multiplica por fisión binaria dentro de la célula hospedera.

Los epimastigotes tienen una longitud de 20 a 40 μm , también se multiplican por fisión binaria y presentan un flagelo libre, que se origina en la posición anterior del núcleo. Esta forma se encuentra en el aparato digestivo del vector.

Los tripomastigotes presentan una membrana ondulante a lo largo de su cuerpo y un gran flagelo libre que se origina después del núcleo, esta es la forma infecciosa del parásito y no puede multiplicarse. Cuando este estadio está presente en la sangre del hospedero se denomina tripomastigotes sanguíneo capaz de infectar al vector durante su alimentación (Onyekwelu, 2018). Cuando el parásito se localiza en las heces y la orina de los vectores se denomina tripomastigote metacíclico y es capaz de infectar a los hospederos. También se pueden originar a partir de las formas epimastigotes por un proceso artificial en cultivo que replica el proceso de diferenciación en el vector. Estas formas se denominan tripomastigotes metaciclogénicos, y cuando se obtienen tripomastigotes a partir de un cultivo celular de células de mamífero se nombran tripomastigotes derivados de cultivo. Aunque

estos tripomastigotes se parecen morfológicamente, pueden presentar diferencias a nivel de expresión de proteínas, infectividad y resistencia. Como se mencionó anteriormente, estas formas están presentes durante el ciclo de vida del parásito y los cambios que sufre el parásito le permiten sobrevivir a las condiciones variantes de su entorno (Figura 2).

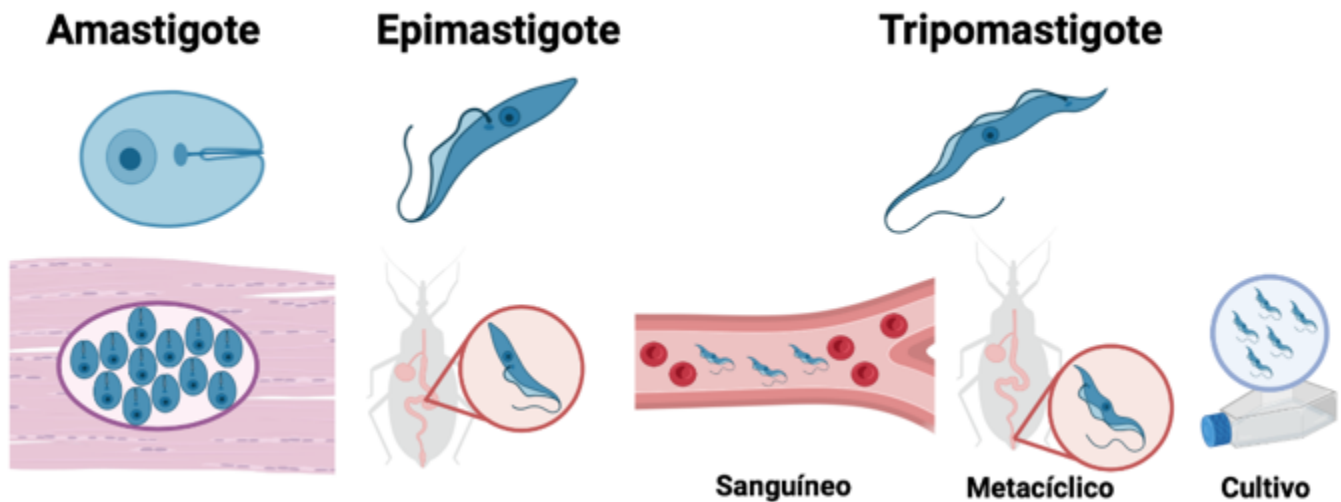


Figura 2. Diferentes estadios del parásito flagelado *T. cruzi*. Presenta tres estadios principales: amastigote (es la forma replicativa intracelular presente en los tejidos), epimastigote (forma replicativa en el intestino del vector) y tripomastigote sanguíneo, metacíclico y derivado de cultivo (forma infectiva). Imagen elaborada por Lucio Rivera Santiago en Biorender.

Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. cruzi* se desarrolla en dos tipos de hospederos: los mamíferos, incluidos humanos y varias especies de triatomíneos vectores de la familia *Reduviidae*. Dentro de estos hospederos, *T. cruzi* tiene que hacer frente a diferentes tipos de estrés ambientales como los cambios de temperatura, la baja disponibilidad de nutrientes, los cambios en la osmolaridad y la presencia de especies oxidantes altamente reactivas (Melo *et al.*, 2020). La respuesta al estrés es esencial para la viabilidad del parásito en diversas situaciones, como las respuestas al estrés térmico y osmótico durante la transición del insecto al huésped

mamífero, y la respuesta al estrés oxidativo cuando invade las células de los mamíferos. Por lo tanto, la respuesta al estrés del parásito es importante para la transmisión y la patogénesis de la enfermedad. Se ha observado que *T. cruzi* aumenta la síntesis de proteínas de choque térmico (HSP) o enzimas reparadoras del ADN cuando se dañan algunas macromoléculas en situaciones de altas temperaturas; también hay síntesis de moléculas redox no enzimáticas y aumento en la actividad de las enzimas superóxido dismutasas y peroxidasas cuando se presenta estrés oxidante (Wilkinson y Kelly 2003, 2009).

El ciclo de vida comienza cuando un vector se alimenta de un mamífero infectado con tripomastigotes sanguíneos, estos viajan al intestino posterior donde sufren un proceso de diferenciación a epimastigotes derivado del cambio de pH que fluctúa de 5.7 a 8.9 y de la osmolaridad que incrementa hasta 1000 mosm/kg en el recto (Kollien *et al.*, 2001). Asimismo, en el intestino grandes cantidades de hemoglobina producto de la alimentación es degradada a hemo (Nogueira *et al.*, 2015), el cual incrementa la producción de ROS, las cuales pueden eliminar al parásito. Otro componente importante en la generación de ROS dentro del vector es la profenoloxidasa presente en la hemolinfa y en los hemocitos, además participa en el proceso de melanización, fagocitosis y encapsulación de parásitos (Machado-Silva *et al.*, 2016) y la producción de intermediarios de especies de nitrógeno y oxígeno. En las heces y en la orina del vector la osmolaridad incrementa de 320 a 410 mosm/kg y existe un decremento en la cantidad de nutrientes comparado con el intestino y una disminución de pH a 5.0, ambos factores ocasionan que el parásito se transforme a tripomastigote metacíclico (Gonçalves, *et al.*, 2018); actualmente la obtención de tripomastigotes metacíclicos consiste en asemejar estas condiciones artificialmente en medios de crecimiento parecidos a la orina de triatomino (medio TAU) (Contreras, *et al.*, 1985)

Una vez dentro de la sangre del hospedero se presenta un estrés calórico, mientras que la temperatura del vector es de 27 °C en el mamífero puede oscilar entre 34 °C a 40 °C. En el parásito se presenta una alteración en la composición de la membrana se incrementa la relación entre los esteroides/fosfolípidos y una gran

proporción de ácidos grasos saturados presentes en los fosfolípidos (Florin-Christensen 1997); además que el pH de la sangre es de 7.4 (Figura 3).

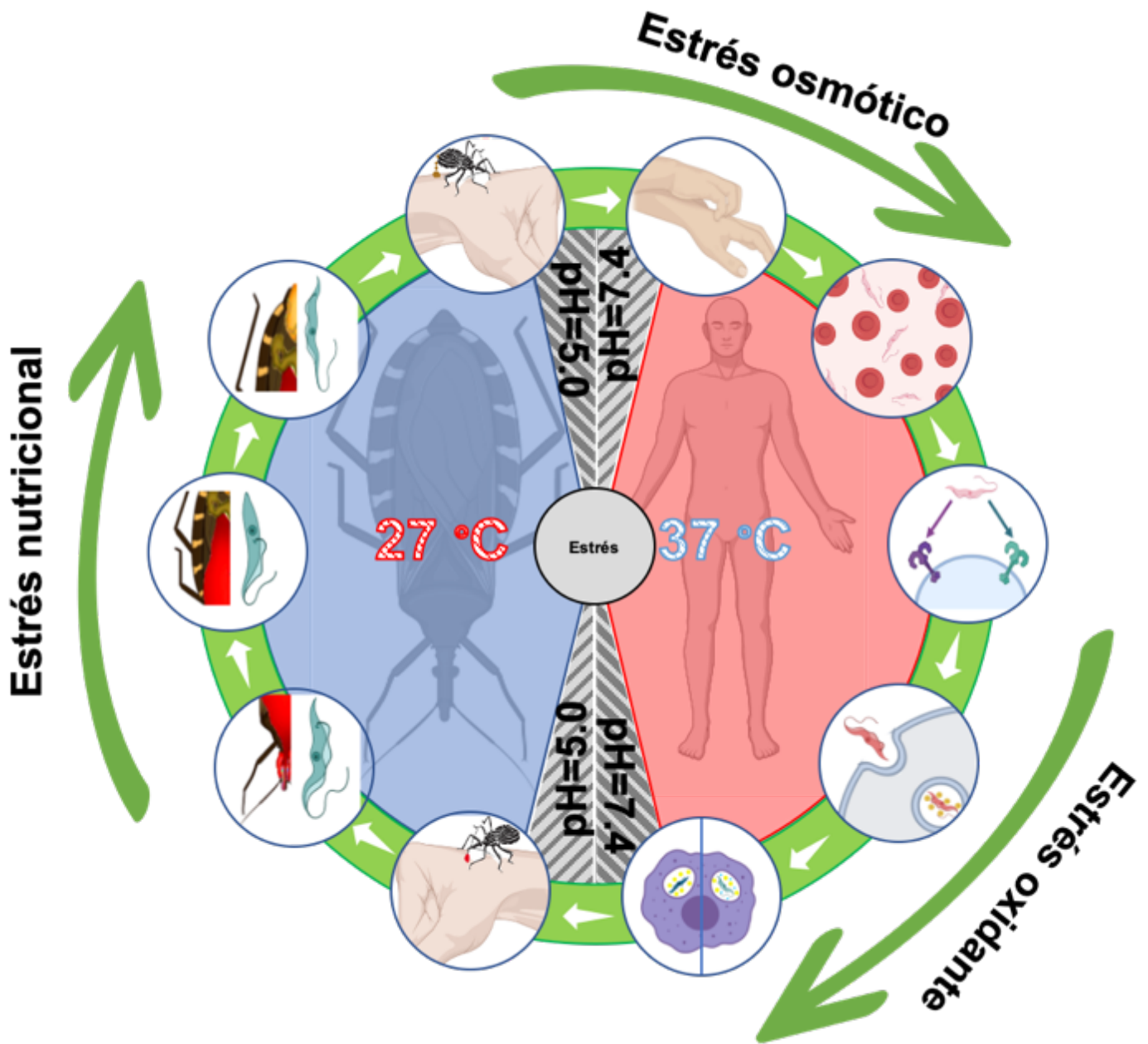


Figura 3. Ciclo de vida de *T. cruzi* que muestra los diferentes tipos de estrés: térmico, osmótico, nutricional, pH y oxidante a los que se enfrenta el parásito dentro de los hospederos mamífero y vector. Imagen por Lucio Rivera Santiago elaborada en Biorender.

Algunos componentes del sistema inmune del hospedero, principalmente las células fagocíticas, combaten la infección fagocitando al parásito, una vez dentro del fagolisosoma se producen grandes cantidades de radical superóxido, que puede dismutarse a peróxido de hidrógeno o reaccionar con la sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) para formar óxido nítrico (NO) y reaccionar para crear peroxinitrito (ONOO^-) los cuales eliminarán al parásito (Piacenza *et al.*, 2013). A su vez *T. cruzi* posee un eficiente mecanismo de defensa que le permite eludir este estrés oxidante y migrar hacia los tejidos, donde se presenta un cambio de osmolaridad con respecto a la sangre el cual es de 20 a 30 mosm/kg. Desde su ingreso al hospedero en el sitio de inoculación, este parásito interactúa con los elementos de la respuesta inmune, tanto extra como intracelulares, como el $\text{O}_2^{\bullet-}$, el H_2O_2 y el ONOO^- , así como aquellos derivadas de su propio metabolismo (Finzi *et al.*, 2004; Peloso *et al.*, 2016). El ciclo culmina cuando el vector se alimenta de nuevo de otro hospedero infectado originando descenso de temperatura de 37 °C a 27 °C.

Estrés oxidante en *T. cruzi*

Durante la infección en el hospedero mamífero, los macrófagos son la primera línea de defensa y son capaces de fagocitar al parásito. Los macrófagos tienen dos funciones; por un lado, son importantes células efectoras para el control y destrucción de la forma intracelular del parásito por mecanismos oxidativos y no oxidativos. Por otro lado, los macrófagos también pueden servir como células huésped a largo plazo que facilitan la replicación y supervivencia de los patógenos. Los tripomastigotes metacíclicos deben sobrevivir y evadir el ambiente altamente oxidativo que se encuentra dentro del fagolisosoma de estas células para establecer la infección (Cardoso *et al.*, 2016). Durante la fagocitosis, la NADPH oxidasa presente en la membrana de los macrófagos se activa, produciendo anión superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$). El $\text{O}_2^{\bullet-}$ se puede unir a los iones H^+ presentes en el medio intracelular formando H_2O_2 o puede reaccionar con el NO derivado de la iNOS,

inducido por IFN- γ y TNF, citocinas sintetizadas durante el proceso de infección aguda por *T. cruzi* y que producen ONOO $^-$ (Piacenza *et al.*, 2019) (Figura 4).

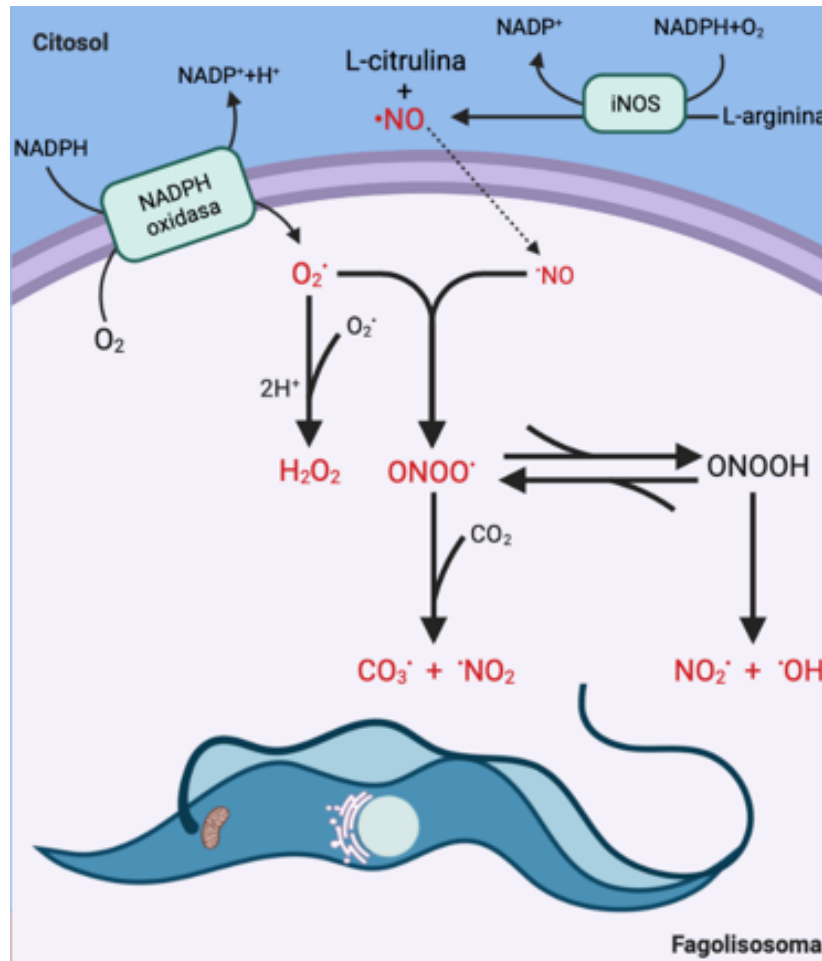


Figura 4. Especies reactivas de oxígeno dentro del fagolisosoma. Después de la fagocitosis del parásito, se activa la NADPH oxidasa asociada a la membrana del macrófago, lo que produce ($O_2^{\bullet-}$) que se puede convertir en H_2O_2 . Los macrófagos estimulados con citocinas proinflamatorias inducen la expresión de iNOS, generando $\bullet NO$ en el citoplasma a partir de la oxidación de la L-arginina. El $\bullet NO$ se difunde en la vacuola del fagolisosoma y reacciona con $O_2^{\bullet-}$ para formar $ONOO^{\bullet}$. El $CO_3^{\bullet-}$, $\bullet NO_2$ y $\bullet OH$, se producen a partir de $ONOO^{\bullet}$. Las ROS pueden causar varios daños celulares y la muerte del parásito dentro del fagolisosoma (Adaptado de Cardoso *et al.*, 2016).

El ONOO^- es clave para la eliminación del parásito, puede causar daño por reacciones directas mediante mecanismos de oxidación de uno o dos electrones a varias moléculas, como tioles y centros metálicos, también produce especies reactivas secundarias, incluido el radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), el dióxido de nitrógeno ($\bullet\text{NO}_2$) y el carbonato (CO_3^\bullet), que pueden oxidar lípidos, dañar ADN y participar en la oxidación, carbonilación y nitración de proteínas (Álvarez *et al.*, 2011). Si el tripomastigote es capaz de sobrevivir y establecerse dentro de la célula, se diferencia a la forma amastigote, la célula hospedera produce óxido nítrico (NO). El NO puede difundirse y alcanzar a los amastigotes intracelulares, lo que lleva a la generación de $\text{O}_2^{\bullet-}$ intramitocondrial y a la formación de ONOO^- . El daño oxidativo del NO depende en gran medida de su reacción con el superóxido (Gutiérrez *et al.*, 2019).

Otro de los componentes celulares encargados de la eliminación de *T. cruzi* son los neutrófilos que contienen grandes cantidades de mieloperoxidasas (MPO) que se reclutan temprano en el sitio de la infección. Al igual que en macrófagos, la NADPH oxidasa, produce $\text{O}_2^{\bullet-}$, además la activación endotelial de la xantina oxidasa (XOD) en respuesta a la infección por *T. cruzi*, también da como resultado una mayor producción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ a través de la oxidación de hipoxantina a xantina y ácido úrico. El $\text{O}_2^{\bullet-}$ se recombina espontáneamente con otras moléculas para producir radicales libres como H_2O_2 y OH. La MPO se libera por los neutrófilos activados en el medio extracelular, donde utiliza H_2O_2 y anión cloruro (Cl^-), formando ácido hipocloroso (HOCl) (Dhiman *et al.*, 2011).

El HOCl es un poderoso oxidante y reacciona con aminos para formar cloraminas y radicales peroxilos. Los pacientes con enfermedad de Chagas crónica tienen niveles elevados de mieloperoxidasa (MPO) circulante y nitración de proteínas en plasma, además se han identificado proteínas nitradas del huésped en lesiones cardíacas en el modelo de ratones con enfermedad de Chagas (Teixeria *et al.*, 2015, Piacenza *et al.*, 2019).

Defensa antioxidante

Las superóxido dismutasas de hierro (FeSOD)

La historia de coevolución de este protozoario con su hospedero le ha provisto de mecanismos de evasión y de resistencia al sistema inmune, así como el desarrollo de una eficiente maquinaria antioxidante. *T. cruzi* contiene cuatro superóxidos dismutasas de hierro (FeSOD). Las FeSOD es una familia de enzimas que protegen a muchos organismos, entre ellos los tripanosomátidos, contra los radicales tóxicos al convertir el superóxido en oxígeno y peróxido ya sea generado en el citosol (TcSODB1), los glicosomas (TcSODB1-2) o las mitocondrias (TcSODA) (Peloso *et al.*, 2012). La mitocondria es un organelo clave, ya que es una fuente de $O_2^{\cdot-}$, por lo que esta enzima previene la formación de $ONOO^-$ a través de la dismutación de $O_2^{\cdot-}$, lo cual contribuye a neutralizar la citotoxicidad en la mitocondria. Sin embargo, esta molécula se inhibe por concentraciones altas de $ONOO^-$, que produce la nitración de residuos de tirosina cercanas al sitio activo de la molécula reduciendo su capacidad antioxidante, por lo cual es necesaria la participación de otras moléculas antioxidantes en este organelo (Menna-Barreto y de Castro *et al.*, 2014).

Sistema tripanotión reductasa

Esta vía es exclusiva de los tripanosomátidos, se basa en un sistema sofisticado de vías vinculadas en las que los equivalentes reductores de NADPH derivados de la vía de las pentosas fosfato (PPP) se entregan a una variedad de sistemas de desintoxicación enzimática. Existen altos niveles del conjugado de poliamina-péptido tripanotión (N 1, N 8-bis(glutationil) espermidina) en su forma reducida (T[SH]₂), que a su vez es capaz de reducir a la triparredoxina (TryX). La TryX reducida interactúa y transmite un equivalente reductor a la triparedoxina peroxidasa (TXN).

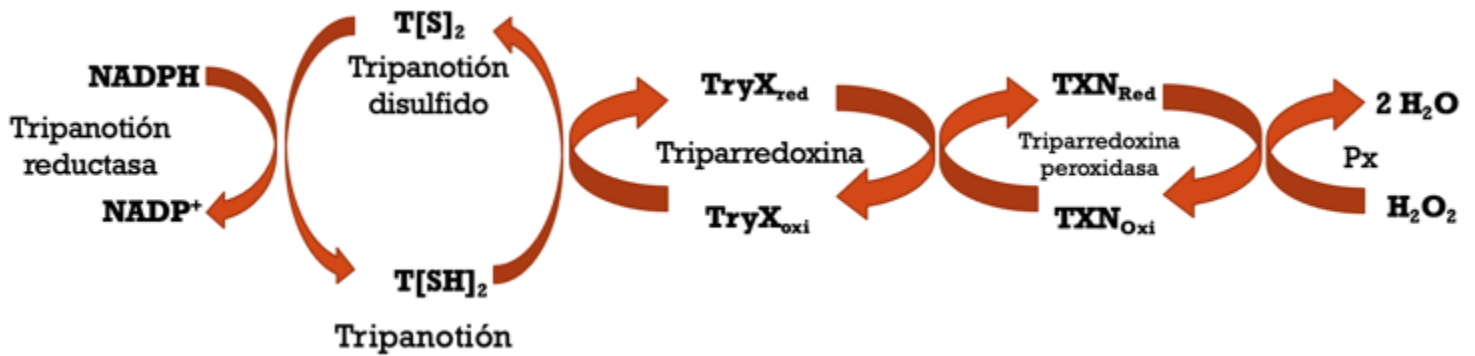


Figura 5. Sistema tripanotión reductasa. El Tripanotión (T[SH]₂) es la molécula central de esta vía de desintoxicación que incluye a la triparredoxina (TryX) y a la triparredoxina peroxidasa (TXN), las peroxirredoxinas (Px) son las moléculas finalesceptoras de protones que transforman al peróxido en dos moléculas de agua. Imagen elaborada por Lucio Rivera Santiago

Una característica de la vía del sistema tripanotión reductasa es que el transporte del poder reductor de TryR a TryP utiliza las propiedades redox de los enlaces disulfuro en las enzimas y sus sustratos peptídicos (Fairlamb y Cerami *et al.*, 1992). El último receptor de electrones del sistema son las peroxirredoxinas (Px) lo que le permite catalizar la reducción de peróxido de hidrógeno e hidroperóxidos orgánicos a agua o alcoholes, respectivamente (Flohé *et al.*, 2012). (Figura 5).

Tripanotión

El tripanotión (T[SH]₂) fue descrito en 1985 como un derivado de la espermidina en varios tripanosomátidos (Fairlamb *et al.*, 1985), a partir de ese momento se le consideró como molécula clave en el metabolismo redox de los tripanosomátidos (Krauth-Siegel y Leroux, 2003). El T[SH]₂ se sintetiza en dos pasos secuenciales en los que dos moléculas de glutatión (GSH) se unen covalentemente a los grupos terminales NH₂ de la espermidina mediante una única enzima citosólica denominada tripanotión sintetasa de *T. cruzi* (TcTS). T[SH]₂ posee las mismas funciones metabólicas del glutatión (GSH) que está presente en los mamíferos, por esta razón se asoció a la defensa contra oxidantes, xenobióticos, metales pesados y en procesos regulatorios (Fairlamb & Cerami, 1992). La función de T[SH]₂ es

transferir equivalentes reducidos desde NADPH, proveniente de la PPP hacia otra molécula parte del sistema: la triparredoxina.

Triparredoxinas

La triparredoxina peroxidasa (TXN) es parte de la superfamilia de las tiorredoxinas ya que sirve como reductor para diferentes tipos de tiol peroxidases (Castro y Tomas, 2008; Diechtierow y Krauth-Siegel, 2011). En *T. cruzi*, existen dos genes que codifican para dos diferentes peroxidases, TXNI y TXNII, las cuales se encuentran en dos diferentes organelos, en el citoplasma y la mitocondria, respectivamente (Arias *et al.*, 2013). TXN representa un clado molecular distinto dentro de la superfamilia de oxidorreductasas de tiorredoxinas caracterizadas por un motivo WCPPC en su centro catalítico. La cisteína N-terminal del motivo del sitio activo CPPC queda expuesta. Su nucleofilia está garantizada por un rápido transporte de protones que involucra la segunda cisteína y una red de residuos internos sin carga (Irigoin *et al.*, 2008). Esta proteína cataliza la reducción del ditiol tripanotión (de TS₂ a T[SH]₂), el mecanismo de reacción se basa en la transferencia de dos electrones de NADPH a dos cisteínas catalíticas, a través del cofactor flavín adenín dinucleótido (FAD). Una vez reducidas las cisteínas, la TryX[S]₂ oxidada se une a la proteína mediante el puente disulfuro del sustrato, dando como resultado la formación de un disulfuro mixto. Finalmente, se forma T[SH]₂ reducida. Después, otra molécula la triparredoxina reductasa transfiere los equivalentes a una molécula que los transformará en agua: las peroxirredoxinas.

Peroxirredoxinas

Las peroxirredoxinas (Px) son enzimas antioxidantes ubicuas que se encuentran en todos los organismos, es una familia de enzimas antigua e importante que derivó de una proteína precursora similar a la tiorredoxina. Las Px son diferentes en secuencia a las catalasas o al GSH, tampoco contienen cofactores redox como hemo, flavina o iones metálicos como las SOD, su función la realizan a través de un residuo de cisteína conservado catalíticamente esencial en el dominio N-terminal de todas las Px, denominado cisteína peroxidática (C_P) (Hall *et al.*, 2009,

Flohé, 2012). Con base en el mecanismo de resolución y la existencia o ausencia de una cisteína resolutive (C_R) localizada en la región C-terminal de la enzima, las Px se dividen en tres subgrupos denominados 2-Cys típicas, 2-Cys atípicas y 1-Cys (Nicolussi *et al.*, 2017). En el caso de las Px 2-Cys típicas y 2-Cys atípicas se forma un puente disulfuro de Cys-SOH entre la C_R y la C_P de la misma u otra Px (Yuan *et al.*, 2010), respectivamente.

La primera estructura cristalina reportada de una Px (Choi *et al.*, 1998) reveló que está estrechamente relacionada con la de las tiorredoxinas (Pedone *et al.*, 2010). La C_P siempre se ubica en la hélice α_2 en una cara de la hoja β , acuñada entre las hélices α_3 y α_5 (Hall *et al.*, 2011).

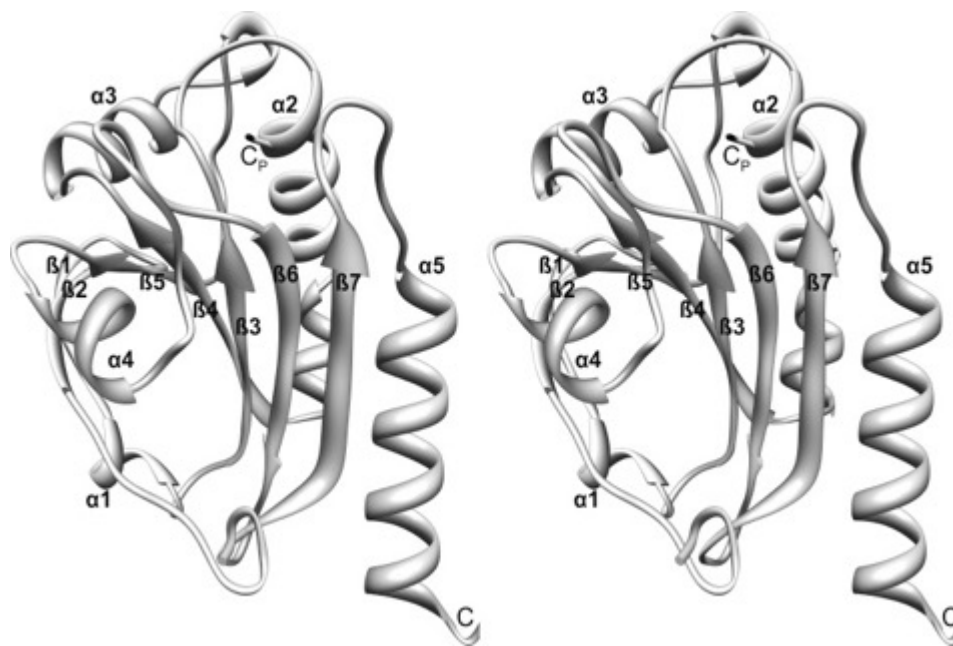


Figura 6. Estructura conformacional de Px. Comparación de estructuras entre la tiorredoxina de *T. cruzi* (izquierda) y peroxirredoxina de *P. falciparum* (derecha) y la posición de la cisteínas peroxidática (C_P), cinco α -hélices y siete β -lámina. C_P en la hélice α_2 , entre las hélices α_3 y α_5 . Para las 2-Cys Pxs, la ubicación de la C_R tiende a ser característica de una subfamilia de Px determinada y, puede estar cerca del extremo C-terminal en α_2 , α_3 o α_5 . (Gretes *et al.*, 2012).

Para las Px de tipo 2-Cys, la ubicación de la C_R puede estar cerca del extremo C-terminal en las posiciones $\alpha 2$, $\alpha 3$ o $\alpha 5$ (Gretes *et al.*, 2012). Las Px forman dos tipos de dímeros: tipo A, que se cree que representan el modo ancestral de dimerización, interactúan de punta a punta en las hebras $\beta 1$ y $\beta 2$, y en los bucles que preceden a las hélices $\alpha 2$, $\alpha 3$ y $\alpha 4$ (Sarma *et al.*, 2005). Los dímeros de tipo B se forman mediante una interacción de hoja β de borde a borde (la interfaz B) para formar una hoja β extendida de 10 hebras (Hall *et al.*, 2011) (Figura 6). Los dímeros de tipo B comúnmente se asocian a través de la interfaz A en decámeros en forma de anillo para estabilizar el sitio activo FF (completamente plegado en inglés fully folded) y permitir la máxima actividad peroxidativa. Las Px catalizan la reducción directa de una variedad de hidroperóxidos (ROOH) a los correspondientes alcoholes (ROH; o H₂O en la reducción de H₂O₂) y agua. Esto ocurre a través de una reacción de sustitución nucleofílica bimolecular (SN₂) de desplazamiento directo, con un átomo de azufre de cisteína en el sitio activo de Px que lleva a cabo un ataque nucleofílico en el átomo de oxígeno distal del peróxido. La reacción procede a través de un estado de transición planar, liberando el alcohol y dejando la cisteína Px oxidada a ácido sulfénico (C_P-SOH) (Hall *et al.*, 2009), que puede condensarse con un segundo residuo de Cys (resolución de cisteína, C_R-SH) que forma un disulfuro intermolecular (C_P-S-S-C_R) (Tairum *et al.*, 2021). La alta reactividad de la C_p está relacionada con el microambiente en el que se encuentra. La C_p está muy cerca de otros dos residuos totalmente conservados (Thr/Ser y Arg), formando interacciones polares que aumentan la electrofilia del H₂O₂ y facilitan el ataque nucleofílico del tiolato sobre la C_p. Estas cisteínas son esenciales para la reducción eficiente de hidroperóxidos, estos tres residuos (C_p, Thr/Ser y Arg) componen la llamada tríada catalítica.

Para regenerar la cisteína del sitio activo reducido para la próxima ronda de catálisis, la Px participa en una serie de reacciones que involucran intermediarios de disulfuro.

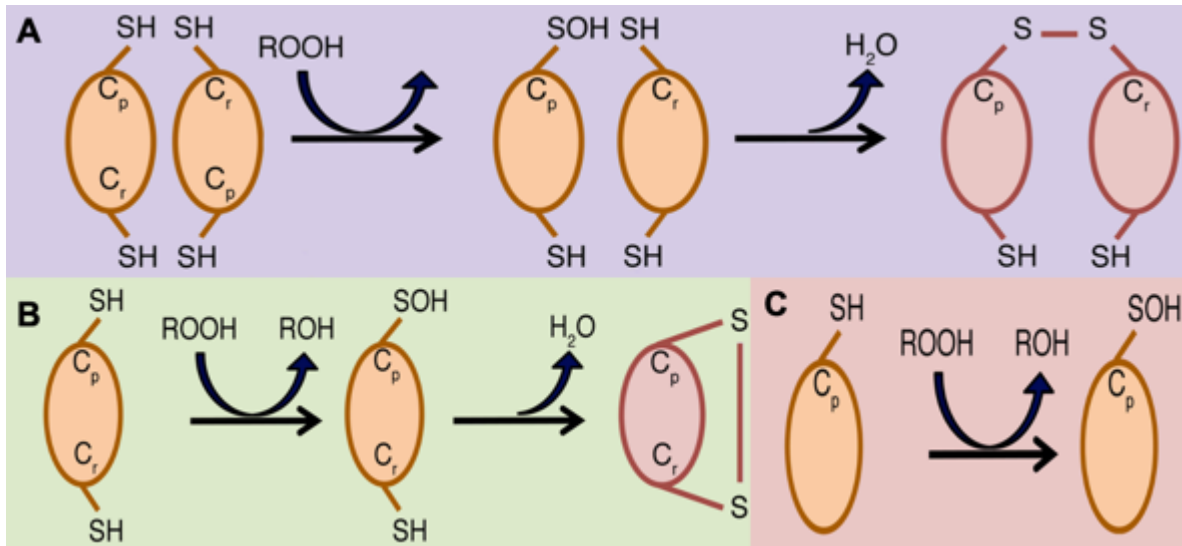


Figura 7. Tipos de peroxirredoxinas. A. Mecanismo de acción de las 2-cys típicas y la formación del ácido sulfénico (SOH) para la desintoxicación y producción de H₂O. B. Mecanismo de acción de las 2-cys atípicas y la interacción de la C_p y la C_r en la misma peroxirredoxina. C. Mecanismo de acción al 1-cys peroxirredoxinas a través de la C_p. (modificado de Nicolussi *et al.*, 2017)

En *T. cruzi*, las Px son proteínas que inactivan a las ROS y sus derivados, como peróxidos orgánicos, peroxinitritos y ácido peroxinitroso, que generan un ambiente oxidante dañino para el parásito (Flohé *et al.*, 2012).

Las Px de *T. cruzi* son de tipo 2-Cys típicas (Trujillo *et al.*, 2004), como se mencionó anteriormente, para la eliminación de ROS activan la cisteína Cp y Cr. Se han identificado hasta cinco Px distintas en *T. cruzi*, que difieren en su ubicación subcelular y especificidad de sustrato y se ha demostrado que estas protegen a *T. cruzi* contra un amplio intervalo de concentraciones de peroxinitritos y ROS (Wilkinson *et al.*, 2000) derivado de células del sistema inmune, del propio metabolismo y productos derivados de fármacos. Además, estas moléculas se han propuesto como factores de virulencia que favorecen el establecimiento del parásito en el hospedero (Piacenza *et al.*, 2009).

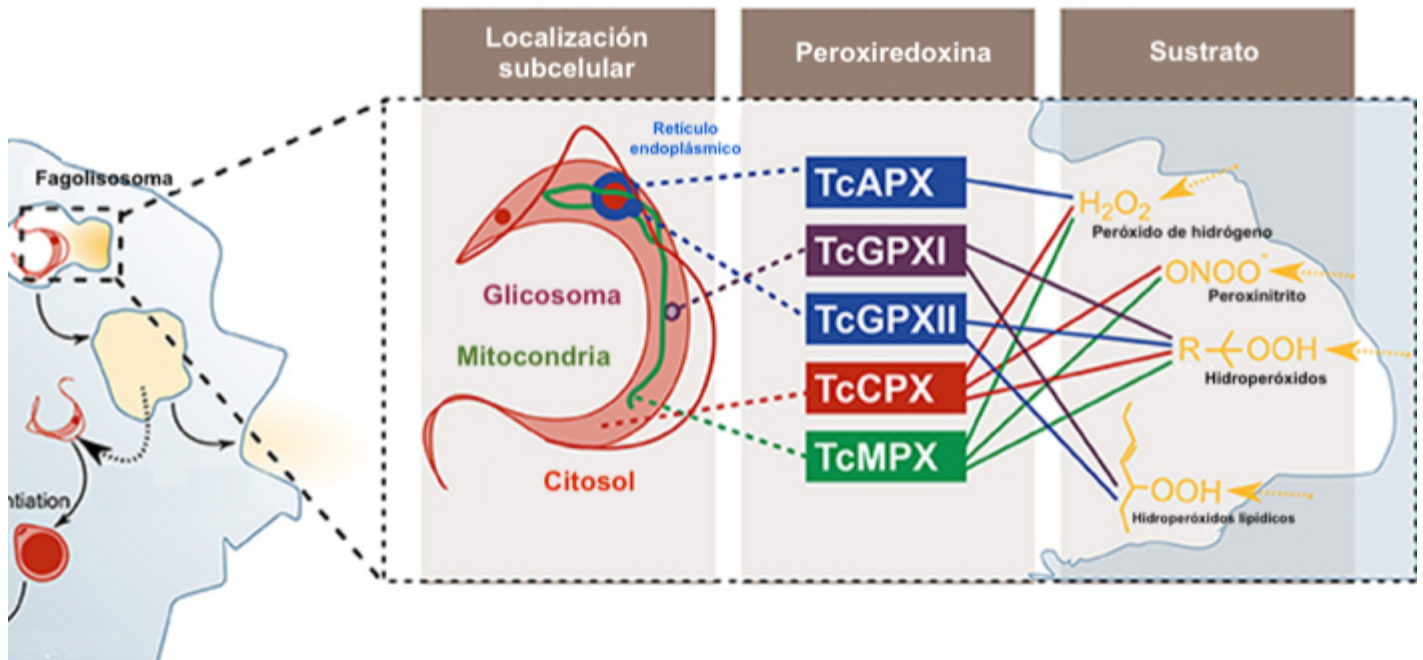


Figura 8. Localización de las diferentes peroxidoredoxinas de *T. cruzi*. Se muestra la ubicación subcelular de los cinco diferentes Px de *T. cruzi* (TcAPX, TcGPXI, TcGPXII, TcCPX y TcMPX) y los sustratos específicos que pueden degradar (peróxido de hidrógeno, peroxinitrito, hidroperóxidos e hidroperóxidos lipídicos) (Modificado de Acevedo *et al.*, 2018).

Peroxirredoxina dependiente de ascorbato (TcAPX)

La peroxidasa de ascorbato (APX) es una peroxidoredoxina de tipo 1-Cys que contienen un grupo hemo, reduce catalíticamente al H_2O_2 en presencia de ascorbato como sustrato reductor, esta Px se describió por primera vez en plantas. En *T. cruzi*, la secuencia de aminoácidos tiene un 30-35% de similitud con la APX de plantas, además de una eficiencia catalítica varias veces menor. En *T. cruzi* solo existe una isoforma de TcAPX que se ubica exclusivamente en el retículo endoplasmático (RE). En este organelo la mayor fuente de H_2O_2 proviene del plegamiento de las proteínas, el cual es mediado por enzimas como la flavoproteína oxireductina del RE (ERO1), que usa el oxígeno molecular para oxidar a la proteína disulfuro isomerasa, que es necesaria para la formación de puentes disulfuro en este organelo (Rashdan *et al.*, 2020). Por cada enlace disulfuro generado, se forma una molécula de H_2O_2 y, por lo tanto, este proceso puede generar altos niveles de

estrés oxidativo. Dado que TcAPX está ausente en el huésped humano, esta enzima puede considerarse un objetivo potencial para la quimioterapia contra la enfermedad de Chagas (Wilkinson *et al.*, 2002, Turrens, 2004). APX también se encuentra en el parásito *Leishmania sp.*, donde es una enzima mitocondrial y en varios otros cinetoplastidos, pero está ausente de los tripanosomas africanos: *T. brucei*, *T. congolense* y *T. vivax* (Berriman *et al.*, 2005).

Peroxirredoxinas dependientes de glutatión I y II (TcGPXI, TcGPXII)

La peroxirredoxina dependiente de glutatión I o TcGPXI se localiza en el citosol y en los glicosomas (Wilkinson *et al.*, 2002). Tiene la capacidad de catalizar peróxidos orgánicos, derivados de fosfolípidos y ácidos grasos, su función es prevenir el daño celular debido a la peroxidación lipídica. Estas Px no son tan eficientes en la reducción de oxidantes por lo que son dependientes de glutatión o triparredoxina como donantes de electrones inmediatos (Taylor *et al.*, 2015). Su capacidad de aceptar equivalentes reductores de diferentes moléculas donantes puede deberse a su localización ya que, como se mencionó anteriormente se encuentran en dos diferentes compartimentos. La segunda molécula, TcGPXII, se localiza en el RE esta también es dependiente de glutatión; además puede metabolizar hidroperóxidos de ácidos grasos y fosfolípidos, pero no hidroperóxidos de alquilo de cadena corta, lo que sugiere su papel específico en la protección de los lípidos celulares del daño causado por ROS. En análisis filogenéticos, se sugiere que TcGPXI y TcGPXII pueden tener diferentes orígenes evolutivos. TcGPXI comparte 50% de similitud con las Px que se encuentran en las plantas, mientras que TcGPXII tiene entre 31-37% de similitud (Wilkinson *et al.*, 2002).

Peroxirredoxina citosólica (TcCPX)

TcCPX pertenece a la familia de las 2-cys típicas, tiene la capacidad de desintoxicar H₂O₂, peroxinitrito e hidroperóxidos orgánicos de cadena pequeña. Esta Px se ubica en el citosol. Es un factor importante para la supervivencia y proliferación de los tripanosomátidos en presencia de macrófagos activados. Su

expresión en diferentes estadios es diferente, en la forma de tripomastigotes existe un mayor contenido enzimático. Además, se ha sugerido su papel como factor de virulencia, ya que cepas virulentas expresan esta Px en mayor proporción (Piacenza *et al.*, 2009). Otra característica distintiva, es que TcCPX no sufre transición de dímero a decámero en condiciones de estrés oxidante, por lo que es fácilmente sobre oxidada, y su capacidad desintoxicante es reducida. También TcCPX induce el reclutamiento de células presentadoras de antígeno productoras de IL-12/23p40 y promueve una fuerte respuesta inmune Th1 específica, además de inducir proliferación y altos niveles de secreción de IFN- γ en células mononucleares de sangre periférica de pacientes crónicos sin manifestaciones cardíacas demostrables (López *et al.*, 2021). Lo cual se ha observado con Px de otros parásitos como la Px de helmintos que induce la activación alternativa de macrófagos al inducir la producción de IL-4, IL-5 e IL-13 y la polarización de las células T hacia una respuesta inmune Th2, que es independiente de la actividad de la peroxidasa y dependiente de la estructura (Donnelly *et al.*, 2008). También la Px de *T. gondii* induce macrófagos alternativamente activados en modelos murinos *in vitro* (Marshall *et al.*, 2008). Esta activación y polarización puede deberse a las propiedades estructurales o funcionales de la proteína, afectando la respuesta inmunitaria adaptativa, aunque el mecanismo aún no se ha elucidado (López *et al.*, 2021).

Peroxisredoxina mitocondrial (TcMPX)

TcMPX pertenece a la familia de 2-cisteína típicas (Trujillo *et al.*, 2004) y se localiza junto al cinetoplasto del parásito, por lo cual se piensa que protege al DNA mitocondrial del daño provocado por el peróxido (Wilkinson *et al.*, 2000). La unidad funcional básica de esta Px es el dímero, pero puede formar estructuras decaméricas, dodecaméricas y toroidales (Figura 9) (Cao y Lindsay, 2017).

La sobreexpresión de esta Px confiere un nivel alto de protección a los epimastigotes contra un intervalo amplio de concentraciones de peroxinitrito (Piacenza *et al.*, 2008). También se ha reportado que existe una correlación positiva entre la parasitemia y la presencia de esta enzima desintoxicante cuando estas

moléculas se sobre expresan en tripomastigotes metacíclicos de diferentes cepas de *T. cruzi*, lo que sugiere que estas enzimas están involucradas en una estrategia de adaptación antioxidante del parásito (Piacenza *et al.*, 2008, 2009).

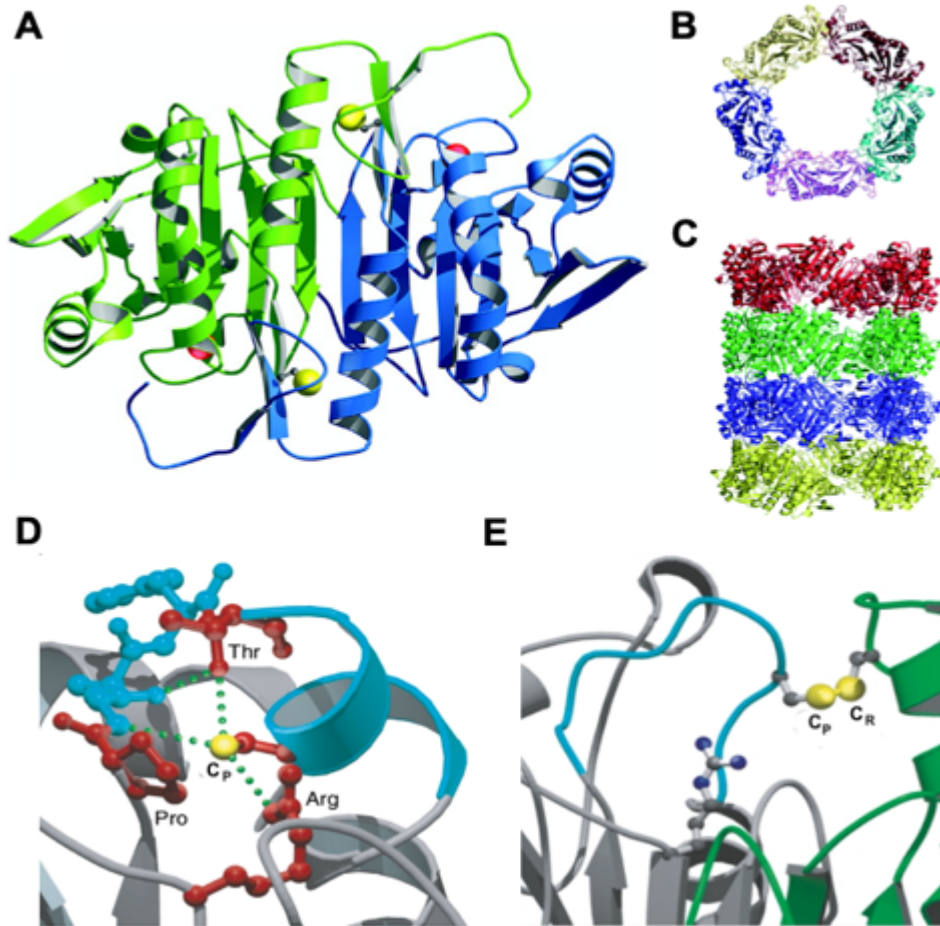


Figura 9. Conformación estructural de las Px. **A.** Homodímero de Px. **B.** Decámero de Px. **C.** Oligómero toroidal de Px. **D.** Sitios activos de peroxirredoxina. Red de enlaces de hidrógeno conservada (líneas de puntos) de los residuos del sitio catalítico en color rojo y la región bucle-hélice azul. También identificado en la alineación están las regiones I y II, que son necesarias para la formación del decámero. **E.** Se muestra Pxs diméricas (monómeros individuales de color gris o verde) en el que la cisteína peroxidativa (C_P) está presente como un ácido sulfínico sobreoxidado (bola y barra) o en un disulfuro con la cisteína de resolución (C_R) (Wood *et al.*, 2003).

Estos parásitos son más infectivos, ya que se demostró que cepas virulentas de *T. cruzi* expresan un mayor contenido enzimático de esta proteína que cepas no virulentas, asimismo esta molécula se expresa en mayor proporción en la etapa de tripomastigotes que epimastigotes (Piacenza *et al.*, 2008)

En los últimos años se ha propuesto que TcMPX tiene actividad de holdasa y forma parte de vías de señalización como daño celular y de repliegue de proteínas (Rhee *et al.*, 2011; Perkins *et al.*, 2015). Las holdasas son parte de la familia de chaperonas moleculares que previenen la agregación de proteínas de manera independiente al ATP. Por lo que la actividad de TcMPX como holdasa es crucial para la protección celular durante diferentes condiciones de estrés que inducen el daño y el plegamiento de las proteínas con la posible formación de agregados de proteínas (Specker *et al.*, 2022). La interacción entre la función peroxidasa y holdasa de las Px está regulada por varios entornos en la célula, como el pH, la temperatura, los iones, las modificaciones postraduccionales y el equilibrio redox (Saccoccia *et al.*, 2014).

Otras funciones atribuidas a la TcMPX son la participación en el proceso metabólico de moléculas pequeñas y el plegamiento de proteínas en condiciones basales y de estrés oxidante, lo que diferencia a esta Px en función con respecto a TcCPx y abre nuevas perspectivas sobre la participación de TcMPx en el metabolismo del parásito, en la señalización redox, en las cascadas de señalización, en procesos que contribuyen a la supervivencia y adaptación del parásito a los diferentes ambientes (incluido estrés térmico) que encuentra durante su ciclo de vida (Peloso *et al.*, 2016); además, en condiciones de estrés oxidante la TXN tiene una mayor preferencia de donar equivalentes a TcMPX que a TcCPX para transformar al peróxido en agua (Dias *et al.*, 2018) por lo que esta molécula es la principal aceptora de electrones durante el estrés oxidante.

Antecedentes

Los microorganismos unicelulares patógenos utilizan mecanismos antioxidantes específicos y no-específicos para mantener la supervivencia y la rápida proliferación en el hospedero (Piacenza *et al.*, 2019), aunque cada patógeno tiene sus propios sistemas antioxidantes particulares; los procesos de óxido-reducción requieren de tioles de bajo peso molecular y sistemas enzimáticos basados en tioles, que proporcionan equivalentes reductores para el catabolismo de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 y de peroxinitrito (Staerck *et al.*, 2017), estos mecanismos catabolizan especies reactivas, inhiben la fagocitosis y aumentan la virulencia (Nosanchuk & Casadevall, 2006).

Se han identificado varios factores de virulencia para *T. cruzi* entre las que se incluyen la proteína tripartita del inhibidor del receptor C2 del complemento (CRIT), la calreticulina (TcCRT), la gp35/50, la gp82, la cruzipaína, la oligopeptidasa B y las transialidasas, entre otras. Las peroxirredoxinas TcCPX y TcMPX también se consideran factores de virulencia (Piacenza *et al.*, 2009), ya que además de su papel en la desintoxicante de ROS recientemente se ha reportado su papel como chaperonas en condiciones de estrés (Dias *et al.*, 2018). Varios análisis proteómicos han sugerido la inducción de la respuesta antioxidante de *T. cruzi* en el tripomastigote metacíclico en comparación con el estadio epimastigote (Piacenza *et al.*, 2008, 2009). El nivel de defensas antioxidantes del parásito al inicio de la infección influye en la supervivencia del patógeno, ya que favorece su escape de la vacuola fagocítica y el establecimiento en el hospedero (Osorio *et al.*, 2012). En algunos trabajos se reportó que las peroxirredoxinas estaban presentes en concentraciones más altas en las formas metacíclicas de los aislados virulentos en comparación con las cepas atenuadas. En los ratones infectados se encontró una correlación directa entre la concentración proteica de TcCPX, TcMPX y la parasitemia provocada por los diferentes aislados estudiados. Estos resultados refuerzan la idea de que las enzimas antioxidantes del parásito representan nuevos factores de virulencia implicados en el establecimiento de la enfermedad (Piacenza *et al.*, 2009). Además, se ha reportado que la sobreexpresión de TcMPX y TcCPX

incrementa la resistencia al estrés oxidante, así como un aumento en la virulencia y mayor resistencia al Nfx (Specker *et al.*, 2022).

Tabla 1. Moléculas que interactúan con TcMPX en condiciones basales y de estrés oxidante. (Peloso *et al.*, 2016)

Condiciones basales	Estrés oxidante
Proteína 14-3-3	Alfa tubulina
Receptor de proteína cinasa C activado, putativa	Epsilon tubulina, putativa, parcial
Aldo/ceto reductasa	Adenilato cinasa, putativa
Aminopeptidasa, putativa	ATP sintasa, cadena epsilon, putativa
Arginasa, putativa	Proteína de unión a GTP Rab1, putativa
Arginina cinasa	Factor iniciador de traducción eucariótica 6 (eIF-6)
Aspartato aminotransferasa, mitocondrial, putativa	Factor de elongación 2, putativa, parcial
Subunidad beta-ATPasa, putativa	HSP60
D-isomero específico 2-hidroxiácido deshidrogenasa-proteína, putativa	HSP70
D-isomero específico 2-hidroxiácido deshidrogenasa-proteína, putativa, parcial	HSP70 kDa, precursor mitocondrial, putativa
Deshidrogenasa	NADP-dependiente alcohol hidrogenasa, putativa
Dihidrolipoamida deshidrogenasa (DLDH)	Prolin racemasa, parcial
Enolasa 1, parcial	Subunidad proteasoma beta 7, putativa
Proteína Enoil-CoA hidratasa/isomerasa, familia, putativa	Piruvato deshidrogenasa E1 subunidad beta, putativa
Factor de iniciación eucariótica 4a, putativa	Espermidín sintasa, putativa
Glutamamil carboxipeptidasa, putativa	Proteína glutatión peroxidasa-similar, putativa
Hidrolasa similar a la deshalogenasa haloácida, putativa	Deshidrogenasa
HSP70 kDa, precursor mitocondrial, putativa	Tiol transferasa Tc52
HSP70	Tirosin aminotransferasa
Malato deshidrogenasa mitocondrial, putativa, parcial	ATP sintasa vacuolar subunidad B, putativa
HSP similar de 85 kDa	
Metiltioadenosin fosforilasa	
NADP-dependiente alcohol hidrogenasa, putativa	
Nucleósido fosforilasa	
Peptidasa M20/M25/M40, putativa	
Peroxisredoxina mitocondrial (TcMPx)	
Proteína disulfida isomerasa (PDI), putativa	
Succinil-coA:3-cetoácida-coenzima A transferasa, precursor mitocondrial putativa	
Superóxido dismutasa B (hierro)	
Tiol transferasa Tc52	
Tripanotión reductasa	
Triparredoxina peroxidasa homólogo (TcCPx)	
Tirosin aminotransferasa	

En ausencia de estrés oxidante, la TcMPX interactúa con diversas proteínas. Se ha reportado que puede interactuar hasta con 35 proteínas diferentes y se ha asociado a distintos procesos entre los que destacan el transporte de proteínas, el ciclo de Krebs, la actividad de cinasas, la unión de ATP, los procesos metabólicos, la respuesta al estrés, la actividad óxido-reductasa y las estructurales además de la interacción con proteínas de choque térmico (Tabla 1). En condiciones oxidantes, TcMPX interactúa con un menor número de proteínas, la mayoría relacionadas con la defensa celular, el plegamiento de proteínas, las isomerasas, la reparación de ADN, la polimerización de proteínas, el metabolismo de aminoácidos, la respuesta

al estrés, la actividad oxido-reductasa y las proteínas estructurales (Peloso *et al.*, 2016).

Por lo tanto, es posible que, si se inhibe la expresión de estos genes, el parásito tendrá una mayor sensibilidad al estrés oxidativo, lo que originará cambios morfológicos, alteraciones de DNA y muerte celular, como lo demuestra la inhibición de una de las moléculas asociadas a la defensa anti-oxidante como TcAPX, en estos parásitos mutantes se reportó una mayor sensibilidad al peróxido de hidrógeno exógeno, aunque no se reportó susceptibilidad al Bz, sí se mostró un decremento significativo en la infectividad en células de mamífero; sin embargo, no se detectó efecto sobre la replicación, diseminación o tropismo tisular de *T. cruzi in vivo* (Taylor *et al.*, 2015).

Justificación

Con la finalidad de estudiar con más profundidad a la peroxirredoxina TcMPX de *T. cruzi*, en este trabajo se realizó un estudio *in silico* de su estructura y se inhibió su expresión para estudiar cómo se afecta la respuesta anti-estrés oxidante, el crecimiento y el metabolismo del parásito. A nivel molecular, se analizó cómo afecta a las proteínas y cómo la enzima participa en la resistencia a fármacos. El estudio de las PX ayudará a definir estrategias para combatir la infección y para aumentar la eficacia de los tratamientos disponibles para la enfermedad.

Objetivo general

- Realizar un estudio *in silico* de la TcPMX y reducir su expresión para analizar su función en el parásito.

Objetivos particulares

- Realizar un estudio *in silico* de la estructura de la TcMPX.
- Reducir la expresión de TcMPX en epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi*.
- Determinar la susceptibilidad de parásitos con expresión reducida de TcMPX al estrés oxidativo, así como posibles cambios morfo-fisiológicos y bioquímicos.
- Determinar la susceptibilidad de parásitos modificados con expresión reducida de TcMPX a fármacos.
- Evaluar el efecto de la reducción de la expresión de TcPMX en la infección de *T. cruzi in vitro*.

Materiales y métodos

Cultivo de parásitos

El estadio epimastigote de *T. cruzi* de la cepa TBAR / MX / 0000 / Querétaro (Qro), que es altamente virulenta, fue proporcionada por el cepario del Laboratorio de Tripanosomiasis americana del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM a cargo de la Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez. Los epimastigotes se cultivaron en medio LIT (NaCl 68 mM, KCl 5.36 mM, Na₂HPO₄ 53.6 mM, Glucosa 1 mM; Triptosa e Infusión de caldo de hígado) suplementado con 10% de SFB y cosechados cada cuarto, día que corresponde a la fase logarítmica de crecimiento (Espinoza *et al.*, 2010; Martínez *et al.*, 2013).

Purificación de tripomastigotes metacíclicos

Para la obtención de tripomastigotes metacíclicos, se envejecieron 5x10⁶ epimastigotes/mL por 14 días en medio LIT suplementado con 10% de SFB en botellas de cultivo de 25 cm³ a 28 °C. Al término se cosecharon y se lavaron con amortiguador de fosfatos-salino (PBS-137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ y 1.8 mM KH₂PO₄, pH 7.4) dos veces y se centrifugaron a 800 x *g* durante 10 min en centrifuga con rotor angular. Después los parásitos se transfirieron a medio TAU (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 8 mM amortiguador de fosfatos pH 6.0) durante dos horas a una densidad de 250 x 10⁶ parásitos/mL a 28 °C. Inmediatamente después, se diluyeron a 50 x 10⁶ parásitos/mL en medio TAU 3AAG (Medio TAU suplementado con 10 mM L-prolina, 50 mM ácido L-glutámico, 2 mM L-ácido aspártico y 10 mM glucosa) y cultivados a 28 °C por 5 días más en frascos de cultivo de 75 cm³ a 28 °C (Nogueira *et al.*, 2015).

Ensayo de lisis por Complemento

Para la selección de las formas metacíclicas se realizó el ensayo de lisis por complemento para la eliminación de parásitos en el estadio epimastigote. Esto se logró mediante la incubación de los parásitos en medio TAU 3AAG con suero de individuos sanos durante dos horas en una relación 1:1 v/v a 37 °C. Al término se cosecharon y se lavaron dos veces con PBS y se centrifugaron a 800 x g durante 10 min en centrifuga con rotor angular. Por último, se purificaron los tripomastigotes en un gradiente discontinuo de Percol (GE Healthcare), en tres fases 80/40/20 (porcentaje de Percol diluido con PBS) se centrifugó en un rotor de columpio a 2500 x g, 30 min a 25 °C y se aisló la fase 40/20 donde se encontraban los tripomastigotes metacíclicos, y se lavaron dos veces con PBS a 800 x g por 10 min para ser utilizados en los diferentes tratamientos (Castanys *et al.*, 1984).

Clonación de TcMPX

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar TcMPX se realizó con 200 ng de ADN del parásito y se diseñaron cebadores específicos con el software Primer1 (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>): TcMPX-Fw (5'-ATGTTTCGTCGTATGGCCG-3') y TcMPX-Rv (5'-TCATGCGTTTTTCTCAAATATTCA-3'). Las condiciones empleadas fueron las siguientes: 5 U de enzima Platinum™ Pfx (Invitrogen, Massachusetts, EE. UU.), 10 mM de cada cebador y MgCl₂ 4 mM. Un paso inicial de 94 °C durante 3 min, 35 ciclos (30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 45 s a 68 °C) y un paso final de elongación (5 min a 68 °C). Los amplicones obtenidos (fragmento de 330 pb) se purificaron con el kit innuPREP DOUBLEpure (Analytik Jena, Jena, Alemania). Se secuenciaron en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud (UNAM) con la técnica de Sanger, utilizando un analizador genético 3500xL (Applied biosystems, Massachusetts, EE. UU.). La secuencia obtenida para Qro se analizó utilizando el software Chromas. La secuencia consenso se determinó usando el

software Bioedit. Finalmente, la secuencia obtenida se subió al GenBank como QroMPX (número de acceso QKE53461.1).

Análisis in silico de TcMPx QRO de T. cruzi

Para determinar la secuencia del gen de TcMPX, se realizó un análisis bioinformático comparando un gen de referencia en una cepa del mismo genotipo que la cepa Qro: la cepa Sylvio (TCSYLVIO_007608, *T. cruzi* Sylvio X10/1-2012 tryparedoxin peroxidase). Adicionalmente la secuencia se comparó con 31 secuencias de peroxirredoxinas mitocondriales de *T. cruzi* de diferentes genotipos en el GenBank y se comparó el porcentaje de similitud entre las secuencias con la herramienta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para la determinación del péptido de direccionamiento a la mitocondria se utilizó el software iPSORT prediction (<https://ipsort.hgc.jp/predict.cgi>).

Alineamiento y análisis por Neighbor Joining

Todas las secuencias de aminoácidos se alinearon mediante el programa ClustalW, homologando la extensión de todas las secuencias a 168 aa, que es el tamaño de las secuencias de las PRX de *T. cruzi*. Una vez alineadas, se realizó un análisis de *Neighbor Joining* (NJ) en el programa MEGA 7.0 con un bootstrap de 10,000 réplicas, mediante el método *p*-distance. Todas las posiciones con una cobertura menor al 95% fueron eliminadas (Kumar *et al.*, 2018). Los filogramas resultantes se visualizaron mediante el mismo software enraizando con un grupo externo, que en este caso fueron las PRX humanas.

Modelaje molecular de peroxirredoxina TcMPX

Se realizó el modelaje molecular de TcMPX Qro y se comparó con TcTxNPX CL Brener (PDB 4LLR), utilizando los servidores en línea I-TASSER de la página Zhang Lab (Universidad de Michigan) disponible en

<https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/> y Phyre2 disponible en <http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>, como plantilla se utilizaron las secuencias utilizadas en el alineamiento. Una vez realizados los modelos, se analizaron en el programa PyMOL Molecular Graphics System, Versión 2.0 Schrödinger, LLC (DeLano 2002) y la homología estructural de secuencias se compararon mediante el software Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/index.html>).

Obtención de DNA antisentido (morfolino)

Los morfolinos son oligómeros sintéticos compuestos con un dominio modificado de unidades de morfolina y un fosforoamidato que los une en un esqueleto que lo hace resistente a las endonucleasas y se fija a las secuencias complementarias de los ARNm por apareamiento de bases inhibiendo la traducción del gen correspondiente. Se envió a la empresa GeneTools Inc. para el diseño del DNA antisentido, la secuencia de 100 pb río arriba a partir del codón de inicio del gen para la TcPMX y 100 pb río abajo de la secuencia obtenida en el análisis *in silico*. La secuencia de este oligo antisentido fue la siguiente: 5' TCACGGCCATACGACGAAACATGAC 3'. Adicionalmente como control negativo de transformación se utilizó una secuencia de DNA antisentido no específica (Random), dicha secuencia fue: 5' AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3' (Summerton y Weller 1997).

Reducción de la expresión de TcMPX

Para la inhibición de la TcMPX, se utilizaron dos estadios de la cepa Qro, la forma replicativa y la forma infectiva. Se utilizaron 40×10^6 parásitos y se les adicionó el morfolino a una concentración de 10 μM más 6 μL de Endoportor (Genetools Inc) en medio TAU 3AAG a 28 °C durante 48 h para la fase de tripomastigote, como control negativo se utilizó un morfolino random con las concentraciones descritas con anterioridad. Para el caso de epimastigotes, se hizo una cinética para determinar la concentración de inhibición, comenzando con 10, 20, 40 y 80 μM

durante 48 h, al término de los tratamientos se cosecharon los parásitos y se lavaron 2 veces con PBS a 800 x g por 10 min. Las pastillas obtenidas se almacenaron a -70 °C para la obtención de extractos totales o para los ensayos de susceptibilidad a estrés oxidante (San Francisco et al., 2017).

Obtención de extractos totales

Para la obtención de extractos totales, se utilizaron las pastillas almacenadas a -70 °C obtenidas de los cultivos de epimastigotes y de tripomastigotes modificados con el morfolino. Se agregó amortiguador de lisis (6% SDS, 10 mM Hepes) y se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después se agitaron en vortex a 3,000 rpm durante 30 s y posteriormente se hirvió la muestra en baño María a 96 °C durante 5 min. Por último, se dejó enfriar y se centrifugó durante 10 min a 10,000 x g a 4 °C para la recuperación del sobrenadante (Tesis de licenciatura Martínez-Espinosa 2007)

Análisis de proteínas por electroforesis vertical en geles de acrilamida (SDS-PAGE)

Las muestras tratadas se corrieron en SDS-PAGE en condiciones reductoras y desnaturalizantes en geles de 5 x 6 cm y 0.75 mm de grosor con gel concentrador de acrilamida 4% y gel separador 12%. Se cargaron 12 µg de proteína para los ensayos de expresión y de detección de proteínas carboniladas. Para cada muestra se agregó amortiguador de muestra (Tris 3%, glicerol 40%, SDS 4%, azul de bromofenol 2%, 2-β-mercaptoetanol 4%) se cargaron las muestras en los carriles de la cámara de electroforesis vertical Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories, Inc) en amortiguador de electroforesis (Tris base 3.03 g, 14.4 g glicina, 1.0 g SDS) durante 90 min a 110 V. Los geles control se tiñeron con colorante azul de Coomasie (Azul Coomasie R-250 0.05%, metanol 50%, ácido acético 10%) durante 20 min y desteñidos con solución desteñidora (metanol 50%, ácido acético 10%, agua destilada 40%) en agitación constante.

Western Blot

Una vez obtenidos los geles de la SDS-PAGE, se colocaron en casetes junto a una membrana de nitrocelulosa Amersham Protan (Cytiva Life Sciences) y se sumergieron en amortiguador de transferencia (Tris-base 0.03%, glicina 0.144%, metanol 20%) en una cámara de transferencia húmeda Mini Trans-blot (Bio-Rad Laboratories Inc) y se transfirieron a la nitrocelulosa a 400 mA durante 70 min. Para verificar la correcta transferencia de las proteínas, la membrana de tiñó con colorante Rojo Ponceau (Rojo Ponceau 0.1%, ácido acético 0.5%) durante 45 s. Finalmente la membrana se lavó con PBS-Tween (amortiguador de fosfatos pH 7.4, Tween 20 0.05%) por 5 min con agitación constante. Después, la membrana se incubó toda la noche con leche descremada al 10% a 4 °C en agitación constante. Para la detección de la expresión de TcMPX se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-PRX de ratón (B-11:SC-13722, Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:2000 durante 2 h a temperatura ambiente (TA) en las membranas previamente bloqueadas. Después se lavó la membrana con PBS-Tween 20% durante 5 min. Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo anti ratón unido a peroxidasa (HRP-IgG A-9044, Sigma-Aldrich) a una dilución 1:4000 durante 2 h a TA y después se lavaron con las condiciones descritas anteriormente. La membrana se reveló por luminiscencia basado en la reacción con Luminol del kit de detección Western blotting Amersham (Cytiva Lifescience) se sumergió la membrana en la solución de revelado durante 5 min y se visualizó en un fotodocumentador de geles Gel Logic 1500 Imaging System (Kodak, USA) con 20 exposiciones de 5 seg cada una. Como control de carga en tripomastigotes y epimastigotes se utilizó un anticuerpo anti- α -tubulina (SC-23948, SantaCruz Biotechnology) a una dilución 1:2000 durante 2 h a TA. El análisis densitométrico de la expresión relativa de TcMPX y tubulina fue realizado con el programa ImageJ. (Martínez, 2007).

Ensayos de susceptibilidad al estrés oxidativo

Para evaluar la susceptibilidad al estrés oxidativo de los parásitos

modificados con el morfolino anti TcMPX, parásitos con morfolino random y parásitos no modificados (30×10^6 parásitos), se incubaron con concentraciones de 80 y 160 μM de H_2O_2 en 1 mL de medio de incubación (5 mM KCl, 80 mM NaCl, 2 mM MgCl_2 , 16.2 mM Na_2HPO_4 , 3.8 mM NaH_2PO_4 , 50 mM glucosa, ajustado a pH 7.4 y 0.15% BSA) por 30 min a 28 °C. (Pérez-Morales 2013; Carnieri *et al.*, 1993). Pasado este tiempo los parásitos se lavaron tres veces con PBS y se centrifugaron a 800 $\times g$ para evaluar su morfología, viabilidad, detección de ROS, proteínas carboniladas y lípidos peroxidados, así como su potencialidad para infectar células *in vitro*.

Evaluación morfológica

El parámetro morfológico evaluado fue la presencia de formas modificadas de la morfología fusiforme y con flagelo habitual de los parásitos mediante tinción con Giemsa. Brevemente, se colocaron 2.5×10^5 parásitos en un volumen de 10 μL de PBS, este volumen se dejó secar al aire en un portaobjetos. Posteriormente, los parásitos se fijaron con metanol 100% por 5 min y se les agregaron 10 μL del colorante Wright-Giemsa (WG-32, Sigma-Aldrich) por 20 min. Al término de este tiempo, el portaobjetos se lavó con agua destilada a pH 7.0 por dos minutos para lograr el contraste. La muestra se analizó en un microscopio óptico y se contaron 100 parásitos al azar por campo para determinar las formas atípicas. Como forma atípica se definió a los parásitos que no presentaron la forma tradicional de tripomastigotes, es decir aquellas redondeadas sin flagelo o las que mostraban la parte posterior redondeada con flagelo largo o carente de él.

Ensayo de viabilidad

Para verificar la viabilidad de los parásitos modificados se realizó un ensayo de viabilidad con Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) donde se colocaron 1.5×10^6 parásitos en una placa de 96 pozos con H_2O_2 a dos diferentes concentraciones 80 y 160 μM como se mencionó anteriormente. Al término de esta incubación las células se cosecharon y se lavaron 3 veces con PBS

a 800 x g a 4 °C, Posteriormente, se adicionaron 60 µL de medio LIT y 12 µL de MTT y se incubaron por 4 h para permitir la formación de cristales de formazán. Se eliminó el sobrenadante y se añadieron 180 µL de isopropanol para disolver el formazán, finalmente se leyeron en un lector de placas a 570 nm (Muelas-Serrano *et al.*, 2000).

Detección de ROS

La detección de ROS se realizó con dicloroflorescein-diacetato (DCF-DA), el cual difunde a través de la célula y cuando entra en contacto con ROS se transforma en DCF que emite fluorescencia. Brevemente, 5×10^6 de tripomastigotes tratados con oligonucleótido anti-TcMPX (MPX), oligo random y parásitos no modificados (PNM) se incubaron con 80 y 160 µM de H₂O₂ durante 30 min a 28 °C, después los parásitos se lavaron dos veces con PBS y se centrifugaron a 800 x g durante 10 min a 4 °C. Posteriormente, se resuspendieron en 50 µM de DCF-DA en medio TAU-3AAG por 30 min a 28 °C. Después, las células se centrifugaron a 800 x g por 10 min a 25 °C y se lavaron dos veces con PBS para eliminar el DCF no incorporado (Rodríguez-Hernández 2020). Las muestras se leyeron en el flurómetro Biotek a 488 nm.

Detección de proteínas carboniladas

Para la detección de proteínas carboniladas mediante la derivatización de los grupos carbonilos y su unión a DNP después del estrés inducido por los tratamientos, se utilizó el kit Oxiblot (Merck S7150). Por cada ensayo, se utilizaron 12 µg de extracto total proteico de epimastigotes modificados y se mezclaron con 2,4 *dinitro-fenilhidrazina* (DNPH), el cual se une a los grupos carbonilos, en una proporción volumen-volumen de 1:1. Después de 15 minutos de incubación, se adicionó la solución neutralizante en una proporción 1:0.7 de acuerdo con las indicaciones del proveedor. Estos extractos se sometieron a SDS-PAGE con acrilamida al 12% y transferidos a una membrana de nitrocelulosa como se

mencionó anteriormente. Para la detección de las proteínas carboniladas se utilizó el anticuerpo de ratón anti-DNP 1:400 como anticuerpo secundario se empleó un anticuerpo de cabra anti-ratón conjugado a HRP todos provenientes del kit Oxiblot y se reveló utilizando Luminol durante 5 min con las condiciones previamente descritas (Shahi *et al.* 2016).

Detección de lípidos peroxidados

Para la detección de lipoperoxidación en lisados de tripomastigotes modificados y no modificados genéticamente tratados con H₂O₂ se utilizó el kit OxiSelect™ TBARS (STA-330, Cell Biolabs, Inc. San Diego, CA, EEUU). Brevemente, las muestras de parásitos incubados con 80 y 160 μM de H₂O₂ se mezclaron con solución de lisis y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. A continuación, las muestras se hicieron reaccionar con ácido tiobarbitúrico (TBA) a 95 °C durante 60 min. Posteriormente, las muestras se enfriaron en hielo durante 5 min, después se centrifugaron a 800 x g durante 15 min. El sobrenadante se recogió y se colocó en placas de 96 pozos en un volumen de 50 μL por duplicado y se midió en un espectrofotómetro Sinergy Biotek a 532 nm.

Ensayo de resistencia a fármacos (Benznidazol y Tioestrepton)

Se incubaron 5x10⁵ tripomastigotes metacíclicos en medio TAU 3AGG con Bz (N-bencil-2-nitro-1-imidazolacetamida; Roche, Suiza) en dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma, EE. UU.), y se realizaron diluciones seriadas que oscilaron entre 3 y 100 μM de Bz en los cultivos. Se incluyeron controles con DMSO (sulfóxido de dimetilo 0.05% v/v) en todos los experimentos. Los parásitos se cultivaron en placa de 96 pozos en un volumen de 100 μL y se incubaron a 28 °C durante 48, 72 y 96 h. Se realizaron tres experimentos independientes para cada tratamiento y se evaluaron los parámetros de movilidad, crecimiento y presencia de formas atípicas en cámara de Neubauer.

Para evaluar el efecto de Tioestreptón (TS), se sembraron 2×10^6 epimastigotes en placas de 96 pozos en un volumen de 200 μ l incubados a 28 °C en presencia o ausencia de varias concentraciones de TS (1–40 μ M) durante 24 y 48 h. Se incluyeron Bz (25 μ M) o vehículo DMSO al 0,5 % como controles positivo y negativo, respectivamente. Luego, se contó el número de parásitos en el cultivo en cámara de Neubauer para evaluar el crecimiento. Cada condición se evaluó por duplicado en tres ensayos independientes.

Por último, para evaluar el efecto sinérgico de TS y BZ, primero, se calculó la IC_{50} de BZ en tripomastigotes derivados de cultivo; posteriormente se incubaron los parásitos con varias concentraciones de BZ (0.39–50 μ M) durante 24 h. La IC_{50} se calculó como 0.96 ± 0.04 . La Bz IC_{50} se utilizó para ensayos de sinergia con TS. Se sembraron tripomastigotes derivados de células (2×10^5) en placas de 96 pozos en un volumen de 100 μ L y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO_2 en presencia o ausencia de diferentes concentraciones de TS (1,25–10 μ M) y BZ a 1,0 μ M durante 24 h.

Ensayo de infección en células Vero

Se obtuvieron células Vero cultivadas en medio DMEM (GIBCO, Cat.12100-046) suplementado con 10% de SFB y mantenidas a 37 °C, 90 % de humedad y 5 % de CO_2 . Las células se recolectaron al tercer día, retirando el sobrenadante de los cultivos y añadiendo 4 mL de EDTA 5 mM por 5 minutos a TA y posteriormente 1 ml de tripsina a 1mg/mL por 3 minutos a 37 °C para despegar las células. Se ajustó el número celular a 3000 células, que se resuspendieron en un volumen de 30 μ L y se transfirieron a laminillas de 21 pozos y se cultivaron en medio DMEM suplementado con 10 % de SFB por 12 h a 37 °C, 90 % de humedad y 5 % de CO_2 para permitir la adhesión celular. Transcurrido este tiempo, las células se incubaron con tripomastigotes metacíclicos modificados y no modificados en una relación 10:1 y 20:1 parásito-célula durante 6 h en las condiciones antes mencionadas. (López-Olmos *et al.*, 1998)

Después de permitir la infección en células Vero, a las laminillas se les retiró el medio de cultivo y se agregaron 15 μ L de metanol 100% y se permitió secar por 5 min. Se rehidrató la laminilla con 25 μ L de PBS, se agregaron 10 μ L de colorante DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) a 50 mM en oscuridad durante 20 minutos, y posteriormente se lavó dos veces con PBS. Se retiró el exceso de PBS y se colocaron unas gotas de solución de montaje (1:1 de PBS y Glicerol con 0.0125% de azida de sodio) y se sellaron las laminillas con esmalte de fijado rápido. Estas laminillas se observaron en un microscopio de fluorescencia Olympus IX 71 en el filtro de 485 nm. Se contabilizaron 100 células en tres campos diferentes y se evaluó el número de células infectadas y número de amastigotes por célula.

Tabla 2. Secuencias de peroxirredoxinas mitocondriales de diferentes especies

Familia	Especie	Nombre	GenBank		
Tripanosoma	<i>Trypanosoma cruzi</i>	Cuti1 mitochondrial peroxidase	AIB07569.1		
		X10c1 mitochondrial peroxidase	AIB07568.1		
		Sp104c1 mitochondrial peroxidase	AIB07570.1		
		P209c193 mitochondrial peroxidase	AIB07571.1		
		OPS21c11 mitochondrial peroxidase	AIB07572.1		
		92101601Pc1 mitochondrial peroxidase	AIB07573.1		
		Can11c1 mitochondrial peroxidase	AIB07574.1		
		DogTheis mitochondrial peroxidase	AIB07576.1		
		Tu18c193 mitochondrial peroxidase	AIB07577.1		
		CBBc13 mitochondrial peroxidase	AIB07578.1		
		Masc1 mitochondrial peroxidase	AIB07579.1		
		Esmc13 mitochondrial peroxidase	AIB07581.1		
		M5631c15 mitochondrial peroxidase	AIB07582.1		
		M6241c16 mitochondrial peroxidase	AIB07583.1		
		CM17 mitochondrial peroxidase	AIB07584.1		
		X109/2 mitochondrial peroxidase	AIB07585.1		
		CL Brener mitochondrial peroxidase	AIB07590.1		
		P63c1 mitochondrial peroxidase	AIB07591.1		
		Tulahuen c12 mitochondrial peroxidase	AIB07592.1		
		Mpx gene encoding mitochondrial peroxiredoxin	CAA06923.1		
		TCC 1994 mitochondrial peroxidase	AKT44559.1		
		92122102R mitochondrial peroxidase	AIB07575.1		
		IVVc14 mitochondrial peroxidase	AIB07580.1		
		Sc43c1 mitochondrial peroxidase	AIB07589.1		
		SO3c15 mitochondrial peroxidase	AIB07588.1		
		Bug2148c1 mitochondrial peroxidase	AIB07587.1		
		MNc12 mitochondrial peroxidase	AIB07586.1		
		Marinkellei isolate TCC 344 mitochondrial peroxidase	AKT44560		
		Qro mitochondrial peroxidase	QKE53461.1		
		Ninoa mitochondrial peroxidase	QKE53460.1		
			<i>Trypanosoma rangeli</i>	SC58 Cont6481 mitochondrial peroxidase	ESL05855.1
			<i>Trypanosoma conorhini</i>	Mitochondrial tryparedoxin peroxidase trypanosomatid typical 2-Cys peroxiredoxin	RNF02014.1
			<i>Angonomas deanei</i>	Mitochondrial tryparedoxin peroxidase trypanosomatid typical 2-Cys peroxiredoxin	EPY42814.1
	<i>Strigomonas culicis</i>	Mitochondrial tryparedoxin peroxidase trypanosomatid typical 2-Cys peroxiredoxin	EPY22216.1		
Leishmania	<i>Leishmania amazonensis</i>	Mitochondrial tryparedoxin peroxidase	AAX47429.1		
		Mitochondrial peroxidase	AYV64378.1.		
		Mitochondrial peroxiredoxin	AAX73294.1		
Plasmodium	<i>Plasmodium falciparum</i>	Chain B structure of the mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin	pdb 2COD B		
		Chain A structure of the mitochondrial 2-Cys peroxiredoxin	pdb 2COD A		
Candida	<i>Candida albicans</i>	Mitochondrial peroxiredoxin	EEQ47073.1		
Homo	<i>Homo sapiens</i>	Peroxisredoxin 1 (PRDX1)	ABB84465.1		
		Peroxisredoxin 2 (PRDX2)	ABB02182.1		
		Peroxisredoxin 3 (PRDX3)	ABB84468.1		
		Peroxisredoxin 4 (PRDX4)	sp Q13162		
		Peroxisredoxin 5 (PRDX5)	ABB05181.1		

Resultados

Secuencia de la peroxirredoxina mitocondrial de T. cruzi cepa Qro y Ninoa

El gen de la triparredoxina peroxidasa mitocondrial de la cepa Qro tiene una extensión de 681 pares de bases, codifica a la proteína TcMPX de 226 aa, tiene un peso molecular de 25.5 kDa, un punto isoeléctrico de 7.65 y una carga eléctrica neta de 2. La secuencia se depositó en el Genbank con número de acceso MN451715.1 (Arroyo Olarte, 2020).

TcMPX es una proteína altamente conservada en T. cruzi.

Se realizó la comparación de 31 secuencias de Px mitocondriales pertenecientes a diferentes DTU's de *T. cruzi* con otras Px mitocondriales presentes en otros protistas así como con una Px de un grupo externo (homínidos) (Tabla 2) con la finalidad de determinar el grado de similitud entre ellas. Se realizó la construcción de un árbol filogenético por el método Neighbor-Joining (NJ), el cual agrupó las secuencias en tres grandes clados correspondientes a tripanosomátidos, otros protistas y humano. La secuencia de TcMPX Qro se agrupó con las otras secuencias de Px mitocondriales de *T. cruzi*. Esto muestra que todas las Px mitocondriales presentan una alta homología entre las diferentes cepas y que difieren con otros tripanosomátidos y de otras especies (Figura 10). Se comprobó la similitud de todas las secuencias de TcMPX en Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y se obtuvo un porcentaje de identidad entre el 98 y el 100%. Entre Qro y Ninoa (una cepa mexicana del mismo genotipo) el porcentaje de identidad fue de 100%, lo que confirmó lo mostrado por el análisis NJ.

Las similitudes en las secuencias de PRX de tripanosomatidos y humanos, se analizaron en el programa ClustalW, se identificaron residuos conservados, semiconservados o no conservados (Figura 11). Se seleccionaron secuencias representativas a los 6 DTU del parásito, con énfasis en las TcMPX Qro y se compararon con la PRX3 humana, ya que se ha reportado que esta peroxirredoxina cumple la función de proteger a la mitocondria en las células humanas.

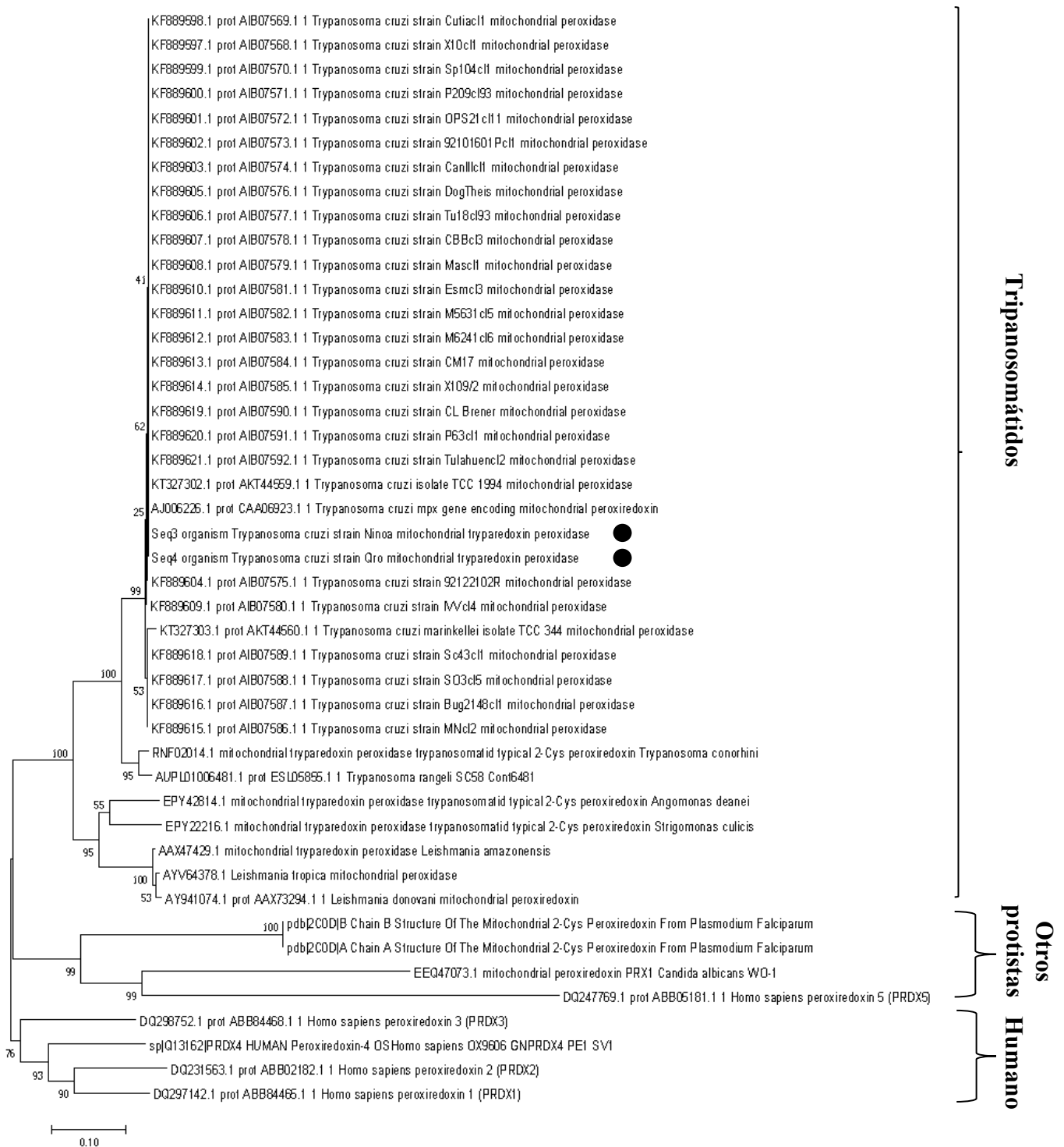


Figura 10. Análisis de secuencias de peroxidases mitocondriales mediante el método de Neighbor joining. El alineamiento y análisis se realizaron con un bootstrap de 10,000 y las distancias se analizaron con el método de *p*-distance. El análisis involucró 65 secuencias de aminoácidos. Todas las posiciones con menos del 95% de cobertura del sitio se eliminaron. Las secuencias se agruparon en 3 clados correspondientes a tripanosomátidos otros protistas y humanas. Las cepas mexicanas Qro y Ninoa se agruparon en el clado de tripanosomátidos (círculos negros).

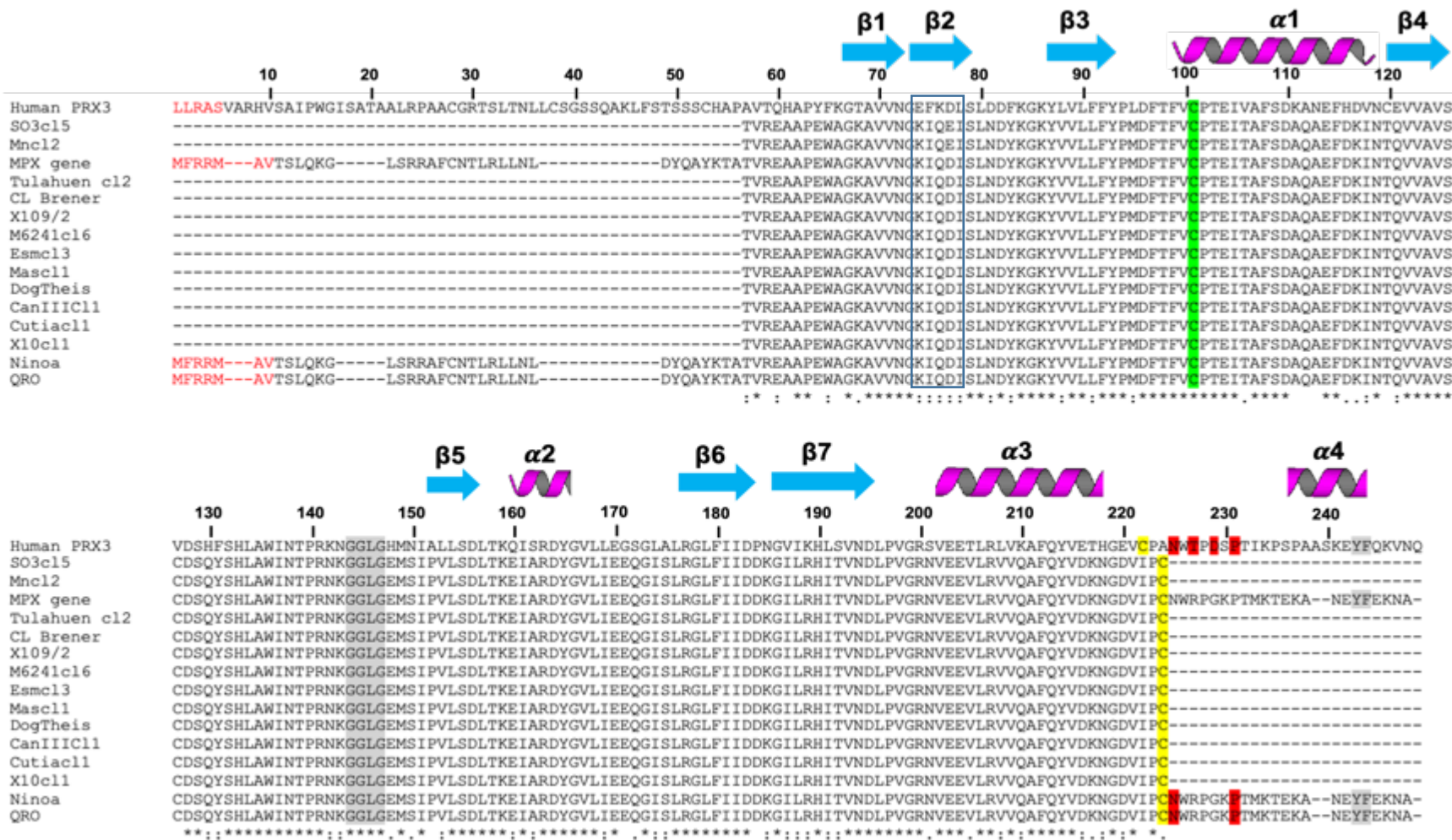


Figura 11. Análisis de secuencias de peroxirredoxinas mitocondriales de *T. cruzi* y *Homo sapiens*. Se alinearon 15 secuencias de TcMPX de diferentes fondos genéticos con la PRX3 humana con una extensión de 226 aminoácidos. Las letras rojas marcan la secuencia del péptido señal para mitocondria. Los sombreados verde y amarillo corresponden a las cisteínas C_p y C_R respectivamente. Las áreas sombreadas con gris y con rojo señalan los motivos asociados a susceptibilidad y resistencia al estrés oxidante. Las flechas color cian muestran las estructuras β -lamina y el magenta las α -hélice. La caja azul en la secuencia indica el motivo más extenso de aminoácidos semiconservados. (*)= sitios conservados, (:)= semiconservados, (.)= sitios menos conservados, () = diferente aminoácido.

El análisis mostró que las secuencias de TcMPX tienen entre ellas un promedio de porcentaje de identidad de 98%, mientras que la identidad con respecto a la PRX3 fue de 64%. La secuencia de aa posee un motivo de direccionamiento a la mitocondria con un valor de $0.1 \geq 0.083$. Dentro de la secuencia se encontraron mayoritariamente regiones conservadas, la región más grande con diferencias semiconservadas corresponde a la región KIQEI en 4 cepas de *T. cruzi* y KIQDI en los restantes, mientras que en PRX3 humana estos aminoácidos se sustituyen por EFKDL (Figura 11).

Adicionalmente se realizaron modelos moleculares de la TcMPX Qro y la PRX3 para identificar regiones diferenciales, cambios conformacionales o diferencias en los sitios catalíticos. Esto con la finalidad de proponer a TcMPX como posible blanco terapéutico, ya sea de fármacos, oligos antisentido o métodos de inhibición de proteínas o genes. En los modelos obtenidos se observa que TcMPX Qro y PRX3 están conformadas por 7 láminas β paralelas y antiparalelas, ambas poseen 5 α -hélices. Ambos modelos corresponden al modelo reportado previamente para triparredoxinas (Figura 12A). La región KIQEI/KIQDI en *T. cruzi*, (que en el humano la región corresponde a EFKDL) se ubica en una de las láminas β en ambos modelos y cuando se sobreponen ambas estructuras, el 90% de la estructura es idéntica (Figura 12B), difiriendo en el extremo N-terminal. Esto resulta importante ya que el método de inhibición utilizado para reducir la expresión de la PRX mitocondrial de la cepa Qro (oligo antisentido), se une complementariamente a las bases iniciales del ARNm que codifica para la proteína de la TcMPX, realizando un impedimento estérico y bloqueando así la traducción del transcrito e inhibiendo la expresión de la proteína. Estas diferencias en el extremo N-terminal podrían no afectar la expresión de alguna PRX humana que conlleve a una patología derivada de la posible inhibición. Esta secuencia corresponde a TVREAPEWAGK mientras que en *H. sapiens* es AVTQHAPYFKGT. Las secuencias presentan aminoácidos diferentes que no son semiconservados, ni de la misma familia. Ambos modelos mostraron que los sitios catalíticos correspondientes a las C_P y la C_R son altamente conservados en las dos moléculas.

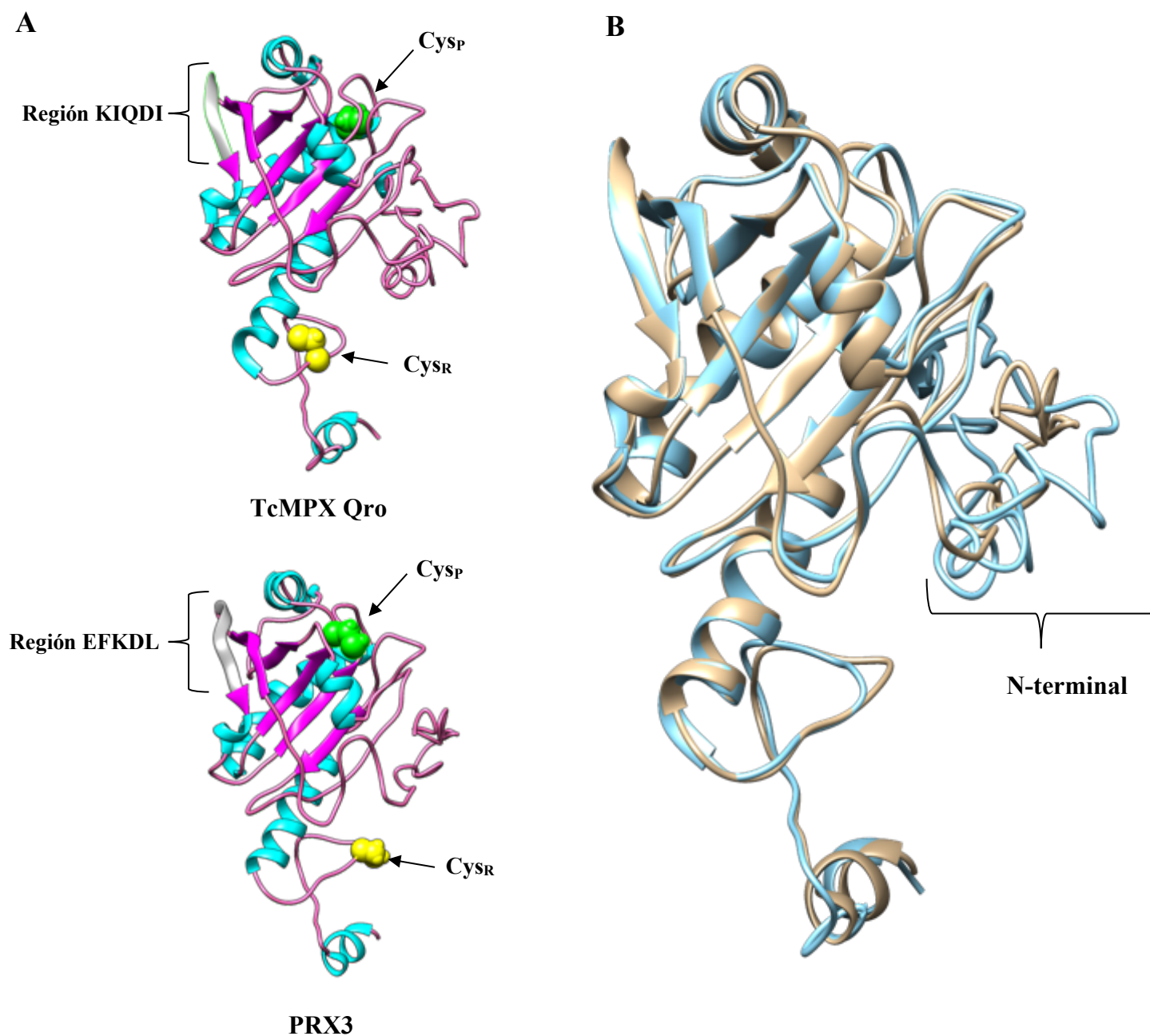


Figura 12. Comparación de modelos de la TcMPX Qro y la PRX3 humana. **A.** Modelo molecular de peroxirredoxinas *TcMPX* y *PRX3*. Se muestran los modelos tridimensionales para ambas peroxirredoxinas diseñadas en I-Tasser. En cian se muestran las hélices y en magenta las láminas. Las cisteínas con actividad catalítica (Cys-peroxidáticas y Cys-resolutivas) se muestran en amarillo y verde respectivamente. Además se señala la lámina β que corresponde en ambos casos a la región de 5 aa diferentes (KIQDI/EFKDL). **B.** *Sobreposición de ambos modelos.* Se muestra la comparación de los modelos moleculares de TcMPX Qro (azul) y PRX3 (dorado) realizado con el programa Chimera y contrastando la región N-terminal.

TcMPX es reconocida por un anticuerpo anti-PRX humano

Comparamos el epítipo PRX humano específico ubicado entre los aminoácidos 123-161, que es reconocido por el anticuerpo α -PRX B-11, con las secuencias de MPXQro y PRX3. Ambas comparten una homología de 76% y 68% respectivamente, con la secuencia reconocida por el anticuerpo α -PRX B-11, (Figura 13A). Finalmente, se corroboró la similitud entre PRX3 humano y la TcMPX Qro mediante el uso de un anticuerpo comercial en un WB (Figura 13B), en este se detectó la presencia de una proteína con un peso de 25 kDa, que corresponde a la TcMPX en su forma monomérica, por lo cual se utilizó este anticuerpo en los ensayos de comprobación de la reducción de la expresión de la TcPRX.

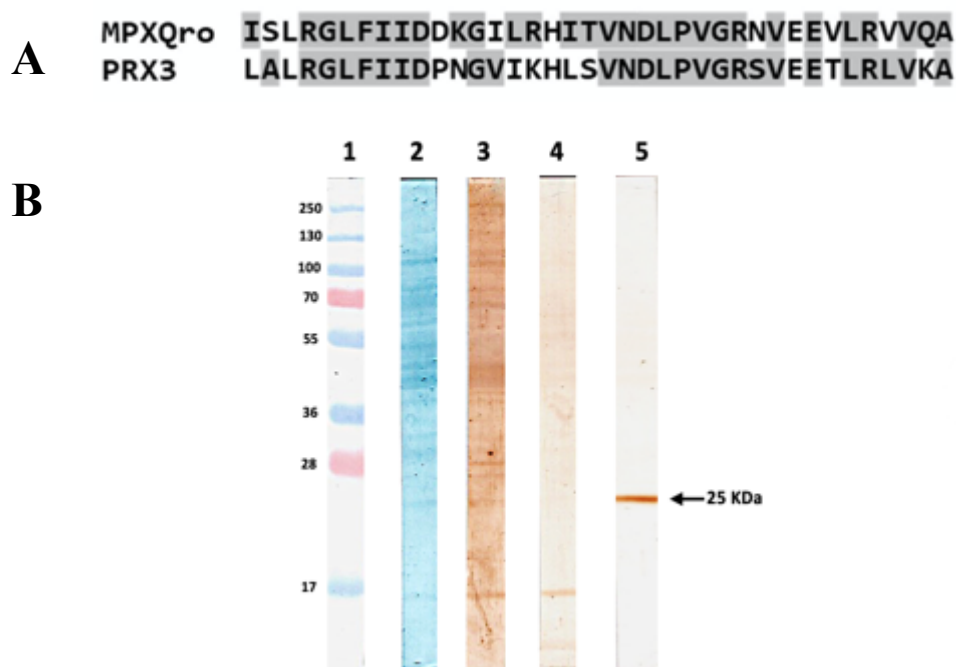


Figura 13. Reconocimiento de MPXQro por el anticuerpo anti-PRX3 humano. (A) Las secuencias de aminoácidos reconocidas por el anticuerpo monoclonal α -PRX B-11 sc-137222 tanto en MPXQro como en PRX3 están sombreadas (panel superior). (B) El panel inferior muestra el Western blot que se realizó como se indica en materiales y métodos. Western blot: marcador de proteína de peso molecular en kDa (carril 1), extracto de proteína total de *T. cruzi* transferido y teñido con colorante negro amido (carril 2), reconocimiento del extracto de proteínas totales por suero anti *T. cruzi* (carril 3), suero de ratón de control negativo (carril 4), y el reconocimiento de MPXQro por el anticuerpo α -PRX B-11 SC-137222 (carril 5).

Reducción de la expresión de la TcMPX

Para reducir la expresión de TcMPX se utilizó un oligo antisentido comercial denominado Morfolino. Para el diseño del morfolino se utilizaron 100 pb rio arriba y 100 pb rio abajo tomando como referencia el codón de inicio de la secuencia correspondiente al gen de TcMPX. El morfolino obtenido fue el siguiente: 5' TCACGGCCATACGACGAAACATGAC 3'. Se realizó un BLAST para verificar la complementariedad en las secuencias Px encontrando 96 al 100% de complementariedad del total de secuencias analizadas de las cepas de *T. cruzi*. Para reducir la expresión de MPX se utilizaron varias concentraciones de morfolino. En tripomastigotes, las dosis de 5 μ M y 10 μ M redujeron en un 50% la expresión de esta Px (Figura 14A), mientras que con las concentraciones de 15 y 20 μ M no se observó inhibición.

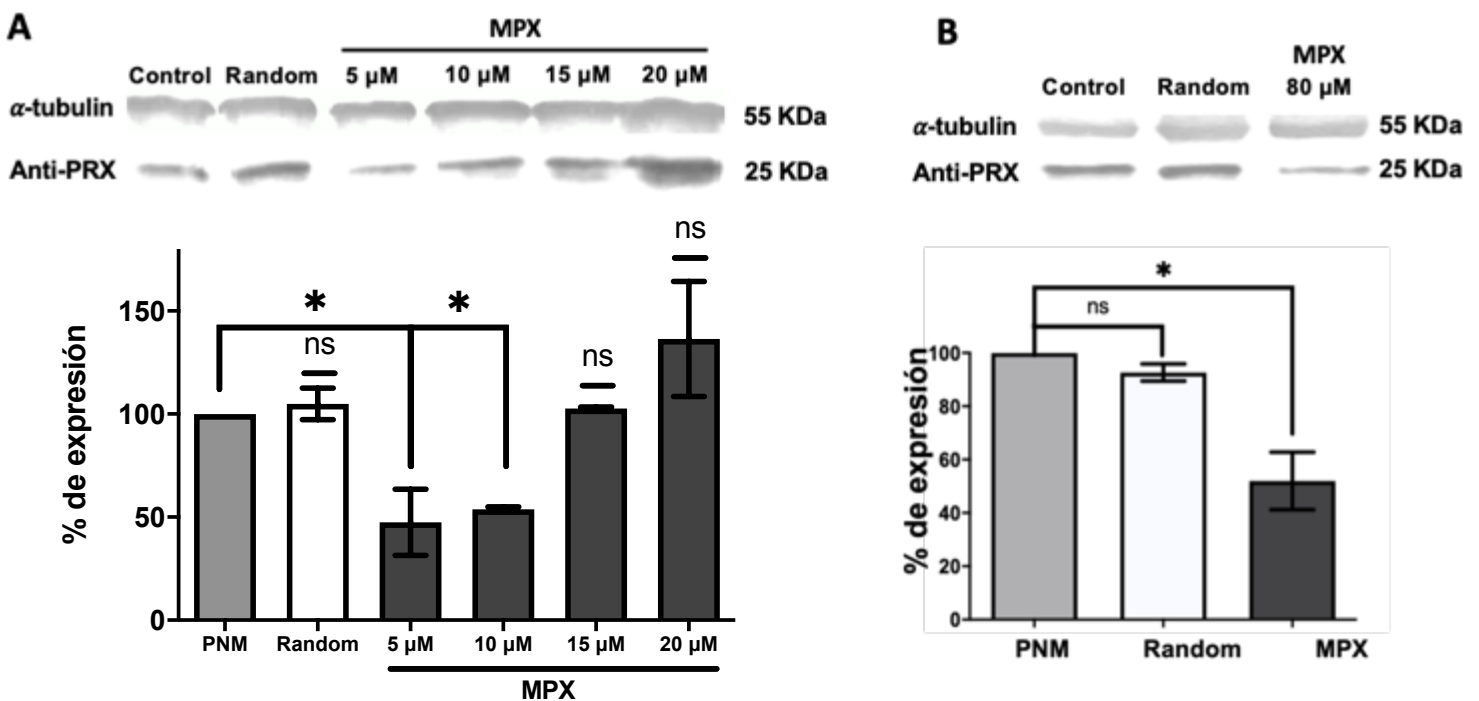


Figura 14. Reducción de la expresión de TcMPX en *T. cruzi*. A. Reducción en tripomastigotes con diferentes concentraciones de morfolino anti-MPX, como control de carga se utilizó α -tubulina. Se muestra el WB de los extractos proteicos cuando se incuban con anticuerpos anti-PRX y anti-tubulina como control de carga. Las gráficas muestran los datos obtenidos de 3 experimentos independientes. B. Reducción en epimastigotes con la concentración final de morfolino a 80 μ M, se muestra el WB de los extractos proteicos cuando se incuban con anticuerpos anti-PRX y anti-tubulina como control de carga. Las gráficas muestran los datos obtenidos de 3 experimentos independientes con una n=3 y comparados con parásitos no modificados (PNM). El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad 8.0 ANOVA dos vías, Bonferroni test. No significativo: ns, *P<0.005

En los epimastigotes se observó que la concentración de 10 μM no reducía la expresión de esta proteína al igual que en tripomastigotes, por lo que se incrementó la concentración de morfolino hasta 80 μM . Con esta última concentración se logró la reducción de la expresión de TcMPX en un 55% (Figura 14B). La expresión de la proteína se analizó con el anticuerpo PRX B11 y se empleó el anticuerpo α -tubulina como control de carga para ambos estadios. Al ser el tripomastigote la forma infectiva del parásito, que utiliza TcMPX como factor de virulencia y que existe una mayor concentración de esta Px en este estadio, todos los ensayos posteriores se realizaron con la forma tripomastigote del parásito.

La reducción de TcMPX hace más sensible a T. cruzi contra el estrés oxidante

Una vez obtenida la reducción de la expresión de TcMPX, se estudió la sensibilidad del parásito al H_2O_2 como agente oxidante en tripomastigotes ya que se ha reportado que esta peroxirredoxina lo utiliza como sustrato. Los cambios morfológicos se contabilizaron mediante la detección de formas atípicas o con algún grado de alteración morfológica. Después de tres experimentos independientes de tratamiento con 80 μM y 160 μM de H_2O_2 , se observó que los parásitos no tratados con el morfolino (al cual no referiremos como PNM) presentaron menos del 30% de tripomastigotes con forma atípica para ambas concentraciones de peróxido. Algo similar se observó con los parásitos tratados con morfolinos random (Random) quienes presentaron el mismo porcentaje de formas atípicas en estas concentraciones, por lo que no se observaron diferencias significativas entre estos tratamientos.

Los parásitos disminuidos en su expresión de peroxirredoxina (MPX) se volvieron más sensibles al estrés oxidativo en ambas concentraciones de H_2O_2 , se presentó aumento del 36% en formas atípicas (parásitos redondeados o con pérdida de flagelo) con 80 μM lo que fue estadísticamente significativo respecto a los PNM, mientras que se obtiene hasta un 70% en las formas redondeadas para la concentración más alta cuando se comparó con los PNM y los Random. Estos

resultados indicaron una pérdida de la arquitectura típica en los parásitos que presentaban una reducción parcial de MPX con una mayor sensibilidad hacia el peróxido, lo que fue más evidente a la concentración de 160 μM de H_2O_2 (Figura 15).

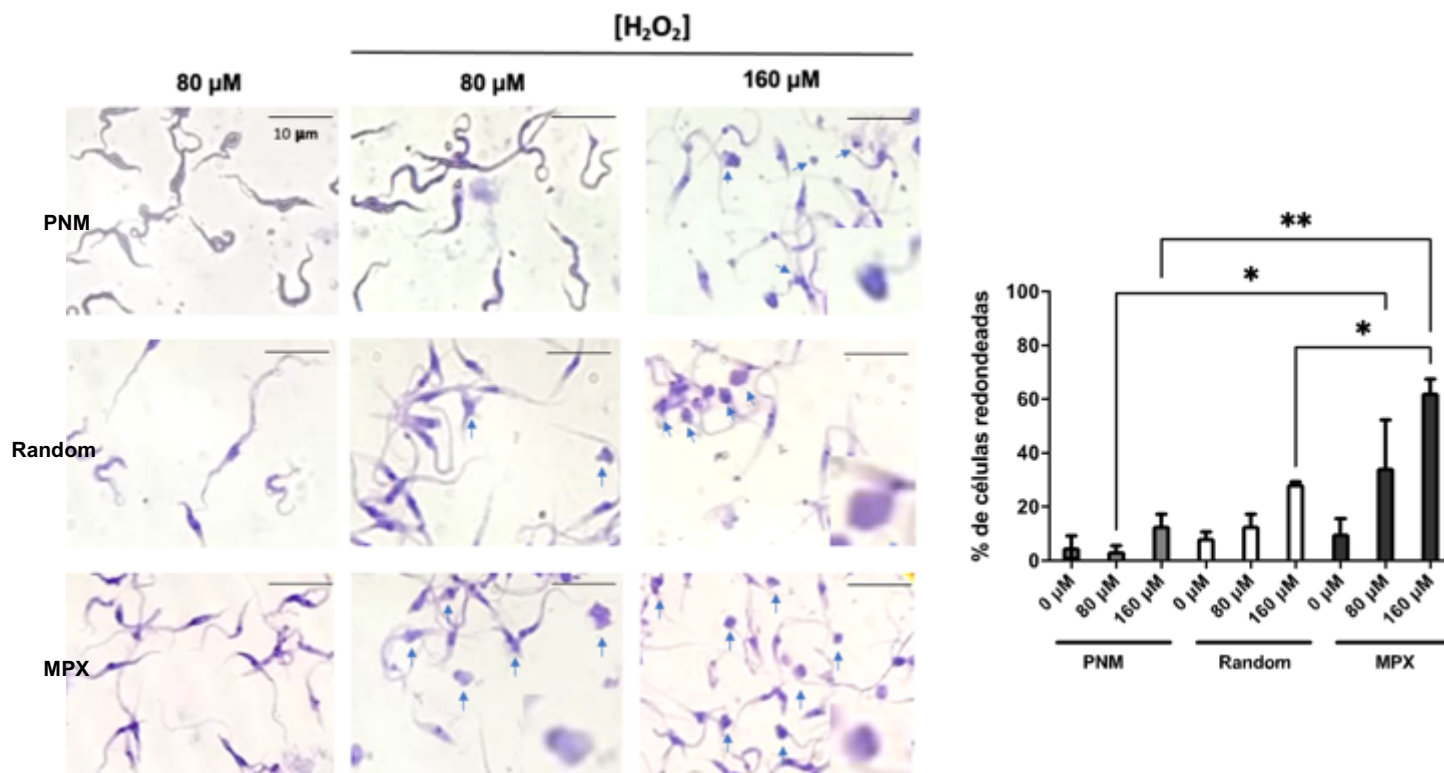


Figura 15. Cambios morfológicos en *T. cruzi* modificados por estrés oxidante. Se trataron a tripomastigotes metacíclicos con dos diferentes concentraciones de H_2O_2 : 80 y 160 μM . Se tiñeron las muestras con Giemsa y se contabilizaron 100 parásitos por cada tratamiento y por triplicado para determinar el porcentaje de células redondeadas en parásitos no modificados (PNM) con oligo Random (Random) y con expresión disminuida de TcMPX (MPX). El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad 8.0 ANOVA dos vías, Bonferroni test. * $P < 0.01$, ** $P < 0.005$.

La reducción de TcMPX modifica la actividad enzimática de T. cruzi

La determinación de la actividad enzimática se realizó mediante el ensayo con MTT. Este compuesto es reducido por esterasas mitocondriales, y por lo tanto

puede indicar modificaciones en la actividad de estas enzimas. Al utilizar peróxido como inductor de estrés observamos que la actividad enzimática de los PNM no disminuye significativamente a las concentraciones 80 μM y 160 μM de H_2O_2 , en los parásitos Random, tampoco se encuentran diferencias significativas con ninguno de los tratamientos con respecto a los PNM. En los parásitos MPX no se observaron cambios con la concentración de 80 μM , mientras que a la concentración de 160 μM se observó una disminución en la actividad enzimática de 45%, comparado con los parásitos MPX que no recibieron tratamiento y diferencias significativas a la misma concentración de peróxido con los parásitos Random y PNM (Figura 16). Este resultado podría indicar que en el parásito se disminuye la actividad enzimática por el efecto en la reducción de la expresión de la peroxirredoxina, al no ser capaz de contender con la presencia de peróxido y la aparición de nuevas especies reactivas de oxígeno.

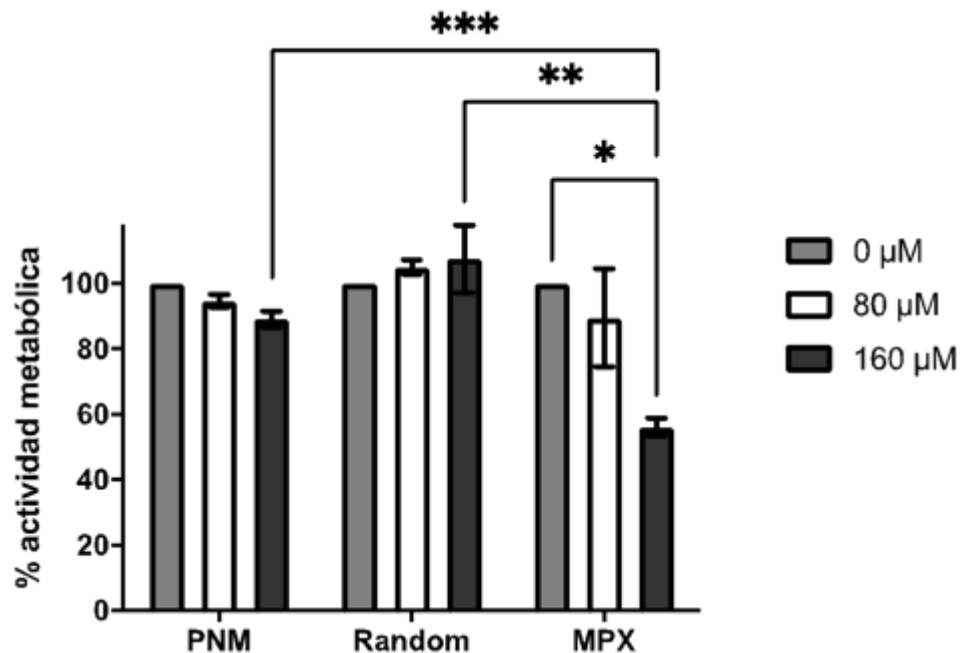


Figura 16. Ensayo de MTT con parásitos modificados en la expresión de *TcMPX*. Se evaluó la actividad metabólica de los parásitos PNM, Random y MPX para determinar su susceptibilidad después del estrés oxidante con 80 y 160 M de H_2O_2 . El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad 8.0 ANOVA dos vías, Bonferroni test. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.05$, * $P < 0.01$.

La reducción de TcMPX aumenta la producción de ROS

Tras el tratamiento con peróxido se analizó la producción de ROS. En los PNM no se encontraron diferencias significativas en la producción de ROS en las concentraciones de 80 μM y 160 μM de H_2O_2 , comparados con aquellos que no recibieron tratamiento. En los parásitos Random, tampoco se observaron diferencias entre ambos tratamientos y con respecto a la PNM. En contraste, se encontró que aquellos parásitos que tienen una expresión reducida de MPX producen el doble de ROS que los parásitos control a 80 y 160 μM de H_2O_2 , y entre ambas concentraciones no hubo diferencias significativas (Figura 17).

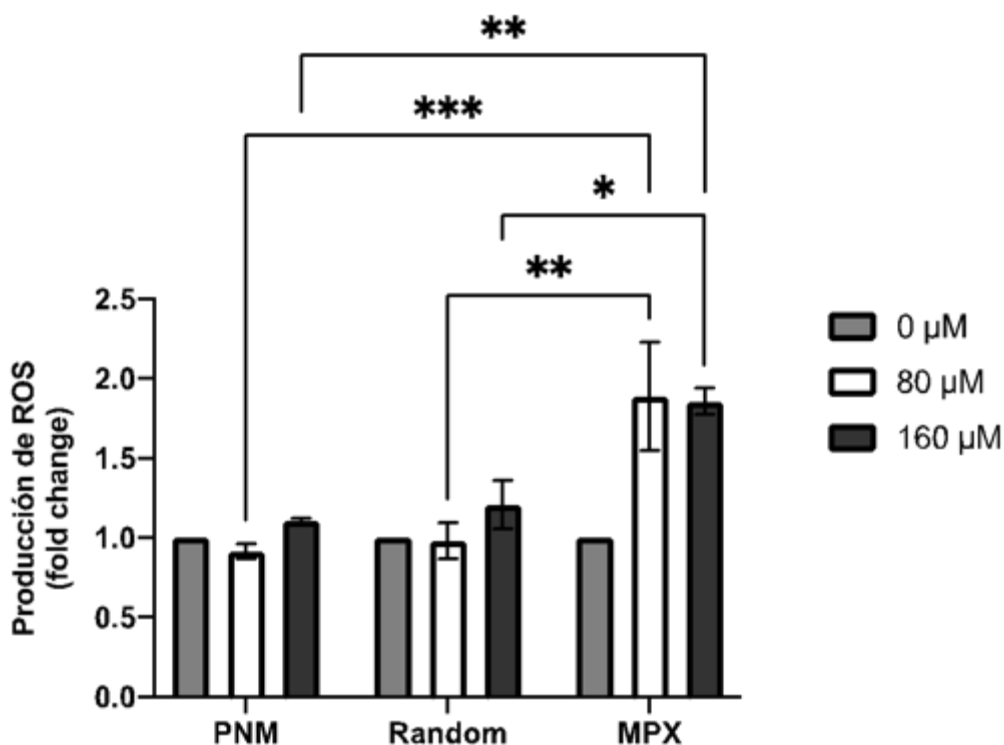


Figura 17. Ensayo de detección de ROS de parásitos modificados con morfolino. Determinación de ROS con DCF-DA para verificar la producción de ROS después del estrés oxidante con 80 y 160 M de H_2O_2 por fluorimetría. Parásitos no modificados (PNM), parásitos tratados con morfolino random (Random) y parásitos modificados en su expresión de peroxirredoxina (MPX). El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad 8.0 ANOVA dos vías, Bonferroni test. *** $P < 0.001$, ** $P < 0.05$, * $P < 0.01$.

La reducción de TcMPX aumenta la carbonilación de proteínas

Derivado del aumento de ROS bajo estrés oxidante de los parásitos modificados, se evaluó la carbonilación de proteínas, ya que este proceso implica oxidación severa y representa un indicador de estrés oxidante y de daño celular. Estos cambios en la expresión de carbonilos se cuantificaron mediante densitometría de las proteínas carboniladas con respecto al grupo control sin estrés (expresión relativa) con el software ImageJ. En los PNM no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones. En los parásitos Random tampoco se encontraron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones ni con los parásitos PNM. En los parásitos MPX, no se encontraron diferencias con respecto a los PNM y Random; sin embargo, si se observó cambio en la expresión relativa de la carbonilación de proteínas con la concentración de 160 μM con respecto a parásitos sin H_2O_2 en los parásitos MPX con aumento de 1.56 ± 0.28 (Figura 18).

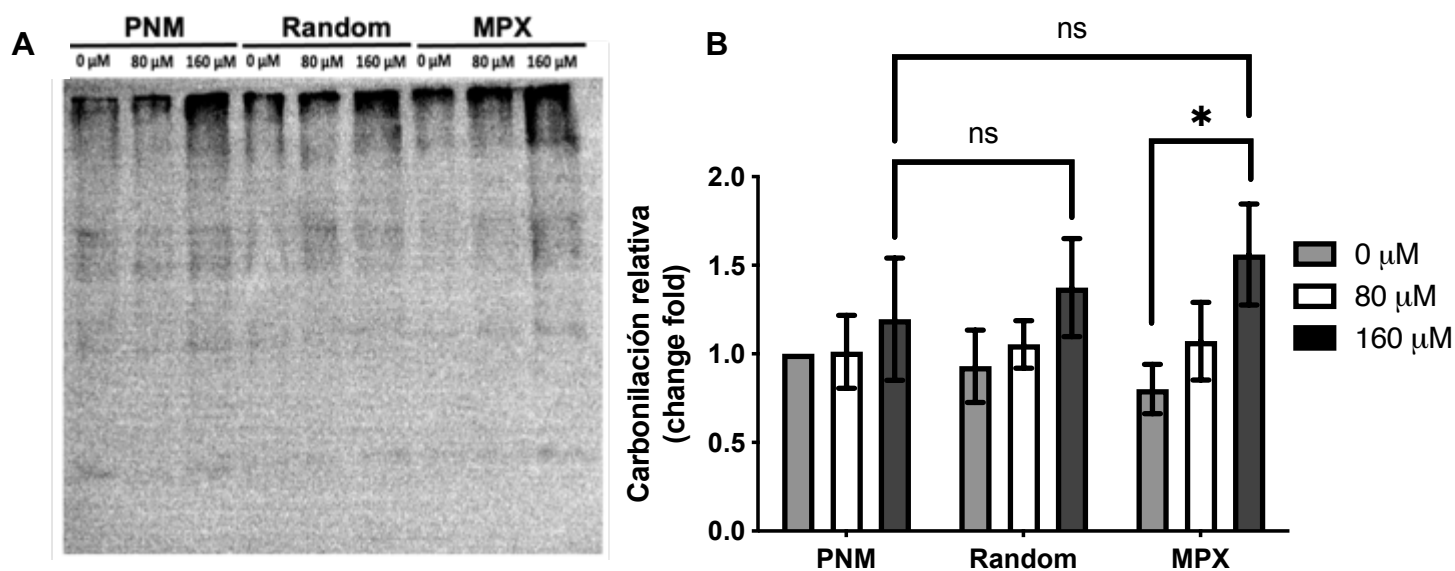


Figura 18. Ensayo de carbonilación en parásitos modificados con morfolino. **A.** Determinación de carbonilos con DNP para verificar carbonilación de proteínas después de incubar con 80 y 160 μM de H_2O_2 durante 30 min y revelados por luminiscencia. **B.** Expresión relativa de carbonilos en parásitos PNM, Random y MPX. Se muestra la gráfica de tres experimentos independientes con una $n=3$. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad 8.0 ANOVA dos vías, Bonferroni test. * $P < 0.05$

La reducción de TcMPX aumenta la lipoperoxidación

Uno de los daños que genera la sobreproducción de ROS es la peroxidación de los lípidos de membrana, uno de los productos generados es el malondialdehído (MDA), el cual forma aductos con el ácido tiobarbitúrico (TBA) (Armstrong *et al.*, 1998). Una mayor cantidad de MDA sugiere un incremento de lípidos peroxidados. Cuando se incubaron los parásitos PNM con las diferentes concentraciones de H₂O₂ no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje lipoperoxidación con una ligera tendencia al alza en la concentración de 160 μM. En los parásitos Random no se detectaron diferencias significativas en la peroxidación de lípidos con respecto a los PNM, pero si entre 160 μM y 0 μM. Nuestros resultados indicaron que cuando se reduce la expresión de TcMPX se induce estrés oxidante a la concentración de 160 μM de H₂O₂ y se observó un aumento significativo en el porcentaje de lipoperoxidación de 48% con relación a los parásitos MPX no tratados (100%). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de lipoperoxidación de los parásitos MPX con respecto a los PNM (Figura 19).

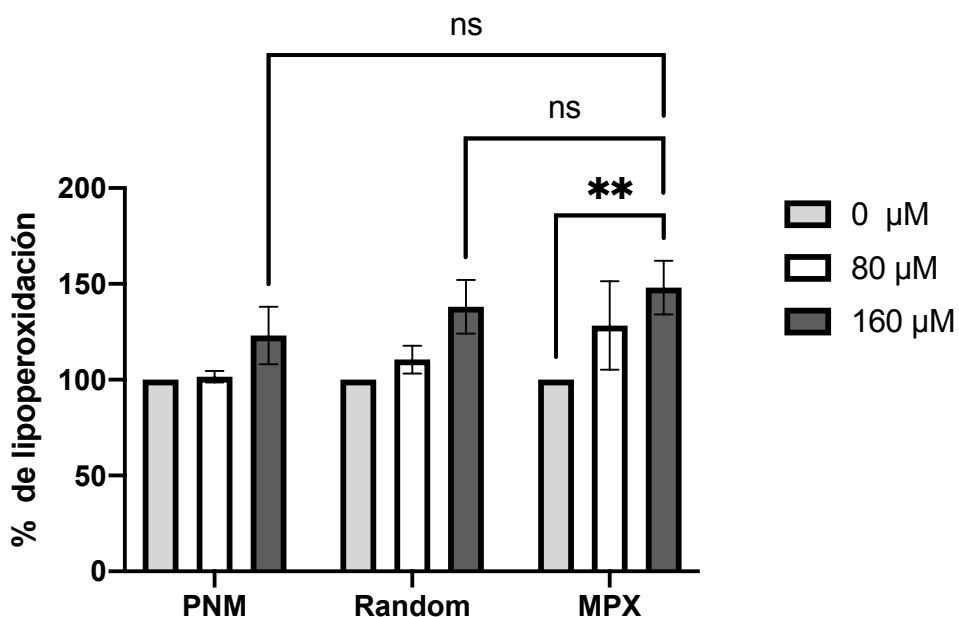


Figura 19. Ensayo de lipoperoxidación en parásitos modificados con morfolino. Determinación de MDA con TBA para verificar la producción de lípidos peroxidados después del estrés oxidante con 80 y 160 M de H₂O₂ evaluados por fluorimetría. Se realizaron 3 experimentos independientes con una n=3. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad 8.0 ANOVA dos vías, Bonferroni test. No significativo: ns. **P=<0.05

Efecto de Bz en parásitos reducidos en TcMPX

Uno de los mecanismos tripanocidas de Bz es incrementar la producción de ROS, lo que puede modificar la arquitectura del parásito causando la presencia de formas atípicas (morfología redondeada), además que este fármaco es uno de los utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Por lo que parásitos MPX, Random y PNM se incubaron con diluciones seriadas de Bz (3, 6, 12, 25, 50 y 100 μM) por diferentes tiempos (48, 72 y 96 h).

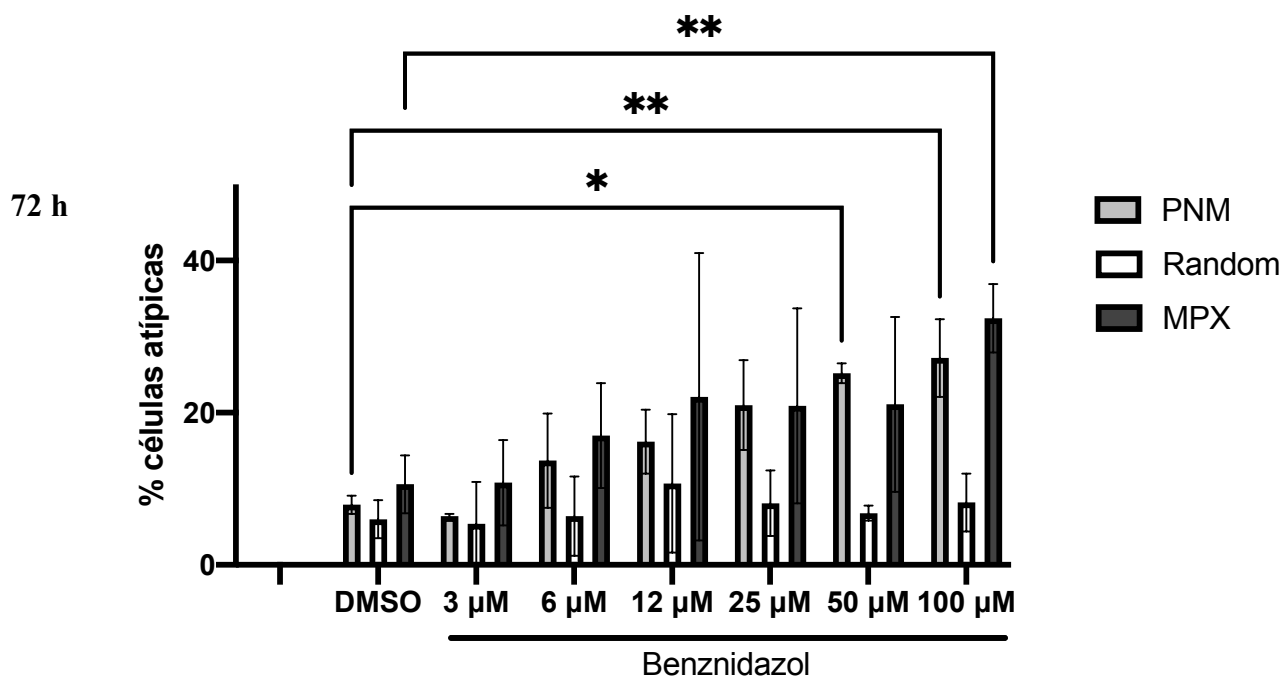


Figura 20. Ensayo del efecto de Benznidazol sobre la morfología en parásitos modificados en la expresión de TcMPX. Determinación de cambios morfológicos en parásitos tratados con morfolino anti MPX a las 72 h y con un gradiente de concentración del fármaco Bz. Se contabilizó el número de células con morfología redondeada en este tiempo. Se realizaron 3 experimentos independientes con una $n=3$. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad 8.0 ANOVA dos vías, Bonferroni test. * $P=<0.05$, ** $P=<0.01$.

Aunque se realizó la medición a las 48 y 96 h no se encontraron diferencias significativas a estos tiempos con las diferentes concentraciones de Bz (datos no mostrados). A las 72 h, los parásitos Random no se encontraron diferencias en las

formas atípicas con todas las concentraciones probadas. En los parásitos PNM hubo un efecto dosis-dependiente ya que se incrementó la presencia de formas atípicas de 6.4 a 27.2%. Se observó un efecto dosis-dependiente similar en los parásitos MPX de 10.6 a 32.4%. Importantemente, hubo diferencias significativas entre parásitos PNM y MPX a 100 μ M (Figura 20).

Efecto de benznidazol en la movilidad en parásitos modificados

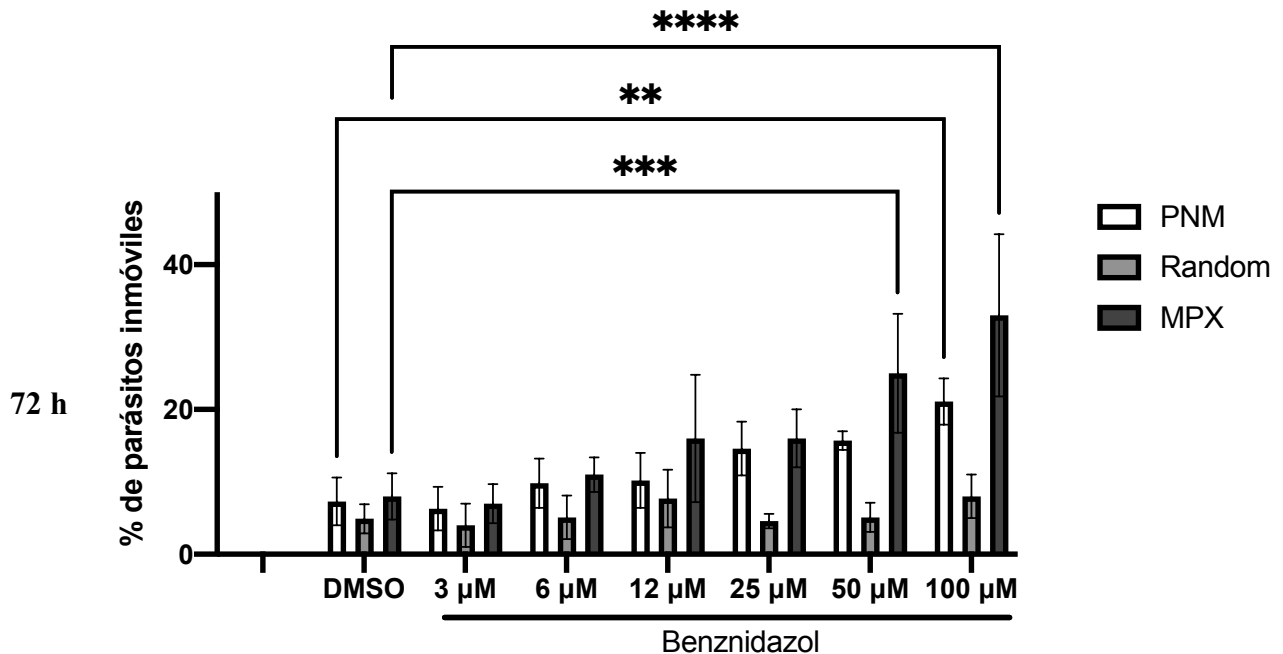


Figura 21. *Ensayo del efecto del Bz sobre la movilidad en parásitos modificados en la expresión de TcMPX. Determinación de inhibición de la movilidad en parásitos tratados con morfolino anti-MPX a las 72 h y con un gradiente de concentraciones de Bz. Se realizaron 3 experimentos independientes con una n=3. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad 8.0 ANOVA dos vías, Bonferroni test. *P=<0.05, **P=<0.01, ***P=<0.001*

A las 72 h se observó un aumento significativo en el número de parásitos MPX inmóviles a concentraciones de 50 μ M de Bz. El aumento de parásitos inmóviles fue de 25% \pm 8.2 con respecto a los parásitos PNM con el tratamiento de DMSO; este efecto aumentó a 33% \pm 11 con la concentración de 100 μ M. (Figura 21). En los parásitos Random no hubo diferencias significativas entre los tratamientos.

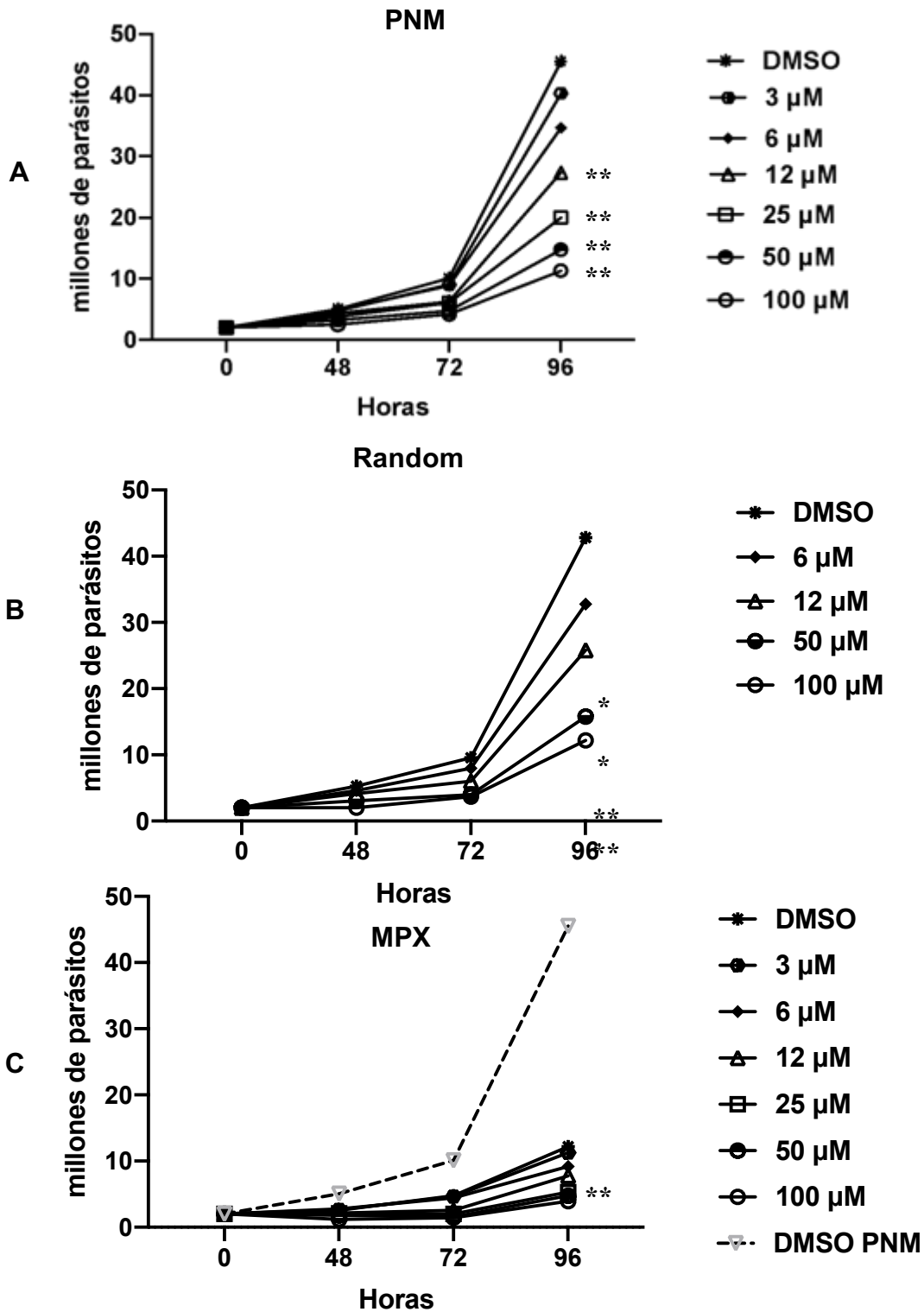


Figura 22. Ensayo del efecto del Bz sobre el crecimiento en parásitos modificados en la expresión de *TcMPX*. Determinación de resistencia en parásitos con morfolino anti MPX en diferentes días y con un gradiente de concentraciones del fármaco. Se contabilizó el número de parásitos a diferentes tiempos; A. PNM, B. Random, C. MPX. . Se realizaron 3 experimentos independientes con una n=3. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad 8.0 ANOVA dos vías, Tukey test. *P=<0.005, ** P=<0.001

Efecto de benznidazol en el crecimiento en parásitos reducidos en la expresión de MPX

Otro de los efectos del Bz es afectar el crecimiento de *T. cruzi*. Se encontró que el número de parásitos PNM incubados con Bz disminuye con respecto a las horas de cultivo de manera Bz dosis dependiente a partir de las 72 h (Figura 22A). A las 96 h, se detectó disminución en el crecimiento tiempo-concentración dependiente, la concentración de 100 μM de Bz produjo el efecto más evidente con una reducción a 11.33×10^6 parásitos/mL con respecto al control DMSO que es de 45×10^6 parásitos/mL. En los parásitos Random, ocurre un efecto similar, aquellos parásitos con DMSO tienen un 42.83×10^6 parásitos/mL a las 96 h, cantidad similar que los PNM. Con el mismo tratamiento, a la concentración de 100 μM de Bz se observó una reducción a 12.17×10^6 parásitos/mL, para las concentraciones de 6, 12 y 50 μM hubo un efecto tiempo-concentración dependiente (Figura 22B). En los parásitos MPX se observó un cambio significativo en la disminución del número de parásitos, aún sin tratamiento con BZ, esta disminución en el número de parásitos disminuyó un poco más a las concentraciones más altas de BZ siendo esto más evidente desde las 96 h (Figura 22C), lo que podría sugerir que TcMPX está implicada en el crecimiento del parásito.

TcMPX participa en la infección a células Vero

Se ha propuesto que TcMPX es un factor de virulencia que participa en la infección de *T. cruzi* a células del hospedero, por lo que su inhibición podría impactar negativamente en su capacidad infectiva. Nuestros resultados mostraron que cuando se infectan células Vero con una MOI (multiplicity of infection, por sus siglas en inglés) de 1:10 célula/parásito, los PNM infectan al $63\% \pm 7.93$ de las células, mientras que no existen diferencias significativas con el grupo Random. De manera importante los parásitos con inhibición de MPX infectan solo al $45\% \pm 4.0$ de las células, lo cual es estadísticamente diferente con respecto al control (Figura 23).

También se cuantificó el número de amastigotes por cada 100 células observándose una tendencia a su disminución (Figura 23).

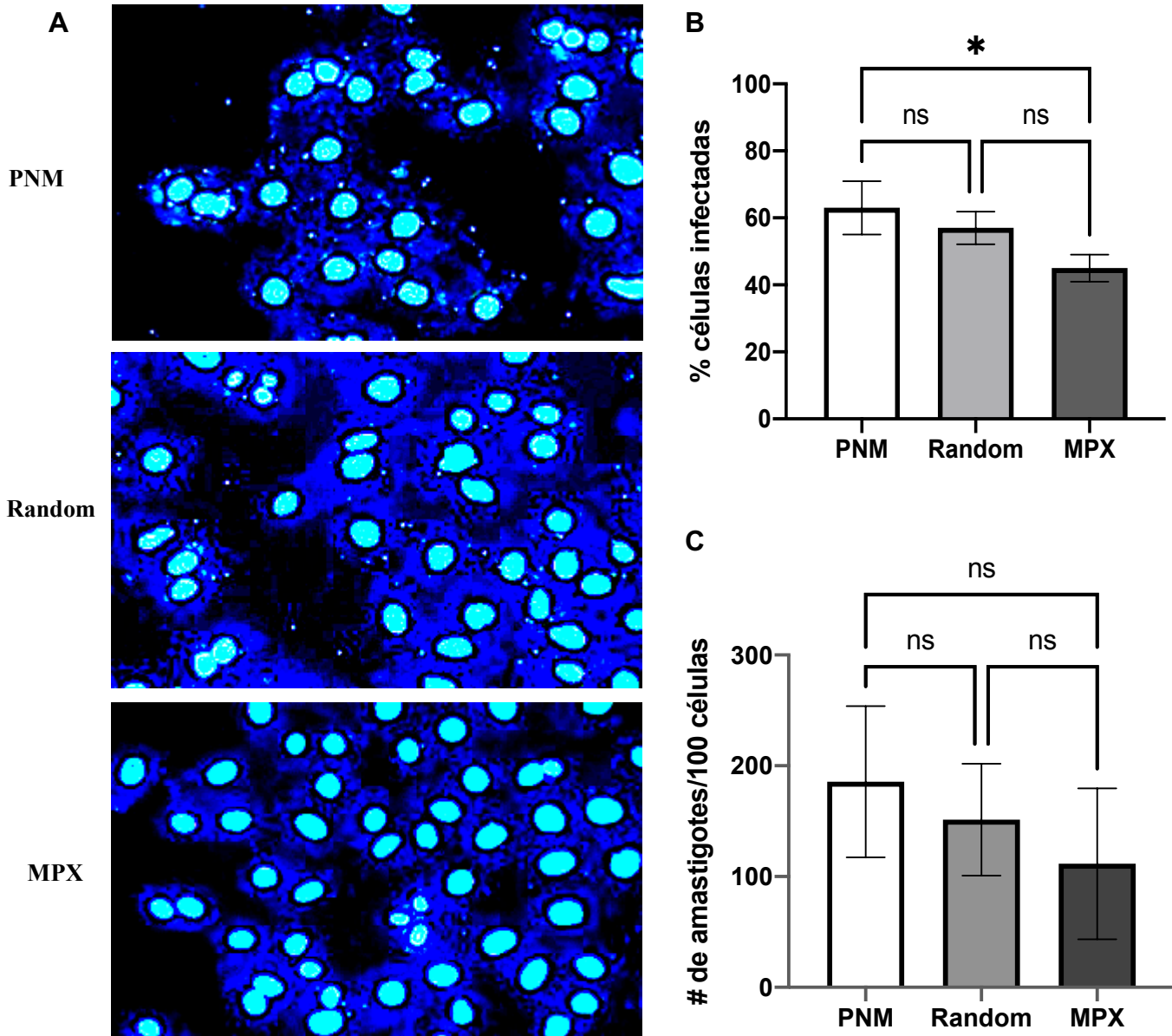


Figura 23. *Ensayo de infección in vitro con parásitos modificados en la expresión de TcMPX (1:10).* **A.** Determinación de infección de parásitos a células VERO con una MOI 1:10, las células se tiñeron con el colorante DAPI. **B.** Se realizaron tres experimentos independientes del ensayo de infección. **B.** Se contabilizó el número de amastigotes presentes por cada 100 células. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad 8.0 ANOVA dos vías, Bonferroni test. *P<0.005

Se probó también una MOI 1:20, observando que los parásitos no modificados infectaron un $84\% \pm 21.29$ de las células, no existieron diferencias significativas con el grupo Random.

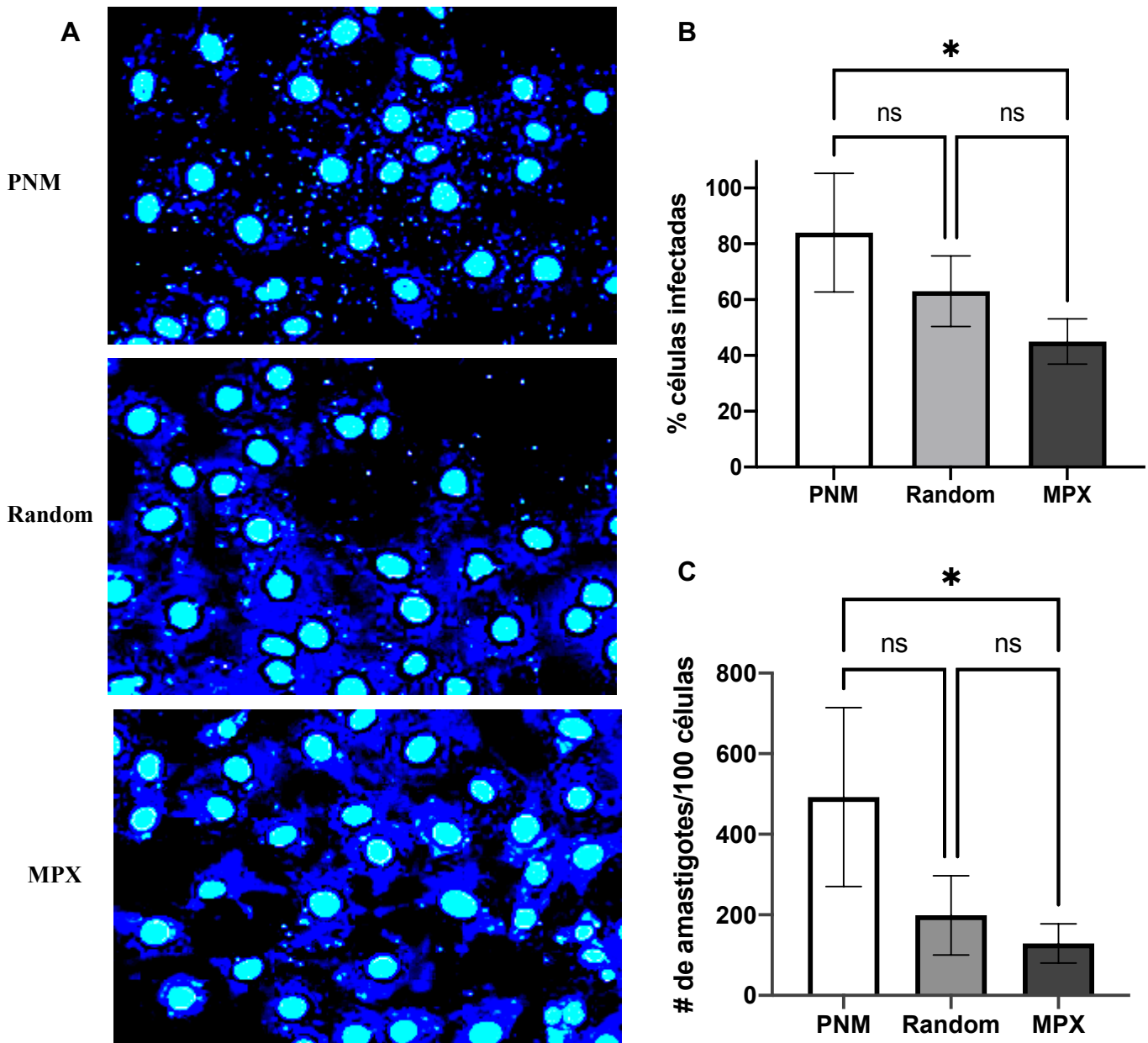


Figura 24. Ensayo de infección *in vitro* con parásitos modificados en la expresión de TcMPX (1:20). **A.** Determinación de infección en parásitos en células VERO con una MOI 1:20 y teñidas con el colorante DAPI. **B.** Se realizaron tres experimentos independientes del ensayo de infección. **C.** Se contabilizó el porcentaje de células infectadas y el número de amastigotes presentes por cada 100 células. El análisis estadístico se realizó con el programa GraphPad 8.0 ANOVA dos vías, Bonferroni test. *P<0.005

Los parásitos reducidos en la expresión de MPX infectaron solo al $45\% \pm 8.13$, lo cual es estadísticamente significativo con respecto al control (parásitos PNM) (Figura 24). En cuanto al número de amastigotes intracelulares por cada 100 células, nuestros resultados indicaron que existe diferencia significativa en la cantidad de estos cuando se infecta con los parásitos reducidos en su expresión de MPX que tienen 130 ± 48 parásitos, en comparación con las células infectadas con el grupo control PNM (492 ± 222) y con el grupo infectado con los parásitos tratados con el Random (Figura 24).

*Efecto del Tioestreptón en *T. cruzi**

Tioestreptón (TS) es un medicamento aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer. Uno de sus mecanismos de acción es unirse estéricamente a las cisteínas catalíticas y reducir la defensa oxidante de las células. Para establecer si el TS pudiera reducir el crecimiento de *T. cruzi* se incubaron epimastigotes en presencia de este compuesto durante 24 y 48 h. Se observó que TS redujo el número de epimastigotes sólo a las 48 h de incubación a concentraciones de 20 y 40 μM (Figura 25A). El valor IC_{50} fue de 40 ± 7.5 mM. Se observó que el TS tiene un alto efecto tripanocida sobre el estadio infectivo de *T. cruzi* ya que, a las 24 h, más del 50% de los tripomastigotes derivados de cultivo habían sido eliminados con menos de 5 μM del compuesto (Figura 25B). El valor IC_{50} se calculó a 4.5 ± 0.7 mM. Por otro lado, los tripomastigotes obtenidos de sangre de ratón infectado también fueron sensibles al efecto de TS porque, con 20 mM de TS, más del 65% de los parásitos fueron eliminados del cultivo (Figura 25C). El valor IC_{50} se calculó a 11 ± 2.6 mM. No hubo daño morfológico observado en microscopía óptica. De manera importante, este fármaco no presenta citotoxicidad en células de mamífero, ya que la concentración más alta que se pudo probar fue de 40 μM , y no se observó reducción en la actividad metabólica.

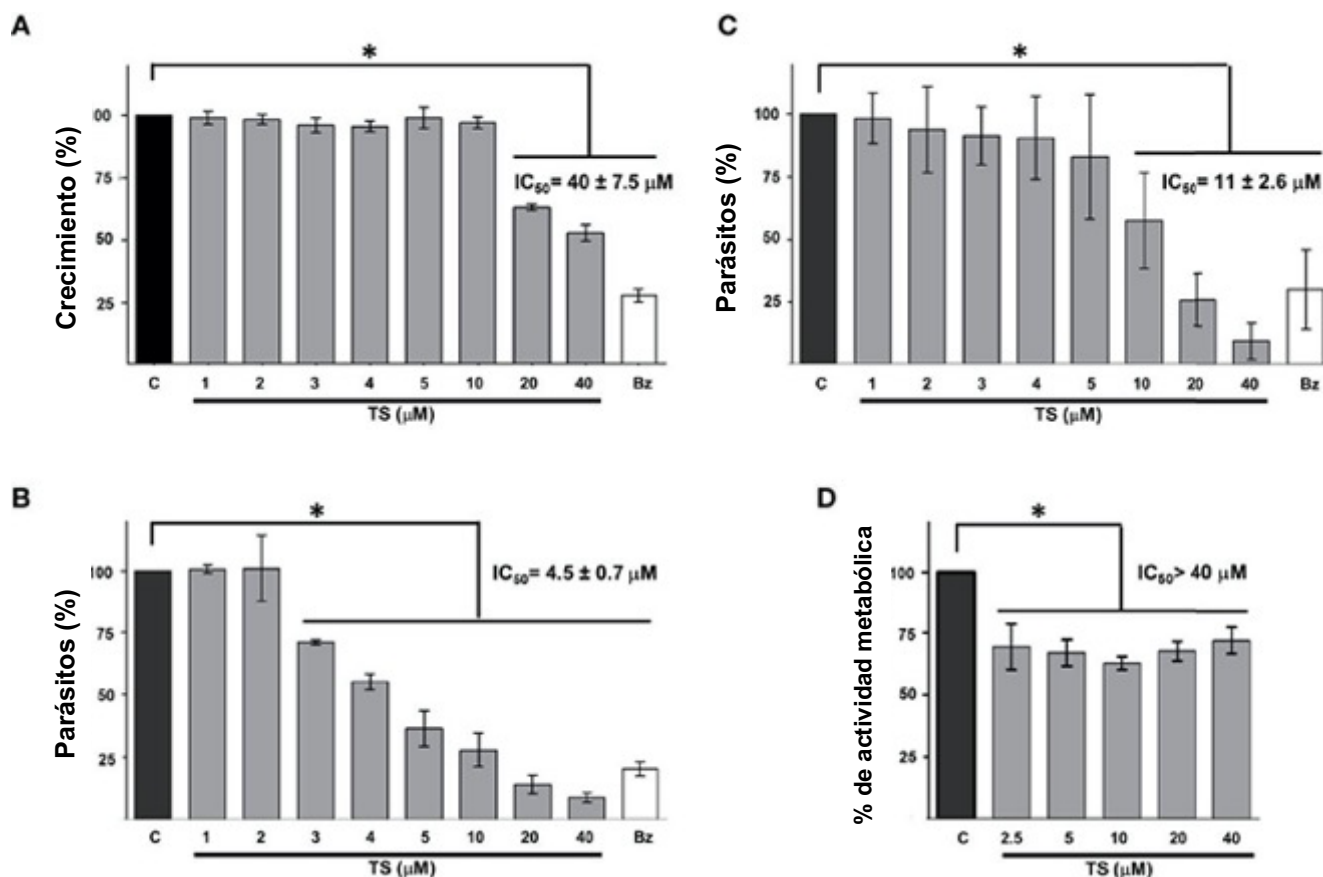


Figura 25. Efecto tripanocida del Tioestrepton en parásitos modificados en la expresión de TcMPX. **A.** Epimastigotes, **B.** tripomastigotes derivados de cultivo, **C.** tripomastigotes sanguíneos y **D.** citotoxicidad de células Vero, se incubaron en presencia o ausencia de TS en las concentraciones micro molares indicadas. El número de parásitos se estableció contando a las 48 h (A) o 24 h (B, C) de incubación. La actividad enzimática se midió utilizando el ensayo MTT a las 24 h (D). Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar. Se usó Bz (25 μ M) como control positivo. Se usaron medios sin TS (C) como control. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con un asterisco ($p < 0,05$).

Efecto sinérgico de Tioestreptón con benznidazol sobre *T. cruzi*

Debido al efecto tripanocida de TS en tripomastigotes derivados de cultivo de *T. cruzi*, evaluamos el posible efecto sinérgico con Bz y diferentes concentraciones de TS por 24 h. Utilizando la combinación de TS y BZ se observó un efecto sinérgico significativo a concentraciones bajas de TS (1.25 y 2.5 μ M). Con 1.25 μ M de TS se observó 79.14 % de parásitos con TS solo, en contraste con un

46.66% de los parásitos incubados simultáneamente con TS y BZ. Resultados similares se observaron con TS 2.5 μM y Bz 1.0 μM , ya que hubo 58.57% de parásitos tratados solo con TS frente al 39.38% con TS y BZ. No se encontraron diferencias significativas comparando TS 5 y 10 μM más BZ con los parásitos tratados solo con TS (Figura 26).

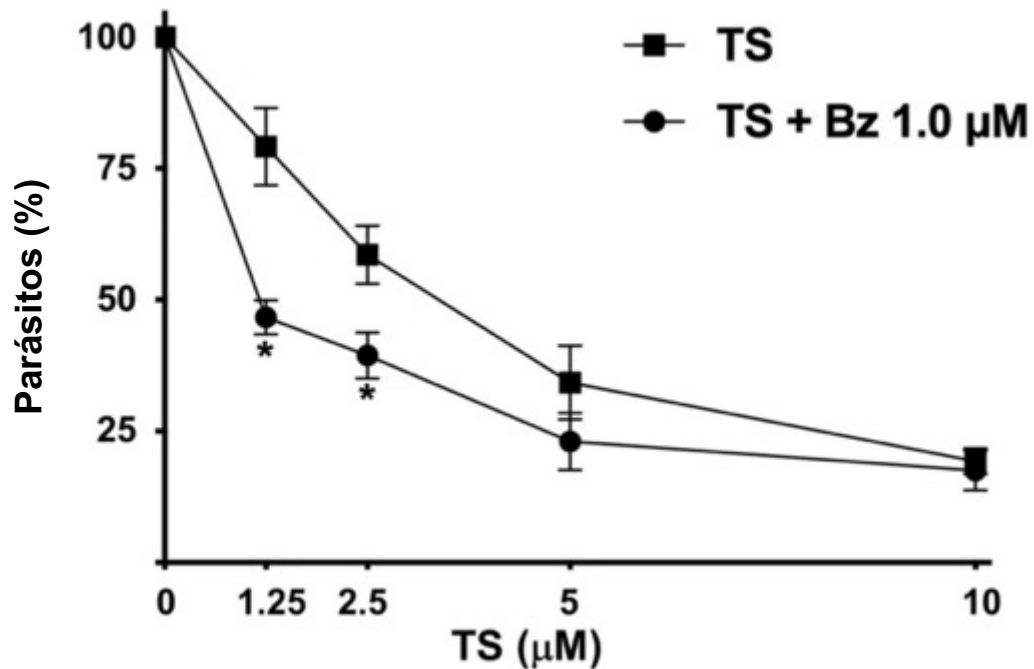


Figura 26. Efecto sinérgico de TS y Bz. Se incubaron tripomastigotes derivados de células Vero en presencia de diferentes concentraciones de TS solo o en combinación con 1.0 μM Bz. El número de parásitos se determinó contando en una cámara de Neubauer después de 24 h de incubación con los compuestos. Los resultados se presentan como media \pm desviación estándar. El análisis estadístico fue una regresión no lineal con Kolmogorov–Smirnov post-test. * $p < 0.001$).

Discusión

Las Px son una superfamilia de peroxidasa conservadas a través de la evolución en arqueas, bacterias y eucariotas (Perkins *et al.*, 2015). En *T. cruzi* tienen la función de agentes antioxidantes, pero además son factores de virulencia (Piacenza *et al.*, 2008, 2009; Piñeyro *et al.*, 2008; Nogueira *et al.*, 2009) y tienen función de chaperona (Piñeyro *et al.*, 2019) y holdasa (Specker *et al.*, 2022), por este motivo, se les ha considerado como buenos candidatos a blancos terapéuticos (Andrade y Reed 2015). El análisis de secuencia mostró un 64% de identidad entre las secuencias de aminoácidos de TcMPX Qro y PRX3 humana, con marcadas diferencias en el extremo N-terminal. Estas diferencias son importantes ya que el diseño de métodos de inhibición de estas proteínas se deben enfocar a estos sitios; asimismo las técnicas de inhibición de genes o expresión de proteínas a utilizar son limitadas, por ejemplo, en *T. cruzi* no se pueden utilizar RNA interferentes ya que *T. cruzi* carece de la maquinaria para la biogénesis de estos RNA como lo son DICER y Ago (DaRocha *et al.*, 2004) a diferencia de otros tripanosomatidos que si poseen estas moléculas como *T. brucei* (Motyka y Englund 2004). El uso de Crispr-Cas9 está limitado debido a la presencia de extensas regiones repetitivas de ADN, incluidas grandes familias multigénicas, y variaciones en el número de copias cromosómicas características de este parásito. Por lo tanto, las secuencias genómicas adicionales y más precisas de diferentes cepas de *T. cruzi* son necesarias para aumentar el uso y la eficiencia de las técnicas de edición de genes en este parásito (Chiurillo *et al.*, 2021). Algunos métodos de inhibición utilizan oligonucleótidos anti-sentido que son una nueva generación de agentes terapéuticos dirigidos, los cuales funcionan silenciando los genes responsables de las enfermedades (Hashimoto *et al.*, 2014). Una de las ventajas del uso de oligonucleótidos antisentido (morfolino) es que están dirigidos contra los primeros nucleótidos de una secuencia para evitar la transcripción de la proteína, impidiendo estéricamente la unión al ribosoma, y es justo donde encontramos diferencias entre la PRX3 humana y TcMPX.

Al comparar la secuencia de QroMPX con otras PRX previamente caracterizadas, encontramos que comparte el 57% similitud con la peroxidasa

mitocondrial (TXNII) reportada en *T. cruzi* con el que interactúa en condiciones de estrés oxidativo (Dias *et al.*, 2018). Aunque QroMPX como TXNII son peroxidasas mitocondriales, su porcentaje de similitud es menor que la se encontró para QroMPX y las PRX2 y PRX3 humanas. Esto explica por qué el modelo de homología señaló a PRX3 humana como templado. Además, el modelado molecular mostró que en QroMPX los monómeros podrían interactuar por sus hojas $\beta 7$, formando una interfaz tipo B para generar homodímeros, como se ejemplificó para otros 2-cys PRX (Poole y Nelson, 2016). En estas estructuras, el C_P (C81) de un monómero podría estar asociado con el C_R (C204) del monómero adyacente. En esta estructura conformacional, la disposición de los motivos GGLG e YF y la tríada catalítica (P74, T78 y R157) alrededor del sitio catalítico son muy similares a PRX3 humana. Esto facilitaría la hiperoxidación de la molécula, pero la presencia y posición de los aminoácidos N205 y P211 cercanos a C_R (C204) indican que QroMPX podría ser parcialmente resistente a este fenómeno porque la resistencia a los eventos de sobre oxidación en PRX3 se da por la presencia de cuatro aminoácidos (NTDP) en una forma similar posición cercana al C_R (Cox *et al.*, 2009). El modelado de homología también sugiere que los dímeros pueden ensamblarse en oligómeros.

En este trabajo se estudiaron parásitos *T. cruzi* en los que se redujo la expresión de la peroxirredoxina mitocondrial (una molécula asociada a la defensa contra el estrés oxidante) con el uso de morfolinos. Los morfolinos son moléculas sintéticas similares a los oligonucleótidos, tienen una base estructural por anillos de N-metil morfolina unidos por enlaces de tipo fosfodiamidato. Sobre este esqueleto se unen las bases nitrogenadas de la secuencia complementaria cuya expresión se desea inhibir. Se utilizó este método de reducción ya que induce una inhibición estable, duradera y es resistente a las ribonucleasas. Además, para que el morfolino se internalice dentro de las células solo se requiere de un péptido facilitador denominado Endoportin (Stainier *et al.*, 2017).

En este trabajo se obtuvo una reducción del 50% en la expresión de TcMPX para los estadios de epimastigotes y tripomastigotes, lo que provocó un cambio importante en la morfología celular como la aparición de células atípicas ante el desafío del estrés oxidativo. Otros trabajos realizados con oligonucleótidos

antisentido (morfolinos), pero dirigido a otras proteínas, han descrito cambios en el crecimiento de *T. cruzi* al inhibir la cruzipaina (San Francisco *et al.*, 2017) y pérdida de virulencia asociadas al receptor de membrana IP3 (Hashimoto *et al.*, 2013). En estos trabajos se observó una reducción del 30% en la expresión proteica, mientras que nosotros obtuvimos un 50% de reducción en la expresión en tripomastigotes y en epimastigotes. Solamente se ha reportado un trabajo de inhibición de una molécula asociada al estrés oxidante, el cual describió mutantes que no expresaban TcAPX, en estos parásitos se demostró una mayor sensibilidad al peróxido de hidrógeno exógeno, pero no se investigó la susceptibilidad al benznidazol como se hizo en el presente trabajo. También se observó un decremento significativo en la infectividad en células de mamífero, similar al observado en nuestro trabajo aunque el modelo de infección era diferente, sin embargo, no se tuvo efecto sobre la replicación, diseminación o tropismo tisular de *T. cruzi in vivo* (Taylor *et al.*, 2015). Estos últimos aspectos no se estudiaron por nosotros y sería interesante abordarlos en estudios posteriores. Los demás trabajos reportados sobre modificaciones a la expresión de moléculas asociadas al control del estrés en los parásitos están enfocados en la sobreexpresión de Prx y su participación en el mecanismo de defensa (Piacenza *et al.*, 2008) y como factor de virulencia (Piacenza *et al.*, 2009).

Una de las particularidades observadas durante la reducción en la expresión de TcMPX con morfolinos fue que se utilizó una mayor concentración en los estadios de epimastigotes. En el estadio de epimastigote la concentración utilizada fue ocho veces mayor, esto se debe a que el epimastigote es la forma replicativa y en 48 h, que es el tiempo de incubación con morfolino, aumenta el número de parásitos y es necesario aumentar la dosis de morfolino para disminuir la expresión de QroMPX de los nuevos parásitos generados. También se debe considerar que las membranas entre estos estadios son diferentes y que el intercambio de nutrientes entre el ambiente y el parásito se realiza por diferentes sistemas (Alves *et al.*, 2017), por lo que el estadio epimastigote estará nutriendo y excretando más activamente que el tripomastigote, ya que el primero necesita más nutrientes ya que es la fase replicativa, mientras que el segundo es la fase infectiva.

Se ha demostrado que las ROS son moléculas que inducen la oxidación de proteínas y lípidos que interfieren con la integridad y la función mitocondrial (Menna-Barreto y de Castro, 2014), además la sobreproducción de estas moléculas dentro de las células induce de manera inespecífica cambios en la arquitectura celular y la muerte. En los parásitos modificados, se encontraron cambios morfológicos similares a los reportados previamente con H₂O₂ a mayor concentración, las células se vuelven redondeadas (Pérez-Morales *et al.*, 2017). Estos cambios se pueden atribuir a que una de las funciones de TcMPX es interactuar con proteínas del citoesqueleto como la tubulina (Peloso *et al.*, 2016), y al haber una reducción de TcMPX, incrementa la producción de ROS y se producen daños en la membrana celular, lo que conduce a la pérdida de la integridad de la membrana y defectos en la función de las proteínas de membrana.

El principal daño en las moléculas producidas por ROS es la lipoperoxidación, un ataque directo a los residuos Thr, Pro, Lys y Arg de las proteínas que pueden derivatizar los polipéptidos y conducir a la formación de grupos carbonilos que derivan en la carbonilación de proteínas (Gupta *et al.*, 2009). Ambos son indicadores de daños por estrés oxidativo en el parásito que repercute en el correcto plegamiento de las proteínas, afecta su integridad, conducen a otros eventos adversos en la célula y la muerte; sin embargo, en nuestro modelo no observamos cambios drásticos en estos parámetros, nuestros resultados sugieren que estos cambios se empiezan a producir en el parásito a una concentración más alta de peróxido, y posiblemente es necesario incrementar el tiempo de exposición al agente oxidante para que estos cambios sean determinantes. Otro de los efectos de las ROS es la modificación de la actividad metabólica; en los parásitos reducidos en la expresión de MPX hay una marcada reducción de la actividad metabólica, esto derivado del posible daño que sufre el parásito, probablemente haya un cambio en la polarización de la membrana que interrumpe la cadena respiratoria y produce menos energía para el parásito, como sucede con otros compuestos que inducen estrés oxidativo (Rodríguez-Hernández *et al.*, 2019).

Se ha sugerido que la TcMPX es un factor de virulencia, ya que se expresa preferentemente en cepas virulentas de *T. cruzi* (Piacenza *et al.*, 2009), además su

expresión está relacionada con el estadio tripomastigote, que es la etapa infectiva del parásito (Piacenza *et al.*, 2013) y existe una correlación entre el contenido enzimático de esta Px con su virulencia. Nuestros resultados mostraron una reducción en la infección en cultivos in vitro, lo que corrobora su importancia como factor de virulencia, aunque no se reduce la infección al 100%, esto se debe a que el parásito cuenta con un enorme número de moléculas para infectar, como glicoproteínas y enzimas como las transialidasas, entre otras. Además, se redujo el número de amastigotes por célula en los tratamientos Random y MPX, esto puede deberse a que, en el citosol, el hierro se puede almacenar como hierro férrico (Fe^{3+}), una forma redox-inerte, asociada con ferritina o se puede exportar desde la célula como hierro ferroso (Fe^{2+}). La expresión de ferroportina y ferritina está regulada al alza por los antioxidantes, como las Px, lo que puede conducir a niveles reducidos de reservas de hierro lábil en el citosol. Se desconoce el mecanismo de captación de hierro por los amastigotes, pero se ha sugerido que el parásito depende de la reserva intracelular de hierro lábil para su crecimiento (Cardoso *et al.*, 2016), en nuestro caso, pensamos que la reducción de TcMPX modificó los niveles de hierro en la célula y esto a su vez, redujo el número de amastigotes.

Debido a la similitud entre QroMPX y PRX3, así como la disposición de las cisteínas del sitio activo y los aminoácidos que los rodean, es muy probable que QroMPX sea susceptible a los mismos inhibidores que PRX3. Esta característica se puede utilizar para reposicionar moléculas que actualmente son terapéuticas en humanos. Varias moléculas quelantes de hierro como la triapina, auranofina y cisplatino reducen la presencia de PRX3 humana y tienen un uso farmacológico en el tratamiento de algunos tipos de cáncer (Myers, 2016). Otra molécula es TS, un excelente inhibidor de PRX3 que interactúa con las cisteínas del sitio activo, esta molécula también induce una condición de estrés oxidativo en varios tipos de cáncer y se utiliza como tratamiento para reducir el crecimiento celular (Nelson *et al.*, 2021), ya que PRX3, se sobre expresa en mesoteliomas y se ha observado que al inactivarse esta enzima se modifica la red mitocondrial antioxidante, causando alteraciones en este tipo de células cancerosas (Newick *et al.*, 2012).

TS y algunos derivados poseen buena actividad contra protozoos como *Babesia* y *Plasmodium* sp., pero no se había probado contra otros protozoos como *T. cruzi* (Aminake et al., 2011; Aboulaila et al., 2012). Se realizó un análisis de acoplamiento (docking molecular), el cual sugirió que TS podría unirse a la cisteína resolutiva en el sitio catalítico (datos no mostrados), pero no descartamos que ambas cisteínas estén involucradas porque la unidad funcional de PRX es homodimérica en un entorno biológico (Poole y Nelson, 2016). Asimismo, por la similitud en la secuencia de aminoácidos (>55%) entre QroMPX y TXNII, es muy probable que TS también interactúe con esta proteína, y la inhibición de ambas Px podría tener un efecto sinérgico. Cuando incubamos epimastigotes de *T. cruzi* durante 48 h en presencia de TS, se observó una reducción en la multiplicación del parásito en el cultivo sin cambios morfológicos evidentes en los parásitos restantes. Los tripomastigotes y los tripomastigotes sanguíneos (ambos infecciosos) fueron susceptibles al efecto tripanocida de TS, pero en un menor tiempo y con menor concentración de fármaco. A las 24 h de incubación con diferente concentración de TS, se observaron diferencias con respecto a los grupos de control en amastigotes intracelulares. TS se puede utilizar en combinación con el tratamiento clásico contra la enfermedad de Chagas, así que comparamos el efecto sinérgico de TS y BZ en tripomastigotes para reducir la concentración de ambos compuestos, y observamos una reducción significativa en el número de parásitos con la combinación más baja de TS-BZ utilizada. Es de llamar la atención que a dosis altas, no encontramos efecto sinérgico; por lo que se debe trabajar más para abordar este fenómeno, ya que posiblemente se enmascara el efecto de una u otra droga por la concentración. Aunque TS es una herramienta útil para inhibir la expresión de TcMPX, dado que uno de los mecanismos reportados para este fármaco es unirse a las cisteínas del sitio catalítico de moléculas antioxidantes (Chiu *et al.*, 1996), esta unión también puede presentarse en otras peroxirredoxinas, como la TcCPX, la TcAPX y la TcGPX dificultando el estudio de una Px en particular, aunque estudios anteriores indican que TS tiene preferencia a unirse a las Px mitocondriales por el pH del organelo en humanos (Nelson *et al.*, 2021), esto no se ha estudiado en *T. cruzi* y por nuestra

parte, exploraremos estos resultados evaluando el efecto sinérgico en parásitos con expresión reducida de TcMPX y el Ts.

Conclusiones

- TcMPX tiene una alta similitud con PRX3 humana
- Se obtuvo una inhibición de ~50% de TcMPX en epimastigotes y tripomastigotes utilizando un oligonucleotido anti sentido (morfolino) específico.
- La reducción en la expresión de TcMPX hizo más susceptible a los tripomastigotes al estrés oxidante producido por H₂O₂.
- Los tripomastigotes modificados en la expresión de TcMPX presentaron cambios morfológicos, un descenso en la actividad enzimática, aumento en la producción de ROS, aumento en carbonilación de proteínas y de lipoperoxidación.
- Los tripomastigotes modificados presentan una reducción en el crecimiento cuando se tratan con benznidazol.
- Los parásitos modificados presentan una menor capacidad infectiva, lo que confirma la participación de TcMPX como factor de virulencia.
- La reducción en la expresión de TcMPX afecta el crecimiento de *T. cruzi*.
- El uso de Tioestrepton que se une a las Px puede ser una alternativa para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Perspectivas

- Evaluar el posible daño al DNA del parásito producto de las especies reactivas de oxígeno
- Inhibir completamente la expresión de TcMPX con algún fármaco u otro mecanismo de silenciamiento de genes
- Evaluar el efecto combinado del morfolino MPX y Tioestreptón
- Evaluar el papel de TcMPX reducida en un modelo *in vivo*
- Evaluar el efecto de Tioestreptón en un modelo de infección *in vivo*

Referencias

- Acevedo, G. R., Girard, M. C., & Gómez, K. A. (2018). The Unsolved Jigsaw Puzzle of the Immune Response in Chagas Disease. *Frontiers in immunology*, 9, 1929. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01929>
- Alevi, K., de Oliveira, J., da Silva Rocha, D., & Galvão, C. (2021). Trends in Taxonomy of Chagas Disease Vectors (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae): From Linnaean to Integrative Taxonomy. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(12), 1627. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121627>
- Alvarez, M. N., Peluffo, G., Piacenza, L., & Radi, R. (2011). Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity. *The Journal of biological chemistry*, 286(8), 6627–6640. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.167247>
- Alves, M. J., Kawahara, R., Viner, R., Colli, W., Mattos, E. C., Thaysen-Andersen, M., Larsen, M. R., & Palmisano, G. (2017). Comprehensive glycoproteomics of the epimastigote and trypomastigote stages of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of proteomics*, 151, 182–192. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2016.05.034>
- Andrade, L. O., & Andrews, N. W. (2004). Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *The Journal of experimental medicine*, 200(9), 1135–1143. <https://doi.org/10.1084/jem.20041408>
- Andrade, L. O., & Andrews, N. W. (2005). The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature reviews. Microbiology*, 3(10), 819–823. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1249>
- Arias, D. G., Marquez, V. E., Chiribao, M. L., Gadelha, F. R., Robello, C., Iglesias, A. A., & Guerrero, S. A. (2013). Redox metabolism in *Trypanosoma cruzi*: functional characterization of trypanoredoxins revisited. *Free radical biology & medicine*, 63, 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.036>
- Armstrong, D., et al. (1998). *Free Radicals and Antioxidant Protocols*. 108: 315-324.
- Bachega, J. F. R., Navarro, M. V. A. S., Bleicher, L., Bortoleto-Bugs, R. K., Dive, D., Bachega, J. F., Navarro, M. V., Bleicher, L., Bortoleto-Bugs, R. K., Dive, D., Hoffmann, P., Viscogliosi, E., & Garratt, R. C. (2009). Systematic structural studies of iron superoxide dismutases from human parasites and a statistical coupling analysis of metal binding specificity. *Proteins*, 77(1), 26–37. <https://doi.org/10.1002/prot.22412>
- Battista, T., Colotti, G., Ilari, A., & Fiorillo, A. (2020). Targeting Trypanothione Reductase, a Key Enzyme in the Redox Trypanosomatid Metabolism, to Develop New Drugs against Leishmaniasis and Trypanosomiasis. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(8), 1924. <https://doi.org/10.3390/molecules25081924>
- Bern C. (2015). Chagas' Disease. *The New England journal of medicine*, 373(5), 456–466. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1410150>
- Berriman, M., Ghedin, E., Hertz-Fowler, C., Blandin, G., Renauld, H., Bartholomeu, D. C., Lennard, N. J., Caler, E., Hamlin, N. E., Haas, B., Böhme, U., Hannick, L., Aslett, M. A., Shallom, J., Marcello, L., Hou, L., Wickstead, B., Alsmark, U. C., Arrowsmith, C., Atkin, R. J., ... El-Sayed, N. M. (2005). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5733), 416–422. <https://doi.org/10.1126/science.1112642>

Cao, Z., & Lindsay, J. G. (2017). The Peroxiredoxin Family: An Unfolding Story. *Sub-cellular biochemistry*, 83, 127–147. https://doi.org/10.1007/978-3-319-46503-6_5

Cardoso, M. S., Reis-Cunha, J. L., & Bartholomeu, D. C. (2016). Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. *Frontiers in immunology*, 6, 659. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00659>

Carnieri, E. G., Moreno, S. N., & Docampo, R. (1993). Trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi* different stages. *Molecular and biochemical parasitology*, 61(1), 79–86. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(93\)90160-y](https://doi.org/10.1016/0166-6851(93)90160-y)

Castanys, S., Osuna, A., Gamarro, F., & Ruiz-Pérez, L. M. (1984). Purification of metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* by Percoll discontinuous gradient centrifugation. *Zeitschrift fur Parasitenkunde (Berlin, Germany)*, 70(4), 443–449. <https://doi.org/10.1007/BF00926684>

Castro, H., & Tomás, A. M. (2008). Peroxidases of trypanosomatids. *Antioxidants & redox signaling*, 10(9), 1593–1606. <https://doi.org/10.1089/ars.2008.2050>

CDC Center for disease control and preventios Revisado April 11, 2022. Content source: Global Health, Division of Parasitic Diseases

Chiu, M. L., Folcher, M., Griffin, P., Holt, T., Klatt, T., & Thompson, C. J. (1996). Characterization of the covalent binding of thiostrepton to a thiostrepton-induced protein from *Streptomyces lividans*. *Biochemistry*, 35(7), 2332–2341. <https://doi.org/10.1021/bi952073eand> Malaria. https://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/detailed.html

Choi, H. J., Kang, S. W., Yang, C. H., Rhee, S. G., & Ryu, S. E. (1998). Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution. *Nature structural biology*, 5(5), 400–406. <https://doi.org/10.1038/nsb0598-400>

Chiurillo, M. A., & Lander, N. (2021). The long and winding road of reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*. *Microbial cell (Graz, Austria)*, 8(9), 203–207. <https://doi.org/10.15698/mic2021.09.758>

Contreras, V. T., Salles, J. M., Thomas, N., Morel, C. M., & Goldenberg, S. (1985). In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Molecular and biochemical parasitology*, 16(3), 315–327. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(85\)90073-8](https://doi.org/10.1016/0166-6851(85)90073-8)

DaRocha, W. D., Otsu, K., Teixeira, S. M., & Donelson, J. E. (2004). Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology*, 133(2), 175–186. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.10.005>

Dhiman, M., Estrada-Franco, J. G., Pando, J. M., Ramirez-Aguilar, F. J., Spratt, H., Vazquez-Corzo, S., Perez-Molina, G., Gallegos-Sandoval, R., Moreno, R., & Garg, N. J. (2009). Increased myeloperoxidase activity and protein nitration are indicators of inflammation in patients with Chagas' disease. *Clinical and vaccine immunology : CVI*, 16(5), 660–666. <https://doi.org/10.1128/CVI.00019-09>

Dias, L., Peloso, E. F., Leme, A., Carnielli, C. M., Pereira, C. N., Werneck, C. C., Guerrero, S., & Gadelha, F. R. (2018). *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin II interacts with different peroxiredoxins under physiological and oxidative stress conditions. *Experimental parasitology*, 184, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.10.015>

Díaz-Garrido, P., Cárdenas-Guerra, R. E., Martínez, I., Poggio, S., Rodríguez-Hernández, K., Rivera-Santiago, L., Ortega-López, J., Sánchez-Esquivel, S., & Espinoza, B. (2021). Differential activity on trypanosomatid parasites of a novel recombinant defensin type 1 from the insect *Triatoma (Meccus)*

pallidipennis. *Insect biochemistry and molecular biology*, 139, 103673. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2021.103673>

Diechtierow, M., & Krauth-Siegel, R. L. (2011). A tryparedoxin-dependent peroxidase protects African trypanosomes from membrane damage. *Free radical biology & medicine*, 51(4), 856–868. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2011.05.014>

Docampo, R., & Stoppani, A. O. (1979). Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. *Archives of biochemistry and biophysics*, 197(1), 317–321. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(79\)90251-0](https://doi.org/10.1016/0003-9861(79)90251-0)

Donnelly, S., Stack, C. M., O'Neill, S. M., Sayed, A. A., Williams, D. L., & Dalton, J. P. (2008). Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 22(11), 4022–4032. <https://doi.org/10.1096/fj.08-106278>

Echeverria, L. E., & Morillo, C. A. (2019). American Trypanosomiasis (Chagas Disease). *Infectious disease clinics of North America*, 33(1), 119–134. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.015>

Espinoza, B., Martínez-Ibarra, J. A., Villalobos, G., De La Torre, P., Laclette, J. P., & Martínez-Hernández, F. (2013). Genetic variation of North American Triatomines (Insecta: Hemiptera: Reduviidae): initial divergence between species and populations of Chagas disease vector. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 88(2), 275–284. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0105>

Espinoza, B., Rico, T., Sosa, S., Oaxaca, E., Vizcaino-Castillo, A., Caballero, M. L., & Martínez, I. (2010). Mexican *Trypanosoma cruzi* T. *cruzi* I strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2010, 890672. <https://doi.org/10.1155/2010/890672>

Fairlamb, A. H., & Cerami, A. (1992). Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annual review of microbiology*, 46, 695–729. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.003403>

Fairlamb, A. H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B. T., & Cerami, A. (1985). Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science (New York, N.Y.)*, 227(4693), 1485–1487. <https://doi.org/10.1126/science.3883489>

Finzi, J. K., Chiavegatto, C. W., Corat, K. F., Lopez, J. A., Cabrera, O. G., Mielniczki-Pereira, A. A., Colli, W., Alves, M. J., & Gadelha, F. R. (2004). *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. *Molecular and biochemical parasitology*, 133(1), 37–43. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.08.011>

Flohé L. (2012). The trypanothione system and its implications in the therapy of trypanosomatid diseases. *International journal of medical microbiology: IJMM*, 302(4-5), 216–220. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2012.07.008>

Florin-Christensen, M., Florin-Christensen, J., de Isola, E. D., Lammel, E., Meinardi, E., Brenner, R. R., & Rasmussen, L. (1997). Temperature acclimation of *Trypanosoma cruzi* epimastigote and metacyclic trypomastigote lipids. *Molecular and biochemical parasitology*, 88(1-2), 25–33. [https://doi.org/10.1016/s0166-6851\(97\)00056-x](https://doi.org/10.1016/s0166-6851(97)00056-x)

Goldenberg S. (2022). Chagas disease treatment: a 120-year-old challenge to public health. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 117, e210501chgsa. <https://doi.org/10.1590/0074-02760210501chgsa>

Gonçalves, C. S., Ávila, A. R., de Souza, W., Motta, M., & Cavalcanti, D. P. (2018). Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. *Parasites & vectors*, 11(1), 83. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2664-4>

Gretes, M. C., Poole, L. B., & Karplus, P. A. (2012). Peroxiredoxins in parasites. *Antioxidants & redox signaling*, 17(4), 608–633. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4404>

Guiry, M.D. & Guiry, G.M. 2022. *AlgaeBase*. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <https://www.algaebase.org>; searched on 25 July 2022

Gupta, S., Wen, J. J., & Garg, N. J. (2009). Oxidative Stress in Chagas Disease. *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*, 2009, 190354. <https://doi.org/10.1155/2009/190354>

Gutierrez, F. R., Mineo, T. W., Pavanelli, W. R., Guedes, P. M., & Silva, J. S. (2009). The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 Suppl 1, 236–245. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762009000900030>

Hall, A., Karplus, P. A., & Poole, L. B. (2009). Typical 2-Cys peroxiredoxins--structures, mechanisms and functions. *The FEBS journal*, 276(9), 2469–2477. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06985.x>

Hall, A., Nelson, K., Poole, L. B., & Karplus, P. A. (2011). Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxidants & redox signaling*, 15(3), 795–815. <https://doi.org/10.1089/ars.2010.3624>

Halliwell B. Gutteridge J. (2015). *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press; 1985.

Hashimoto, M., Enomoto, M., Morales, J., Kurebayashi, N., Sakurai, T., Hashimoto, T., Nara, T., & Mikoshiba, K. (2013). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates replication, differentiation, infectivity and virulence of the parasitic protist *Trypanosoma cruzi*. *Molecular microbiology*, 87(6), 1133–1150. <https://doi.org/10.1111/mmi.12155>

Hashimoto, M., Nara, T., Hirawake, H., Morales, J., Enomoto, M., & Mikoshiba, K. (2014). Antisense oligonucleotides targeting parasite inositol 1,4,5-trisphosphate receptor inhibits mammalian host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Scientific reports*, 4, 4231. <https://doi.org/10.1038/srep04231>

Hickson, J., Athayde, L., Miranda, T. G., Junior, P., Dos Santos, A. C., da Cunha Galvão, L. M., da Câmara, A., Bartholomeu, D. C., de Souza, R., Murta, S., & Nahum, L. A. (2022). *Trypanosoma cruzi* iron superoxide dismutases: insights from phylogenetics to chemotherapeutic target assessment. *Parasites & vectors*, 15(1), 194. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05319-2>

Hugo, M., Martínez, A., Trujillo, M., Estrada, D., Mastrogiovanni, M., Linares, E., Augusto, O., Issoglio, F., Zeida, A., Estrín, D. A., Heijnen, H. F., Piacenza, L., & Radi, R. (2017). Kinetics, subcellular localization, and contribution to parasite virulence of a *Trypanosoma cruzi* hybrid type A heme peroxidase (TcAPx-CcP). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 114(8), E1326–E1335. <https://doi.org/10.1073/pnas.1618611114>

Irigoín, F., Cibils, L., Comini, M. A., Wilkinson, S. R., Flohé, L., & Radi, R. (2008). Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free radical biology & medicine*, 45(6), 733–742. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.05.028>

Kollien, A. H., Grospietsch, T., Kleffmann, T., Zerbst-Boroffka, I., & Schaub, G. A. (2001). Ionic composition of the rectal contents and excreta of the reduviid bug *Triatoma infestans*. *Journal of insect physiology*, 47(7), 739–747. [https://doi.org/10.1016/s0022-1910\(00\)00170-0](https://doi.org/10.1016/s0022-1910(00)00170-0)

Krauth-Siegel, R. L., Meiering, S. K., & Schmidt, H. (2003). The parasite-specific Krauth-Siegel, R. L., Meiering, S. K., & Schmidt, H. (2003). The parasite-specific trypanothione metabolism of trypanosoma and leishmania. *Biological chemistry*, 384(4), 539–549. <https://doi.org/10.1515/BC.2003.062>

Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Nknyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>

López-Olmos, V., Pérez-Nasser, N., Piñero, D., Ortega, E., Hernandez, R., & Espinoza, B. (1998). Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica*, 69(3), 239–254. [https://doi.org/10.1016/s0001-706x\(97\)00131-9](https://doi.org/10.1016/s0001-706x(97)00131-9)

López, L., Chiribao, M. L., Girard, M. C., Gómez, K. A., Carasi, P., Fernandez, M., Hernandez, Y., Robello, C., Freire, T., & Piñeyro, M. D. (2021). The cytosolic tryparedoxin peroxidase from *Trypanosoma cruzi* induces a pro-inflammatory Th1 immune response in a peroxidatic cysteine-dependent manner. *Immunology*, 163(1), 46–59. <https://doi.org/10.1111/imm.13302>

Machado-Silva, A., Cerqueira, P. G., Grazielle-Silva, V., Gadelha, F. R., Peloso, E., Teixeira, S. M., & Machado, C. R. (2016). How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways. *Mutation research. Reviews in mutation research*, 767, 8–22. <https://doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.12.003>

Marshall, E. S., Elshekhiha, H. M., Hakimi, M. A., & Flynn, R. J. (2011). *Toxoplasma gondii* peroxiredoxin promotes altered macrophage function, caspase-1-dependent IL-1 β secretion enhances parasite replication. *Veterinary research*, 42(1), 80. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-42-80>

Martínez E., R. (2010). Identificación de proteínas carboniladas en estrés oxidantes causado por peróxido de hidrógeno en *Trypanosoma cruzi* (Tesis de Maestría). Universidad Nacional Autónoma de México, Coordinación General de Estudios de Posgrado, UNAM. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/3453883>

Martínez, I., Noguera, B., Martínez-Hernández, F., & Espinoza, B. (2013). Microsatellite and mini-exon analysis of Mexican human DTU I *Trypanosoma cruzi* strains and their susceptibility to nifurtimox and benznidazole. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 13(3), 181–187. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1072>

McCord, J. M., & Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry*, 244(22), 6049–6055.

Melo, R., Guarneri, A. A., & Silber, A. M. (2020). The Influence of Environmental Cues on the Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae Vector. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 27. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00027>

Menna-Barreto, R. F., & de Castro, S. L. (2014). The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. *BioMed research international*, 2014, 614014. <https://doi.org/10.1155/2014/614014>

Motyka, S. A., & Englund, P. T. (2004). RNA interference for analysis of gene function in trypanosomatids. *Current opinion in microbiology*, 7(4), 362–368. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2004.06.004>

Muelas-Serrano, S., Nogal-Ruiz, J. J., & Gómez-Barrio, A. (2000). Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology research*, 86(12), 999–1002. <https://doi.org/10.1007/pl00008532>

Murillo-Godínez G. (2018). Chagas disease (American trypanosomiasis). *Med Int Mex.* 2018;34(6):959-970.

Newick K, Cunniff B, Preston K, Held P, Arbiser J, Pass H, Mossman B, Shukla A, Heintz Newick, K., Cunniff, B., Preston, K., Held, P., Arbiser, J., Pass, H., Mossman, B., Shukla, A., & Heintz, N. (2012). Peroxiredoxin 3 is a redox-dependent target of thioestrepton in malignant mesothelioma cells. *PLoS one*, 7(6), e39404. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039404>

Nelson, K. J., Messier, T., Milczarek, S., Saaman, A., Beuschel, S., Gandhi, U., Heintz, N., Smalley, T. L., Lowther, W. T., & Cunniff, B. (2021). Unique Cellular and Biochemical Features of Human Mitochondrial Peroxiredoxin 3 Establish the Molecular Basis for Its Specific Reaction with Thioestrepton. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(2), 150. <https://doi.org/10.3390/antiox10020150>

Nicolussi, A., D'Inzeo, S., Capalbo, C., Giannini, G., & Coppa, A. (2017). The role of peroxiredoxins in cancer. *Molecular and clinical oncology*, 6(2), 139–153. <https://doi.org/10.3892/mco.2017.1129>

Nogoceke, E., Gommel, D. U., Kiess, M., Kalisz, H. M., & Flohé, L. (1997). A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in *Crithidia fasciculata*. *Biological chemistry*, 378(8), 827–836. <https://doi.org/10.1515/bchm.1997.378.8.827>

Nogueira, F. B., Rodrigues, J. F., Correa, M. M., Ruiz, J. C., Romanha, A. J., & Murta, S. M. (2012). The level of ascorbate peroxidase is enhanced in benznidazole-resistant populations of *Trypanosoma cruzi* and its expression is modulated by stress generated by hydrogen peroxide. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107(4), 494–502. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012000400009>

Nogueira, F. B., Ruiz, J. C., Robello, C., Romanha, A. J., & Murta, S. M. (2009). Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial trypanothione peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Parasitology research*, 104(4), 835–844. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-1264-1>

Nogueira, N. P., Saraiva, F. M., Sultano, P. E., Cunha, P. R., Laranja, G. A., Justo, G. A., Sabino, K. C., Coelho, M. G., Rossini, A., Atella, G. C., & Paes, M. C. (2015). Proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have a new trigger: redox status. *PLoS one*, 10(2), e0116712. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116712>

Nosanchuk, J. D., & Casadevall, A. (2006). Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(11), 3519–3528. <https://doi.org/10.1128/AAC.00545-06>

OMS 2021 Nota descriptiva Enfermedad de Chagas en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/es/> consultado el 4 de septiembre 2021.

Onyekwelu, K. C. (2019). Life Cycle of *Trypanosoma cruzi* in the Invertebrate and the Vertebrate Hosts. In (Ed.), *Biology of Trypanosoma cruzi*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84639>

Osorio, L., Ríos, I., Gutiérrez, B., & González, J. (2012). Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who?. *Microbes and infection*, 14(15), 1390–1402. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2012.09.003>

Patterson, S., & Wyllie, S. (2014). Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and prospects. *Trends in parasitology*, 30(6), 289–298. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.04.003>

Pedone, E., Limauro, D., D'Ambrosio, K., De Simone, G., & Bartolucci, S. (2010). Multiple catalytically active thioredoxin folds: a winning strategy for many functions. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 67(22), 3797–3814. <https://doi.org/10.1007/s00018-010-0449-9>

Peloso, E. F., Dias, L., Queiroz, R. M., Leme, A. F., Pereira, C. N., Carnielli, C. M., Werneck, C. C., Sousa, M. V., Ricart, C. A., & Gadelha, F. R. (2016). *Trypanosoma cruzi* mitochondrial trypanothione peroxidase is located throughout the cell and its pull down provides one step towards the understanding of its mechanism of action. *Biochimica et biophysica acta*, 1864(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2015.10.005>

Peloso, E. F., Gonçalves, C. C., Silva, T. M., Ribeiro, L. H., Piñeyro, M. D., Robello, C., & Gadelha, F. R. (2012). Trypanothione peroxidases and superoxide dismutases expression as well as ROS release are related to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes growth phases. *Archives of biochemistry and biophysics*, 520(2), 117–122. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2012.02.020>

Pérez M., D. (2013). Estudio del efecto de diferentes tipos de estrés en el parásito *Trypanosoma cruzi* : consecuencias en su morfología, ultraestructura, capacidad infectiva y expresión de la proteína sHSP16". (Tesis de Doctorado). Universidad Nacional Autónoma de México, México. Recuperado de <https://repositorio.unam.mx/contenidos/100285>

Pérez-Morales, D., Hernández, K. D., Martínez, I., Agredano-Moreno, L. T., Jiménez-García, L. F., & Espinoza, B. (2017). Ultrastructural and physiological changes induced by different stress conditions on the human parasite *Trypanosoma cruzi*. *Cell stress & chaperones*, 22(1), 15–27. <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0736-y>

Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2015). Peroxiredoxins: Guardians Against Oxidative Stress and Modulators of Peroxide Signaling. *Trends Biochem. Sci.* 40, 435–445. doi: 10.1016/j.tibs.2015.05.001

Phan, I. Q., Davies, D. R., Moretti, N. S., Shanmugam, D., Cestari, I., Anupama, A., Fairman, J. W., Edwards, T. E., Stuart, K., Schenkman, S., & Myler, P. J. (2015). Iron superoxide dismutases in eukaryotic pathogens: new insights from Apicomplexa and *Trypanosoma* structures. *Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications*, 71(Pt 5), 615–621. <https://doi.org/10.1107/S2053230X15004185>

Piacenza, L., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Kelly, J. M., Wilkinson, S. R., & Radi, R. (2008). Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *The Biochemical journal*, 410(2), 359–368. <https://doi.org/10.1042/BJ20071138>

Piacenza, L., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Martínez, A., & Radi, R. (2013). *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease. *Antioxidants & redox signaling*, 19(7), 723–734. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4618>

Piacenza, L., Trujillo, M., & Radi, R. (2019). Reactive species and pathogen antioxidant networks during phagocytosis. *The Journal of experimental medicine*, 216(3), 501–516. <https://doi.org/10.1084/jem.20181886>

Piacenza, L., Zago, M. P., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Basombrio, M. A., & Radi, R. (2009). Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence. *International journal for parasitology*, 39(13), 1455–1464. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2009.05.010>

Pino-Marín, A., Medina-Rincón, G. J., Gallo-Bernal, S., Duran-Crane, A., Arango Duque, Á. I., Rodríguez, M. J., Medina-Mur, R., Manrique, F. T., Forero, J. F., & Medina, H. M. (2021). Chagas Cardiomyopathy: From Romana Sign to Heart Failure and Sudden Cardiac Death. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 10(5), 505. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050505>

- Piñeyro, M. D., Parodi-Talice, A., Arcari, T., & Robello, C. (2008). Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease?. *Gene*, 408(1-2), 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.10.014>
- Piñeyro, M. D., Arias, D., Ricciardi, A., Robello, C., & Parodi-Talice, A. (2019). Oligomerization dynamics and functionality of *Trypanosoma cruzi* cytosolic trypanredoxin peroxidase as peroxidase and molecular chaperone. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 1863(10), 1583–1594. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2019.06.013>
- Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases*, 1(2), 92–100. doi:10.1016/s1473-3099(01)00065-2
- Quijano H. I., Dumonteil E. (2011). Advances and challenges toward a vaccine against Chagas disease. *Human Vaccines* 7:11, 1184-1191.
- Ramirez, M. I., Ruiz, R., Araya, J. E., Da Silveira, J. F., & Yoshida, N. (1993). Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. *Infection and immunity*, 61(9), 3636–3641. <https://doi.org/10.1128/iai.61.9.3636-3641.1993>
- Rashdan, N. A., & Pattillo, C. B. (2020). Hydrogen peroxide in the ER: A tale of triage. *Redox biology*, 28, 101358. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101358>
- Rassi, A., Jr, Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet (London, England)*, 375(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Rhee, S. G., and Woo, H. A. (2011). Multiple Functions of Peroxiredoxins: Peroxidases, Sensors, and Regulators of the Intracellular Messenger H₂O₂, and Protein Chaperones. *Antioxid. Redox Signaling* 5, 781–794. doi: 10.1089/ars.2010.3393
- Rodríguez-Hernández, K. D., Martínez, I., Agredano-Moreno, L. T., Jiménez-García, L. F., Reyes-Chilpa, R., & Espinoza, B. (2019). Coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense* produce ultrastructural alterations and affect in vitro infectivity of *Trypanosoma cruzi*. *Phytomedicine*, 152827. doi:10.1016/j.phymed.2019.152827
- Rodríguez-Hernández, K. D., Martínez, I., Reyes-Chilpa, R., & Espinoza, B. (2020). Mammea type coumarins isolated from *Calophyllum brasiliense* induced apoptotic cell death of *Trypanosoma cruzi* through mitochondrial dysfunction, ROS production and cell cycle alterations. *Bioorganic chemistry*, 100, 103894. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103894>
- Rojo-Medina, J., Ruiz-Matus, C., Salazar-Schettino, P. M., & González-Roldán, J. F. (2018). *Gaceta medica de Mexico*, 154(5), 605–612. <https://doi.org/10.24875/GMM.18004515>
- Saccoccia, F., Angelucci, F., Boumis, G., Carotti, D., Desiato, G., Miele, A. E., & Bellelli, A. (2014). Thioredoxin reductase and its inhibitors. *Current protein & peptide science*, 15(6), 621–646. <https://doi.org/10.2174/1389203715666140530091910>
- San Francisco, J., Barría, I., Gutiérrez, B., Neira, I., Muñoz, C., Sagua, H., Araya, J. E., Andrade, J. C., Zailberger, A., Catalán, A., Remonsellez, F., Vega, J. L., & González, J. (2017). Decreased cruzipain and gp85/trans-sialidase family protein expression contributes to loss of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote virulence. *Microbes and infection*, 19(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.08.003>

Sarma, G. N., Nickel, C., Rahlfs, S., Fischer, M., Becker, K., & Karplus, P. A. (2005). Crystal structure of a novel *Plasmodium falciparum* 1-Cys peroxiredoxin. *Journal of molecular biology*, 346(4), 1021–1034. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.12.022>

Scharfstein, J., Schmitz, V., Morandi, V., Capella, M. M., Lima, A. P., Morrot, A., Juliano, L., & Müller-Esterl, W. (2000). Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *The Journal of experimental medicine*, 192(9), 1289–1300. <https://doi.org/10.1084/jem.192.9.1289>

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, baaa062. <https://doi.org/10.1093/database/baaa062>

Shahi, P., Trebicz-Geffen, M., Nagaraja, S., Alterzon-Baumel, S., Hertz, R., Methling, K., Lalk, M., & Ankri, S. (2016). Proteomic Identification of Oxidized Proteins in *Entamoeba histolytica* by Resin-Assisted Capture: Insights into the Role of Arginase in Resistance to Oxidative Stress. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(1), e0004340. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004340>

Specker, G., Estrada, D., Radi, R., & Piacenza, L. (2022). *Trypanosoma cruzi* Mitochondrial Peroxiredoxin Promotes Infectivity in Macrophages and Attenuates Nifurtimox Toxicity. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 749476. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.749476>

Staerck, C., Gastebois, A., Vandeputte, P., Calenda, A., Larcher, G., Gillmann, L., Papon, N., Bouchara, J. P., & Fleury, M. (2017). Microbial antioxidant defense enzymes. *Microbial pathogenesis*, 110, 56–65. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.015>

Stainier, D., Raz, E., Lawson, N. D., Ekker, S. C., Burdine, R. D., Eisen, J. S., Ingham, P. W., Schulte-Merker, S., Yelon, D., Weinstein, B. M., Mullins, M. C., Wilson, S. W., Ramakrishnan, L., Amacher, S. L., Neuhauss, S., Meng, A., Mochizuki, N., Panula, P., & Moens, C. B. (2017). Guidelines for morpholino use in zebrafish. *PLoS genetics*, 13(10), e1007000. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007000>

Summerton, J., & Weller, D. (1997). Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense & nucleic acid drug development*, 7(3), 187–195. <https://doi.org/10.1089/oli.1.1997.7.187>

Tarleton R. L. (2015). CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Seminars in immunopathology*, 37(3), 233–238. <https://doi.org/10.1007/s00281-015-0481-9>

Taylor, M. C., Lewis, M. D., Fortes Francisco, A., Wilkinson, S. R., & Kelly, J. M. (2015). The *Trypanosoma cruzi* vitamin C dependent peroxidase confers protection against oxidative stress but is not a determinant of virulence. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(4), e0003707. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003707>

Teixeira, T. L., Machado, F. C., Alves da Silva, A., Teixeira, S. C., Borges, B. C., Dos Santos, M. A., Martins, F. A., Brígido, P. C., Rodrigues, A. A., Notário, A. F., Ferreira, B. A., Servato, J. P., Deconte, S. R., Lopes, D. S., Ávila, V. M., Araújo, F., Tomiosso, T. C., Silva, M. J., & da Silva, C. V. (2015). *Trypanosoma cruzi* P21: a potential novel target for chagasic cardiomyopathy therapy. *Scientific reports*, 5, 16877. <https://doi.org/10.1038/srep16877>

Trochine, A., Creek, D. J., Faral-Tello, P., Barrett, M. P., & Robello, C. (2014). Benzimidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics. *PLoS neglected tropical diseases*, 8(5), e2844. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002844>

- Trujillo, M., Budde, H., Piñeyro, M. D., Stehr, M., Robello, C., Flohé, L., & Radi, R. (2004). *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxyxynitrite via oxidation of fast reacting thiols. *The Journal of biological chemistry*, 279(33), 34175–34182. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404317200>
- Turrens J. F. (2004). Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Molecular aspects of medicine*, 25(1-2), 211–220. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2004.02.021>
- Wilkinson, S. R., & Kelly, J. M. (2003). The role of glutathione peroxidases in trypanosomatids. *Biological chemistry*, 384(4), 517–525. <https://doi.org/10.1515/BC.2003.060>
- Wilkinson, S. R., & Kelly, J. M. (2009). Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert reviews in molecular medicine*, 11, e31. <https://doi.org/10.1017/S1462399409001252>
- Wilkinson, S. R., Obado, S. O., Mauricio, I. L., & Kelly, J. M. (2002). *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(21), 13453–13458. <https://doi.org/10.1073/pnas.202422899>
- Wilkinson, S. R., Temperton, N. J., Mondragon, A., & Kelly, J. M. (2000). Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of biological chemistry*, 275(11), 8220–8225. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.11.8220>
- Yoshida N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 78(1), 87–111. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652006000100010>
- Yuan, Y., Knaggs, M., Poole, L., Fetrow, J., & Salsbury, F., Jr (2010). Conformational and oligomeric effects on the cysteine pK(a) of tryparedoxin peroxidase. *Journal of biomolecular structure & dynamics*, 28(1), 51–70. <https://doi.org/10.1080/07391102.2010.10507343>
- Zenno, S., Koike, H., Kumar, A. N., Jayaraman, R., Tanokura, M., & Saigo, K. (1996). Biochemical characterization of NfsA, the *Escherichia coli* major nitroreductase exhibiting a high amino acid sequence homology to Frp, a *Vibrio harveyi* flavin oxidoreductase. *Journal of bacteriology*, 178(15), 4508–4514. <https://doi.org/10.1128/jb.178.15.4508-4514.1996>
- Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M., 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>

Producción científica

Artículos en revistas internacionales

Rivera-Santiago, L., Martínez, I., Arroyo-Olarte, R., Díaz-Garrido, P., Cuevas-Hernandez, R. I., & Espinoza, B. (2022). Structural New Data for Mitochondrial Peroxiredoxin From *Trypanosoma cruzi* Show High Similarity With Human Peroxiredoxin 3: Repositioning Thiostrepton as Antichagasic Drug. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 12, 907043. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.907043>

Díaz-Garrido, P., Cárdenas-Guerra, R. E., Martínez, I., Poggio, S., Rodríguez-Hernández, K., **Rivera-Santiago, L.**, Ortega-López, J., Sánchez-Esquivel, S., & Espinoza, B. (2021). Differential activity on trypanosomatid parasites of a novel recombinant defensin type 1 from the insect *Triatoma (Meccus) pallidipennis*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 139, 103673. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2021.103673>

Moreno-Fierros, L., García-Hernández, A. L., Ilhuicatzí-Alvarado, D., **Rivera-Santiago, L.**, Torres-Martínez, M., Rubio-Infante, N., & Legorreta-Herrera, M. (2013). Cry1Ac protoxin from *Bacillus thuringiensis* promotes macrophage activation by upregulating CD80 and CD86 and by inducing IL-6, MCP-1 and TNF- α cytokines. *International immunopharmacology*, 17(4), 1051–1066. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2013.10.005>

Artículos de divulgación

Martínez I, **Rivera-Santiago L**, Espinoza B (2019). Factores de virulencia de *Trypanosoma cruzi* y nuevos compuestos tripanocidas: aportaciones del IIB al combate del Mal de Chagas. *Gaceta Biomédicas* 24 (3): 12-13.

Martínez I y **Rivera-Santiago L** (2020). Control de la expresión proteica mediante oligos morfolidos y su aplicación en investigación biomédica. *Gaceta Biomédicas* 25 (12): 10-11.

Martínez I, **Rivera-Santiago L**, Arroyo Olarte R, Espinoza B (2022). *Trypanosoma cruzi* mitochondrial peroxiredoxin (TcMPX) shares spatial distribution of active site with human peroxiredoxin 3. *Advances in protein folding, evolution, and design* 2022, pag. 92. Electronic Conference Booklet <https://apfed22.uni-bayreuth.de/index/booklet>



Structural New Data for Mitochondrial Peroxiredoxin From *Trypanosoma cruzi* Show High Similarity With Human Peroxiredoxin 3: Repositioning Thiostrepton as Antichagasic Drug

OPEN ACCESS

Edited by:

Vilma G. Duschak,
Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas (CONICET),
Argentina

Reviewed by:

Wilfredo Quiñones,
Universidad de Los Andes
(Venezuela), Venezuela
Miguel A. Chiurillo,
University of Cincinnati, United States

*Correspondence:

Bertha Espinoza
besgu@iibiomedicas.unam.mx

Specialty section:

This article was submitted to
Parasite and Host,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

Received: 29 March 2022

Accepted: 27 May 2022

Published: 06 July 2022

Citation:

Rivera-Santiago L, Martínez I,
Arroyo-Olarte R, Díaz-Garrido P,
Cuevas-Hernandez RI and Espinoza B
(2022) Structural New Data for
Mitochondrial Peroxiredoxin From
Trypanosoma cruzi Show High
Similarity With Human Peroxiredoxin 3:
Repositioning Thiostrepton as
Antichagasic Drug.
Front. Cell. Infect. Microbiol. 12:907043.
doi: 10.3389/fcimb.2022.907043

Lucio Rivera-Santiago, Ignacio Martínez, Ruben Arroyo-Olarte, Paulina Díaz-Garrido, Roberto I. Cuevas-Hernandez and Bertha Espinoza*

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México

Trypanosoma cruzi, the causal agent of Chagas disease, has peroxiredoxins (PRXs) expressed in all stages of the parasite and whose function is to detoxify oxidizing agents, such as reactive oxygen species (ROS). These proteins are central for the survival and replication of the parasite and have been proposed as virulence factors. Because of their importance, they have also been considered as possible therapeutic targets, although there is no specific drug against them. One of them, the mitochondrial PRX (TcMPX), is important in the detoxification of ROS in this organelle and has a role in the infectivity of *T. cruzi*. However, their structural characteristics are unknown, and possible inhibitors have not been proposed. The aim was to describe in detail some structural characteristics of TcMPX and compare it with several PRXs to find possible similarities and repositioning the antibiotic Thiostrepton as a potential inhibitor molecule. It was found that, in addition to the characteristic active site of a 2-cys PRX, this protein has a possible transmembrane motif and motifs involved in resistance to hyper oxidation. The homology model suggests a high structural similarity with human PRX3. This similarity was corroborated by cross-recognition using an anti-human PRX antibody. In addition, molecular docking showed that Thiostrepton, a potent inhibitor of human PRX3, could bind to TcMPX and affect its function. Our results show that Thiostrepton reduces the proliferation of *T. cruzi* epimastigotes, cell-derived trypomastigotes, and blood trypomastigotes with low cytotoxicity on Vero cells. We also demonstrated a synergic effect of Thiostrepton and Beznidazol. The convenience of seeking treatment alternatives against *T. cruzi* by repositioning compounds as Thiostrepton is discussed.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, mitochondrial peroxiredoxin, bioinformatic analysis, repositioning Thiostrepton, trypanocidal activity

INTRODUCTION

The protozoan *T. cruzi* is the etiologic agent of the Chagas disease (American trypanosomiasis), one of the major causes of morbidity and mortality in many countries of Latin America. Because of human migrations, Chagas disease is emerging in other regions (Europe and the United States principally), and it is estimated that 6 to 7 million people are currently infected worldwide (WHO, 2021). *T. cruzi* infects two hosts, the insect vector, a member of the Reduviidae family, and mammals such as humans. During its life cycle within these hosts, the parasite faces oxidant stress. When a vector feeds on a mammal infected with blood trypomastigotes, they travel to the posterior intestine. Large amounts of hemoglobin produced by food are degraded to heme (Nogueira et al., 2015), increasing the production of reactive oxygen species (ROS), which can eliminate the parasite. Another critical component in generating ROS within the vector is the prophenoloxidase present in hemolymph and hemocytes. It participates in melanization, phagocytosis, and encapsulation of parasites (Machado-Silva et al., 2016) and the production of intermediates of ROS and reactive nitrogen species. When the vector feeds on its host, it detects near the suction area, and the host can enter the parasite due to micro-abrasions in the skin caused by scratching. Once *T. cruzi* enters to the host, it interacts with several elements of the immune response like macrophages or neutrophils, which can potentially eliminate it through ROS such as superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), and peroxynitrite (ONOO⁻). The host-parasite relationship has resulted in that *T. cruzi* developed effective mechanisms of evasion and resistance to the immune system as well as efficient antioxidant machinery. The peroxiredoxins (PRXs) are proteins responsible for inactivating ROS, organic peroxides, peroxynitrites, and peroxynitrous acid, which generate an oxidizing environment for the parasite (Perkins et al., 2015).

In *T. cruzi*, five PRXs that are found in specific organelles have been reported: cytosolic PRX (TcCPX), mitochondrial PRX (TcMPX), ascorbate-dependent heme peroxidase present in the endoplasmic reticulum (TcAPX), glutathione peroxidase I present in the glycosome (TcGPXI), and glutathione peroxidase II present in the endoplasmic reticulum (TcGPXII) (Wilkinson et al., 2000).

The mitochondrial enzyme TcMPX is one of the most studied, and it belongs to the typical 2-Cys PRXs, with a molecular weight of ~25 kDa. TcMPX concentrates on the kinetoplast, indicating that its main function is to protect the mitochondrial genome from peroxide-mediated damage (Wilkinson et al., 2000). Furthermore, this enzyme interacts with other molecules such as trypanothione II during oxidative stress conditions (Dias et al., 2018). It has been demonstrated that the overexpression of TcMPX protects *T. cruzi* against a wide range of peroxynitrites derived from immune cells and increases the resistance to H_2O_2 , corroborating its participation as an antioxidant defense mechanism (Piacenza et al., 2008). In addition, during *T. cruzi* differentiation, there is an increase of TcMPX expression in trypomastigotes (infective stage) compared with epimastigotes (non-infective stage), analyzed in

several *T. cruzi* strains (Piacenza et al., 2009). Furthermore, there is a correlation between virulence and the expression levels of these proteins, which could facilitate the establishment of the parasite in the host and resistance to drugs such as Nifurtimox (NF) (Piñeyro et al., 2008; Specker et al., 2022). Finally, TcMPX has a role as a partner of several proteins important for cellular metabolism (Peloso et al., 2016). Therefore, TcMPX has been proposed as an attractive candidate for the development of anti-*T. cruzi* drugs (Wilkinson et al., 2000). However, to date, no studies have been published addressing this possibility *in vivo*, *in vitro*, or *in silico*. In the present work, TcMPX from two *T. cruzi* strains were sequenced and a phylogenetic study was done. An *in silico* analysis was also carried out, and TcMPX structural properties were deduced from a model generated by homology. Finally, the role of a potential inhibitor of TcMPX on the proliferation of *T. cruzi*, cytotoxicity on Vero cells, and synergic effect with Beznidazol (BZ) were evaluated, and its possible role as a therapeutic drug is discussed.

MATERIALS AND METHODS

Parasites and DNA Extraction

Epimastigotes of Mexican TcI Qro (TBAR/MX/0000/Queretaro) and Ninoa (MHOM/MX/1994/Ninoa) strains were cultured as previously described (López-Olmos et al., 1998). Cell-derived trypomastigotes of Qro strain were obtained from Vero cells previously infected as described (Rodríguez-Hernández et al., 2019). Infected cells were cultured in 75-cm² flasks instead using Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), pH 7.2, plus 10% Fetal Bovine Serum (FBS), glutamine (2 mg/ml), penicillin (100 units/ml), and streptomycin (100 mg/ml), in a humidified 5% CO₂ atmosphere at 37°C. For maintenance, confluent cultures cells were washed with 5 mM Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), incubated for 5 min with trypsin (1 mg/ml), diluted, and re-plated. Blood trypomastigotes were obtained from Balb/c mice infected with the Qro strain. Maintenance was performed by bleeding mice every 18–20 days and infecting healthy 8-week-old female mice with 1×10^5 parasites intraperitoneally. Genomic DNA extraction of epimastigotes was performed with the phenol-chloroform technique, using 20 ml of logarithmic phase parasite culture (60×10^6 parasites/ml) (Macedo et al., 1992). Nucleic acid integrity was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis, and its concentration and purity were assessed using a NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). The DNA was kept at -20°C until used.

PCR and TcMPX Sequencing

The Polymerase Chain Reaction (PCR) to amplify TcMPX was performed using 200 ng of DNA, and specific primers were designed using the software *Primer1* (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>): TcMPX-Fw (5'-ATGTTTCGTCGTATGGCCG-3') and TcMPX-Rv (5'-TCATGCGTTTTCTCAAATATTCA-3'). The conditions employed were as follows: 5 U Platinum™ Pfx enzyme (Invitrogen, Massachusetts, USA), 10 mM of each primer, and 4 mM MgCl₂. One initial step of 94°C for 3 min, 35 cycles (30 s

at 94°C, 30 s at 60°C, and 45 s at 68°C), and a final elongation step (5 min at 68°C). The amplicons obtained (330-bp fragment) were purified using the innuPREP DOUBLEpure Kit (Analytik Jena, Jena, Germany). They were sequenced in the Laboratorio de Secuenciación Genómica de la Biodiversidad y de la Salud (UNAM) with the Sanger technique, using a 3500xL genetic analyzer (Applied Biosystems, Massachusetts, USA). The obtained sequences for Qro and Ninoa were analyzed using the software Chromas. The consensus sequence was determined using the software Bioedit. Finally, the two sequences were uploaded to the GenBank as QroMPX (accession number QKE53461.1) and NinoaMPX (QKE53460.1).

Phylogenetic and Comparative Analysis

The molecular weight, isoelectric point, and net charge were determined using the software Pepstats 6.6.0 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web>). The conserved domain-based prediction was performed with the online software SMART (Simple Modular Architecture Research Tool) (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). For the comparative analysis, several sequences of mitochondrial PRXs from different organisms were obtained from GenBank and Protein Data Bank (PDB) (**Supplementary Table 1**). The alignment of the sequences was performed using the software ClustalW. The phylogeny was established by Neighbor-Joining (NJ) analysis, and the bootstrap statistical method (10,000 replicates) was performed with MEGA 7.0. The calculation of the genetic distances was carried out by p-distance. Only the positions with coverage greater than or equal to 95% were considered. The resulting phylogenetic trees were visualized with FigTree V1.4.3 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>). For the identification of conserved amino acids residues and functional motifs, multiple alignments of PRXs were performed using T-coffee (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/tcoffee/>). The prediction of transmembrane helices in QroMPX proteins was done using TMHMM 2.0 software (<https://services.healthtech.dtu.dk/service.php?TMHMM-2.0>).

TcMPX Homology Modeling

The homology modeling of QroMPX was performed by two different platforms: SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>) and Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/>). The resulting models were visualized and compared with PyMol Molecular Graphics System version 2.4.0 (Janson et al., 2017). In addition, the steric arrangement of the amino acids residues and the reliability of the protein structure was validated by the software Procheck, whereas the general rate of error frequencies was established using the software ERRAT. Both software are included in the package SAVES v6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>).

Immunodetection by Western Blot Using a Commercial Antibody

As described above, epimastigotes of *T. cruzi* Qro strain were cultured for four days. The parasites were harvested and heat-killed at 100°C for 5 min in lysis buffer (12% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), 10 mM Hepes, pH 7.0). The protein was quantified with the DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, California, USA). Then, 12 µg of the protein were separated by electrophoresis in a 12%

SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) and blotted to nitrocellulose membrane. Western blot (WB) analysis was performed by anti-PRX IgG1 B-11 (1:2,000) (137222, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA) as primary antibody and anti-Mouse IgG-Peroxidase (1:4000) (A-9044, Sigma Aldrich, Missouri, USA) as a secondary antibody. The WB was revealed by the addition of 3,3-diaminobenzidine (D5637, Sigma Aldrich, Missouri, USA).

Molecular Docking With TS

To explore the possible interaction between QroMPX and Thioestrepton (TS), we performed an *in silico* molecular docking study using AutoDock Vina (ADV) 1.1.2 on Mac OS X System (Trott and Olson, 2010). The receptors used for this analysis were the QroMPX model obtained by homology and human PRX3 (PDB 5JCG). Receptors and TS ligand (PDB ID: 2L2W) were prepared and converted to *.PDBQT files in AutoDockTools 1.5.6 (Sanner, 1999). Protein preparation was performed using a standard protocol consisting of the removal of co-crystallized ligands and water molecules; polar hydrogens were added, and Kollman charges for all receptor atoms were computed to assess hydrogen-bonding interactions. All the other parameters were kept at their default settings. The TS ligand was docked at each receptor using a grid box: 60 Å × 60 Å × 60 Å centered at the midpoint between the C α of the peroxidatic and resolutive cysteines (C_P and C_R, respectively). That is, grid center for PRX3: X = 5.865 Å, Y = -27.873 Å, and Z = -27.243 Å; and grid center for QroMPX: X = 23.17 Å, Y = 23.233 Å, and Z = -3.844 Å. The docking algorithm of ADV was used to find the best complex between ligand and protein. A maximum of 20 conformers were considered for each ligand, and the complex with the most favorable free binding energy was selected for analyzing the interactions and the binding mode between the PRXs and TS with MGLTools 1.5.6 and Discovery Studio Visualizer v21 software.

TS Activity on *T. cruzi*

TS (Sigma, T8902), a human PRX3 inhibitor used in anti-cancer therapies, was tested for its ability to *T. cruzi* damage. Epimastigotes (2×10^6) were seeded in 96-well plates (200 µl per well) and incubated at 28°C in the presence or absence of several concentrations of TS (1–40 µM) for 24 and 48 h. Benznidazole (BZ, 25 µM) or vehicle (Dymethyl sulfoxide (DMSO) 0.5%) were included as positive and negative controls, respectively. Then, the parasite number in the culture was counted in a Neubauer hemocytometer and reported as a growth percentage. Each condition was evaluated in duplicate in three independent assays. Analysis by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison was done using GraphPad Prism version 5 for Windows. The mean lethal concentration (IC₅₀) of TS to eliminate 50% of the parasites present in the culture was calculated as previously described (Martínez et al., 2013).

Supernatants containing cell-derived trypomastigotes were collected from Vero cells infected with Qro strain by centrifugation at 3,000×g for 20 min and resuspended in complete DMEM medium (Invitrogen, USA). Parasites were counted by microscopic observation using a Neubauer hemocytometer and adjusted to 2×10^6 /ml. Parasites were seeded

(100 μ l per well) in duplicates in a 96-well microplate, in presence or absence of several concentrations of TS and BZ as above, and incubated at 37°C, with 5% of CO₂ for 24 h as reported previously for other compounds (Adessi et al., 2022). Parasite number was counted as described above. Each condition was evaluated in duplicate in two independent assays. Blood trypomastigotes were obtained as described in Section 2.1. Parasites were counted and blood was diluted with DMEM medium to reach 2×10^6 trypomastigotes/ml as described previously (Sánchez Alberti et al., 2022). These parasites were incubated with TS, like cell-derived trypomastigotes. Parasite number was counted as described above and reported as the percent of parasites. Each condition was evaluated in duplicate in three independent experiments. Statistical analysis was done as reported for epimastigotes.

Cell Cytotoxicity Assay on Vero Cells

Vero cells were maintained in DMEM medium supplemented with 10% FBS and reseeding 1/6 of the total culture content every third day. Cytotoxicity produced by TS was evaluated using 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Briefly, Vero cells were seeded in a 96-well plate (5,000 per well) and allowed to adhere for 12 h. Then, the medium was removed, and 200 μ l of DMEM was added in the absence or presence of TS at concentrations of 2.5 to 40 μ M for further 24 h. Next, the medium was removed, and three washes with PBS were performed. Then, 200 μ l of DMEM was added in the presence of MTT at 0.8 mg/ml (Sigma, USA) and incubated for 4 h at 37°C. The medium was removed, and the formazan salt was solubilized using 120 μ l of DMSO. Absorbance was recorded in a microplate reader with a wavelength of 595 nm and a filter of 655 nm as reference. Three independent assays with duplicates of each condition were performed. Data were plotted and analyzed by one-way ANOVA using GraphPad Prism software.

Synergy Effect Between TS and BZ

To evaluate the synergistic effect of TS and BZ, first, we calculated the BZ IC₅₀ on cell-derived trypomastigotes; we incubated the parasites with several concentrations of BZ (0.39–50 μ M) for 24 h. The IC₅₀ was calculated as 0.96 ± 0.04 (Supplementary Figure 3). Then, we used the BZ IC₅₀ in synergy assays with TS. Cell-derived trypomastigotes (2×10^5) were seeded in 96-well plates (100 μ l per well) and incubated at 37°C with 5% of CO₂ in the presence or absence of several concentrations of TS (1.25–10 μ M) and BZ at 1.0 μ M for 24 h. Parasites in the culture were counted in a Neubauer hemocytometer and reported as parasite percent. Three independent assays with duplicates of each condition were performed. Using GraphPad Prism software, data were plotted and analyzed by non-linear regression with Kolmogorov–Smirnov posttest.

RESULTS

QroMPX and NinoAMPX Sequences Analysis

The QroMPX and NinoAMPX have the same nucleotide sequences and do not show differences in their protein

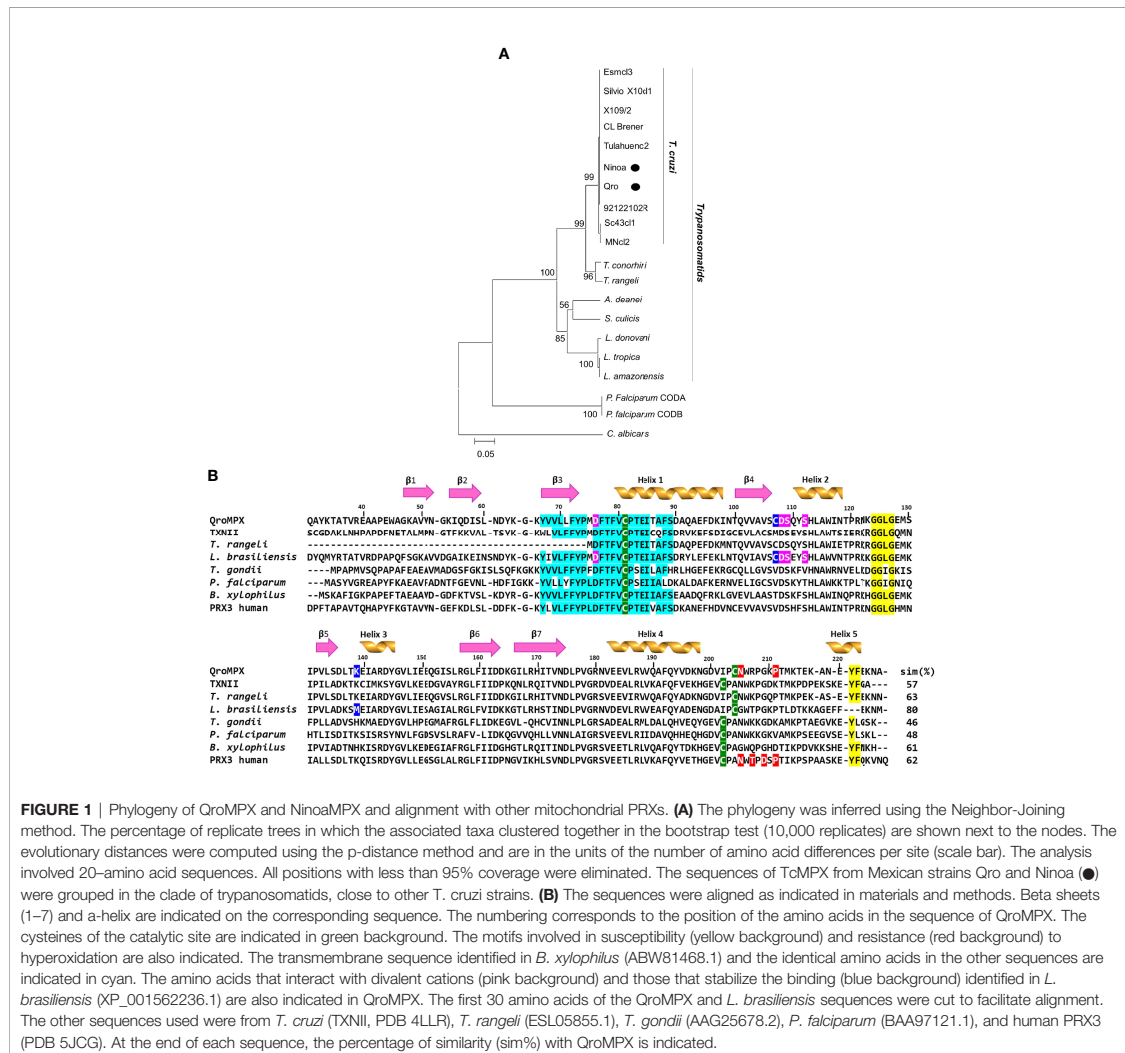
sequences (data not shown). Both TcMPX have a predicted size of 226 aa, a molecular weight of 25.5 kDa, an isoelectric point of 7.65, and a net electric charge of 2. A NJ analysis was performed to establish the phylogeny of both proteins. The topology of the obtained tree shows that both sequenced proteins belong to the trypanosomatids clade. Both protein sequences are very similar to the other from *T. cruzi* because tree topology shows a comb structure, characteristic of sequences that are highly similar to each other (Figure 1A).

Multiple Alignments and Functional Motifs Identification

Because of the high identity between QroMPX and NinoAMPX, we decided to work only with the QroMPX as a representative molecule. Multiple alignments were performed with other MPX (including the best-known human PRX3) to establish the presence of functional motifs in the sequence. This analysis showed a percentage of 48%–63% of similarity between QroMPX and the other proteins. In addition, the peroxidatic cysteine (Cp81) and resolving cysteine (C_R204) from the catalytic site are almost the same in all PRX. However, the second catalytic site in QroMPX has two amino acid changes (IPC instead of VCP). This is one of the notable differences between QroMPX and the mitochondrial trypanoxin TXNII from *T. cruzi* that does preserve the VCP sequence at the C-terminus. Adjacent to the C_R (C204) are present two amino acids (N205 y P211) and GGLG and YF motifs, involved in events of hyper oxidation on several PRXs (Figure 1B).

QroMPX Homology Modeling

The models generated by homology in the two platforms used were very similar (Supplementary Figure 1A). Furthermore, a similarity was observed between the amino acid sequence Y67 to S89 of QroMPX with a transmembrane motif described in *B. xylophilus*. Because of this, an analysis was carried out to establish the probability that QroMPX is a transmembrane protein, and the probability is 0.014. Therefore, there is no enough evidence to say that QroMPX can be a transmembrane protein under this analysis. The validation of the model using the Ramachandran plot showed that 90.2% of the amino acids are in the favorable region, indicating good reliability of the structure. The ERRAT plot showed a quality factor of 95.7%, indicating a good model quality. Thus, the model was representative with seven parallel and antiparallel β -sheets, and five α -helices of different lengths (Figure 2A). The resulting modeling in all the servers suggests that the template for our target protein (QroMPX) was the human PRX3. The structural similarity between both proteins is highlighted when they are overlapped (Figure 2B). The molecular modeling showed that QroMPX monomers could interact forming an interface type B to generate homodimers (Supplementary Figure 2A). They could be formed by the interaction of the β 7 sheets from each subunit (Supplementary Figure 2B). By assembling five dimers, the formation of oligomers (decamers) was also modeled (Supplementary Figure 2C), and the electric charges in the oligomer show that the negative charges are preferably



distributed inside the structure (Supplementary Figure 2D) as reported in other PRXs.

The C_P (C81) from a QroMPX monomer could be associated with the C_R (C204) from the adjacent monomer. In this conformational structure, C_P is surrounded by the catalytic triad formed by the amino acid residues P74, T78, and R157, close to the motifs GGLG and YF, whereas C_R is close to the amino acid residues N205 and P211 (Figure 2C). The location of the amino acid around the catalytic site is very similar to the human PRX3 (Figure 2D).

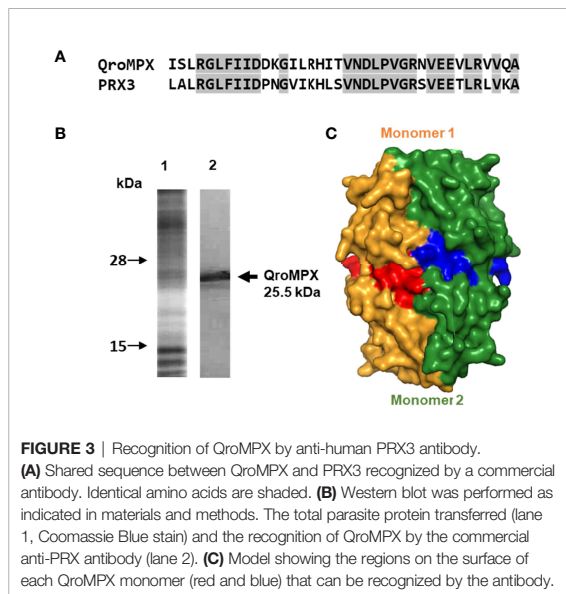
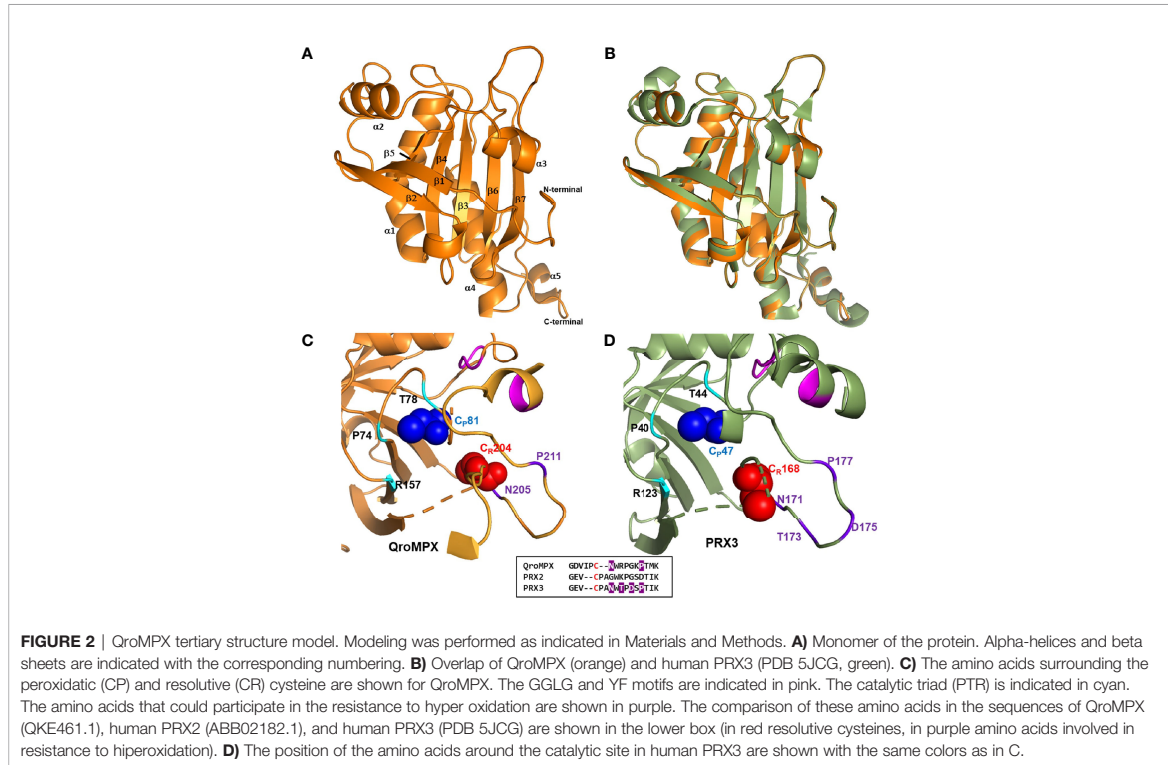
Similarity Between QroMPX and PRX3

Because of the observed similarity between human PRX3 and QroMPX, it was decided to test whether a commercial anti-PRX

antibody that recognizes the former could also recognize the *T. cruzi* protein because the amino acid sequence recognized by the commercial antibody is very similar in both proteins (Figure 3A). The commercial antibody recognized in a *T. cruzi* total protein extract a protein with molecular weight close to that predicted from TcMPX (Figure 3B). Interestingly, when modeling the recognition site in the QroMPX dimer, it was observed that a region of the sequence is exposed on the surface of the molecules, which could facilitate the recognition of these structures by commercial antibodies (Figure 3C).

TS-QroMPX Docking

Because QroMPX and human PRX3 are structurally similar, there is a possibility that QroMPX was susceptible to PRX3



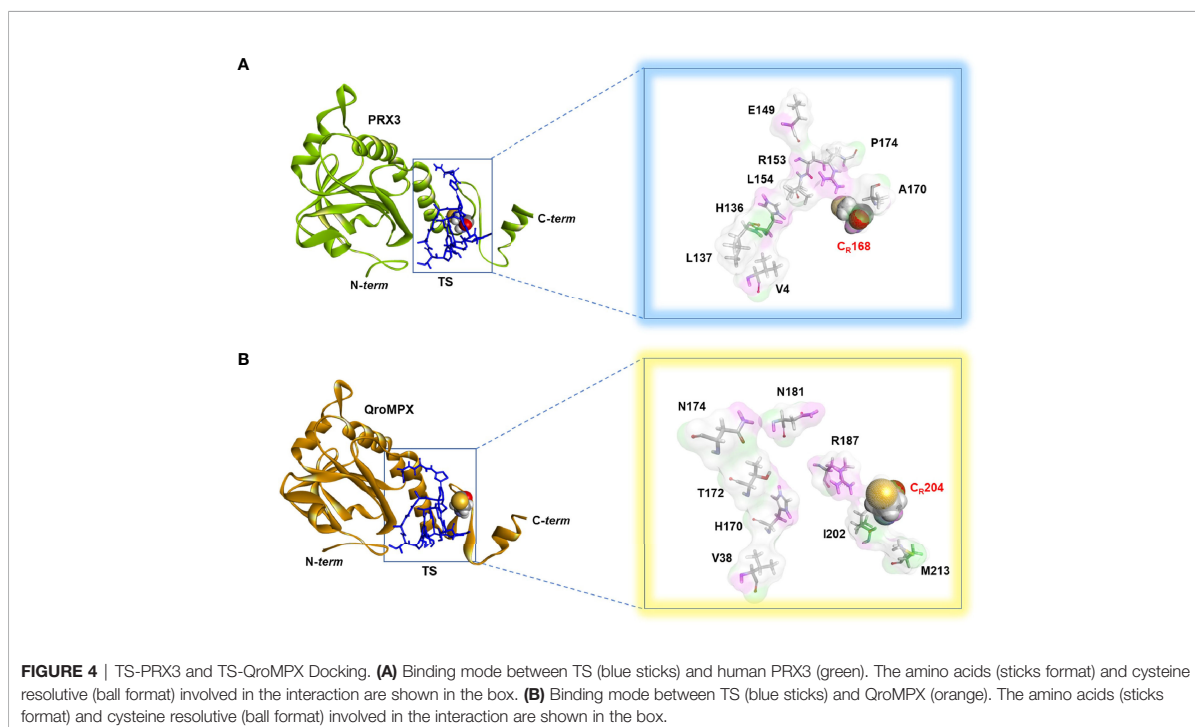
minimum energy for the protein QroMPX obtained by homology and for PRX3 obtained from the PDB (5JCG). To eliminate bias from the rigid nature of the receptor in our model, we used one monomer of each protein for ligand-receptor interaction analysis, because the ligand (TS) would be physically hindered by its bulk. Therefore, our results showed that TS has an affinity for the catalytic site, particularly, the resolutive-cysteine (C_R) in PRX3 (Figure 4A). Something similar was observed in the TS-QroMPX interaction model in which, in addition to the resolutive cysteine, the amino acids V38, H170, T172, N174, N181, R187, I202, CR204, and M213 are involved, with a $\Delta G = 7.0$ kCal/mol (Figure 4B). These results suggest that TS has a high probability of binding to cysteines in the catalytic domain of QroMPX and interfering with their biological activity.

TS Activity on *T. cruzi*

To establish whether TS could reduce the growth of *T. cruzi* as it does with some cancer cells, epimastigotes were incubated in the presence of this compound for 24 and 48 h. It was observed that TS reduced the number of parasites only at 48 h of incubation at concentrations of 20 and 40 μM (Figure 5A). The IC_{50} value was established at $40 \pm 7.5 \mu M$.

It was observed that TS has a high trypanocidal effect on the infective state of *T. cruzi* because, at 24 h, more than 50% of the cell-derived trypomastigotes had been eliminated with less than 5 μM of the compound (Figure 5B). The IC_{50} value was

inhibitors such as the antibiotic TS. To explore this hypothesis, we performed an in silico molecular docking study. Our computational model considered a stable conformation of



calculated at $4.5 \pm 0.7 \mu\text{M}$. On the other hand, blood trypomastigotes were also sensitive to the effect of TS because, with $20 \mu\text{M}$ of TS, more than 65% of the parasites were eliminated from the culture (**Figure 5C**). The IC_{50} value was calculated at $11 \pm 2.6 \mu\text{M}$. No morphological damage was observed at optical microscopy. Preliminary experiments show no effect on intracellular amastigotes at 24 h of incubation with several TS concentrations.

Cytotoxicity Effect of Ts on Vero Cells

A significant decrease in the metabolic activity of Vero cells was observed in the presence of TS, but this was not greater than 25%, even at the highest TS concentration used ($40 \mu\text{M}$). The IC_{50} for Vero cells is greater than $40 \mu\text{M}$, but it could not be established, so the selectivity index could not be calculated. The cytotoxicity of TS on Vero cells was moderate since between 62% and 72% of the cells maintained their metabolic activity (**Figure 5D**).

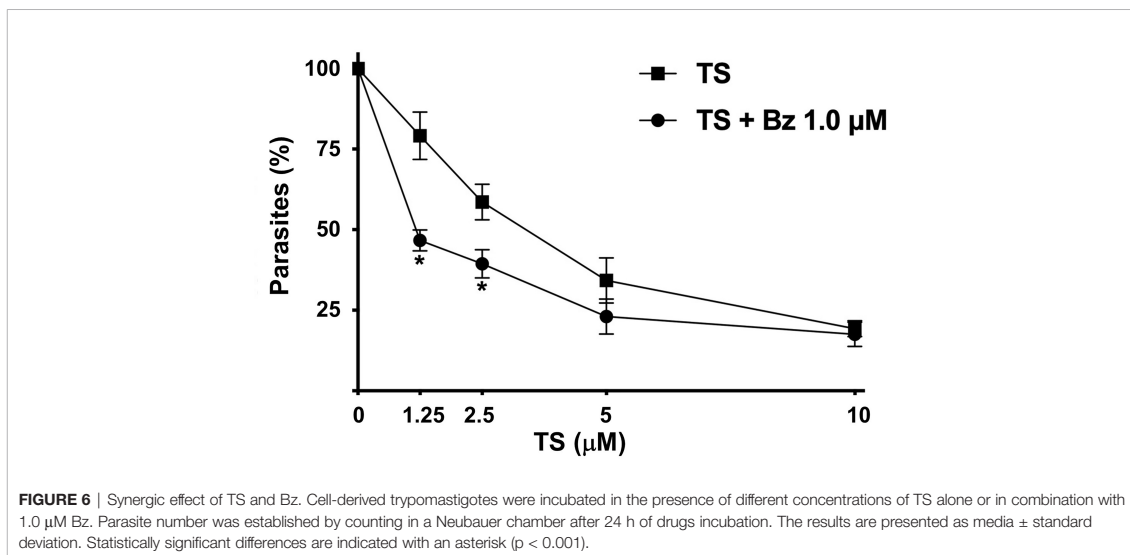
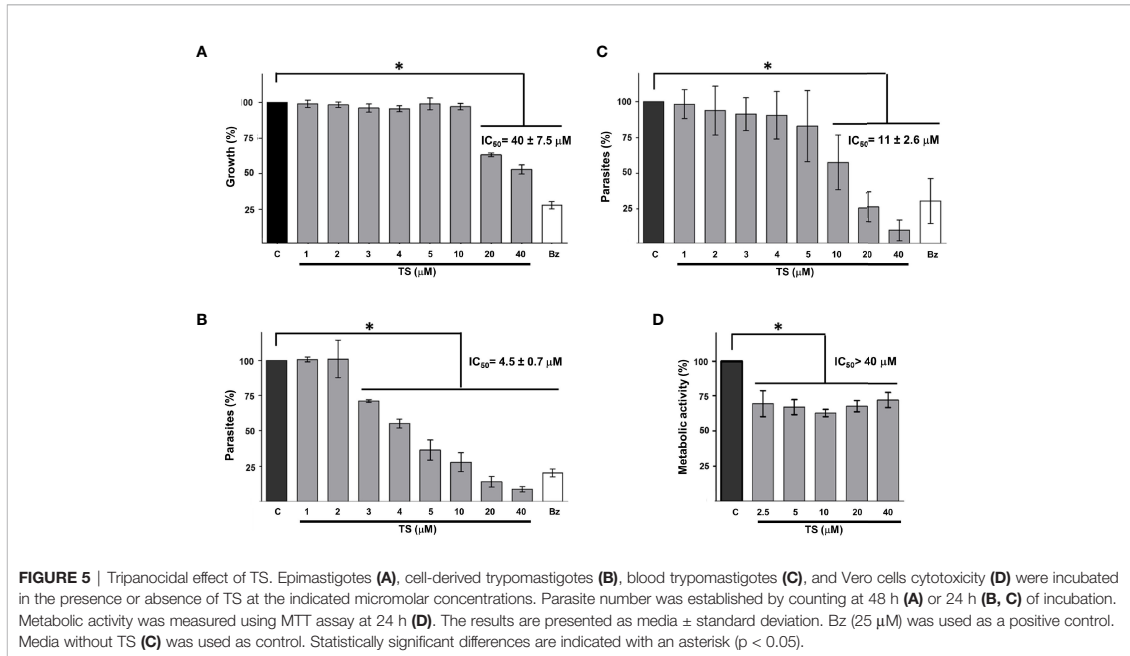
Synergic Effect Between TS and BZ

Because of the trypanocidal effect of TS on *T. cruzi* trypomastigotes, we evaluate a possible synergic effect with BZ. Using the combination of $1.25 \mu\text{M}$ TS and $1.0 \mu\text{M}$ BZ, a 46.66% presence of parasites was observed. By contrast, 79.14% of parasites were observed with TS alone at the same concentration. Similar results were observed with $2.5 \mu\text{M}$ TS and $1.0 \mu\text{M}$ BZ because 39.38% of parasites were found versus 58.57% with TS alone. There were no significant differences comparing 5 and $10 \mu\text{M}$ TS alone or with BZ (**Figure 6**).

DISCUSSION

There are no effective vaccines or drugs against *T. cruzi*, and the available drugs (NF and BZ) have low efficacy to treat the chronic phase of this disease and cause several side effects (Lascano et al., 2020). With the purpose to find new therapeutic targets, metabolic and defense pathways in *T. cruzi* have been studied in recent years. The detoxification of ROS is one of the main mechanisms implicated in the survival of the parasite, and for this reason, antioxidant enzymes have been considered as good therapeutic targets (González-Chávez et al., 2015).

The TcMPX have received particular attention due to their role as partner of several important proteins for cellular metabolism, as well as a virulence factor by protecting *T. cruzi* against NF effect, macrophage-derived peroxynitrite, and avoiding redox imbalance by ROS during mitochondrial energy generation (Piacenza et al., 2008; Piacenza et al., 2009; Peloso Ede et al., 2011; Piacenza et al., 2013; Peloso et al., 2016; Specker et al., 2022). In this study, the TcMPX from Querétaro and Ninoa Mexican *T. cruzi* strains were sequenced and analyzed *in silico*. The phylogenetic analysis showed that they are highly conserved proteins among *T. cruzi* strains, which suggests that variations in the sequence could affect their function and compromise the viability of *T. cruzi*. In addition, TcMPX is a single copy gene (Yeo et al., 2011). These reasons make it an attractive therapeutic target. However, to date, no inhibitor has been reported for this protein.



When comparing the sequence from QroMPX with other PRX previously characterized, we find that it shares 57% similarity with mitochondrial peroxidase (TXNII) reported in *T. cruzi* with which it interacts in oxidative stress conditions (Dias et al., 2018). Although both QroMPX and TXNII are mitochondrial, their similarity percentage is lower than that

between QroMPX and human PRX2 and PRX3. This explains why homology modeling pointed to human PRX3 as temperate.

In addition, it was observed that the similarity is higher with MPX from other trypanosomatids (*L. brasiliensis* or *T. rangeli*) and human PRX3. This similarity of more than 60% in the sequence and highly similar spatial disposition of the QroMPX

3D model with PRX3 could suggest a similar function for both proteins, like an increase in its expression during heat stress events as has been shown for human PRX3 (Tchouagué et al., 2019). Although specific analysis showed that Qro MPX is unlikely to be a transmembrane protein, the presence of a sequence that has been proposed as a transmembranal domain in other PRXs opens the possibility that this protein may be secreted by *T. cruzi* or actively transported to the extracellular environment, probably to counteract ROS produced by the host, as proposed for other PRXs of trypanosomatids (Cuervo et al., 2009; Gadelha et al., 2013). It has been proposed that the PRX from *B. xylophilus* could use this motif to be transported across the intracellular membranes by ABC transporters (Li et al., 2011). This possibility cannot yet be ruled out for QroMPX and should be explored in the future. The possibility that this protein can be transported across the mitochondrial membrane or interact with it during cellular events has not been described and still needs to be explored as reported for other PRXs (Sasagawa et al., 2001; Choi et al., 2005). However, for the moment, we propose that it could be in soluble form as other mitochondrial and chloroplast PRXs (Flohé and Harris, 2007).

In the QroMPX sequence, the presence of GGLG and YF motifs was observed, which have been associated with the susceptibility of some PRXs to be hyper oxidated, leading to their inactivation (Cox et al., 2009). The QroMPX reported in this study is the first to be reported in *T. cruzi* with the presence of these structural motifs.

In addition, the molecular modeling showed that QroMPX monomers could interact by its β 7-sheets, forming an interface type B to generate homodimers, as it was exemplified for other 2-cys PRXs (Poole and Nelson, 2016). In these structures, the C_P (C81) from a monomer could be associated with the C_R (C204) from the adjacent monomer. In this conformational structure, the arrangement of the GGLG and YF motifs and the catalytic triad (P74, T78, and R157) around the catalytic site are very similar to the human PRX3. This would facilitate the hyper oxidation of the molecule, but the presence and position of the amino acids N205 and P211 close to C_R (C204) indicate that QroMPX could be partially resistant to this phenomenon because the resistance to over-oxidation events in PRX3 is given by the presence of four amino acids (NTDP) in a similar position close to the C_R (Cox et al., 2009). Homology modeling also suggests that dimers can assemble into oligomers.

On other hand, several PRXs from protozoa have been proposed as therapeutic targets using molecules that inhibit it, which leads to a reduction in the resistance to oxidative stress (Haraldsen et al., 2009; König et al., 2011). Because of the similarity between QroMPX and PRX3, as well as the arrangement of the active site cysteines and the amino acids that surround them, it is very probable that QroMPX will be susceptible to the same inhibitors as PRX3. This feature can be used to reposition molecules that are currently therapeutic in humans. Several iron chelator molecules such as triapine, auranofin, and cisplatin reduce the presence of human PRX3 and have a pharmacological use in the treatment of some types of cancer (Myers, 2016). It would be interesting to test whether these molecules affect the *T. cruzi* proliferation or viability.

Another molecule is TS, an excellent inhibitor of PRX3 that interacts with the active site cysteines, and this molecule also induces an oxidative stress condition in several types of cancer cells and is used as a treatment to reduce cell growth (Nelson et al., 2021). TS and some derivatives have shown good activity against protozoa as *Babesia* and *Plasmodium* sp. but have not been tested against other protozoa such as *T. cruzi* (Aminake et al., 2011; Aboulaila et al., 2012).

Docking analysis suggested that TS could bind to the resolutive-cysteine in the catalytic site, but we do not rule out the possibility that both cysteines are involved because the functional unit of PRX is dimeric in a biological environment (Poole and Nelson, 2016). Likewise, because of the similarity found in the amino acid sequence (>55%) between QroMPX and TXNII, it is highly probable that TS also interacts with this protein, and the inhibition of both PRXs could be related to a synergistic effect.

When we incubated epimastigotes of *T. cruzi* for 48 h in the presence of TS, a reduction in the multiplication of the parasite in the culture was observed, without obvious morphological changes in the remaining parasites. In addition, cell-derived trypomastigotes and blood trypomastigotes (both infective) were susceptible to the trypanocidal effect of TS, but in a shorter time and with a lower drug concentration. At 24 h of incubation with different concentration of TS, no significant differences with respect to control groups were observed in intracellular amastigotes. Longer incubation time periods and combination with other drugs should be investigated in future works.

Previously, it has been shown that disrupting the electron transport chain in *T. cruzi* epimastigotes inhibits growth (Aldunate et al., 1986). The interaction between TS and QroMPX could interrupt the electron transport chain involved in the mitochondrial antioxidant network, leading to growth inhibition. On the other hand, it was very important to observe that *T. cruzi* trypomastigotes are more susceptible to the trypanocidal effect of TS because they are the ones that infect mammalian hosts, including humans. It has previously been shown that trypomastigotes from several strains of *T. cruzi* have two to six times more TcMPX than epimastigotes, so it has been proposed that it is one of the important enzymes for maintaining redox balance during energy generation in the infective stage (Piacenza et al., 2009; Gadelha et al., 2013). In addition, it has been reported that mitochondrial activity is greater in trypomastigotes than in epimastigotes, with the consequent production of H_2O_2 (Gonçalves et al., 2011). Because of this abundance of the protein and its biological role, it would be expected that when it is inhibited by TS, the effects would be faster and stronger on trypomastigotes than epimastigotes, which is consistent with the IC_{50} differences observed.

TS IC_{50} values for cell-derived trypomastigotes (4.5 μ M) and blood trypomastigotes (11 μ M) are lower than those concentration used for healthy human cells. We observed that the IC_{50} of TS on Vero cells is greater than 40 μ M, which is higher than the solubility limit of the compound. Similar results have been reported for human epidermal melanocytes at 24 h (Qiao et al., 2012).

TS can be used in combination with the classical treatment against Chagas disease. We compare the synergic effect of TS and BZ in trypomastigotes to reduce the concentration of both compounds, and we observed a significant reduction in the parasite number with the lowest TS-BZ combination used. Intriguingly, at high doses, we do not find synergic effect; further work should be done to address this phenomenon.

Therefore, the results obtained are promising, and they could be improved by making modifications to TS to make it more specific to PRX or by searching for similar molecules with higher selectivity.

Furthermore, the possibility of using TS in an animal model of infection with *T. cruzi*, as well as the mechanism of action, should be explored. In addition, the repositioning of this molecule, which is currently used in the human treatment of some oncological diseases, can be an alternative for a better Chagas disease treatment.

CONCLUSIONS

The results reported in the present work suggest that TcMPX from *T. cruzi* has a high similarity with human PRX3, so this characteristic could be exploited to evaluate its susceptibility to inhibitors and their derivatives that are currently used for therapeutic purposes, such as TS that was found that reduced the growth of the parasite by a mechanism that could involve the change in the mitochondrial metabolism of *T. cruzi*.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found in the article/**Supplementary Material**.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by the Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio following the

REFERENCES

- Aboulaïla, M., Munkhjargal, T., Sivakumar, T., Ueno, A., Nakano, Y., Yokoyama, M., et al. (2012). Apicoplast-Targeting Antibacterials Inhibit the Growth of *Babesia* Parasites. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (6), 3196–3206. doi: 10.1128/aac.05488-11
- Adessi, T. G., Ana, Y., Stempin, C. C., García, M. C., Bisogno, F. R., Nicotra, V. E., et al. (2022). Psilostachyins as Trypanocidal Compounds: Bioguided Fractionation of *Ambrosia Tenuifolia* Chemically Modified Extract. *Phytochemistry* 194, 113014. doi: 10.1016/j.phytochem.2021.113014
- Aldunate, J., Ferreira, J., Letelier, M. E., Repetto, Y., and Morello, A. (1986). T-Butyl-4-Hydroxyanisole, a Novel Respiratory Chain Inhibitor. Effects on *Trypanosoma Cruzi* Epimastigotes. *FEBS Lett.* 195 (1-2), 295–297. doi: 10.1016/0014-5793(86)80180-6
- Aminake, M. N., Schoof, S., Sologub, L., Leubner, M., Kirschner, M., Arndt, H. D., et al. (2011). Thiostrepton and Derivatives Exhibit Antimalarial and Gametocytocidal

recommendation of the Ethical Code of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM (<https://www.biomedicas.unam.mx/wp-content/pdf/intranet/reglamentos/codigo-etico-iibo.pdf?x88126>).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LR-S, IM, and BE designed the experiments. LR-S and RA-O sequenced the proteins. LR-S, PD-G, and IM performed homology modeling and bioinformatic analysis. LR-S and RC-H performed the molecular docking. LR-S and IM carried out the trypanocidal activity assays. LR-S, IM, and BE wrote the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

BE acknowledges the financial support of DGAPA-PAPIIT, UNAM-IN206620, NUATEI-IIB 2019-2021, and CONACYT (CB) 160671.

ACKNOWLEDGMENT

Lucio Rivera-Santiago is a doctoral student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and has received CONACyT fellowship 266855 and the support of the Carlos Espinosa Fuentes Trust. Authors are grateful to Patricia de la Torre from Instituto de Investigaciones Biomédicas for the support on the sequencing and to Beatriz Ruiz-Villafan for providing the TS.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.907043/full#supplementary-material>

- Activity by Dually Targeting Parasite Proteasome and Apicoplast. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55 (4), 1338–1348. doi: 10.1128/aac.01096-10
- Choi, M. H., Sajed, D., Poole, L., Hirata, K., Herdman, S., Torian, B. E., et al. (2005). An Unusual Surface Peroxiredoxin Protects Invasive *Entamoeba Histolytica* From Oxidant Attack. *Mol. Biochem. Parasitol.* 143 (1), 80–89. doi: 10.1016/j.molbiopara.2005.04.014
- Cox, A. G., Pearson, A. G., Pullar, J. M., Jönsson, T. J., Lowther, W. T., Winterbourn, C. C., et al. (2009). Mitochondrial Peroxiredoxin 3 is More Resilient to Hyperoxidation Than Cytoplasmic Peroxiredoxins. *Biochem. J.* 421 (1), 51–58. doi: 10.1042/bj20090242
- Cuervo, P., De Jesus, J. B., Saboia-Vahia, L., Mendonça-Lima, L., Domont, G. B., and Cupolillo, E. (2009). Proteomic Characterization of the Released/Secreted Proteins of *Leishmania (Viannia) Braziliensis* Promastigotes. *J. Proteomics* 73 (1), 79–92. doi: 10.1016/j.jprot.2009.08.006
- Dias, L., Peloso, E. F., Leme, A. F. P., Carnielli, C. M., Pereira, C. N., Werneck, C. C., et al. (2018). *Trypanosoma Cruzi* Tryparedoxin II Interacts With Different

- Peroxiredoxins Under Physiological and Oxidative Stress Conditions. *Exp. Parasitol.* 184, 1–10. doi: 10.1016/j.exppara.2017.10.015
- Flohé, L., and Harris, J. R. (2007). Introduction. History of the Peroxiredoxins and Topical Perspectives. *Subcell. Biochem.* 44, 1–25. doi: 10.1007/978-1-4020-6051-9_1
- Gadelha, F. R., Gonçalves, C. C., Mattos, E. C., Alves, M. J., Piñeyro, M. D., Robello, C., et al. (2013). Release of the Cytosolic Tryparedoxin Peroxidase Into the Incubation Medium and a Different Profile of Cytosolic and Mitochondrial Peroxiredoxin Expression in H₂O₂-Treated *Trypanosoma Cruzi* Tissue Culture-Derived Trypomastigotes. *Exp. Parasitol.* 133 (3), 287–293. doi: 10.1016/j.exppara.2012.12.007
- Gonçalves, R. L., Barreto, R. F., Polycarpo, C. R., Gadelha, F. R., Castro, S. L., and Oliveira, M. F. (2011). A Comparative Assessment of Mitochondrial Function in Epimastigotes and Bloodstream Trypomastigotes of *Trypanosoma Cruzi*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43 (6), 651–661. doi: 10.1007/s10863-011-9398-8
- González-Chávez, Z., Olin-Sandoval, V., Rodríguez-Zavala, J. S., Moreno-Sánchez, R., and Saavedra, E. (2015). Metabolic Control Analysis of the *Trypanosoma Cruzi* Peroxide Detoxification Pathway Identifies Tryparedoxin as a Suitable Drug Target. *Biochim. Biophys. Acta* 1850 (2), 263–273. doi: 10.1016/j.bbagen.2014.10.029
- Haraldsen, J. D., Liu, G., Botting, C. H., Walton, J. G., Storm, J., Phalen, T. J., et al. (2009). Identification of Conoidin a as a Covalent Inhibitor of Peroxiredoxin II. *Org. Biomol. Chem.* 7, 3040–3048. doi: 10.1039/b901735f
- Janson, G., Zhang, C., Prado, M. G., and Paiardini, A. (2017). PyMod 2.0: Improvements in Protein Sequence-Structure Analysis and Homology Modeling Within PyMOL. *Bioinformatics* 33 (3), 444–446. doi: 10.1093/bioinformatics/btw638
- König, J., Wyllie, S., Wells, G., Stevens, M. F., Wyatt, P. G., and Fairlamb, A. H. (2011). Antitumor Quinol PMX464 is a Cytocidal Anti-Trypanosomal Inhibitor Targeting Trypanothione Metabolism. *J. Biol. Chem.* 286 (10), 8523–8533. doi: 10.1074/jbc.M110.214833
- Lascano, F., Garcia Bournissen, F., and Altcheh, J. (2020). Review of Pharmacological Options for the Treatment of Chagas Disease. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 88 (2), 383–402. doi: 10.1111/bcp.14700
- Li, Z., Liu, X., Chu, Y., Wang, Y., Zhang, Q., and Zhou, X. (2011). Cloning and Characterization of a 2-Cys Peroxiredoxin in the Pine Wood Nematode, *Bursaphelenchus Xylophilus*, a Putative Genetic Factor Facilitating the Infestation. *Int. J. Biol. Sci.* 7 (6), 823–836. doi: 10.7150/ijbs.7.823
- López-Olmos, V., Pérez-Nasser, N., Piñero, D., Ortega, E., Hernandez, R., and Espinoza, B. (1998). Biological Characterization and Genetic Diversity of Mexican Isolates of *Trypanosoma Cruzi*. *Acta Trop.* 69 (3), 239–254. doi: 10.1016/s0001-706x(97)00131-9
- Macedo, A. M., Martins, M. S., Chiari, E., and Pena, S. D. (1992). DNA Fingerprinting of *Trypanosoma Cruzi*: A New Tool for Characterization of Strains and Clones. *Mol. Biochem. Parasitol.* 55 (1–2), 147–153. doi: 10.1016/0166-6851(92)90135-7
- Machado-Silva, A., Cerqueira, P. G., Grazielle-Silva, V., Gadelha, F.R., Peloso, E., Teixeira, S. M., et al. (2016). How *Trypanosoma Cruzi* Deals With Oxidative Stress: Antioxidant Defence and DNA Repair Pathways. *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 767, 8–22. doi: 10.1016/j.mrv.2015.12.003
- Martínez, I., Nogueira, B., Martínez-Hernández, F., and Espinoza, B. (2013). Microsatellite and Mini-Exon Analysis of Mexican Human DTU I *Trypanosoma Cruzi* Strains and Their Susceptibility to Nifurtimox and Benznidazole. *Vector. Borne. Zoonotic. Dis.* 13 (3), 181–187. doi: 10.1089/vbz.2012.1072
- Myers, C. R. (2016). Enhanced Targeting of Mitochondrial Peroxide Defense by the Combined Use of Thiocarbonyl Sulfonamides and Inhibitors of Thioredoxin Reductase. *Free Radic. Biol. Med.* 91, 81–92. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2015.12.008
- Nelson, K. J., Messier, T., Milczarek, S., Saaman, A., Beuschel, S., Gandhi, U., et al. (2021). Unique Cellular and Biochemical Features of Human Mitochondrial Peroxiredoxin 3 Establish the Molecular Basis for its Specific Reaction With Thiostrepton. *Antioxidants (Basel)*. 10 (2), 150. doi: 10.3390/antiox10020150
- Nogueira, N. P., Saraiva, F. M., Sultano, P. E., Cunha, P. R., Laranja, G. A., Justo, G. A., et al. (2015). Proliferation and Differentiation of *Trypanosoma Cruzi* Inside Its Vector Have a New Trigger: Redox Status. *PLoS One* 10 (2), e0116712. doi: 10.1371/journal.pone.0116712
- Peloso, E. F., Dias, L., Queiroz, R. M., Leme, A. F., Pereira, C. N., Carnielli, C. M., et al. (2016). *Trypanosoma Cruzi* Mitochondrial Tryparedoxin Peroxidase is Located Throughout the Cell and its Pull Down Provides One Step Towards the Understanding of its Mechanism of Action. *Biochim. Biophys. Acta* 1864 (1), 1–10. doi: 10.1016/j.bbapap.2015.10.005
- Peloso Ede, F., Vitor, S. C., Ribeiro, L. H., Piñeyro, M. D., Robello, C., and Gadelha, F. R. (2011). Role of *Trypanosoma Cruzi* Peroxiredoxins in Mitochondrial Bioenergetics. *J. Bioenerg. Biomembr.* 43 (4), 419–424. doi: 10.1007/s10863-011-9365-4
- Perkins, A., Nelson, K. J., Parsonage, D., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2015). Peroxiredoxins: Guardians Against Oxidative Stress and Modulators of Peroxide Signaling. *Trends Biochem. Sci.* 40 (8), 435–445. doi: 10.1016/j.tibs.2015.05.001
- Piacenza, L., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Kelly, J. M., Wilkinson, S. R., and Radi, R. (2008). Peroxiredoxins Play a Major Role in Protecting *Trypanosoma Cruzi* Against Macrophage- and Endogenous-Derived Peroxynitrite. *Biochem. J.* 410 (2), 359–368. doi: 10.1042/bj20071138
- Piacenza, L., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Martínez, A., and Radi, R. (2013). *Trypanosoma Cruzi* Antioxidant Enzymes as Virulence Factors in Chagas Disease. *Antioxid. Redox Signal* 19 (7), 723–734. doi: 10.1089/ars.2012.4618
- Piacenza, L., Zago, M. P., Peluffo, G., Alvarez, M. N., Basombrio, M. A., and Radi, R. (2009). Enzymes of the Antioxidant Network as Novel Determiners of *Trypanosoma Cruzi* Virulence. *Int. J. Parasitol.* 39 (13), 1455–1464. doi: 10.1016/j.ijpara.2009.05.010
- Piñeyro, M. D., Parodi-Talice, A., Arcari, T., and Robello, C. (2008). Peroxiredoxins From *Trypanosoma Cruzi*: Virulence Factors and Drug Targets for Treatment of Chagas Disease? *Gene* 408 (1–2), 45–50. doi: 10.1016/j.gene.2007.10.014
- Poole, L. B., and Nelson, K. J. (2016). Distribution and Features of the Six Classes of Peroxiredoxins. *Mol. Cells* 39 (1), 53–59. doi: 10.14348/molcells.2016.2330
- Qiao, S., Lamore, S. D., Cabello, C. M., Lesson, J. L., Muñoz-Rodríguez, J. L., and Wondrak, G. T. (2012). Thiostrepton is an Inducer of Oxidative and Proteotoxic Stress That Impairs Viability of Human Melanoma Cells But Not Primary Melanocytes. *Biochem. Pharmacol.* 83 (9), 1229–1240. doi: 10.1016/j.bcp.2012.01.027
- Rodríguez-Hernández, K. D., Martínez, I., Agredano-Moreno, L. T., Jiménez-García, L. F., Reyes-Chilpa, R., and Espinoza, B. (2019). Coumarins Isolated From *Calophyllum Brasilense* Produce Ultrastructural Alterations and Affect *In Vitro* Infectivity of *Trypanosoma Cruzi*. *Phytomedicine* 61, 152827. doi: 10.1016/j.phymed.2019.152827
- Sánchez Alberti, A., Beer, M. F., Cerny, N., Bivona, A. E., Fabian, L., Morales, C., et al. (2022). *In Vitro*, *in Vivo*, and *in Silico* Studies of Cumanin Diacetate as a Potential Drug Against *Trypanosoma Cruzi* Infection. *ACS Omega*. 7 (1), 968–978. doi: 10.1021/acsomega.1c05560
- Sanner, M. F. (1999). Python: A Programming Language for Software Integration and Development. *J. Mol. Graph. Model.* 17 (1), 57–61.
- Sasagawa, I., Matsuki, S., Suzuki, Y., Iuchi, Y., Tohya, K., Kimura, M., et al. (2001). Possible Involvement of the Membrane-Bound Form of Peroxiredoxin 4 in Acrosome Formation During Spermiogenesis of Rats. *Eur. J. Biochem.* 268 (10), 3053–3061. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02200.x
- Specker, G., Estrada, D., Radi, R., and Piacenza, L. (2022). *Trypanosoma Cruzi* Mitochondrial Peroxiredoxin Promotes Infectivity in Macrophages and Attenuates Nifurtimox Toxicity. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 12. doi: 10.3389/fcimb.2022.749476
- Tchouagué, M., Grondin, M., Glory, A., and Averill-Bates, D. (2019). Heat Shock Induces the Cellular Antioxidant Defenses Peroxiredoxin, Glutathione and Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase Through Nrf2. *Chem. Biol. Interact.* 310, 108717. doi: 10.1016/j.cbi.2019.06.030
- Trott, O., and Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the Speed and Accuracy of Docking With a New Scoring Function, Efficient Optimization, and Multithreading. *J. Comput. Chem.* 31 (2), 455–461. doi: 10.1002/jcc.21334
- WHO (2021). *Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)*. (Fact Sheet, World Health Organization, WHO). Consulted August 2, 2021.
- Wilkinson, S. R., Temperton, N. J., Mondragon, A., and Kelly, J. M. (2000). Distinct Mitochondrial and Cytosolic Enzymes Mediate Trypanothione-Dependent Peroxide Metabolism in *Trypanosoma Cruzi*. *J. Biol. Chem.* 275 (11), 8220–8225. doi: 10.1074/jbc.275.11.8220

Yeo, M., Mauricio, I. L., Messenger, L. A., Lewis, M. D., Llewellyn, M. S., Acosta, N., et al. (2011). Multilocus Sequence Typing (MLST) for Lineage Assignment and High Resolution Diversity Studies in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5 (6), e1049. doi: 10.1371/journal.pntd.0001049

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of

the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Rivera-Santiago, Martínez, Arroyo-Olarte, Díaz-Garrido, Cuevas-Hernandez and Espinoza. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

