



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLÁN

**Efecto de la butionina sulfoximina y la
suplementación con tioles en el
sistema antioxidante de *Trypanosoma
cruzi***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:
MARLEN BEATRIZ MEJIA TLACHI

ASESOR:
DRA. EMMA CECILIA SAAVEDRA LIRA

COASESOR:
M. EN C. RAQUEL MARIA DEL REFUGIO TAPIA
ROMERO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Efecto de la butionina sulfoximina y la suplementación con tioles en el sistema antioxidante de *Trypanosoma cruzi*.

Que presenta la pasante: Marlen Beatriz Mejía Tlachi
Con número de cuenta: 303341345 para obtener el Título de la carrera: Química Farmacéutico Biológica.

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 10 de diciembre de 2018.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Juan Pablo Martínez Labat	
VOCAL	M. en C. Tais Nopal Guerrero	
SECRETARIO	M. en C. Raquel María del Refugio Tapia Romero	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	
2do. SUPLENTE	Dr. Jorge Luis de la Rosa Arana	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg

DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A mi Mamá, por ser la amiga y compañera que me ha ayudado a crecer, gracias por estar siempre conmigo en todo momento. Gracias por la paciencia que has tenido para enseñarme, por el amor que siempre me das, por tus cuidados, por los regaños. Gracias “mamita linda” por estar al pendiente durante toda esta etapa.

A mi Papá, este es un logro que quiero compartir contigo, gracias por ser mi papá y por creer en mí. Gracias porque siempre, aunque lejos has estado a mi lado. Te quiero mucho.

A mis hermanos Jorge y Ricardo, que con todo su amor me han enseñado a salir adelante. Gracias por preocuparse por su hermana menor, gracias por compartir tantos buenos momentos de vida juntos, pero sobretodo, por estar en otro momento tan importante en mi vida.

A mi sobrina Dana, aunque todavía no puedes leer, un día no tan lejano vas a aprender y por eso también te dedico esta tesis, gracias por alegrarme con tus juegos y bailes los fines de semana. Te quiero Danita.

A mis compañeros de clase y amigos, Aidé, Alfredo, Araceli, Israel, Maribel, Mayra, Nancy, Pamela, Rebeca, Viviana, etc., por pasar a mi lado los momentos de mi vida universitaria y estar siempre en las buenas y en las malas, jamás los olvidaré.

A todos mis profesores no solo de la carrera sino de toda la vida, mil gracias porque forman parte de lo que ahora soy.

A mi asesora y tutora Dra. Emma C. Saavedra Lira, gracias por sus valiosas enseñanzas, por permitirme formar parte de su equipo de Trabajo, por su apoyo y guía en mi formación.

A mi asesora técnica y mejor amiga Citlali Vázquez, que me ayudado mucho en la realización de este trabajo, sin ti muchas cosas me habrían resultado más difíciles. Gracias por tu paciencia, gran cariño y apoyo, espero corresponderte y te sientas orgullosa de mí como yo me siento de ti.

A mis amigos y compañeros del laboratorio (trypos y amibas) Rusely, Zabdi, Citlali, Erika, Estephania, Aketzalli, Kevin, Samantha, Oswaldo y Ximena que me han ayudado en todo lo posible y con los que he pasado buenos momentos, gracias por siempre brindarme su apoyo, así como las palabras de ánimo y buenos consejos.

A los miembros del jurado, gracias por darme la oportunidad y por el tiempo que me han dedicado para leer este trabajo.

Gracias a todos aquellos que no están aquí, pero que me ayudaron a que este gran esfuerzo se volviera realidad.

Esta tesis se desarrolló en el Departamento de Bioquímica, en el edificio de investigación del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, bajo la dirección de la Doctora Emma C. Saavedra Lira. Este trabajo fue realizado con el apoyo brindado por el Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a través del proyecto 272941 del Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad Social.

INDICE

Abreviaturas

Resumen

1	Introducción.....	12
1.1	Enfermedad de Chagas, aspectos históricos.....	12
1.2	Morfología del parásito.....	12
1.3	Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	14
1.4	Epidemiología.....	15
1.5	Formas de transmisión.....	16
1.6	Patología de la enfermedad de Chagas.....	17
1.7	Diagnóstico.....	18
1.8	Tratamiento.....	19
1.9	Mecanismo de acción del Nifurtimox y Benznidazol.....	20
2	Marco teórico.....	21
2.1	Enfermedad de Chagas y el estrés oxidante.....	21
2.2	Sistema antioxidante de <i>T. cruzi</i>	22
2.3	Butionina Sulfoximina inhibidor de la γ ECS.....	25
3	Antecedentes.....	26
4	Justificación.....	27
5	Hipótesis.....	28
6	Objetivo general.....	28
7	Objetivos particulares.....	28
8	Metodología.....	29
8.1	Cultivo de <i>T. cruzi</i>	29
8.2	Efecto de la DL-(S, R)- BSO sobre el crecimiento de epimastigotes expuestos por 24 h.....	30
8.3	Efecto de la DL-(S, R)- BSO sobre el crecimiento de epimastigotes expuestos por 10 días.....	30
8.4	Exposición para determinación de metabolitos tioles en parásitos incubados con BSO en ausencia y presencia de suplementación con tioles.....	30
8.5	Cuantificación de proteína.....	31
8.6	Determinación de tioles en cultivos de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	32
8.7	Purificación de proteínas recombinantes.....	34
8.8	Determinación de la actividad enzimática y la inhibición por DL-(S, R)-BSO.....	34
9	Resultados.....	37

9.1	Cinética de crecimiento de los parásitos.....	37
9.2	Efecto de la DL-(S, R)- BSO a 24 h en el crecimiento de epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	38
9.3	Efecto de la DL-(S, R)- BSO sobre el crecimiento de epimastigotes de <i>T. cruzi</i> por 10 días.....	40
9.4	Efecto de la DL-(S, R)- BSO y la suplementación con Cys o GSH sobre los metabolitos tioles de <i>T. cruzi</i>	42
9.5	Efecto de la DL-(S, R)- BSO en la actividad de enzimas recombinantes de γ ECS, GS y TryS.....	44
9.6	Efecto de la L-(S, R)- BSO en la actividad de enzimas recombinantes de γ ECS, GS y TryS.....	47
9.7	Efecto de la DL-(S, R)- BSO en la actividad de enzimas γ ECS, GS y TryS en extractos citosólicos del parásito.....	48
9.8	Efecto de la DL-(S, R)- BSO sobre el crecimiento de parásitos que sobreexpresan a γ ECS o TryS.....	48
10	Análisis de resultados y discusión.....	49
10.1	Efecto del BSO en el crecimiento del parásito.....	50
10.2	Análisis de los perfiles de tioles en parásitos tratados con BSO para dilucidar su posible modo de acción.....	50
10.3	Resistencia de los parásitos a la BSO.....	52
10.4	Suministro de metabolitos tiol y la inhibición multi-sitio de la BSO.....	52
11	Conclusión.....	53
12	Perspectivas.....	53
13	Referencias.....	54
14	Anexo: Artículo “Buthionine sulfoximine is a multitarget inhibitor of trypanothione synthesis in <i>Trypanosoma cruzi</i> ”	58

ABREVIATURAS

•OH	anión hidroxilo
$^1\text{O}_2$	oxígeno en singulete
AdoMet	S- adenosil metionina descarboxilada
AdoMetDC	S-adenosil metionina descarboxilasa
ADP	adenosin difosfato
Apx	ascorbato peroxidasa
ATP	adenosil-trifosfato
Bnz	Benznidazol
BSA	albumina suero bovino
CENAPRE enfermedades	Centro nacional de programas preventivos y control de enfermedades
Cys	Cisteína
DL-(S,R)-BSO	DL-(S, R)-Butionina Sulfoximina
DNA	ácido desoxirribonucleico
ELISA	Ensayo por inmuno-absorción ligado a enzimas
EUA	Estados Unidos de América
Fe^{3+}	hierro
G	tiempo generacional
Gly	glicina
GS	glutación sintetasa
GSH	glutación
H_2O_2	peróxido de hidrógeno
HAI	hemaglutinación indirecta
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
IC_{50}	Concentración inhibitoria 50%
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M

Ki	constante de inhibición
Km	constante de Michaelis- Menten
L-(S, R)-BSO	L-(S,R)- Butionina Sulfoximina
L-Glu	glutamato
LIT	Liver infusion-tryptose
Ln	logaritmo natural
NADH	nicotinamida-adenina-dinucleótido
NADPH	nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato
Nfx	Nifurtimox
NO•	óxido nítrico
NOS	especies reactivas de nitrógeno
nsGPXA, nsGPXB	glutación peroxidasa no dependiente de selenio A y B
O ²⁻	oxígeno atómico
O ₂ • ⁻	superóxido
O ₃	ozono
OH ⁻	radical hidroxilo
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONOO	peroxinitrito
OPS	Organización Panamericana de la Salud
p52	triptanotión-glutación tiol transferasa
PBS	buffer de fosfato salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEP	fosfoenol piruvato
PYK / LDH	piruvato cinasa / lactato deshidrogenasa
ROS	especies reactivas de oxígeno
SOD	superóxido dismutasa
Spd	espermidina
SpdS	espermidina sintasa

SS	Secretaria de Salud
T(SH) ₂	tripanotión
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TryR	tripanotión reductasa
TryS	tripanotión sintetasa
TS ₂	disulfuro del tripanotión
TXN	triparedoxina
TXN-Px	peroxiredoxina
<i>V_{max}</i>	velocidad máxima
WHO	world health organization
γEC	gamma glutamilcisteina
γECS	gamma-glutamilcisteina sintetasa
μ	velocidad de crecimiento

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es consecuencia de la infección por el protozoario *Trypanosoma cruzi*. En México durante la fase crónica de la enfermedad, 30% de las personas infectadas desarrollarán miocardiopatía chagásica, mientras que en Sudamérica el 10% presentarán afecciones de tipo digestivo.

Durante el ciclo de vida del parásito al igual que durante la colonización del hospedador, *T. cruzi* se enfrenta al estrés oxidante, por lo que cuenta con un metabolismo antioxidante dependiente de tripanotión ($T(SH)_2$) el cual es un conjugado de dos moléculas de glutatión (GSH) y una espermidina (Spd). En nuestro grupo de trabajo se realizó un modelado metabólico y se determinó que la gamma-glutamylcisteína sintetasa (γ ECS) controla el 58% del flujo de síntesis de $T(SH)_2$ y la tripanotión sintetasa (TryS) un 49%. Por otro lado se sabe que la γ ECS es inhibida específicamente por la butionina sulfoximina (DL-(S,R)-BSO). En epimastigotes de *T. cruzi* se determinó una IC_{50} de 13.6 mM de BSO sobre el crecimiento; en otros tripanosomatidos se observó que en presencia del inhibidor la concentración de GSH y $T(SH)_2$ disminuye. Al suplementar con GSH este efecto no pudo revertir lo que sugiere que el BSO tiene blancos adicionales a la γ ECS, proponiendo que la disminución de $T(SH)_2$ en ambas condiciones puede deberse a la inhibición de la tripanotión sintetasa (TryS) un punto de control importante en la vía antioxidante.

El objetivo de esta tesis es determinar si la BSO es un inhibidor inespecífico de la síntesis de $T(SH)_2$. Se determinó una IC_{50} de 3.3 ± 1.4 mM por BSO en el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* después de 24 horas de exposición. Al determinar el perfil de tioles en parásitos expuestos a la BSO (0 – 3 mM); el tratamiento provocó una acumulación de cisteína (Cys) 30% y la disminución de la concentración de GSH en 50% y $T(SH)_2$ en 90%. Posteriormente, se realizaron experimentos de inhibición por BSO en presencia de 0.1 mM de Cys o 1 mM de GSH extracelular en ambos casos los tioles se internalizaron e incrementaron la síntesis de tripanotión hasta 5 veces con respecto al control sin suplementar. En presencia de Cys más BSO se observó el mismo efecto del control, sin embargo, al suplementar con 1 mM GSH en presencia de BSO, se observó una ligera acumulación de Cys, los niveles de GSH fueron similares al control sin BSO y a pesar de esto las células no sintetizaron más $T(SH)_2$, estos resultados sugieren que la TryS podría estar inhibida por la BSO.

Para demostrar esto último, en epimastigotes de *T. cruzi* sobreexpresantes de γ ECS o TryS se expusieron a 3 mM de D,L-(S,R)-BSO durante 24 h, posteriormente se determinó la actividad enzimática de estas y se observó una inhibición del 63% y 45 % respectivamente, mientras que la actividad de la glutatión sintetasa (GS) no se afectó. Este efecto también se observó en las enzimas recombinantes γ ECS, GS y TryS. También se determinó el efecto de los isómeros L-(S,R)-BSO, en las enzimas recombinantes donde la γ ECS se inhibió parcialmente

(40%) cuando el L (S, R) -BSO se añadió directamente al ensayo enzimático y dicha inhibición se incrementó hasta 60% cuando la enzima se preincubó con el inhibidor durante 1 h a 4°C. Para la TryS, el L-(S,R)-BSO fue un inhibidor parcial más débil, alcanzando sólo un 10% de inhibición en la reacción inmediata y una inhibición no superior al 30% cuando la enzima se preincubó durante 1 h con el compuesto. La GS se inhibe a concentraciones superiores a 1 mM. Posteriormente se determinó el efecto del BSO sobre el crecimiento en células sobreexpresantes de γ ECS, cuyo incremento en la expresión de esta enzima hizo que la IC₅₀ por BSO aumentara a 13 ± 4 mM, 4 veces con respecto a las células no sobreexpresantes. Estos datos confirman la importancia de esta enzima en la síntesis de T(SH)₂ mientras que las células sobreexpresantes de TryS> mock> Querétaro fueron igual de sensibles al inhibidor entre ellas.

Podemos concluir que la BSO, además de inhibir a la γ ECS, también inhibe a la TryS, lo que en su conjunto explica la disminución tan drástica de la concentración basal de GSH y T(SH)₂ en el parásito. Por lo tanto, el BSO no es un inhibidor específico de la γ ECS por lo menos para *T. cruzi*. La BSO tiene un efecto citostático y en combinación con un antichagásico podría resultar en un buen tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Parte de los resultados de esta tesis se publicaron en el artículo Vázquez, C.; Mejía-Tlachi, M.; González-Chávez, Z.; Silva, A.; Rodríguez-Zavala, J.S.; Moreno-Sánchez, R.; Saavedra, E. (2017) Buthionine Sulfoximine is a multitarget inhibitor of trypanothione synthesis in *Trypanosoma cruzi*. *FEBS Lett.* **591**: 3881-3894.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Enfermedad de Chagas, aspectos históricos

La presencia de *Trypanosoma cruzi* desde la llegada del humano al continente americano (hace 9000 años), se ve evidenciado en momias humanas de Chile y Perú que datan de los años 7 000 a.C. hasta 1 500 d.C., en las cuales hallaron restos de DNA perteneciente al cinetoplasto del parásito (Aufderheide *et al.*, 2004). De manera interesante, Adler S. (1959), propuso que Darwin adquirió la infección por *T. cruzi* durante las expediciones que realizó por América del sur, en las que tuvo contacto con chinches besuconas cerca de 4 meses, esto fue descrito por el propio Darwin en "The Journal of the voyage de H.M.S en 1835. Darwin murió por problemas cardiacos, una de las consecuencias de la enfermedad de Chagas.

La Tripanosomiasis Americana o enfermedad de Chagas se describió en 1909 por Carlos Chagas (1879-1934). El logro aislar al parásito del vector *Panstrongylus megistus* (Murillo-Godínez, 2012). Después de egresar como médico Carlos Chagas con su tesis sobre Paludismo participó en la campaña contra la malaria, y descubrió al vector así como la patología y epidemiología de la enfermedad de Chagas. (Velasco, Rivas, 2008, Ceballos, 2012). En 1938 se dio a conocer el primer caso en fase aguda de la enfermedad de Chagas en México por Luis Mazzotti.

La enfermedad de Chagas se ha relacionado siempre con la pobreza y hacinamiento de las zonas rurales, estos factores prevalecen en las zonas de Centroamérica y Sudamérica y se cree que estos factores son los que favorecen la reproducción del parásito causante de la enfermedad de Chagas (Viotti *et. al.* 2009).

1.2 Morfología del parásito

Trypanosoma cruzi es un protozooario perteneciente al phylum Sarcomastigophora, subphylum Mastigophora, orden Kinetoplastida, y familia Trypanosomatidae. El parásito se caracteriza por tener un flagelo que le otorga movilidad y forma una membrana ondulante. Además cuenta con una mitocondria que contiene el cinetoplasto lo que le da el nombre al Orden de estos organismos. El cinetoplasto es una malla o red de DNA extranuclear que se relaciona con el genoma mitocondrial del parásito y forman la mayor parte de la estructura, se localiza cerca del cuerpo basal del flagelo.

El ciclo de vida de *T. cruzi* presenta cuatro estadios de desarrollo: epimastigote, amastigote, tripomastigote metacíclico y tripomastigote sanguíneo, presentes en los hospedadores (el vector invertebrado y mamífero).

Epimastigote: Forma replicativa no infectiva, de aspecto fusiforme, tiene una longitud de 35 a 40 μM , cuenta con un cinetoplasto en la posición anterior cerca del

núcleo y el flagelo forma una membrana ondulante corta, se reproduce en el intestino del vector (Becerril, 2014).

Amastigote: Forma esférica que constituye la forma reproductiva intracelular en los tejidos del hospedador, mide entre 2.4 a 6.5 μM de diámetro, su flagelo está dentro de una bolsa o vesícula, se caracteriza por tener un gran núcleo y cinetoplasto.

Tripomastigote metacíclico: Estadio infeccioso no replicativo, tiene forma alargada y mide entre 20 a 25 μM . Su núcleo es vesiculado y está localizado en la parte media del parásito y en la parte posterior se encuentra el cinetoplasto y el flagelo tiene una membrana ondulante que abarca toda la longitud del organismo.

Tripomastigote sanguíneo: esta forma parasitaria posee un cinetoplasto grande, puede infectar nuevas células o pasar a un vector no infectado para continuar con el ciclo de vida del parásito (Flisser; Pérez-Tamayo 2006).

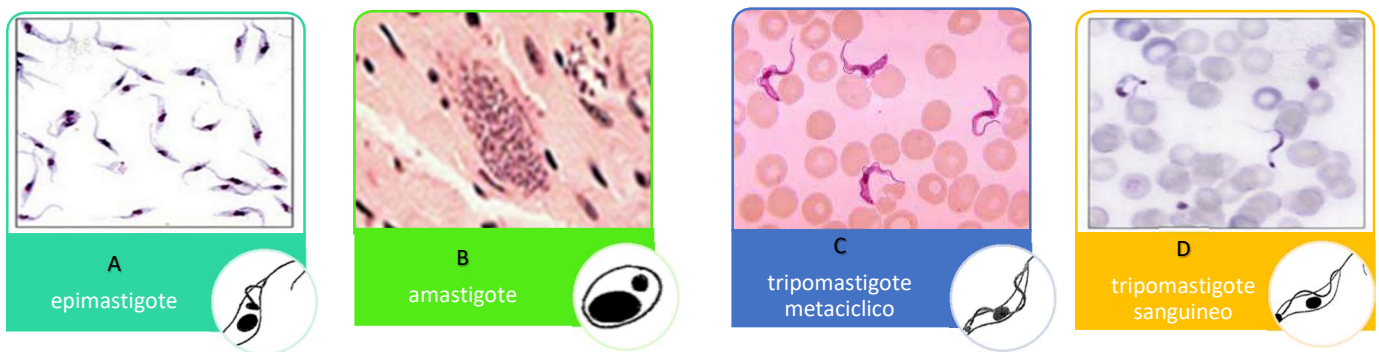


Fig. 1.1 Fases en el desarrollo de *T. cruzi* en frotis con tinción de Giemsa.

(A) Muestra un gran número de epimastigotes obtenidos de cultivo, (B) nido de amastigotes de músculo cardíaco y por último (C y D) tripomastigote metacíclico y sanguíneo en un frotis de sangre de ratón con formas delgadas y gruesas de los estadios (Lawrence, 2010; Uribarren, 2013).

1.3 Ciclo de vida del parásito

La invasión del parásito al hospedador comienza cuando un triatómino infectado con *T. cruzi* se alimenta de la sangre del mamífero y defeca simultáneamente, depositando *tripomastigotes metacíclicos* sobre la piel o mucosas, lo que provoca una laceración por la probóscide del vector. El parásito atraviesa la piel por el sitio de la picadura o a través de las mucosas e inmediatamente pasa al torrente sanguíneo. El parásito se introduce en las células de diversos tejidos donde se transforma en *amastigote*, y se reproduce por fisión binaria, formando nidos intracelulares. Posteriormente los amastigotes se transforman a *tripomastigotes* y su elevado número causa lisis celular, de esta manera son liberados a la circulación donde pueden colonizar nuevas células o pueden ser ingeridos por un insecto vector no infectado. Ya en el intestino medio del vector, el *tripomastigote* circulante o sanguíneo se transforma en *epimastigote*, otro estadio de replicación del parásito. Finalmente estos pasan a la parte final del intestino del vector donde se transforma a *tripomastigote metacíclico* para continuar el ciclo de vida (Flisser, Pérez-Tamayo, 2006).

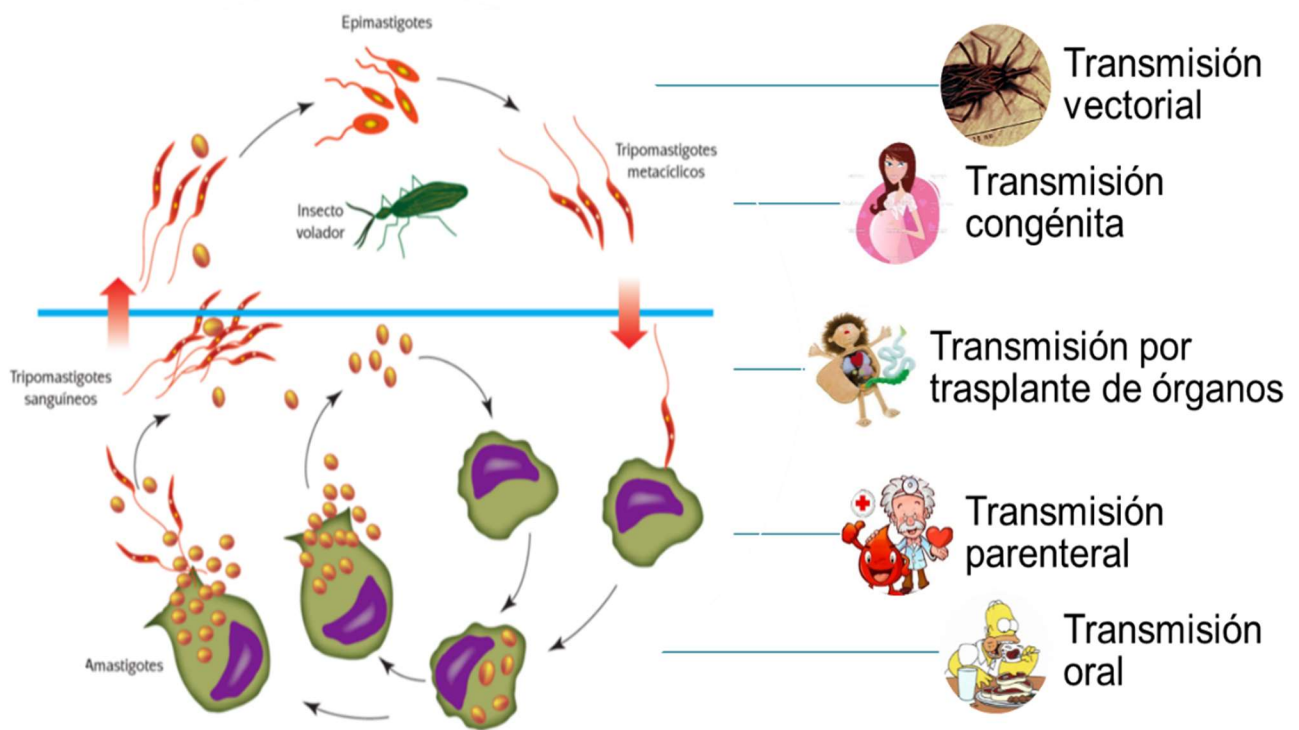
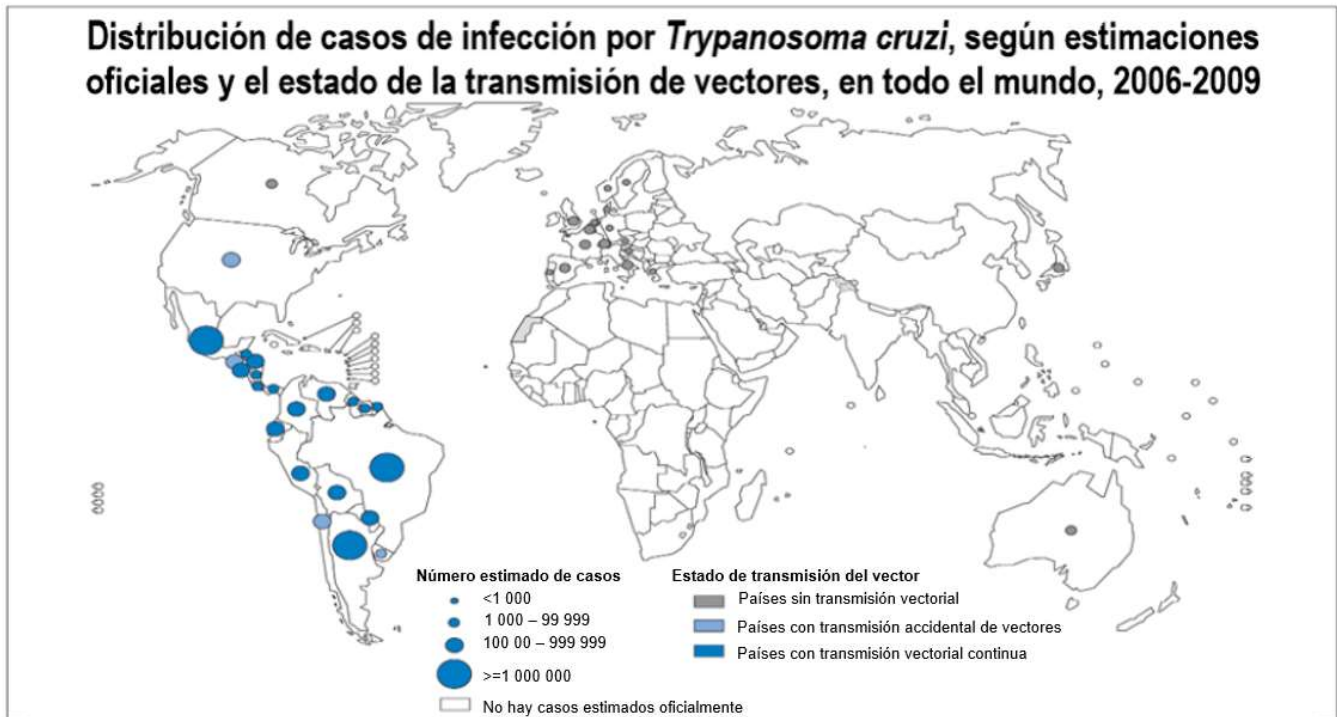


Fig.1.2 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* y formas de transmisión (Modificado de Becerril, 2014)

1.4 Epidemiología

La tripanosomiasis americana es endémica de 21 países de América. En la actualidad es un problema de salud que ha llegado a otros lugares no endémicos debido a las migraciones de personas infectadas; como es el caso de Estados Unidos de América, Canadá, países europeos como Reino Unido, Francia, Suiza, España entre otros y algunos del pacífico occidental como Japón y Australia (Molina *et al.*, 2016).

Los vectores de *T. cruzi* son los triatóminos, estos pertenecen al orden *hemipterae*, familia *reduviidae* y subfamilia *Triatominae*. México cuenta con diversas poblaciones del género *Rhodnius* (Oaxaca y Chiapas) y las más importantes son *Triatoma dimidiata* y *T. barberi* que se localizan en los estados de Guerrero, Oaxaca, Chiapas, Morelos, Michoacán y Jalisco (Uribarren, 2013).



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2010. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Fig.1.3 (2006-2009) Mapa de la distribución de los casos de infección por *T. cruzi*

En los países endémicos entre los que destacan Argentina, Brasil y México con el mayor número de casos, este mapa muestra los países no endémicos con presencia de la enfermedad de Chagas debido a las migraciones de personas infectadas con el parásito, encontrándose zonas de EU y Europa con un alto número de casos. Fuente: <http://gamapservr.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>.

La organización panamericana de la salud (OPS) en 2006 estimó que en México existían aproximadamente 1,100,000 individuos infectados y 29,500 en riesgo de contraer la infección; los estados con mayor incidencia son Veracruz, Morelos, Oaxaca, Yucatán, Chiapas, Guerrero y Jalisco, mientras que se ha registrado un aumento en las defunciones en Oaxaca y Guerrero (Becerril, 2014).

Debido a su diversidad genética *Trypanosoma cruzi* ha sido clasificado en seis linajes (*T. cruzi* I – VI); el linaje I se considera predominante en los ciclos silvestres e infecta al humano. Se ha reportado que las cepas mexicanas pertenecen al linaje I mientras que el linaje II se divide en 5 grupos y estos son prevalentes en el cono sur del continente americano (Argentina, Bolivia, Chile y Paraguay) (Risso *et al.*, 2011).

1.5 Formas de transmisión

La principal forma de infección es a través de la contaminación de las mucosas con heces del vector que contienen las formas infectivas del parásito. Al alimentarse de sangre, las chinches defecan conteniendo el parásito. Existen también otras formas de transmisión de la enfermedad como se muestra en la Fig.1.2. La forma transfusional es considerada el segundo mecanismo de transmisión, con un periodo de incubación del parásito de 30 a 40 días. En México en los últimos años se exige un tamizaje en bancos de sangre para la obtención de sangre humana libre de infección (SS, 2013-2018). La transmisión materno-fetal se puede dar de forma (1) transplacentaria infectando al producto en formación o (2) por contaminación durante el parto (CENAPRECE 2017). Este tipo de transmisión es la causa principal en países no endémicos, con una tasa de 1 al 12 %. La mayor parte de las embarazadas con tripanosomiasis se encuentra en la fase crónica de la enfermedad, por esta razón es importante realizar el tamizaje en mujeres fértiles que habitan áreas endémicas (Molina *et al.*, 2016).

Otros mecanismos de infección menos frecuentes son: el trasplante de órganos y tejidos, la ingesta de artrópodos infectados, carne cruda o bebidas contaminadas con heces u orina del vector, ha causado que la mayoría de los casos de enfermedad de Chagas se han producido en países como Brasil (jugo de caña y acaí), además de Colombia (vino de palma), Argentina (carne de animales de caza), Venezuela (jugo de guayaba) y Ecuador (carne de animales de caza) (Toso *et al.*, 2011).

Los accidentes de laboratorio son poco frecuentes y se da por el contacto en las mucosas o piel lesionada con medios de cultivo o material biológico contaminado con *T. cruzi* que se haya manipulado sin las medidas de bioseguridad adecuadas (OMS 2016; Carrada-Bravo *et al.*, 2004).

1.6 Patología de la enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas en el humano tiene dos fases clínicas distintivas: la aguda y la crónica.

La fase aguda se presenta entre 7 y 10 días después de contraer la infección con el parásito, en la cual se registra una gran cantidad de parásitos circulantes por el torrente sanguíneo. Un signo inicial característico es la formación del “Chagoma” de inoculación (una inflamación subcutánea en el sitio de la picadura del insecto) y si el sitio fue cerca del ojo produce inflamación de la mucosa (signo de Romaña); acompañado de síntomas comunes como fiebre, dolores musculares y escalofríos (Molina *et al.*, 2016).

La fase crónica se declara cuando la parasitemia es negativa microscópicamente y sus manifestaciones ocurren en un periodo de 10 años o más después de la infección (Molina *et al.*, 2016; Carrada-Bravo, 2004). Durante este lapso pueden surgir alteraciones en el corazón como miocardiopatía crónica y las alteraciones del ritmo cardiaco, son las formas más comunes de la cardiopatía chagásica. Esta patología comienza con la aparición de alteraciones electrocardiográficas por un bloqueo completo de la rama derecha del haz de His y hemibloqueo izquierdo anterior. Los síntomas más frecuentes son palpitaciones, mareos, disnea del esfuerzo, edema y dolor precordial. La cardiopatía crónica es considerada multifactorial, ya que involucra una pérdida de control autónomo del corazón, debido a la destrucción de las neuronas parasimpáticas y a la destrucción del tejido cardiaco por *T. cruzi* y la ruptura de los nidos de amastigotes siempre involucra una reacción inflamatoria así como reacciones del sistema inmune anti miocardio.

La miocardiopatía chagásica es una de las consecuencias de la enfermedad de Chagas, desencadenando miocardiopatía dilatada (MCD) con insuficiencia cardíaca que es considerada una de las principales causas de morbilidad provocada por Chagas. La MCD es una enfermedad del músculo cardíaco que consiste en la dilatación ventricular y disminución de la función sistólica, conduciendo a insuficiencia cardíaca. Afecta al ventrículo izquierdo, aunque en ocasiones también el derecho, puede presentarse trastorno de ritmo o de la conducción voltaje de ondas, cardiopatía congénita o hipertensión arterial. La organización Panamericana de la salud (OPS), reporta que 9 millones de personas viven en riesgo de infectarse con el parásito y la tercera parte de esta población infectada puede desarrollar enfermedad cardíaca. Se estima que 50 mil personas mueren cada año a causa de MCD (Velasco *et al.*, 1992; Cordero *et al.*, 2002).

Dependiendo de la progresión y magnitud del daño cardiaco puede generar arritmias y cardiomegalia debido a una combinación de hipertrofia y alteraciones del músculo del corazón, provocando el aumento de tamaño de este órgano (Molina *et al.*, 2016). La mortalidad a causa de la cardiopatía chagásica se estima en un 3.9% al año, considerándose una de las más altas en comparación con otras cardiopatías.

A nivel digestivo, la enfermedad de Chagas afecta al esófago y el colon generando trastornos de motilidad esofágica, el tránsito intestinal se ve retardado provocando una disfagia lórica o progresiva (primero con alimentos sólidos, siguiendo con los blandos y finalmente líquidos), dolor epigástrico y regurgitación, ocurriendo un fenómeno llamado acalasia, después viene un aumento de tamaño y dilatación del órgano, desarrollando megaesófago, también se pueden presentar alteraciones peristálticas del colon con constipación progresiva, fecalomas, dilatación y elongación, que forman el megacolon chagásico. La dilatación digestiva se debe a la degeneración de las neuronas de los plexos mientéricos que se encuentran en las capas musculares del intestino y el canal anal, estas neuronas pertenecen al sistema nervioso entérico (SNE) que controla el aparato digestivo. Las complicaciones digestivas se manifiestan en un rango del 5 – 35 %, principalmente en esófago y colon (Molina *et al.*, 2016).

En la neuropatía chagásica la destrucción neuronal afecta el sistema nervioso central, periférico y autónomo, dependiendo de la localización de la lesión, puede aparecer afectación en el cerebelo, convulsiones y daños psíquicos.

En las áreas endémicas de México, principalmente en las zonas rurales de los estados de Nayarit, Colima, Morelos, Michoacán, Jalisco, Guerrero, Oaxaca y Chiapas se ha reportado la presencia del vector *Triatoma barberi* relacionado con la miocardiopatía y mega síndromes del sistema digestivo (Salazar-Schettino *et al.*, 2016).

1.7 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad de Chagas durante la fase aguda se confirma con la presencia del parásito en sangre (Flores *et al.*, 2006; Molina *et al.*, 2016).

- Frotis en fresco: Se realiza a partir de una gota de sangre extraída por punción digital o de sangre venosa, donde la rápida motilidad de los tripomastigotes permite su hallazgo en el microscopio durante la fase aguda.
- Microhematocrito: Técnica que utiliza capilares heparinizados con sangre periférica que al centrifugarse separan leucocitos y eritrocitos; en la fracción de glóbulos blancos se observa al microscopio para localizar a *T. cruzi*.
- Hemocultivo: este método parasitológico mejora la sensibilidad diagnóstica mediante la multiplicación de parásitos en un medio de cultivo con sangre del paciente más anticoagulante, se realiza la detección del parásito entre los 10 a 60 días después de la siembra.

- Xenodiagnóstico: este método consiste en reproducir el ciclo natural del parásito utilizando triatóminos libres de infección, alimentarlos con la sangre del paciente; luego de 30 a 60 días se observan al microscopio las heces del triatómino, donde se verá la presencia de *T. cruzi* si el paciente se encuentra infectado.

En la fase aguda e incluso la fase crónica de la enfermedad se realiza el diagnóstico por medio de la detección de anticuerpos anti-*T. cruzi*, las principales técnicas moleculares y serológicas son:

- Prueba de ELISA: ensayo inmunoenzimático para identificar anticuerpos anti *T. cruzi* de inmunoglobulinas IgG o IgM (Flores-Chávez *et al.*, 2006)
- PCR: esta técnica molecular donde se amplía una secuencia específica del parásito en la primera región variable de DNA del minicírculo del cinetoplasto (kADN) y una secuencia de DNA de 195 pb. (Flisser, Perez, 2006; Flores-Chávez *et al.*, 2006)
- Hemaglutinación indirecta (HAI): Prueba en la que se determina la aglutinación de glóbulos con antígenos de *T. cruzi*, considerada una prueba de tamizaje para las zonas de alta prevalencia de la enfermedad así como la Aglutinación indirecta que se realiza en un soporte de partículas de gelatina
- Inmunofluorescencia indirecta (IFI): detecta anticuerpos contra antígenos de superficie de *T. cruzi* (Flores-Chávez *et al.*, 2006)

1.8 Tratamiento

En la actualidad se dispone de dos fármacos antichagasicos para la clínica; Nifurtimox (Nfx) derivado del nitrofurano y Benznidazol (Bnz) derivado nitroimidazolico. Ambos son utilizados en la fase aguda, ya que tiene actividad tripanosomicida para todas las formas del parásito (Stopani *et al.*, 1999).

Tabla 1 Tratamiento con Nifurtimox y Benznidazol en la fase aguda de la enfermedad en niños y adultos (Coura, Castro, 2002; Bern 2015).

Antichagastico	Dosificación y lapso de aplicación
Nifurtimox	5 – 10 mg/kg por día, durante 3 a 4 meses
Benznidazol	7– 12 mg/kg por día, durante 1 – 2 meses

Estos medicamentos en la etapa temprana de la enfermedad tienen una respuesta terapéutica favorable en la fase aguda de la enfermedad, con una tasa de curación de entre un 65 a 80 % de los pacientes. Por otro lado, también podría tener un efecto en la fase crónica ya que se ha reportado entre un 15 a 40 % de curación. Una de las limitaciones que presentan estos medicamentos es que tienen efectos adversos en los pacientes, entre los que puede presentarse desde reacciones de hipersensibilidad, digestivas, neurológicas y de carácter general (Molina *et al.*, 2016).

1.9 Mecanismo de acción del Nifurtimox y Benznidazol

La forma en que actúan el Benznidazol (Bnz) y Nifurtimox (Nfx) es a través de sus grupos nitro los cuales son reducidos por acción de las nitroreductasas generando metabolitos electrofílicos los cuales pueden formar conjugados droga-tiol o pueden unirse a proteínas, lípidos o ácidos nucleicos. Por otra parte, el Nfx además genera radicales libres, a través del anión radical nitro que en presencia de oxígeno forma el anión superóxido ($O_2^{\bullet-}$); el cual es sustrato de la superóxido dismutasa (SOD), la cual cataliza la formación de H_2O_2 . Este último puede reaccionar con el $O_2^{\bullet-}$ en presencia de hierro (Fe^{3+}) y H_2O_2 formando el anión hidroxilo (OH^-) y el radical hidroxilo ($\bullet OH$) (Reacción Haber-Weiss), este radical es reactivo y se une a macromoléculas (Maya *et al.*, 2006).

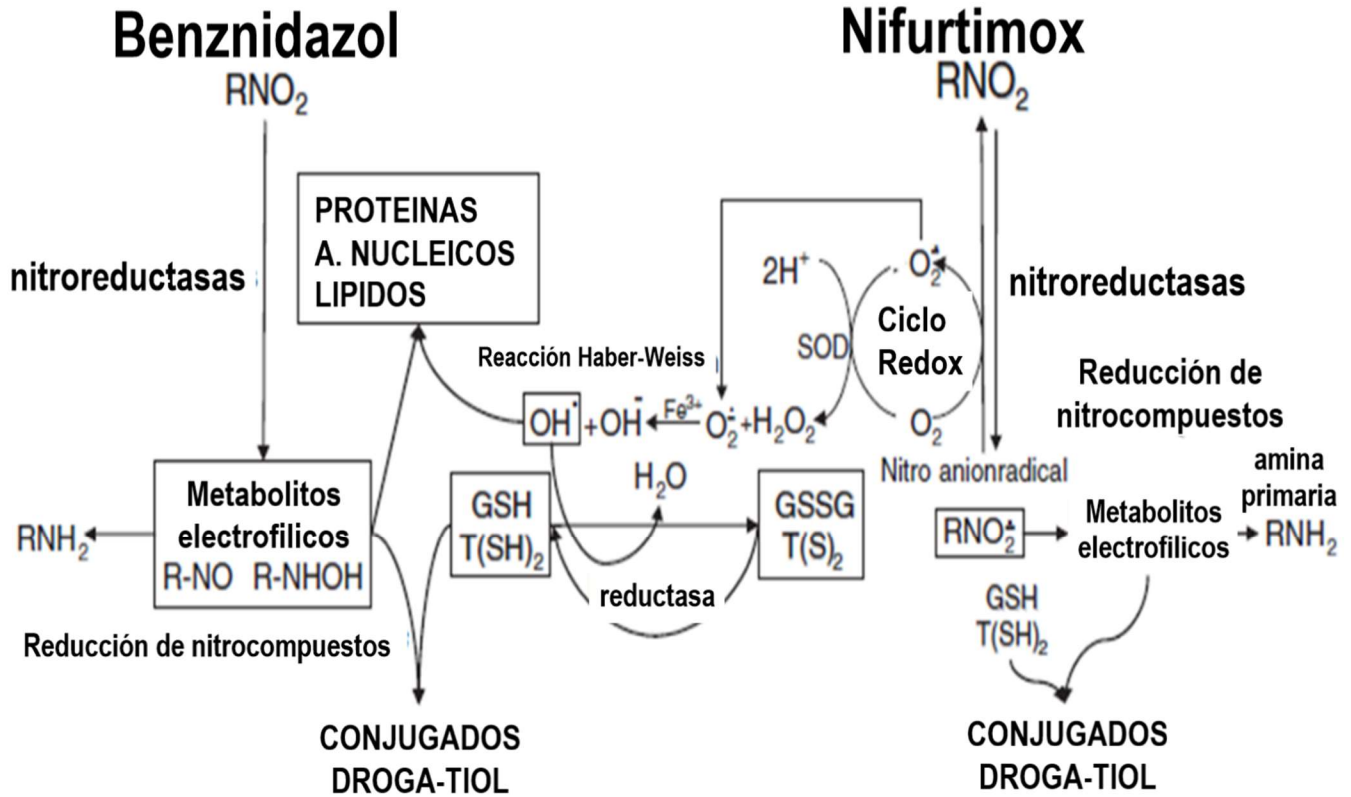


Fig. 1.4 Mecanismo de acción del Bnz y Nfx (tomado de Maya *et al.*, 2006) Los fármacos nifurtimox y benznidazol pueden ejercer su toxicidad por varios mecanismos, de acuerdo al siguiente esquema, por acción directa del nitro anión radical, sobre las moléculas de DNA o la generación de radicales libres del oxígeno en el caso de nifurtimox y la producción de moléculas altamente reactivas ($\bullet OH$)

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Enfermedad de Chagas y el estrés oxidante

La miocardiopatía chagásica suele presentarse durante la fase crónica de la enfermedad debido al daño en los cardiomiocitos por un largo proceso inflamatorio, por la respuesta inmune del hospedero o la generación de ROS/NOS (Valenzuela *et al.*, 2010).

Por esta razón, es importante conocer las especies reactivas de oxígeno (ROS). Estas representan un grupo de moléculas derivadas del oxígeno, se forman a partir de la ruptura o excitación del oxígeno (oxígeno atómico $O^{2\bullet}$, ozono O_3 y oxígeno en singulete 1O_2) y las especies de oxígeno que están parcialmente reducidas, como el anión superóxido $O_2^{\bullet-}$, el peróxido de hidrogeno H_2O_2 y el radical hidroxilo $\bullet OH$ que se muestran en la tabla 2. Estas moléculas son altamente reactivas y reaccionan rápidamente con proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. Las

especies reactivas de nitrógeno NOS incluyen al óxido nítrico $\text{NO}\bullet$ y sus derivados; el peroxinitrito ONOO^- que se forma por la reacción entre $\text{O}_2^{\bullet-}$ y el $\text{NO}\bullet$.

Tabla 2 Especies reactivas de oxígeno y sus características

RADICAL	CARACTERÍSTICA
ION SUPERÓXIDO ($\text{O}_2^{\bullet-}$)	Anión generado a partir del oxígeno molecular O_2 , por la adición de un electrón.
PERÓXIDO DE HIDRÓGENO (H_2O_2)	Molécula con poder oxidante que pueda formar un radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$) en presencia de un metal de transición.
RADICAL HIDROXILO ($\bullet\text{OH}$)	Radical que tiene una alta reactividad con macromoléculas. Es producto de la reacción del H_2O_2 cuando es catalizado por iones metálicos como el Fe^{2+}
ÓXIDO NÍTRICO ($\text{NO}\bullet$)	Similar al radical superóxido, pero no reacciona con las macromoléculas y reacciona con el radical superóxido dando como producto el radical peroxinitrito.
PEROXINITRITO (ONOO^-)	Potente oxidante; se forma por una reacción rápida entre $\text{O}_2^{\bullet-}$ y NO

(Modificado de Betancur, 2015; Martínez-Sámano *et al.*, 2011)

2.2 Sistema antioxidante de *T. cruzi*.

Mientras que la célula del mamífero cuenta con las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión-S-transferasa, así como metabolitos reductores como el GSH para contender contra las ROS; el parásito cuenta con el $\text{T}(\text{SH})_2$ el cual tiene el papel de su homólogo el GSH (Olin-Sandoval *et al.*, 2010). El $\text{T}(\text{SH})_2$ es un tiol de bajo peso molecular formado por dos moléculas de GSH unidas a una molécula de Spd.

El GSH es el tiol intracelular más abundante en las células de los mamíferos. Se encuentra en concentraciones que van desde 1 a 12 mM, dependiendo del órgano u organelo. Por ejemplo, en la mitocondria alcanza una concentración de 10 a 12 mM y en el citosol la concentración es de ~7 mM (Martinez-Samano *et al.*, 2011; Denzoin *et al.*, 2013; Richie *et al.*, 1996).

El $\text{T}(\text{SH})_2$ se sintetiza (Fig. 2.1) dentro de la célula por la vía que inicia con la reacción catalizada por la gama-glutamilcisteína sintetasa (γECS) la cual forma un enlace peptídico entre el grupo γ -carboxilo del glutamato y el α -amino de la cisteína (Cys) para producir γ -glutamilcisteína (γEC), con consumo de una molécula de ATP. Posteriormente, la glutatión sintetasa (GS) une a la glicina (Gly) con γEC para formar GSH, consumiendo ATP (Mukherjee *et al.*, 2009; Lueder *et al.*, 1996). En el parásito, el GSH es sintetizado de manera similar que en mamíferos. Por otro lado,

la Spd se puede tomar del medio extracelular a través de transportadores de Spd de alta afinidad o puede sintetizarse de *ново* a partir de putrescina y S-adenosilmetionina descarboxilada. El parásito carece de ornitina descarboxilasa y arginina descarboxilasa que sintetizan putrescina como en células humanas. El parásito incorpora la putrescina del medio a través del transporte extracelular. La putrescina recibe el grupo propilamino de la S- adenosil metionina descarboxilada (AdoMet) por acción de la espermidina sintasa (SpdS) sintetizando de esta forma a la Spd. Por último, el T(SH)₂ lo sintetiza la tripanotión sintetasa (TryS) conjugando los dos GSH y la Spd (Huynh *et al.*, 2003; Hasne *et al.*, 2010).

El T(SH)₂ cede sus electrones (Fig. 2.1) a las diferentes enzimas antioxidantes del parásito para reducir a distintos peróxidos a sus formas inocuas. Finalmente, la tripanotión reductasa (TryR) reduce al disulfuro del tripanotión TS₂ a expensas de la oxidación de NADPH (Olin-Sandoval *et al.*, 2012).

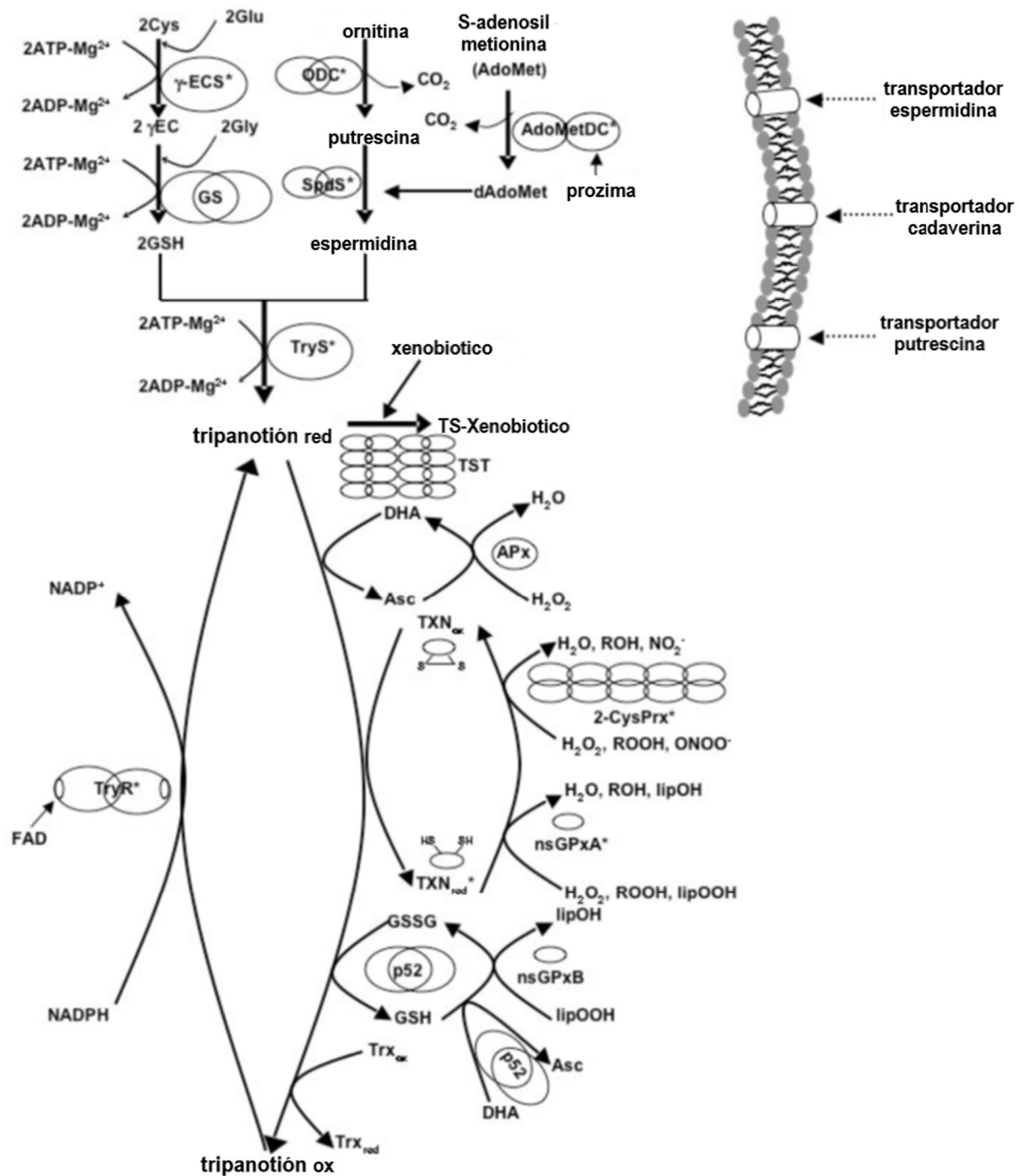


Fig. 2.1 Metabolismo del T(SH)₂. El GSH es sintetizado en dos reacciones dependientes de ATP por la γ ECS y GS, en diversos organismos, este metabolito es el principal mecanismo de defensa antioxidante, sin embargo, en *T. cruzi*, esta función la realiza el T(SH)₂, el cual es sintetizado a partir de GSH y Spd por la TryS, además el parásito mantiene el balance entre el tripanotión ox/red por la acción de TryR. γ - glutamylcisteina sintetasa (γ ECS), γ - glutamylcisteina (γ -EC), glutatión sintetasa (GS), glutatión (GSH), S-adenosil metionina descarboxilasa (AdoMetDC), espermidina sintetasa (SpdS), espermidina (Spd),

tripanotión sintetasa (TryS), tripanotión (T (SH)₂), tripanotión reductasa (TryR), ascorbato peroxidasa (Apx), triparedoxina (TXN), 2-Cys peroxiredoxina (TXN-Px), glutatión peroxidasa no dependiente de selenio A y B (nsGPXA, nsGPXB), tripanotión-glutation tiol transferasa (p52) (Tomado de Olin Sandoval *et al.*, 2010).

Nuestro grupo de investigación (Olin-Sandoval *et al.*, 2012) construyó un modelo computacional de la síntesis de T(SH)₂ en *T. cruzi* de la cepa Querétaro, en el programa de simulación metabólica (COPASI). Para construir este modelo utilizó los parámetros cinéticos (*K_m*, *K_i* y *V_{max}*) de las enzimas, así como la concentración inicial de metabolitos en los parásitos. En este modelo observaron que la γ ECS controla en 58% el flujo de síntesis de T (SH)₂, mientras que la TryS controla en un 49%. (Olin-Sandoval *et al.*, 2012)

2.3 Butionina sulfoximina inhibidor de la γ ECS

En mamíferos la γ ECS consta de dos subunidades, una catalítica o pesada y otra reguladora o ligera. La primera subunidad cuenta con un sitio activo el cual se encarga de la unión entre la cisteína y el glutamato, mientras la subunidad ligera modula la actividad mediante el aumento de la eficiencia catalítica, al incrementar la afinidad de L-Glu y disminuir la inhibición por el GSH de la subunidad catalítica (Denzoin *et al.*, 2013). Por otro lado, la γ ECS del parásito consta de una sola subunidad, la cual es catalíticamente activa, y no requiere de ser modulada por subunidades externas, esta enzima es de naturaleza citosólica, también se ha encontrado diferencias en la afinidad por aminoácidos aceptores, estos datos sugieren que los sitios activos de la enzima de *T. cruzi* y de mamífero son diferentes (Morello *et al.*, 1987).

Se ha reportado que la γ ECS de muchas fuentes es inhibida por la DL-(S,R)-butionina sulfoximina (BSO), que es una mezcla de cuatro isómeros debido a los dos centros quirales del BSO en el carbono alfa y el azufre. Este inhibidor al ser fosforilado por la enzima, se une fuertemente a su sitio activo. El isómero L(S)-BSO imita al estado de transición formado cuando la Cys y el γ -glutamilfosfato son unidos (Fig. 2.2); por esta razón el inhibidor se une fuertemente pero de forma no covalente al sitio activo de la enzima, convirtiendo a este isómero en un potente inhibidor parcialmente irreversible. Por otro lado, el isómero L(R)-BSO al tener una estructura semejante pero no fosforilada puede inhibir en forma reversible y competitiva con el L-glutamato (Faundez *et al.*, 2005; Huynh *et al.*, 2003).

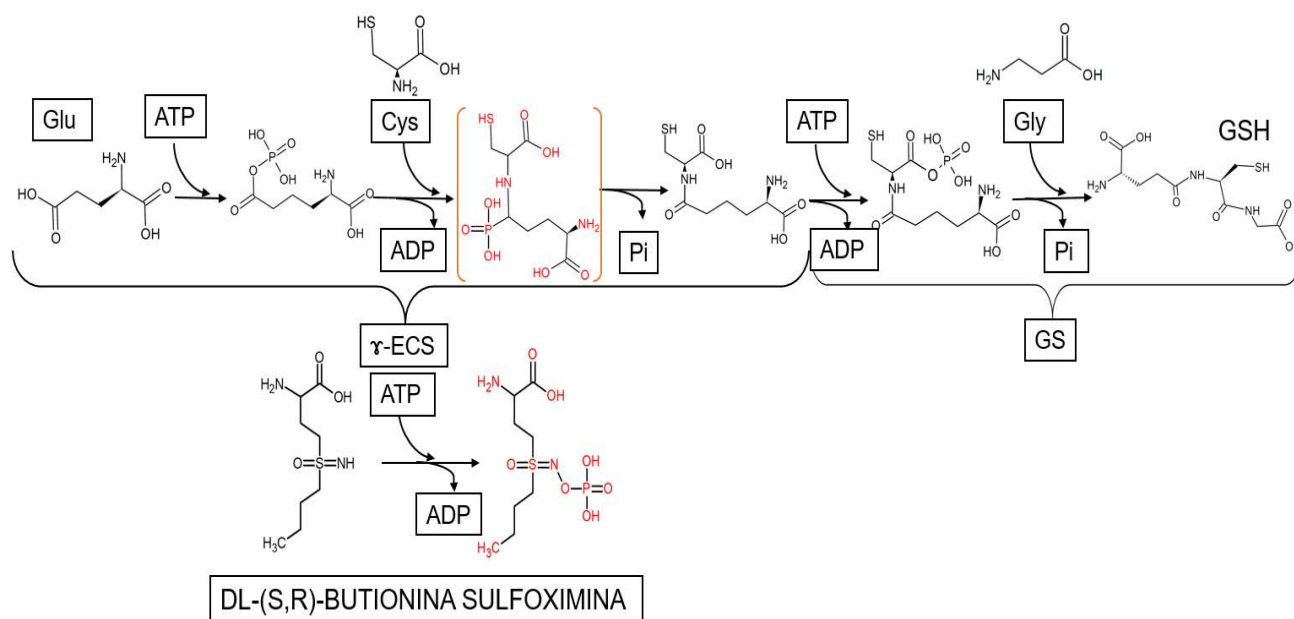


Fig. 2.2 Síntesis de GSH y su inhibición por BSO

El glutatión es sintetizado por la acción de las enzimas γ ECS y GS en presencia de ATP, la enzima γ ECS inicia la síntesis de GSH cuya síntesis es inhibida por un análogo químico del glutamato la DL-(S,R) butionina sulfoximina (modificado de Lagos *et al.*, 2012).

3. ANTECEDENTES

Maya *et al.*, 2005 determinaron la IC_{50} por BSO en el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* cepa MF, con diferentes concentraciones de BSO (1 – 30 μ M) por 10 días, obteniendo una IC_{50} de 13.6 mM. También al determinar la concentración de tioles en epimastigotes en cultivos en ausencia y presencia de 500 μ M de BSO por 48 h determinaron que los tioles disminuyeron más del 50%, demostrando así la inhibición de la γ ECS por BSO (Faundez *et al.*, 2005)

Por otro lado, se realizó un estudio en *Trypanosoma brucei* donde se disminuyó el nivel de expresión del gen de la γ ECS y se evaluó después de 4 días los niveles de tioles (GSH y $T(SH)_2$), tanto en cultivos sin suplementar como suplementados con GSH (80 μ M). Se observó que después del 4° día los parásitos no suplementados tenían una disminución de más del 50 % de los tioles, por otro lado el cultivo suplementado logro restaurar los niveles de concentración basal de tioles. En el mismo trabajo se realizó otro experimento donde se determinó el efecto del BSO en parásitos expuestos a diferentes concentraciones del inhibidor (0-150 μ M) sin suplementar y suplementado con GSH (80 μ M), durante 4 días. Los resultados demostraron que el BSO disminuyo los niveles de GSH (80%) y $T(SH)_2$ (90%) de los parásitos; sin embargo, los suplementados con GSH, la concentración

de tioles no se recuperó, por lo que los autores propusieron que el BSO no solo inhibe a la γ ECS si no que posiblemente también este inhibiendo al transportador de GSH (Huynh *et al.*, 2003).

Sin embargo, el último resultado también puede explicar que la BSO también podría inhibir a la TryS, además de la γ ECS, lo que en conjunto podría explicar la disminución de la concentración basal de GSH y T(SH)₂ en el parásito. Esta interpretación nos llevó a proponer que el BSO no es un inhibidor específico de la γ ECS.

4. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años la enfermedad de Chagas se ha asociado a múltiples factores sociales y ambientales que exponen a millones de personas a contraer la infección a través de sus diversas formas de transmisión del parásito. En la actualidad se dispone de dos fármacos antichagásicos, el benznidazol (Bnz) y nifurtimox (Nfx), los cuales tienen una alta toxicidad provocando un gran número de reacciones adversas en el hospedador, por lo que el tratamiento muchas veces es interrumpido. Además, el Bnz es solamente efectivo en la etapa aguda de la enfermedad y actualmente no existen tratamientos efectivos para los pacientes en la etapa crónica.

Debido a que el T(SH)₂ no se encuentra en el humano se propone que las enzimas involucradas en el metabolismo del T(SH)₂ podrían ser blancos terapéuticos. Nuestro grupo de trabajo se ha enfocado en la caracterización de esta vía de síntesis de dicho metabolito. En esta tesis se pretende la búsqueda de un potencial blanco terapéutico dentro la vía antioxidante de *T.cruzi*.

La butionina sulfoximina DL-(S,R)-BSO ha resultado ser un buen inhibidor de la γ ECS al bajar la concentración basal de GSH y T(SH)₂. Por dogma se dice que la BSO es un inhibidor específico de la γ ECS. Sin embargo, los antecedentes de la literatura del uso de este inhibidor en tripanosomátidos sugieren que puede ser inespecífico e inhibir otras enzimas/ transportadores del metabolismo del T(SH)₂. Específicamente nosotros hipotetizamos que la BSO también puede inhibir a la TryS. La posible inhibición de la BSO en la γ ECS y TryS cobra relevancia ya que son las enzimas que tienen un alto grado de control sobre el flujo de síntesis de T(SH)₂.

5. HIPÓTESIS

La disminución del T(SH)₂ en epimastigotes de *T. cruzi* por el tratamiento con BSO se debe a la inhibición no solo de la γ ECS, sino también a la inhibición de la TryS.

6. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar el efecto inhibitorio de la BSO en la vía de síntesis de T(SH)₂

7. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar el efecto de la BSO en el crecimiento, viabilidad y el contenido de tioles en epimastigotes de *T. cruzi*.

- Analizar el efecto de la BSO en enzimas (recombinantes y extractos citosólicos) de la vía de síntesis de T(SH)₂

8. METODOLOGÍA

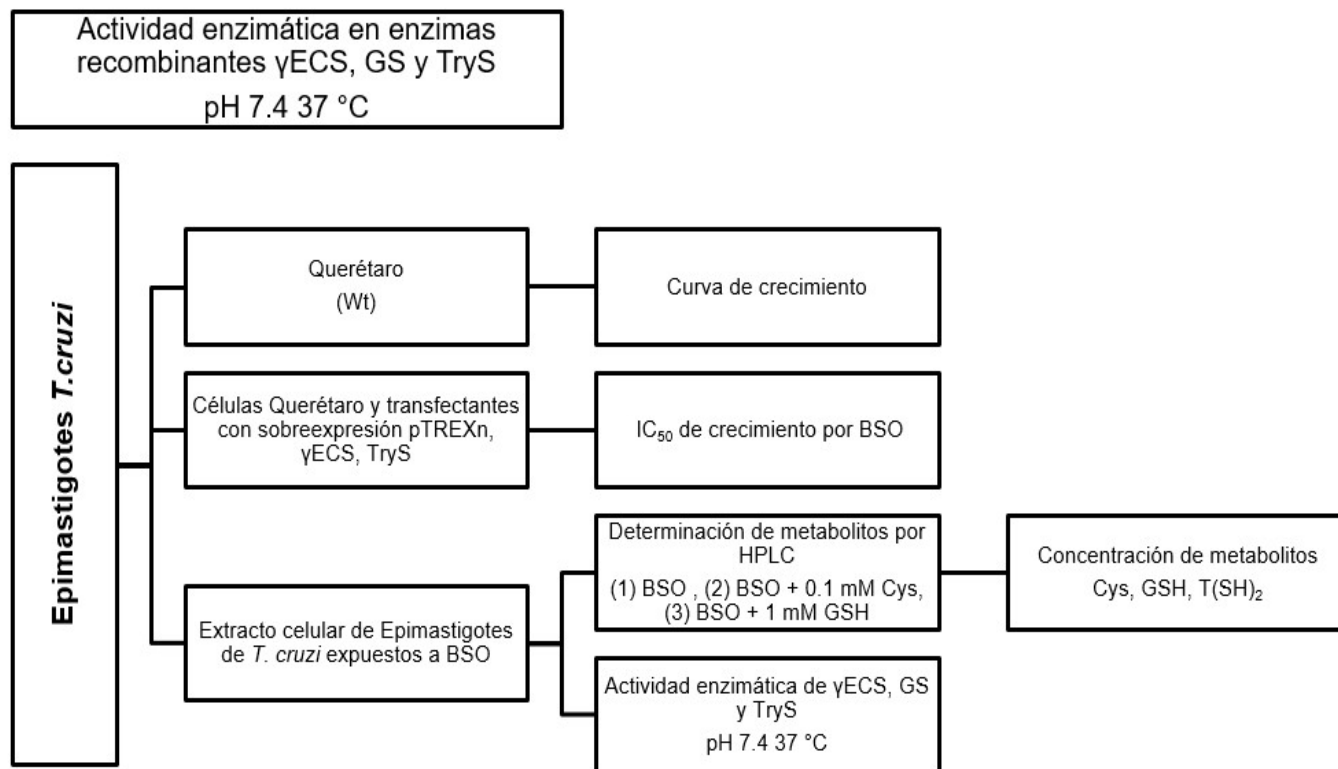


Fig. 8.1 Metodología. Desarrollo experimental realizado en epimastigotes de *T. cruzi*, cepa Querétaro

8.1 Cultivo de *T. cruzi*

Los epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Querétaro se crecieron en medio liver infusion-tryptose (LIT, 0.4 % NaCl, 0.04% KCl, 0.42% Na₂HPO₄, 0.2% glucosa, 0.5% infusión de hígado, 0.5% triptosa) y se suplementaron con 10% de suero fetal bovino (ByProductos, Guadalajara, México), 25µg/mL hemina y una mezcla de antibióticos (100 µg/mL estreptomycin, 100 U/mL penicilina; Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, EUA) e incubados a 28°C.

Se caracterizó el crecimiento del parásito. Se sembraron 1x10⁶ parásitos/mL y cultivaron a 28°C. Cada 24 horas por 5 días se contó el número de parásitos usando una cámara de Neubauer. Posteriormente se graficó el Ln de la concentración de parásitos contra tiempo, este grafico semilogarítmico es útil para determinar los siguientes datos experimentales, tiempo generacional (G) este nos dice el tiempo requerido para que una célula se duplique, se determina a partir del siguiente cociente, tiempo de la fase exponencial dividido entre el número de

generaciones (n) (\ln (número de células inicial menos número final de células) / 0.693) y la velocidad de crecimiento (μ) es número de generaciones sobre el tiempo.

8.2 Efecto de la DL-(S,R)-BSO sobre el crecimiento de epimastigotes expuestos por 24 h

Se inoculó un cultivo de 50 mL a una concentración de 0.7×10^6 parásitos/mL y se incubó por 48 h a 28 °C hasta alcanzar una concentración de $2.8 - 3.2 \times 10^6$ parásitos/mL. El cultivo se dividió en alícuotas de 5 mL que posteriormente se expusieron a diferentes concentraciones (0.025 – 20 mM) de DL-(S,R)- butionina sulfoximina (Sigma Aldrich) y una alícuota control sin el inhibidor. Después de 24 h se determinó la densidad celular contando los parásitos con cámara de Neubauer y se determinó la concentración a la que se inhibe en un 50% el crecimiento de la población (IC_{50}) al graficar el crecimiento relativo (que es la resta de la concentración de parásitos finales menos la concentración de parásitos iniciales 24 horas antes de la exposición al inhibidor) contra las diferentes concentraciones de exposición a BSO.

8.3 Efecto de DL-(S,R)-BSO sobre el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* por 10 días

Se preparó un cultivo celular como en la sección 8.2, el cual se dividió en alícuotas como ya se ha descrito y se expusieron a diferentes concentraciones de BSO (0.25 – 16 mM), dejando una de ellas sin el inhibidor como control. Se incubaron a 28 °C y se contaron los parásitos con cámara de Neubauer cada 24 h durante 10 días.

8.4 Exposición para determinación de metabolitos tioles en parásitos incubados con BSO en ausencia y presencia de suplementación con tioles.

Se preparó un cultivo celular a una concentración de 0.7×10^6 parásitos / mL en 550 mL de medio LIT como se explicó en la sección 8.2. El cultivo se dividió en tres partes, uno se suplementó con 0.1 mM CyS (Sigma Aldrich), el otro con 1 mM GSH (Sigma), la alícuota no suplementada se tomó como control. Posteriormente los cultivos se dividieron en alícuotas de 25 mL que se expusieron a diferentes concentraciones (0.1 - 3 mM) de DL-(S,R) BSO. Se incubaron por 24 h a 28 °C y al final se tomó una alícuota de 1 mL de cada tubo para la determinación de proteína. Posteriormente, se cosecharon los parásitos por centrifugación a $4500 \times g$ por 10 min; se lavaron dos veces con buffer PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4). La pastilla celular se almacenó a -70°C. La muestra de parásitos para proteína se cosechó con el procedimiento antes mencionado, se

resuspendió en 100 μL de solución A (2% Na_2CO_3 , 0.4% NaOH , 0.16% tartrato sódico-potásico, 1% SDS) y se almacenó a -70°C hasta su cuantificación.

8.5 Cuantificación de proteína

El contenido de proteína de las muestras de parásitos se determinó por el método de Lowry (Lowry *et. al.* 1951). Esta reacción se da en un medio básico y en presencia de iones de Cu^{2+} que forman complejos con las proteínas que están compuestas por cisteína y triptófano (color azul), provocando el desdoblamiento de la proteína y dejando expuestos los residuos de tirosina y en presencia del tartrato (mezcla C: solución A (2% Na_2CO_3 , 0.4% NaOH , 0.16% tartrato sódico-potásico, 1% SDS) + 4% CuSO_4) se reduce al reactivo de Folin-Ciocalteu's (ácido fosfotungstico y fosfomolibdico). Este a su vez reacciona con los residuos de tirosina produciendo un color azul intenso.

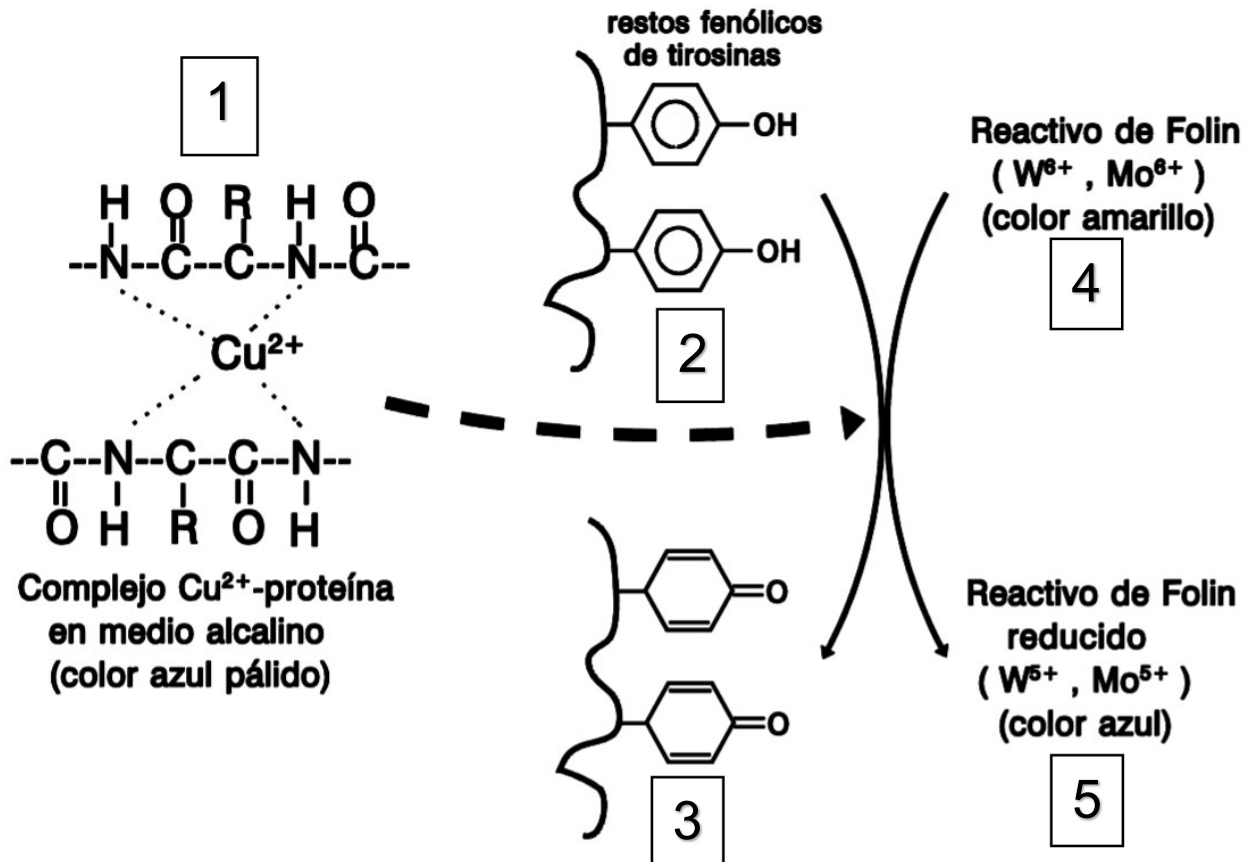


Fig. 8.2. Reacciones para la cuantificación de proteína por el método de Lowry.

Método colorimétrico, útil para cuantificar proteínas; la muestra con proteína forma un complejo colorado con los reactivos y la intensidad de color es dependiente de la concentración de proteínas presentes.

www3.uah.es/bioquimica/Sancho/farmacia/practicas/Lowry

Se preparó una curva patrón a diferentes concentraciones de albumina sérica bovina (BSA) de acuerdo a la siguiente tabla utilizando una solución calibrada de BSA a una concentración de 1 mg/ml:

Tabla 3 Curva patrón a partir de Albumina de suero bovino (BSA)

Tubo	BSA ($\mu\text{g/ml}$)
1	0
2	5
3	10
4	20
5	40
6	60
7	80
Mta. Problema	-----

La curva patrón y las muestras problema (en un volumen de 0.1 ml) se llevaron a un 1 ml con la mezcla C 1:50 (solución de cobre (1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) y solución A (2% Na_2CO_3 , 0.4% NaOH , 0.16% tartrato sódico-potásico, 1% SDS), se mezclaron y dejaron reposar por 10 min. Posteriormente se adicionaron 100 μL de reactivo de Fenol de Folin y Ciocalteu's (Sigma Aldrich) (1:1), se mezcló por agitación e incubó por 20 min. Se determinó la absorbancia con un espectrofotómetro UV-Vis (Cary 60 UV-Vis, Agilent, Santa monica, California) a una longitud de onda de 660 nm. La concentración de las muestras problema se obtuvo interpolando la absorbancia obtenida en la curva de calibración construida de la absorbancia de BSA vs la concentración de BSA (mg), obteniendo la ecuación de la recta para determinar la concentración de la muestra problema.

8.6 Determinación de tioles en cultivos de epimastigotes de *T. cruzi*

Los parásitos obtenidos de la suplementación con 0.1 mM Cys o 1 mM GSH y control (sección 8.4) se resuspendieron en 90 μL de buffer de lisis (20 mM HEPES- NaOH pH 7.4, 1 mM EDTA, 0.15 mM KCl) + 20 mM DTT. Se obtuvo la fracción citosólica lisando los parásitos en tres ciclos de congelación / descongelación en nitrógeno líquido, posteriormente se centrifugo a 4500 x g por 10 min; La fracción soluble se redujo con borohidruro de sodio (NaBH_4) e incubó por 10 min en hielo. Posteriormente se agregó ácido perclórico a una concentración final del 3% para detener la reacción. La muestra se centrifugó a 12 800 x g por 2 min y 20 μL de la muestra filtrada se analizó de manera inmediata.

Los tioles se separaron por Cromatografía de líquidos de alta resolución en un equipo de HPLC (Waters; Milford, MA, USA). Los tioles se separaron en una columna de fase reversa Alltima HP C18 de 13 μm 150 x 2.1 mm, con un flujo 0.5 mL/min y utilizando un gradiente de ácido trifluoroacético (TFA) al 0.1% y acetonitrilo. Los tioles se detectaron post columna mediante su derivatización con 0.1 mM de ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico) (DTNB). Se acopló un detector de luz visible /UV que detectó el DTNB el cual es utilizado en la determinación de grupos sulfhidrilo por el método de Ellman. El ácido di-tiobis-nitrobenzoico reacciona con un grupo sulfhidrilo libre, liberando como producto al ácido 2-nitro-5-tiobenzoato el cual es amarillo y detectable a una longitud de onda de 412 nm (Tecles *et al.*, 2000, Ellman *et al.*, 1961). El cromatograma de la Fig. 9 muestra los tiempos de retención de los metabolitos de interés Cys, GSH y T(SH)₂ a los 1.7, 3 y 14.3 min, respectivamente.

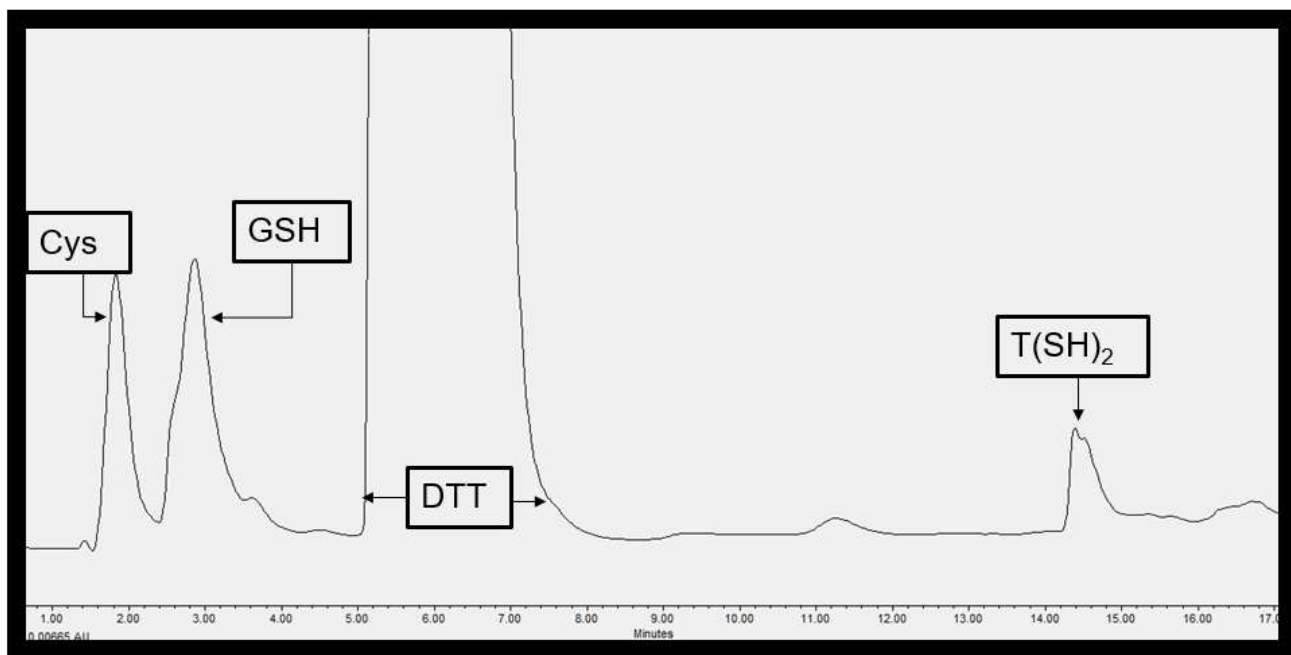


Fig. 8.3 Cromatograma del perfil de tioles de epimastigotes de *T. cruzi*. Los metabolitos Cys, GSH y T(SH)₂ son detectados e identificados mediante la cromatografía de fase reversa, este cromatograma se muestra el pico de DTT (5-8 min) y Cys, GSH y T(SH)₂ con los siguientes tiempos de retención 1.7, 3 y 14.3 min.

8.7 Purificación de proteínas recombinantes

Nuestro laboratorio previamente obtuvo bacterias *E. coli* BL21 que contienen plásmidos que sobreexpresan a la γ ECS, GS y TryS de *T. cruzi* fusionadas a una etiqueta de histidinas para facilitar su purificación (Olin-Sandoval *et. al.* 2012). Se realizó un pre-cultivo de las bacterias sobreexpresantes en medio Luria-Bertani (LB; 0.5% NaCl, 1% triptona y 1% extracto de levadura) suplementado con 30 μ g/mL de kanamicina para mantener el plásmido. Se incubaron a 37 °C con agitación a 200 rpm durante 18 h aproximadamente. A continuación, se inocularon los pre-cultivos en 250 mL de medio de autoinducción ZYM (1% triptona y 0.5% extracto de levadura), suplementado con kanamicina 30 μ g/mL, solución 25 x M (25 mM Na₂HPO₄, 50 mM KH₂PO₄, 5mM Na₂SO₄), solución 25 x 5052 (0.5 % glicerol, 0.05 % glucosa, 0.2% α -lactosa) y 2 mM MgSO₄. Se incubaron a 37°C por 4 h, posteriormente se trasladaron a una temperatura de 25°C durante 16 – 18 h para su inducción. Para la purificación de proteína, las células se rompieron en 10 ml de buffer de lisis (300mM NaCl, 100 mM TEA, 2 mM Imidazol) y se lisaron por sonicación, se centrifugo a 10 000 rpm/10 min, se obtuvo el sobrenadante y se adicionó en resina de cobalto y se incubó por 1 h en agitación, centrifugando a 2000 rpm/ 5 min, posteriormente se realizaron tres ciclos de lavados con 10 ml de buffer de lisis e incubaciones de 10 min en agitación; finalmente se realizó un lavado con solución de imidazol 10 mM, posteriormente se eluyo la proteína con 100mM de imidazol, finalmente se concentró por centrifugación de 4200 rpm durante 40 minutos. Las enzimas se almacenaron con 0.5 M (γ ECS y TryS) y 1 M (GS) de trehalosa a 4°C.

8.8 Determinación de la actividad enzimática y la inhibición por DL-(S,R)-BSO

La actividad enzimática se determinó a 37°C empleando un sistema acoplado a la formación de ADP (Fig. 8.3) el cual en presencia de fosfoenolpiruvato (PEP) se utiliza para formar piruvato y lactato mediante la piruvato cinasa y lactato deshidrogenasa (0.6 U PYK/ 0.9 U LDH) Sigma Aldrich. El lactato producido se detecta espectrofotométricamente mediante la oxidación de NADH a 340 nm. El ensayo enzimático se realizó en 0.5 ml con buffer de ensayo (100 mM HEPES, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 5 mM MgSO₄ pH 7.4), 0.2 mM NADH, 2 mM PEP, 2 mM ATP y 2-7.5 μ g de proteína recombinante. Las reacciones se iniciaron con los sustratos específicos: 1.3 mM glutamato y 2.1 mM de Cys para la γ ECS; 8 mM de Gly y 0.4 mM γ EC para la GS; 11 mM de Spd y 1 mM de GSH para TryS.

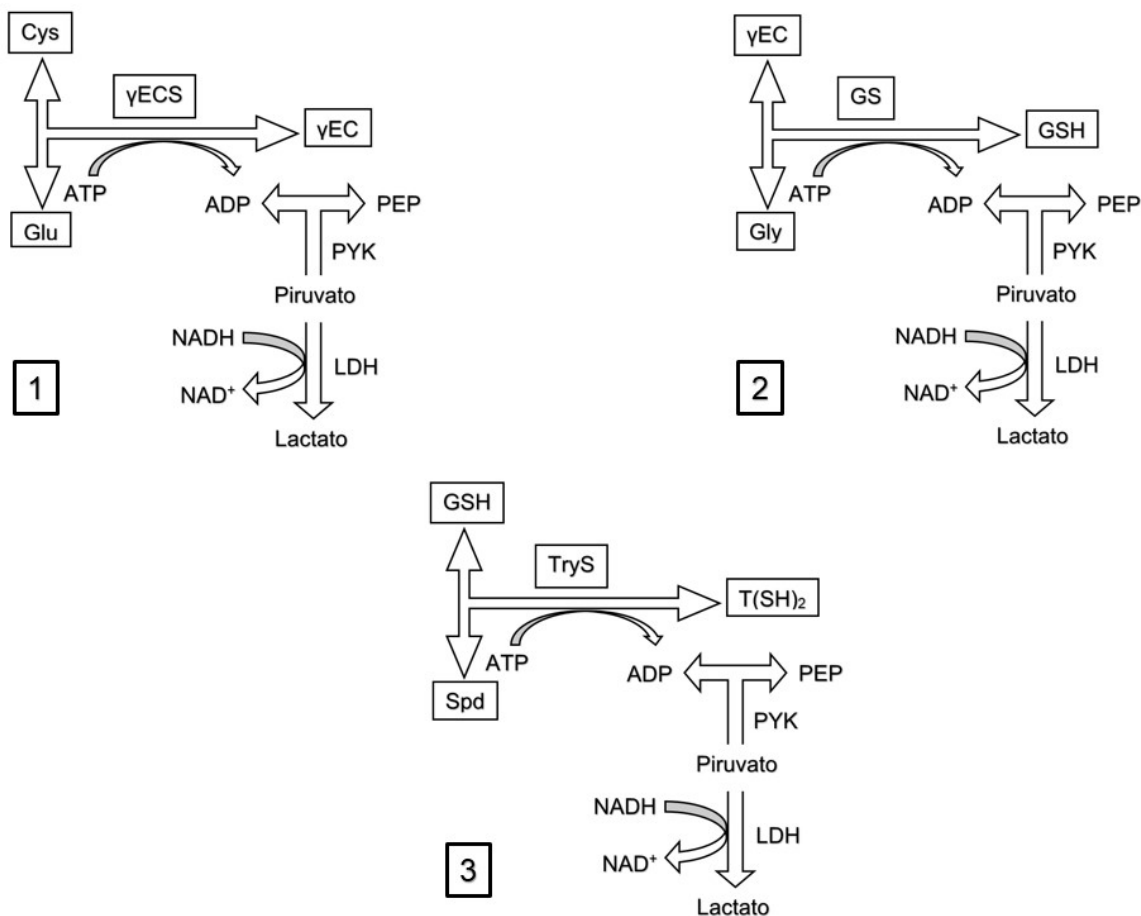


Fig. 8.4 Método para determinar actividad enzimática de γ ECS (1), GS (2) y TryS (3) en enzimas recombinantes o extractos citosólicos de parásitos. Se emplea un sistema acoplado a la formación de ADP en presencia de (PEP) y el lactato producido se detecta espectrofotométricamente mediante la oxidación de NADH a 340 nm.

Para determinar el efecto de la DL-(S,R)-butionina sulfoximina en las enzimas recombinantes, se pre incubaron alícuotas individuales a 4°C con diferentes concentraciones de BSO (0.05 – 3 mM) en 100 μ L de buffer de ensayo enzimático durante 1 - 6 h. Posteriormente, se determinó la actividad usando el ensayo enzimático ya antes mencionado. Además, se determinó el efecto de los isómeros L-(S,R)-BSO en las enzimas sin pre-incubación, añadiendo directamente el inhibidor al ensayo enzimático, con co-sustratos saturantes.

También se determinó el efecto del inhibidor en las enzimas de parásitos expuestos al compuesto. Debido a la baja actividad basal de estas enzimas en los parásitos, estos experimentos se realizaron utilizando clonas de parásitos que sobreexpresan las enzimas.

Se cultivaron epimastigotes cepa Querétaro no transfectados y transfectados con vector vacío (mock) y plásmidos que permiten la sobreexpresión de γ ECS o

TryS. Se cultivaron en 50 mL de LIT y se expusieron a 0-3 mM de DL-(S,R)-BSO. Los parásitos se cosecharon y lavaron como se describió en la sección 8.4. Los parásitos en la pastilla celular obtenida se rompieron por congelación/descongelación en presencia de buffer de lisis celular e inhibidor de proteasas (fluoruro de fenilmetanosulfonilo 1 mM) y DTT 0.2 M.

Las actividades enzimáticas se determinaron con el ensayo enzimático descrito anteriormente para las enzimas recombinantes. Debido a que los extractos de parásitos muestran una actividad inespecífica y alta de ATPasa se modificó el ensayo de actividad cuando se utilizan extractos de parásitos, Se prepararon mezclas para dos reacciones que contenían 0.2 – 0.5 mg de células y todos los componentes del ensayo enzimático descrito anteriormente, excepto el sustrato tiol específico para cada reacción. La mezcla se dividió en dos celdas y sólo una de ellas se suplementó con el sustrato tiol específico. La muestra sin el sustrato representó la actividad ATPasa la cual se restó de la actividad en la reacción completa.

9. RESULTADOS

9.1 Cinética de crecimiento de los parásitos.

En la figura 9.1A se muestra la cinética de crecimiento a 5 días de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Querétaro como el incremento en la concentración de parásitos en función del tiempo. Se observa que este fenómeno se ajusta a una curva con comportamiento sigmoidal. La concentración máxima de parásitos que se alcanzó al final del tiempo de incubación fue de 23×10^6 parásitos / mL. La figura 9.1B muestra la linealización de los datos de crecimiento mediante la obtención del logaritmo natural (Ln) de la concentración de parásitos en función del tiempo. Con este análisis se determinó que la duración de la fase exponencial de crecimiento fue de 4 días.

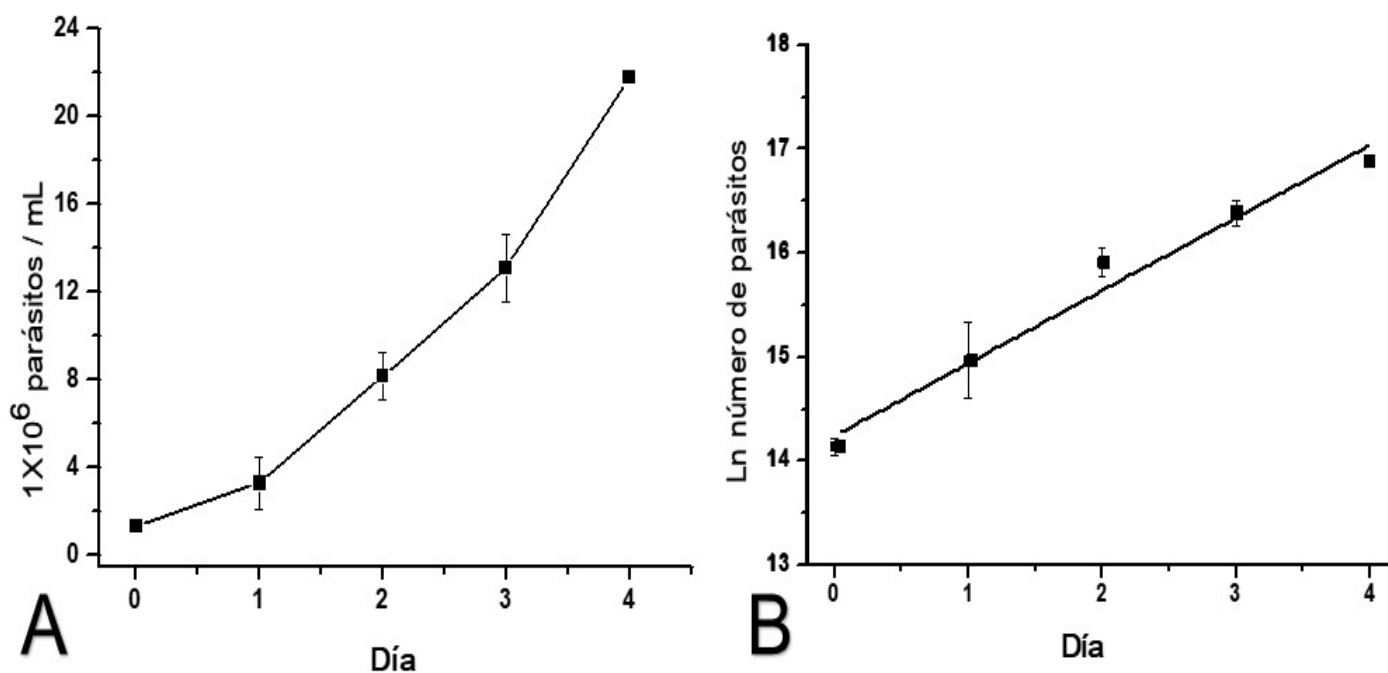


Fig. 9.1. Curva de crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* de la cepa Querétaro.

Los parámetros de crecimiento de los epimastigotes (velocidad de crecimiento, número y tiempo generacional) se obtuvieron como se describe en la sección 8.1 de la metodología y los valores se indican en la Tabla 4.

Tabla. 4 Parámetros del crecimiento de epimastigotes de *T.cruzi* de la cepa Querétaro.

	Velocidad de crecimiento μ	Número de generaciones N	Tiempo generacional G (horas)
<i>T. cruzi</i> , cepa Querétaro	0.71 \pm 0.03	3.8 \pm 0.48	23.4 \pm 1.3

9.2 Efecto del DL-(S,R)-BSO a 24 h en el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi*

Se determinó la concentración de DL-(S,R)-BSO la cual se disminuyó en un 50 % el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* después de 24 h de ser expuestos a diferentes concentraciones del compuesto (0.25 – 16 mM). Para ello se graficó el porcentaje de crecimiento relativo en función de la concentración de BSO (Fig. 9.2). El crecimiento relativo se determinó restando la concentración inicial de parásitos previos a la exposición al fármaco a la concentración de parásitos final después de 24 h de exposición al compuesto. Además se utilizó como 100% control, un cultivo paralelo de parásitos sometido a las mismas condiciones experimentales pero en ausencia del fármaco. Los datos se ajustaron a una curva de dosis respuesta y se obtuvo una IC₅₀ de 3.3 \pm 1.4 mM.

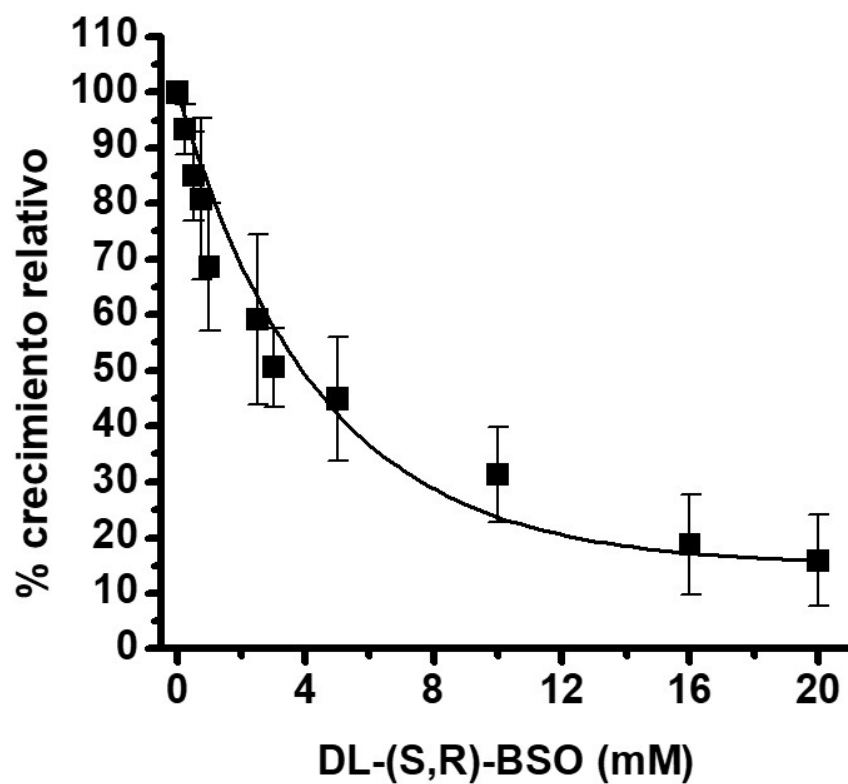


Fig. 9.2 Determinación de la IC₅₀ de parásitos tratados por 24 h con la DL-(S, R)-BSO
 Se determinó la IC₅₀ después de 24 horas en medio de cultivo LIT a 28 °C. Se tomó como 100% el crecimiento de los parásitos sin exponer a BSO después del periodo de incubación. El 100% equivale a $3.6 \pm 0.8 \times 10^6$ parásitos/mL

9.3 Efecto de la DL(S, R)-BSO sobre el crecimiento de epimastigotes de *T.cruzi* por 10 días

50 mL de medio se sembraron con epimastigotes a una concentración inicial de 0.7×10^6 parásitos/mL y se incubaron por 48 horas hasta alcanzar una densidad celular de $2.8 - 3.2 \times 10^6$ parásitos/mL. El cultivo se dividió en alícuotas de 5 mL que posteriormente se expusieron a diferentes concentraciones de BSO (0 – 16 mM) desde el primer día (0) y cada 24 h se determinó la concentración de parásitos por conteo directo en cámara de Neubauer.

En la figura 9.3 (A, B y C) se muestran las diferentes gráficas. Se puede observar (fig. 9.3 A) que el máximo número de parásitos obtenidos en células no expuestas a BSO fue de 60×10^6 parásitos/mL y esta concentración celular disminuyó conforme aumentó la concentración del inhibidor.

Posteriormente se linealizó cada una de las diferentes curvas de crecimiento (fig. 9.3 B) y se determinó la velocidad de crecimiento (μ) la cual es la pendiente para cada curva. Finalmente, en la figura 9.3 C se graficó el porcentaje de μ (velocidad de crecimiento) en función de la concentración de BSO y normalizado a la curva de crecimiento en ausencia del inhibidor. Se obtuvo una IC_{50} de 6.3 ± 2.4 mM. Este valor es parecido al que se determinó cuando los parásitos se sometieron solo por 24 h al fármaco.

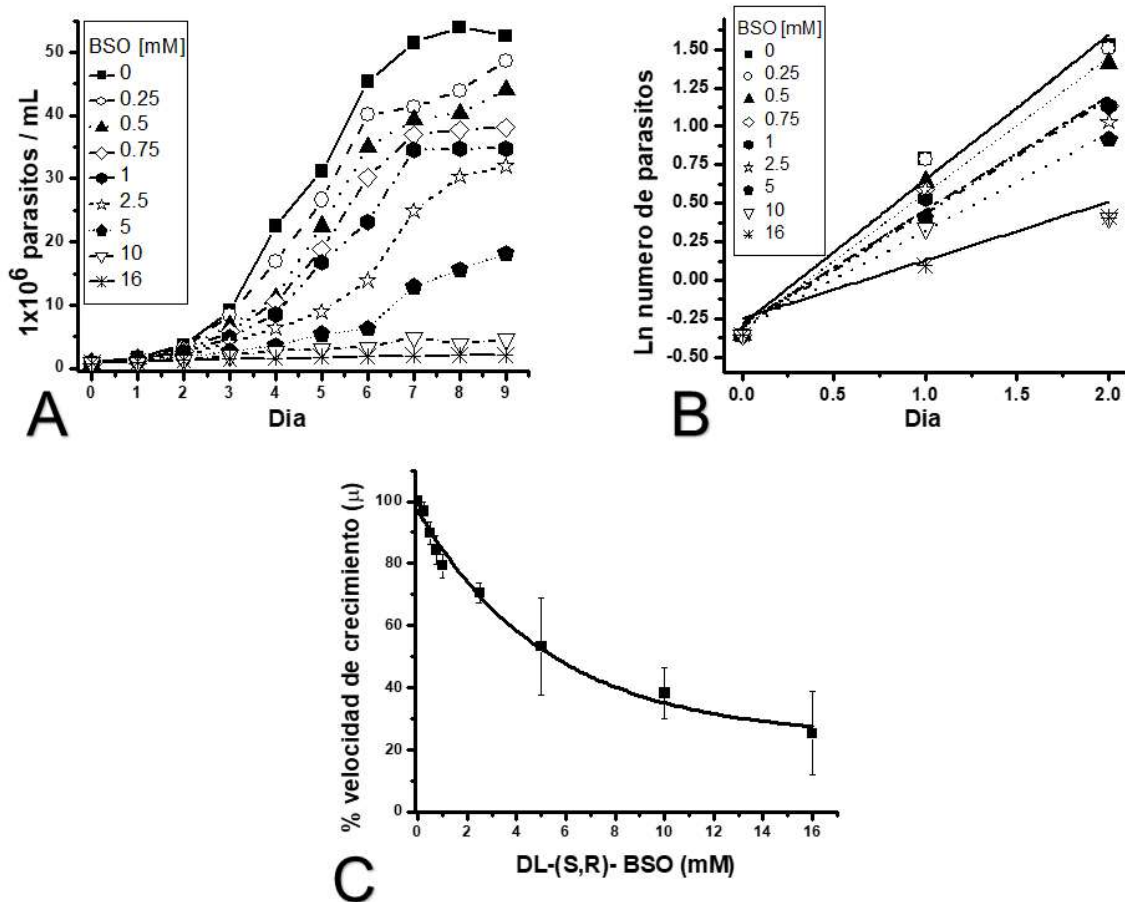


Fig. 9.3 Efecto del BSO en el crecimiento de epimastigotes de *T. cruzi* a 10 días. Se determinó la IC_{50} del crecimiento en 10 días de exposición al fármaco. El 100 % de crecimiento corresponde al número de parásitos procesados en paralelo en ausencia del compuesto.

9.4 Efecto del DL(S, R)-BSO y la suplementación con Cys o GSH sobre los metabolitos tioles de *T. cruzi*.

Se determinaron por HPLC los tioles libres intracelulares después de exponer a los parásitos por 24 h a diferentes concentraciones de BSO (0 – 3 mM) en ausencia o en presencia de 0.1 mM de Cys o 1 mM de GSH. Los resultados se muestran en la Fig. 9.4.

En parásitos expuestos solamente a BSO, a partir de 0.5 mM se puede apreciar la acumulación en un 30% de Cys, así como una disminución del 50% en el nivel de GSH y del 90% en el del T(SH)₂.

Al añadir 0.1 mM de Cys en ausencia de BSO, se observó en los parásitos que la Cys se internalizó y acumuló en un 50%, también el GSH se acumuló en el mismo porcentaje mientras que el T(SH)₂ aumentó cuatro veces más con respecto al control (epimastigotes no suplementados). Por otro lado, en parásitos suplementados con Cys y expuestos a diferentes concentraciones de BSO se observó que a partir de 0.25 mM del inhibidor, la Cys se acumuló al doble, mientras que el GSH disminuyó más del 50% y el T(SH)₂ disminuyó casi en su totalidad.

Por último, al suplementar a los parásitos con 1 mM de GSH en ausencia de BSO hubo un incremento del 50% de Cys, un aumento del doble en el GSH y de hasta 5 veces el T(SH)₂ con respecto al cultivo control. Posteriormente, al exponer a los parásitos a BSO en presencia de GSH se observó un incremento del 20 % en Cys, el GSH se mantuvo por arriba del control hasta una concentración de BSO de 0.5 mM y luego disminuyó progresivamente, llegando a tener un 75% del nivel del control. De manera interesante, a pesar de tener niveles suficientes de GSH, los niveles de T(SH)₂ no se recuperaron, disminuyendo hasta un 90% a partir de 0.75 mM de BSO. Este último panel de experimentos sugiere fuertemente que la TryS podría ser inhibida también por la BSO.

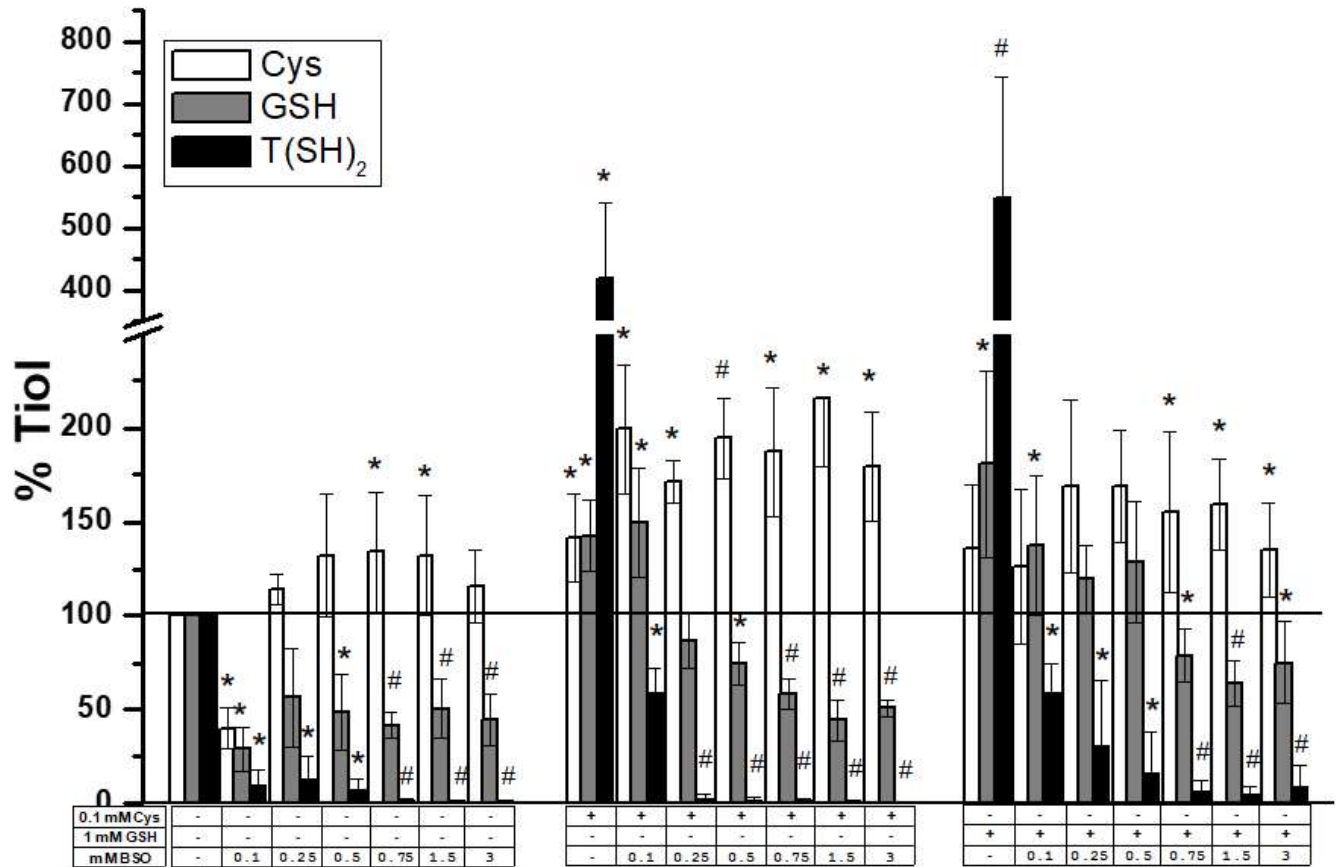


Fig. 9.4 Efecto de DL-(S,R)-BSO en los contenidos de tioles en epimastigotes.

Los contenidos de Cys, GSH y T(SH)₂ se determinaron por HPLC en parásitos tratados con DL-(S,R)-BSO durante 24 h en ausencia o presencia de Cys 0.1 mM o GSH 1 mM. El 100% de tío de Cys 4.8 ± 1 , GSH 5.7 ± 2.2 y T(SH)₂ 3.1 ± 0.9 nmol / mg de proteína ($n = 17$) que son equivalentes a 0.8 ± 0.2 , 0.95 ± 0.37 y 0.52 ± 0.15 mM. El número de experimentos usando cultivos celulares independientes fue: BSO $n = 14-22$; BSO + Cys $n = 5-8$; BSO + GSH $n = 5-8$. El análisis estadístico prueba t de Student de dos colas. * $p \leq 0.05$, # $p \leq 0.001$ contra las células control sin suplementación en ausencia de BSO

9.5 Efecto de la DL-(S,R)-BSO en la actividad de enzimas recombinantes de γ ECS, GS y TryS.

Se evaluó el efecto que tiene el inhibidor en las actividades de las enzimas recombinantes de la síntesis de T(SH)₂. Para la TryS se realizaron ensayos de inhibición enzimática a diferentes temperaturas (4, 28 y 37-39 °C) y tiempos de incubación (0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6 y 24 h).

Primero se determinó la estabilidad de la enzima en ausencia del inhibidor. La Fig. 9.5 A muestra que partir de 1 h de incubación a 28 o 39°C empieza a disminuir drásticamente la actividad de la enzima, mientras que muestras incubadas a 4°C mostraron inhibición hasta pasadas las 6 h de incubación. Al realizar el ensayo por una hora (fig. 9.5 B) observamos que la actividad enzimática de la TryS es estable de 4 a 28 °C. De esta manera, se demostró que las condiciones de ensayo en los que la actividad de la enzima es estable son por 60 min a 4 y 28 °C.

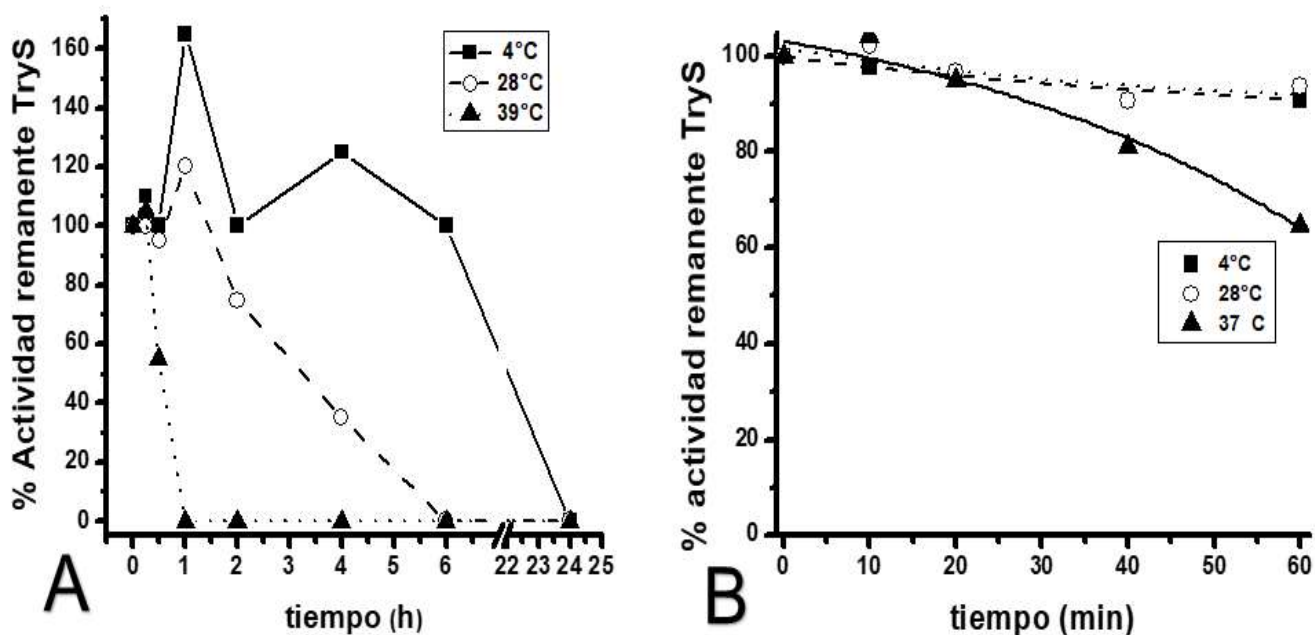


Fig. 9.5 Estabilidad de TryS recombinante a diferentes temperaturas.

(A) Se incubaron alícuotas de enzima recombinante en buffer de ensayo enzimático a las temperaturas y tiempos indicados. Posteriormente se determinó la actividad a 37°C en condiciones saturantes de sustratos. (B) La enzima TryS se pre incubó a 4, 28 y 37 °C durante 60 min, posteriormente se determinó la actividad enzimática.

También se realizó un ensayo control de estabilidad del sistema acoplante conformado por las enzimas PYK/LDH expuestas a 3 mM de DL-(S,R)-BSO o 1 mM de L-(S,R)-BSO. En la Fig. 9.6 se observa que después de 60 min estas enzimas no se inhiben por los compuestos.

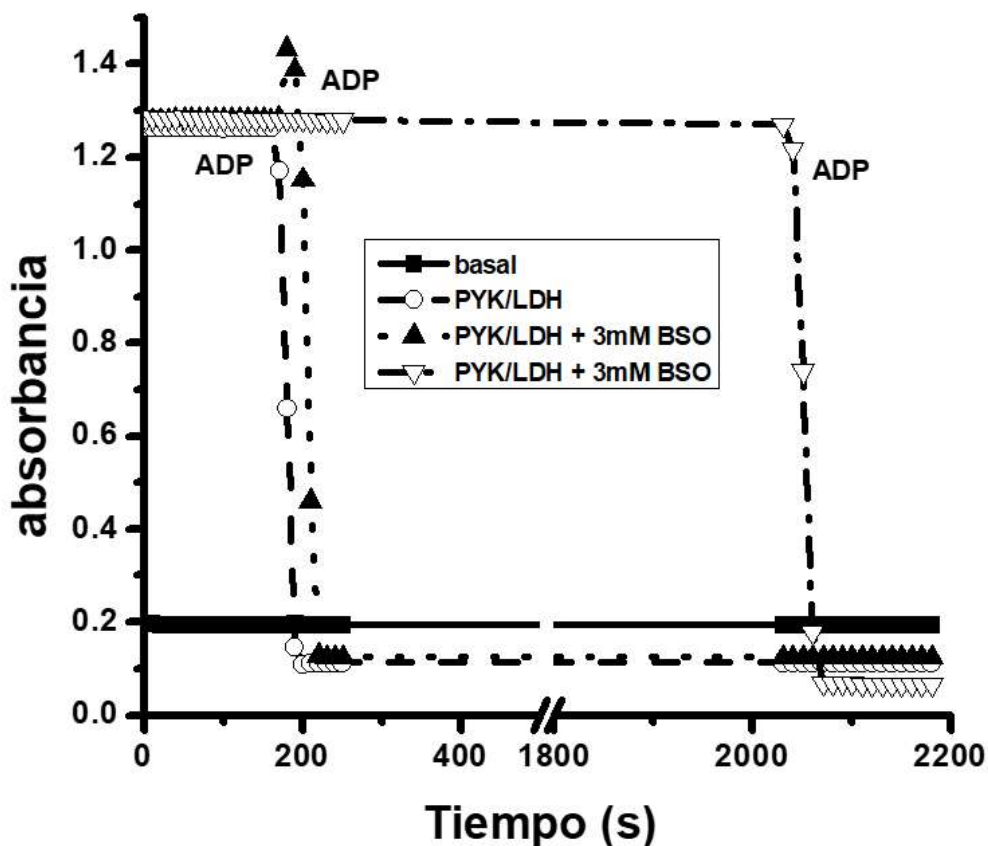


Fig. 9.6 Sistema enzimático acoplante expuesto a 3 mM de BSO por 60 min. Este ensayo se realizó en el buffer de reacción en presencia o ausencia del inhibidor y a partir del segundo 200 o 2100 aprox se adiciono ADP esperando una bajada correspondiente a la hidrolisis del ATP.

Una vez que se confirmó que la actividad de las enzima acoplante no se inhibía y la condición en que la temperatura y el tiempo de incubación no afectaban la actividad de la TryS, se procedió a determinar el efecto que tiene el inhibidor sobre la actividad de las diferentes enzimas.

Se determinó la actividad de las enzimas recombinante γ ECS, GS y TryS expuestas a diferentes concentraciones de BSO (0.05 – 3 mM) incubadas por 6 h a 4°C. La Fig. 9.7 muestra el gráfico del porcentaje de actividad remanente *versus* la concentración del inhibidor. Se observó que a partir de 1 mM la γ ECS y a 0.05 mM

la TryS, alcanzaron una inhibición del 40 y 30 % respectivamente, mientras que la GS no se vio afectada por la presencia del inhibidor. Debido a que la inhibición es parcial, se determinó la IC_{30} por DL-(S,R)-BSO los cuales son $0.8 \pm 0.3 \text{ mM}$ para la γECS y $0.08 \pm 0.04 \text{ TryS}$.

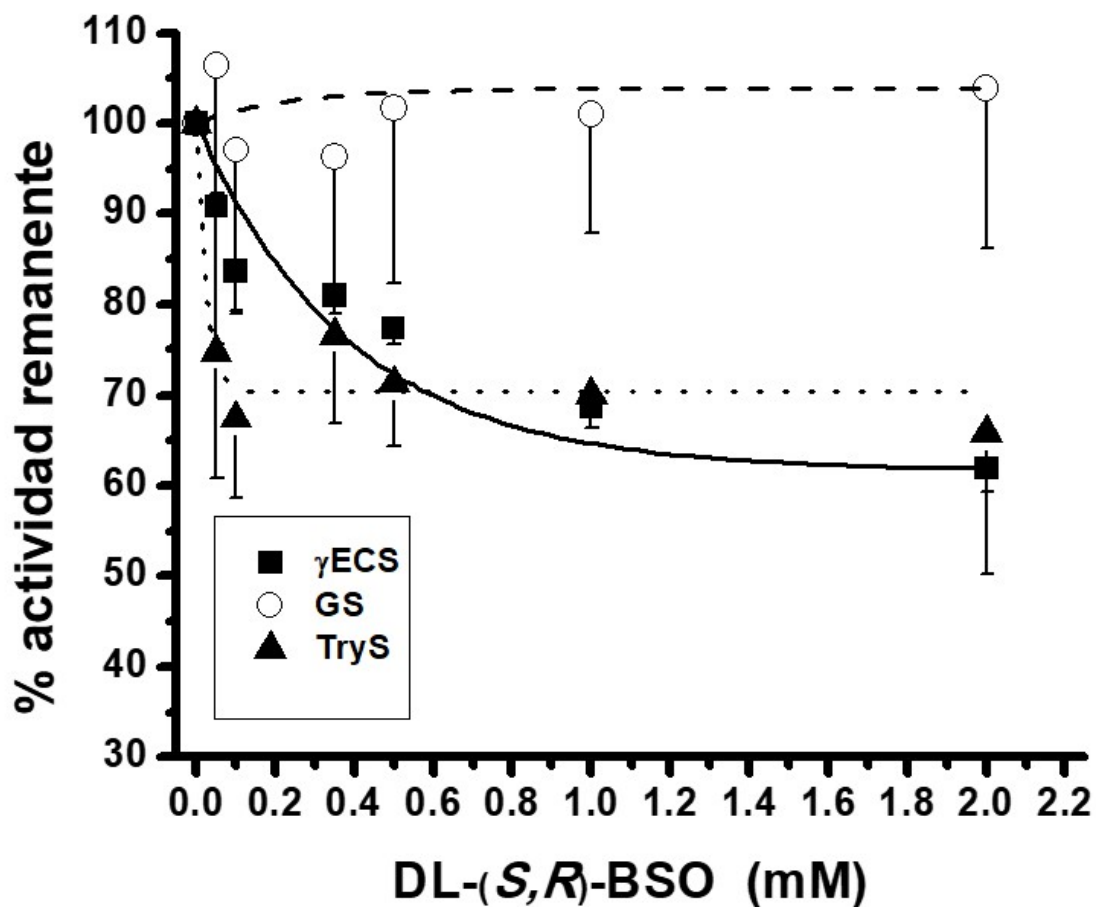


Fig. 9.7 Efecto de DL- (S, R) -BSO en γECS , GS y TryS recombinantes incubadas durante 6 h a 4°C

El 100% de las actividades ($\mu\text{moles} / \text{min} * \text{mg}$ de proteína) a 37°C fueron 0.5 ± 0.16 para γECS ($n = 3$), 4.1 ± 2.3 para GS ($n = 3$) y 1.5 ± 0.7 para TryS ($n = 5$).

9.6 Efecto de L-(S,R)-BSO en la actividad de las enzimas recombinantes γ ECS, GS y TryS.

Debido a que dos de los isómeros de la mezcla de compuestos no tienen actividad inhibitoria, se evaluó el efecto de solamente dos de los isómeros activos L-(S,R)-BSO (Fig. 9.8). La γ ECS se inhibió en un 40% al añadir directamente (sin preincubación) en el ensayo enzimático el L-(S, R)-BSO; esta inhibición aumentó a un 60% cuando la enzima se pre incubó con el inhibidor durante 1 h (Fig. 9.8 A). Para TryS, el L-(S, R)-BSO demostró ser un inhibidor parcial débil, con sólo un 10% de inhibición en la reacción inmediata mientras que cuando se preincubó durante 1 h alcanzó una inhibición no mayor al 30% (Fig. 9.8 B). Al ensayar el inhibidor con la GS solo se observó el efecto en concentraciones superiores a 1 mM en ambos protocolos inmediato o pre incubado (Fig. 9.8 C).

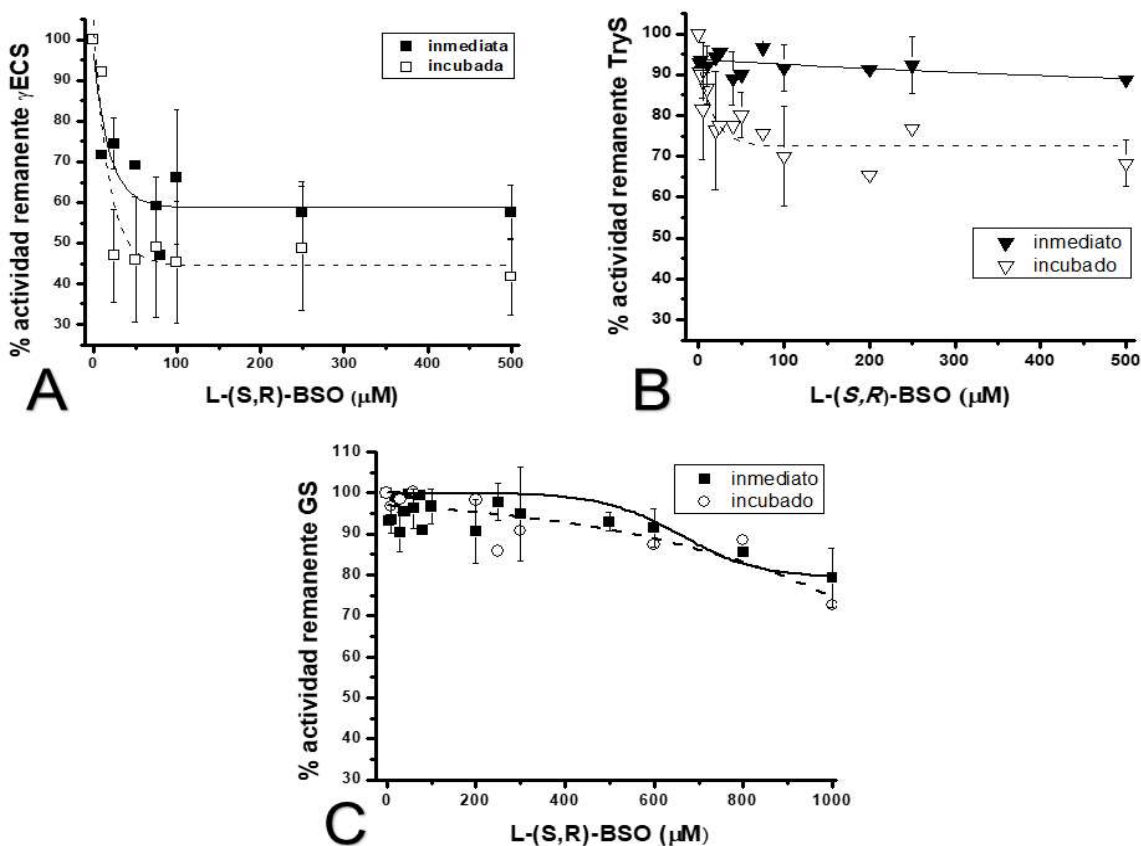


Fig. 9.8 Efecto de los isómeros L-(S,R)-BSO en γ ECS, GS y TryS recombinantes.

A), B) y C) Inhibición de L-(S, R) -BSO en γ ECS, TryS y GS, respectivamente. El inhibidor se añadió directamente al ensayo enzimático (inhibición inmediata) o la enzima se preincubó con el inhibidor durante 1 h a 4 °C y se analizó la actividad a 37 °C (preincubado). 100% de actividades (μ moles / min * mg de proteína) (n = 6) a 37 °C fueron 0.7 ± 0.3 para γ ECS, 1.6 ± 0.3 para GS y 2 ± 0.8 para TryS).

9.7 Efecto de DL-(S,R)-BSO en la actividad de enzimas γ ECS, GS y TryS en extractos citosólicos del parásito.

Debido a que las actividades basales de la γ ECS y TryS no se pueden determinar de manera confiable en los parásitos ya que están por debajo del límite de detección del ensayo, se determinó el efecto del DL-(S,R)-BSO sobre la actividad de estas enzimas en parásitos sobreexpresantes de las mismas .

Los parásitos se expusieron a una concentración de 3 mM de DL-(S,R)-BSO por 24 h, se obtuvieron extractos solubles de proteínas y se procedió a determinar las actividades enzimáticas (Tabla 5). Se determinó una inhibición de aproximadamente el 50% en γ ECS y TryS por la BSO, mientras que la GS no se afectó.

Tabla 5. Inhibición de actividad de γ ECS, GS y TryS en parásitos expuestos a DL-(S,R)-BSO

Célula	Actividad γ ECS			Actividad GS			Actividad TryS		
	Control	actividad después de 3 mM BSO	% inhibición	Control	actividad después de 3 mM BSO	% inhibición	Control	actividad después de 3 mM BSO	% inhibición
Querétaro	<2	-	-	3.8 \pm 1.3	4 \pm 2	0	<2	-	-
Mock	<2	-	-	7.3 \pm 3.6	8.9 \pm 2.8	0	<2	-	-
s- γ ECS	23 \pm 15	8.5 \pm 3.1	63 \pm 14	9.3 \pm 2.1	9.2 \pm 3.3	0	<2	-	-
s-TryS	<2	-	-	8.7	11.9	0	47 \pm 8	21 \pm 2	55 \pm 4

Actividad en nmoles /min*mg de proteína celular. n= 2 – 4 cultivos independientes de parásitos.

9.8 Efecto de DL-(S;R)-BSO sobre el crecimiento de parásitos que sobreexpresan a γ ECS o TryS.

Se realizaron curvas de inhibición de crecimiento en presencia de DL-(S,R)-BSO (0.5 – 16 mM) por 24 h en los parásitos que sobreexpresan 10 y 20 veces a γ ECS o TryS, respectivamente y se compararon con los parásitos sin transfectar (Querétaro) y transfectados con el plásmido vacío (mock). La concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) en los controles (Querétaro 3.3 \pm 1.4 y Mock 6.3 \pm 3 mM), mostraron que estos tienen una mayor sensibilidad al inhibidor en comparación con los parásitos sobreexpresantes de γ ECS que tuvo una IC₅₀ de 13 \pm 4 mM, mientras que la IC₅₀ de los parásitos sobreexpresantes de TryS fue similar a los control (4.9 \pm 1.7mM).

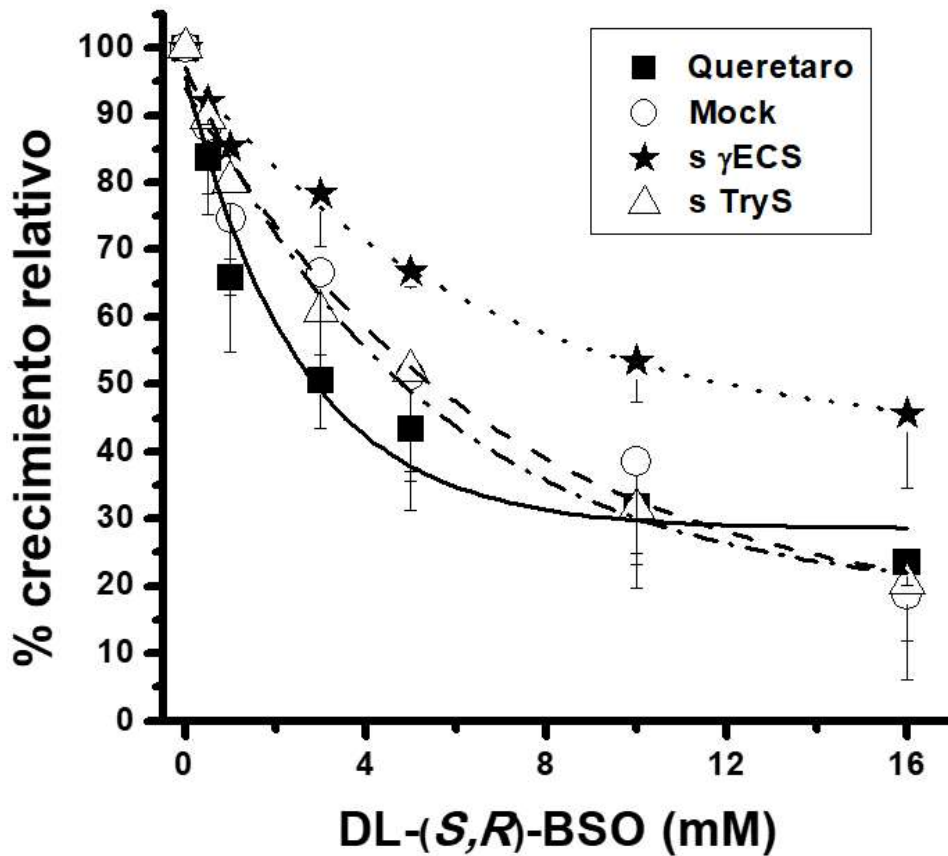


Fig. 9.9 Efecto de BSO en el crecimiento de parásitos cepa Querétaro y con sobreexpresión de γ ECS, TryS.

Las células control y con sobreexpresión se trataron con diferentes concentraciones de DL-(S, R) -BSO durante 24 h; Después se determinó el número de células y se calculó la IC_{50} sobre el crecimiento del parásito.

10. ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta tesis se analizó el efecto de la DL-(S,R) -BSO, un inhibidor potente y específico de la síntesis de GSH para disminuir los niveles de tioles en los tripanosomas que afectar la defensa antioxidante del parásito, Los resultados obtenidos indican que este compuesto es un inhibidor inespecífico para *T. cruzi*, ya que además de afectar a su principal blanco la γ ECS, también inhibe a la TryS, una enzima que no está presente en las células humanas.

La BSO se ha propuesto como un tratamiento adyuvante para tumores, ya que al menos *in vitro*, se ha demostrado que el tratamiento con BSO las hace más susceptibles a fármacos anticancerígenos y a la radiación (Arrick *et al.*, 1981). Por lo tanto, el BSO podría ayudar en el tratamiento adyuvante contra la infección por

T. cruzi (Meister, 1988; Anderson, A., Meister A. 1982; Smith *et al.*, 2015; Morrelo *et al.*, 1987)

10.1 Efecto del BSO en el crecimiento del parásito

Los valores de IC₅₀ del BSO sobre el crecimiento obtenidos en esta tesis son menores con respecto a los reportados por Faundez *et al.*, 2005 de 13.6 ± 0.52 mM. Esta diferencia podría deberse a que se usaron diferentes cepas de *T. cruzi*. En el estudio de Faundez utilizó epimastigotes de la cepa MF de un paciente Chileno en fase crónica de la enfermedad de Chagas mientras que en nuestro estudio utilizamos la cepa Querétaro, que es de las más virulentas reportadas para las cepas mexicanas (Espinosa *et al.*, 2010). Otra gran diferencia es la metodología utilizada para la determinación de la viabilidad del parásito, Faundez *et al.*, (2005) realizaron sus experimentos mediante nefelometría, monitoreando por 10 días, exponiendo al fármaco a partir del primer día, mientras que nosotros lo realizamos en parásitos en fase exponencial y expuestos por 24 h al inhibidor determinando la concentración de parásitos por cuenta directa en cámara de Neubauer.

Cabe mencionar que este trabajo de tesis se realizó con la fase parasitaria de epimastigote de fácil cultivo en medio LIT y de la cual se obtiene la cantidad de biomasa adecuada para poder realizar los estudios metabólicos de perfil de tioles y actividades enzimáticas. Aunque no es la fase infectiva de humano, ya se ha reportado que esta fase parasitaria tiene aproximadamente el doble de contenido de tiol que las fases amastigote y tripomastigote (Faundez *et al.* 2015),

10.2 Análisis de los perfiles de tioles en parásitos tratados con BSO para dilucidar su posible modo de acción.

En epimastigotes de *T. cruzi* expuestos solo a BSO sin suplementación con tioles (Fig. 9.4 panel izquierdo), hubo una acumulación de Cys muy probablemente debido a la inhibición de la γ ECS. Así mismo, los parásitos tienen una disminución en el nivel de GSH de alrededor del 50% debido a que la γ EC muy probablemente se agota por la inhibición de la γ ECS. Sin embargo, a pesar de que hay GSH, el T(SH)₂ disminuyó desde las concentraciones más bajas de BSO. Por lo tanto, la disminución del T(SH)₂ en los parásitos tratados con BSO tal como lo encontramos aquí y que se ha reportado en numerosos estudios (Faundez *et al.*, 2005; Huynh *et al.*, 2003; Griffith 1999) no puede explicarse solo por la inhibición de γ ECS. Este dato sugirió fuertemente que el efecto del BSO en la concentración basal de T(SH)₂ en epimastigotes de *T. cruzi* se debe a la acción inhibitoria combinada de γ ECS y TryS.

Para demostrar que la TryS también era inhibida por BSO, se efectuaron experimentos en los que se suplementaron los parásitos con Cys y GSH, evitando

de esta manera el paso de control de la γ ECS en la concentración basal de GSH, y en ausencia y presencia de la BSO.

Al suplementar los parásitos con Cys o GSH en ausencia de BSO hubo incrementos importantes de hasta 4 y 6 veces en la concentración basal de $T(SH)_2$, con respecto al cultivo control (Fig. 9.4 panel medio y derecho), lo que indica que las enzimas no están inhibidas y tienen capacidad de incrementar el metabolito si se le dan los sustratos respectivos.

Al exponer a los parásitos a la BSO en presencia de Cys (Fig. 9.4 panel medio) se observa que a pesar de que hay mayor cantidad de GSH, el $T(SH)_2$ disminuyó en su totalidad a concentraciones de BSO de 0.25 mM. Este resultado indicó fuertemente que la TryS sí era inhibida por la BSO.

Esta hipótesis se confirmó cuando se trataron los parásitos con BSO en presencia de GSH (Fig. 9.4 panel derecho). En este experimento, el efecto de la inhibición de la γ ECS por BSO, aunque está presente, no afecta de manera significativa la concentración basal de GSH, ya que se mantiene alto por la suplementación externa con GSH y alcanzando casi los niveles de los parásitos control a todas las concentraciones del inhibidor. A pesar de lo anterior, la concentración basal de $T(SH)_2$ no se restauró de manera significativa, observándose la disminución de este metabolito aún a concentraciones bajas de BSO de 0.5 mM. Por último, se demostró que la γ ECS y TryS de parásitos expuestos al inhibidor estaban inhibidas en un 50%, mientras que la GS no se afectó. Todos estos resultados evidenciaron que la TryS era también inhibida por la BSO y explicaba los cambios en el perfil de los tioles de esta vía. Posteriormente, los resultados de la inhibición de las enzimas recombinantes γ ECS, GS y TryS (Fig. 9.7 y 9.8) confirmaron que la γ ECS y TryS se inhiben de manera parcial por la BSO. Se demostró que el isómero L(S,R) tienen efecto sobre las enzimas, siendo un inhibidor de tipo parcial, que es lento, ya que el efecto inhibidor se incrementó cuando el compuesto se pre incubaba con la enzima.

En otros experimentos que no son parte de esta tesis pero que se incluyen en el artículo publicado del anexo 1, se determinó que la BSO es un inhibidor de tipo parcial competitivo con respecto al GSH. Además, mediante un modelo estructural de la TryS se determinó que la BSO podría unirse al sitio de unión del GSH en la enzima.

Todos estos datos consideramos que demuestran que la BSO es un inhibidor inespecífico en la síntesis de $T(SH)_2$, al tener como blanco a dos de las enzimas más importantes de la vía, la γ ECS y TryS.

10.3 Resistencia de los parásitos a la BSO

Los parásitos que sobre expresan la γ ECS fueron más resistentes a BSO debido al nivel de sobreexpresión de 10 veces de la γ ECS que induce en los parásitos niveles de GSH y T(SH)₂ aproximadamente 3 veces más alto que los parásitos control no transfectados.

Sin embargo, los parásitos sobreexpresantes de TryS solo mostraron una ligera resistencia a BSO en comparación con las células control (Querétaro) pero no hubo diferencia con los parásitos mock. Un problema de estos transfectantes es que a pesar de tener una sobreexpresión de TryS de 25 veces no tienen un aumento en el contenido de T(SH)₂. Otros resultados de nuestro laboratorio han demostrado que estos parásitos pueden estar degradando y sintetizando el T(SH)₂, ya que la TryS tiene una actividad de amidasa que degrada T(SH)₂, lo que pudo haberse potenciado esa actividad en la célula cuando los parásitos sobreexpresan mucho a la enzima y actuando en la concentración basal de T(SH)₂.

10.4 Suministro de metabolitos-tiol y la inhibición multi-sitio de BSO

Un hallazgo interesante es que los parásitos pueden introducir tioles del medio extracelular, tanto Cys como GSH. La suplementación de Cys y GSH se realizó a concentraciones muy cercanas a las fisiológicas encontradas en la sangre humana. Sin embargo, cuando los tripomastigotes y los amastigotes de *T. cruzi* infectan las células huésped, tienen acceso a concentraciones mayores de Cys y GSH (0.2 mM y 2 - 20 mM, respectivamente). Ya se ha caracterizado una actividad de transporte de Cys de alta afinidad (Km Cys de 49,5 μ M) pero baja Vmax (13 pmol / min x 10⁷ células) en epimastigotes de *T. cruzi* (Canepa *et al.*, 2009). Sin embargo, hasta el momento no se ha profundizado en la caracterización del transporte de GSH.

11. CONCLUSIONES

- La BSO es un inhibidor inespecífico de la síntesis de T(SH)₂ en *T. cruzi* ya que además de inhibir a la γ ECS también inhibe de manera importante a la TryS.
- Los parásitos sometidos al inhibidor BSO, muestran una drástica disminución del T(SH)₂ debido al efecto aditivo sobre las enzimas que controlan la síntesis de este metabolito.
- El BSO solamente tiene un efecto citostático ya que detiene el crecimiento de las células, pero en combinación con un antichagásico podría mejorar los esquemas de tratamiento de la enfermedad.

12. PERSPECTIVAS

- Determinar el efecto de la combinación de BSO con los antichagásicos, así como el mecanismo de acción de estos fármacos.
- Determinar el efecto de la combinación de BSO más antichagásicos en las enzimas de la vía antioxidante del parásito.

13. REFERENCIAS.

1. Adler, S. (1959) Darwin's illness. *Nature*. **184**:1102-1104
2. Arrick, B.A.; Griffith, O. (1981) Inhibition of glutathione synthesis as a chemotherapeutic strategy for Trypanosomiasis. *J Exp Med* **153**: 720-725.
3. Aufdrheide A.C.; Salo, W.; Madden, M.; Streitz, J.; Buikstra, J.; Guhl, F. (2004) A 9,000-year record of Chagas disease. *PNAS* **101**: 2034-39
4. Becerril, M.A. *Parasitología médica* McGraw Hill México DF 2014 p.442
5. BernCaryn, M.D. (2015) Chagas' disease. *N Engl J Med* **373**: 456-66
6. Betancur G., Y.L. (2015) Cuantificación de tioles libres y superóxido dismutasa (SOD) en extractos metanólicos de las familias Asteraceae, Euphorbiaceae y Piperaceae. Tesis Lic. Pereira, Universidad Tecnológica de Pereira Fac. Tecnología 76 p.
7. Canepa, G., Bouvier, L., Miranda, M., Uttaro, A., Pereira, C., (2009) Characterization of *Trypanosoma cruzi* L-cysteine transport mechanisms and their adaptive regulation. *FEMS Microbiology Letters* **292**: 27-32
8. Carrada-Bravo, T. (2004) *Trypanosoma cruzi*: historia natural y diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Rev Mex Patol Clin* **51**: 205-219
9. CENAPRECE Centro Nacional de Programas Preventivos y Control de Enfermedades. Manual de diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas 2017
10. Coura, J.R.; Castro, S.L. (2002) A critical review on chagas disease chemotherapy. *Mem inst Oswaldo Cruz* **97**: 3-24
11. Cordero, L. J.; Castañeda. R., Ramos C. M.A., Cordero C. J., (2002) Miocardiopatía dilatada chagásica en el estado de Chiapas *Rev Mex Cardiol* **13** (4): 153-157
12. Denzoin, L.A.; Soraci, A.L.; Tapia M.O (2013) Homeostasis del glutatión. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana* **47**: 529-39
13. Espinoza, B., Rico, T., Sosa, S., Oaxaca, E., Vizcaino-Castillo, A., Caballero, M. L., Martínez, I. (2010) Mexican *Trypanosoma cruzi* (TCl) strains with different degrees of virulence induce diverse humoral and cellular immune responses in a murine experimental infection model. *BioMed Research International* **2010**
14. Esquivel E.E.; Leal L.I. (2004) Cromatografía de fase reversa Universidad Nacional Autónoma De México Cuernavaca, Morelos
15. Faundez M. (2007) Inhibición de la síntesis de glutatión como estrategia para potenciar el efecto de drogas antichagásicas en modelo *in vitro* e *in vivo* de la enfermedad de Chagas. Tesis Doc. Chile Universidad de Chile facultad de ciencias químicas y farmacéuticas 128p.
16. Faundez, M.; Lopez-Muñoz, R.; Torres G. (2008) Buthionine Sulfoximine has Anti-*Trypanosoma cruzi* activity in a Murine model of acute Chagas Disease and Enhances the efficacy of Nifurtimox. *Antimicrob. Agents Chemother* **52**: 1837-39

17. Faundez, M.; Pino, L.; Letelier, P. (2005) Buthionine Sulfoximine increases the toxicity of nifurtimox and benznidazole to *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother* **49**: 126-130
18. Flisser, A.; Pérez-Tamayo, R. Aprendizaje de la parasitología basado en problemas Editores de texto mexicanos México DF 2006 p.411-428
19. Florez-Chávez, M.; deFuentes, I.; Garate, T.; Cañavete, C. (2006) Programa de control externo de calidad SEIMC Diagnóstico de laboratorio de la enfermedad de Chagas importada. Madrid, España
20. Griffith, O.; Mulcahy, R. (1999) The enzyme of glutathione synthesis: γ -glutamylcysteine synthetase. *Advances in enzymology and related areas of molecular biology* **73**: 209-63
21. Griffith, O.W. (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis *Free Radical Biology and Medicine* **27**: 922-35
22. Hasne, M.P.; Coppens, I.; Soysa, R.; Ullman, B. (2010) A high-affinity putrescine-cadaverine transporter from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Microbiology* **76**: 78-91
23. Huang, C.S.; Chang, L.S.; Anderson, M.E.; Meister, A. (1993) Catalytic and regulatory properties of the heavy subunit of rat kidney gamma-glutamylcysteine synthetase. *Journal Biological Chemistry* **268**: 19675-680
24. Huynh, T.; Huynh, V.T. (2003) Gene knock down of γ -glutamylcysteine synthetase by RNAi in the parasitic protozoa *Trypanosoma brucei* demonstrates that it is an essential enzyme. *J. Biol. Chem.* **278**: 39794-39800
25. Jaramillo, C.; Guhl, F.; Gomez, M. F.; Vallejo, R.Y. (2000) Hallazgo de *Trypanosoma cruzi* en momias de más de 4000 años de antigüedad *Rev Med* **2**: 119-125
26. Lagos, C.F.; Araya-Secchi, R.; Thomas, P.; Perez-Acle, T.; Tapia, R.A.; Salas C.O. (2012) Molecular modeling of *Trypanosoma cruzi* glutamate cysteine ligase and investigation of its interactions with glutathione. *J Mol Model* **18**: 2055-64
27. Liu, Q.; Zhou, X. (2015) Preventing the transmission of american tripanosomiasis and its spread into non-endemic countries. *Infectious Diseases of Poverty* **4**: 60
28. Lueder, D.V.; Phillis M.A. (1996) Characterization of *Trypanosoma brucei* γ -glutamylcysteine synthetase, an essential enzyme in the biosynthesis of trypanothione (diglutathionyl-spermidine). *The journal of biological chemistry* **271**: 17485-17490
29. Martínez-Sámamo, J.; Torres-Duran, P.V.; Juárez-Oropeza, M.A. (2011) El glutatión y su asociación con las enfermedades neurodegenerativas, la esquizofrenia, el envejecimiento y la isquemia cerebral. *Revista de Educación Bioquímica* **30**: 56-67
30. Maya, J.D.; Cassels, B.K.; Iturriaga-Vásquez, P.; Ferreira, J. (2007) Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative biochemistry and physiology* **146**: 601-20
31. Mendoza, M.I.; (2015) Caracterización biológica y bioquímica de cuatro aislados de *Trypanosoma cruzi* Facultad de química, UNAM
32. Molina, I.; Salvador, F.; Sanchez-Montalva, A. (2016) Actualización en enfermedad de Chagas *Enferm Infecc Microbiol Clin.* **34(2)**:132–138

33. Mukherjee, A.; Roy, G.; Guimond, C.; Ouellette, M. (2009) The γ -glutamylcysteine synthetase gene of leishmaniasis essential and involved in response to oxidants. *Molecular Microbiology* **74**: 914-27
34. Murrillo-Godinez, G (2012) Tripanosomiasis americana, enfermedad de Chagas-Cruz, enfermedad de Chagas-Mazza: historia de un epónimo. *Med. Int. Mex* **28(2)**:182-86
35. Nelson, D.; Cox, M. (1992) Lehninger: principios de bioquímica vol. 2 Omega
36. Olin-Sandoval, V.; Moreno- Sánchez, R.; Saavedra, E. (2010) Targeting trypanothione metabolism in trypanosomatid human parasites. *Current drug targets* **11**: 1614-1630
37. Olin-Sandoval, V.; González-Chávez, Z.; Berzunza-Cruz, M. (2012) Drug target validation of the trypanothione pathway enzymes through metabolic modelling. *The FEBS Journal* **279**: 1811-1833
38. Rassi, A.J., Rassi, A.; Marin-Neto, J.A. (2010) Chagas disease. *Lancet* **375**: 1388-1402
39. Richie, J.P.; Skowronski, L.; Abraham P., Leutzinger Y. (1996) Blood glutathione concentrations in a large-scale human study. *Clinical Chemistry* **42**: 64-70
40. Risso, M.G.; Sartor, P.A.; Burgos, J.M.; Briceño, L.; Rodriguez, E.M.; Guhl, F.; Chavez, O.T.; Espinoza, B.; Monteon, V.M.; Russomando, G.; Schijiman, A.G.; Bottasso, O.A.; Leguizamon, M.S. (2011) Inmunological identification of *Trypanosoma cruzi* lineages in human infection along the endemic área. *Am J Trop Med Hyg* **84**: 78-84
41. S.K. Sharma, H.S. Banyal (2009) γ -glutamylcysteine synthetase from *Plasmodium berghei*. *Parasitology International* **58**: 145-153
42. Salazar-Schettino, P.M.; Bucio-Torres, M.I.; Cabrera-Bravo, M.; de Alba-Alvarado, M.C.; Castillo-Saldaña, D.R.; Zenteno-Galindo, E.A.; Rojo-Medina, J.; Fernández-Santos, N.A.; Perera-Salazar, M.G. (2016) Enfermedad de Chagas en México. *Rev Fac Med UNAM* **59** (3)
43. Secretaria de salud Prevención y control de la enfermedad de Chagas. México 2013-2018
44. Skoog, D.A.; West, D.M.; James, H.F. (1997) Fundamentos de química analítica Vol. 2 Reverte
45. Smith, I. C., Vigna, C., Levy, A. S., Denis, S. G., Rush, J. W., Tupling, A. R. (2015). The effects of buthionine sulfoximine treatment on diaphragm contractility and SERCA pump function in adult and middle aged rats. *Physiological reports*, **3(9)**: e12547.
46. Tyler, K.M.; Engman, D.M. (2001) The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal For Parasitology* **31**: 472-81
47. Uribarren T. Enfermedad de Chagas Departamento de Microbiología y Parasitología Facultad de Medicina 2014 UNAM
48. Valenzuela, L.; Barría, C.; Sepúlveda, S.; Galanti, N.; Cabrera, G. (2010) Enfermedad de Chagas crónica: estrés oxidativo y miocarditis chagastica asociada a la persistencia

parasitaria. Programa de biología celular y molecular ICBM Facultad de medicina Universidad de Chile

49. Velasco-Castrejon, O.; Rivas-Sanchez, B. (2008) Apuntes para la historia de la enfermedad de Chagas en México. *Bol Med Hosp Infant Mex* **65**: 579
50. Velasco C.O; Valdespino J.C; Tapia C.R; Salvatierra B; Guzmán B.C; Magos C. (1992) Seroepidemiología de la enfermedad de Chagas en México. *Salud Publ Méx* **34**(2): 186-196
51. Viotti, R.; Vigliano, C.A.; Alvarez, M.G.; Lococo, B.E.; Petti, M.A.; Bertocchi, G.L.; Armenti, A.H. (2009) The impact of socioeconomic conditions on chronic Chagas disease progression. *Rev. Esp Cardiol* **62**: 1224-32
52. Werner, A.B.; Zulantay, A.I. (2011) Estado actual en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Rev Med Chile* **139**: 247-56
53. World Health Organization (2015) Reporte sobre la enfermedad de Chagas (WHO) World Health Organization Ginebra Suiza

14. ANEXO

Buthionine sulfoximine is a multitarget inhibitor of trypanothione synthesis in *Trypanosoma cruzi*

Citlali Vázquez*, Marlen Mejia-Tlachi*, Zabdi González-Chávez, Aketzalli Silva, José Salud Rodríguez-Zavala, Rafael Moreno-Sánchez and Emma Saavedra

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Mexico city, México

Correspondence

E. Saavedra, Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Juan Badiano No 1 Col. Sección XVI, Tlalpan, Ciudad de México, 14080, México
Tel: +52 55 5573-2911 ext. 1298
E-mail: emma_saavedra2002@yahoo.com

*These authors contributed equally to this study.

(Received 15 May 2017, revised 31 October 2017, accepted 2 November 2017)

doi:10.1002/1873-3468.12904

Edited by Michael Ibba

Buthionine sulfoximine (BSO) induces decreased glutathione (GSH) and trypanothione [T(SH)₂] pools in trypanosomatids, presumably because only gamma-glutamylcysteine synthetase (γECS) is blocked. However, some BSO effects cannot be explained by exclusive γECS inhibition; therefore, its effect on the T(SH)₂ metabolism pathway in *Trypanosoma cruzi* was re-examined. Parasites exposed to BSO did not synthesize T(SH)₂ even when supplemented with cysteine or GSH, suggesting trypanothione synthetase (TryS) inhibition by BSO. Indeed, recombinant γECS and TryS, but not GSH synthetase, were inhibited by BSO and kinetics and docking analyses on a *Tc*TryS 3D model suggested BSO binding at the GSH site. Furthermore, parasites over-expressing γECS and TryS showed ~ 50% decreased activities after BSO treatment. These results indicated that BSO is also an inhibitor of TryS.

Keywords: buthionine sulfoximine; gamma-glutamylcysteine synthetase; glutathione; *Trypanosoma cruzi*; trypanothione; trypanothione synthetase

American trypanosomiasis or Chagas disease is a systemic and chronic parasitic illness caused by the human parasite *Trypanosoma cruzi*. The estimated infected persons in American countries are 5.7 million, whereas the estimated population being at risk of infection is 70 million [1]. Although the disease is mainly endemic of Latin American countries, infected people are now distributed worldwide because of human emigration and nonvectorial transmission.

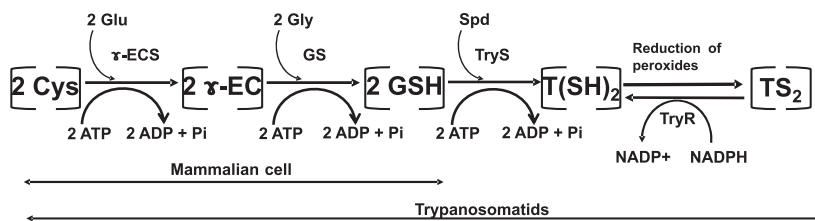
During human infection, the parasite is exposed to reactive oxygen species produced by the host immune response, or as a consequence of pharmacologic intervention with benznidazole or nifurtimox, the current drugs used for its treatment [2,3]. To contend with oxidative stress, *T. cruzi* has an antioxidant system based on trypanothione [T(SH)₂] instead of glutathione (GSH) like in human cells (Scheme 1) reviewed in

[4,5]. Trypanothione is a conjugate of two GSH molecules covalently bound by a spermidine (Spd) molecule which is synthesized in an ATP-consuming reaction catalyzed by trypanothione synthetase (TryS). The *de novo* GSH synthesis starts with cysteine (Cys) and glutamate which are bound in an ATP-consuming reaction by gamma-glutamylcysteine synthetase (γECS) to form gamma-glutamylcysteine (γEC). The latter is further linked to glycine in another ATP-consuming reaction catalyzed by glutathione synthetase (GS) to produce GSH. On the other hand, Spd can be *de novo* synthesized from putrescine (Put) and decarboxylated S-adenosylmethionine by Spd synthase, or it can be imported from the extracellular milieu by high-affinity plasma membrane polyamine transporters.

The enzymes of this particular T(SH)₂ metabolism have been regarded as attractive therapeutic sites [3–6],

Abbreviations

BSO, buthionine sulfoximine; Cys, cysteine; GS, glutathione synthetase; GSH, glutathione; Put, putrescine; Spd, spermidine; T(SH)₂, reduced trypanothione; TryS, trypanothione synthetase; γEC, gamma-glutamylcysteine; γECS, gamma-glutamylcysteine synthetase.



Scheme 1. Synthesis of T(SH)₂ in trypanosomatids. Trypanothione is synthesized by TryS from two GSH and one Spd molecules. In turn, GSH is synthesized from glutamate (Glu), Cys, and glycine (Gly) by the successive action of γ ECS and GS. Spd can be synthesized by the parasite or imported from the medium. T(SH)₂ is the reducing equivalent donor of the peroxide reduction pathway. Trypanothione disulfide (TS₂) is reduced by trypanothione reductase (TryR) using NADPH.

and it has been proposed that inhibition of GSH synthesis should affect T(SH)₂ synthesis and the antioxidant defense of the parasite [7]. It is well established that buthionine sulfoximine (BSO) is a potent inhibitor of γ ECS. The BSO isomers inhibit by acting as structural analogs of glutamate [8,9]. The L-(S)-BSO isomer is phosphorylated by γ ECS resulting in a compound that simulates a chemical transition state previous to the formation of γ EC, and tightly binds to the catalytic site blocking catalytic [8,10]. The L-(R)-BSO isomer is not phosphorylated but competitively (*vs.* glutamate) inhibits the enzyme with a $K_i = 0.15$ mM for the human enzyme [10]. The D-(S,R)-isomers do not inhibit the γ ECS activity [10].

Buthionine sulfoximine decreases the thiol pools in *T. cruzi* epimastigotes. Parasites exposed to 0.5 mM BSO for 1–8 days show 20–80% less total thiols [11–13], and BSO lowers (30–40%) the IC₅₀ values for benznidazole and nifurtimox on parasite growth [13]. Indeed, BSO treatment of different *T. cruzi* strains revealed that inhibition of the thiol metabolites synthesis increases the susceptibility to trypanocidal drugs [11,13,14].

Most of the described BSO effects on thiol metabolites have been explained by assuming exclusive γ ECS inhibition. However, decreased GSH and T(SH)₂ levels in BSO-treated, (60 and 120 μ M) wild-type *Trypanosoma brucei* cells are not restored by supplementing with 80 μ M GSH, which contrasts with the recovered thiol levels in *T. brucei* γ ECS knockdown cells supplemented with GSH [15]. These authors explained this result by proposing that external GSH transport is also inhibited by BSO; hence other pathway sites may very likely be also BSO targets. However, BSO inhibition specificity on trypanothione metabolism of trypanosomatid parasites has not been systematically examined. Therefore, in the present study, a thorough analysis of metabolite pools and enzyme activities of the T(SH)₂ metabolism in *T. cruzi* treated with this inhibitor was performed which led to identifying TryS as an additional BSO target.

Experimental strategy

Cell culture

Trypanosoma cruzi epimastigotes Querétaro strain, DTU I [16] were grown at 28 °C in liver infusion tryptose (LIT) medium (0.5% triptose, 0.5% liver infusion, 0.4% NaCl, 0.04% KCl, 0.42% Na₂HPO₄, 0.2% glucose) supplemented with 10% FBS (ByProducts, Guadalajara, Jalisco, Mexico), 25 μ g·mL⁻¹ hemin, 100 μ g streptomycin·mL⁻¹, and 100 U penicillin·mL⁻¹ (Sigma-Aldrich, St. Louis MO, USA) reaching a final pH = 7. In this medium the basal Cys concentration was 62 μ M ($n = 2$), whereas GSH was below the limit of detection of the assay (< 25 nM).

BSO exposure

Cultures of 50 mL were initiated at a cell density of 0.7×10^6 parasites·mL⁻¹ and were grown for 48 h to reach the exponential growth phase ($2.8 - 3.2 \times 10^6$ parasites·mL⁻¹). The cell culture was split in aliquots of 5 mL and poured into 15-mL tubes, with one of them serving as control, whereas the others received different concentrations (0.25–20 mM) of freshly prepared DL-buthionine-(S,R)-sulfoximine (B2640; Sigma) dissolved in Milli-Q water and then the cells were further incubated for 24 h. Thereafter, the cell density (number of parasites·mL⁻¹) of each culture was determined by direct cell counting with a Neubauer chamber. The relative cell growth was the difference between the cell density attained after 24 h of incubation with the inhibitor minus the initial cell density before adding the inhibitor. A second protocol was performed in which the inhibitor was added at the beginning of the cell culture and the cell density was daily monitored for 9 days. To determine the DL-(S,R)-BSO concentration required to attain 50% growth decrease (EC₅₀), the relative cell growth in the presence of the inhibitor was normalized to the relative growth in its absence. The growth rate (μ) corresponds to the slope given by a semilog plot of log cell density *vs.* time at the different inhibitor concentrations; these values were further normalized to the μ value obtained in the absence of the inhibitor. The BSO stability in the parasite culture medium is unknown, but if it is

unstable, then its effects on the parasite physiology would originate from acting in a bolus fashion.

Similar experiments were performed in 25-mL parasite cultures with 0–3 mM DL-(*S,R*)-BSO and supplemented with 0–0.1 mM of either Cys or *N*-acetyl-L-Cys (NAC) and 0–1 mM of either GSH or GSH-monoethyl ester (GMEE; Sigma), all dissolved in Milli-Q water. The cells were incubated for 24 h at 28 °C; then 1-mL aliquots were separated for protein determination by the Lowry method [17] in PBS-washed cell pellets and the rest was used for metabolite determination as follows. The cells were collected by centrifugation at 4500 *g* for 10 min at 4 °C and the cell pellet (~ 100 µL) was washed once with 10 mL PBS buffer (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) and later with 1 mL PBS. The cellular pellet for metabolite determination was stored at –70 °C until use (within the next 7 days). All the samples of each individual titration experiments (control and experimental curves) were analyzed the same day.

Metabolite determination

Thiol metabolites were determined as described before, but with some modifications [18]. Briefly, the cellular pellets were resuspended in 90 µL of cold lysis buffer (20 mM HEPES pH 7.4, 0.15 mM KCl, 1 mM EDTA, 20 mM dithiothreitol) and the cell soluble fraction was obtained by three quick cycles of freezing in liquid nitrogen/thawing at 37 °C (~ 4 min in total), followed by centrifugation at 20 817 *g* for 10 min at 4 °C. The soluble fractions were reduced with an excess of sodium borohydride for 10 min on ice; then the protein and excess borohydride and its salts were discarded by adding perchloric acid (3% v/v), mixing and centrifuging at 4500 *g* for 2 min at 4 °C (protocol 1). Twenty microliters of the acidic sample was used for thiol metabolite separation carried out by high-performance liquid chromatography in a Waters apparatus (Milford, MA, USA) using a reverse-phase C-18 column of 3-µm particle size (Altima, Columbia, MD, USA) previously equilibrated with 99% trifluoroacetic acid (0.1% v/v in water) and 1% acetonitrile, which also served as separating phase. Separated thiols were postcolumn derivatized with dithionitrobenzoic acid (Sigma) in 100 mM Na₂HPO₄ at pH 8.0 and detected by UV-VIS spectrophotometry at 412 nm with the HPLC-coupled detector.

To test the thiol stabilities during sample processing, two other protocols of thiol extraction were assessed. The pellets of freshly harvested cells were resuspended in lysis buffer and immediately treated with perchloric (3% v/v; protocol 2) or sulfosalicylic (5% v/v; protocol 3) acids, vortexed, incubated for 20 min on ice, and centrifuged. Similar T(SH)₂ levels were obtained in the three protocols in non-supplemented and thiol-supplemented parasites; however, Cys and GSH were three to five times lower in the PCA and SSA extraction protocols (Fig. S1A). Thus, protocol 1

yielded significantly higher total thiol levels because it allows recovery of dithiol molecules such as oxidized glutathione. Hence, the protocol of cell lysis/thiol reduction/acid precipitation used in this work seems to be reliable for simultaneously determining the changes in the intracellular Cys, GSH, and T(SH)₂ contents. Therefore, with the extraction protocol 1, the total amount of reduced thiol equivalents (thiol groups derived from the reduced forms, and from the oxidized and mixed disulfides reduced by NaBH₄) was determined throughout the present study. Furthermore, thiol stabilities through time in cells stored at –70 °C vs. fresh cells were monitored (Fig. S1B). The average thiol contents were similar in both cell samples, although the storage increased the standard deviation.

The polyamines Put and Spd were determined as described before [18].

γECS and TryS overexpression in epimastigotes

The genes of interest were amplified by PCR. For γECS gene amplification, genomic DNA from the *T. cruzi* Querétaro strain was used as template. The primers used were: γECS sense 5'-GCACGATATCATGGGTCTCTTGA-3' and γECS antisense 5'-CGATGCGGCCGCT-TACTC ACGGG-3'. These primers were designed using the sequence previously published for the γECS from *T. cruzi* CL Brener strain (XM_808833.1) and contained *EcoRV* and *NotI* restriction sites, respectively. The PCR amplification protocol was 10 min of denaturation at 95 °C, followed by 40 cycles of 3-min denaturation at 95 °C, 15-s annealing at 60 °C, and 3-min elongation at 72 °C; and a final step of 5 min at 72 °C. The PCR product was cloned in the pJET 2.1 vector (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and further subcloned in the *EcoRV* and *NotI* restriction sites of the pTREXn *T. cruzi* transfection vector [19] and sequenced. No difference with the γECS amino acid sequence from *T. cruzi* CL Brener strain was observed.

The TryS gene was amplified from a previous expression vector containing the TryS gene of the *T. cruzi* Ninoa strain [18]. The amplification primers were based on the TryS sequence of the Silvio strain (AF311782.1): sense 5'-GGCAAGCTTATGACGACTCTAAAGTCTTTGGCGG-3' and antisense 5'-GGCGGCCGCTCACGTTTTCAA GCCACCACCG-3'; these primers contained restriction sites for *HindIII* and *NotI*, respectively. The PCR protocol was similar as above except for using an annealing temperature of 60 °C. The PCR product was directly ligated into the pTREXn vector using the restriction sites and verified by sequencing.

Trypanosoma cruzi epimastigotes were transfected by electroporation as described before [20]. Briefly, 3 × 10⁸ epimastigotes harvested at the exponential growth phase were resuspended in cold 1-mL incomplete LIT medium (with neither serum nor hemin) and were transferred to a

2-mm electroporation cell. Then, 100 µg of plasmidic pTREXn DNA constructs (previously purified by cesium chloride gradient) were added and the sample subjected to a pulse of 300 V for 70 ms using a BTX electroporator (Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA). After electroporation, the transfected parasites were poured into 15-mL sterile conical tubes with 5 mL of complete LIT medium and incubated at 28 °C for 48 h. Afterwards, the parasites were cultured in LIT medium in the presence of 500 µg geneticin-mL⁻¹ (Gibco, NY, Grand Island, USA) for 15 days with two subsequent selection procedures of 15 days in the presence of the antibiotic. As a control to assess efficiency in the transfection and selection procedures, epimastigotes were transfected with the pTREXn vector containing the GFP. Expression of the GFP protein was indeed displayed by 100% parasites. For further experiments, pTREXn without GFP was used to transfect cells (mock cells). Transfected parasites were exposed to DL-(S, R)-BSO as described in section BSO exposure.

Recombinant γ ECS, GS and TryS

The recombinant proteins were purified from previously obtained *Escherichia coli* BL21(DE3) cells containing plasmids that allow overexpression of the enzymes [18]. The overexpression protocol was modified to that of autoinduction [21]. Briefly, a preinoculum of bacteria grown in LB medium for 18 h at 37 °C with orbital agitation at 200 r.p.m. was generated. Then, 2.5-mL preinoculum aliquots were diluted in 250 mL of ZYM autoinduction medium (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 25 mM Na₂HPO₄, 25 mM KH₂PO₄, 50 mM NH₄Cl, 5 mM Na₂SO₄, 2 mM MgSO₄, 0.5% glycerol, 0.05% glucose, 0.2% α -lactose) and incubated for 4 h at 37 °C under agitation and further for 16 h at 25 °C. The proteins were purified by metal-affinity chromatography as described before [18].

Enzyme activity determination and BSO inhibition

Recombinant γ ECS, GS, and TryS activities were determined under initial rate conditions as described before [18]. Briefly, the ADP produced by their reactions was determined at 37 °C by coupling with excess pyruvate kinase and lactate dehydrogenase (at least 0.6 U PYK/0.9 U LDH; Sigma) and following the NADH oxidation at 340 nm in a diode-array Agilent spectrophotometer. The reaction mixture (0.5 mL) contained assay buffer (100 mM HEPES pH 7.4, 100 mM KCl, 5 mM MgSO₄, 1 mM EDTA), 2 mM PEP, 0.2 mM NADH, 2 mM ATP plus specific substrates: 1.3 mM glutamate and 2.1 mM Cys to start the γ ECS reaction; 8 mM Gly and 0.4 mM γ EC to start the GS reaction; 11 mM Spd and 1 mM GSH to start the TryS reaction. The amount of protein used was 2–7.5 µg which was within the linearity of the assay. Saturation curves for

TryS were performed at variable GSH with saturating cosubstrate concentrations.

To determine the effect of BSO on recombinant *T. cruzi* γ ECS, GS, and TryS enzymes, individual aliquots of 2–7.5 µg of recombinant protein were preincubated at 4 °C with different concentrations (0–2 mM) of water-dissolved DL-(S,R)-BSO in 100 µL of enzymatic assay buffer (100 mM HEPES pH 7.4, 100 mM KCl, 5 mM MgSO₄, 1 mM EDTA) for 1–6 h. Afterward, the whole mix was used to determine the remaining activity using the standard enzymatic assay; in this, the maximal DL-(S,R)-BSO final concentration was 0.4 mM.

Furthermore, the kinetics of the effect of the two diastereomers L-(S,R)-BSO (B2515; Sigma) on the enzymes was determined without preincubation, by directly adding the inhibitor to the enzymatic assay with saturating cosubstrates; in this case, the reactions were started by adding variable concentrations of the specific thiol substrates. In addition, the enzymes were preincubated for 1 h with L-(S, R)-BSO as described above and the remaining activity was determined under initial rate conditions (whose duration was up to 10 min). Double reciprocal and Dixon plots were used to determine the type of inhibition and inhibition constant ($K_{i,app}$) values [22]. The activity of the coupling enzymes PYK and LDH was not affected by 3 mM of DL-(S,R)-BSO or 1 mM L-(S,R)-BSO after 1 h incubation.

To determine the effect of BSO in the enzymes within the parasites, wild-type epimastigotes (Querétaro strain), parasites transformed with empty vector (mock), and parasites overexpressing γ ECS or TryS were cultured in 50 mL of LIT medium to the exponential phase of growth and exposed to 0–3 mM DL-(S,R)-BSO as described in BSO exposure. The cells were harvested, washed with PBS, and the cell-soluble fractions were obtained as described in Metabolite determination except that the cell lysis buffer also contained 1 mM phenylmethanesulfonyl fluoride. Enzyme activities were determined in the enzymatic assay protocol described above for recombinant enzymes but following the next procedures. Mixtures for two reactions were prepared containing 0.2–0.5 mg of cell-soluble protein and all the enzymatic assay components except the specific thiol substrate. The mix was divided into two fractions but only one was supplemented with the required thiol. The sample lacking the thiol substrate accounted for the contaminating ATPase activity present in the soluble cell fractions, which was subtracted from the activity in the complete reaction.

Modeling of *T. cruzi* TryS and molecular docking analysis

A three-dimensional model of *T. cruzi* TryS was obtained by homology modeling using the SWISSMODEL software (available at <http://swissmodel.expasy.org/>) [23]. The template used for modeling was the structure of

Leishmania major TryS (PDB: 2VOB) [24]. The structures of GSH and L-BSO were downloaded from PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>). The protein structure model and ligands were prepared for docking using the software ADT 1.5.2 [25]. Docking analysis was carried out using the software Autodock 4.2.5.1 (available at <http://autodock.scripps.edu/>) [26]. After docking, the 100 best conformations for each ligand were selected and then clustered for analysis using the software ADT 1.5.2. The conformations selected were within the most represented cluster and corresponded to those showing the lowest values of binding energy and theoretical K_i values. Model analyses and figure drawing were carried out with PYMOL version 1.3 (The PyMOL Molecular Graphics System, Schrödinger, LLC; <http://pymol.sourceforge.net/>).

Results

DL-(S,R)-BSO effect on cell growth

Trypanosoma cruzi epimastigotes grown for 48 h (exponential growth phase) and then treated with DL-(S,R)-BSO for further 24 h (Fig. 1A) yielded an EC_{50} value of 3.3 ± 1.4 mM ($n = 6$), which was lower to that previously reported of 13.6 ± 0.52 mM in a 10 days exposure to L-(S,R)-BSO [13]. Therefore, a similar experiment to the reported one was performed

adding the inhibitor at the beginning of the culture and monitoring parasite growth for 9 days (Fig. 1B). An EC_{50} value of 6.3 ± 2.4 mM ($n = 3$) on the growth rate (μ) was now obtained (Fig. 1C), which was still lower to the reported one [13].

DL-(S,R)-BSO effect on parasite thiol metabolite content

DL-(S,R)-BSO effect on nonthiol-supplied cells

The steady-state intermediate metabolite levels of a particular pathway depend on the rates of the enzymes that produce a given metabolite and those that consume it; if a pathway enzyme is inhibited (rate-limited), then its substrates should accumulate, whereas its products should decrease (crossover theorem) [27,28]. Hence, the changes in the T(SH)₂ synthesis pathway intermediates (Scheme 1) and T(SH)₂ seen as the pathway's end product, can provide clues about how BSO affects the T(SH)₂ pathway enzymes.

At 3 mM DL-(S,R)-BSO, parasite viability was not significantly affected (90% mobile parasites; data not shown) but the relative cell growth decreased by 60% (Fig. 1). In agreement with previous reports [13,15], DL-(S,R)-BSO administration promoted (a) significant decrease in the T(SH)₂ content starting at the lowest

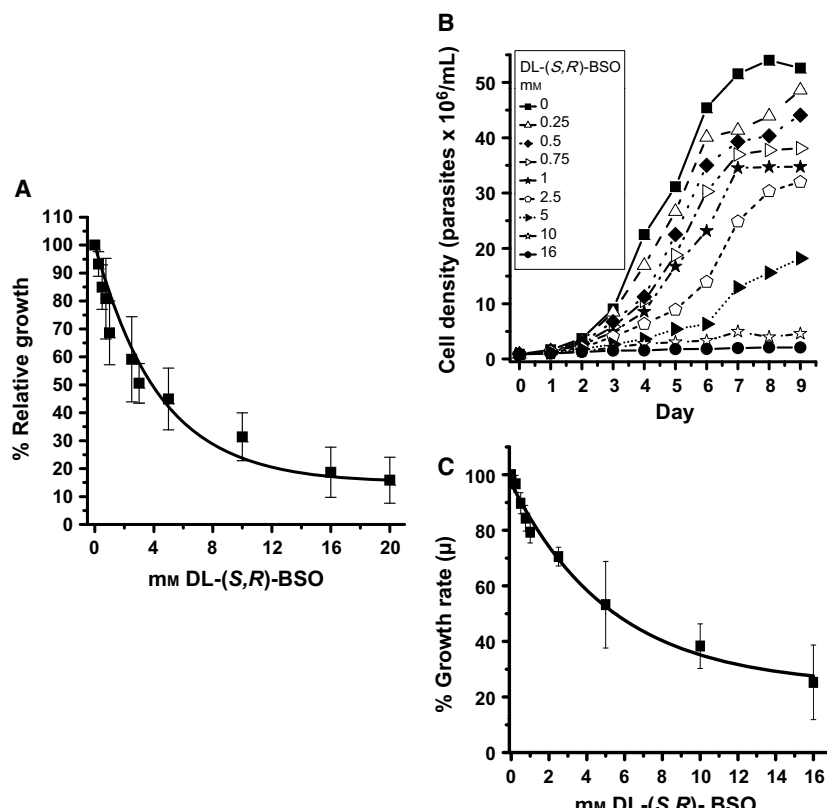


Fig. 1. Effect of DL-(S,R)-BSO on parasite growth. (A) Epimastigotes cultured for 2 days (exponential growth phase) in LIT medium at 28 °C were treated with the indicated DL-(S,R)-BSO concentration and changes in cell density were determined after 24 h. One hundred percent relative growth within 24 h = $3.6 \pm 0.8 \times 10^6$ parasites·mL⁻¹ ($n = 7$). (B) Epimastigotes were incubated with BSO added at the beginning of the cell culture and the cell number was monitored for 9 days ($n = 3$). (C) The growth rate (μ) determined from data shown in (B) was used to estimate the EC_{50} for BSO. One hundred percent μ value = 0.8 ± 0.12 day⁻¹ in the absence of BSO.

inhibitor concentrations of 0.1 mM; (b) ~ 50% decrease in the GSH pool; and (c) a marked decrease in the Cys level only at 0.1 mM (probably due to competitive inhibition of BSO on Cys synthesis), but which was increased at higher inhibitor concentrations (Fig. 2, left panel) most probably due to γ ECS inhibition.

DL-(S,R)-BSO effect on Cys-supplied cells

To circumvent the limiting effect of the parasites' Cys pool on the γ ECS rate (Scheme 1), the cells were supplemented with increasing Cys (or Cys analogs) concentrations. Thus, the inhibitory effect of BSO on γ ECS and pathway thiol metabolites can be directly analyzed. Up to 0.1 mM Cys was supplied to the parasites, which is close to the physiological concentrations present in human plasma (0.212 mM) [29] and Cys + cystine in serum (0.096 mM) [30]. There were concentration-dependent increases in the T(SH)₂ contents reaching up to 4.5-fold at 0.1 mM Cys (Figs 3A and 2 middle panel). Supplementation with higher Cys concentrations up to 1 mM yielded a similar pattern in thiol pools to that observed with 0.1 mM Cys (data not shown). In contrast, lower increases in T(SH)₂ levels (2.5-fold) were attained when parasites were supplemented with permeable

NAC (Fig. 3A). These observations indicated that *T. cruzi* epimastigotes can readily take up Cys for T(SH)₂ synthesis.

Afterward, in the presence of DL-(S,R)-BSO and 0.1 mM external Cys, (a) internal Cys built up as a consequence of Cys uptake and γ ECS inhibition; (b) GSH level gradually decreased, stabilizing at 50% of the control cells value; and (c) T(SH)₂ was severely depleted at inhibitor concentration \geq 0.25 mM despite the presence of GSH in the cell (Fig. 2 middle panel). The T(SH)₂ depletion suggested either GSH limitation for TryS reaction or an inhibitory effect of DL-(S,R)-BSO on TryS (Scheme 1).

DL-(S,R)-BSO effect on GSH-supplied cells

To further test the latter hypotheses, the controlling effect of γ ECS on the GSH pool and the putative GSH limitation of TryS (Scheme 1) were circumvented by directly supplementing the parasites with 0.3–5 mM free GSH or 0.3–1 mM of the permeable GSH analog GMEE. These GSH concentrations are within the physiological intracellular concentrations found in animal cells (0.5–13.7 mM) and liver (5–10 mM) [31–33]. Addition of external GSH (0.3–1 mM) gradually increased T(SH)₂ to high levels (up to five fold) as in Cys supplementation (Figs 3B and 2 right panel) and this high

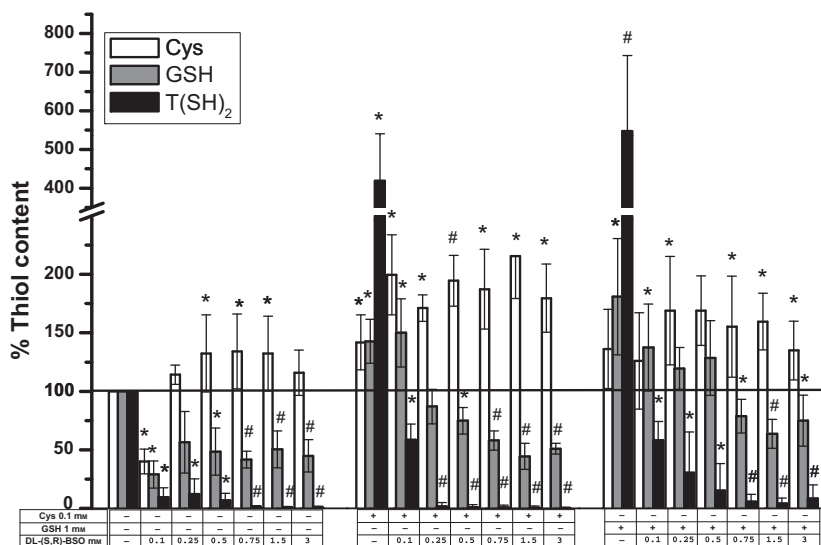


Fig. 2. Effect of DL-(S,R)-BSO on thiol metabolite contents in epimastigotes. The contents of Cys, GSH, and TSH₂ were determined by HPLC in parasites treated with DL-(S,R)-BSO for 24 h in the absence or presence of 0.1 mM external Cys or 1 mM external GSH. One hundred percent thiol contents were Cys 4.8 ± 1, GSH 5.7 ± 2.2 and T(SH)₂ 3.1 ± 0.9 nmol·(mg protein)⁻¹ (n = 17) which are equivalent to 0.8 ± 0.2, 0.95 ± 0.37, and 0.52 ± 0.15 mM, respectively, considering that 1x10⁸ parasites are equivalent to 0.5 ± 0.07 mg protein and have 3 μL intracellular volume. The number of inhibition experiments using independent cell cultures was: BSO n = 14–22; BSO + Cys n = 5–8; BSO + GSH n = 5–8. The statistical analysis used was two-tailed Student's t-test. *P ≤ 0.05, #P ≤ 0.001 against control cells without supplementation in the absence of BSO

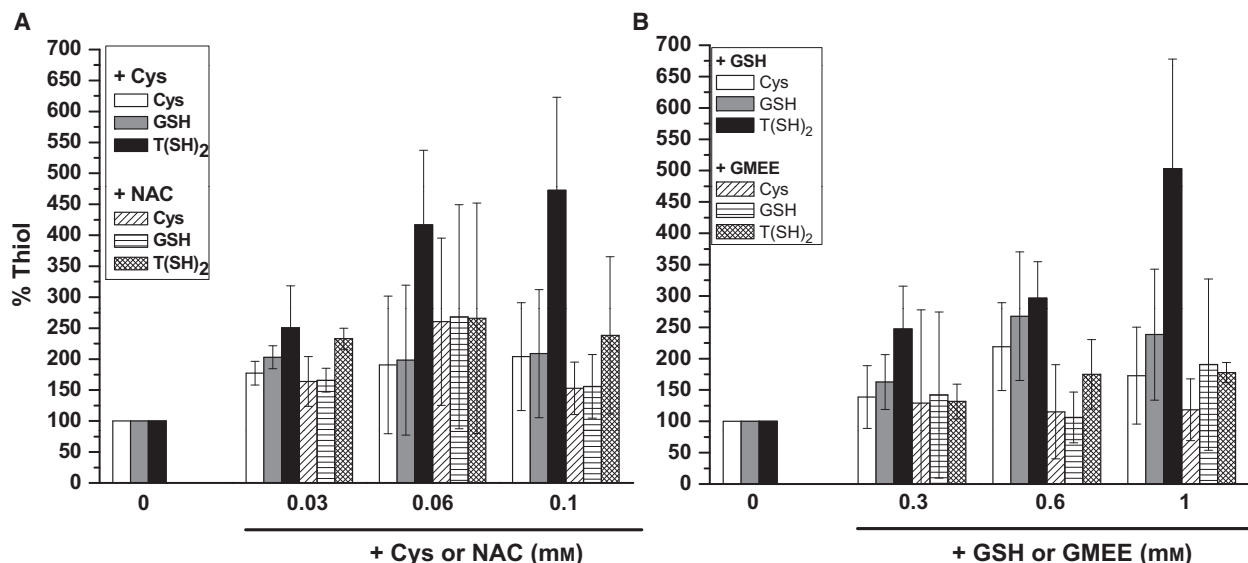


Fig. 3. Effect of different thiol suppliers on the thiol intracellular contents in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Parasites were supplemented with the indicated concentrations of (A) Cys or the permeable NAC; and (B) GSH or GMEE. After 24 h, the parasites were harvested and the intracellular thiol contents were determined by HPLC. One hundred percent thiol was equivalent to Cys, 4.2 ± 1.8 ; GSH, 6.9 ± 1 ; T(SH)₂, 4.3 ± 1.6 nmol·(mg protein)⁻¹ ($n = 5$).

T(SH)₂ level was not further increased by 5 mM external GSH (data not shown). In contrast, GMEE increased the T(SH)₂ pool by only 75% (Fig. 3B). Perhaps the ethyl group of GMEE was not efficiently removed by the parasite esterases, preventing its covalent binding to Spd by TryS.

A concentration of 1 mM GSH was chosen for supplementing the parasites in the presence of increasing concentrations of DL-(S,R)-BSO. At inhibitor concentrations lower than 0.5 mM, the GSH content was up to 80% higher than in control and Cys-supplemented cells; however, this did not prevent the gradual decrease in the T(SH)₂ levels (Fig. 2 right panel). It has been reported that TryS from several trypanosomatids are potently inhibited by GSH (reviewed in [4]). However, as shown in Fig. S2 and previously reported [18], TryS from *T. cruzi* is inhibited by GSH at very high, nonphysiological concentrations (Ki_{GSH} : 7.5–11.2 mM) which are not reached under any of the conditions tested in Fig. 2 (at most 1.8 mM in the GSH-supplemented parasites in the absence of inhibitor). Hence, the decreased T(SH)₂ level in the DL-(S,R)-BSO-treated parasites originated from the BSO inhibitory effect on TryS rather than from metabolic inhibition of TryS by GSH.

On the other hand, the levels of Put and Spd did not significantly change in the parasites supplemented with Cys and GSH in the absence or presence of the inhibitor (Fig. S3), ruling out a BSO effect on the polyamine

supply required for T(SH)₂ synthesis. However, in non-thiol-supplied cells in the presence of the inhibitor, the polyamine contents showed a tendency to accumulate, as expected from an inhibited T(SH)₂ synthesis.

Effect of DL-(S,R)-BSO on the enzymes present within the parasites

It was next determined whether DL-(S,R)-BSO actually inhibited the GSH and T(SH)₂ syntheses enzymes within the parasites. Since no reliable determinations of γ ECS and TryS activities in wild-type cells can be attained due to their low activities and high levels of an interfering ATPase activity, *T. cruzi* epimastigotes were transfected with plasmids allowing the overexpression of these enzymes. The enzyme activities were determined in the parasites exposed for 24 h to 3 mM DL-(S,R)-BSO. The γ ECS and TryS activities were reliably determined in the overexpressing parasites, whereas GS could be determined in both wild-type and overexpressing cells. DL-(S,R)-BSO treatment brought about inhibition of γ ECS (63%) and TryS (55%) activities, whereas GS activity was not affected (Table 1).

On the other hand, the growth of wild-type cells showed higher susceptibility to DL-(S,R)-BSO in comparison to the three transfected parasites (Fig. 4). The EC₅₀ value for BSO was 3.9-fold higher in the cells overexpressing γ ECS, which correlated with their higher T(SH)₂ content (Table 2). In contrast,

Table 1. Inhibition of γ ECS, GS and TryS activities in parasites exposed to DL-(S,R)-BSO.

Cell type	γ ECS activity ^a			GS activity ^a			TryS activity ^a		
	Control	Activity after 3 mM BSO	% inhibition	Control	Activity after 3 mM BSO	% inhibition	Control	Activity after 3 mM BSO	% inhibition
Wild-type	< 2	–	–	3.8 ± 1.3	4 ± 2	0	< 2	–	–
Mock	< 2	–	–	7.3 ± 3.6	8.9 ± 2.8	0	< 2	–	–
oe- γ ECS	23 ± 15	8.5 ± 3.1	63 ± 14	9.3 ± 2.1	9.2 ± 3.3	0	< 2	–	–
oe- TryS	< 2	–	–	8.7	11.9	0	47 ± 8	21 ± 2	55 ± 4

^aActivity in nmoles·(min × mg of cell protein)⁻¹. < 2 means below the limit of detection of activity after subtracting the ATPase activity present in the cell preparation. *n* = 2–4 soluble fractions from independent cell cultures.

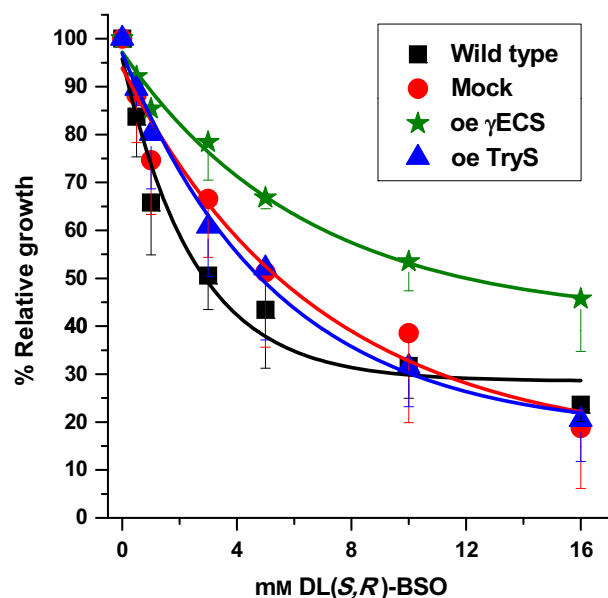


Fig. 4. Effect of DL-(S,R)-BSO on parasite growth of wild-type and transfected epimastigotes. Epimastigotes of the *Trypanosoma cruzi* Querétaro strain were transfected with pTREXn plasmid (mock) or plasmid allowing γ ECS or TryS overexpression. Control and transfected epimastigotes were treated with the indicated DL-(S,R)-BSO concentrations for 24 h after which the cell number was determined. The EC₅₀ on parasite growth (Table 2) was determined as described in the material and methods section. For clarity, only one side of the SD value is shown. The experimental data were fitted to an exponential decay equation, but no mechanistic implications were meant.

overexpressing TryS cells showed nonsignificant higher resistance than wild-type and mock cells (Table 2). A puzzling observation was that the latter cells showed higher Cys, GSH, and T(SH)₂ levels than wild-type and overexpressing (oe)-TryS cells, probably due to off-side effects. Nevertheless, after 3 mM DL-(S,R)-BSO treatment, undetectable levels of T(SH)₂ were found in all cell types despite the presence of high GSH levels (Table 2).

Table 2. Effect of DL-(S,R)-BSO on growth and thiol contents of wild-type and transfected parasites overexpressing γ ECS and TryS.

Cell type	EC ₅₀ on cell growth (mM)	Thiols without inhibitor (nmol·(mg cell prot) ⁻¹)			Thiols + 3 mM inhibitor (nmol·(mg cell prot) ⁻¹)		
		Cys	GSH	T(SH) ₂	Cys	GSH	T(SH) ₂
Wild-type	3.3 ± 1.4	3.8	8.5	2.4	4.4	5.8	ND
Mock	6.3 ± 3*	6.3	12.6	3	4.4	8.6	ND
oe γ ECS	13 ± 4**	5.7	16.2	4.4	5.8	10	ND
oe-TryS	4.9 ± 1.7	5.6	13.3	2.6	4.8	5.7	ND

For EC₅₀ values *n* = 3–5 independent cell cultures. The statistical analysis used for EC₅₀ was two-tailed Student's *t*-test: **P* < 0.05, ***P* < 0.001 vs. wild-type. For thiol contents *n* = 2 independent cell cultures, ND means below the limit of detection of 0.6 nmol thiol·(mg cell protein)⁻¹.

Effect of different BSO isomers on recombinant enzymes of T(SH)₂ synthesis

The type of inhibition mechanism of different BSO isomers was further analyzed. The mixture of the four isomers DL-(S,R)-BSO directly added to the enzyme assays did not inhibit recombinant *T. cruzi* TryS activity; hence, the enzyme was preincubated with the inhibitor. It was first determined that TryS preincubation at 37 °C for 30 min or at 28 °C for 1.5 h in the absence of inhibitor induced significant loss of its activity; however, incubation at 4 °C for up to 6 h was not detrimental, although at longer times, activity was lost (Fig. S4A). Hence, a protocol of 6-h incubation at 4 °C was selected for testing the DL-(S,R)-BSO effect on the three recombinant enzymes. The DL-(S,R)-BSO mixture did not inhibit GS, whereas a pattern of partial inhibition on γ ECS and TryS was observed (Fig. 5A).

Subsequently, the effect of only two of the BSO stereoisomers, the L-(S,R)-BSO mixture, was determined on the recombinant enzymes (Fig. 5B–F). These

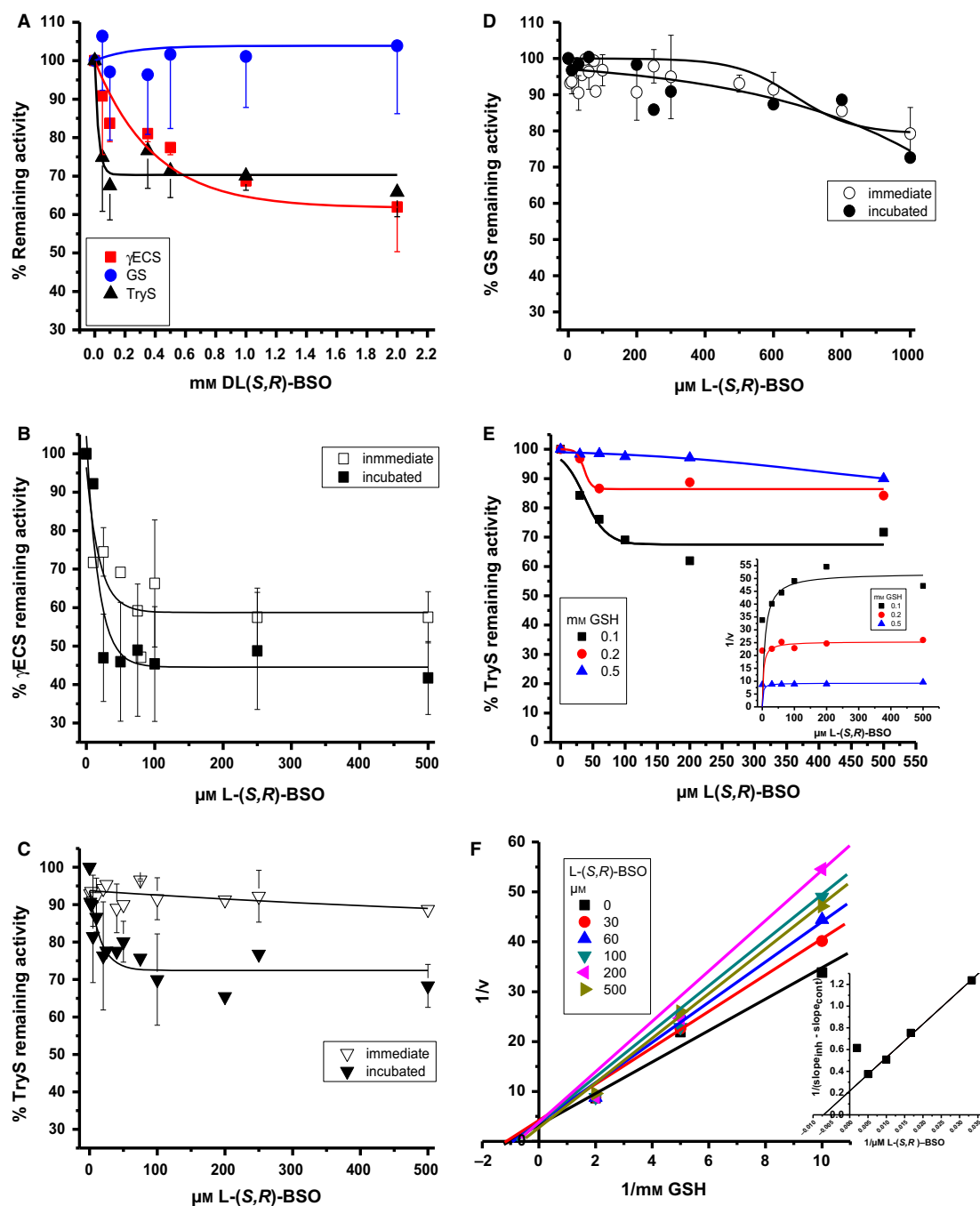


Fig. 5. Effect of BSO isomers on recombinant γ ECS, GS, and TryS. (A) The recombinant enzymes were incubated for 6 h at 4 °C with different DL-(S,R)-BSO concentrations and the remaining activity was determined as described in the material and methods section. One hundred percent activities ($\mu\text{moles} \cdot (\text{min} \times \text{mg protein})^{-1}$) at 37 °C were 0.5 ± 0.16 ($n = 3$) for γ ECS, 4.1 ± 2.3 ($n = 3$) for GS, and 1.5 ± 0.7 ($n = 5$) for TryS. For clarity, the experimental data were fitted to an exponential decay equation, but no mechanistic implications were meant and only one side of the SD is shown. (B, C, and D) Inhibition of L-(S,R)-BSO on γ ECS, TryS, and GS, respectively. The inhibitor was directly added to the standard enzymatic assay (immediate inhibition) or the enzyme was preincubated with the inhibitor for 1 h at 4 °C and later the remaining activity was assayed in the standard enzymatic assay at 37 °C (preincubated). One hundred percent activities ($\mu\text{moles} \cdot (\text{min} \times \text{mg protein})^{-1}$) at 37 °C were 0.7 ± 0.3 ($n = 6$) for γ ECS, 1.6 ± 0.3 ($n = 6$) for GS, and 2 ± 0.8 ($n = 6$) for TryS. (E) Representative plot of the effect of L-(S,R)-BSO on TryS at variable GSH concentrations. Inset: Dixon plot showing that the inhibitor is a partial inhibitor against GSH (the curves fit to a hyperbola) [22]. (F) Double reciprocal plot of the experiment in E showing that BSO is competitive against GSH. Inset: the intersect on the X axis of the plot of the double reciprocal slopes against inhibitor is equivalent to $-1/K_{\text{app}}$ [22].

forms of the inhibitor were more potent and allowed to determine their effect in the enzymatic assay without enzyme preincubation. As a control, it was determined that the enzyme activities were not significantly altered (Fig. S4B) during the duration of the reaction assay (up to 15 min) in the absence of BSO.

Gamma-glutamylcysteine synthetase was ~40% partially inhibited when L-(S,R)-BSO was directly added to the enzymatic assay; this inhibition was increased to 60% when the enzyme was preincubated with the inhibitor for 1 h (Fig. 5B). For TryS, L-(S,R)-BSO proved to be a weaker partial inhibitor, attaining only 10% inhibition in the immediate reaction but reaching 30% inhibition when the enzyme was preincubated for 1 h (Fig. 5C). At the lowest remaining inhibitor concentration of 2 μM , the enzyme was more inhibited than in the immediate reaction, which suggested a low-affinity constant value for the inhibitor or an irreversible inhibition. In contrast, GS inhibition by L-(S,R)-BSO was observed at concentrations higher than 1 mM of the inhibitor in both the immediate or preincubated protocols (Fig. 5D).

The L-(S,R)-BSO inhibition on TryS assayed without preincubation and at variable GSH concentrations (Fig. 5E) showed higher inhibitory effect at low GSH concentration. Double reciprocal (Fig. 5F) and Dixon plots (insets in Fig. 5E,F) data analyses [22] indicated

that L-(S,R)-BSO is a partial competitive inhibitor against GSH, with a $K_{i\text{app}}$ value of $171 \pm 65 \mu\text{M}$ ($n = 3$).

Modeling BSO binding to TcTryS

A three-dimensional model of TryS from *T. cruzi* (*TcTryS*) was obtained with validation parameters described in Fig. S5. The highest identity of the enzyme was obtained with the crystal structure of *L. major* TryS (*LmTryS*; PDB: 2VOB) [24] with an amino acid sequence identity of 57.8% and a protein sequence coverage of 99%. Structural alignment of the *TcTryS* model and *LmTryS* crystal structure overlapped almost perfectly (Fig. 6A). A previous structure superposition analysis of *LmTryS* and glutathionylspermidine synthetase amidase from *E. coli* [24] indicated that the GSH-binding site in the synthetase domain of *LmTryS* was a groove formed by residues R328, S349, S351, D403, E407, E408, M459, and S462. In the *TcTryS* model, the groove was formed by residues R316, S337, S339, D391, D395, E396, M447, and T450 (Fig. 6B).

Docking analysis indicated that GSH may indeed bind to this groove in the *TcTryS* (theoretical $K_d = 1.52 \text{ mM}$; Fig. 6C). The majority of these residues were conserved with respect to *LmTryS*, except for D395 and T450 which were Glu and Ser, respectively, in the *L. major* enzyme. Furthermore, docking analysis

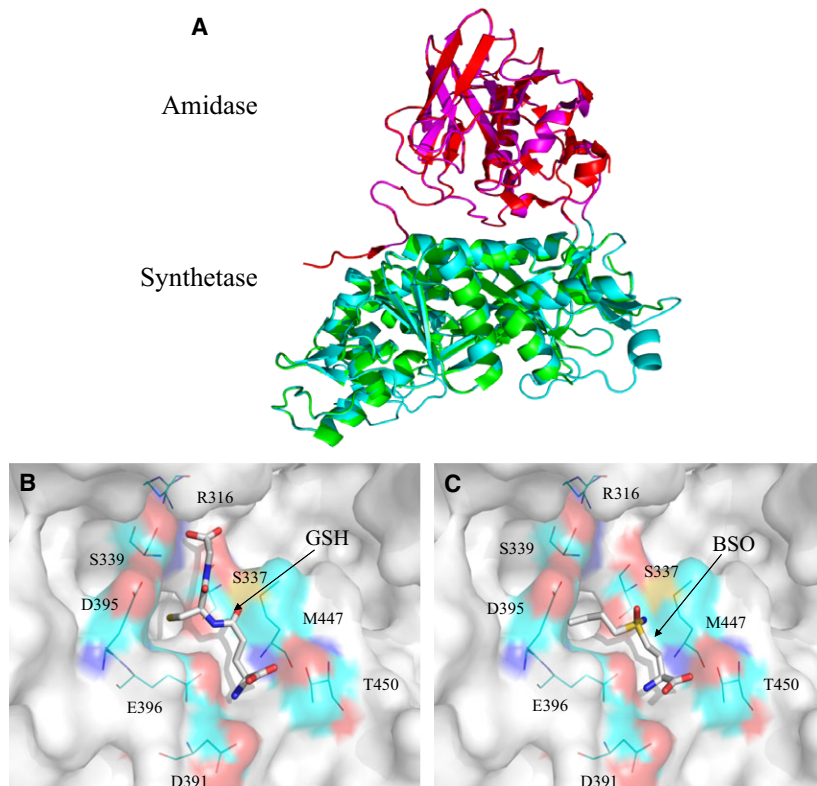


Fig. 6. Docking analysis of BSO on *Trypanosoma cruzi* TryS. Three-dimensional model of *T. cruzi* TryS. The model was obtained as described under the Materials and Methods section. Panel A shows a structural alignment of the *TcTryS* model with the structure of *Leishmania major* (*LmTryS*; PDB: 2VOB). Amidase and synthetase domains are shown in magenta and cyan, and red and green, for *TcTryS* model and *LmTryS* structure, respectively. Panel B shows docking results of GSH in the *TcTryS* model (calculated binding energy $-3.85 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$; theoretical K_d of 1.52 mM). Panel C shows docking results of L-BSO in the active site of *TcTryS* (calculated binding energy $-4.58 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, theoretical K_i $439 \mu\text{M}$). GSH and BSO are shown as sticks colored by elements. The equivalent residues proposed to interact with GSH in *LmTryS* are labeled and indicated by lines colored by elements with the carbon backbones in cyan, N in blue, O in red and S in yellow.

with L-BSO indicated that it may bind to the groove proposed for GSH binding (Fig. 6C). In the *TcTryS* model, the sulfoximine moiety is stabilized by residues D391, E396, M447, and T450 which also stabilize the gamma-glutamyl moiety of GSH (Fig. 6C), while the butyl group of BSO is stabilized in a hydrophobic patch formed by the carbon backbones of A338, S339, D395, E396, T399, and T445. These model predictions suggested that BSO binds to the GSH-binding site and were in agreement with the kinetic analysis.

Discussion

γ ECS and TryS activity inhibition by BSO

The T(SH)₂ depletion induced by BSO and inability of external GSH supply to fully restore its level cannot be explained by exclusive BSO inhibition on γ ECS. The supplementation experiments with Cys and GSH (to circumvent the controlling role of γ ECS on the GSH pool) and enzyme activity determinations within the parasites treated with BSO allowed to elucidate that the changes in the T(SH)₂ contents induced by BSO were mediated by inhibition of γ ECS as well as TryS. Furthermore, the results of the kinetic analysis on the recombinant enzyme and docking analysis in a 3D model suggested that BSO competes with GSH for the GSH-binding site in TryS. To our knowledge this is the first report showing that TryS can be inhibited *in vitro* and *in vivo* by BSO; hence, a consequence of the unspecific action of BSO is that it targets the two main controlling enzymes of T(SH)₂ synthesis in the parasite [18].

Thiol metabolite supply and BSO multitarget inhibition in *T. cruzi*

Due to limitations in obtaining high amounts of the trypomastigote and amastigote forms for metabolic analyses, the present work was carried out with the epimastigote stage of the parasite. However, a higher susceptibility to BSO can be predicted in the human infective forms since they have approximately half the thiol contents than the epimastigote form [13,34]. On the other hand, Cys and GSH external supply may have physiological meaning, besides being used as a methodological strategy. When *T. cruzi* trypomastigotes and amastigotes infect host cells they get access to higher Cys and GSH concentrations, for example, in cells (1–8 mM GSH), rat liver mitochondria (5–10 mM), kidney (4.2 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$), liver (7.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$), pancreas (2.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$), and brain 1.8 $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ [9,10,35,36] than those found in blood (0.2 mM and 2–20 μM , respectively) [29,30].

Cysteine was readily taken up by the parasites and used for T(SH)₂ synthesis; in consequence, Cys significantly accumulated when added and γ ECS was inhibited by BSO (Fig. 2). A high affinity Cys transporter ($K_{m\text{Cys}}$ of 49.5 μM , V_{max} of 13 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot 10^{-7}$ cells) has been reported for *T. cruzi* which seems to be inducible under Cys depletion and low pH [37]. Our results indirectly demonstrated that Cys transport was active in the parasites, but it was unknown whether it was induced or already expressed under the culture conditions without Cys supplementation.

Glutathione also entered the parasites promoting T(SH)₂ synthesis; however, the latter was inhibited by BSO with a different response pattern to that attained in Cys supplemented cells in the presence of the inhibitor (Fig. 2). At BSO concentrations lower than 0.5 mM, the higher levels of T(SH)₂ in the GSH-supplemented parasites in comparison to the Cys-supplemented parasites might be the consequence of (a) high GSH availability for synthesis and (b) GSH competition with BSO for binding to TryS. In contrast, when the parasites were supplemented with Cys, this amino acid is not a substrate of TryS and therefore does not compete with BSO for binding to the TryS GSH site, with the consequent drastic depletion of T(SH)₂ with 0.25 mM BSO (Fig. 2). These results supported that TryS was *in vivo* effectively inhibited by BSO, which was further demonstrated in the TryS-overexpressing parasites exposed to the inhibitor.

On the other hand, it has been proposed that GSH transport may also be inhibited by BSO [15] which cannot be ruled out in the GSH supplementation experiments. Nevertheless, at least a fraction of external GSH appeared to enter into the cells and accumulate at BSO concentrations < 0.5 mM (Fig. 2 right panel). The possibility that extracellular GSH hydrolysis functions as an external Cys supply for γ ECS cannot be ruled out either; however, since BSO also inhibits γ ECS, then the most probable source of the accounted increased intracellular GSH in the parasites was the external GSH through plasma membrane transport. Furthermore, in GSH-supplied cells, extracellular GSH degradation alone would be unable to rescue T(SH)₂ synthesis in γ ECS and growth in GS *T. brucei* down-regulated cells [15,38], indicating that GSH transport is feasible in trypanosomatids.

The GSH plasma membrane transport has not been studied in trypanosomatids; however, GSH internalization through plasma membranes can be carried out by specific GSH transporters (reviewed in [39]). GSH transporters have been biochemically detected or their presence has been indirectly shown in different cell models, like in this paper. So far, the molecular

identity of only one GSH transporter (the Hgt1p GSH transporter in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*) has been reported [40] and a GSH transporter gene has been identified only in the parasite *Plasmodium falciparum* [41]. Hence, GSH transport is an issue deserving further study in *T. cruzi*.

Effect of BSO on parasite growth

The EC₅₀ value (6.3 mM) for BSO on growth of the Mexican *T. cruzi* Querétaro strain used here was within the same order of magnitude to that previously reported (13.6 ± 0.52 mM) for the MF strain [13].

Parasites overexpressing γ ECS were 3.9-fold more resistant to BSO because they contained 10-fold higher γ ECS activity and displayed approximately twofold higher Cys, GSH, and T(SH)₂ contents than wild-type cells. In marked contrast, parasites overexpressing TryS exhibited a marginal increased resistance to BSO in comparison to WT cells and no significant increased T(SH)₂ content despite showing 25-fold increased TryS activity. A likely explanation is that, in cells with greater TryS expression and in the absence of external Cys and GSH sources, γ ECS increases its degree of control on T(SH)₂ synthesis [18] (i.e., becomes more flux-limiting due to its low basal levels of activity). Then, the similar sensitivity of the TryS transfectants to BSO in comparison to the WT cells probably derived from the deleterious effect on the pathway flux induced by the BSO inhibition on the wild-type level of γ ECS activity and the ensuing GSH limitation for TryS activity. Further analyses on a possible metabolic regulation in TryS transfectants remain to be analyzed.

Conclusion

Buthionine sulfoximine is a multitarget inhibitor of T(SH)₂ synthesis in *T. cruzi* by blocking γ ECS and TryS. Although BSO is highly toxic [9], it may serve as a lead compound for drug design studies against TryS. Since the compound induced only a partial inhibition on γ ECS and TryS and showed mainly a cytostatic effect on the parasites, BSO analogs with improved inhibitory effects could be generated. Hence, studies on therapeutic synergism of antichagasic canonical drugs such as benznidazole with BSO analogs to decrease parasite infection with less toxic effects, may be worth not to be abandoned.

Acknowledgement

This research was supported by CONACyT-Mexico grants 178638, 264292 and 272941 to ES.

Author contributions

CV, MM-T, ZG-Ch, AS, and JSR-Z performed experiments; CV, RM-S, and ES designed research, analyzed data, and wrote the paper.

References

- 1 World Health Organization (2015) Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates. *Wkly Epidemiol Rec* **90**, 33–43.
- 2 Hall BS and Wilkinson SR (2012) Activation of benzimidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob Agents Chemother* **56**, 115–123.
- 3 Maya JD, Salas CO, Aguilera-Venegas B, Diaz MV and López-Muñoz R (2014) Key proteins in the polyamine-trypanothione pathway as drug targets against *Trypanosoma cruzi*. *Curr Med Chem* **21**, 1757–1771.
- 4 Olin-Sandoval V, Moreno-Sanchez R and Saavedra E (2010) Targeting trypanothione metabolism in trypanosomatid human parasites. *Curr Drug Targets* **11**, 1614–1630.
- 5 Leroux AE and Krauth-Siegel RL (2016) Thiol redox biology of trypanosomatids and potential targets for chemotherapy. *Mol Biochem Parasitol* **206**, 67–74.
- 6 Irigoín F, Cibils L, Comini MA, Wilkinson SR, Flohé L and Radi R (2008) Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radic Biol Med* **45**, 733–742.
- 7 Arrick BA, Griffith OW and Cerami A (1981) Inhibition of glutathione synthesis as a chemotherapeutic strategy for trypanosomiasis. *J Exp Med* **153**, 720–725.
- 8 Griffith OW (1982) Mechanism of action, metabolism, and toxicity of buthionine sulfoximine and its higher homologs, potent inhibitors of glutathione synthesis. *J Biol Chem* **257**, 13704–13712.
- 9 Griffith OW (1999) Biologic and pharmacologic regulation of mammalian glutathione synthesis. *Free Radic Biol Med* **27**, 922–935.
- 10 Griffith OW and Mulcahy RT (1999) The enzymes of glutathione synthesis: gamma-glutamylcysteine synthetase. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **73**, 209–267.
- 11 Moncada C, Repetto Y, Aldunate J, Letelier ME and Morello A (1989) Role of glutathione in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to drugs. *Comp Biochem Physiol C* **94**, 87–91.
- 12 Maya JD, Rodríguez A, Pino L, Pabón A, Ferreira J, Pavani M, Repetto Y and Morello A (2004) Effects of buthionine sulfoximine nifurtimox and benzimidazole upon trypanothione and metallothionein proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Biol Res* **37**, 61–69.

- 13 Faundez M, Pino L, Letelier P, Ortiz C, López R, Seguel C, Ferreira J, Pavani M, Morello A and Maya JD (2005) Buthionine sulfoximine increases the toxicity of nifurtimox and benznidazole to *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 126–130.
- 14 Repetto Y, Opazo E, Maya JD, Agosin M and Morello A (1996) Glutathione and trypanothione in several strains of *Trypanosoma cruzi*: effect of drugs. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **115**, 281–285.
- 15 Huynh TT, Huynh VT, Harmon MA and Phillips MA (2003) Gene knockdown of gamma-glutamylcysteine synthetase by RNAi in the parasitic protozoa *Trypanosoma brucei* demonstrates that it is an essential enzyme. *J Biol Chem* **278**, 39794–39800.
- 16 López-Olmos V, Pérez-Nasser N, Piñero D, Ortega E, Hernandez R and Espinoza B (1998) Biological characterization and genetic diversity of Mexican isolates of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* **69**, 239–254.
- 17 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265–275.
- 18 Olin-Sandoval V, González-Chávez Z, Berzunza-Cruz M, Martínez I, Jasso-Chávez R, Becker I, Espinoza B, Moreno-Sánchez R and Saavedra E (2012) Drug target validation of the trypanothione pathway enzymes through metabolic modeling. *FEBS J* **279**, 1811–1833.
- 19 Vázquez MP and Levin MJ (1999) Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene* **239**, 217–225.
- 20 Lugo-Caballero C, Ballesteros-Rodea G, Martínez-Calvillo S and Manning-Cela R (2013) Identification of protein complex associated with LYT1 of *Trypanosoma cruzi*. *Biomed Res Int* **2013**, 493525.
- 21 Studier FW (2005) Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr Purif* **41**, 207–234.
- 22 Segel IH (1975) *Enzyme Kinetics*. Wiley, New York.
- 23 Bordoli L, Kiefer F, Arnold K, Benkert P, Battey J and Schwede T (2009) Protein structure homology modelling using SWISS-MODEL Workspace. *Nat Protoc* **4**, 1–13.
- 24 Fyfe PK, Oza SL, Fairlamb AH and Hunter WN (2008) *Leishmania* trypanothione synthetase-amidase structure reveals a basis for regulation of conflicting synthetic and hydrolytic activities. *J Biol Chem* **283**, 17672–17680.
- 25 Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS and Olson AJ (2009) AutoDock 4 and AutoDockTools 4: automated docking with selective receptor flexibility. *J Comput Chem* **30**, 2785–2791.
- 26 Huey R, Morris GM, Olson AJ and Goodsell DS (2007) A semiempirical free energy force field with charge-based desolvation. *J Comp Chem* **28**, 1145–1152.
- 27 Fell DA (1997) *Understanding the Control of Metabolism*. Portland Press, London.
- 28 Moreno-Sánchez R, Saavedra E, Rodríguez-Enríquez S and Olin-Sandoval V (2008) Metabolic control analysis: a tool for designing strategies to manipulate metabolic pathways. *J Biomed Biotechnol* **2008**, 597913.
- 29 Pastore A, Massoud R, Motti C, Lo Russo A, Fucci G, Cortese C and Federici G (1998) Fully automated assay for total homocysteine, cysteine, cysteinylglycine, glutathione, cysteamine, and 2-mercaptopropionylglycine in plasma and urine. *Clin Chem* **44**, 825–832.
- 30 Psychogios N, Hau DD, Peng J, Guo AC, Mandal R, Bouatra S, Sinelnikov I, Krishnamurthy R, Eisner R, Gautam B *et al.* (2011) The human serum metabolome. *PLoS ONE* **6**, e16957.
- 31 Meister A (1988) On the discovery of glutathione. *Trends Biochem Sci* **13**, 185–188.
- 32 Townsend DM, Tew KD and Tapiero H (2003) The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* **57**, 145–155.
- 33 Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton RL and Turner ND (2004) Glutathione metabolism and its Implications for health. *J Nutr* **134**, 489–492.
- 34 Maya JD, Repetto Y, Agosin M, Ojeda JM, Tellez R, Gaule C and Morello A (1997) Effects of nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* **86**, 101–106.
- 35 Meister A (1995) Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochim Biophys Acta* **1271**, 35–42.
- 36 Campbell EB, Hayward ML and Griffith OW (1991) Analytical and preparative separation of the diastereomers of L-buthionine (SR)-sulfoximine a potent inhibitor of glutathione biosynthesis. *Anal Biochem* **194**, 268–277.
- 37 Canepa GE, Bouvier LA, Miranda MR, Uttaro AD and Pereira CA (2009) Characterization of *Trypanosoma cruzi* L-cysteine transport mechanisms and their adaptive regulation. *FEMS Microbiol Lett* **292**, 27–32.
- 38 Pratt C, Nguyen S and Phillips MA (2014) Genetic validation of *Trypanosoma brucei* glutathione synthetase as an essential enzyme. *Eukaryot Cell* **13**, 614–624.
- 39 Bachhawat AK, Thakur A, Kaur J and Zulkifli M (2013) Glutathione transporters. *Biochim Biophys Acta* **1830**, 3154–3164.
- 40 Bourbouloux A, Shahi P, Chakladar A, Delrot S and Bachhawat AK (2000) Hgt1p, a high affinity glutathione transporter from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**, 13259–13265.

41 Patzewitz EM, Salcedo-Sora JE, Wong EH, Sethia S, Stocks PA, Maughan SC, Murray JA, Krishna S, Bray PG, Ward SA *et al.* (2013) Glutathione transport: a new role for PfCRT in chloroquine resistance. *Antioxid Redox Signal* **19**, 683–695.

Supporting information

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article:

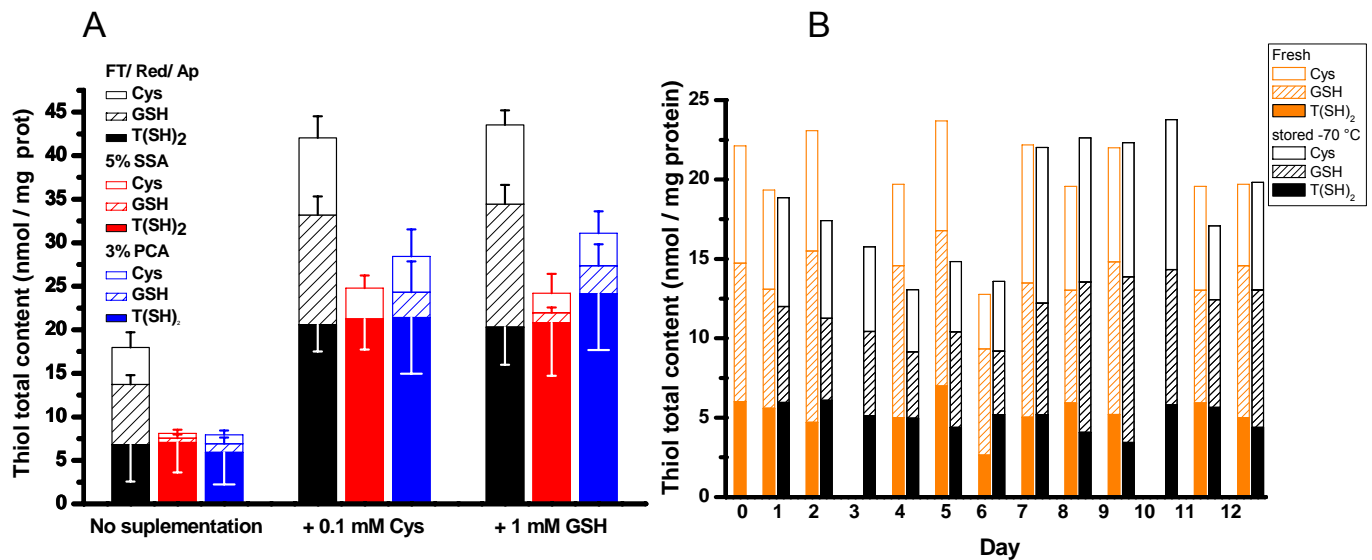
Fig. S1. Performance of the thiol determination protocol.

Fig. S2. *Trypanosoma cruzi* TryS inhibition by GSH.

Fig. S3. Effect of DL-(*S,R*)-BSO BSO on polyamine contents in epimastigotes.

Fig. S4. Stability of recombinant TryS at different temperatures.

Fig. S5. Validation results of the three-dimensional model of TryS from *Trypanosoma cruzi*.



Thiol	nmol/mg cell prot	
	Fresh cells	Stored cells
Cys	6.5 ± 1.5	6.9 ± 2.6
GSH	8.6 ± 1.3	7.1 ± 2.8
T(SH) ₂	5.3 ± 1.1	5 ± 0.8

Fig. S1. Performance of the thiol determination protocol

A) Performance of different intracellular thiol extraction protocols.

The parasites were grown in the absence or presence of the indicated Cys or GSH concentrations. After 24 h, the cells were harvested, washed twice and resuspended in lysis buffer and further processed for thiol extraction following one of the next protocols: (1) cell lysis by freezing and thawing, reduction with sodium borohydride and perchloric acid extraction (FT/Red/AP; black bars); (2) immediate cell lysis with sulfosalicylic acid (5% SSA; red bars); and (3) immediate cell lysis with perchloric acid (3% PCA; blue bars). Thiols were determined by HPLC. See material and methods section for details. n= 5 individual cell cultures. For clarity, only one side of the SD is shown. In the SSA protocol, no GSH could be determined in any sample.

B) Thiol stability in fresh vs. stored cell samples.

A culture of non-thiol-supplemented parasites in the log growth phase was harvested, washed, separated in aliquots and stored at -70°C. One aliquot *per* day in parallel with an aliquot of daily and freshly harvested parasites were extracted with the freezing-thawing/reduction/acid precipitation protocol for thiol determination. Thiol determination was performed by HPLC as described in the Methods section. The Table shows the average thiol content at the end of the procedure.

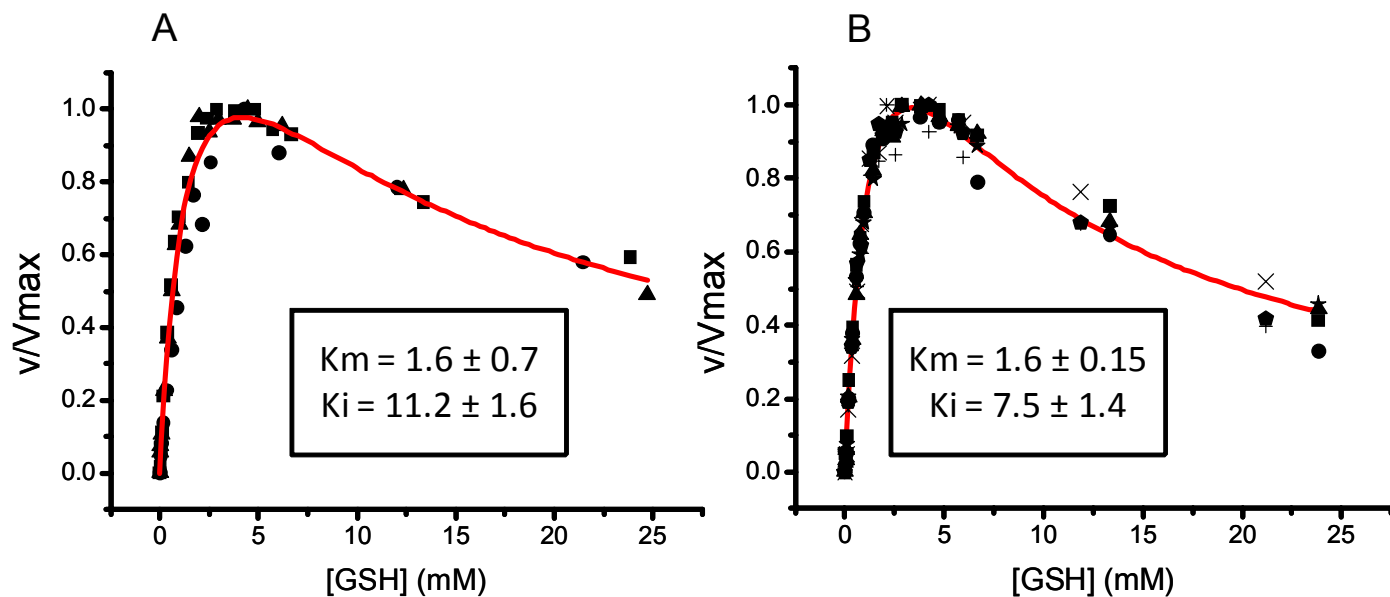


Fig. S2. *T. cruzi* TryS inhibition by GSH

TryS saturation curves for GSH were performed with A) recombinant purified enzyme and B) soluble cytosolic-enriched extract of TryS overexpressing parasites using saturating co-substrate concentration (11 mM Spd, 2 mM ATP, 5 mM MgSO₄). GSH was freshly prepared and calibrated with DTNB in 100 mM Na₂HPO₄ pH 8.0 buffer. Different independent preparations were used (3 independent purification in A, 7 soluble cell fractions in B), and because of a difference in the V_{max} values, the Y axis was normalized by dividing the rate value (v) by the highest rate value obtained in each assay. The curves were fitted to the substrate-inhibition equation $v = (V_{max} \cdot S) / ((K_m + S + (S^2 / K_i)))$ using the Origin Microcal software.

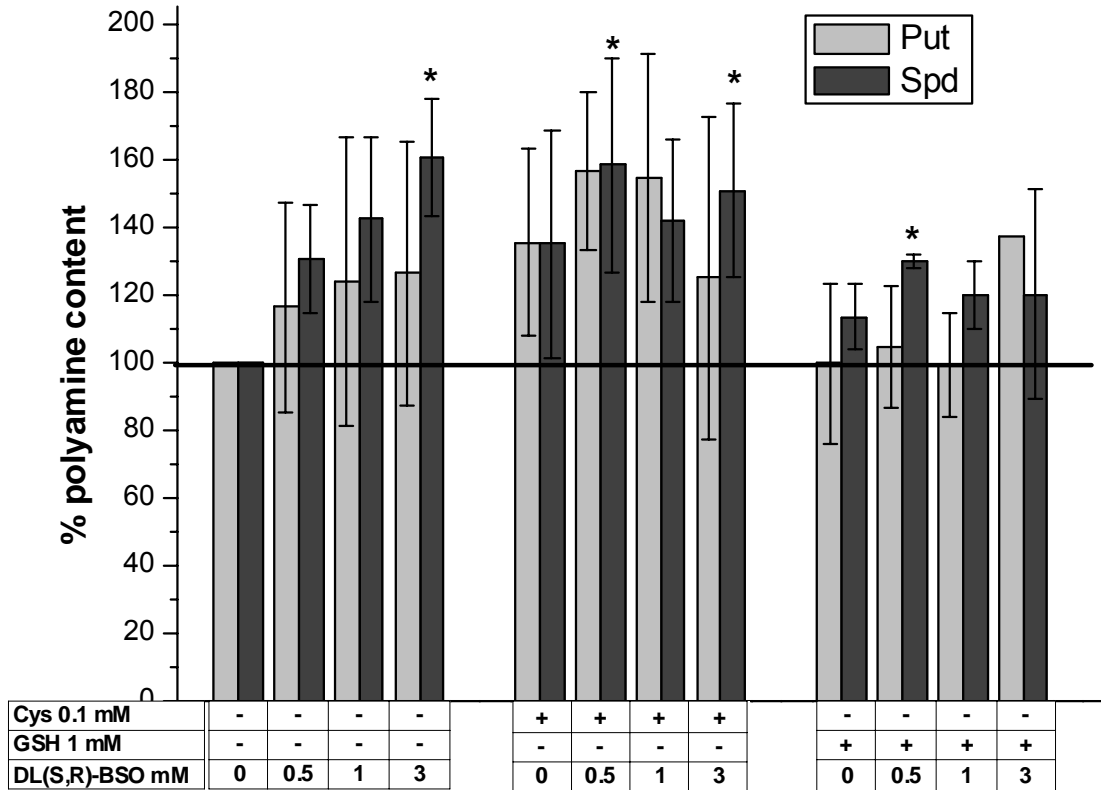


Fig. S3. Effect of DL-(S,R)-BSO BSO on polyamine contents in epimastigotes

Epimastigotes were treated with the indicated DL-(S,R)-BSO concentrations in the absence or presence of 0.1 mM external Cys or 1 mM external GSH and after 24 h the polyamine content was determined by HPLC. 100% polyamine (nmol/mg cell protein) was equivalent to 9.7 ± 3.4 (n=3) for Put and 4.7 ± 1.2 (n=3) for Spd. The inhibition assays were performed in at least three independent parasite cultures. The statistical analysis used was two-tailed Student's t- test $*p \leq 0.05$

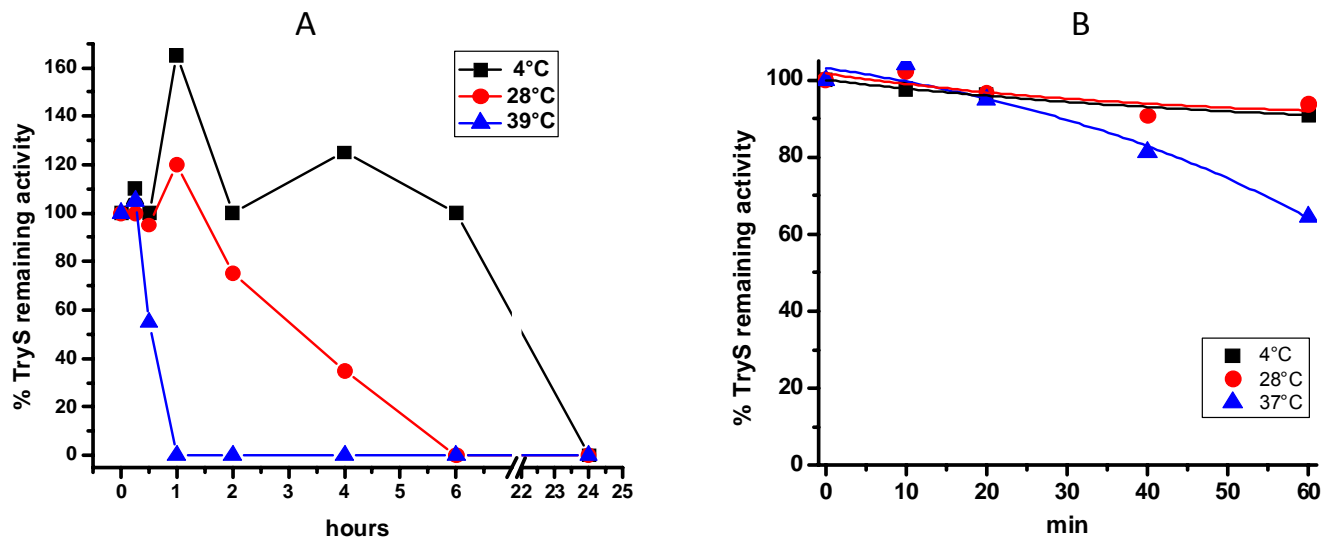


Fig. S4. Stability of recombinant TrypS at different temperatures


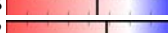



A) Aliquots of recombinant enzyme were incubated in the enzymatic assay buffer at the indicated temperatures and times. Afterwards the enzyme activity was determined by the standard enzymatic assay at 37°C. B) The enzyme was preincubated at the indicated min and temperatures and later the activity was determined by the standard enzymatic assay at 37°C.

A Model Parameters

Template	2VOB
Sequence Identity	57.81%
Sequence Similarity	48%
Sequence Coverage	99%
Oligomerization State	Monomer
GMQE	0.76
QMEAN Z-score	-1.64

GMQE, Global Model Quality Estimation,
QMEAN, Qualitative Model Energy Analysis

B Global quality results

QMEAN	-1.64	
C β	-1.58	
All Atom	-1.12	
Solvation	-0.20	
Torsion	-1.25	

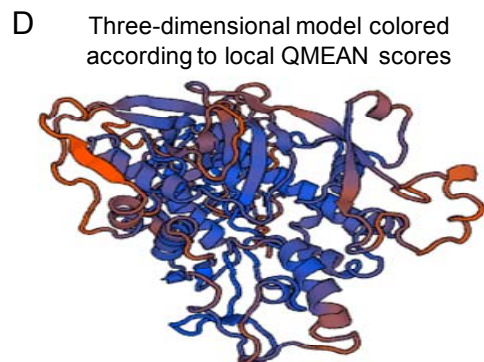
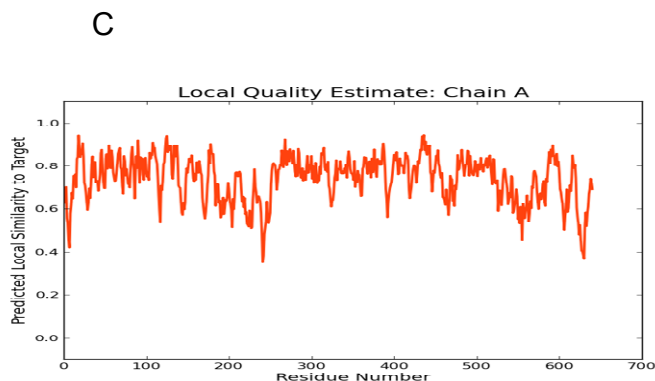


Fig. S5 Validation results of the three-dimensional model of TryS from *T. cruzi*

The results of the model quality evaluation were obtained from the SWISS MODEL server modelling report. A) model parameters; B) model QMEAN evaluation results; C and D, local quality evaluation results. In D, the residues are colored by local QMEAN scores. Although some regions of low quality are observed in the model (red areas), they are located in the structure periphery, distant from the active site, which is centered in the perspective shown.