



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA
L-PROPARGILGLICINA EN LA VÍA DE SÍNTESIS DE
TRIPANOTIÓN DE *Trypanosoma cruzi***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MOISÉS EMILIO RIVERA HERNÁNDEZ

TUTORA: DRA. EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA

ASESORA TÉCNICA M. en C. CITLALI VÁZQUEZ MARTÍNEZ



MÉXICO, CDMX.

2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

DEDICATORIAS

Para aquella mujer que me vio crecer, jugar, reír y llorar, aquella que me acogió en brazos y me convirtió en la persona que soy hoy en día, la que me motivo y se mantuvo a mi lado hasta el último día. No tengo palabras o acciones suficientes que pueda devolverte como gratificación por todo el amor incondicional que me brindaste, aún te recuerdo con alegría y eso me mantiene fuerte en mi camino, esta tesis es para ti, para recordarte cada día de mi vida y decirte lo mucho que te amo, fuiste una persona excepcional. Gracias por todo abuelita, lo logramos.

A mis padres Emilio Rivera y Lucy Hernández por apoyarme a lo largo de toda mi vida, gracias por enseñarme el valor de las cosas, por dotarme de herramientas para enfrentarme a la vida y por enseñarme a levantarme después de los golpes, gracias a ustedes maduré, vencí obstáculos y perdí miedos, son unos padres excepcionales y siempre han estado para mí, en las buenas y en las malas, los amo.

A mi hermana Fernanda Rivera por todo tu apoyo, por escucharme y por tu confianza. Siempre hemos estado juntos superando obstáculos, este es un pequeño paso para convertirme en una mejor persona para ti y guiarte por el camino que te falta recorrer, te amo.

A la Dra. Saavedra por recibirme en su laboratorio y hacerme sentir como un miembro más de su equipo de trabajo, por su apoyo en el desarrollo de esta tesis y por escucharme en momentos difíciles.

A la M. en C. Citlali Vázquez, al Dr. Javier Belmont, al Dr. Zabdi González y a la Biol. Rusely Encalada gracias por su amistad y por todo el apoyo durante mi estadía en el instituto de Cardiología, sin la menor de las dudas han sido un ejemplo para seguir, mi fuente de inspiración y su profesionalismo es mi aspiración.

A los agraviosos por la amistad tan sincera que me brindaron, por todos los consejos que me dieron y todo el apoyo que recibí desde que los conocí, las risas en el laboratorio me demostraron que el aprendizaje de la ciencia también puede ser divertido.

A mis amigas de la facultad Isabel Jiménez y Bexidui Escoto por acompañarme en tiempos difíciles y demostrarme que la amistad va más allá de la formación académica, gracias por todo su apoyo.

Al departamento de Bioquímica por todas las facilidades que me brindaron en mi formación profesional, por su participación en los seminarios y por todos sus consejos.

A la Dra. Cecilia Martínez por introducirme a este maravilloso mundo de la ciencia, ya ha pasado un largo tiempo desde que nos conocimos, pero siempre la tengo presente por ser una de las personas que me impulsó y motivó a seguir estudiando.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis de licenciatura se realizó bajo la dirección y tutoría de la Dra. Emma Cecilia Saavedra Lira, con el apoyo y la participación de la asesora técnica la M. en C. Citlali Vázquez Martínez, en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”

Se reconoce la colaboración de la Biol. Rusely Encalada Oregón, el Dr. Javier Alejandro Belmont Díaz y el Dr. Zabdi Abraham González Chávez por su apoyo en diversos experimentos para completar este trabajo, así como en sus aportaciones en la discusión de los resultados.

Agradezco al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” y al Departamento de Bioquímica por permitirme la estancia en sus instalaciones durante el desarrollo de este proyecto.

La realización de los experimentos en esta tesis se efectuó con recursos del donativo CONACyT 282663 bajo la responsiva de la Dra. Emma Cecilia Saavedra Lira.

Agradezco al CONACyT por haberme otorgado el apoyo económico 30810 bajo la responsiva de la Dra. Emma Cecilia Saavedra Lira con recursos del donativo 282663 para la realización de mis estudios de licenciatura.

Agradezco al jurado designado y revisor por formar parte de mi proyecto y apoyarme en mi examen profesional, así como en los trámites de mi titulación.

El jurado designado para el examen de titulación de licenciatura estuvo integrado por:

PRESIDENTE

Dr. José Pedraza Chaverri

VOCAL

Dr. Euclides Ávila Chávez

SECRETARIO

Dra. Emma Cecilia Saavedra Lira

SUPLENTE 1

Dr. Manuel Gutiérrez Aguilar

SUPLENTE 2

Dra. Laura Carmona Salazar

ÍNDICE

Abreviaturas	9
Lista de reactivos	12
RESUMEN	14
1. INTRODUCCIÓN	15
1.1 Origen de la enfermedad de Chagas	15
1.2 Epidemiología de la enfermedad de Chagas	15
1.3 Biología de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
1.4 Ciclo biológico del parásito	19
1.5 Vías de transmisión de <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
1.6 Etapas de la parasitosis y diagnóstico	22
1.7 Tratamiento	24
1.8 Antecedentes directos del proyecto de investigación.....	26
1.9 Vía de síntesis de tripanotión.....	26
1.10 Vías de suministro de cisteína en <i>T. cruzi</i>	28
1.11 Mecanismo de acción de la L-propargilglicina	31
1.12 Importancia del estudio de la CGL en <i>T. cruzi</i>	33
2. JUSTIFICACIÓN	34
3. HIPÓTESIS	35
4. OBJETIVOS	35
4.1 Objetivo general.....	35
4.2 Objetivos particulares	35
5. METODOLOGÍA	36
5.1 Mantenimiento de cultivos.....	36
5.2 Determinación de IC ₅₀ /LC ₅₀ en epimastigotes y células HFF1 expuestos a la PAG por 24 h	36
5.3 Extracto citosólico de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	37
5.4 Cuantificación de proteína	37
5.5 Evaluación del efecto de la PAG sobre la CGL de <i>T. cruzi</i>	38
5.6 Cuantificación de los metabolitos tioles de epimastigotes expuestos a la PAG ..	39
6.1 Evaluación del efecto de la PAG sobre el crecimiento y viabilidad en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> y fibroblastos humanos HFF1	40
6.2 Evaluación del efecto de la PAG en la CGL de <i>T. cruzi</i>	42
6.3 Efecto de la PAG en la concentración de metabolitos tioles.....	44

7. DISCUSIÓN	46
8. CONCLUSIONES	49
9. PERSPECTIVAS	49
10. BIBLIOGRAFÍA	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de los principales triatomas causantes de la Enfermedad de Chagas en México.....	17
Figura 2. Microscopía electrónica de barrido de los estadios morfológicos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 4. Estructura química de los antiparasitarios usados en la Enfermedad de Chagas	24
Figura 5. Estructura química del [N ¹ ,N ⁸ -bis(glutacionil)espermidina] conocido como tripanotión, T(SH) ²	27
Figura 6. Estudios de suplementación de Cys en epimastigotes expuestos por 24 h.....	28
Figura 7. Suministro de cisteína en <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
Figura 8. Estructura química de la L-propargilglicina, PAG.....	32
Figura 9. Mecanismo de inhibición de la PAG en la CGL.....	32
Figura 10. Curva concentración-respuesta sobre crecimiento de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> expuestos a L-propargilglicina por 24 h.....	40
Figura 11. Curva concentración-respuesta sobre viabilidad de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> expuestos a L-propargilglicina por 24 h.....	41
Figura 12. Curva concentración-respuesta sobre crecimiento de fibroblastos de la línea celular HFF1 expuestos a L-propargilglicina por 24 h.....	42
Figura 13. Actividad enzimática de la CGL.....	43
Figura 14. Inactivación de la CGL en extractos citosólicos de parásitos expuestos a PAG 155 µM por 24 h.....	43
Figura 15. Efecto de la PAG en la concentración de metabolitos tioles involucrados en la vía de síntesis de tripanotión.....	44

Abreviaturas

- aa: aminoácido
- Acetil-CoA: acetil coenzima A
- ACS: Sociedad Americana de Química
- ATCC: Colección de cultivos Americana
- ATP: trifosfato de adenosina
- BSA: albúmina bovina sérica
- BNZ: benznidazol
- CBS: cistationina beta sintasa
- CDC: Centro para el Control y Prevención de Enfermedades
- CGL: cistationina gama liasa
- CH₃COOH: ácido acético
- CPR: citocromo P450 reductasa
- CS: cisteína sintasa
- CuSO₄: sulfato de cobre
- cth: L-cistationina
- Cys: L-cisteína
- DMEM: medio eagle modificado de Dulbecco
- DNA: ácido desoxirribonucleico
- DTT: ditioneitol
- DTNB: ácido ditiobisnitrobenzoico
- EDTA: ácido etilen diamina tetraacético
- ELISA: ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas
- EROS: especies reactivas de oxígeno
- FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos
- γ -EC: gama glutamil cisteína
- γ -GCL: gama glutamato-cisteína ligasa
- GEMSA: colorante eosina y azul de metileno
- Glu: glutamato
- Gly: glicina
- GS: glutatión sintetasa
- GSH: glutatión
- h: horas
- H₂O₂: peróxido de hidrógeno

- HCl: ácido clorhídrico
- H-Cys: L-homocisteína
- HEPES: agente amortiguador de ácido sulfónico
- HFF1: fibroblastos de prepucio humano 1
- HO⁻: anión hidroxilo
- HO·: radical libre hidroxilo
- HPLC: cromatografía de líquidos de alta resolución
- HS⁻: sulfuro monoprotonado
- IC₅₀: concentración inhibitoria 50
- IFI: inmunofluorescencia indirecta
- IPCA: Iniciativa Subregional de Prevención, Control y Atención de la enfermedad de Chagas
- KCl: cloruro de potasio
- KH₂PO₄: fosfato monobásico de potasio
- Km: constante de Michaelis-Menten
- LC₅₀: concentración letal 50
- LIT: infusión de hígado y triptona
- NaBH₄: borohidruro de sodio
- NaCl: cloruro de sodio
- Na₂CO₃: carbonato de sodio
- NaHCO₃: bicarbonato de sodio
- Na₂HPO₄: fosfato dibásico de sodio
- NaOH: hidróxido de sodio
- NFX: nifurtimox
- O₂⁻: anión superóxido
- OAS: oxígeno acetil serina
- OMS: Organización Mundial de la Salud
- OPS: Organización Panamericana de la Salud
- PAG: L-propargilglicina
- PBS: amortiguador salino de fosfatos
- PCA: ácido perclórico
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- pH: potencial de hidrógeno
- PLP: fosfato de piridoxal

- R-NHOH: grupo funcional hidroxilamina
- R-NO: grupo funcional nitroso
- R-NO₂: grupo funcional nitro
- RNO₂⁻: radical libre nitro-anión
- rpm: revoluciones por minuto
- SAT: serina acetil transferasa
- SDS: dodecilsulfato sódico
- Ser: L-serina
- SFB: suero fetal bovino
- -SH: grupo funcional tiol
- SNC: sistema nervioso central
- SOD: superóxido dismutasa
- TCA: ácido tricloroacético
- *T. cruzi*: *Trypanosoma cruzi*
- TFA: ácido trifluoroacético
- T(SH)₂: tripanotión
- TryS: tripanotión sintetasa
- U: unidades de actividad enzimática (μmol/min)
- USP: Farmacopea de los Estados Unidos
- UV-Vis: ultravioleta-visible
- Vmax: velocidad máxima

Lista de reactivos

Amresco®

- D-glucosa (dextrosa) anhidra, grado biotecnológico

AP®

- ácido acético glacial (CH₃COOH) grado ACS

Chem Cruz®

- cloruro de hemina en polvo

Difco®

- infusión de hígado en polvo, grado laboratorio
- triptosa en polvo, grado laboratorio

Fermont®

- sal disódica de ácido etilen diamina tetraacético (EDTA) en cristales y grado ACS

Fluka®

- DL-ditiotreitol (DTT) en polvo y grado laboratorio

Golden bell reactivos®

- cloruro de sodio (NaCl) anhidro, en cristales y grado USP
- cloruro de potasio (KCl) anhidro, en cristales y grado ACS

Grace Davison Discovery Sciences®

- columna de separación Altima C18 3 μm

IBI Scientific®

- dodecilsulfato sódico (SDS) en polvo y grado laboratorio

J.T Baker®

- ácido trifluoroacético (TFA) grado HPLC
- fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄) anhidro, en cristales y grado ACS

Merck®

- bicarbonato de sodio (NaHCO₃) anhidro, en cristales
- L-cistationina (cth) en polvo y grado ACS

Meyer®

- carbonato de sodio (Na_2CO_3) anhidro, en cristales y grado ACS
- hidróxido de sodio (NaOH) en lentejas y grado ACS

Millipore-Millex®

- filtro de 0.45 μm

MP Biomedicals®

- ácido ditiobisnitrobenzoico (DTNB) en polvo y grado laboratorio

Reproquif In®

- ácido perclórico (PCA) grado laboratorio

Sigma Aldrich®

- acetonitrilo grado HPLC
- ácido clorhídrico (HCl) concentrado para biología molecular grado biotecnológico
- ácido tricloroacético (TCA) en polvo y grado laboratorio
- agente amortiguador de ácido sulfónico (HEPES) en cristales y grado ACS
- azul tripano en polvo, para uso en cultivos celulares
- borohidruro de sodio (NaBH_4) en polvo y grado laboratorio
- fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) anhidro, en cristales y grado ACS
- L-propargilglicina (PAG) en polvo y grado ACS
- ninhidrina en polvo y grado ACS
- piridoxal 5 fosfato (PLP) grado laboratorio
- solución fenólica de Folin & Ciocalteu grado laboratorio
- solución de penicilina-estreptomicina filtrada y grado biotecnológico
- sulfato de cobre (CuSO_4) anhidro, en cristales y grado ACS
- tartrato de sodio y potasio (tartrato de Na-K) tetrahidratado, en cristales y grado ACS

Thermo Fisher Scientific®

- suero fetal-bovino (SFB) marca gibco, USA
- suero fetal-bovino (SFB) marca biowest, Chile
- medio "Eagle" modificado de Dulbecco (DMEM) marca gibco, USA

RESUMEN

El protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas también conocida como tripanosomiasis americana. De acuerdo con lo informado por la Organización Mundial de la Salud (OMS), se estima que alrededor de 6 millones de personas en el mundo se encuentran infectadas con el parásito, mientras que en México por ser un país endémico 30 millones de personas están susceptibles de infectarse. Los efectos adversos provocados por el tratamiento farmacológico para tratar la infección, además de la baja eficacia de estos medicamentos en la etapa crónica de la enfermedad, justifica la búsqueda de posibles blancos terapéuticos.

Debido a que la L-cisteína (Cys) es un metabolito limitante para la producción del tripanotión ($T(SH)_2$), el cual a su vez es indispensable para la supervivencia del parásito, el presente proyecto de tesis se enfocó en estudiar la vía de transulfuración reversa. En esta vía, la Cys se sintetiza por la hidrólisis de la L-cistationina (Cth) en una reacción catalizada por la cistationina gama liasa (CGL). Para determinar la participación de esta enzima en la síntesis de Cys y $T(SH)_2$, y evaluar su función en el metabolismo antioxidante de *T. cruzi*, se utilizó a la L-propargilglicina (PAG), el cual es un inactivador de la CGL.

Se determinó el efecto de la PAG sobre el crecimiento y viabilidad en epimastigotes de *T. cruzi*. Se encontró un efecto en el crecimiento y en la viabilidad de los epimastigotes, se obtuvieron valores de concentración inhibitoria y concentración letal 50: IC_{50} de 0.2 mM y de LC_{50} de 1.5 mM. Se evaluó el efecto de la PAG en células humanas HFF1, siendo estas últimas más susceptibles al compuesto con una IC_{50} de 0.04 mM.

Se determinó la actividad enzimática de la CGL en extractos citosólicos de epimastigotes control, obteniendo un valor de 2.2 nmol/min*mg proteína. Por otro lado, se determinó que la PAG inactivó completamente a la CGL de *T. cruzi* de manera *in vitro* (en extractos citosólicos de parásitos control), así como *in vivo* (en parásitos cultivados en presencia de la PAG).

Por último, se determinó por HPLC el perfil de los metabolitos tioles involucrados en la vía de síntesis de tripanotión (cisteína, glutatión (GSH) y tripanotión) en epimastigotes tratados con la PAG. Se observó un decremento y posteriormente una recuperación de la concentración basal de la Cys tras la exposición de los parásitos a la PAG, mientras que para el GSH y el $T(SH)_2$ su concentración decreció en un 60% y 80%, respectivamente.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Origen de la enfermedad de Chagas

La Tripanosomiasis Americana en humanos es ocasionada por la infección del protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi*. El parásito fue descubierto en 1909 en el contenido intestinal de insectos hematófagos de la familia *Reduviidae*, género *Conorhinus* (conocidos como barbeiros por los nativos del lugar), por el médico e investigador Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas (1879-1934) en el estado de Minas Gerais, Brasil. Carlos Chagas describió el ciclo infeccioso completo, en el cual también demostró la presencia de los tripomastigotes en la sangre periférica de una niña de dos años y en un gato, por lo cual llegó a la conclusión de que el parásito se transmite a los mamíferos a través del insecto (Chagas, 1909).

1.2 Epidemiología de la enfermedad de Chagas

La Organización Mundial de la Salud (OMS) informó en 2021 alrededor de 6 millones de personas en todo el mundo infectadas con *Trypanosoma cruzi*, con una incidencia de 30 mil casos anuales, principalmente en zonas endémicas de los 21 países de América Latina, Centro América y México, provocando 14 mil defunciones al año (OMS, 2021).

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, 2016) y la Organización Panamericana de la Salud (OPS, 2016) definen como zonas endémicas de la parasitosis aquellos lugares en los que por su tipo de clima y ecosistema se desarrollan los vectores que transmiten al parásito. Los vectores más prevalentes son: *Triatoma infestans* en Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay, Uruguay y Perú; *Rhodnius prolixus* en Colombia, Venezuela y Centroamérica; *Triatoma dimidiata* en Ecuador y América Central y *Rhodnius pallescens* en Panamá. Por otra parte, el flujo migratorio de personas infectadas con *T. cruzi* ha ocasionado la aparición de nuevos casos en zonas no endémicas como Europa y Asia, debido a mecanismos de transmisión vertical y transfusiones sanguíneas o de órganos infectados; por este hecho, la enfermedad de Chagas es actualmente reconocida como un problema de salud pública mundial (AMSE, 2022).

En el caso particular de México, en 2005 se estimó que existen 1.1 millones de personas infectadas; se informó que la mayoría de los casos de infección con *T. cruzi* se encuentran en los estados de Jalisco, Veracruz, Oaxaca y Guerrero (Cruz *et al.*, 2005). Sin embargo, para el año 2017 se registraron las mayores tasas de incidencia en Yucatán (4.0), Oaxaca (2.4) e Hidalgo (2.1) (Fig. 1), acompañadas de un incremento nacional entre 2008 y 2012 de 0.61 a 0.70 casos por cada 100 mil habitantes (Rojo-Medina *et al.*, 2018). Para el año 2017 otros estudios demográficos determinaron que el grupo etario más afectado o con mayor incidencia de la enfermedad se encuentra entre los 45 a 49 años, con una razón de casos de 2.1 hombres por cada mujer (Rojo-Medina *et al.*, 2018).

La OPS estimó que cerca de 30 millones de personas en México se encuentran en riesgo de adquirir la infección debido principalmente a la amplia distribución geográfica del vector que transmite al parásito ya que en dos terceras partes del territorio mexicano existen las condiciones para que se lleve a cabo la transmisión vectorial (Salazar *et al.*, 2016). En México existen 32 especies de triatominos en donde las principales especies transmisoras de la enfermedad son *Triatoma longipennis* (34%), *Triatoma pallidipennis* (23%) y *Triatoma dimidiata* (29%) (Fig. 1). Estos artrópodos habitan generalmente en las grietas y huecos de paredes de casas, así como también en tejados de palma, corrales de animales y pisos de tierra de zonas rurales (Arellano, 2002).

Entre 2008 y 2010 el grupo Iniciativa Subregional de Prevención, Control y Atención de la enfermedad de Chagas (IPCA) se ha encargado de hacer acciones para erradicar a *R. prolixus* en México y el Salvador debido a su alta capacidad vectorial y a sus elevadas cifras (800 mil infectados) asociadas como el principal transmisor de la enfermedad en Centroamérica (IPCA, 2011; OPS, 2011).

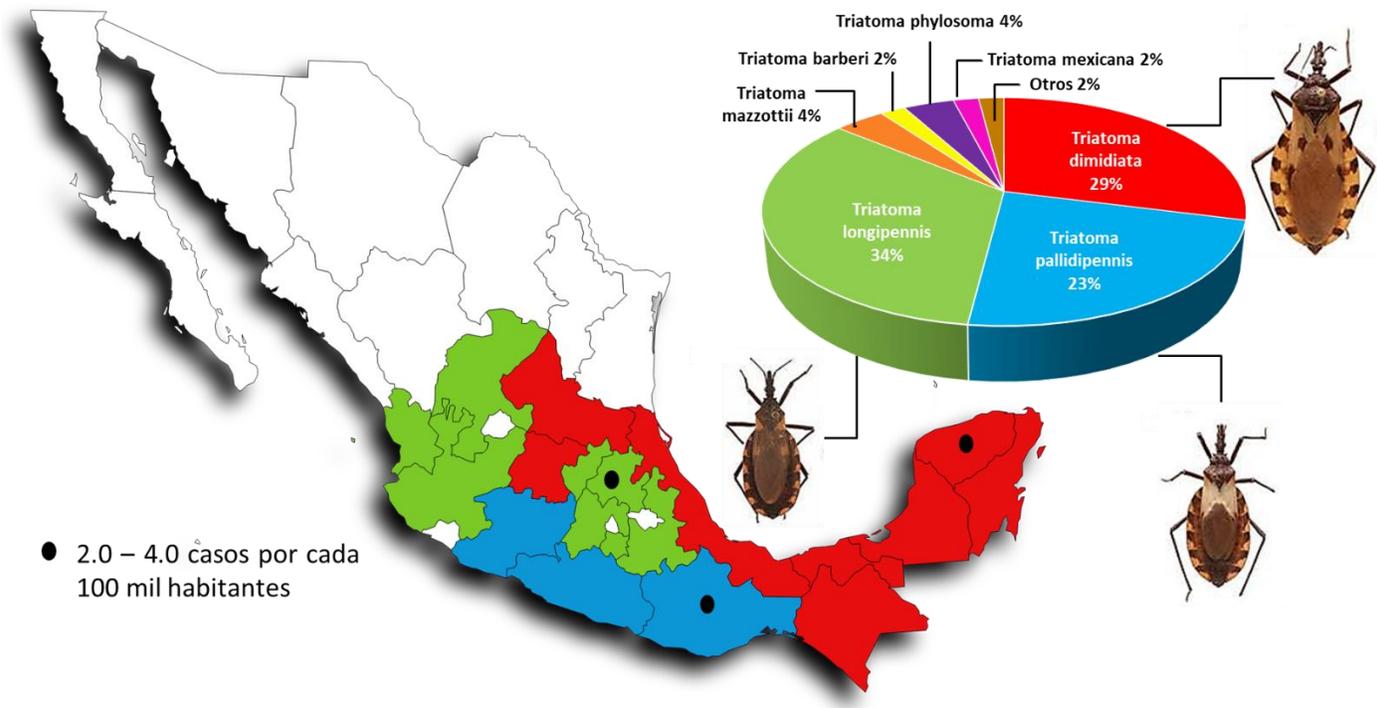


Figura 1. Distribución geográfica de los principales triatomas causantes de la Enfermedad de Chagas en México. Los estados marcados con un punto representan las zonas con mayor incidencia de la Tripanosomiasis Americana. Figura modificada de: Fuente: Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica, Secretaría de Salud (2015).

1.3 Biología de *Trypanosoma cruzi*

El *Trypanosoma cruzi* es un protista el cual pertenece al phylum *Sarcomastigophora*, subphylum *Mastigophora*, Clase *Zoomastigophorea*, orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*. El parásito unicelular posee un único flagelo el cual se origina en el cuerpo basal y se dobla lateralmente a lo largo de la célula, envuelto por un reborde de membrana citoplasmática (ondulante); además se caracteriza por poseer una sola mitocondria donde se localiza el cinetoplasto (red de ADN) el cual es una característica que le da el nombre al orden de estos microorganismos. Dependiendo de la posición del cinetoplasto respecto al núcleo y la presencia o ausencia de la membrana ondulante del flagelo, se pueden distinguir los 3 estadios morfológicos del parásito presentes en su ciclo de vida (Fig. 2) (Brener et al., 2000; Madigan et al., 2015; Cevallos y Hernández, 2001).

-Epimastigote: Estadio proliferativo presente en el intestino del triatoma. Tanto el cinetoplasto y flagelo se localizan en la parte media del organismo, por delante del núcleo, su tamaño es aproximadamente de 20 a 25 micras (Fig. 2A).

-Tripomastigote: Estadio infeccioso, no proliferativo que se encuentra presente en el intestino posterior del vector (tripomastigote metacíclico) y en la circulación sanguínea del hospedero (tripomastigote sanguíneo). El flagelo emerge del cinetoplasto el cual se localiza posterior al núcleo, formando una membrana ondulante tan larga como el parásito, cuyo tamaño alcanza aproximadamente las 20 micras (Fig. 2B).

-Amastigote: Estadio proliferativo presente en el interior de células nucleadas de los mamíferos infectados. Se caracteriza por tener el cinetoplasto cerca al núcleo y el flagelo disminuye microscópicamente. Tiene una morfología ovalada y mide de 2.0 a 2.5 micras (Fig. 2C).

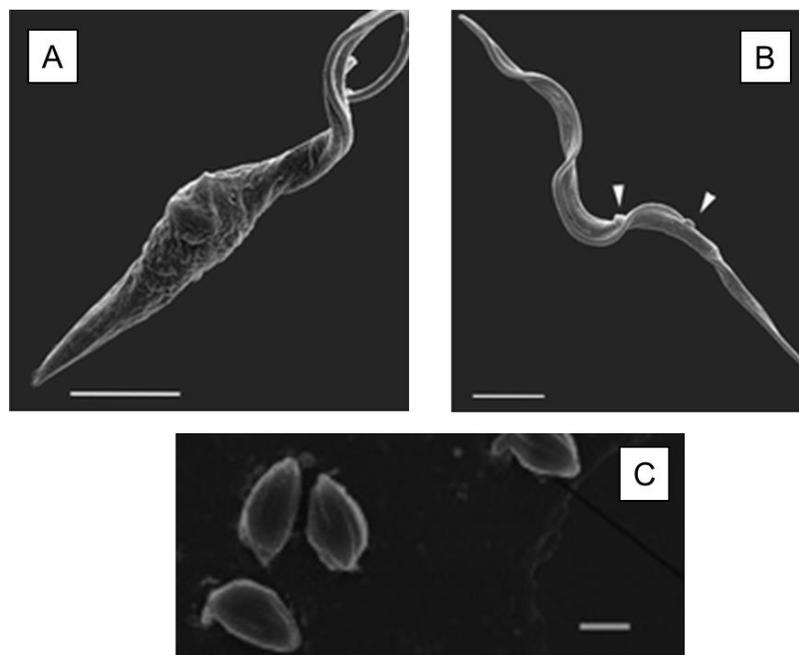


Figura 2. Microscopía electrónica de barrido de los estadios morfológicos de *Trypanosoma cruzi*. (A) Epimastigote. (B) Tripomastigote. (C) Amastigote. La barra de la figura A y B corresponde a 2.5 μ M, mientras que la de C a 1 μ M. Figuras tomadas de: <https://www.nature.com/articles/srep44451/figures/1>; [18](https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-2664-</p></div><div data-bbox=)

Por otra parte, gran parte del metabolismo energético de *T. cruzi* está basado en el uso de aminoácidos como fuente de carbono y reservorio energético, principalmente prolina como fuente de carbono exógena, aunque se ha demostrado que también puede utilizar asparagina, glutamina, glutamato, leucina e isoleucina (Pereira *et al.*, 2008). Por otro lado, la glucosa funge como la principal fuente de carbono en el parásito. De particular importancia en los tripanosomátidos es la presencia de un orgánulo denominado glicosoma, el cual contiene 8 enzimas glucolíticas encargadas de efectuar el catabolismo de la glucosa (glucólisis), además de la vía oxidativa de las pentosas fosfato, y otras del metabolismo de lípidos y nucleótidos (García-Torres *et al.*, 2011; Cazzulo, 1994).

Durante el proceso de transformación del parásito en sus diferentes estadios, se reemplazan vías metabólicas de biosíntesis de *novo* y de salvamento por sistemas de transporte de metabolitos esenciales provenientes del medio extracelular del hospedador. (Pereira *et al.*, 2008).

1.4 Ciclo biológico del parásito

La vía de transmisión principal de *Trypanosoma cruzi* es vectorial y lo hace a través de las heces infectadas de insectos hematófagos triatominos de la familia *Reduviidae*, orden *Hemiptera*, subfamilia *Triatominae* (Rojo-Medina *et al.*, 2018). El ciclo inicia cuando la chinche infectada se alimenta de la sangre del hospedero susceptible y por deyección deposita a los tripomastigotes metacíclicos en las heces (Fig. 3.1). Posteriormente, por acción mecánica de las patas del insecto o por el efecto del rascado, los tripomastigotes se introducen en el tejido adyacente de la picadura, infectando cualquier tipo de célula nucleada (Fig. 3.2). Una vez dentro de la célula, el tripomastigote se transforma en amastigote y se multiplica por fisión binaria (Fig. 3.3); posteriormente, cuando la población de amastigotes es abundante dentro de la célula, se transforman en tripomastigotes circulantes y debido al movimiento flagelar lisan a la célula infectada, liberándose para circular en el torrente sanguíneo y continuar infectando a otras células (Fig. 3.4). El ciclo continúa cuando un triatomino no infectado se alimenta de la sangre del hospedero infectado y adquiere a los tripomastigotes sanguíneos (Fig. 3.5); éstos migran al intestino medio del insecto donde se transforman en epimastigotes, los cuales se multiplican por fisión binaria (Fig. 3.6-3.7) y finalmente, migran al intestino posterior de la

chinche para transformarse en tripomastigotes metacíclicos y reiniciar el ciclo de infección (Fig. 3.8).

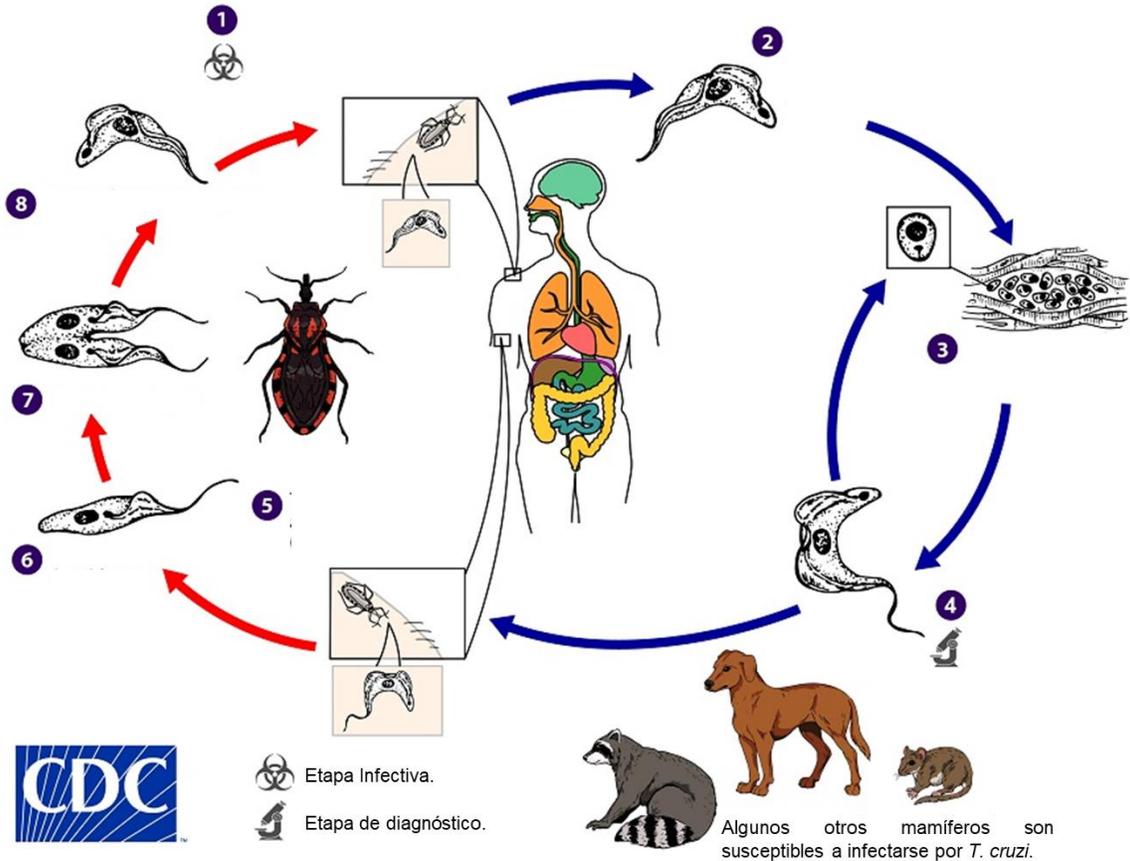


Figura 3. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*. (1) Tripomastigotes metacíclicos en las heces del vector. (2) Infección de células nucleadas por tripomastigotes metacíclicos. (3) Proliferación de amastigotes. (4) Transformación de amastigotes en tripomastigotes sanguíneos. (5) Adquisición del parásito en un triatoma no infectado. (6) Transformación de tripomastigotes en epimastigotes (7) Los epimastigotes se multiplican por fisión binaria. (8) Los epimastigotes migran al intestino posterior de la chinche y se transforman en tripomastigotes metacíclicos. Figura tomada y modificada de: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>

1.5 Vías de transmisión de *Trypanosoma cruzi*

Se sabe que más del 80% de los casos descritos de la Enfermedad de Chagas se deben a la transmisión vectorial del parásito (Díaz y González, 2014), sin embargo, existen otros mecanismos de transmisión menos frecuentes los cuales se describen a continuación:

- 1 Transfusiones sanguíneas y de órganos infectados. Es la segunda vía de transmisión más frecuente, tiene una prevalencia aproximada del 20% y es la responsable de la diseminación de la enfermedad hacia zonas no endémicas debido al flujo migratorio de personas infectadas (Gascón *et al.*, 2009). Se estima que entre 2006 y 2011 se reportaron 1459 donaciones seropositivas para *T. cruzi*, y en países europeos alrededor del 2% de los inmigrantes latinoamericanos están infectados con el parásito. Desde el año 1993 se implementó el tamizaje para la infección con *T. cruzi* en bancos de sangre de Latinoamérica con la finalidad de disminuir la prevalencia de esta vía de transmisión (Velasco *et al.*, 2002; Rueda *et al.*, 2014)
- 2 Vía oral. Se da a través de la ingesta de alimentos y/o bebidas contaminadas con las heces y orina del vector (o secreciones de mamíferos infectados) y el consumo de carne mal cocida de animales que alojen al parásito. Esta vía de transmisión se ha reportado principalmente en la región amazonia en donde la mayoría de los casos están asociados al consumo de jugos; por ejemplo, el jugo de asaí y la caña de azúcar en Brasil (país predominante con 587 casos), el vino de palma y el jugo de naranja en Colombia, entre otros. En Latinoamérica hasta 2013 se reportaron 900 casos de infección aguda por *T. cruzi* asociados con la transmisión oral (Portal info-Chagas; Rueda *et al.*, 2014).
- 3 Transmisión vertical o congénita. El parásito se transmite de la madre infectada al hijo durante el embarazo mediante la interacción, invasión y proliferación de los tripomastigotes sanguíneos con las células del espacio intervelloso de la placenta. Se ha encontrado que la prevalencia en esta vía de transmisión ocurre entre el 2 y 12% en los embarazos de mujeres en la etapa crónica de la enfermedad, acompañada de una incidencia de más de 15,000 casos anuales en Latinoamérica (del Pino *et al.*, 2006; Menchaca-Armenta, 2019; Moya *et al.*, 2005; Portal info-Chagas; Rueda *et al.*, 2014; Sandoval *et al.*, 2020).
- 4 Transmisión por accidentes de laboratorio. Los riesgos implicados en esta vía radican en hospitales o laboratorios donde se trabaje o manipule al agente causal de la enfermedad de Chagas, específicamente en medios de cultivos celulares, sangre

contaminada, triatomíneos portadores del parásito o animales infectados. La correcta manipulación del material contaminado deberá realizarse siguiendo las normativas de bioseguridad propia de cada entidad sanitaria por el personal capacitado con la finalidad de reducir el riesgo. Menos del 1% de casos totales descritos están asociados a esta vía de transmisión (Portal info Chagas; Lorca *et al.*, 2001).

Las diferentes vías de transmisión de la enfermedad de Chagas han activado una alerta en las autoridades sanitarias para fomentar e implementar protocolos destinados a mantener mejores medidas de higiene y seguridad para disminuir el riesgo de infección por *T. cruzi* en personas potencialmente susceptibles.

1.6 Etapas de la parasitosis y diagnóstico

En humanos la enfermedad de Chagas transcurre en dos fases, la aguda y la crónica. Durante la primera fase de la infección se ha encontrado que cerca del 80% de los pacientes son asintomáticos, por lo que solo se llegan a diagnosticar clínicamente el 20% de los casos; inclusive si se llegaran a presentar síntomas (fiebre, fatiga, dolores corporales, dolor de cabeza o sarpullido) éstos son de forma generalizada o pueden confundirse con dolencias comunes asociadas únicamente a la picadura de insectos (Shelly *et al.*, 2016; Salazar *et al.*, 2011). Los signos detectados en la etapa aguda de la enfermedad pueden ser el agrandamiento leve del hígado o el bazo, inflamación de los ganglios e inflamación local conocida como chagoma de inoculación, el cual se presenta en los sitios donde el parásito ingresó al organismo y es concomitante con la zona de la picadura del triatómico. Si los tripomastigotes ingresaron por la vía de la conjuntiva el chagoma se manifestará en el párpado (llamado signo de romaña), un marcador usado en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas (CDC, 2022). En la fase aguda de la enfermedad se ha determinado que cerca del 5% de los niños pequeños mueren por la inflamación o infección grave del músculo cardíaco o del cerebro; además se sabe que personas inmunocomprometidas son de alto riesgo a la infección por *Trypanosoma cruzi* (CDC, 2022).

Posterior a las 4 – 8 semanas del primer contacto con *T. cruzi*, los parásitos migran de la circulación sanguínea hacia el músculo cardíaco, digestivo o a las neuronas, iniciando así la fase crónica. Esta puede durar entre 10 y 20 años sin que se presente algún síntoma claramente evidente; sin embargo, cerca del 30% de las personas infectadas desarrollarán trastornos cardíacos y cerca del 10% desarrollarán alteraciones

digestivas, neurológicas o mixtas (OMS, 2021). En el corazón, el parásito destruye las células del haz de His, ocasionando alteraciones en el ritmo cardíaco y cuando afecta el músculo produce adelgazamiento del ventrículo izquierdo, acompañado de aneurisma y, en el peor de los casos, la muerte por paro cardíaco. Algunos de los síntomas que se presentan son disnea, taquicardia y palpitaciones (Salazar, 2019). Por otra parte, las complicaciones digestivas son el agrandamiento del esófago (*megaesófago*) y el colon (*megacolon*), provocando dificultades para comer o defecar. En el sistema nervioso central (SNC) la manifestación clínica más frecuente se presenta como una masa ocupante, chagoma o pseudotumor, o bien como una meningoencefalitis difusa que suele coincidir con la observación de abundantes tripomastigotes en el líquido cefalorraquídeo (OMS, 2021; Simioli *et al.*, 2017).

El diagnóstico se puede efectuar en ambas fases de la parasitosis. Durante la etapa aguda de la enfermedad los tripomastigotes sanguíneos se pueden visualizar de manera directa en el microscopio a través de extendidos de sangre en fresco (frotis), gota gruesa (tinción de los parásitos con GIEMSA) o hematocrito; los hemocultivos y el xenodiagnóstico también resultan útiles en la detección indirecta de *T. cruzi* y se fundamentan en simular el ciclo biológico del parásito (Siqueira *et al.*, 1994).

Debido a que en la fase crónica de la enfermedad los parásitos se han diseminado a otras regiones del organismo y sus niveles en circulación sanguínea son bajos, la detección de la enfermedad resulta ser más efectiva mediante ensayos de seropositividad, en los cuales se busca la reactividad de la respuesta inmunológica del hospedero mediante las técnicas de ensayo por Inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA ó enzyme-linked immunosorbent assay, por sus siglas en inglés) o inmunofluorescencia indirecta (IFI). De igual manera la detección de anticuerpos con métodos convencionales se presenta a partir de los 20 días de la infección (Salazar *et al.*, 2016).

En México se realizaron estudios de seropositividad para infección por *T. cruzi* entre 2006 y 2017 donde se determinó una seroprevalencia nacional de 3.38%, lo cual indica que existen 4.06 millones de casos reportados; la seroprevalencia en mujeres embarazadas fue de 2.21%, en niños menores de 18 años del 1.51% y en donantes de sangre con una seroprevalencia nacional de 0.55% (Arnal *et al.*, 2019).

Por otra parte, la Biología Molecular ha brindado herramientas sumamente útiles implicadas en la detección de *T. cruzi* tal es el caso de la técnica reacción en cadena de la polimerasa (PCR ó Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés), la cual permite amplificar regiones de ADN del parásito, utilizando iniciadores específicos, esta técnica es ampliamente utilizada en muestras de sangre de mujeres embarazadas, en muestras de pacientes con afecciones crónicas donde la serología es dudosa o en bancos de sangre (Martínez *et al.*, 2013).

1.7 Tratamiento

El tratamiento antiparasitario se basa en el uso de dos medicamentos, benznidazol (BNZ) y nifurtimox (NFX) (Fig. 4). El BNZ ha sido aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) para el uso en niños de 2 a 12 años, fuera de este rango de edad su manejo debe efectuarse con base en el diagnóstico clínico y la decisión de un médico tratante. Por otra parte, el NFX está estrictamente controlado y fue aprobado en 2020 por la FDA para su uso en niños y adultos (CDC, 2019; Stewart, 2021). Las dosificaciones de ambos fármacos se presentan en la Tabla 1.

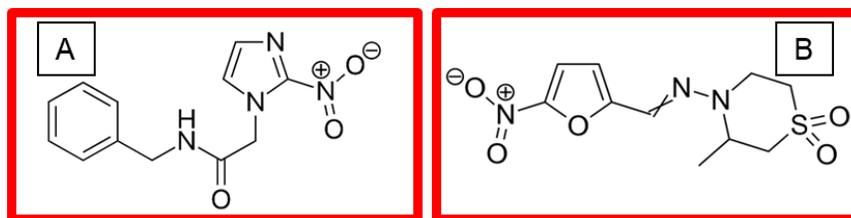


Figura 4. Estructura química de los antiparasitarios usados en la Enfermedad de Chagas. (A) Benznidazol (N-bencil-2-(2-nitroimidazol-1-il) acetamida). (B) Nifurtimox ((RS)-N-(3-metil-1,1-dioxo-1,4-tiazinan-4-il)-1-(5-nitro-2-furil) metanimina).

Tabla 1. Esquema terapéutico de antichagásicos por rangos de edad.

Medicamento	Grupo de edades	Dosis y duración	% de eficacia
Benznidazol	2-12 años	5 a 8 mg/kg por día, vía oral, durante 60 días.	Cercano a 70% en la fase aguda.
	18 años o más	5 mg/kg/día por vía oral, durante 60 días.	Entre 8 y 30% en la fase crónica de la enfermedad.
Nifurtimox	≤ 10 años	15 a 20 mg/kg por día, vía oral, durante 90 días.	Cercano al 80% durante la fase aguda.
	11-16 años	12.5 a 15 mg/kg por día, vía oral, durante 90 días.	Cercano al 30% en la fase crónica.
	17 años o más	8 a 10 mg/kg por día, vía oral, durante 90 días.	

Información tomada de: CDC, 2019; Comité de parasitología. 2008; Mello *et al.*, 2013.

El BNZ y el NFX ejercen su efecto antiparasitario a través de la formación de centros electrofílicos, radicales libres intermediarios o especies reactivas que pueden ocasionar daños a estructuras de lípidos, proteínas o ácidos nucleicos de *T. cruzi*. El mecanismo de bio-activación de ambos fármacos inicia a través de la reducción del grupo nitro (R-NO₂), efectuada por la acción de nitroreductasas de tipo I y tipo II relacionadas con la citocromo P450 reductasa (CPR) (Maya *et al.*, 2007). En el caso particular de NFX, la reducción de éste grupo funcional desencadena una serie de reacciones entre el radical libre nitro-anión (RNO₂⁻) y el O₂ lo cual ocasiona la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) como el anión superóxido (O₂⁻) y más tarde el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) debido a la acción de la superóxido dismutasa (SOD) (Maya *et al.*, 2007; Moreno *et al.*, 1984). Los iones hidroxilo (HO[•]) y los radicales libres (HO⁻) también se producen por las reacciones de Fenton y Haber-Weiss con la intervención de Fe³⁺ (Hasenberg *et al.*, 2002), de esta manera todas estas especies reactivas inducen estrés oxidativo en el parásito. Por otra parte, ambos fármacos también producen metabolitos intermediarios con centros electrofílicos (R-NO, R-NHOH) (formados durante la primera reacción de la nitroreductasa), los cuales interaccionan con metabolitos con grupo tiol (-SH) del parásito, como el tripanotión [N¹,N⁸-bis(glutathionil)espermidina, T(SH)₂] (Fig. 5) o el glutatión [L-γ-glutamyl-L-cisteinglicina, GSH]. La reactividad de dichos centros electrofílicos también repercute en su unión a macromoléculas (lípidos, proteínas y DNA), provocando así un daño en los procesos vitales y fisiológicos del parásito (Maya *et al.*, 2007).

Pese a toda la investigación y control que tienen las autoridades sanitarias sobre el uso de estos dos antichagásicos, se ha determinado que también son dañinos para el paciente. Dentro de los efectos secundarios más importantes se encuentran la dermatitis alérgica, neuropatía periférica, polineuropatía, anorexia y pérdida de peso, náuseas, vómito, dolor de cabeza, mareo o vértigo e insomnio; además, las contraindicaciones del tratamiento incluyen la presencia de enfermedad hepática o renal graves (CDC, 2019; Asociación Española de Pediatría, 2020). Este conjunto de factores en conjunto con las condiciones clínicas del paciente y las interacciones farmacológicas ocasiona frecuentemente la suspensión del tratamiento, ya que este debe estar destinado hacia la respuesta terapéutica sin comprometer la integridad ni la calidad de vida de los pacientes (Castro, 2014; Sosa *et al.*, 2004; Asociación Española de Pediatría, 2020).

Por otra parte, el tratamiento de sostén está destinado a ayudar a pacientes ya con problemas cardíacos o intestinales derivados de la afección crónica de la parasitosis, haciendo uso de marcapasos y medicamentos para controlar los latidos irregulares del corazón y realizar cirugías para aliviar el agrandamiento del colón (Pearson, 2020).

1.8 Antecedentes directos del proyecto de investigación

Debido a las limitaciones en los tratamientos actuales para tratar la infección por *T. cruzi*, todavía es necesaria la investigación básica para encontrar estrategias alternativas de tratamiento. Uno de esos enfoques involucra el estudio de las vías metabólicas esenciales en el parásito cuyas enzimas pueden ser blancos de intervención terapéutica. Al respecto, el metabolismo antioxidante de *T. cruzi* se basa en el tripanotión [T(SH)₂], el cual no está presente en las células humanas y ofrece un sitio potencial de intervención farmacológica.

1.9 Vía de síntesis de tripanotión

El T(SH)₂ (Fig. 5), es un metabolito de importancia para la supervivencia del parásito ya que es el principal donador de electrones en su sistema de desintoxicación de peróxidos.

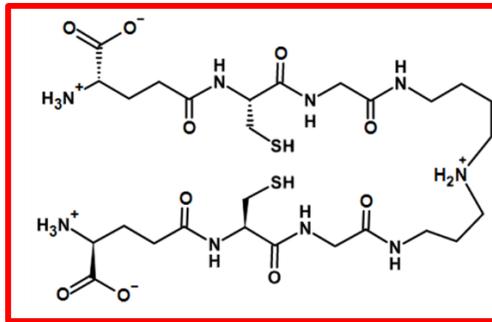


Figura 5. Estructura química del [N¹,N⁸-bis(glutathionil)espermidina] conocido como tripanotión, T(SH)₂.

La síntesis de este metabolito se realiza por medio de la acción de tres enzimas dependientes de ATP (Fig. 7D). En primer lugar, la gama glutamato-cisteína ligasa (γ -GCL) conjuga cisteína (Cys) y glutamato (Glu) para producir gama-glutamilcisteína (γ GC); posteriormente, este sustrato es conjugado por la glutatión sintetasa (GS) con glicina (Gly) para producir glutatión (GSH) y finalmente, el T(SH)₂ es sintetizado tras la conjugación de dos moléculas de glutatión con una molécula de espermidina, reacción catalizada por la tripanotión sintetasa (TryS) (Olin *et al.*, 2010; Olin *et al.*, 2012; Moreno *et al.*, 2008).

En 2017 Vázquez *et al.*, realizaron ensayos en los que se observó que la incubación de cultivos de epimastigotes con Cys 100 μ m por 24 h provocaba un incremento de la concentración de T(SH)₂ de hasta cuatro veces (Fig. 6) (Vázquez *et al.*, 2017). Con este resultado se planteó que el suministro de Cys podría ser limitante para la síntesis de éste metabolito y su estudio podría abrir la posibilidad de encontrar nuevos blancos terapéuticos.

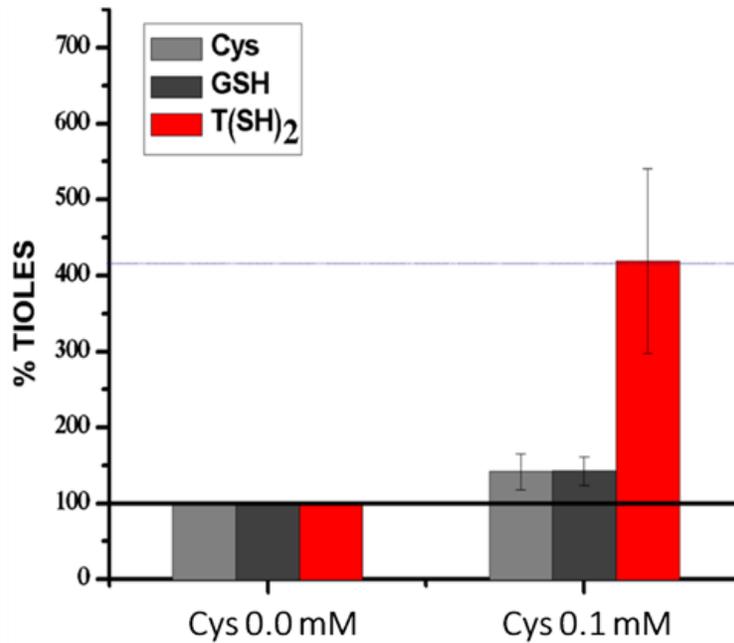


Figura 6. Estudios de suplementación de Cys en epimastigotes expuestos por 24 h. Cuantificación de metabolitos (Cys, GSH y T(SH)₂) por cromatografía de líquidos de alta resolución. Figura modificada y tomada de Vázquez *et al.*, (2017).

1.10 Vías de suministro de cisteína en *T. cruzi*

El parásito cuenta con 3 vías de suministro de Cys (Fig. 7): mediante su asimilación del medio extracelular efectuada por un transportador de alta afinidad (Fig. 7A) y por dos vías que llevan a cabo su biosíntesis (Pereira *et al.*, 2008).

El transporte de Cys en *T. cruzi* es altamente específico pues se ha demostrado que en epimastigotes el transportador tiene una Km aparente por Cys de 49.5 μ M y una Vmax de 13 pmol/min (por 10^7 parásitos); además, la adición en exceso de algunos otros aminoácidos como metionina, arginina, glutamato, prolina, glicina o serina no modifican la absorción de Cys (Canepa *et al.*, 2009). La ventaja que presenta este sistema es el ahorro energético para el parásito sobre la síntesis del aminoácido, sin embargo, su capacidad de proveer del aminoácido al parásito se encuentra limitada a la cantidad de Cys presente en el medio extracelular (Canepa *et al.*, 2009).

Otra vía por la que se obtiene Cys es a través de la de síntesis de *novo* (Fig. 7B) en la cual la L-serina se conjuga con la acetil-coenzima A (acetil-CoA) para producir O-acetil-L-serina (OAS), por medio de la acción de la serina acetiltransferasa (SAT). Posteriormente, éste intermediario sufre un β -reemplazamiento con sulfuro (HS⁻)

catalizado por la cisteína sintasa (CS), lo cual conlleva a la generación de cisteína y acetato (Fig. 7B) (Marciano *et al.*, 2012). La SAT tiene una cinética de tipo Michaelis-Menten con una Km para la L-serina de 0.24 mM y una Km para acetil-CoA de 0.92 mM, mientras que la CS tiene una Km para OAS de 7.8 mM, una Km para HS⁻ de 8.2 mM y una Vmax de 307 $\mu\text{mol}/\text{min}\cdot\text{mg prot}$ (Nozaki *et al.*, 2000; Marciano *et al.*, 2012). Esta vía no se encuentra presente en mamíferos y se piensa que en el parásito se mantiene activa en algunos estadios, pues se ha comprobado que la cantidad de CS es más abundante en amastigotes (Nozaki *et al.*, 2000).

Finalmente, en la vía de transulfuración reversa (Fig. 7C) la producción de Cys inicia a partir de L-homocisteína (H-Cys) la cual es conjugada con O-acetil-L-serina (OAS), o L-serina (Ser) para formar L-cistationina (cth) en una reacción catalizada por la cistationina β -sintasa (CBS) (que tiene Km de 0.9 mM para H-Cys y 1.0 mM para Ser). Posteriormente, la cth es hidrolizada por la acción de la cistationina gama-liasa (CGL) (Km = 2.0 mM), para producir Cys y α -cetobutirato (Marciano *et al.*, 2012; Nozaki *et al.*, 2000).

De estas vías es como el parásito incorpora la Cys a su metabolismo y parte de él se destina como sustrato de la γ -GCL para la síntesis del GSH y finalmente del T(SH)₂ (Fig. 7D) (Marciano *et al.* 2012; Nozaki *et al.*, 2000). Cabe destacar que esta ruta también se encuentra presente en vertebrados, hongos, procariontes, plantas y mamíferos y que, además, en estos últimos participa en el catabolismo de la metionina y sus derivados tóxicos incluyendo a la L-homocisteína (Nozaki *et al.*, 2000).

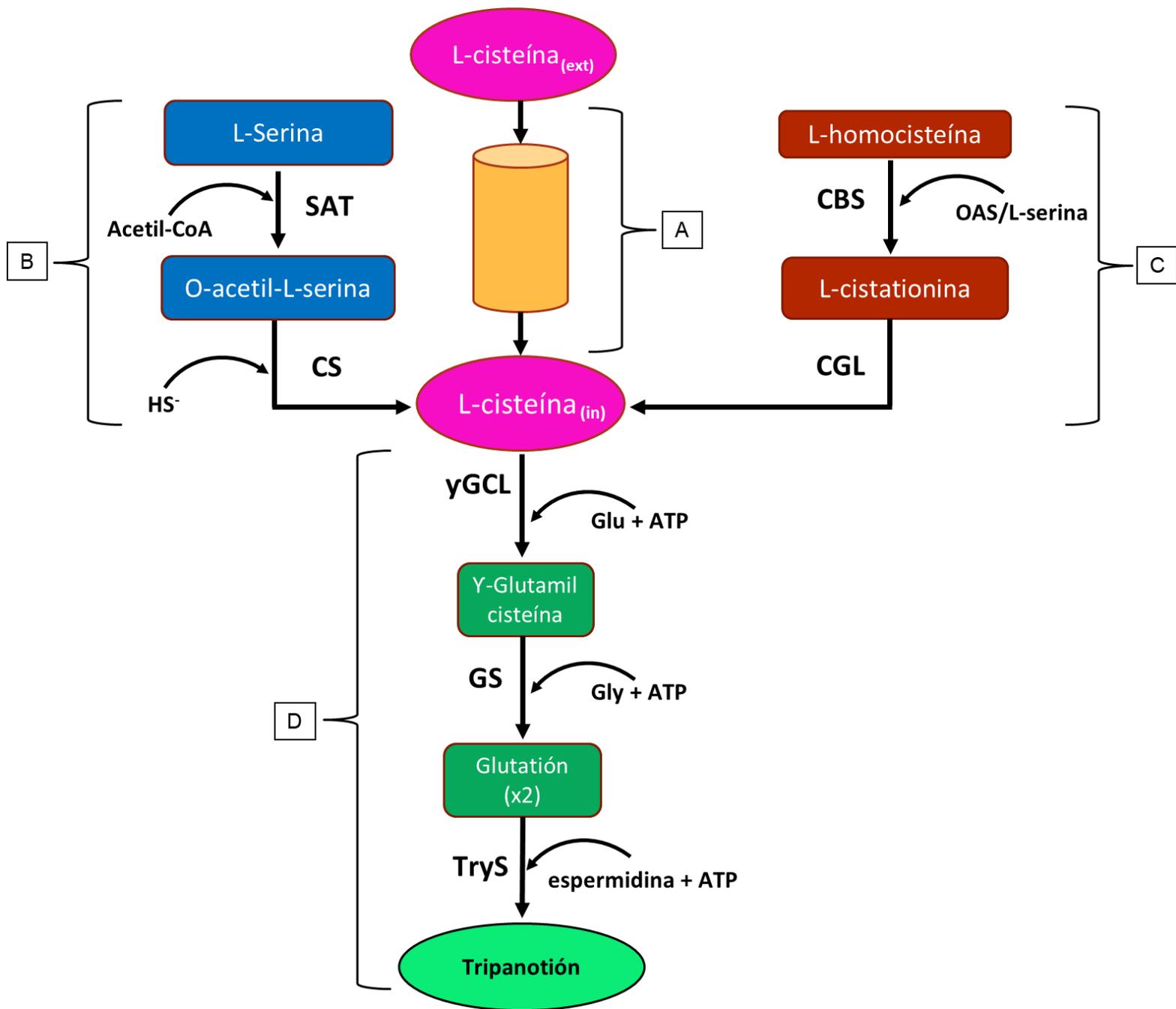


Figura 7. Suministro de cisteína en *Trypanosoma cruzi*. (A) Transportador de alta afinidad. (B) Vía de síntesis de *novoo*. Con la participación de las enzimas serina acetil transferasa (SAT) y cisteína sintasa (CS), y como sustratos el acetil coenzima A (Acetil CoA), la L-Serina, la O-acetil-L-Serina y el sulfuro (HS⁻). (C) Vía de transulfuración reversa. Con la participación de las enzimas cistationina β sintasa (CBS) y cistationina gama liasa (CGL), y como sustratos la L-homocisteína, la O-acetil-L-Serina (OAS), la L-serina y la L-cistationina. (D) Vía de síntesis de tripanotión. Con la participación de las enzimas gama glutamato-cisteína liasa (γGCL), glutatió sintetasa (GS) y tripanotión sintetasa (TryS), y como sustratos la cisteína, el glutamato (Glu), la γ-glutamilcisteína, la glicina (Gly), el glutatió, la espermidina y el trifosfato de adenosina (ATP) Figura modificada y tomada de Maresi *et al.*, 2018.

En el caso particular de *T. cruzi* se ha identificado que la CBS parece ser más abundante en epimastigotes y es capaz de efectuar reacciones diferentes a la vía canónica tomando diferentes sustratos; algunos ejemplos de ello es la producción de HS⁻ por medio de la descomposición de L-cisteína o por medio de su condensación con L-homocisteína (Km 2.0 y 0.6 mM, respectivamente). Además, se ha descrito que la CBS también produce L-cisteína a través de la condensación de OAS o L-serina con sulfuro (Km de 1.1 mM y 3.1 mM, respectivamente) lo cual significa que esta enzima puede realizar prácticamente la misma función que la CS en la síntesis *de novo* de Cys (Marciano *et al.*, 2012; Nozaki *et al.*, 2000).

Por otro lado, la CGL parece que permanece activa en el parásito en sus estadios de epimastigote y tripomastigote; presenta un porcentaje de similitud en la secuencia de aminoácidos cercano al 40% con la CGL de humanos y no es capaz de producir sulfuro en presencia de otros sustratos (cistina, L-cisteína y/o L-homocisteína), por lo cual su función de hidrolizar cistationina parece ser específica (Marciano *et al.*, 2012; Nozaki *et al.*, 2000).

1.11 Mecanismo de acción de la L-propargilglicina

La L-propargilglicina (PAG) (Fig. 8) es un inactivador no proteico de la CGL, similar a la L-alanina en donde uno de los hidrógenos del grupo metilo ha sido reemplazado por un grupo etinilo. Su proceso de bio-activación se lleva a cabo cuando el grupo prostético de la CGL, el fosfato de piridoxal (PLP) incorpora a la PAG mediante el reemplazamiento de un residuo de Lys, esta acción tiene como consecuencia la formación de una aldimina externa (Fig. 9A). Posteriormente, una base en el sitio catalítico de la enzima (la cual puede tratarse de un residuo de cisteína o tirosina) abstrae un protón (H⁺) del carbono alfa del compuesto, provocando un cambio estructural en la molécula y con ello, dejando al carbono beta susceptible a la extracción de otro protón (Fig. 9B). La consecuencia final de estas reacciones es catalizar la transposición del grupo acetilénico de la PAG a un grupo aleno (Fig. 9C). Esta nueva modificación estructural reacciona con otro centro nucleofílico en el sitio activo de la enzima que termina en la formación de un enlace covalente y provoca la pérdida de la función catalítica de la CGL (Fig. 10D). Se ha descrito que a concentraciones cercanas a 12 μM de la PAG, la enzima se encuentra completamente inactivada (National Center for Biotechnology Information. PubChem, 2022; Washtien y Abeles, 1977; Marciano *et al.*, 2012).

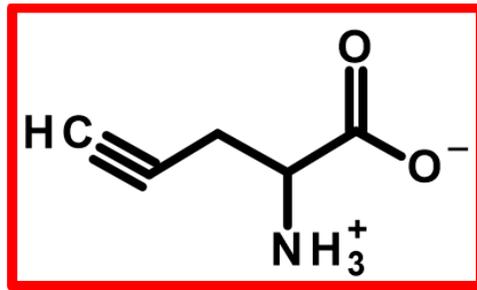


Figura 8. Estructura química de la L-propargilglicina, PAG.

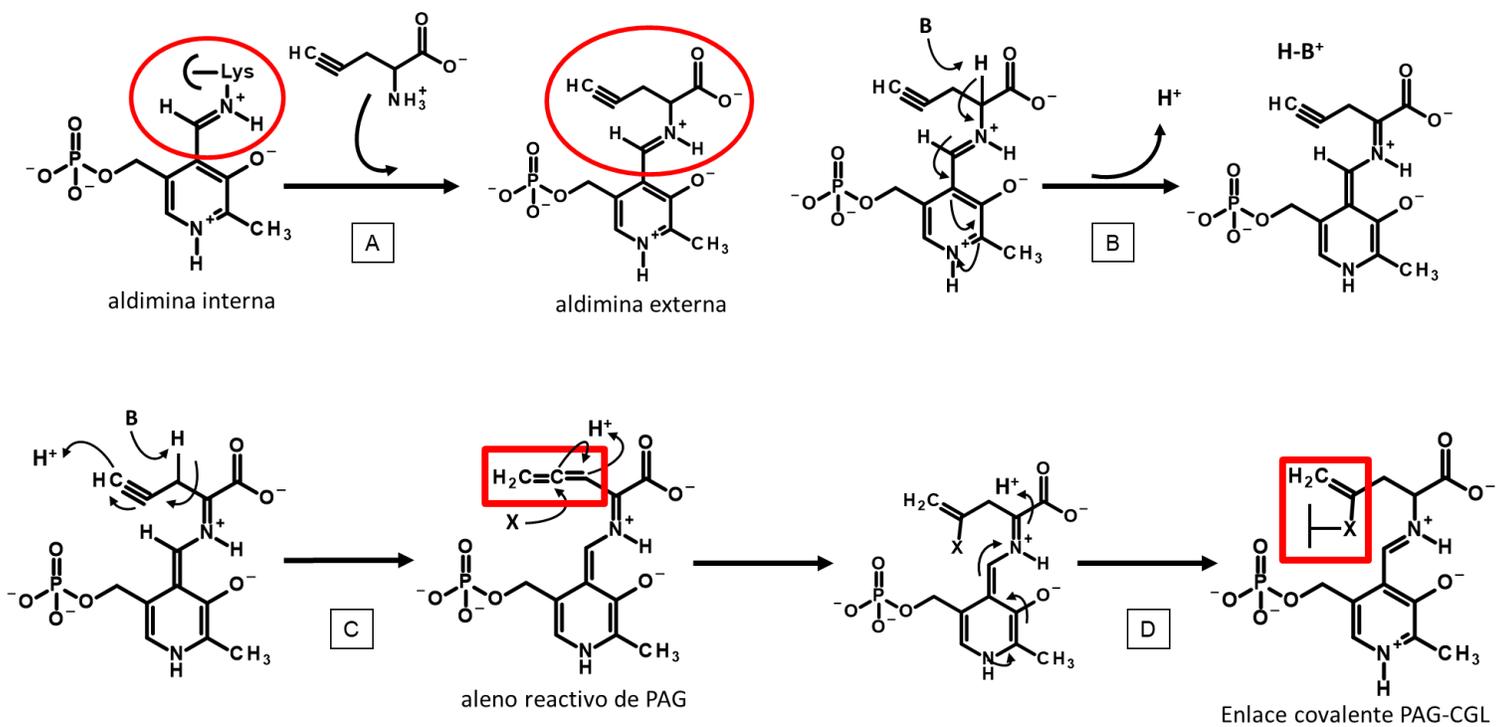


Figura 9. Mecanismo de inhibición de la PAG en la CGL. (A) Formación de la aldimina externa. (B) Arreglo estructural de la PAG y el PLP. (C) Transposición del etinilo a aleno de la PAG. (D) Formación del enlace covalente de la PAG con la CGL. Tanto B como X pueden ser: cisteína o tirosina. Figura modificada y tomada de Washtien y Abeles, 1977.

1.12 Importancia del estudio de la CGL en *T. cruzi*

La vía de transulfuración reversa se convirtió en un buen objetivo de estudio ya que a diferencia de otras vías que suministran Cys esta parece ser más indispensable en el parásito. Estudios efectuados por nuestro grupo de trabajo sobre el transportador de Cys (datos no publicados) revelaron que este tiene un bajo coeficiente de control de flujo sobre la síntesis del T(SH)₂ (14%), aunado a esto el transporte se limita por la cantidad de Cys que se presenta en el medio extracelular con parámetros cinéticos determinados de Km 0.5 mM y Vmax de 0.001 U/mg proteína. Además de ello este transportador parece ser más eficiente en el estadio infectivo y no proliferativo del parásito (tripomastigote) por lo que su estudio se hace más complicado. En el caso de la vía de síntesis de *nov*o se ha identificado que su principal limitante es la disposición de SH⁻; un metabolito necesario para la producción de Cys, el cual se encuentra en el parásito a concentraciones cercanas a 20 μM (Marciano *et al.* 2012) mientras que las enzimas que utilizan SH⁻ como sustrato presentan una Km en el intervalo de concentraciones mM (revisar apartado 1.10), por lo cual, estos antecedentes pueden sugerir que el aporte de Cys procedente de esta vía es mínimo.

Por otra parte, el estudio de la CBS de la vía de transulfuración reversa se complica debido a que cuenta con diversas reacciones espurias, mientras que la CGL mantiene una reacción específica y cuenta con un inhibidor específico para su estudio.

2. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad la enfermedad de Chagas ha sido catalogada como un padecimiento olvidado en donde la población más susceptible vive en condiciones precarias de alimentación, educación y vivienda, y con bajo acceso a servicios de salud. Aunado a esto, la problemática de la enfermedad se ha extendido a nivel mundial y debido a la poca efectividad de los tratamientos y las limitadas respuestas de las autoridades sanitarias, diversos grupos de investigación continúan la tarea de profundizar en el estudio de la infección con *T. cruzi* y la enfermedad de Chagas para optimizar o encontrar mejores opciones de tratamiento. El estudio del comportamiento, la respuesta y el papel que juegan las vías metabólicas esenciales en la supervivencia del parásito pueden ser de gran ayuda en la identificación de blancos que pueden ser intervenidos terapéuticamente y con ello, la posibilidad de mejorar el tratamiento ya existente. Se identificó que la L-cisteína es un aminoácido limitante en la síntesis de tripanotión, el metabolito clave en el sistema antioxidante del parásito. El estudio de la inhibición de la CGL nos permitirá entender cómo la vía de transulfuración reversa contribuye a la síntesis del glutatión y el tripanotión y con ello, nos permitirá identificar blancos potencialmente beneficiosos para una intervención terapéutica.

3. HIPÓTESIS

La L-cisteína es un metabolito limitante para la síntesis de tripanotión en *T. cruzi*, por lo que la inactivación de la cistationina γ -liasa que sintetiza el aminoácido por la vía de transulfuración reversa, disminuirá de manera importante la concentración del tripanotión.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Determinar el efecto de la inhibición de la CGL por la PAG sobre la concentración del T(SH)₂ en *T. cruzi*.

4.2 Objetivos particulares

- Determinar la IC50/LC50 de la PAG en epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Querétaro.
- Evaluar el efecto inhibitor de la PAG en la CGL de *T. cruzi*.
- Evaluar el efecto de la PAG en las concentraciones de los metabolitos tioles (Cys, GSH y T(SH)₂) de la vía de síntesis del T(SH)₂ en el parásito.

5. METODOLOGÍA

5.1 Mantenimiento de cultivos

Los epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Querétaro se crecieron y mantuvieron en medio LIT (por sus siglas en inglés de Liver infusion and tryptone) compuesto por NaCl 0.4%, KCl 0.04%, Na₂HPO₄ 0.42%, triptosa 0.5%, infusión de hígado 0.5% y glucosa 0.2% el cual se suplementó con suero fetal bovino (SFB) marca Biowest al 10%, hemina (12.5 mg/mL) y solución de penicilina-estreptomicina al 0.5%. Los cultivos de parásitos se incubaron a 28°C.

Por otra parte, los fibroblastos de la línea celular HFF1 (human foreskin fibroblasts 1 o por su traducción al español fibroblastos humanos de prepucio) obtenidos de la colección de cultivos americana (ATCC) se crecieron a 37°C con 5% de CO₂ en placa de cultivo con medio "Eagle" modificado de Dulbecco (DMEM ó Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco), suplementado con HEPES 0.6%, NaHCO₃ 0.4%, SFB marca Gibco al 10% y solución de penicilina-estreptomicina al 0.5%.

5.2 Determinación de IC₅₀/LC₅₀ en epimastigotes y células HFF1 expuestos a la PAG por 24 h

Se sembraron 0.2 mL por pozo del cultivo de los epimastigotes a una densidad de 1x10⁶ parásitos/mL (C₀) en placas de cultivo de 96 pozos y se expusieron a concentraciones crecientes de 0 a 2.0 mM de la PAG por 24 h a 28°C. Al término de la incubación, se contó la población de epimastigotes expuestos al compuesto (C₁) en una cámara de Neubauer y para determinar el porcentaje de crecimiento se comparó la población inicial (C₀) en contra de la población final (C₁) de los epimastigotes expuestos a la PAG después de 24 h de incubación, se tomó como parámetro de crecimiento total (100%) a la población de epimastigotes que fueron expuestos a 0.0 mM de la PAG, aunado a esto el movimiento flagelar fue el parámetro utilizado para determinar la viabilidad.

Se realizó el mismo ensayo con la línea celular HFF1 como control de citotoxicidad. Se partió de un cultivo celular en placa de las HFF1 al 80% de confluencia, se contó la población celular en la cámara de Neubauer y se preparó un nuevo cultivo celular a una densidad de 5x10⁴ células/mL (C₀), se sembraron 0.2 mL por pozo del

cultivo anteriormente mencionado en placas de cultivo de 96 pozos y se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ por 24 h. Posteriormente, las células se expusieron a concentraciones crecientes de 0 a 200 µM de la PAG y se incubaron por 24 h a 37°C y 5% de CO₂. Finalmente, se contó la población celular (C₁) en una cámara de Neubauer y se utilizaron los mismos criterios anteriormente descritos en los epimastigotes para cuantificar el crecimiento y el colorante azul tripano fue utilizado como marcador de viabilidad.

Se construyeron gráficos de crecimiento y viabilidad contra concentración creciente de exposición a la PAG y los datos se ajustaron a ecuaciones de concentración/respuesta $(y = A1 + \frac{A2-A1}{1+10^{(LOGX0-x)P}})$ y bidosis-respuesta $(y = A1 + (A2 - A1) \left[\frac{P}{1+10^{(LOGx01-x)h1}} + \frac{1-P}{1+10^{(LOGx02-x)h2}} \right])$ empleando el software OriginLab® Origin 8. De las curvas se calcularon los parámetros IC₅₀/LC₅₀.

5.3 Extracto citosólico de epimastigotes de *T. cruzi*

Los cultivos de epimastigotes se centrifugaron a 3500 x g por 10 min, posteriormente se realizaron dos lavados con amortiguador salino de fosfatos (PBS) (NaCl 0.8%, KCl 0.02%, Na₂HPO₄ 0.14% y KH₂PO₄ 0.03%) y los botones celulares se resuspendieron en 100 µL de amortiguador de lisis (HEPES 20 mM, EDTA 1 mM, DTT 20 mM y KCl 0.15 mM). Se realizaron 3 ciclos de congelamiento (en N₂ líquido) y descongelamiento (baño a 37°C); posteriormente, la muestra se centrifugó a 13300 x g por 10 min y el sobrenadante que contiene la fracción de proteínas solubles se recolectó para los ensayos posteriores de cuantificación de proteína y medición de actividades enzimáticas.

5.4 Cuantificación de proteína

La proteína de las muestras provenientes de los extractos citosólicos se cuantificó colorimétricamente por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Para ello se construyó una curva patrón con albúmina bovina sérica (BSA) a concentraciones crecientes de 0 a 80 µg/µL y, por otro lado, diferentes volúmenes de los extractos citosólicos se trataron de la misma manera. Las muestras se suplementaron con una mezcla de reacción de solución A (Na₂CO₃ 2%, NaOH 0.4%, tartrato de Na-K 0.16% y SDS 1%) para completar 100 µL; se les adicionaron 0.9 mL de solución B (CuSO₄ 0.08%) y 100 µL del reactivo de

Folin-Ciocalteu. La reacción se incubó a temperatura ambiente por 30 min y se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 660 nm en el espectrofotómetro de UV-Vis. Se graficó la curva patrón de absorbancia versus concentración de proteína. La cantidad de proteína de las muestras problema se obtuvo por interpolación de la absorbancia en la curva patrón de proteína.

5.5 Evaluación del efecto de la PAG sobre la CGL de *T. cruzi*

Se prepararon dos cultivos de 200 mL de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Querétaro en medio LIT a una densidad de 1×10^6 parásitos/mL y se incubaron a 28°C por 4 días, alcanzando una concentración de 2×10^7 parásitos/mL. A uno de los cultivos se le adicionó PAG 155 μ M y se incubaron por otras 24 h. Al término de la incubación se cosecharon los parásitos y se realizaron extractos citosólicos de cada cultivo; se cuantificó la cantidad de proteína total por el método de Lowry y se determinó la actividad de la CGL a punto final como se describe a continuación.

La mezcla de reacción para determinar la actividad de CGL en un volumen de 250 μ L fue la siguiente: amortiguador de reacción (HEPES 40 mM, EDTA 1 mM pH 7.4) para completar el volumen final de la reacción, PLP 120 μ M, proteína de las fracciones solubles de los extractos citosólicos (0.5 μ g/ μ L); se inició la reacción adicionando cth 5 mM y la reacción se incubó a 37°C, se tomaron alícuotas de 50 μ L a diferentes tiempos (2, 5, 10 y 15 min) y se detuvo la reacción con TCA al 20%.

La Cys formada durante la reacción se cuantificó en una reacción colorimétrica adicionando ninhidrina 0.625% en una mezcla de HCl-CH₃COOH 3:2; posteriormente las muestras se incubaron por 10 min en baño María a ebullición y el complejo formado de color rosa se determinó en un espectrofotómetro de UV-Vis a una longitud de onda de 560 nm. Finalmente, se determinó la concentración de la Cys mediante la ecuación de Lambert-Beer ($A = \epsilon \cdot b \cdot C$, donde se correlaciona la absorbancia de la sustancia con su concentración molar). En paralelo a las muestras problema, se realizó el mismo procedimiento para 3 reacciones control: la primera sin proteína del extracto citosólico, la segunda sin cth y la tercera reacción en presencia de la PAG 100 μ M.

5.6 Cuantificación de los metabolitos tioles de epimastigotes expuestos a la PAG

Se realizó un cultivo de epimastigotes cepa Querétaro en medio LIT a una concentración de 3×10^6 parásitos/mL; el cultivo se separó en muestras de 25 mL a las cuales se les adicionaron diferentes concentraciones crecientes de la PAG (0 - 200 μ M) y se incubaron por 24 h a 28°C. Posteriormente, se realizaron extractos citosólicos de las diferentes muestras y se tomó una alícuota de 1 mL de cada una de ellas para la cuantificación de la proteína por el método de Lowry. El volumen restante de cada muestra se trató con NaBH_4 al 20% por 10 min a 4°C y se agregó PCA a una concentración final del 30%. Las muestras se centrifugaron a 13300 x g por 2 min y se filtraron en un dispositivo Millipore-Millex de 0.45 μ m. Finalmente, se inyectaron 50 μ L de la muestra filtrada en un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC o, por sus siglas en inglés: High Performance Liquid Chromatography). La separación de los metabolitos tioles se llevó a cabo en una columna de fase reversa C18 (Altima) utilizando como fase móvil una mezcla de TFA al 0.1% y acetonitrilo grado HPLC 100%. Los tioles se detectaron mediante una reacción post-columna con ácido ditiobisnitrobenzoico (reactivo de Ellman) (DTNB) el cual se midió a 412 nm de absorbancia con un detector UV-Vis acoplado al HPLC. Finalmente, para determinar diferencias significativas en las concentraciones de los metabolitos tioles de los epimastigotes que fueron expuestos a la PAG comparado con el control (PAG 0.0 μ M), se realizó una prueba estadística t-student con un valor de significancia de $p < 0.05$, y una prueba Anova post-hoc Dunnett de una vía con un valor de significancia de $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 Evaluación del efecto de la PAG sobre el crecimiento y viabilidad en epimastigotes de *T. cruzi* y fibroblastos humanos HFF1

Se realizaron curvas de dosis-respuesta sobre el crecimiento y la viabilidad de los parásitos después de 24 h de incubación en presencia de diferentes concentraciones de la PAG. En la Fig.10 se observa una disminución progresiva en el crecimiento de los epimastigotes expuestos a la PAG y se realizó un ajuste de los datos experimentales a una función de dosis-respuesta con el programa Origin 8. Se determinó la concentración de la PAG a la cual el 50% de la población deja de crecer (IC_{50}) cuyo valor fue de $204 \pm 9.0 \mu M$ ($n=4$); a una concentración de $900 \mu M$ de la PAG el crecimiento de los epimastigotes disminuye hasta en un 90%. En los siguientes experimentos para asegurar que los parásitos estuvieran vivos y tener una biomasa suficiente para los análisis cinéticos y metabólicos, se eligieron concentraciones menores a $200 \mu M$ de la PAG en la cual la viabilidad de los parásitos es del 100% y su crecimiento disminuyó sólo en un 40%.

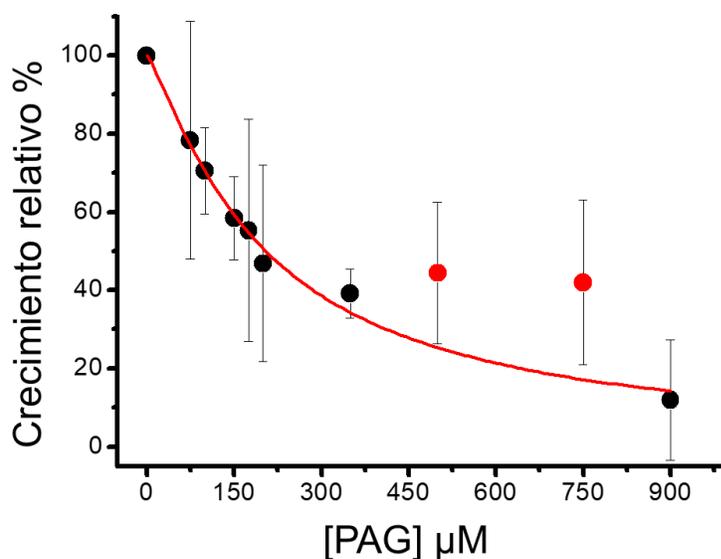


Figura 10. Curva concentración-respuesta sobre crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* expuestos a L-propargilglicina por 24 h. $n=4$. Los puntos rojos no se consideraron en el ajuste de la curva. Ajuste concentración-respuesta 0.99. El valor determinado de la IC_{50} fue de: $204 \pm 9.0 \mu M$.

En la Fig. 11 se observa que la población total de epimastigotes reduce su viabilidad en un 50% a una concentración LC_{50} de 1.60 ± 0.26 mM ($n=3$) de la PAG mientras que a 2.0 mM del compuesto se provoca la muerte de los parásitos en un 90%.

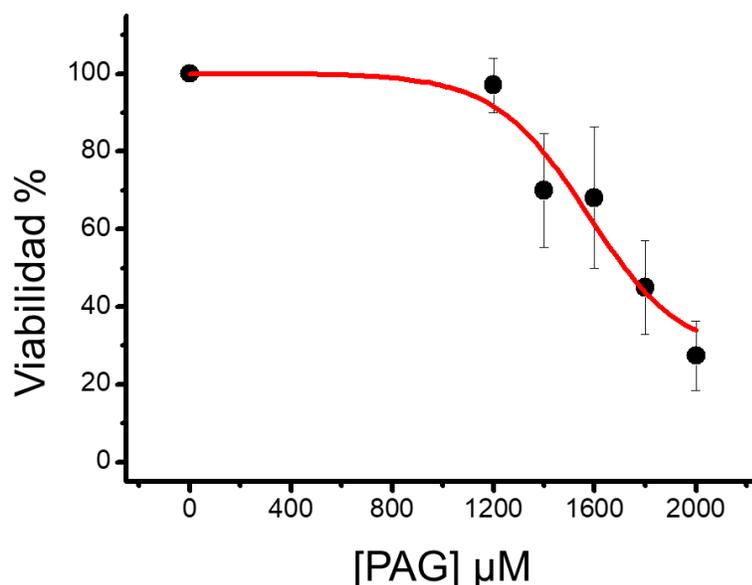


Figura 11. Curva concentración-respuesta sobre viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi* expuestos a L-propargilglicina por 24 h. $n=3$. Ajuste concentración-respuesta 0.93. El valor determinado de la LC_{50} fue de: 1.60 ± 0.26 mM.

Por otro lado, se evaluó el efecto de la PAG en el crecimiento de fibroblastos humanos de la línea celular HFF1 como comparativo de susceptibilidad de ambos tipos celulares. En la Fig. 12 se observa el efecto de la PAG sobre las células HFF1, como se puede observar el crecimiento celular se inhibe en un 50% a una concentración de 40.3 μM, lo cual es 5 veces menos a la IC_{50} determinada para epimastigotes de *T. cruzi*. En conclusión, los fibroblastos humanos son más susceptibles a la PAG que los epimastigotes de *T. cruzi*.

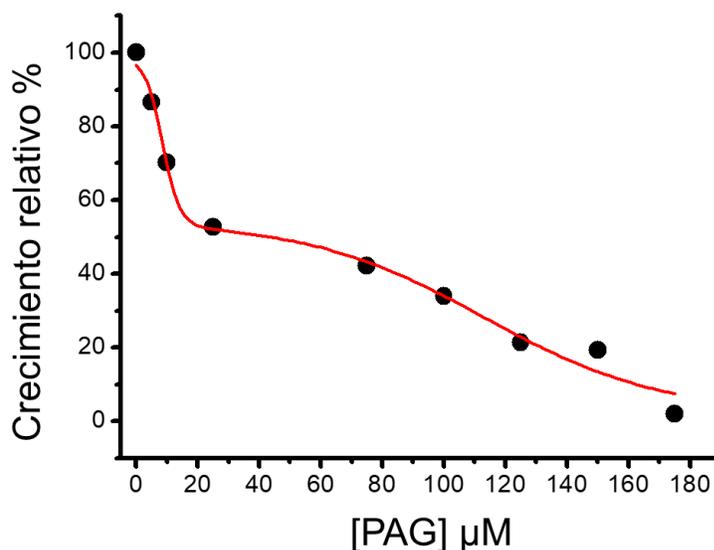


Figura 12. Curva concentración-respuesta sobre crecimiento de fibroblastos de la línea celular HFF1 expuestos a L-propargilglicina por 24 h. n=2. Ajuste: BiDosis-Respuesta 0.98. El valor determinado de la IC_{50} fue de: 40.3 μM .

6.2 Evaluación del efecto de la PAG en la CGL de *T. cruzi*

Se determinó la actividad de la CGL en presencia y ausencia de la PAG en extractos citosólicos del parásito. En la Fig.13 se presenta la actividad de la CGL del extracto citosólico de un cultivo control, en la que la recta en la gráfica corresponde a la síntesis de Cys a través del tiempo (cuadrados negros). También se observa que al iniciar la reacción en presencia de de la PAG 100 μM no existe una producción progresiva de Cys (círculos rojos). Como ensayos control de especificidad adicionales, se realizaron reacciones en ausencia del sustrato específico (Cth) (triángulos azules) y en ausencia del extracto citosólico que contiene a la CGL (triángulos verdes). Con estos ensayos se demuestra que la producción de la Cys se atribuye únicamente a la acción de CGL. La actividad enzimática que se calculó para la CGL fue de 2.2 ± 0.8 nmol/min*mg prot (n=3).

También se determinó la actividad de la CGL en extractos citosólicos de parásitos que se expusieron por 24 h a la PAG 155 μM , donde en el ensayo completo se muestra que no hubo síntesis de la Cys (Fig. 14) y con la finalidad de mantener las mismas condiciones experimentales se realizaron las mismas reacciones control de actividad específica adicionales aplicadas al extracto citosólico control. Estos resultados indican que el compuesto inactivó a la CGL del parásito.

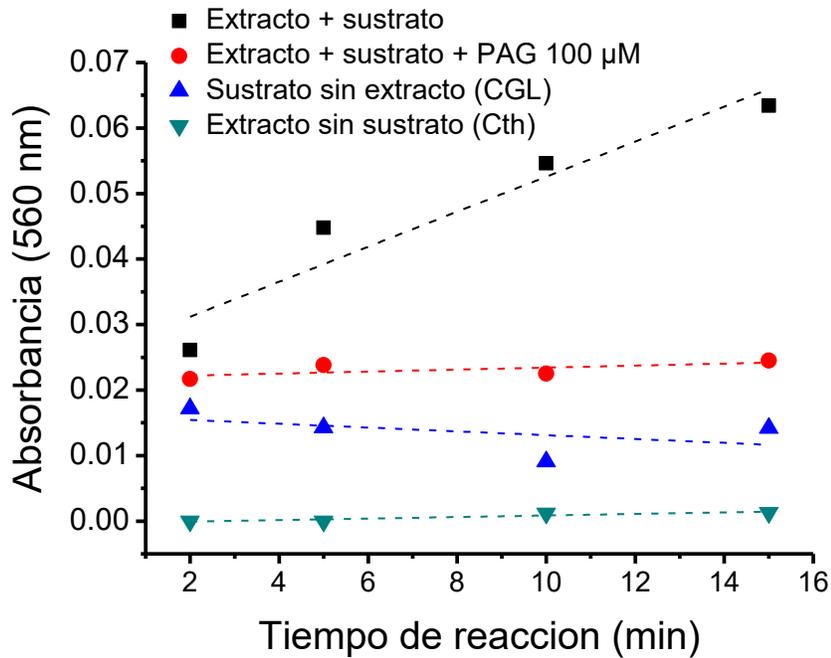


Figura 13. Actividad enzimática de la CGL.

La composición del ensayo completo es: HEPES 40 mM + EDTA 1 mM pH 7.4, PLP120 µM, proteína del extracto citosólico 0.5 µg/ µL y Cth 5 mM. Se observa la proporcionalidad de la producción de la Cys a través del tiempo. En los ensayos control de especificidad de la reacción (en presencia de la PAG y en ausencia del sustrato) no hay formación de la Cys. No hay reacción espuria entre los componentes de la reacción (ausencia de extracto).

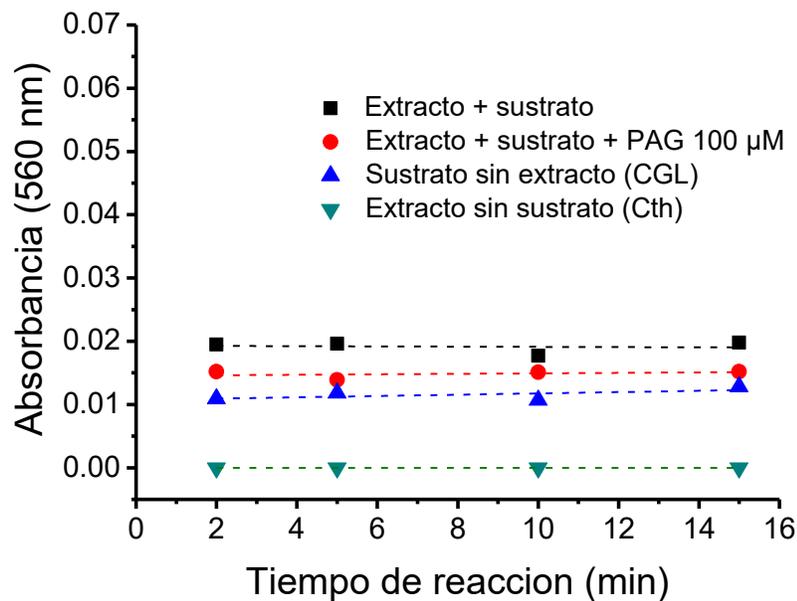


Figura 14. Inactivación de la CGL en extractos citosólicos de parásitos expuestos a PAG 155 µM por 24 h. En el ensayo completo se muestra la improductividad de la Cys a través del tiempo.

6.3 Efecto de la PAG en la concentración de metabolitos tioles

Se cuantificaron por HPLC los metabolitos tioles de la vía de síntesis del tripanotión (Cys, GSH y T(SH)₂) de la fracción soluble de extractos citosólicos de parásitos que se expusieron a concentraciones progresivas de la PAG por 24 h.

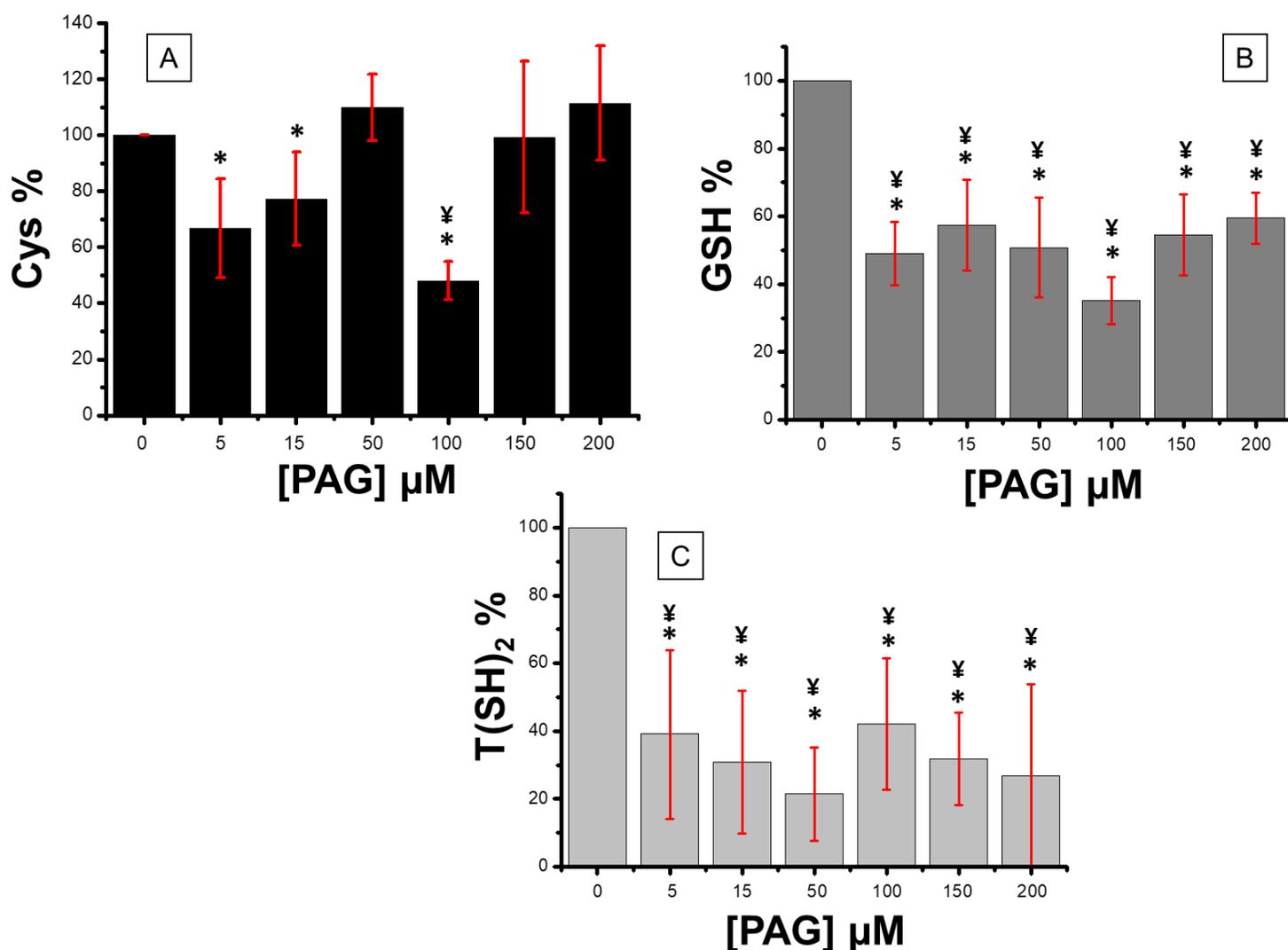


Figura 15. Efecto de la PAG en la concentración de metabolitos tioles involucrados en la vía de síntesis de tripanotión. (A) Cisteína, (B) Glutatión, (C) Tripanotión. Los datos se manejaron en una escala comparativa porcentual con respecto a los contenidos de tioles en parásitos no expuestos a la PAG en donde el 100% de la concentración de metabolitos equivale a Cys = 7.5 ± 1.6 , GSH = 5.7 ± 2.0 , T(SH)₂ = 2.3 ± 1.2 nmol tiol/mg de proteína celular n=4.

*Prueba t-student para dos muestras $p < 0.05$ concentraciones de la [PAG] comparadas con la [PAG] 0.0 μM.

‡Prueba Anova post-hoc Dunnett de una vía $p < 0.05$ concentraciones de la [PAG] comparadas con la [PAG] 0.0 μM.

Nota: Para los análisis de resultados y la discusión se tomaron en cuenta los datos de la prueba t-student, ya que los epimastigotes que fueron expuestos a la PAG provienen de un mismo cultivo y por lo tanto, tienen un mismo fondo genético.

En la Fig. 15A se observa que a concentraciones de 5-15 μM de la PAG, la concentración de la Cys disminuye hasta un 35%, pero al incrementar la concentración del compuesto hasta 200 μM se observa una tendencia en la recuperación de la concentración de la Cys al nivel basal. En el caso del GSH (Fig. 15B) se observa un decremento del 60% desde 5 μM de la PAG el cual se mantiene sin cambios a mayor concentración del inhibidor. Por último, el T(SH)_2 (Fig. 15C) presenta un decremento progresivo del 60 al 80% entre 5 y 50 μM de la PAG siendo este un reflejo de la disminución de los metabolitos precursores (Cys y GSH). No hay una posterior recuperación de la concentración basal del T(SH)_2 a concentraciones mayores de 50 μM de la PAG.

7. DISCUSIÓN

En este proyecto a través de la inhibición de la CGL con su inhibidor específico PAG se demostró la importancia que ejerce la vía de transulfuración reversa sobre la síntesis de la Cys y su efecto en la vía síntesis del T(SH)₂ en *T. cruzi*.

En primer lugar, se determinó el efecto del compuesto sobre el crecimiento y viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi*, así como sobre el crecimiento de la línea celular HFF1. Se observa una resistencia a la PAG en algunos tripanosomátidos; en epimastigotes de *T. cruzi* se determinó una IC₅₀ de 204 μM mientras que para *Leishmania spp.* se ha informado una IC₅₀ de 65 μM para la PAG (Giordana L. *et al.*, 2014). La capacidad de incorporar Cys del medio extracelular que posee *T. cruzi* frente a *Leishmania spp.* (Williams *et al.*, 2009) puede conferirle una ventaja metabólica frente al gasto de energía que se requiere para la síntesis de este aminoácido por la vía de transulfuración reversa o por la vía de síntesis *novo*, por tanto, siendo la Cys el metabolito principal para la síntesis del T(SH)₂, esta ventaja que posee *T. cruzi* puede ser una posible explicación de su mayor resistencia frente a la PAG, sin embargo, esta comparación debe sustentarse y tomarse con cautela ya que las condiciones experimentales en las que se estudiaron a ambos tripanosomátidos fueron diferentes.

Así mismo, la IC₅₀ de *T. cruzi* fue cinco veces mayor comparado a la obtenida en los fibroblastos HFF1 (40 μM), aunque hay que tomar en cuenta las mismas consideraciones que se describieron con *Leishmania spp* inclusive llegar a tomar más consideraciones puesto que se trata de células completamente diferentes. Sin embargo, la mayor susceptibilidad de las células HFF1 puede deberse a que en mamíferos sólo existe la vía de transulfuración reversa para proveer la Cys, además de que participa en el catabolismo de la metionina y sus derivados como la L-homocisteína (Nozaki *et al.*, 2000), siendo fundamental en la supervivencia y mantenimiento celular.

En cuanto al efecto de la PAG sobre la viabilidad de los epimastigotes, se necesitó ocho veces la concentración de IC₅₀ determinada (204 μM) para llegar a la LC₅₀ (1.6 mM), lo que sugiere una alta resistencia de los epimastigotes a la PAG. Para poder estudiar el metabolismo de los tioles y la actividad de la CGL en parásitos expuestos a la PAG se tuvieron que utilizar concentraciones que estuvieran por debajo de la IC₅₀.

Se determinó que la PAG es un inhibidor potente y altamente específico para la CGL de *T. cruzi*, esto se debe a su estructura química y a su interacción con los grupos reactivos del sitio activo de la enzima. La estructura de la PAG es similar a la de los

aminoácidos y esto permite que el grupo amino interaccione rápidamente con el cofactor PLP en el sitio activo de la CGL. Dichas bases reactivas parecen estar exclusivamente en la CGL y ocasionan la activación del compuesto en un metabolito reactivo aleno (Fig. 9) ya que otras enzimas dependientes de PLP no se inhiben por la PAG (Yadav *et al.*, 2019). Como se muestra en las Figuras 13 y 14, el inactivador puede actuar a tiempos cortos de exposición (*in vitro* en la CGL del extracto citosólico control) o a tiempos prolongados (*in vivo* en la CGL de los epimastigotes en cultivo). En resultados experimentales del laboratorio se demostró que la PAG no inhibe a la CBS, la otra enzima de la vía de transulfuración reversa.

Debido a la alta especificidad de la PAG como inactivador de la CGL, el compuesto se utilizó para evaluar cómo la inhibición la vía de transulfuración reversa afecta la concentración de los tioles de la vía de síntesis de T(SH)₂ tras 24 h de exposición a la PAG. La inhibición de la vía de transulfuración reversa disminuye significativamente la concentración de todos los metabolitos tioles: a concentraciones de la PAG menores a 50 μM la Cys disminuye significativamente, pero a mayores concentraciones tiene una tendencia a recuperar su concentración basal, siendo estos últimos datos muy cercanos al control sin una diferencia significativa. Sin embargo, pese a que hay disponibilidad de la Cys para la síntesis de los tioles siguientes de la vía; el GSH y el T(SH)₂, se mantienen a la baja hasta en un 60% y 80%, respectivamente. Una razón de este patrón de metabolitos es que la PAG pudiera estar afectando a algunas de las enzimas de esta vía como la γ-GCL, lo que pudiera explicar esta acumulación de la Cys y la disminución del GSH y el T(SH)₂ (Fig. 7).

De acuerdo con los resultados publicados por González *et al.*, (2019) se determinó a través de un análisis de control metabólico que la γ-ECS ejerce entre un 60-74% del control del flujo de la síntesis del T(SH)₂, esto quiere decir que la inhibición de esta enzima disminuirá en un gran porcentaje la concentración del GSH y el T(SH)₂ y a su vez se acumulará su sustrato (Cys) (ver diagrama de la Fig. 7 y Fig. 15). Sin embargo, debido al mecanismo de acción de la PAG en la que tiene una función clave el cofactor PLP, la γ-ECS carece de este cofactor, por lo que si realmente se inhibe la γ-ECS por la PAG, sería por otro mecanismo.

Otra explicación que se planteó para el aparente incremento en la concentración de Cys después de la inhibición de la CGL por la PAG es la acumulación de la H-Cys, la cual difiere estructuralmente de Cys por un grupo metilo (CH₃) además de que la H-Cys es el metabolito con el que inicia la vía de transulfuración reversa (ver diagrama de la Fig.

7); de esta manera, esto nos permitió deducir que la Cys realmente se mantendría a la baja, razón por la cual las concentraciones de GSH y T(SH)₂ no se incrementarían. Sin embargo, la separación de los metabolitos por HPLC no nos permitió distinguir entre la L-HCys y la Cys en el cromatograma, por lo cual es necesario efectuar una metodología que nos permita confirmar o desmentir la acumulación de la H-Cys tras el efecto de la PAG.

Otra posibilidad que no debe descartarse es la activación de mecanismos compensatorios para mantener la concentración basal de la Cys por medio de reacciones no canónicas efectuadas por la CBS o por la activación de la vía de síntesis de *novo* en *T. cruzi* (Fig. 7). De acuerdo con los resultados publicados por Marciano *et al.*, (2012) la reacción canónica de la CBS es la síntesis de cistationina en la vía de transulfuración reversa pero también está involucrada en la producción de cisteína y sulfuro (HS⁻). Dentro de las reacciones no canónicas que cataliza la CBS se encuentran la conjugación de O-Acetil serina o L-Serina con sulfuro (Km de 1.1 ± 0.2 mM para L-serina y Km de 3.1 ± 0.2 mM para sulfuro de sodio) para producir Cys, mientras que en la vía de síntesis de *novo* la reacción O-Acetil serina + HS⁻ (Km para OAS de 7.8 ± 0.6 mM y Km para HS⁻ de 8.2 ± 0.5 mM) se cataliza mediante la acción de la cisteína sintasa (CS). Sin embargo la principal limitación que tienen ambas reacciones es la dependencia de HS⁻, ya que este metabolito es altamente reactivo y se encuentra disponible a bajas concentraciones, cercanas a 20 µM (Marciano *et al.* 2017), mientras que las Km de la enzimas para HS⁻ en *T. cruzi* se encuentran en el orden mM (Marciano *et al.* 2017; Nozaki *et al.* 2000), por lo que esta premisa tampoco correspondería con el efecto observado en las concentraciones del GSH y el T(SH)₂ ya que si la Cys realmente se está recuperando, los metabolitos siguientes también deberían recuperar su concentración basal debido a que la Cys es limitante en la producción del T(SH)₂.

El resultado más importante a destacar es que la inhibición de la CGL en la vía de transulfuración reversa induce una disminución significativa en la concentración de los metabolitos involucrados en la síntesis del T(SH)₂, lo que indica la importancia de esta vía para la síntesis del principal metabolito antioxidante del parásito. Así mismo, resultados preliminares del laboratorio indican que la CGL es una enzima indispensable en la síntesis de la Cys y el T(SH)₂ por lo que la CGL puede ser un potencial blanco terapéutico.

Para finalizar, los resultados presentados en este proyecto brindan información relevante y complementaria en el estudio del principal metabolito que contribuye al sistema antioxidante del parásito aunado a esto, se evidenció que el metabolismo de *T. cruzi* se mantiene estrechamente relacionando y, por lo cual, se abren nuevas ventanas

de oportunidades en la búsqueda de potenciales objetivos terapéuticos.

8. CONCLUSIONES

- Se demostró que la PAG afecta el crecimiento y viabilidad de epimastigotes de *T. cruzi* cepa Querétaro, así como en fibroblastos de la línea celular HFF1, siendo éstos últimos más susceptibles al compuesto.
- La PAG es un inhibidor potente de la CGL de *T. cruzi* a tiempos cortos de exposición (*in vitro*) como a tiempos prolongados (*in vivo*).
- La inhibición de la CGL de *T. cruzi* de la vía de transulfuración reversa disminuye significativamente la concentración de T(SH)₂.

9. PERSPECTIVAS

- Determinar la presencia de L-homocisteína tras la inactivación de CGL por la PAG y estudiar cómo se relaciona con la vía de síntesis del tripanotión.
- Evaluar los posibles efectos de la PAG sobre las enzimas de la vía de síntesis del tripanotión para poder explicar de mejor manera los cambios en los metabolitos tioles.
- Con base en los resultados obtenidos en esta tesis se abre la posibilidad de caracterizar cinéticamente y estudiar con mayor profundidad a la CGL de *T. cruzi*, con la finalidad de determinar su relación con el suministro de cisteína y la síntesis del tripanotión, y con ello evaluar su potencial como objetivo terapéutico.

10. BIBLIOGRAFÍA

- AMSE (Asociación de Médicos de Sanidad Exterior). (2016) Tripanosomiasis Americana. Epidemiología y situación mundial. Base de datos electrónica. Consultado el 15/05/22. Disponible en: <https://www.amse.es/informacion-epidemiologica/108-tripanosomiasis-americana-epidemiologia-y-situacion-mundial>
- Arellano M. (2002) Enfermedad de Chagas. *Revista médica de la Universidad Veracruzana* 2(1): Texto disponible en: https://www.uv.mx/rm/num_anteriores/revmedica_vol2_num1/articulos/enfermedad_del_chagas.html#:~:text=El%20h%C3%A1bitat%20de%20la%20chinche,adobe%20y%20pisos%20de%20tierra.
- Arnal A., Waleckx E., Rico-Chávez O., Herrera C., Dumonteil E. (2019) Estimating the current burden of Chagas disease in Mexico: A systematic review and meta-analysis of epidemiological surveys from 2006 to 2017. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 13(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006859>
- Asociación Española de Pediatría. Ficha técnica Nifurtimox. (2020). Consultado 22/05/22. Disponible en: <https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/nifurtimox>
- Brener Z., Andrade, Z., Barral-Neto M. (2000) *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2º Edição. Guanabara Koogan Editorial Rio de Janeiro, Brasil. 431 pp.
- Canepa E., Bouvier A., Miranda R., Uttaro D., Pereira A. (2009) Characterization of *Trypanosoma cruzi* L-cysteine transport mechanisms and their adaptive regulation. *FEMS Microbiology Letters*. 292(1), 27–32. [doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01467.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01467.x)
- Castro J. (2014) Efectos tóxicos de los fármacos utilizados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Rev Ciencia e investigación*. 64(5). Disponible en: <http://aargentinapciencias.org/wp-content/uploads/2018/01/RevistasCel/tomo64-5/Rev-cei64-5-7.pdf>
- Cazzulo J. (1994). Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 26(2), 157–165. [doi: 10.1007/BF00763064](https://doi.org/10.1007/BF00763064)
- Cevallos M., Hernández R. *Trypanosoma cruzi* y la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana). *Microbios en línea*. Martínez E., Martínez J. C. (editores). Libro virtual en: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap15/>.
- CDC (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades). (2016) Epidemiología y Factores de riesgo de la Enfermedad de Chagas. Base de datos electrónica. Consultado el 02/04/22. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/epidemiologia.html>
- CDC (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades). (2019) Tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas. Base de datos electrónica. Consultado el 05/04/22. Disponible en: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/hcp/tratamiento.html>
- Chagas C. (1909) Nova trypanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1(2), 159-218. Disponible en: <https://www.scielo.br/j/mioc/a/FXTzX4Sptjs5Wnz3yKCMRpS/>
- Comité de Parasitología. (2008) Tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas. Departamento de Enfermedades Emergentes y Re-emergentes, Ministerio de Salud de Chile. *Rev Chilena Infectología*. 25(5), 384-389. Consultado el 22/04/22. Documento electrónico disponible en: <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v25n5/art13.pdf>
- Cruz A., Pickering M. (2005) Chagmex. UNIBIO, Instituto de Biología, UNAM. Base de datos electrónica. Consultado el 03/04/22. Disponible en: <http://www.unibio.unam.mx/chagmex>. Documento PDF disponible en: <http://www.ibiologia.unam.mx/pdf/noticias/CHAGMEX.pdf>
- Del Pino M., Coll O. (2006) Enfermedad de Chagas, transmisión materno fetal y experiencia recogida en nuestro centro. *Enfermedades Emergentes*. 8(1), 37-39. Disponible en: <http://enfermedadesemergentes.com/articulos/a513/s-8-supl-010.pdf>
- Díaz I., De Pablos L., Longhi S. (2017) Immune complexes in chronic Chagas disease patients are formed by exovesicles from *Trypanosoma cruzi* carrying the conserved MASP N-terminal region. *Scientific Reports*. 7(44451). <https://doi.org/10.1038/srep44451>.

- Díaz L., González I. (2014) Enfermedad de Chagas aguda: transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* como una vía de transmisión re-emergente. *Rev Universidad Industrial Santander*. 46(2), 177-188. [ISSN 0121-0807](https://doi.org/10.1042/bj1040627).
- Gaitonde MK. A spectrophotometric method for the direct determination of cysteine in the presence of other naturally occurring amino acids. (1967) *Biochemistry Journal*. 104(2), 627-33. [doi: 10.1042/bj1040627](https://doi.org/10.1042/bj1040627). PMID: 6048802; PMCID: PMC1270629.
- García-Torres I., Pérez-Montfort Ruy. (2011) Avances en la identificación de blancos terapéuticos y el diseño racional de fármacos contra la Enfermedad de Chagas. *Revista de Educación Bioquímica*. UNAM 30(2), 68-81. Disponible en: <https://www.redalyc.org/pdf/490/49019903004.pdf>
- Gascón J., Bern C., Pinazo MJ. (2010) Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Tropica*. 115(1-2), 22-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.07.019>
- Giordana L., Mantilla BS., Santana M., Silber AM., Nowicki C. (2014) Cystathionine γ -lyase, an enzyme related to the reverse transsulfuration pathway, is functional in *Leishmania* spp. *Journal Eukaryot Microbiol*. 61(2), 204-213. [doi: 10.1111/jeu.12100](https://doi.org/10.1111/jeu.12100). PMID: 24410980.
- Gonçalves S., Ávila R., de Souza, W. (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>
- González-Chávez Z. (2011) Análisis cinético del sistema de desintoxicación de peróxidos de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- González-Chávez Z., Vázquez C., Mejía-Tlachi M., Márquez-Dueñas C., Manning-Cela R., Encalada R., Rodríguez-Enríquez S., Michels PAM., Moreno-Sánchez R., Saavedra E. (2019) Gamma-glutamylcysteine synthetase and tryparedoxin 1 exert high control on the antioxidant system in *Trypanosoma cruzi* contributing to drug resistance and infectivity. *Redox Biology*. 26, 101231. [doi: 10.1016/j.redox.2019.101231](https://doi.org/10.1016/j.redox.2019.101231).
- Hasenberg W. (2002) Biología de las especies de oxígeno reactivas. *Mensaje Bioquímico*. En cea A., del Arenal I. P., Riveros H., Vázquez E. (editores). XXVI. Disponible en: http://static1.1.sqspcdn.com/static/f/1381323/18832492/1340082783193/Mensaje_Bioq02v_26p019_Hansberg.pdf
- IPCA (Iniciativa de los Países de América Central, para la Interrupción de la Transmisión Vectorial y Transfusional de la Enfermedad de Chagas). (2011) Historia de 12 años de una Iniciativa Subregional 1998-2010. Representación de la OPS (2011). Honduras. 89 pp. Consultado 16/05/22. Documento disponible en: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2012/chagas-Historia-IPCA.pdf>
- Jaramillo L., Ruiz C, Martínez L., Vera S. (2017) Enfermedad de Chagas: una mirada alternativa al tratamiento. *Revista Cubana de Medicina Tropical*. 69(2). Disponible en: <http://revmedtropical.sld.cu/index.php/medtropical/article/view/140>
- Madigan M., Martinko J., Bender K., Buckley D. y Stahl D. (2015) Brock. Biología de los microorganismos. 14ª edición. Pearson Education, S.A. Madrid. 588, 1017 y 1018 pp.
- Marciano D., Santana M., Nowicki C. (2012) Functional characterization of enzymes involved in cysteine biosynthesis and H₂S production in *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Biochemistry Parasitology*. 185(2), 114-120. [doi: 10.1016/j.molbiopara.2012.07.009](https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2012.07.009)
- Maresi E., Janson G., Fruncillo S., Paiardini A., Vallone R., Dominici P., Astegno A. (2018) Functional Characterization and Structure-Guided Mutational Analysis of the Transsulfuration Enzyme Cystathionine γ -Lyase from *Toxoplasma gondii*. *International Journal Molecular Sciences*. 19(7), 2111. [doi: 10.3390/ijms19072111](https://doi.org/10.3390/ijms19072111). PMID: 30036991; PMCID: PMC6073527.
- Martínez I., Cervantes A., Espinoza. (2013) Diagnóstico Molecular de la Enfermedad de Chagas. *Gaceta Médica de México*. 149:363-5 Disponible en: https://www.anmm.org.mx/GMM/2013/n3/GMM_149_2013_3_363-365.pdf
- Martínez A., Herrán Aguirre M., Guibert Valencia J., Ezpeleta C. (2013) Enfermedad de Chagas neonatal de transmisión vertical en países no endémicos: El uso de la PCR en el diagnóstico: ventajas sobre técnicas convencionales. *Analies Sis San Navarra*. 36(1), 115-118. <https://dx.doi.org/10.4321/S1137-66272013000100011>.

- Matoba Y., Noda M., Yoshida T. (2020) Catalytic specificity of the *Lactobacillus plantarum* cystathionine γ -lyase presumed by the crystallographic analysis. *Science Reports* 10(1), 14886. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71756-7>
- Maya JD., Cassels BK., Iturriaga-Vásquez P., Ferreira J., Faúndez M., Galanti N., Ferreira A., Morello A. (2007) Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Biochemistry. Physiology*. 146(4), 601-620. [doi: 10.1016/j.cbpa.2006.03.004](https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.03.004).
- Menchaca-Armenta I. (2019) Transmisión Congénita de la Enfermedad de Chagas. *Gaceta Hidalguense de Investigación en Salud*. 7(1). Disponible en: https://salud.hidalgo.gob.mx/contenido/transparencia/armonizacion/2019/Gaceta-2019-1_Transmisi%C3%B3nChagas.pdf
- Mello FV., Carvalho AS., Bastos MM., Boechat N., Aiub CA., Felzenszwalb I. (2013) Evaluation of genotoxic effects of new molecules with possible trypanocidal activity for Chagas disease treatment. *Scientific World Journal*. 287319. [doi: 10.1155/2013/287319](https://doi.org/10.1155/2013/287319).
- Moreno-Sánchez R., Saavedra E., Rodríguez-Enríquez S., Olín-Sandoval V. (2008) Metabolic control analysis: a tool for designing strategies to manipulate metabolic pathways. *Journal Biomedicine Biotechnology*. 597913. [doi: 10.1155/2008/597913](https://doi.org/10.1155/2008/597913). PMID: 18629230; PMCID: PMC2447884.
- Moreno N., Docampo R., Mason P., León W., Stoppani O. (1984) Different behaviors of benzimidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. *Archives. Biochemistry. Biophysics*. 218, 585–591. [doi: 10.1016/0003-9861\(82\)90383-6](https://doi.org/10.1016/0003-9861(82)90383-6)
- Moya P., Basso B., Moretti E. (2005) Congenital Chagas disease in Cordoba, Argentina: epidemiological, clinical, diagnostic, and therapeutic aspects. Experience of 30 years of follow up. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina*. 38(2), 33-40. PMID: 16482811
- National Center for Biotechnology Information. PubChem Compound Summary for CID 168091, L-Propargylglycine. Consultado 14/03/22. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-Propargylglycine>.
- Nozaki T., Shigeta Y., Saito-Nakano Y., Imada M., Kruger WD. (2001) Characterization of transsulfuration and cysteine biosynthetic pathways in the protozoan hemoflagellate, *Trypanosoma cruzi*. Isolation and molecular characterization of cystathionine beta-synthase and serine acetyltransferase from *Trypanosoma*. *Journal Biological Chemistry*. 276(9), 6516-6523. [doi: 10.1074/jbc.M009774200](https://doi.org/10.1074/jbc.M009774200). PMID: 11106665.
- Lorca M. (2001) La enfermedad de Chagas congénita, transfusional y otras vías en el contexto de la interrupción de la transmisión vectorial. Grupo de Trabajo OPS en Enfermedad de Chagas, Montevideo, Uruguay. Consultado 16/04/22. Disponible en: <https://www3.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/consulta-3.pdf>
- Lowry OH., Rosebrough NJ., Farr AL y Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal Biological Chemistry*. 193(1), 265-275. PMID: 14907713.
- Olin V., Moreno R., Saavedra E. (2010) Targeting trypanothione metabolism in trypanosomatid human parasites. *Current Drug Targets*. 11(12), 1614-1630. <https://doi.org/10.2174/1389450111009011614>
- Olin-Sandoval V., González-Chávez Z., Berzunza-Cruz M., Martínez I., Jasso-Chávez R., Becker I., Espinoza B., Moreno-Sánchez R., Saavedra E. (2012) Drug target validation of the trypanothione pathway enzymes through metabolic modelling. *FEBS Journal*. 279(10), 1811-1833. [doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08557.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08557.x). PMID: 22394478.
- OMS (Organización Mundial de la Salud). (2021) La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana). Base de datos electrónica. Consultado el 07/04/22. Disponible en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).
- OPS (Organización Panamericana de la Salud). (2016) Enfermedad de Chagas. Base de datos electrónica. Consultado 10/04/22. Disponible en: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>
- Pearson R. (2020) Enfermedad de Chagas. MD, *University of Virginia School of Medicine*. Consultado 22/05/22. Disponible en: <https://www.msmanuals.com/es->

[mx/professional/enfermedades-infecciosas/protozoosextraintestinales/enfermedad-de-chagas](#)

- Pereira C., Carrillo C., Miranda M., Bouvier L., Canepa G. (2008) *Trypanosoma cruzi*: Transporte de metabolitos esenciales obtenidos del hospedador. *Medicina Buenos aires*; 68, 398-404. Documento electrónico disponible en: http://www.medicinabuenosaires.com/revistas/vol68-08/5/v68_n5_p398_404_.pdf
- Portal informativo: Info-Chagas. Transmisión de la Enfermedad de Chagas. Base de datos electrónica. Consultado 20/05/22. Disponible en: <https://www.infochagas.org/como-se-transmite>
- Rojo-Medina J., Ruiz-Matus C., Salazar-Schettino PM., González-Roldán JF. (2018) Enfermedad de Chagas en México. *Gaceta Médica Mexicana*. 154, 605-612. doi: [10.24875/GMM.18004515](https://doi.org/10.24875/GMM.18004515)
- Rueda K., Trujillo JE, Carranza JC., Vallejo GA. (2014) Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. *biomédica*. 34(4), 631-641. Disponible en: <https://revistabiomedica.org/index.php/biomedica/article/view/2204>
- Salazar-Schettino P., Bucio-Torres M., Cabrera-Bravo M., Alba-Alvarado M., Castillo-Saldaña D., Zenteno-Galindo E. (2016) Enfermedad de Chagas en México. *Rev Facultad Medicina*. 59(3), 6-16. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S002617422016000300006&lng=es
- Salazar-Schettino P., Bucio-Torres M., Cabrera-Bravo M., Ruiz A. (2011) Presentación de dos casos de enfermedad de Chagas aguda en México. *Gaceta médica de México*. 147, 63-69. Disponible en: https://www.anmm.org.mx/GMM/2011/n1/64_GMM_Vol_147_-_1_2011.pdf
- Salazar-Schettino P., Cabrera B., Yurika M. (2019) Más de un millón de infectados en México con la Enfermedad de Chagas. *Boletín UNAM DGCS-718*. Ciudad Universitaria, UNAM. Consultado 22/05/22. Disponible en: https://www.dgcs.unam.mx/boletin/bdboletin/2019_718.html
- Sandoval D., Jaimes M., Jiménez F. (2020) Transmisión Vertical de la Enfermedad de Chagas: Reporte de caso. *Ginecología Obstetricia Mex*. 88(4), 271-276. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/ginobsmex/gom-2020/gom204i.pdf>
- Shelly EM., Acuna-Soto R., Ernst KC., Sterling CR., Brown HE. (2016) A Critical Assessment of Officially Reported Chagas Disease Surveillance Data in Mexico. *Public Health Reports*. 131(1), 59-66. doi: [10.1177/003335491613100112](https://doi.org/10.1177/003335491613100112). PMID: 26843671; PMCID: PMC4716473.
- Simioli F., Sánchez-Cunto M., Velázquez E., Lloveras S., Orduna T. (2017) Enfermedad de Chagas en el sistema nervioso central en paciente con infección por VIH: dificultades diagnósticas y terapéuticas. *Rev chilena infectología*. 34(1), 62-66. <https://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182017000100009>.
- Siqueira R., Meneses L., Storino L. (1994) Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica XL*. 527, 69-75. Disponible en: <https://www.binasss.sa.cr/revistas/rmcc/rmedica/527/art7.pdf>
- Sosa S., Armenti A., Araujo G., Viotti R., Lococo B., Ruiz B., Vigliano C., Rissio A., Segura E. (2004) Tratamiento de la enfermedad de Chagas con benznidazol y ácido tiotico. *Medicina Buenos Aires*. 64, 1-6. Disponible en: <http://www.scielo.org.ar/pdf/medba/v64n1/v64n1a01.pdf>
- Steegborn C., Clausen T, Sondermann P., Jacob U., Worbs M., Marinkovic S., Huber R., Wahl MC. (1999) Kinetics and inhibition of recombinant human cystathionine gamma-lyase. Toward the rational control of transsulfuration. *Journal Biological Chemistry*. 274(18), 12675-12684. doi: [10.1074/jbc.274.18.12675](https://doi.org/10.1074/jbc.274.18.12675). PMID: 10212249.
- Stewart J. (2021) Lampit FDA approval history. Base de datos electrónica: Drugs.com. Consultado 14/10/22. Disponible en: <https://www.drugs.com/newdrugs/fda-approves-lampit-nifurtimox-chagas-children-5317.html>
- Vázquez C., Mejía-Tlachi M., González-Chávez Z., Silva A., Rodríguez-Zavala JS.,

- Moreno-Sánchez R., Saavedra E. (2017) Buthionine sulfoximine is a multitarget inhibitor of trypanothione synthesis in *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Letters*. 591(23), 3881-3894. [doi: 10.1002/1873-3468.12904](https://doi.org/10.1002/1873-3468.12904). PMID: 29127710.
- Velasco O., Valdespino L., Tapia R., Salvatierra B., Guzmán C., Magos C., Llausás A., Gutiérrez G., Sepulveda J. (2002) Seroepidemiología de la Enfermedad de Chagas en México. *Salud Pública Mex*; 34(2), 186-196. Disponible en: <https://saludpublica.mx/index.php/spm/article/download/5487/5838>
 - Washtien W., Abeles RH. (1977) Mechanism of inactivation of gamma-cystathionase by the acetylenic substrate analogue propargylglycine. *Biochemistry*. May 31;16(11):2485-91. [doi: 10.1021/bi00630a026](https://doi.org/10.1021/bi00630a026). PMID: 16648.
 - Williams RA, Westrop GD, Coombs GH. (2009) Two pathways for cysteine biosynthesis in *Leishmania major*. *Biochemistry Journal*. 420(3), 451-462. [doi: 10.1042/BJ20082441](https://doi.org/10.1042/BJ20082441). PMID: 19296828.
 - Yadav PK., Vitvitsky V., Kim H., White A., Cho US., Banerjee R. (2019) S-3-Carboxypropyl-L-cysteine specifically inhibits cystathionine γ -lyase-dependent hydrogen sulfide synthesis. *Journal Biological Chemistry*. 294(28), 11011-11022. [doi: 10.1074/jbc.RA119.009047](https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.009047) PMID: 31160338; PMCID: PMC6635441.