

La glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) como blanco molecular contra *Trypanosoma cruzi*

LUCÍA CABILLÓN ⁽¹⁾, YEMINA CORREA ^(1*), VALERIA DE AGOSTINI ^(1*), BELÉN DOTTI ⁽¹⁾, NOELIA LOPEZ ⁽¹⁾, MICHEL MASSA ⁽¹⁾, AGUSTINA SILVA ^(1*), ILEANA CORVO ⁽²⁾, LÍA RANDALL ⁽²⁾

(1) Estudiante de Medicina, Ciclo de Metodología Científica II, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay.

La contribución en la realización del trabajo fue equivalente a la de los demás estudiantes.

*Participaron en la adaptación de la monografía para su publicación en la revista.

(2) Docente supervisor. Laboratorio de I+D de Moléculas Bioactivas, Departamento de Ciencias Biológicas, Centro Universitario Regional Litoral Norte, Universidad de la República, Paysandú, Uruguay.

Ciclo de Metodología Científica II 2023, Grupo 115.

RESUMEN

La enfermedad de Chagas es la manifestación de la infección sistémica y crónica causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, actualmente considerada endémica en América. El tratamiento actual se basa en dos fármacos: Nifurtimox y Benznidazol. Ambos presentan una elevada toxicidad produciendo efectos secundarios severos, siendo un tratamiento complicado y poco accesible, ya que requiere de tiempos prolongados y altos costos. Por otra parte, tampoco han demostrado buena eficacia en la fase crónica y se ha evidenciado la aparición de resistencia a ambos medicamentos. Por estos motivos es de gran importancia contribuir al desarrollo de nuevos fármacos para controlar esta "enfermedad desatendida".

En este trabajo se plantea como objetivo estudiar a la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) como blanco molecular de *T. cruzi*, ya que ésta ha mostrado, en diversos estudios, ser un factor de virulencia para las formas infectivas. Esta proteína es responsable de catalizar la primera reacción de la vía de las pentosas fosfato, generando NADPH, ribosa-5-fosfato e intermediarios de la glicólisis. Por tanto, las moléculas capaces de inhibir esta enzima crucial para el metabolismo del parásito constituyen potenciales fármacos a explorar para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

Palabras clave: Trypanosoma cruzi, glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, enfermedad de Chagas, vía de las pentosas fosfato

ABSTRACT

Chagas disease is a systemic and chronic infection caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, currently considered endemic in America. The current treatment is based on two drugs: Nifurtimox and Benznidazol. Both of them present high toxicity, producing severe side effects, being a complicated and little accessible treatment, since it is long and expensive. Current drugs have not demonstrated good efficacy in the chronic phase either, and the emergence of resistance to both of them has been reported. For these reasons, it is of great importance to contribute to the development of new drugs to control this "neglected disease." In this work, the enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) was tested as a molecular target of *T. cruzi*, since it was shown to be a virulence factor for the infective forms. This protein catalyzes the first reaction of the pentose phosphate pathway, generating NADPH, ribose-5-phosphate and glycolysis intermediates. Therefore, the molecules capable of inhibiting this crucial enzyme constitute potential drugs for the treatment of Chagas disease.

Key words: Trypanosoma cruzi, glucose-6-phosphate dehydrogenase, Chagas disease, pentose phosphate pathway

INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas, al igual que la tripanosomiasis africana y la leishmaniasis, pertenecen a un grupo de enfermedades denominadas “enfermedades desatendidas”, que a pesar de afectar a más de 100 millones de personas en el mundo y generar grandes pérdidas económicas debido a su alta morbilidad, no reciben el apoyo necesario para lograr ser erradicadas⁽¹⁾. Los tratamientos disponibles actualmente tienen limitaciones, y existe poco interés de la industria farmacéutica en generar nuevos fármacos más efectivos y con menos efectos adversos, por no asociar beneficio económico⁽²⁾. La enfermedad de Chagas, considerada endémica en América, es la manifestación de la infección sistémica y crónica causada por el parásito *Trypanosoma cruzi*, un protozoario flagelado perteneciente a la familia de los tripanosomatídeos, con un ciclo de vida complejo que involucra diferentes hospedadores⁽³⁾. Existen diversas formas de transmisión (congénita o vertical, transfusional o por trasplante de órganos), siendo la principal la vectorial a través de insectos hematófagos de la familia de los triatomíneos, conocidos como vinchucas. Los mismos se asientan en viviendas de barro o paja. En Uruguay se eliminó la transmisión vectorial desde el año 1997^(4, 5), permaneciendo la transmisión vertical. Las manifestaciones clínicas pueden ser muy heterogéneas y varían de acuerdo a factores del hospedero, del parásito y de su interacción. Se divide en dos fases: aguda y crónica. La primera presenta una elevada parasitemia, y puede durar de 4 a 8 semanas. Usualmente es asintomática aunque se puede manifestar por síntomas generales como fiebre, fatiga, erupción, taquicardia, cefalea, pérdida de apetito, náuseas, vómitos o diarrea, y puede observarse la aparición de una lesión conocida como Chagoma⁽⁶⁾. Durante la fase crónica, los síntomas son el resultado de la afección de nervios craneales y periféricos, con destrucción de las células nerviosas ganglionares y otras anomalías, lo que determina alteraciones en diferentes órganos, tales como arritmias, falla cardíaca, dificultad en la deglución, dolor abdominal, constipación, entre otros⁽⁷⁾. En cuanto a las manifestaciones neurológicas puede haber cambios cognitivos, convulsiones, hemiparesia y afasia⁽⁸⁾. Se pueden desarrollar visceromegalias y disfunción de los órganos afectados, que además de perjudicar la calidad de vida pueden llegar a ser mortales para el paciente⁽²⁾. El tratamiento para la enfermedad de Chagas se basa en dos pilares: el control de la transmisión y el uso de fármacos anti-tripanosomales⁽⁹⁾, dado que no existen vacunas disponibles⁽¹⁰⁾. Desde hace más de 60 años los fármacos que se utilizan como tratamiento son nitroheterocíclicos: Nifurtimox y Benznidazol. Estos fármacos presentan baja efectividad, alta toxicidad, resistencia y múltiples efectos secundarios⁽¹¹⁾. Ambos están contraindicados en el embarazo y en pacientes con insuficiencia hepática y renal. En pacientes inmunocompetentes están indicados en Chagas agudo, y en inmunocomprometidos se debe iniciar el tratamiento de forma inmediata, sin

importar la fase, para detener la multiplicación parasitaria y su diseminación hacia los tejidos. Otro problema de este tratamiento es su larga duración (al menos 60 días), que afecta la adherencia al mismo y acarrea mayores efectos adversos⁽¹²⁾. Diversos estudios indican el rol fundamental del metabolismo basado en la glucosa en *T. cruzi*, el cual se basa en la vía glucolítica y la vía de las pentosas fosfato, siendo el primer paso de esta última la conversión de glucosa-6-fosfato (G6P) en 6-fosfogluconato, con la reducción de NADP⁺ a NADPH a cargo de la enzima glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (G6PDH)⁽¹³⁾. La G6PDH es una proteína homodimérica que se encuentra en un equilibrio monómero-dímero-tetrámero, altamente dinámico que depende de las condiciones de pH, fuerza iónica del medio, sustratos y productos⁽¹⁴⁾. Las diferencias estructurales en el sitio catalítico entre la enzima humana y la de *T. cruzi*, sugieren que sería plausible el descubrimiento de inhibidores específicos para TcG6PDH⁽¹⁵⁾. En estudios previos se ha reportado afinidad alostérica de la G6PDH por moléculas esteroideas⁽¹⁶⁾. Entre ellas, la epiandrosterona (EA), la dihidroepiandrosterona (DHEA) y derivados modificados como 16 β -BrEA y 16 β -BrDHEA, que muestran mayor actividad inhibitoria y mayor selectividad frente a la enzima del parásito en relación con la enzima humana⁽¹⁷⁾. Se han descrito derivados de la EA efectivos contra las formas intracelulares del parásito, sugiriendo que estas moléculas podrían matar al parásito en la etapa crónica de la enfermedad⁽¹⁸⁾. En un trabajo previo del Laboratorio de Moléculas Bioactivas se sintetizaron compuestos simples con potencial antiparasitario a partir de estructuras que derivan de esteroides naturales y se reportaron 6 moléculas activas⁽¹⁹⁾. El derivado más activo, el compuesto 1260 (Figura 1), mostró una IC₅₀ de 1,2 y 0,2 μ M en el ensayo in vitro con *T. cruzi* y *L. infantum* en cultivo, respectivamente. Asimismo, mostró actividad similar al Benznidazol y la Miltefosina en modelos in vivo en ratones de la enfermedad de Chagas y la Leishmaniasis cutánea, observándose un 60 % de reducción de la infección al ser administrado a una dosis de 50 mg/kg. Este compuesto mostró también una baja toxicidad, buen índice de selectividad y ausencia de efectos genotóxicos, por lo que resulta un compuesto prometedor para el desarrollo de fármacos antitripanosomatídeos⁽¹⁹⁾.

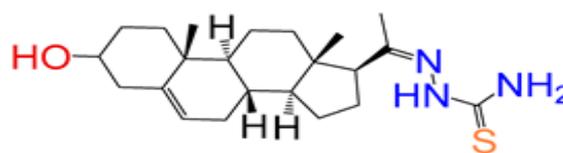


Figura 1. Estructura del compuesto 1260

Compuesto sintetizado a partir de estructuras que derivan de esteroides naturales

Fuente: ⁽¹⁹⁾

En base a estos antecedentes, en este trabajo se plantea como objetivo expresar y purificar la TcG6PDH recombinante para evaluar si el compuesto 1260 y otros derivados activos de la familia de los esteroides sintetizados en el Laboratorio son

capaces de inhibirla, buscando contribuir a la elucidación del mecanismo de acción antiparasitario de estos compuestos.

METODOLOGÍA

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA TcG6PDH

La TcG6PDH se expresó a partir de bacterias *E. coli* Tuner (DE3) transformadas con el plásmido pET28a(+) conteniendo el gen de la TcG6PDH, gentilmente cedido por el grupo del Dr. Comini del Institut Pasteur de Montevideo. La TcG6PDH recombinante contiene una cola de histidinas en el extremo N-terminal de la proteína. Para la puesta a punto de las condiciones de expresión se utilizaron diferentes medios de cultivo con distintos tiempos y temperatura de inducción. Para la expresión en medio Terrific Broth (TB), se crecen las bacterias en un precultivo de 3 mL toda la noche a 37°C con agitación orbital a 220 rpm, en presencia de 50 µg/mL de kanamicina. Se escala el cultivo en presencia del antibiótico y se monitorea la densidad óptica (DO) a 600 nm hasta un valor de 0,6. Se añade el inductor isopropiltiogalactósido (IPTG) a una concentración final de 1 mM. Se deja el cultivo en agitación orbital a 220 rpm durante 4 h a 37°C o toda la noche a 20°C. Las bacterias se cosechan por centrifugación a 5.000 x g a 4°C durante 10 minutos, y se guarda el pellet bacteriano a -20°C hasta su lisis para la purificación de la enzima. Para la expresión de la TcG6PDH en medio de autoinducción (Triptona 1 %, extracto de Levadura 0,5 %, NaHPO₄ 500 mM, KH₂PO₄ 500 mM, NH₄Cl 1 M, Na₂SO₄ 1M, glicerol 10 %, Glucosa 1 %, Lactosa 4 %, MgSO₄ 40 mM) se realiza un precultivo en un volumen de 3 mL toda la noche a 37°C con agitación orbital a 220 rpm, con kanamicina 50 µg/mL. Se inoculan 100 µL del precultivo en 400 mL de medio de autoinducción con lactosa y kanamicina 50 µg/mL, y se deja en agitación orbital a 220 rpm y 25°C por 48 h. En cada paso de la expresión se toman alícuotas para su análisis por electroforesis desnaturante (SDS-PAGE). Se centrifuga a 3.000 x g por 3 minutos, se descarta el sobrenadante y se almacena el *pellet* bacteriano a -20°C.

PURIFICACIÓN DE TcG6PDH

El protocolo se realizó siguiendo lo descrito en Ortiz et al. 2016⁽²⁰⁾. Brevemente, se lisan las células mediante incubación con 1 mg/mL de lisozima y posterior sonicado. La fracción soluble se siembra en una columna de afinidad por níquel conectada a un cromatógrafo automatizado AktaPure (GE-HealthCare). La fracción con la proteína de interés se somete a una segunda cromatografía de gel filtración en una columna Superdex 200 10/300 GL (GE-HealthCare), se colectan las fracciones de elución y se almacenan a 4°C. Durante la lisis y purificación se toman fracciones para su análisis por SDS-PAGE.

ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS

Los resultados de la expresión y purificación se analizaron mediante electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) en geles

de acrilamida al 12 % en condiciones reductoras. Los geles se visualizaron mediante tinción con solución de azul de Coomassie.

MEDIDA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA TcG6PDH

La concentración de TcG6PDH en la fracción obtenida en la purificación se estimó a partir de la medida de Abs a 280 nm según la ecuación de Lambert Beer ($A = \epsilon \cdot C \cdot l$), donde $\epsilon_{TcG6PDH}$ (54.945 M⁻¹cm⁻¹) fue calculado teóricamente con el programa Swiss Expasy. Las medidas de actividad de TcG6PDH se realizaron en un volumen de reacción final de 150 µl en placas de 96 pocillos, monitoreando la formación de NADPH a 340 nm a 25°C en amortiguador 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,5 M NaCl y 5 mM MgCl₂. La reacción se desencadenó con la adición de glucosa-6-fosfato (G6P) y se siguió por espectrofotometría en un lector de placas con modo cinético (Varioskan®). Según se describe en Ortiz et al., 2016⁽²⁰⁾, se ensayaron diferentes concentraciones de enzima (36 nM, 121 nM, 243,7 nM) y de sustratos G6P y NADP⁺ (60 mM y 5 mM respectivamente). La velocidad inicial de la reacción se obtuvo por ajuste de la velocidad inicial de la corrida utilizando el programa OriginPro 6.1.

EVALUACIÓN DEL COMPUESTO 1260 Y DERIVADOS COMO INHIBIDORES DE LA TcG6PDH

Se ensayaron compuestos de la quimioteca del laboratorio con estructuras tipo esteroides similares a los reportados previamente como inhibidores^(21, 22), incluyendo el compuesto 1260 y otros compuestos de la familia que se listan en la **Tabla 1**. El ensayo se realizó como se describió anteriormente, pre-incubando la enzima con cada compuesto a una concentración de 50 µM (en DMSO 0,75 %) y NADP⁺ por 10 min a TA. Cada condición se evaluó por triplicado. Se incluyeron dos controles positivos: enzima sin compuesto y enzima con 0,75 % DMSO, y un control negativo sin enzima.

Tabla 1. Compuestos evaluados

ID de compuesto	Peso molecular (g/mol)	Masa (g)	Volumen (µL)
1256	439	0,00388	883,8
1257	484	0,00249	514,5
1258	457	0,00152	332,6
1260	389,6	0,00294	754,6
1261	682	0,00081	118,7
1262	450,7	0,00165	366,1
1263	583	0,00130	223
1289	420	0,00149	354,8
1317	642	0,00620	965,7
1319	462	0,00182	394
1053	358	0,00052	155,3
1054	316	0,00274	867,1

Fuente: elaboración propia

Se lista el número de identificación de cada compuesto en la quimioteca del laboratorio, su peso molecular, la masa y el volumen de DMSO necesario para preparar los *stock* a una concentración de 10mM.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA TcG6PDH

Se llevó a cabo la expresión de TcG6PDH empleando diferentes medios y condiciones de cultivo buscando optimizar la cantidad de proteína obtenida en forma soluble. La expresión de la proteína de interés se evalúa mediante SDS-PAGE de las fracciones obtenidas luego de la lisis bacteriana (Figura 2).

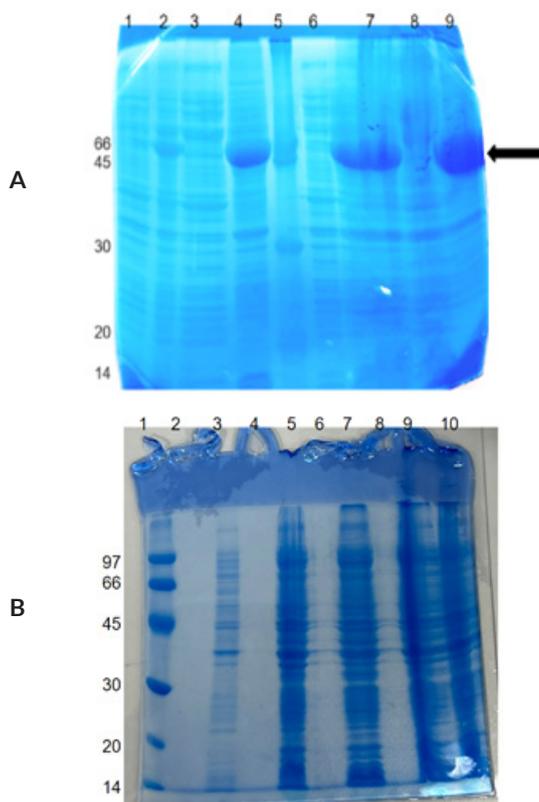


Figura 2. Análisis por SDS-PAGE de la expresión de TcG6PDH recombinante en distintas condiciones.

Las fracciones colectadas durante la expresión de la proteína se corrieron en un gel de poliacrilamida al 6% (A) y al 12% (B). En cada pocillo se sembraron 15 µL de las siguientes fracciones de E. coli Tuner(DE3). A. Carril 1: pre inducción. Carril 2: post inducción con IPTG 1 mM durante 4 horas a 37°C Carril 3 y 4: fracción soluble e insoluble de la muestra del carril 2, respectivamente. Carril 5: MP. Carril 6: pre inducción. Carril 7: post inducción con IPTG 1 mM O.N. a 20°C. Carril 8 y 9: Fracción soluble e insoluble de la muestra del carril 7, respectivamente. B. Carril 1: MP Carril 2: libre Carril 3: pre inducción Carril 4: libre. Carril 5: post inducción. Carril 6: libre. Carril 7: fracción soluble. Carril 8: libre. Carril 9: fracción insoluble. Carril 10: fracción insoluble.

Fuente: elaboración propia

En el gel de la Figura 2A aparece una banda prominente en las fracciones post-inducción con IPTG, que no está presente en las fracciones pre-inducción y cuyo tamaño es el esperado para la TcG6PDH (59 kDa en su forma monomérica). Se puede observar que se expresa mayormente en la fracción insoluble, y ninguna de las condiciones de expresión en TB evaluadas permitió expresarla en la fracción soluble. A raíz de esto, se probó la expresión en un medio de autoinducción (Figura 2B). En este medio se expresó menor cantidad de proteína en relación a la inducción con IPTG. Sin embargo, esto podría favorecer que la proteína permaneciera en la fracción soluble, por lo que se procedió a la purificación utilizando la fracción soluble obtenida en este medio de inducción (carril 7, Figura 2B).

PURIFICACIÓN DE TCG6PDH

La purificación de la enzima se realizó según se describe en la sección de metodología correspondiente. La Figura 3 muestra el resultado de la IMAC, en la que se obtuvo un pico que eluye a los 57,5 mL, de aproximadamente 3 mL totales, donde se espera encontrar a la TcG6PDH (Figura 3).

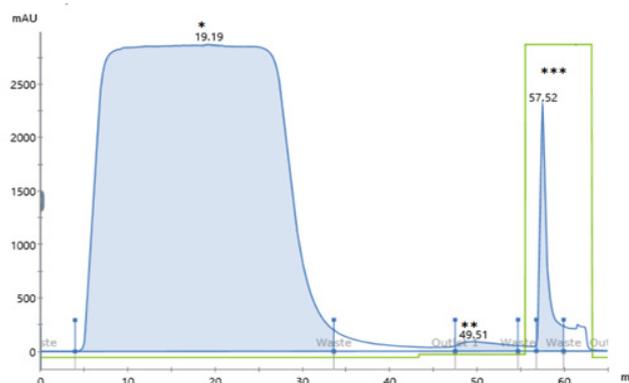


Figura 3. Cromatograma obtenido durante la purificación de la TcG6PDH mediante cromatografía de afinidad (IMAC).

Se grafica la Abs a 280 nm en función del volumen de elución, se aprecia un gran pico correspondiente a la fracción no unida entre los 5 y 35 ml (*), un pico pequeño asociado al lavado a los 49,5 ml (**) y el pico de elución a los 57,5 ml (***). El trazo azul corresponde a la medida de absorbancia a 280 nm para cada fracción y el trazo verde a la concentración de amortiguador de elución utilizado.

Fuente: elaboración propia

Se realizó una segunda cromatografía utilizando una columna de exclusión molecular, sembrando el concentrado del pico de elución de la IMAC, en 3 inyecciones y corridas independientes (Figura 4). Los diferentes picos de elución se colectaron en tubos separados.

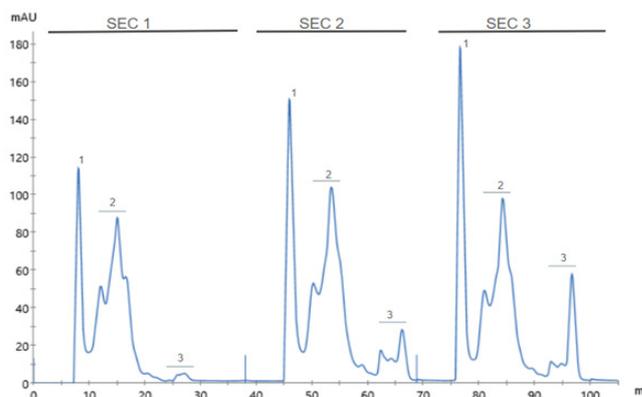


Figura 4. Cromatograma obtenido durante la purificación de la TcG6PDH mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC).

Se grafica la Abs a 280 nm en función del volumen de elución para las 3 inyecciones consecutivas (SEC 1, 2 y 3). En todos los casos se aprecia un pico inicial mayoritario (1), luego un segundo pico donde parece eluir más de una proteína (2) y luego uno o más picos minoritarios (3).

Fuente: elaboración propia

Las fracciones colectadas en la cromatografía se analizaron mediante SDS-PAGE, obteniéndose resultados muy similares en las 3 inyecciones de la SEC. En la Figura 5 se muestra a modo de ejemplo la corrida de las fracciones colectadas durante la IMAC y la primera corrida de la SEC. Como se observa en la Figura 5, la SEC mejora la pureza de la proteína de interés, aumentando considerablemente su abundancia relativa. Dado que la forma monomérica de la TcG6PDH tiene un tamaño esperado de 59 kDa, las bandas obtenidas en los picos 1 y 2 de elución, comprendidas entre 45 y

66 kDa podrían corresponder a la proteína de interés (señaladas con flechas en la figura). En el pico 1 (Figura 5, carril 6) se aprecia una banda única que migra inmediatamente por encima de 45 kDa, mientras en el pico 2 (Figura 5, carril 8) se observan dos bandas en ese rango, teniendo la superior un tamaño estimado en 66 kDa y la inferior de 60 kDa. Estos resultados sugieren que esta última, dado su peso molecular, corresponde a la TcG6PDH. Por otro lado, la electroforesis muestra que el tercer pico corresponde a una mezcla de proteínas.

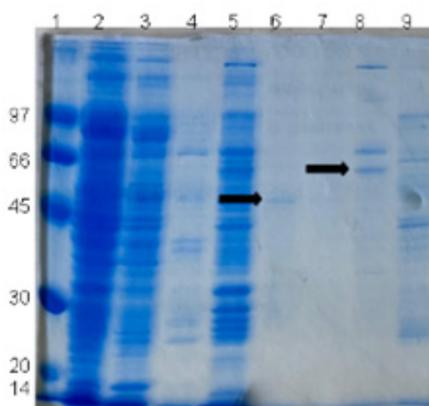


Figura 5. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones colectadas en las corridas cromatográficas.

Carril 1: MP. Carril 2: sembrado en la IMAC. Carril 3: Fracción no unida (IMAC). Carril 4: lavado (IMAC). Carril 5: pico de elución (IMAC). Carril 6: pico 1 (SEC inyección 1). Carril 8: pico 2 (SEC inyección 1). Carril 9: pico 3 (SEC inyección 1).

Fuente: elaboración propia

MEDIDA DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE LA TCG6PDH

Se evaluó la actividad enzimática y se estimó la velocidad inicial de la reacción para tres concentraciones de enzima diferentes (36, 121 y 244 nM).

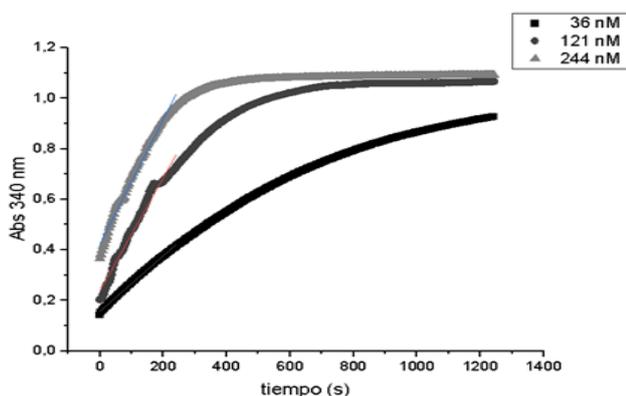


Figura 6. Puesta a punto de la medida de actividad enzimática.

La formación del producto NADPH se siguió midiendo la absorbancia a 340 nm en un lector de placas con modo cinético, a TA. El ensayo se realizó con 60 mM G6P, 5 mM NADP+ y concentración de enzima variable.

Fuente: elaboración propia

En la Figura 6 se muestran corridas representativas de las medidas de actividad realizadas a distintas concentraciones de la muestra conteniendo la enzima TcG6PDH. A medida que aumenta la concentración de enzima la actividad enzimática se incrementa, lo que se desprende de la estimación de la pendiente a partir del ajuste de la porción lineal de la gráfica. Las pendientes y desvíos estándar obtenidos para cada concentración fueron de $0,0011 \pm 9,8 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$ para 36 nM

enzima, de $0,0034 \pm 5,9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ para 121 nM enzima, y de $0,0043 \pm 1,5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para 244 nM enzima. Se seleccionó la concentración de TcG6PDH de 244 nM para realizar los ensayos de inhibición con los compuestos derivados de esteroides, ya que presenta una pendiente mayor.

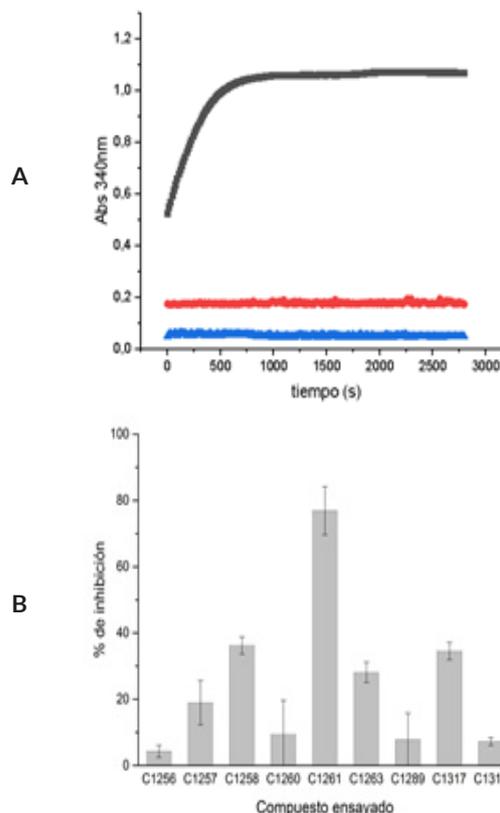


Figura 7. Ensayo de inhibición de la actividad de TcG6PDH

A. Gráfica representativa de las medidas de actividad enzimática, con una concentración de enzima de 244 nM. En gris se observa la corrida del control positivo de enzima en presencia de 0,75 % DMSO, en rojo se observa la corrida en presencia del compuesto 1261 a una concentración de 50 μM, y en azul el control negativo sin enzima. B. Evaluación del efecto inhibitorio de los distintos compuestos ensayados en relación al control de enzima con DMSO. Se muestra el porcentaje de inhibición para aquellos compuestos que presentaron un efecto sobre la actividad enzimática

Fuente: elaboración propia

En la Figura 7A se muestran corridas representativas de las medidas de actividad de la TcG6PDH durante el ensayo de inhibición de la enzima, la actividad de la enzima sin inhibidor, la actividad en presencia de compuesto 1261 y un control sin enzima. Como se observa, dicho compuesto mostró una clara disminución de la actividad enzimática. La Figura 7B resume los resultados obtenidos para los distintos compuestos ensayados permitiendo identificar varios inhibidores, y en particular, se observa que el compuesto 1261 presenta una inhibición de más del 70 % a la concentración ensayada. Por otro lado, a pesar de haber mostrado inhibición del crecimiento de *T. cruzi in vitro* previamente, el compuesto 1260 no presentó inhibición de la TcG6PDH en las condiciones ensayadas, por lo que se hace necesario seguir caracterizando el efecto de este compuesto en el crecimiento parasitario así como su mecanismo de acción. En cuanto a los inhibidores identificados en este ensayo preliminar, es importante realizar los ensayos dosis-respuesta para determinar su IC₅₀ y proseguir con su caracterización a futuro.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Andrade DV, Gollob KJ, Dutra WO. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Negl Trop Dis.*, 2014; 8 (7): 3010.
2. Ortíz C. Validación de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa de *Trypanosoma cruzi*, como blanco para el diseño racional de fármacos antichagasicos. [Montevideo, Uruguay.]: Universidad de la República; 2017.
3. Chiribao ML, Libisch G, Parodi-Talice A, Robello C. Early *Trypanosoma cruzi* infection reprograms human epithelial cells. *Biomed Res Int.*, 2014; 439-501.
4. Barrios P, Más M, Giachetto G, Basjmadjián Y, Rodríguez M, Viera AL, et al. Enfermedad de Chagas: transmisión vertical. Descripción de casos clínicos. *Rev Médica Urug.*, 2015; 31 (3): 209-213.
5. Rosa R, Basjmadjián Y, González M, González M, Salvatella R. Actualización clínico-epidemiológica y terapéutica de la enfermedad de Chagas en Uruguay. *Rev Médica Urug.*, 2001; 17 (2): 125-32.
6. Shighara T, Hashimoto M, Shindo N, Aoki T. Transcriptome profile of *Trypanosoma cruzi*-infected cells: simultaneous up- and down-regulation of proliferation inhibitors and promoters. *Parasitology Research*, 2008; 102 (4): 715-722.
7. Kourbeli V, Chontzopoulou E, Moschovou K, Pavlos D, Mavromoustakos T, Papanastasiou LP. An Overview on Target-Based Drug Design against Kinetoplastid Protozoan Infections: Human African Trypanosomiasis, Chagas Disease and Leishmaniases. *Molecules*. 2021; 26 (15): 4629.
8. Murillo-Godinez G. Enfermedad de Chagas (trípanosomiasis americana). *Md. interna Méx.* 2018; 34 (6): 959-970.
9. Lannes-Vieira J, de Araújo-Jorge TC, Soeiro Mde N, Gadelha P, Corrêa-Oliveira R. The centennial of the discovery of Chagas disease: facing the current challenges. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010 Jun 29;4(6):e645.
10. Ramponi F, Aerts C, Sartor P, Pinazo M, Freilij H, Guzman C, et al. Development of vaccines for Chagas disease (CRUZIVAX): stakeholders' preferences and potential impacts on healthcare. *Gac Sanit.* 2022; (37):102275.
11. Rivera JLH. Síntesis, caracterización y evaluación de nuevos compuestos con actividad biológica frente a enfermedades infecciosas desatendidas. [México]: Universidad autónoma de Chihuahua; 2022.
12. Apt B W, Heitmann I, Jercic MI, Jofré L, Muñoz P, San Martín A. Tratamiento antiparasitario de la enfermedad de Chagas. *Rev Chil Infect.* 2008; 25 (5): 384-389.
13. Núñez-Mujica G. Control y regulación de la glicólisis de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei*: Un enfoque teórico. [Bogotá, Colombia.]: Universidad de Los Andes; 2009.
14. Au SW, Gover S, Lam SVM, Adams MJ. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Struct Fold Des.*, 2000; 293-303.
15. Mercaldi GF, Dawson A, Hunter WN, Cordeiro AT. The structure of a *Trypanosoma cruzi* glucose-6-phosphate dehydrogenase reveals differences from the mammalian enzyme. *FEBS Lett*, 2016; 590: 2776-2786.
16. Gupta S, Cordeiro AT, Michels PA. Glucose-6-phosphate dehydrogenase is the target for the trypanocidal action of human steroids. *Mol Biochem Parasitol.*, 2011; 176(2):112-5.
17. Ortíz C, Moraca F, Laverriere M, Jordan A, Hamilton N, Comini MA. Glucose 6-phosphate dehydrogenase from trypanosomes: Selectivity for steroids and chemical validation in bloodstream *Trypanosoma brucei*. *Molecules*. 2021; 26(2):358.
18. Naciuk FF, Faria JN, Eufrásio AG, Cordeiro AT, Bruder M. Development of Selective Steroid Inhibitors for the Glucose-6-phosphate Dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *ACS Med. Chem. Lett* 2020, 11, 1250-1256.
19. Aguilera E, Perdomo C, Espindola A, Corvo I, Faral-Tello P, Robello C, et al. A Nature-Inspired Design Yields a New Class of Steroids Against Trypanosomatids *Molecules*. 2019; 24(20):3800.
20. Ortíz C, Moraca F, Medeiros A, Botta M, Hamilton N, Comini M. Modo de unión y selectividad de los esteroides hacia la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa del patógeno *Trypanosoma cruzi*. [Montevideo, Uruguay.]: Instituto Pasteur de Montevideo; 2016.
21. Marks PA, Banks J. Inhibition of mammalian glucose-6-phosphate dehydrogenase by steroids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1960; 46, 447-452.
22. Cordeiro AT, Thiemann OH, Michels PAM. Inhibition of *Trypanosoma brucei* glucose-6-phosphate dehydrogenase by human steroids and their effects on the viability of cultured parasites. *Bioorg. Med. Chem.*, 2009; 17, 2483-2489.