



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



DISEÑO, EVALUACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS DERIVADOS DE BENZISOTIAZOLONAS COMO AGENTES TRIPANOSOMÁTIDOS MULTI-BLANCO.

Cristina Quiroga Lozano.

Tesis de Doctorado.

Presentada como uno de los requisitos para el título de Doctor.

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química
Universidad de la República.

Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas.

Noviembre, 2025.

Diseño, evaluación y caracterización de nuevos derivados de benzisotiazolonas como agentes tripanosomátidos multi-blanco.

Tribunal

Dra. Leticia Pérez.

Dr. Hugo Cerecetto.

Dr. Federico Iribarne.

Dra. Andrea Medeiros Directora.

Dr. Marcelo Comini Director.

**Diseño, evaluación y caracterización de nuevos derivados de
benzisotiazolonas como agentes tripanosomátidos multi-blanco.**

Cristina Quiroga Lozano.

Programa de Posgrado en Química de la Facultad de Química
Universidad de la República

2025

DIRECTORA: Andrea Medeiros

DIRECTOR: Marcelo Comini

(Área Química Medicinal, Laboratorio Biología Redox de Tripanosomátidos, Institut
Pasteur de Montevideo)

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo a mis padres, porque sin su apoyo y su amor no habría podido moverme a otro país ni sostener este camino. Gracias por estar siempre, por preocuparse por mí aun desde la distancia y por impulsarme a seguir adelante. A mis hermanos, gracias por acompañarme, escucharme y estar pendientes en cada etapa de esta estancia internacional; su cariño hizo que los momentos difíciles fueran más llevaderos.

A Marcelo y Andrea, gracias por abrirme las puertas del laboratorio y darme la oportunidad de aprender y reaprender tantas cosas. Gracias por confiar en mí, por las facilidades que me brindaron y por toda la gestión realizada para que este trabajo pudiera avanzar y dar frutos a lo largo de estos años. Su guía ha sido clave en mi formación como investigadora.

A Mary, Nía, Ceci, Flor, Nati, Franca y Diego, gracias por todo lo que compartimos en el laboratorio. Con cada uno aprendí algo distinto; siempre encontré apoyo, y eso permitió sacar adelante los experimentos y seguir creciendo.

Al área de Bioimagenología del Instituto Pasteur de Montevideo, especialmente a Marcela, por tu apoyo técnico y por estar dispuesta a ayudar. Al área de Biología Celular del Instituto Pasteur de Montevideo, por cada capacitación, por responder mis dudas y por acompañar mi aprendizaje práctico. Al área de Proteómica del Instituto Pasteur de Montevideo, por el acompañamiento y por los aportes que fortalecieron la interpretación de los resultados.

Al grupo de DETEMA de la UDELAR por las clases compartidas y por su ayuda en todo el capítulo in silico.

Al grupo de Química Farmacéutica de la UDELAR, en especial a Marcelo Incerti, gracias por su guía y apoyo técnico en el desarrollo del componente químico.

Un agradecimiento especial a Andrés, quien siempre tuvo palabras y acciones de aliento para que cada día tuviera algo bueno que aprender. Gracias, siempre.

Y finalmente, gracias a quienes estuvieron conmigo, aunque fuera un trayecto pequeño. Cada apoyo, cada palabra y cada experiencia compartida fueron importantes en este recorrido.

RESUMEN

En la última década y según la OMS, las enfermedades tropicales desatendidas (ETD) continúan siendo uno de los mayores retos de la salud pública global, afectando a más de mil millones de personas en regiones de bajos recursos. Entre ellas, la tripanosomiasis americana (enfermedad de Chagas), la tripanosomiasis africana humana ("enfermedad del sueño") y la leishmaniasis destacan por su impacto sanitario y socioeconómico. A pesar de los esfuerzos internacionales, solo un nuevo fármaco fue aprobado para el tratamiento de la "enfermedad del sueño", el fexinidazol, mientras que la enfermedad de Chagas aún se trata con fármacos desarrollados más de 50 años atrás, el nifurtimox (NFX) y el benznidazol (BNZ). Estos últimos presentan eficacia limitada en la fase crónica de la enfermedad y una marcada toxicidad, lo que denota la necesidad de descubrir y desarrollar nuevas entidades químicas superadoras.

La presente tesis se centró en el diseño racional, síntesis, caracterización y evaluación de una nueva familia de 23 derivados de benzisotiazolonas con actividad anti-tripanosomátidos multidiana. Se seleccionó este andamio estructural tomando en cuenta que compuestos análogos (como el Ebsulfur: EbS, y el derivado con selenio Ebselen: EbSe) mostraron poseer actividad tripanocida e inhibitoria de las enzimas encargadas de la síntesis (tripanotión sintetasa: TryS) y reducción (tripanotión reductasa: TR) del principal tiol de bajo peso molecular de estos organismos, el tripanotión. Los compuestos sintetizados fueron caracterizados mediante RMN (^1H y ^{13}C) y espectrometría de masas. A partir del análisis quimioinformático, los compuestos se agruparon en cinco series para correlacionar las variaciones químicas con sus bioactividades.

La evaluación biológica frente a *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania infantum* permitió identificar varios compuestos con actividades destacadas, aunque especie-específicas. La mayoría de ellos ejerció una citotoxicidad potente y selectiva contra *T. b. brucei* (ej. derivado 14: $\text{CE}_{50} = 0,022 \mu\text{M}$, $\text{IS} = 6772$, el 11: $0,091 \mu\text{M}$, $\text{IS} = 462$ y el 13: $0,21 \mu\text{M}$; $\text{IS} > 952$), la cual fue similar o superior a la del EbS. Para *T. cruzi*, el compuesto 16 ($\text{CE}_{50} = 2,13 \mu\text{M}$; $\text{IS} > 94$) resultó ser el más activo y comparable a BNZ, mientras otros derivados presentaron actividad micromolar baja con índices de selectividad superiores a 10. Notablemente, la mayoría de los compuestos careció de actividad contra

L. infantum, confirmando la especificidad de los nuevos derivados por blancos moleculares presentes en tripanosomas.

Para indagar sobre el modo de acción de los compuestos más activos y teniendo en cuenta evidencias previas sobre la actividad pro-oxidante del EbS y el EbSe, los compuestos activos fueron ensayados contra una línea celular de *T. b. brucei* reportera del estado redox del metabolismo dependiente de tioles. Se verificó que la gran mayoría de los compuestos inducen la oxidación intracelular del pool de tioles de bajo peso molecular, afectando así la homeostasis redox. En base a estos resultados y para verificar nuestra hipótesis de diseño racional de derivados del EbS como inhibidores de TryS y TR, se estudió la inhibición de estas enzimas exclusivas de tripanosomátidos para los compuestos con mayor actividad bioselectiva.

A diferencia del EbS y el EbSe, solo dos o cinco de los nuevos derivados logró inhibir más del 50% la actividad de la TryS y TR a concentraciones inferiores a 70 μ M, respectivamente. En el marco de esta tesis se empleó el análisis de anclaje y dinámicas moleculares para comprender cómo la unión covalente de EbS y EbSe a la Cys270 de TryS afecta la actividad enzimática. En estudios previos de análisis de espectrometría de masas, este residuo había sido identificado estar modificado covalentemente por estos compuestos. Los resultados sugieren que la unión del compuesto a esta cisteína está favorecida por el entorno hidrofóbico y que el anclaje del compuesto a esta región altera la conformación del sitio activo de la enzima (principalmente la región de unión a ATP). Para uno de los inhibidores de TR (compuesto 7), verificamos experimentalmente que éste se une de manera covalente a la Cys221 (parcialmente expuesta al solvente) y que dicha unión afecta el correcto anclaje del NADPH al sitio activo de la enzima, lo cual explica el mecanismo de inhibición parcialmente irreversible observado mediante estudios cinéticos.

En base a reportes previos que indican que el EbSe afecta el metabolismo de la glucosa por inhibir a la enzima Hexoquinasa (HK-1), se estudió si los derivados más activos y selectivos ejercen un efecto similar en la forma infectiva de *T. b. brucei*, la cual posee un metabolismo energético dependiente del glicólisis. A diferencia del EbSe, la mayoría de los derivados no afectaron la tasa de consumo de glucosa o tres de ellos (incluyendo al EbS) lo hicieron de manera marginal (10%). Esto sugiere que HK-1 no es el principal blanco molecular de los nuevos compuestos.

Con el fin de orientar futuras optimizaciones, se desarrolló un modelo QSAR tridimensional (CoMFA) que correlacionó propiedades estéricas y electrostáticas con la actividad frente a *T. b. brucei*. Este análisis indicó que sustituyentes voluminosos y grupos halogenados o metoxilo correlacionan positivamente con actividad.

La eficacia terapéutica del compuesto 14 fue evaluada en un modelo murino agudo de infección por *T. b. brucei*, observándose una reducción parcial de la carga parasitaria y una extensión significativa de la supervivencia de los animales infectados sin signos de toxicidad. Este hallazgo validó a este compuesto como candidato a ser optimizado.

Metodológicamente, en el marco de esta tesis se desarrollaron ensayos y modelos (ej. viabilidad celular y estado redox basados en proteínas reporteras luminiscentes y fluorescentes) innovadoras que ofrecieron un marco experimental robusto y fisiológicamente relevante para el estudio de compuestos en las formas clínicas de estos patógenos. También se participó en el desarrollo de un modelo de infección de organoides murinos (colon) por *T. cruzi*.

Los resultados de esta investigación constituyen la primera caracterización sistemática de benzisotiazolonas frente a tripanosomátidos. Las contribuciones originales incluyen: (i) la expansión del andamiaje de EbS hacia derivados con perfiles de potencia y selectividad superiores a NFX y BNZ, (ii) la identificación de relaciones estructura-actividad especie-específicas que permiten aplicar nuevas estrategias de diseño selectivo, y (iii) la implementación de plataformas metodológicas aplicables al descubrimiento de fármacos. Estos hallazgos posicionan a las benzisotiazolonas en la etapa hit-to-lead, con bases sólidas para estudiar y optimizar su farmacocinética, así como avanzar en su desarrollo preclínico. Por tanto, este estudio constituye una contribución original al campo de la química medicinal aplicada a enfermedades tropicales desatendidas.

ÍNDICE

Índice de figuras

Índice de tablas

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL Y MARCO TEÓRICO	17
1.1. Enfermedades tropicales desatendidas (ETD)	17
1.2. Tripanosomiasis americana (Enfermedad de Chagas)	19
1.2.1. Epidemiología	19
1.2.2. Formas de transmisión	20
1.2.3 Ciclo de Vida de T. cruzi	23
1.2.4. Clínica de la enfermedad	24
1.2.5. Tratamiento	26
1.3. Tripanosomiasis Africana Humana	32
1.3.1 Epidemiologia	32
1.3.2. Ciclo de Vida	34
1.3.3. Clínica de la enfermedad	37
1.3.4. Tratamiento	37
1.4. Leishmaniasis	41
1.4.1 Epidemiologia y transmisión	41
1.4.2. Ciclo de Vida	44
1.4.3. Clínica de la enfermedad	45
1.4.4 Tratamiento	47
1.5. El metabolismo redox dependiente de tioles de tripanosomátidos y tioles de bajo peso molecular atípicos	50
1.5.1. El sistema TR/T(SH) ₂ /TXN y su rol en la biología redox de tripanosomátidos	54

1.6. Inhibidores de TR	59
1.6.1. Unión a la cavidad TS ₂ (competitivos con triptanotona)	59
1.6.2 Unión a la cavidad NADPH (competitivos con NADPH)	62
1.6.3. Inhibidores mixtos y “subversivo” (cicladores redox)	63
1.6.4. Inhibidores irreversibles: EbS, fenotiazinas (tioridazina, TDZ)	63
1.6.5. Inhibidores multidiana: derivados fenoxi-benzo[d]imidazol-4,7-diona	65
1.7 Inhibidores de TryS	66
1.7.1. Indazoles	66
1.7.2 Paullonas N ⁵ -sustituidas	67
1.7.3 Ebselen y nuevos chasis estructurales	68
1.8 Estrategias computacionales para el descubrimiento de inhibidores del metabolismo redox en tripanosomátidos	70
CAPITULO 2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	72
2.1 Objetivo general	72
2.2 Objetivos específicos	72
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA	73
3.1 Síntesis iterativa de compuestos derivados de benzisotiazolonas	73
3.1.1 Datos generales:	73
3.1.2 Caracterización fisicoquímica de los compuestos 1-18	74
3.2 Clasificación estructural de las Series Químicas	80
3.2.1 Categorización	80
3.3. Ensayos Celulares	81
3.3.1 Ensayo de viabilidad de la forma sanguínea de T. b. brucei	81

3.3.2 Ensayos de viabilidad de la forma intracelular de <i>L. infantum</i>	82
3.3.3 Ensayo de viabilidad de la forma intracelular de <i>T. cruzi</i> Dm28c	85
3.3.4 Ensayos de citotoxicidad sobre macrófagos murinos	93
3.3.5 Ensayos de citotoxicidad sobre células epiteliales de riñón de mono	93
3.3.6 Ensayos sobre línea celular de <i>T. b. brucei</i> reportera de cambios redox	94
3.3.7 Ensayos sobre la línea celular de <i>L. infantum</i> reportera de cambios redox	95
3.4 Ensayos in vitro con la proteína fluorescente del biosensor redox	96
3.4.1 Purificación de la forma recombinante del biosensor roGFP2	96
3.4.2. Ensayos de fluorescencia con el biosensor roGFP2	97
3.5 Ensayo de consumo de glucosa por forma infectiva de <i>T. b. brucei</i>	97
3.6 Ensayos con Tripanotona Sintetasa	98
3.6.1 Expresión y purificación de la TryS de <i>T. b. brucei</i> (TbTryS)	98
3.6.2 Ensayo de cribado sobre TbTryS	98
3.6.3 Ensayo de inhibición irreversible y análisis de espectrometría de masas	99
3.7 Ensayos con Tripanotona Reductasa	100
3.7.1 Expresión y purificación de la TR	100
3.7.2 Ensayo de actividad de TR	102
3.7.3 Ensayo de inhibición irreversible y análisis de espectrometría de masas	102
3.8 Métodos Computacionales	104
3.8.1 Metodología 3D-QSAR	104
3.8.2 Análisis in silico del complejo TbTryS – EbSe	105
3.9 Ensayos en modelo animal	109
3.9.1 Citotoxicidad Aguda	109

3.9.2 Eficacia Terapéutica	110
CAPÍTULO 4. RESULTADOS	111
4.1 Desarrollo de ensayos biológicos	111
4.1.1 Generación y caracterización de línea celular bioluminiscente de <i>T. cruzi</i>	111
4.1.2 Desarrollo y validación del ensayo de cribado	118
4.1.3 Estandarización de ensayo con línea celular de <i>T. b. brucei</i> reportera de cambios redox	121
4.2. Síntesis iterativa de compuestos análogos y derivados de benzisotiazolonas	128
4.2.1 Clasificación estructural derivados del EbS	129
4.3 Actividad anti-tripanosomátidos, selectividad y efecto on-target de las benzisotiazolonas.	131
4.3.1 Actividad biológica y selectividad contra la forma sanguínea de <i>T. b. brucei</i> .	131
4.3.2 Actividad biológica y selectividad contra amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i> .	135
4.3.3 Actividad biológica y selectividad contra la forma intracelular de <i>L. infantum</i>	137
4.3.4. Susceptibilidad especie-específica a benzisotiazolonas	137
4.4 Ensayos redox sobre líneas reporteras de <i>T. b. brucei</i> y <i>L. infantum</i>	139
4.4.1 Actividad redox de benzisotiazolonas en <i>T. b. brucei</i>	139
4.4.2 Relaciones cuantitativas de estructura-actividad en tres dimensiones (3D-QSAR) para los hits de <i>T. b. brucei</i>	145
4.4.3 Análisis de Densidad Electrónica para el Cálculo de Reactividad Molecular	147
4.4.4 Actividad biológica y redox de benzisotiazolonas contra forma promastigota de <i>L. infantum</i>	148
4.5 Consumo de Glucosa	151
4.6 Evaluación de la actividad y el mecanismo de acción contra TryS y TR de las benzisotiazolonas.	151

4.6.1 Actividad contra TryS	151
4.6.2 Estudio del mecanismo de inhibición del EbSe y EbS sobre la TryS	155
4.6.3 Construcción y validación de modelo estructural de la TryS	158
4.6.4 Docking y análisis molecular del complejo covalente TbTryS-EbSe	163
4.6.5 Actividad contra TR	170
4.7 Estudios de eficacia terapéutica	177
CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	183
PERSPECTIVAS	192
BIBLIOGRAFIA	194
MATERIAL SUPLEMENTARIO	246

Índice de figuras

Figura 1. Distribución geográfica de casos estimados de infección por <i>T. cruzi</i> en el mundo.	20
Figura 2. Eco-epidemiología y dinámica de transmisión de la enfermedad de Chagas en las Américas.	24
Figura 3. Fármacos nitroheterocíclicos clásicos utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas: nifurtimox y benznidazol.	27
Figura 4. Distribución geográfica de la tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño) en países del África subsahariana.	33
Figura 5. Ciclo de vida de <i>T. brucei</i> .	35
Figura 6. Representación de las estructuras químicas de los principales fármacos utilizados en el tratamiento de la tripanosomiasis africana.	38
Figura 7. Distribución mundial de la leishmaniasis.	43
Figura 8. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .	45
Figura 9. Principales fármacos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis	48
Figura 10. Representación tridimensional de Tripanotiona Sintetasa (TryS).	51
Figura 11. Estructura química, síntesis y metabolismo dependiente de tripanotiona.	51
Figura 12. Sitios de unión de FAD, y tripanotiona en la tripanotiona reductasa (TR).	53
Figura 13. Estructuras químicas de los principales tioles de bajo peso molecular descritos en tripanosomátidos.	54
Figura 14. Biosíntesis de tripanotiona (azul) y vías metabólicas controladas por procesos de oxidoreducción dependientes de $T(SH)_2/TXN$.	57
Figura 15. Principales inhibidores competitivos de tripanotiona reductasa (TR) que se unen a la cavidad TS_2 .	61
Figura 16. Esquema del procedimiento experimental para evaluar la actividad biológica de compuestos frente a la forma intracelular de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	89
Figura 17. Diseño de microplaca para ensayo de actividad antiparasitaria	91
Figura 18. Metodología de modelado y validación del modelo tridimensional de TbTryS	106

Figura 19. Rompimiento del anillo del EbSe. El selenio es reemplazado por azufre en la simulación.	107
Figura 20. Análisis de bioluminiscencia en epimastigotes de <i>T. cruzi</i> Dm28c-luc.	113
Figura 21. Crecimiento y expresión de luciferasa en diferentes estadios de desarrollo de <i>T. cruzi</i> Dm28c-luc.	115
Figura 22. Estabilidad y linealidad de la señal bioluminiscente en amastigotes de <i>T. cruzi</i> Dm28c-luc.	119
Figura 23. Validación del ensayo de bioluminiscencia para el cribado de compuestos contra amastigotes de <i>T. cruzi</i> .	120
Figura 24. Esquema del ensayo para evaluar el estado redox intracelular y la viabilidad en <i>Trypanosoma brucei</i> hGrx1-roGFP2 mediante citometría de flujo.	122
Figura 25. Estado redox del biosensor y viabilidad celular de <i>T. b. brucei</i> hGrx1-roGFP2 bajo distintas condiciones de incubación.	125
Figura 26. Esquema de síntesis de benzisotiazolonas.	129
Figura 27. Agrupamiento y estructura de las benzisotiazolonas sintetizadas	130
Figura 28. Actividad redox contra la forma infectiva de <i>T. b. brucei</i> .	140
Figura 29. Análisis fluorométrico de los hits que indujeron la oxidación intracelular del biosensor en <i>T. b. brucei</i> .	142
Figura 30. Análisis de correlación de la potencia vs capacidad oxidante de los hits de las series I y II.	143
Figura 31. Análisis de correlación de selectividad vs capacidad oxidante de los hits de las series I y II.	144
Figura 32. Mapas derivados del análisis 3D-QSAR para los hits contra <i>T. b. brucei</i> .	146
Figura 33. Gráfico de los valores de pEC50 predichos vs. pEC50 experimentales obtenidos mediante CoMFA.	147
Figura 34. Actividad biológica y redox contra forma promastigote de <i>L. infantum</i> de derivados de benzisotiazolonas.	149

Figura 35. Inhibición de TbTryS silvestre (WT) y mutante en Cys270 (C270A) por EbS, EbSe y AUC.	157
Figura 36. Evaluación ProSA de los modelos de las proteínas TryS.	159
Figura 37. Comparación de modelos in silico de la estructura 3D de TbTryS con respecto a la estructura cristalina de LmTryS.	160
Figura 38. Comparación 3D de los modelos in silico de TbTryS.	162
Figura 39. Dinámica molecular del modelo de TbTryS generado por I-TASSER.	163
Figura 40. Modelo de unión covalente del EbS a la Cys270 de la TbTryS.	164
Figura 41. Análisis de dinámica molecular del complejo covalente TbTryS-EbSe.	165
Figura 42. Análisis de dinámica molecular de los sitios de unión a sustratos en los modelos de TbTryS libre y unida a EbSe.	167
Figura 43. Análisis de estabilidad estructural.	168
Figura 44. Análisis de dinámica molecular de loop de sitio activo de TbTryS.	169
Figura 45. Caracterización cinética de la TcTR recombinante.	172
Figura 46. Identificación por espectrometría de masas de la modificación covalente de TcTR por EbS y el compuesto 7.	175
Figura 47. Análisis estructural de la unión de EbS y el análogo 7 a TcTR.	176
Figura 48. Estudio de eficacia terapéutica en un modelo murino agudo de tripanosomiasis africana.	179

Índice de tablas

Tabla 1. Alternativas farmacológicas para tratar la tripanosomiasis africana.	39
Tabla 2. Sensibilidad a fármacos de amastigotes de líneas celulares de <i>T. cruzi</i> Dm28c.	117
Tabla 3. Actividad biológica de benzisotiazolonas contra el estadio de especies principales de tripanosomátidos y líneas celulares de referencia de mamíferos.	134
Tabla 4. Actividad de las benzisotiazolonas sobre la Tripanotiona Sintetasa de <i>T. b. brucei</i> (TbTryS) y <i>L. infantum</i> (LiTrys).	154
Tabla 5. Comparación de los modelos de TbTryS generados in silico	160
Tabla 6. Media del volumen ($\text{\AA}^3$) de los sitios de unión de sustratos en los modelos APO y COV27 de TbTryS.	166
Tabla 7. Actividad de las benzisotiazolonas sobre TR de <i>T. cruzi</i>	173

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL Y MARCO TEÓRICO

1.1. Enfermedades tropicales desatendidas (ETD)

Las enfermedades tropicales son aquellas que prevalecen principalmente en países donde el entorno ecológico facilita la existencia de reservorios y vectores que sostienen ciclos vitales complejos de microorganismos patógenos.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETD) abarcan un grupo de aproximadamente 20 afecciones que afectan de manera significativa a las regiones más empobrecidas del mundo ubicadas en regiones tropicales y subtropicales (Swe et al., 2023; WHO., 2025). Las ETD han sido calificadas como "desatendidas" debido a su baja prioridad histórica en la agenda global de salud (WHO, 2025, Ca et al., 2024).

En este contexto, las enfermedades tropicales desatendidas (ETD) constituyen un conjunto heterogéneo de patologías que contribuyen significativamente a la morbilidad y mortalidad global. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), las ETD comprenden un grupo diverso de enfermedades transmisibles causadas por distintos agentes patógenos, y que incluyen infecciones helmínticas, protozoarias, bacterianas, virales y fúngicas. Las infecciones helmínticas abarcan enfermedades como la esquistosomiasis, oncocercosis y la filariasis linfática, mientras que las infecciones protozoarias comprenden a la enfermedad de Chagas, la leishmaniasis y la tripanosomiasis africana. Las ETD bacterianas reconocidas incluyen la lepra, el tracoma y la úlcera de Buruli. Esta clasificación subraya la complejidad del panorama global de enfermedades desatendidas y la necesidad de estrategias integradas y multidisciplinarias para su control y eventual erradicación (Hotez et al., 2020). Estas enfermedades son nativas en 149 países (Deribe, 2015) y afectan a más de 1.500 millones de personas en situación de alta vulnerabilidad y caracterizadas por condiciones de pobreza extrema, con acceso limitado o nulo a agua potable, a saneamiento y a servicios de salud de calidad (WHO, 2025).

A pesar de su gran impacto en la salud pública, estas patologías siguen siendo ampliamente olvidadas y reciben poca atención tanto gubernamental como de empresas farmacéuticas. Esto se debe principalmente a la escasa rentabilidad económica que representa invertir en su tratamiento y control. Como resultado, suelen quedar relegadas

en los programas de salud mundial, lo que retroalimenta su impacto negativo en las comunidades afectadas (Ca et al., 2024, Sarabi Asiabar et al., 2024).

Uno de los principales factores de riesgo para las enfermedades tropicales, en el contexto de la desigualdad social y la pobreza, es la migración. Un estudio realizado en 2020 durante la pandemia de COVID-19 en la región andina (Bolivia, Colombia, Ecuador, Perú y Venezuela) identificó a 272 millones de migrantes internacionales, lo que representa que 1 de cada 30 personas en el mundo vive fuera de su país de origen (Ginebra: WHO, 2022). Los países analizados comparten características socioambientales similares, tales como pobreza económica, condiciones higiénicas precarias y programas de salud deficientes, que, en conjunto con la fauna, la ecología y la presencia de riesgos biológicos propios de las zonas tropicales, facilitan la reemergencia de enfermedades tropicales. Este contexto de vulnerabilidad se exacerbó por el impacto del COVID-19, que afectó a millones de ciudadanos y migrantes, tanto andinos como intercontinentales (Zambrano-Barragán et al., 2021).

En el contexto de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) establecido por la ONU, el mapa de ruta para 2030 establece metas ambiciosas para combatir las ETD (Naciones Unidas, 2025). Entre estas, se busca reducir en un 90% la población que requiere tratamiento, disminuir en un 75% los años de vida ajustados por discapacidad (DALYs), eliminar al menos una ETD en 100 países y erradicar dos enfermedades: la dracunculiasis y el pian (frambesia) (Hotez et al., 2020). Sin embargo, el camino hacia estos objetivos enfrenta barreras considerables. Por un lado, la falta de inclusión de muchas ETD en políticas nacionales, causada principalmente por insuficiencia presupuestaria, limita su abordaje (Hotez et al., 2009). Por otro lado, la inversión en investigación sigue siendo ínfima; menos del 1% de los fondos internacionales para salud se destinan a enfermedades que afectan a más de 1.000 millones de personas, en su mayoría habitantes de regiones empobrecidas (Organización Mundial de la Salud., n.d.Ca et al., 2024,). Además, la pandemia de COVID-19 intensificó estas desigualdades, interrumpiendo iniciativas clave como el acceso a tratamientos masivos, cuyo alcance cayó de 1.207 millones de personas en 2019 a 798 millones en 2020 (WHO, 2021 (Organización Panamericana de la Salud (OPS)., n.d-b).

Las enfermedades parasitarias como la leishmaniasis visceral (Kala azar), la enfermedad de Chagas (tripanosomiasis americana) y la enfermedad del sueño africana

(tripanosomiasis humana africana) afectan a más de 27 millones de personas en todo el mundo y se encuentran entre las enfermedades desatendidas más importantes (K. Nussbaum, J. Honek, 2010). Estas patologías representan serios problemas de salud pública, especialmente en regiones endémicas, debido a la limitada eficacia de los tratamientos actuales y a la creciente amenaza del surgimiento de resistencia a los mismos. Estas circunstancias resaltan la urgente necesidad de desarrollar nuevas opciones terapéuticas (K. Nussbaum, J. Honek, 2010).

1.2. Tripanosomiasis americana (Enfermedad de Chagas)

1.2.1. Epidemiología

La enfermedad de Chagas (EC), también conocida como tripanosomiasis americana, es una patología infecciosa causada por el protozoo flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), identificada en 1909 por el médico brasileño Carlos Chagas en Minas Gerais, Brasil.

La EC ha trascendido las fronteras de América Latina debido a los flujos migratorios, extendiéndose a regiones no endémicas como Estados Unidos y Europa occidental, donde millones de personas están en riesgo de infección (Figura 1). Se estima que entre 6 y 7 millones de personas en todo el mundo están infectadas por *T. cruzi*, con un impacto significativo en la salud pública global. Cada año, la enfermedad causa aproximadamente 12.000 muertes, lo que refuerza su relevancia como un desafío internacional que requiere mayor atención y control (DNDI, 2022; Organización Mundial de la Salud., n.d.-a).

Históricamente, los primeros casos documentados de la enfermedad de Chagas aguda en humanos se reportaron en Argentina en 1924. En 1926, Salvador Mazza inició investigaciones pioneras sobre la enfermedad, describiendo más de mil casos de infección y abordando aspectos fundamentales como la transmisión a través de la leche materna, la infestación domiciliar por *Triatoma infestans* y la infección en animales domésticos. En 1935, Cecilio Romaña describió el "signo de Romaña", una hinchazón peri orbitaria característica de la fase aguda, marcando un hito en la identificación clínica de la enfermedad (Ministerio de Educación de Argentina, 1976; Romaña, 1963).

La enfermedad de Chagas (EC) representa uno de los principales desafíos de salud pública en América Latina, debido a su alta morbilidad, mortalidad y las complicaciones crónicas que puede generar, como insuficiencia cardíaca y alteraciones digestivas. Esta carga impone una presión significativa en los sistemas de salud, subrayando la urgencia de desarrollar y fortalecer estrategias preventivas y de control (Bern, 2015; Cucunubá et al., 2024; Fuentes-vicente et al., 2022; Zingales et al., 2012).

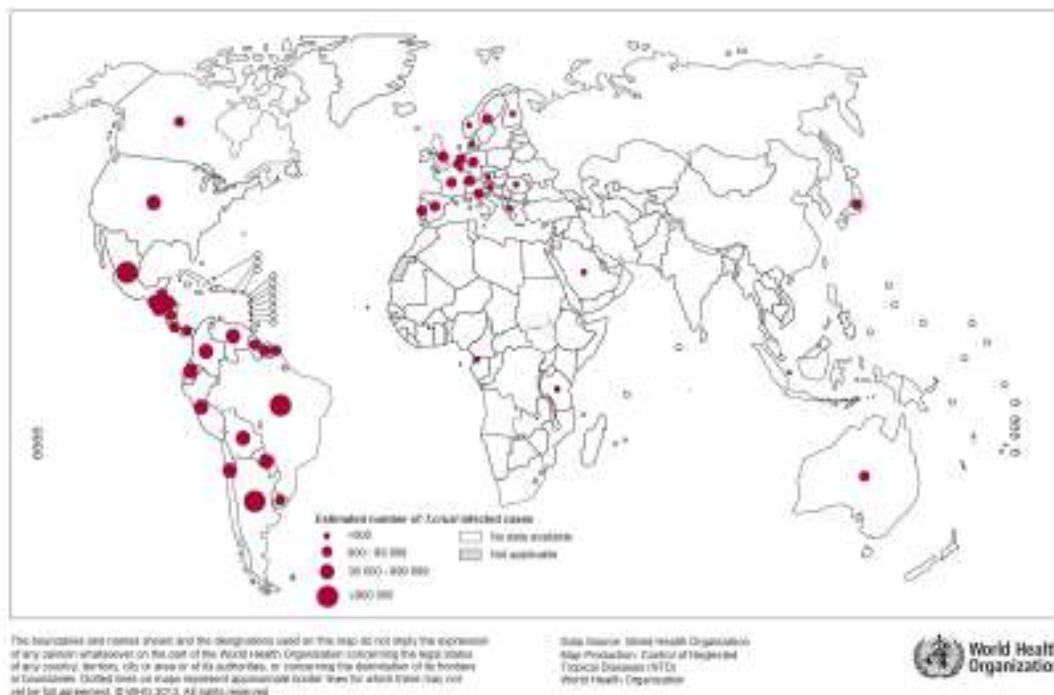


Figura 1. Distribución geográfica de casos estimados de infección por *T. cruzi* en el mundo.

La figura presenta el número estimado de casos por país. La mayor prevalencia de la enfermedad se concentra en América Latina, aunque existen casos en Europa, Norteamérica, Oceanía y África. Fuente: World Health Organization (WHO), Control of Neglected Tropical Diseases (2013).

1.2.2. Formas de transmisión

1.2.2.1. Transmisión vectorial: Es la principal vía de propagación en áreas endémicas, siendo mediada por hemípteros (chinchas), de la familia Reduviidae (Organización Panamericana de la Salud (OPS), n.d.-a). La distribución geográfica de esta forma de transmisión se extiende desde el sur de los Estados Unidos hasta la zona central de Argentina y Chile. Factores sociales y ecológicos, como viviendas precarias y la cercanía

a hábitats naturales, favorecen la colonización domiciliaria de los vectores, aumentando la vulnerabilidad de comunidades en riesgo (Bern, 2015; Cucunubá et al., 2024; Klein et al., 2021; Zingales et al., 2012).

La transmisión de *T. cruzi*, el parásito causante de la enfermedad de Chagas, ha cambiado considerablemente en las últimas décadas. Aunque las campañas de control han logrado eliminar vectores no nativos como *Triatoma infestans* y *Rhodnius prolixus* en varias regiones, los vectores nativos siguen desempeñando un papel clave en la transmisión activa del parásito. Por ejemplo, *R. prolixus* aún persiste en el norte de Colombia, mientras que *T. dimidiata* sigue presente en la costa de Ecuador, y *T. infestans* permanece en áreas específicas de Perú, Argentina, Paraguay y, en menor medida, en Chile y Brasil. Es importante destacar que todos los vectores primarios de *T. cruzi* son nativos de ciertas subregiones de América Latina: *T. infestans* proviene del Chaco seco y de los bosques montanos secos de Bolivia, *R. prolixus* de la cuenca del Orinoco y *T. dimidiata* de Mesoamérica y el norte de Sudamérica (Bargues et al., 2008; Tamay-Segovia et al., 2008). Todos estos vectores mantienen ciclos de transmisión entre ambientes silvestres, domésticos y peridomésticos, lo que dificulta la erradicación completa de esta enfermedad zoonótica (Cucunubá et al., 2024; Dorn et al., 2007). La diversidad de triatomíneos, tanto nativos como no nativos, complica aún más las estrategias de control. En zonas rurales, las viviendas de baja calidad facilitan la reinfestación por triatomíneos, manteniendo la transmisión endémica. Factores ambientales, como el clima y las características ecológicas de cada región, también influyen en la distribución de los vectores (Organización Panamericana de la Salud (OPS), n.d.-a).

En contextos urbanos, la infraestructura deficiente y la coexistencia cercana entre vectores y poblaciones humanas presentan desafíos adicionales para el control de la enfermedad. La transmisión de *T. cruzi* ha evolucionado de un ciclo enzootico a uno antroponozoonótico, estableciéndose entre especies reservorios, vectores y seres humanos (González-Salazar et al., 2022; Jansen et al., 2017). Por lo tanto, para el estudio de la dinámica de la enfermedad se requiere un enfoque multidisciplinario que considere las interacciones ecológicas y moleculares entre el parásito, el vector y el hospedero, así como los factores ambientales que influyen en la distribución y persistencia de los vectores.

Estudios recientes han utilizado técnicas avanzadas de secuenciación para explorar la diversidad genética de *T. cruzi* y sus dinámicas de transmisión, proporcionando

información valiosa para el desarrollo de estrategias de control más efectivas (Majeau et al., 2021).

A diferencia de los países mencionados, Uruguay constituye un caso exitoso de control vectorial. Gracias a la implementación sostenida de la Iniciativa del Cono Sur contra la EC, liderada por la OPS/OMS desde 1991, el país logró eliminar la transmisión vectorial domiciliar de *T. cruzi* por *T. infestans* (Salvatella, 2016).

En las otras regiones a pesar de los avances en el control vectorial, la persistencia de vectores nativos continúa siendo una barrera para erradicar la transmisión de *T. cruzi*. Esto subraya la necesidad de estrategias a largo plazo que combinen vigilancia continua, control de vectores y una mejora en la detección de casos y el tratamiento integral de los pacientes.

1.2.2.2. Transmisión vertical: Es el principal factor que contribuye a la incidencia de la EC en países no endémicos, así como en áreas urbanas o regiones latinoamericanas donde la transmisión vectorial y por transfusión ha sido controlada. La infección puede ocurrir durante el embarazo o la lactancia, lo que resalta la importancia de implementar estrategias de vigilancia prenatal y neonatal para la detección temprana y la prevención de nuevos casos. (Bern, 2015; Cucunubá et al., 2024; Klein et al., 2021; Santana et al., 2020; Zingales et al., 2012).

1.2.2.3. Transmisión oral: Esta forma de transmisión ocurre principalmente entre mamíferos silvestres insectívoros u omnívoros. Sin embargo, en humanos puede dar lugar a brotes agudos a través del consumo de alimentos o bebidas contaminadas con triatominos infectados (Bern, 2015; Cucunubá et al., 2024; Klein et al., 2021; Zingales et al., 2012).

1.2.2.4. Transmisión por transfusión y trasplante: Hasta la década de 1990, la transmisión por transfusión de sangre era responsable de miles de nuevas infecciones anualmente. Sin embargo, el tamizaje universal de donantes ha permitido controlar eficazmente esta vía en la mayoría de los países endémicos. A pesar de ello, la transmisión a través de trasplantes de órganos provenientes de donantes infectados continúa siendo una posible fuente de infección en ciertos países (Bern, 2015; Chin-Hong et al., 2011; Cucunubá et al., 2024; Klein et al., 2021; Tonelli et al., 2004; Zingales et al., 2012).

1.2.3 Ciclo de vida de *T. cruzi*

El ciclo de vida clásico de *T. cruzi* involucra dos hospederos principales: un mamífero y un insecto triatomino, con cuatro etapas principales de desarrollo. La infección en el mamífero comienza cuando los tripomastigotes metacíclicos (no replicativos), presentes en las heces del insecto vector, ingresan al cuerpo a través de heridas en la piel o membranas mucosas (Brener, 1973).

Dentro del huésped, los parásitos pueden invadir diferentes células nucleadas empleando diferentes mecanismos y residen transitoriamente en una vacuola parasitófora en el citosol de la célula infectada (Fernandes & Andrews, 2012; Romano et al., 2009). En su interior, se transforman en amastigotes, su flagelo involucre y escapan al citoplasma, donde proliferan por fisión binaria (Tyler & Engman, 2001). A medida que la infección avanza, los amastigotes vuelven a diferenciarse en tripomastigotes (no replicativos), desarrollan su flagelo y lisan la célula huésped, lo que les permite diseminarse a través de los fluidos, principalmente la sangre, e infectar nuevas células (Figura 2) (Ward et al., 2020).

Cuando un triatomino se alimenta de un huésped infectado, ingiere los tripomastigotes sanguíneos, que en su intestino medio se diferencian en epimastigotes los cuales comienzan a replicarse activamente. Posteriormente, migran al intestino posterior, se adhieren a su cutícula para transformarse nuevamente en tripomastigotes metacíclicos, altamente infectivos (Grisard et al., 1999).

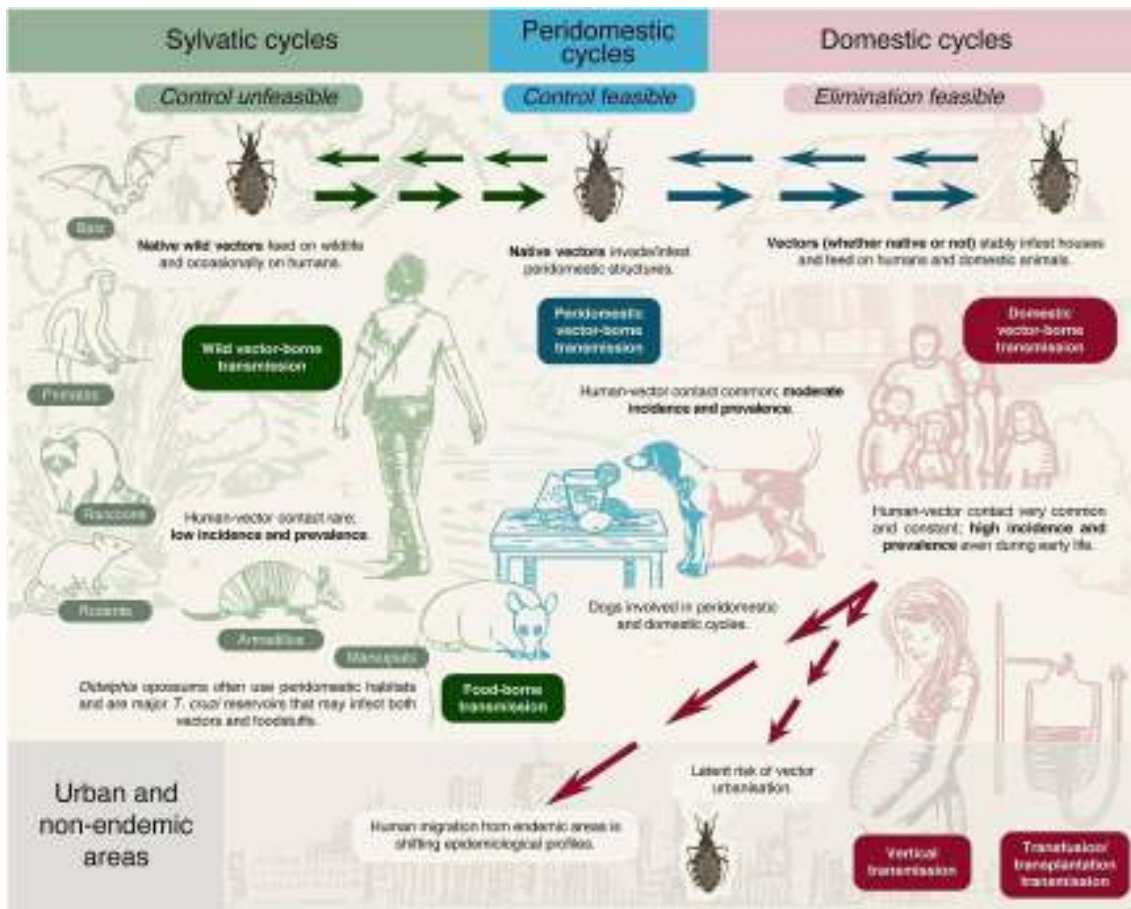


Figura 2. Eco-epidemiología y dinámica de transmisión de la enfermedad de Chagas en las Américas. Traducción y adaptación de Cucunubá et al., 2024

La transmisión de *T. cruzi* se desarrolla en tres contextos principales: ciclos selváticos, peridomésticos y domésticos. En los primeros, los vectores se alimentan e infectan a la fauna silvestre, con baja incidencia en humanos. En los ciclos peridomésticos, los insectos invaden áreas cercanas a las viviendas, aumentando la probabilidad de contacto con personas y animales domésticos. Finalmente, en los ciclos domésticos, los vectores se establecen dentro de las casas, generando una transmisión constante y con alta prevalencia, incluso desde edades tempranas.

1.2.4. Clínica de la enfermedad

La diversidad genética de *T. cruzi* y las complejas interacciones entre la genética del parásito, el vector y el hospedero, junto con factores ambientales, contribuyen significativamente a la variabilidad observada en las manifestaciones clínicas y la dinámica de transmisión de la EC. *T. cruzi* exhibe una notable diversidad biológica y genética, clasificada en siete unidades discretas de tipificación (DTUs), TcI-TcVI y TcBat, identificables mediante protocolos de genotipificación reproducibles (García et al., 2017;

Llovera et al., 2024; Zingales & Bartholomeu, 2022). Esta diversidad genética influye en la infectividad del parásito, su reproducción y diferenciación en los vectores, así como en la respuesta inmunitaria del hospedero y la progresión de la enfermedad (Silvestrini et al., 2024).

La EC, presenta un curso clínico multifásico que refleja tanto la patogénesis del parásito como las respuestas inmunológicas del hospedero. Tradicionalmente, se describe en tres fases clínicas: aguda, indeterminada y crónica sintomática, cada una con implicaciones diagnósticas, terapéuticas y epidemiológicas distintas (Pérez-Molina & Molina, 2018; Rassi et al., 2010).

Durante la fase aguda, que se presenta en las primeras semanas postinfección, la parasitemia es elevada y los síntomas pueden incluir fiebre prolongada, linfadenopatías, hepatomegalia, esplenomegalia y, en ocasiones, manifestaciones más específicas como el chagoma de inoculación o el signo de Romaña, característico de la forma oftálmica de la enfermedad. No obstante, en la mayoría de los casos esta fase es asintomática o se confunde con cuadros virales comunes, lo que dificulta el diagnóstico oportuno y favorece la progresión silente de la infección (Bern et al., 2019; Bonney et al., 2019).

Posteriormente, la infección progresa hacia una fase indeterminada, caracterizada por la aparente ausencia de síntomas clínicos, pero con persistencia del parásito en tejidos diana, en especial en el miocardio y el sistema nervioso entérico. Esta fase puede durar décadas y representa un reto clínico, ya que los individuos infectados pueden ser portadores asintomáticos sin acceso a seguimiento médico, lo que compromete tanto la vigilancia epidemiológica como la oportunidad de tratamiento temprano (Tarleton et al., 2014).

Aproximadamente entre el 30 y 40% de los pacientes desarrollan, años o décadas después de la primo-infección, una fase crónica sintomática. La presentación más frecuente es la miocardiopatía chagásica crónica, una entidad progresiva que incluye arritmias ventriculares, bloqueo auriculoventricular, insuficiencia cardíaca congestiva y fenómenos tromboembólicos. Asimismo, algunos pacientes presentan formas digestivas como megaesófago o megacolon, resultado de la denervación progresiva del sistema nervioso entérico causada por la persistente infección parasitaria (Bern et al., 2019; Rassi et al., 2010). Estas manifestaciones no solo deterioran la calidad de vida de los pacientes, sino

que representan una carga significativa para los sistemas de salud en términos de costos médicos, necesidad de dispositivos implantables, intervenciones quirúrgicas, y cuidados paliativos.

En este contexto, la complejidad clínica de la enfermedad no radica únicamente en su curso bifásico y las complicaciones multiorgánicas, sino también en la limitada disponibilidad de biomarcadores predictivos de progresión y en la escasa eficacia terapéutica en fases avanzadas. Estas limitaciones refuerzan la necesidad de un enfoque integral que combine la vigilancia activa de poblaciones en riesgo, el diagnóstico precoz, el acceso universal al tratamiento antiparasitario y el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas.

1.2.5. Tratamiento

Los primeros intentos de tratamiento contra la enfermedad de Chagas, iniciados poco después de su descubrimiento en 1909, utilizaron compuestos como arsenicales (atoxyl), antimoniales (tartar emético), colorantes (fucsina) y sales de mercurio, sin éxito. Durante la primera mitad del siglo XX, se evaluaron diversos agentes quimioterapéuticos, incluyendo derivados de quinoleína, antimaláricos, arsenicales y nitrofuranos (Laureano de Souza et al., 2023). En la década de 1950, Packchanian introdujo la nitrofurazona, que mostró alta eficacia en modelos murinos, pero generó efectos adversos severos en humanos, como polineuropatía sensitiva. El tratamiento actual de la EC se basa exclusivamente en dos nitroheterocíclicos: benznidazol (BZN) y nifurtimox (NFX), ambos desarrollados hace más de 50 años. Si bien su eficacia es alta en la fase aguda, su impacto en la fase crónica es limitado. Además, el tratamiento se ve obstaculizado por efectos adversos severos (rash cutáneo, neuropatías, toxicidad hepática) y esquemas de administración prolongados (de hasta 60 días). En algunas cepas de *T. cruzi* se han descrito perfiles de susceptibilidad reducida hacia estos compuestos, asociados al surgimiento de resistencia (Figura 3) (Chatelain, 2015; Jackson et al., 2020; Brener, 1968; OPAS/OMS, 1998).

El medicamento ideal para el tratamiento de la EC, según la OMS, debe lograr una cura completa tanto en fases agudas como crónicas, ser efectivo con pocas dosis, accesible y de bajo costo. Además, no debe provocar efectos secundarios graves ni riesgos teratogénicos y debe poder administrarse de forma ambulatoria, sin necesidad de

hospitalización. Estos requisitos buscan garantizar tratamientos eficaces y seguros para la erradicación de la enfermedad en poblaciones vulnerables (Coura & Castro, 2002).

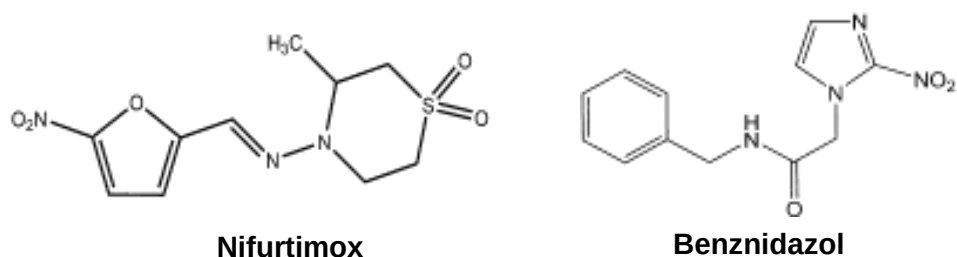


Figura 3. Fármacos nitroheterocíclicos clásicos utilizados en el tratamiento de la enfermedad de Chagas: nifurtimox y benznidazol.

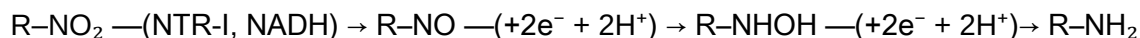
1.2.5.1. Nifurtimox

El nifurtimox, [3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenamina)-tetrahidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido], comercializado como Lampit®, es un fármaco proactivo de tipo nitrofurano que ha sido utilizado durante décadas para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Desde la química medicinal, su mecanismo de acción se caracteriza por una bioactivación selectiva mediada por enzimas del parásito que generan metabolitos altamente citotóxicos por su marcada reactividad contra diferentes biomoléculas (Patterson & Wyllie, 2014).

1.2.5.1.1. Bioactivación enzimática por nitroreductasas tipo I

En *T. cruzi*, la activación metabólica de NFX es catalizada principalmente por una nitroreductasa tipo I (TcNTR), una enzima dependiente de flavina mononucleótido (FMN) (Wilkinson et al., 2011). Esta enzima, ausente en células de mamíferos, es la que determina la susceptibilidad de *T. cruzi* por NFX, habiéndose demostrado experimentalmente que la sobreexpresión o pérdida funcional de la misma reduce o incrementa la susceptibilidad del parásito por este compuesto, respectivamente (Mejia et al., 2012; Wyllie et al., 2013). Además de participar en la activación de compuestos nitro-aromáticos, la NTR-I cumple funciones biológicas desconocidas pero esenciales para la supervivencia de tripanosomátidos (Wyllie et al., 2013).

NTR-I emplea NADH como cofactor y lleva a cabo una reducción secuencial y mediada por dos electrones del grupo nitro (Oliveira et al., 2010):

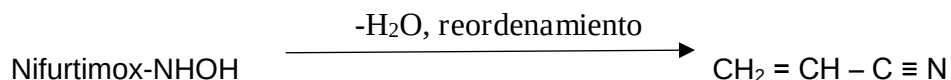


De manera más detallada, la transformación se puede describir en tres etapas:

- **Primer paso:** el grupo nitro (**R-NO₂**) se reduce a un intermedio **nitroso (R-NO)**.
- **Segundo paso:** el nitroso se reduce rápidamente a **hidroxilamina (R-NHOH)**, intermedio frecuentemente asociado a la bioactividad/toxicidad.
- **Tercer paso (posible):** puede ocurrir una reducción adicional hasta **amina primaria (R-NH₂)**. Sin embargo, en varios nitroheteroaromáticos la amina no es el principal determinante de citotoxicidad, ya sea porque se forma en menor proporción o porque el daño celular se origina en etapas previas.

La evidencia experimental indica que el intermedio hidroxilamina generado tras la reducción bioelectrónica del nifurtimox no constituye el metabolito citotóxico final. Estudios metabólicos demostraron que este intermediario sufre transformaciones químicas adicionales que incluyen apertura del anillo nitrofuránico y deshidratación, originando un metabolito nitrilo α,β -insaturado altamente electrofílico. Este producto puede comportarse como un aceptor de Michael y reaccionar con nucleófilos biológicos tales como grupos sulfhidrilo de proteínas y de la tripanotona, así como con bases nitrogenadas y grupos fosfato de biomoléculas. La formación de estos aductos covalentes produce daño celular directo e irreversible, y explica la actividad tripanocida del fármaco. La citotoxicidad no depende entonces de un proceso primario de generación de radicales libres, sino de la bioactivación metabólica selectiva mediada por la nitroreductasa tipo I presente en los tripanosomátidos (Cerecetto & González, 2011).

La hidroxilamina intermediaria sufre un reordenamiento químico mediante apertura del anillo furano, con la consiguiente eliminación de agua, generando un intermediario nitrilo de cadena abierta con insaturaciones conjugadas, típicamente del tipo α,β -insaturado (Penning et al., 2022):



Este compuesto insaturado funciona como un aceptor de Michael, electrofílico y con alta afección por grupos nucleofílicos como los tioles de cisteínas:

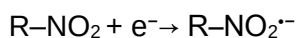


Este tipo de adición covalente a residuos críticos de proteínas puede conducir a una disrupción irreversible de funciones celulares esenciales, entre ellas la actividad enzimática, la síntesis de ADN o la señalización redox (Penning et al., 2022).

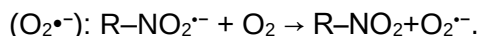
1.2.5.1.2. Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y genotoxicidad

Inicialmente, el mecanismo de acción del nifurtimox fue atribuido a la generación de especies reactivas de oxígeno mediante un proceso de reducción monoelectrónica y redox-cycling del grupo nitro. Sin embargo, evidencia experimental posterior demostró que este mecanismo no explica la citotoxicidad observada a concentraciones terapéuticamente relevantes.

Paralelamente, en condiciones aerobias puede ocurrir una activación por mecanismos de tipo II, en los que se genera un nitro anión radical ($\text{R-NO}_2^{\bullet-}$) vía una reducción monoelectrónica:



Este radical inestable transfiere su electrón al oxígeno molecular, formando superóxido



Este proceso, conocido como ciclo fútil, amplifica el estrés oxidativo generando ROS adicionales como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), los cuales causan: peroxidación lipídica, destruyendo la integridad de membranas celulares, oxidación de proteínas, desnaturalización y pérdida de actividad catalítica y daño al ADN, formando rupturas de doble cadena, aductos y mutaciones puntuales (Martinez et al., 1995; Sánchez, 2005).

Por otra parte, las especies intermedias generadas durante la bioactivación de NFX, particularmente las hidroxilaminas y nitrosos, poseen capacidad mutagénica demostrada mediante el ensayo de Ames (Trossero et al., 2006). También se ha reportado la formación

de nitrenios y nitrosaminas, los cuales pueden alquilar guaninas del ADN, generando mutaciones y activación de vías de muerte celular programada (Shamovsky et al., 2012).

Aunque tradicionalmente se ha propuesto que el mecanismo de acción de Nifurtimox (NFX) contra *Trypanosoma cruzi* está relacionado con la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante un proceso de redox-cycling, los resultados de (Boiani et al., 2010) indican que este proceso solo ocurre a concentraciones muy altas de NFX ($>400\ \mu\text{M}$), mucho mayores a las necesarias para su actividad antiproliferativa ($5\text{--}7\ \mu\text{M}$). Además, la disminución de los niveles de tioles observada tras el tratamiento con NFX no parece estar vinculada a la producción de ROS, sino más bien a la formación de productos de reducción del nitrogrupo, como los derivados nitroso y hidroxilamina, que interactúan directamente con los tioles del parásito. Esto sugiere que el mecanismo de acción de NFX no es consecuencia directa de la generación de especies reactivas del oxígeno, sino de procesos relacionados con su biotransformación y la acción de sus metabolitos sobre componentes celulares específicos de *T. cruzi*, algunos de los cuales (ej. depleción de tioles por conjugación) pueden derivar en un desbalance redox.

1.2.5.2 Nuevos compuestos nitroaromáticos en fase de desarrollo

El éxito de combinaciones como NECT (nifurtimox-eflornitina) y la eficacia preclínica de fexinidazol han reavivado el interés en los nitroaromáticos como plataformas viables para el tratamiento de enfermedades causadas por tripanosomátidos. Aunque históricamente su desarrollo ha estado limitado por preocupaciones sobre toxicidad y genotoxicidad, recientes avances en la comprensión de sus mecanismos de acción, así como una mejor definición de las características deseadas para el producto farmacológico que priorizan tratamientos orales de corta duración, han favorecido su reposicionamiento (Chatelain & Ioset, 2011; Pettersson et al., 2016).

Entre las nuevas generaciones de compuestos destacan las 5-nitro-2-furancarboxilamidas, que han demostrado una potencia *in vitro* hasta 1000 veces mayor que el NFX frente a formas sanguíneas de *T. b. brucei* (Zhou et al., 2013). Paralelamente, se han identificado derivados aziridinil-2,4-dinitrobencílicos con potente actividad frente a amastigotes de *Leishmania donovani* (ej. CE_{50} inferiores a $100\ \text{nM}$; (Voak et al., 2013).

Un compuesto particularmente prometedor es el enantiómero (R)-PA-824 (pretomanid), un nitroimidazopirano originalmente desarrollado para tuberculosis, que al ser administrado de forma oral (100 mg/kg dos veces al día) a ratones infectados con *L. donovani* mostró una eficacia >99% (Patterson et al., 2013). Otro candidato en fase avanzada es DNDI-VL-2098, un derivado nitroimidazólico que muestra alta eficacia y tolerabilidad en estudios preclínicos, y forma parte de la cartera estratégica de DNDi para el tratamiento de la leishmaniasis visceral (DNDi, n.d.).

1.2.5.3 Benznidazol

1.2.5.3.1 Naturaleza química, activación enzimática y productos citotóxicos

El benznidazol es un derivado del 2-nitroimidazol, N-benzil-2-(2-nitro-1H-imidazol-1-il) acetamida. Su grupo funcional nitro ($-\text{NO}_2$) es esencial para su actividad tripanocida. BNZ actúa como profármaco, siendo activado intracelularmente por la NTR-I mediante un mecanismo similar al descrito para otros nitroaromáticos (Maya et al., 2007; Pettersson et al., 2016).

La activación involucra una reducción bi-electrónica del grupo nitro en dos pasos:

- $\text{R-NO}_2 + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{R-NO}$ (intermediario nitroso)
- $\text{R-NO} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightarrow \text{R-NHOH}$ (hidroxilamina)

La hidroxilamina (R-NHOH) generada es inestable y puede transformarse, por reordenamiento no enzimático u oxidación espontánea, en glicoxal o en intermediarios nitrilo electrofílicos derivados de la apertura del anillo furano (Boiani et al., 2010; Hall et al., 2011). Estos metabolitos actúan como agentes alquilantes capaces de formar enlaces covalentes con tioles de tripanotona y glutatión, este último se transforma en un precursor de la bioactivación de múltiples mecanismos.

La conjugación con glutatión es clásicamente descrita como un mecanismo de detoxificación celular. No obstante, diversos estudios han demostrado que, en determinados contextos bioquímicos, este proceso puede resultar en la bioactivación de

xenobióticos, generando metabolitos con mayor reactividad química que el compuesto original (Dekant & Vamvakas, 1993; van Bladeren, 2000).

En este escenario, los metabolitos electrofílicos derivados actúan como agentes alquilantes, capaces de establecer enlaces covalentes con diversas biomoléculas. Dichas interacciones ocurren principalmente con tioles celulares, tales como los presentes en glutatión (GSH) y tripanotona ($T[SH]_2$), así como con los grupos amino de proteínas estructurales y con las bases nitrogenadas del ADN, particularmente la guanina (Liu et al., 2020). El glutatión puede capturar estos intermediarios reactivos a través de su grupo sulfhidrilo, dando lugar a la formación de conjugados estables, lo cual representa una primera línea de defensa celular frente a especies electrofílicas (Liu et al., 2020).

Sin embargo, cuando la disponibilidad intracelular de glutatión disminuye por debajo de un umbral crítico, la capacidad de detoxificación se ve comprometida. En estas condiciones, los metabolitos reactivos no son neutralizados eficientemente y reaccionan de forma irreversible con macromoléculas celulares esenciales, promoviendo procesos como la peroxidación lipídica, la inactivación de enzimas redox-dependientes y alteraciones estructurales en proteínas y ácidos nucleicos (Comporti, 1987). Este fenómeno conlleva una disrupción significativa de la homeostasis redox dependiente de tioles, y ha sido reconocido como un evento clave en la citotoxicidad inducida por compuestos nitroaromáticos y otros xenobióticos bioactivables (Counihan et al., 2016).

1.2.5.3.2 Oxidación del pool de nucleótidos y daño genómico

Estudios recientes demostraron que el BNZ oxida el pool de nucleótidos, en particular generando 8-oxodGTP, que se incorpora erróneamente al ADN durante la replicación. Esto causa mutaciones por transversión (AT→CG) y fragmentación de la doble hebra (DSBs) del ADN nuclear y mitocondrial (Rajão et al., 2014).

La sobreexpresión de MutT (una pirofosfotidilasa bacteriana que degrada 8-oxodGTP) en *T. cruzi* redujo la citotoxicidad del fármaco, mientras que la sobreexpresión de TcOgg1 o TcMutY (glicosilasas reparadoras de 8-oxoG) no modificó la resistencia, lo que refuerza la idea que el daño se genera antes de la incorporación al ADN, y que, si esto último ocurre, el daño en la macromolécula es irreparable (Jayawardhana et al., 2023).

En ese sentido, estudios de microscopía electrónica y electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) revelaron que el BNZ induce la descondensación de la heterocromatina y la fragmentación del ADN, evidencias claras de DSBs. La sobreexpresión de TcRad51, una recombinasa esencial en la reparación del ADN por recombinación homóloga, aumentó la supervivencia frente al tratamiento con este fármaco (Rajão et al., 2014). Esto demuestra que el ADN es un importante blanco molecular del BNZ y que la reparación del daño por recombinación es una respuesta crítica del parásito.

También se observaron alteraciones a nivel mitocondrial (kinetoplasto), el cual incluyó cambios en la permeabilidad y ultraestructura, daño del ADN de esta organelo. La sobreexpresión de TcPol β y TcPol κ , ambas polimerasas mitocondriales de reparación y translación, confirió resistencia contra este fármaco, corroborando así uno de los blancos de acción de este compuesto (Rajão et al., 2014).

1.3. Tripanosomiasis Africana Humana

1.3.1 Epidemiología

La tripanosomiasis africana humana (HAT, del inglés: Human African Trypanosomiasis) conocida también como enfermedad del sueño, es una enfermedad zoonótica y letal, causada por tripanosomas pertenecientes al complejo *Trypanosoma brucei* (Kennedy, 2019; Malvy & Chappuis, 2011). En concordancia con la distribución geográfica del vector, esta enfermedad es endémica en África subsahariana, donde las moscas tsé-tsé habitan de forma natural, aunque solo ciertas especies transmiten la enfermedad lo que genera variaciones marcadas incluso entre comunidades vecinas (Malvy & Chappuis, 2011). Actualmente, aproximadamente 1,5 millones de personas se encuentran en riesgo moderado a alto, y el 20 % de los casos afectan a niños. En 2023 se diagnosticaron menos de 600 casos de la subespecie *Trypanosoma brucei gambiense*, un número muy inferior a los más de 38.000 registrados en 1998, aunque históricamente se han sucedido epidemias mortales durante periodos en los que la enfermedad parecía controlada (DNDi 2024). Las infecciones por *T. b. gambiense* ocurren principalmente en 24 países de África occidental y central, mientras que los casos producidos por *T. b. rhodesiense* predominan en 13 países del este y sur del continente (Figura 4). Asimismo, en 2023 la República Democrática del Congo concentró el 69 % de todos los casos reportados, estableciéndose como epicentro persistente de la transmisión (DNDi 2024).

Esta enfermedad afecta principalmente a comunidades rurales dedicadas a actividades como la agricultura, la pesca, la ganadería o la caza, cuyas condiciones —como la convivencia cercana con ecosistemas habitados por el vector y el difícil acceso a servicios sanitarios— complican un diagnóstico y tratamiento oportuno y adecuado (Franco et al., 2022; World Health Organization (WHO), 2023).

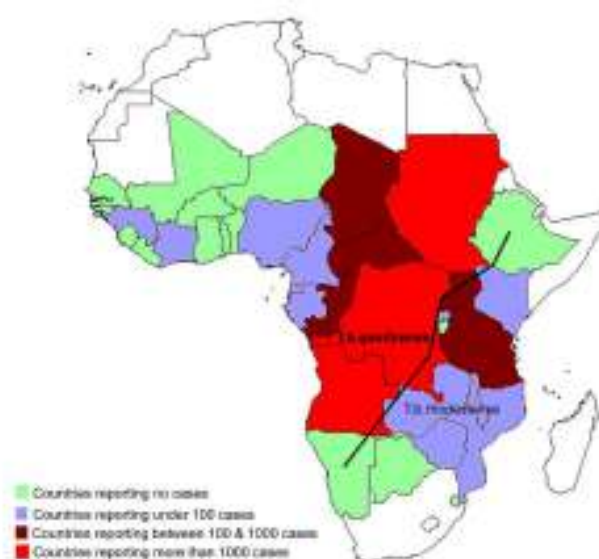


Figura 4. Distribución geográfica de la tripanosomiasis africana (enfermedad del sueño) en países del África subsahariana.

En verde: países sin casos reportados; azul: menos de 100 casos; marrón: entre 100 y 1000 casos; rojo: más de 1000 casos. Traducción y Adaptación de Fundación io (s. f.).

En los últimos 20 años, los esfuerzos sostenidos de control vectorial, vigilancia epidemiológica, detección activa de casos y mejora de las estrategias terapéuticas han resultado en una reducción del 97% en el número de nuevos casos reportados de HAT (Franco et al., 2022). Tal es así que al 2025 ya son 10 los países (Benin, Chad, Costa de Marfil, Guinea Ecuatorial, Ghana, Guinea, Kenia, Ruanda, Togo, y Uganda) que han declarado la eliminación de la HAT como un problema de salud pública (Barrett et al., 2024). No obstante, el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad siguen siendo procedimientos complejos que requieren habilidades clínicas específicas, especialmente en zonas rurales con limitada infraestructura sanitaria. Como para muchas otras enfermedades zoonóticas, un estudio reciente destaca que la erradicación total del patógeno es casi imposible (por la presencia de reservorios selváticos) y que las medidas de control sostenido son la única forma de mantener a raya los casos de HAT (Meisner et al., 2023).

Vale la pena destacar que a diferencia de *T. cruzi*, varias especies de tripanosomas africanos (*T. b. brucei*, *T. congolense*, *T. vivax*, etc.) infectan ganado, lo cual no solo provoca grandes pérdidas económicas sino también impacta en la nutrición humana (ej. alimentos derivados de animales) y capacidad productiva de los países afectados (Okello et al., 2022). Este es un problema que está lejos de ser resuelto en dicho continente.

1.3.2. Ciclo de Vida

El ciclo de vida de *T. brucei*, es complejo y está estrechamente vinculado a su vector exclusivo, la mosca tsé-tsé (*Glossina* spp.) (Malvy & Chappuis, 2011; World Health Organization (WHO), n.d.). La infección en el ser humano inicia cuando una mosca tsé-tsé infectada inocula tripomastigotes metacíclicos no replicativos durante su alimentación hematófaga (Figura 5). Estas formas metacíclicas rápidamente invaden el sistema linfático y la sangre del huésped vertebrado, donde se transforman en tripomastigotes sanguíneos de replicación activa. A diferencia de otros protozoos parasitarios, *T. b. brucei* es un parásito extracelular que prolifera en fluidos corporales como la sangre, la linfa y, en estadios avanzados, en el líquido cefalorraquídeo (Brun et al., 2010; Malvy & Chappuis, 2011).

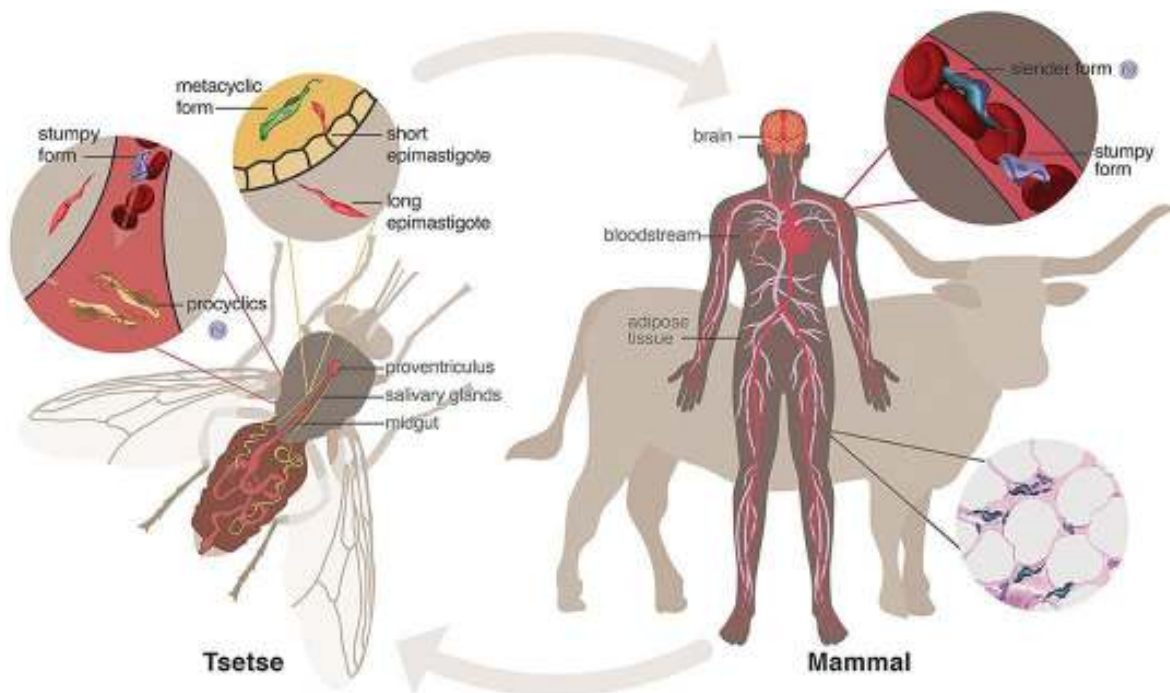


Figura 5. Ciclo de vida de *T. brucei*.

Las moscas tsé-tsé ingieren formas tripomastigotes sanguíneas achaparradas ("stumpy", no replicativas) durante la picadura, las cuales migran al intestino medio y se diferencian en formas procíclicas. Estas evolucionan hacia formas intermedias (epimastigotes) que colonizan las glándulas salivales, donde se transforman en tripomastigotes metacíclicos infectivos. En el hospedero mamífero, los parásitos inoculados se transforman en tripomastigotes sanguíneos (con morfología alargada y delgada) altamente replicativos, que pueden circular en sangre e invadir el espacio intersticial del sistema nervioso central (cerebro) y del tejido adiposo. Durante la infección, una gran parte de la población parasitaria se diferencia a la forma "stumpy", la cual tiene capacidad de sobrevivir y diferenciarse en el intestino del insecto. Traducción y adaptación de Rijo-Ferreira et al., 2017.

Los tripomastigotes sanguíneos exhiben un notable mecanismo de evasión inmune basado en la variación antigénica de su glicoproteína de superficie (VSG, del inglés: Variable Surface Glycoprotein), la cual permite al parásito evitar el reconocimiento y eliminación por anticuerpos específicos del huésped (Holzmuller et al., 2018; Vincendeau & Bouteille, 2006). Esto lo logra mediante cambios periódicos y estocásticos en la expresión de los genes que codifican para las diferentes isoformas de estas proteínas. Dado que las VSG son altamente inmunogénicas, el sostenido recambio de las mismas produce un agotamiento del sistema inmune humoral (y también de la respuesta inmune celular) que contribuye a la patogénesis de la enfermedad al inducir una activación inmunitaria crónica e ineficaz.

Cuando una mosca tsé-tsé se alimenta de la sangre de un huésped parasitado, ingiere tripomastigotes sanguíneos que inician un nuevo ciclo en el vector. Dentro del intestino medio de la mosca, los tripomastigotes se transforman en formas procíclicas, adaptadas al ambiente del intestino, donde proliferan activamente (Malvy & Chappuis, 2011). Posteriormente, las formas procíclicas migran hacia el intestino anterior y la glándula salival del insecto, donde sufren nuevas transformaciones, primero en tripomastigotes epimastigotes y luego en tripomastigotes metacíclicos infecciosos. Estas últimas son las formas que serán transmitidas al humano durante una nueva picadura.

El ciclo en el vector no es completamente eficiente: menos del 1% de las moscas que se alimentan de un huésped infectado desarrollan una infección madura capaz de transmitir al parásito (Simarro et al., 2010). Esta baja tasa de transmisión vectorial se debe

a que el insecto posee mecanismos de defensa biológicos y físico-químicos que dificultan la proliferación y diferenciación del patógeno (Van Den Abbeele et al., 2010).

Finalmente, es importante destacar que el ciclo de vida y la epidemiología difieren entre *T. b. gambiense* y *T. b. rhodesiense*. El primero de ellos mantiene un ciclo de transmisión que es predominantemente antroponótico, mientras que para *T. b. rhodesiense* es zoonótico, siendo los animales ungulados salvajes y el ganado bovino importantes reservorios del parásito (Brun et al., 2010; Malvy & Chappuis, 2011; Simarro et al., 2010).

La comprensión del ciclo de vida de *T. b. brucei* ha sido fundamental para la implementación de estrategias de control y reducción de la densidad de la mosca tsé-tsé en los focos endémicos, que han contribuido al control y/o eliminación de HAT de algunas zonas endémicas.

1.3.3. Clínica de la enfermedad

Se distinguen dos formas clínicas principales de la enfermedad que guardan una fuerte asociación con la subespecie de *T. brucei* que la causa. Por ejemplo, *T. b. gambiense* se caracteriza por desarrollar una enfermedad de evolución tipo crónica, en la cual los individuos pueden permanecer infectados durante meses o años sin síntomas significativos. Cuando las manifestaciones clínicas se hacen evidentes, la enfermedad suele encontrarse ya en un estadio avanzado, con afectación del sistema nervioso central, lo cual se manifiesta bajo la forma de una meningoencefalitis (Franco et al., 2022; World Health Organization (WHO), 2023). Por el contrario, *T. b. rhodesiense* provoca una enfermedad aguda, de desarrollo rápido dado que los síntomas se hacen patentes a las pocas semanas o meses post-infección. Esta infección progresa rápidamente hacia la invasión multiorgánica (incluyendo el sistema nervioso central) y el colapso multi-sistémico (sepsis). Su manejo clínico requiere intervención urgente (Franco et al., 2022; World Health Organization (WHO), 2023). Por distribución geográfica y las características antroponóticas de la enfermedad, los casos de HAT por *T. b. gambiense* (92%) superan ampliamente a los causados por *T. b. rhodesiense* (8%).

1.3.4. Tratamiento

El tratamiento de la HAT se define en función de la fase de la enfermedad y de la subespecie de parásito que la causa (Figura 6 y Tabla 1). En la fase hemolinfática (fase I) o aguda, donde los parásitos residen a nivel sistémico (sangre y linfa) y aún no han invadido el sistema nervioso central, el tratamiento recomendado es la administración intramuscular de pentamidina durante siete días. Este fármaco presenta alta eficacia, buena tolerabilidad y facilidad de administración en contextos de atención ambulatoria, lo que resulta crucial en zonas rurales de África subsahariana donde los recursos sanitarios son limitados (Brun et al., 2010; Burri, 2010).

Cuando la infección progresa a la fase meningoencefálica (fase II) o crónica, caracterizada por el compromiso del sistema nervioso central, la terapia combinada de NFX y eflornitina (NECT) se ha establecido como el estándar terapéutico actual. Desarrollada a partir de colaboraciones entre DNDi, Médicos Sin Fronteras (MSF) y Epicentre. La NECT ha demostrado una eficacia comparable a la de los tratamientos previos (eflornitina o melarsoprol), pero con una toxicidad considerablemente menor y una simplificación del régimen terapéutico (Malvy & Chappuis, 2011; Priotto et al., 2009). Sin embargo, eflornitina muestra una baja eficacia para el tratamiento de la HAT causada por *T. b. rodhesiense*, debido a que el enzima blanco de inhibición (ornitina decarboxilasa) de esta sub-especie presenta una tasa de recambio superior a la de *T. b. gambiense*.

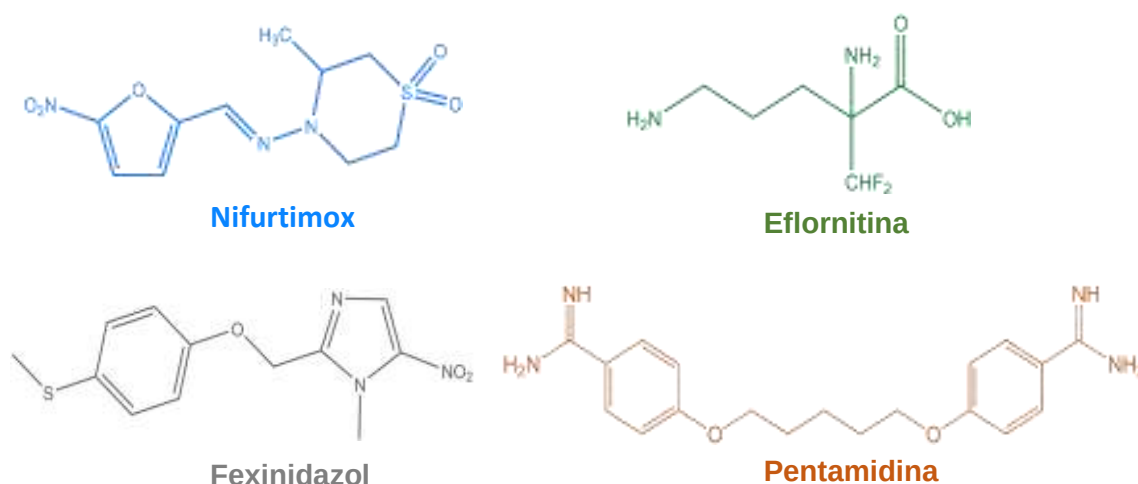


Figura 6. Representación de las estructuras químicas de los principales fármacos utilizados en el tratamiento de la tripanosomiasis africana.

En **azul**, se muestra **nifurtimox**, un derivado nitrofuranilo que, tras su bioactivación por la nitro-reductasa tipo I (NTR-I), genera especies reactivas citotóxicas. En **verde**, **eflornitina**, inhibidor irreversible de la ornitina descarboxilasa, utilizado junto con nifurtimox en la terapia NECT. En **gris**, **fexinidazol**, un profármaco nitro-heterocíclico activado por NTR-I, indicado para las fases hemolinfática y meningoencefálica de la enfermedad. En **naranja**, **pentamidina**, una diamidina aromática que interfiere con la síntesis de ácidos nucleicos y la captación de poliaminas.

Antes del advenimiento de la NECT, el tratamiento de la fase avanzada dependía exclusivamente del melarsoprol, un derivado arsenical desarrollado en 1949. Aunque inicialmente efectivo, su utilización se vio severamente limitada por su elevada toxicidad, incluyendo encefalopatía reactiva letal en hasta el 10% de los pacientes tratados (Burri, 2010; P. G. Kennedy, 2013).

Tabla 1. Alternativas farmacológicas para tratar la tripanosomiasis africana

Combinación farmacológica	Resultado	Clínica
Nifurtimox + Eflornitina (NECT)	Alta eficacia contra T. b. gambiense (fase meningoencefálica); cura >90% en ensayos clínicos	Reduce duración y toxicidad comparado con monoterapia de eflornitina
Pentamidina (monoterapia inicial) + tratamientos complementarios	Tratamiento efectivo en la fase hemolinfática en infecciones por T. b. gambiense	No es combinación estricta, pero se usa secuencialmente para controlar fases iniciales
Fexinidazol (monoterapia oral)	Cura fase hemolinfática y meningoencefálica en infecciones por T. b. gambiense	Sustituye combinaciones anteriores en algunos casos por ser un tratamiento totalmente oral

Un avance fundamental en la terapéutica de la HAT fue la aprobación en 2018 del fexinidazol para el tratamiento oral y con buena eficacia de ambas fases de la infección causada por T. b. gambiense. Este fármaco ha revolucionado el abordaje de la enfermedad al permitir una administración completamente ambulatoria (10 días de tratamiento) y de esta forma eliminar la necesidad de hospitalización prolongada y mejorar la adhesión de los

pacientes a la quimioterapia (Mesu et al., 2018). Sin embargo, en contextos donde el acceso a fexinidazol es aún limitado, la NECT continúa siendo una opción segura y altamente efectiva.

A continuación, se describen las características más relevantes de dos de los fármacos que representaron un hito en el tratamiento de HAT.

1.3.4.1. Eflornitina

La eflornitina (α -difluorometilornitina, DFMO) es un inhibidor irreversible de la enzima ornitina descarboxilasa (ODC), la cual cataliza el primer paso y etapa limitante en la biosíntesis de poliaminas, concretamente la conversión de ornitina en putrescina, precursor esencial en la síntesis de poliaminas como espermidina y espermina (Wishart et al., 2018). Estos metabolitos alifáticos y cargados positivamente asisten numerosos procesos celulares, incluyendo la replicación del ADN, la transcripción génica, la diferenciación celular y la proliferación.

La eflornitina actúa como un análogo suicida del sustrato natural de la ODC. Tras su unión y reacción con residuos del sitio activo de la enzima, esta se transforma en un intermediario inestable que forma un enlace covalente irreversible con la cisteína catalítica (Burri, 2010; Wishart et al., 2018). Esta inhibición resulta en la inactivación permanentemente de la ODC lo cual se traduce en una depleción intracelular de poliaminas y una acumulación del precursor S-AdoMetC, el cual sirve como sustrato para la metilación de diferentes macromoléculas, como ser el ADN. Este escenario metabólico desfavorable conduce a la interrupción de procesos vitales para la viabilidad y proliferación celular (Jobanputra et al., 2007; Wishart et al., 2018). Si bien se trata de un compuesto con características químicas desfavorables para permear membranas (ej. molécula zwitteriónica y altamente polar), a las dosis terapéuticas empleadas ha demostrado tener capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, característica fundamental para su eficacia en la fase meningoencefálica de la enfermedad (Coyne, 2001).

Estudios farmacocinéticos mostraron que menos del 1% de la eflornitina es absorbida sistémicamente (Namazi, 2008). Tras la administración oral, ésta alcanza concentraciones plasmáticas máximas (C_{max}) a las 3,5 h, no sufre una marcada metabolización y es excretada casi en su totalidad y de forma inalterada en la orina, con

una vida media plasmática que oscila entre 3,5 a 8 h (Namazi, 2008). Su volumen de distribución moderado (24,3 L), compatible con su baja biodisponibilidad tisular, y su falta de unión significativa a proteínas plasmáticas favorecen su buena biodisponibilidad a nivel sistémico y su perfil farmacocinético estable (Namazi, 2008).

Los efectos adversos reportados incluyen reacciones leves y transitorias como acné, eritema, irritación cutánea y prurito, resolviéndose habitualmente sin necesidad de interrumpir el tratamiento (DrugBank, 2024).

1.3.4.2. Fexinidazol

El fexinidazol 1-metil-2-[(4-nitrofenil) tio]-5-nitro-1H-imidazol, es una nitroimidazolina redescubierta y desarrollada como el primer tratamiento completamente oral para la HAT causada por *T. b. gambiense*. Después de su administración oral, fexinidazol se absorbe sistémicamente y es biotransformado en dos principales metabolitos activos: el fexinidazol sulfóxido y el fexinidazol sulfona. Ambos metabolitos conservan potencia antiparasitaria significativa y son considerados corresponsables de la eficacia clínica del tratamiento (DNDi The Drugs for Neglected Diseases initiative, 2024b, 2024a).

Al igual que otros nitro-aromáticos, este compuesto se comporta como un fármaco que sufre bio-reducción enzimática catalizada por la NTR-I del parásito, y convierte al grupo nitro en intermediarios reactivos como el radical nitroso (-NO) y la hidroxilamina (-NHOH), esenciales para su actividad citotóxica. Estos productos de reducción forman aductos covalentes con macromoléculas como el ADN, las proteínas y los lípidos, comprometiendo su funcionalidad (Torreele et al., 2010; Patterson & Wyllie, 2014). Dentro de los efectos asociados a estos blancos moleculares se ha descrito la fragmentación, mutación, entrecruzamiento y alteración de la replicación del ADN (Patterson & Wyllie, 2014). También se ha propuesto que la reducción genera especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés: reactive oxygen species) y nitrógeno (RNS, del inglés: reactive nitrogen species), que producen estrés oxidativo.

Tal como se mencionará anteriormente para el NFX y BZN, la expresión de NTR-I por parte de los tripanosomátidos les confiere a estas células una mayor sensibilidad al fexinidazol brucei y proporciona una ventaja terapéutica importante al reducir los efectos colaterales en el hospedero (Patterson & Wyllie, 2014).

1.4. Leishmaniasis

1.4.1 Epidemiología y transmisión

La leishmaniasis es causada por protozoos del género *Leishmania*, los cuales son transmitidos a través de la picadura de hembras de insectos flebótomos (Diptera: Psychodidae). La uniformidad morfológica entre las diferentes especies de *Leishmania* torna compleja su clasificación taxonómica basada en criterios microscópicos y desde hace algunas décadas se apoya en métodos: 1) bioquímicos, basados en la identificación de patrones de isoenzimas (zimodemas), 2) inmunobiológicos, que emplean anticuerpos monoclonales específicos (serodemas), y 3) moleculares, como la hibridación del ADN del kinetoplasto o el análisis de secuencias (marcadores moleculares), junto con pruebas de infectividad y comportamiento biológico en vectores, modelos animales y cultivos in vitro (Kwakye-Nuako et al., 2015; Mayrink et al., 2006; Quiroga et al., 2017; Salloum et al., 2016).

Los vectores que transmiten *Leishmania* pertenecen principalmente a los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en América (González et al., 2015). Su transmisión se ve facilitada por factores como la pobreza, la malnutrición, los desplazamientos poblacionales, la inmunosupresión, y los cambios ambientales derivados de la urbanización o la deforestación ((OMS), 2023; Akhoundi et al., 2016).

Aunque se han descrito más de 350 especies de flebótomos, de acuerdo a criterios entomológicos, parasitológicos y epidemiológicos, solo alrededor de 88 se consideran competentes para transmitir *Leishmania* (Maroli et al., 2013). La plasticidad ecológica de varias de estas especies (ej. *Lutzomyia longipalpis* y *Phlebotomus papatasi*) les permite habitar regiones tropicales, subtropicales y áridas, así como zonas periurbanas, incrementando así el riesgo de exposición humana (Akhoundi et al., 2016; Alvar et al., 2012; Ready, 2013).

El número de nuevos casos que tienen lugar anualmente ronda los 700.000 a 1 millón (Figura 7), aunque esta cifra sea probablemente superior ya que muchos de ellos no son notificados por falta de acceso a diagnóstico y tratamiento. La forma visceral de esta enfermedad está ampliamente distribuida en la región oriental de África, en Brasil y en India, mientras que la forma cutánea predomina en áreas de América Latina, el Mediterráneo oriental y Asia central ((OMS), 2023a; Figura 7). Adicionalmente, se reconocen otras

manifestaciones clínicas como la leishmaniasis cutánea poskala-azar y la coinfección con el VIH, que representan desafíos diagnósticos y terapéuticos importantes.

Desde el punto de vista epidemiológico, la leishmaniasis es una enfermedad zoonótica compleja en la que el ser humano actúa en la mayoría de los casos como hospedador secundario o incidental, involucrándose en ciclos silvestres donde el parásito circula naturalmente entre mamíferos reservorios y vectores hematófagos.

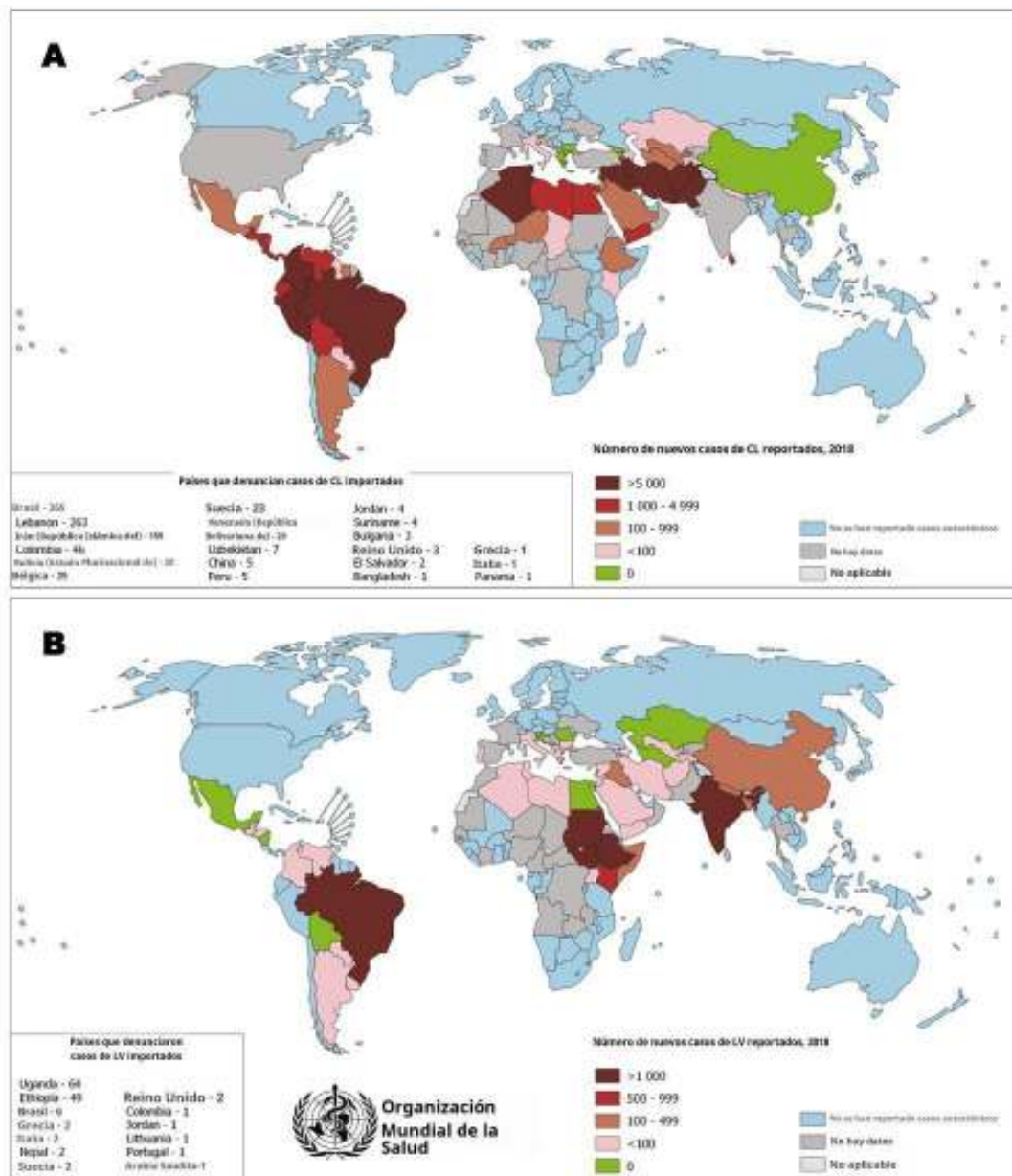


Figura 7. Distribución mundial de la leishmaniasis.

Los mapas muestran la distribución global y el número de casos reportados en 2018 para (A) la leishmaniasis cutánea y (B) la leishmaniasis visceral. Traducido y adaptado de <https://www.stopleishmania.org/es/leishmaniosis-humanos.php>

Diversos estudios han identificado a roedores, marsupiales, cánidos silvestres y domésticos, así como a primates no humanos, como reservorios vertebrados claves para la persistencia del parásito en diferentes regiones ecológicas (Acardi et al., 2013; Jansen et al., 2017). En particular, los cánidos domésticos (*Canis lupus familiaris*) han sido ampliamente reconocidos como los principales reservorios urbanos de *Leishmania*

infantum, desempeñando un papel central en la transmisión al humano en focos endémicos de leishmaniasis visceral (Otranto et al., 2015; Palatnik-de-Sousa & Day, 2011).

1.4.2. Ciclo de Vida

Durante su ciclo de vida, el parásito transita entre estadios diferenciados que le permiten colonizar y sobrevivir en el tubo digestivo y glándulas salivales del insecto vector (forma promastigote), o en el fagolisosoma de células de la progenie monocítica, principalmente los macrófagos (forma amastigote; Figura 8). La forma promastigote presenta una morfología fusiforme de 14 a 20 μm de largo por 2 a 4 μm de ancho, con un flagelo anterior libre que emerge del complejo flagelar. Además de presentar motilidad, este estadio es replicativo. Durante su alimentación, el insecto regurgita saliva la cual, además de contener parásitos promastigotes infectivos (o promastigotes metacíclicos), contiene biomoléculas vasodilatadoras y proinflamatorias que favorecen la irrigación sanguínea en el sitio de la picadura y promueven la migración de células del sistema inmune (ej. macrófagos) (Zer et al., 2001). En ese sentido, a diferencia de *T. cruzi*, que infecta cualquier tipo celular nucleado, *Leishmania* muestra una gran selectividad por invadir células del sistema fagocítico mononuclear (Yuill & Sousa, 2010). Esto se debe a la presencia de moléculas de superficie en la membrana del parásito (como GP63 y los lipofosfoglicanos: LPG) que le permiten interaccionar de manera específica con receptores de células monocíticas (ej. CR3, TLR4 y de Fc; (Depypere et al., 2022)). Estas interacciones señalizan y facilitan la fagocitosis del patógeno. El pH ácido de esta vacuola parasitófora favorece la diferenciación del parásito a la forma amastigote. Este estadio presenta una forma ovoide o esférica de 2 a 5 μm de diámetro, con un núcleo central y un kinetoplasto prominente, carece de flagelo y presenta una tasa de replicación significativamente inferior a los promastigotas (Dandugudumula et al., 2022; Sunter & Gull, 2017). Un aspecto aparentemente contradictorio es que el parásito haya evolucionado a infectar un linaje que forma parte de la primera línea de defensa inmune celular de los mamíferos, los macrófagos. Sin embargo, tanto GP63 como los LPG y otras proteínas del parásito (ej. cisteín proteasas) contribuyen a inhibir la maduración del fagolisosoma y la producción de especies citotóxicas (Dousti et al., 2023; Merida-de-Barros et al., 2018).

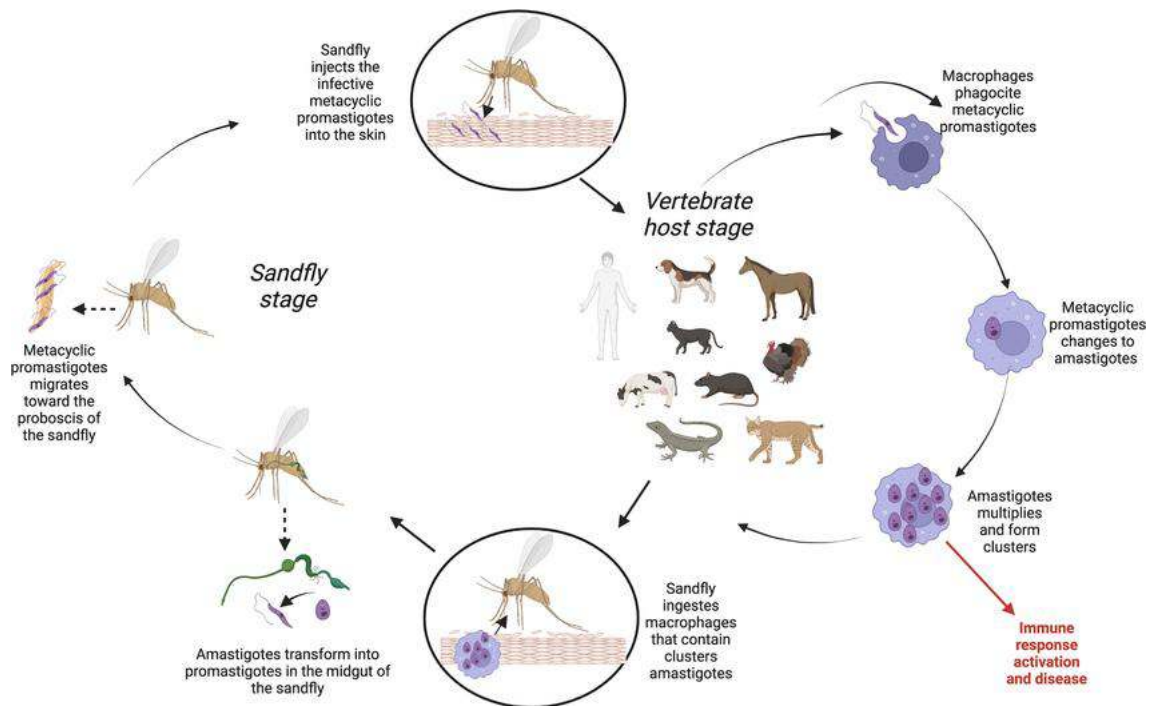


Figura 8. Ciclo de vida de Leishmania.

El ciclo infeccioso se inicia con la picadura de un insecto flebótomo el cual inyecta promastigotes metacíclicos en la dermis del mamífero. Estos son fagocitados por macrófagos y en su interior (vacuola parasitófora o fagolisosoma inmadura) se diferencian a amastigotes. Estos se multiplican por fisión binaria y se liberan al medio extracelular luego de la lisis de la célula huésped. Dada que la población de macrófagos reside principalmente en órganos y tejidos del sistema retículo endotelial (bazo, hígado, médula y ganglios linfáticos), la liberación de parásitos activa la respuesta inmune y favorece la colonización de nuevas células. Al alimentarse de una persona infectada, el flebótomo puede ingerir macrófagos infectados, los cuales se lisan en el intestino medio del insecto, liberando amastigotes que rápidamente se transforman en promastigotes y luego en promastigotes metacíclicos que migran a la proboscis, cerrando el ciclo. Adaptado de Montaner 2023. Figura elaborada con BioRender.com.

1.4.3. Clínica de la enfermedad

Clínicamente, la leishmaniasis se manifiesta bajo tres formas principales: la leishmaniasis visceral (kala-azar), la más grave, que compromete la función hepática y del bazo, siendo letal en más del 95 % de los casos no tratados; la leishmaniasis cutánea, que es la forma más común y se caracteriza por la formación de úlceras dérmicas crónicas; y la leishmaniasis mucocutánea, caracterizada por el compromiso de las membranas mucosas, especialmente de la nariz, boca y tráquea.

Leishmaniasis visceral: se la denomina kala-azar (significa «enfermedad negra») y sus agentes causales son *L. donovani*, que predomina en el subcontinente indio, China, África e Irak; *L. infantum*, predominante en la cuenca del Mediterráneo europeo y africano, y *L. chagasi*, causante de la leishmaniasis visceral en América (Akhoundi et al., 2016). En las áreas endémicas, entre el 30 y 100% de las personas infectadas no presenta síntomas. El período de incubación promedio es de 2 a 4 meses, con un rango entre 3 semanas y más de dos años.

La enfermedad clásica se caracteriza por la presencia de fiebre, esplenomegalia y anemia, aunque también es común que la forma aguda de la enfermedad curse sin ninguna de estas manifestaciones. En las áreas endémicas, algunos individuos pueden desarrollar enfermedad oligosintomática, caracterizada por tos, diarrea, fiebre baja y ausencia de visceromegalias. En estos individuos no se desarrolla la forma clásica de leishmaniasis visceral y se recuperan espontáneamente (Hepburn, 2003). Vale la pena destacar que los pacientes con leishmaniasis visceral presentan un alto grado de inmunosupresión debido a que el sistema fagocítico mononuclear se ve seriamente afectado producto de la infección por el parásito. Por lo tanto, es muy común que estas personas sean altamente susceptibles a infecciones oportunistas por otros patógenos. De la misma manera es muy común observar casos de co-infección entre HIV y leishmaniasis.

Leishmaniasis (muco)cutánea: Estas variantes de la enfermedad muestran una distribución similar al de la leishmaniasis visceral. En el continente americano se extienden desde el sur de Estados Unidos hasta el norte de Argentina. Se encuentran libres de transmisión Canadá, Chile, Uruguay y la mayoría de las islas del Caribe. Más allá de algunas diferencias puntuales entre la leishmaniasis cutánea que se presenta en países del Viejo Mundo y la del Nuevo Mundo, la manifestación clínica típica es la formación de una lesión ulcerosa en el sitio de la picadura. Esta aparece como un eritema pruriginoso que evoluciona a pápula y vesícula pustulosa de base indurada, que luego se abre como una pequeña úlcera, que se cubre de una costra (Singh et al., 2012). La lesión inicial puede ser única o múltiple y, en ocasiones, las lesiones pueden confluir; estas úlceras de mayor tamaño, generalmente, tienen bordes netos y edematosos con un color violáceo, son indoloras y, cuando se retira la costra que la cubre, se aprecia un fondo granulomatoso grueso, hiperémico y sangrante. Solamente el 10% de los afectados desarrolla lesiones mucosas, aparecen cuando las lesiones cutáneas han cicatrizado, aunque a veces pueden ser concomitantes.

1.4.4 Tratamiento

Los fármacos de elección son las sales de antimonio. En el Nuevo Mundo se emplea más la N-metilglucamina (Glucantime®), a dosis de 20 mg/kg de peso y día, en una o dos inyecciones al día, durante 20-30 días y el estibogluconato de sodio (Pentostam®), a la misma dosis y pauta, sin exceder los 850 mg al día. Las sales de antimonio pueden producir mialgias, artralgias, fiebre, astenia, hepatotoxicidad y pancreatitis, entre otros efectos colaterales; además, no están indicadas en mujeres gestantes (Fleta Zaragoza et al., 2001).

Como alternativas terapéuticas de segunda línea se encuentran la anfotericina B y la pentamidina (Figura 9), cuyo uso se reserva para casos en los que los antimoniales no resultan eficaces o cuando existe coinfección con el VIH. La anfotericina B suele administrarse en dosis de 0,5–1 mg/kg en días alternos, hasta alcanzar una dosis acumulada de 15–20 mg/kg. Por su parte, la pentamidina se emplea en un rango de 2–4 mg/kg, administrado entre una y tres veces por semana durante períodos variables de 5 a 25 semanas, dependiendo de la severidad clínica del cuadro (Fleta Zaragoza et al., 2001). La toxicidad de la anfotericina B se manifiesta con fiebre, hipotensión, nefrotoxicidad y anemia, y la de pentamidina con hipotensión, hipoglucemia y vómitos. Todas estas complicaciones son de carácter reversible.

Los compuestos basados en antimonio como antimoniato de meglumina y estibogluconato de sodio han sido el tratamiento clásico de la leishmaniasis visceral. Aunque el mecanismo exacto sigue sin dilucidarse completamente, se ha observado que SbV actúa como pro-fármaco, que es reducido a SbIII intracelularmente mediante la acción catalítica de la enzima tiol-disulfuro reductasa 1 (TDR-1; Denton et al. 2004). La actividad de dicha enzima de leishmania es superior a pHs ácidos (como el registrado en la vacuola parasitófora) y emplea al tripanotión ($T[SH]_2$, principal tiol de bajo peso molecular de los tripanosomátidos) como cofactor redox (Fyfe et al., 2012). Esta bio-reducción consume equivalentes de reducción. SbIII altera el equilibrio redox intracelular dependiente de tioles de bajo peso molecular ya que se ha reportado la formación de aductos entre SbIII y glutatión (GSH) o $T[SH]_2$, y tanto las sales de antimonio como estos aductos inhiben a la enzima tripanotiona reductasa de los parásitos (Baiocco et al., 2009). Esto resulta en la acumulación de las formas disulfuro tanto de $T[SH]_2$ ($T[S]_2$) como de GSH y, en

consecuencia, en generación de estrés oxidativo, apoptosis y muerte celular (Baiocco et al., 2009; Chakravarty & Sundar, 2010; Cunningham & Fairlamb, 1995).

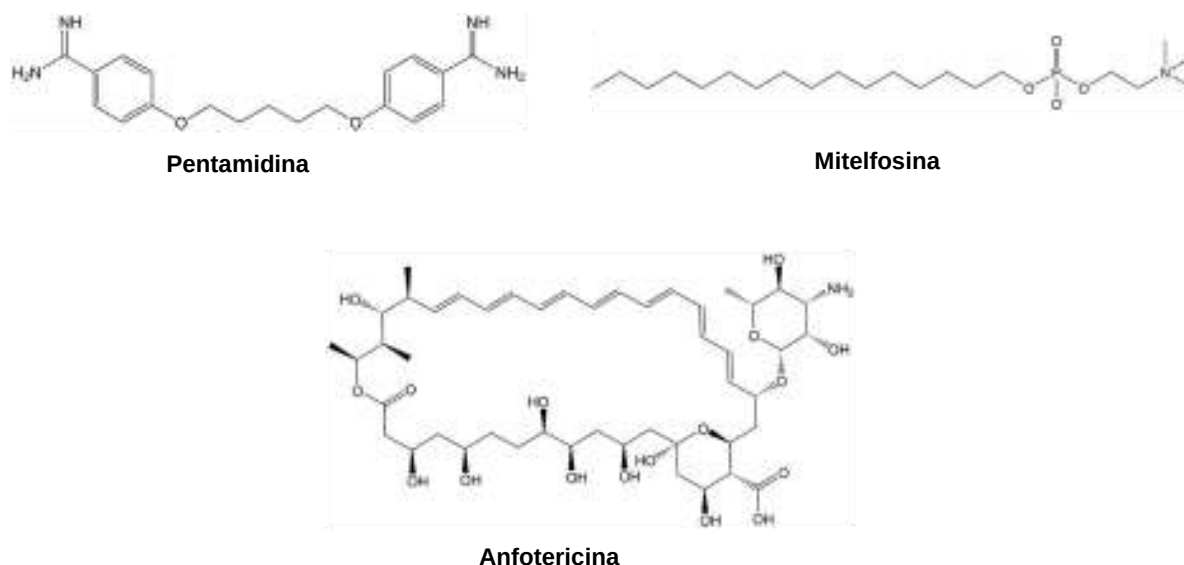


Figura 9. Principales fármacos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis

Miltefosina: fosfolípido alquilfosfocolina administrado oralmente y activo frente a diferentes formas clínicas de la enfermedad; altera la integridad de membranas y vías de señalización del parásito. Anfotericina B: antibiótico poliénico que se une al ergosterol de la membrana parasitaria, formando poros que provocan la muerte celular; su formulación liposomal presenta mejor eficacia y menor toxicidad.

A pesar de ciertos eventos de toxicidad que han comprometido su uso, la pentamidina (una diamidina aromática) remplazó a las sales antimoniales en el tratamiento de la leishmaniasis visceral. Por el contrario, la eficacia de este antibiótico para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea y mucocutánea es destacada, con una tasa de curación de 80 al 94% (Robledo et al., 2006; S. Singh & Sivakumar, 2004). La pentamidina es incorporada activamente por el transportador LmexPT1 (de *Leishmania mexicana* Pentamidine Transporter) y se acumula en la mitocondria del parásito, donde se une al ADN del kinetoplasto, provocando su desorganización estructural y fragmentación. Su modo de acción también involucra alteraciones del potencial de membrana mitocondrial (MMP) que afectan el metabolismo energético y la viabilidad del patógeno (Bray et al., 2003; Mukherjee et al., 2006; Vercesi & Docampo, 1992). La resistencia a pentamidina adquirida por ciertas cepas de *Leishmania* ha sido asociada a una reducción del MMP, que impide la acumulación mitocondrial del fármaco, y no a deficiencias en el transportador PT1 (Bray et al., 2003).

La anfotericina B (AmB) es un antibiótico poliénico macrocíclico de origen natural, aislado de *Streptomyces nodosus*, y utilizado ampliamente como agente antifúngico y antiprotzoario desde la década de 1950 (Akinosoglou et al., 2024). Su uso está indicado para el tratamiento de la leishmaniasis visceral, particularmente en pacientes infectados con cepas resistentes a antimoniales pentavalentes o inmunocomprometidos, como aquellos coinfectados con VIH (Russo et al., 1996; Sundar & Chakravarty, 2010).

La alta afinidad por los esteroides de membrana del parásito, especialmente el ergosterol y el episterol, determina en gran medida el modo de acción de AmB. Al tratarse de una molécula anfipática, la AmB se inserta en la bicapa lipídica formando agregados supramoleculares y poros que permiten el paso descontrolado de iones como K^+ y Na^+ , provocando un colapso del equilibrio osmótico y la muerte celular del parásito (Baginski et al., 2006; Gray et al., 2012). La toxicidad asociada a AmB, en particular la nefrotoxicidad, se ha vinculado a su interacción no selectiva con el colesterol de membranas humanas, especialmente cuando se encuentra en su forma agregada (Adler-moore & Proffitt, 1993). Para mitigar estos efectos, se han desarrollado formulaciones liposomales como AmBisome®, que favorecen la liberación dirigida hacia el sistema fagocítico mononuclear y reducen significativamente los efectos adversos (Adler-moore & Proffitt, 1993; Sundar & Chakravarty, 2010).

La miltefosina se emplea para el tratamiento oral de la leishmaniasis visceral, cutánea y, en algunos casos, mucocutánea. Diferentes estudios sugieren que este compuesto posee una acción polifarmacológica contra este parásito. Uno de sus mecanismos más destacados es la activación de un canal de Ca^{2+} en la membrana plasmática, funcionalmente similar a los canales de tipo L activados por esfingosina. Esta activación promueve la entrada masiva de Ca^{2+} al citoplasma, alterando la homeostasis intracelular de este catión y perturbando funciones celulares críticas; estos canales del parásito son parcialmente sensibles a antagonistas como la nifedipina, lo que sugiere una vía de activación distinta (Benaim & Garcia, 2011; Pinto-Martinez et al., 2018). Además, la miltefosina induce la alcalinización de los acidocalcisomas, organelos responsables del almacenamiento de calcio y pirofosfatos, ocasionando la liberación de Ca^{2+} al citosol y afectando el metabolismo energético alternativo del parásito (Docampo et al., 2005; Pinto-Martinez et al., 2018; Vercesi & Docampo, 1992). De manera complementaria, el fármaco inhibe la actividad del citocromo c oxidasa mitocondrial, lo cual altera el potencial electroquímico mitocondrial, exacerba el estrés intracelular por Ca^{2+} y desencadena la

muerte por apoptosis (Román & Luis, 2007).

1.5. El metabolismo redox dependiente de tioles de tripanosomátidos y tioles de bajo peso molecular atípicos

La escasa eficacia terapéutica y la elevada toxicidad asociada a los tratamientos actuales contra las enfermedades causadas por tripanosomátidos, han impulsado la búsqueda de blancos moleculares alternativos. En este contexto, las rutas metabólicas exclusivas e indispensables para el parásito son objetivos de máximo interés farmacológico por el potencial que ofrecen para el desarrollo de medicamentos selectivos. Como se detallará a continuación, el metabolismo redox dependiente de tioles cumple con dichos criterios. En los tripanosomátidos (y en la clase Kinetoplastidae en general), este metabolismo depende de al menos las siguientes moléculas ausentes en mamíferos: el tiol de bajo peso molecular N¹,N⁸-bis(glutationil)espermidina o dehidro-tripanotiona en su forma reducida [T(SH)₂], y por defecto la enzima encargada de su síntesis: la tripanotiona sintetasa (Figura 10), y las enzimas redox dependientes de tioles: tripanotiona reductasa y triparredoxina (Figura 11, Figura 12). Otra particularidad distintiva de los tripanosomátidos es que carecen de los genes que codifican para las principales reductasas dependiente de NADPH que sostienen el balance redox en la mayoría de los organismos eucariotas e incluso procariotas: la glutatión reductasa (GR) y la tiorredoxina reductasa (TrxR).

La tripanotiona se compone de dos moléculas del tripéptido GSH (γ-L-glutamyl-L-cisteinil-glicina) conjugadas a través del carboxilo de su glicina a cada uno de los grupos amino terminales de una espermidina (Spd) (Fairlamb et al., 1985; Leroux & Krauth-Siegel, 2016). Su biosíntesis es catalizada de manera secuencial (dos pasos de conjugación) por la tripanotiona sintetasa (TryS), una enzima compuesta por dos dominios estructurales cada uno con actividades opuestas. El dominio N-terminal guarda relación con las proteasas del tipo papaína y se especializa en hidrolizar el enlace tipo peptídico del GSH con la espermidina. El dominio C-terminal posee actividad C-N ligasa dependiente de ATP y es estructuralmente similar al de las proteínas de unión a ATP (ATP-grasp proteins) como la D-Ala, D-Ala ligasa. Se cree que esta actividad bifuncional permite mantener el balance de sustratos y productos.

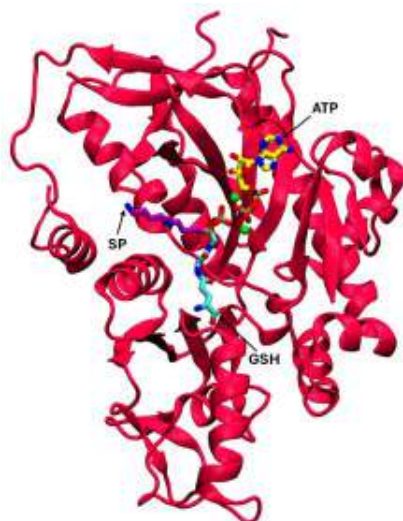


Figura 10. Representación tridimensional de Tripanotona Sintetasa (TryS).
Para posicionar los ligandos en el sitio activo se utilizó el modelo cristalográfico (PDB: 2VPM), el cual fue superpuesto con la estructura (PDB:2IOA), que contiene glutatión (GSH), espermidina (SP) y ATP co-cristalizados. Dicha superposición permitió ubicar de manera aproximada los sustratos en el sitio activo de TryS, debido a la homología estructural entre ambas enzimas. La hélice α central (en rojo) conecta los dominios catalíticos y contribuye a la organización estructural del sitio activo.

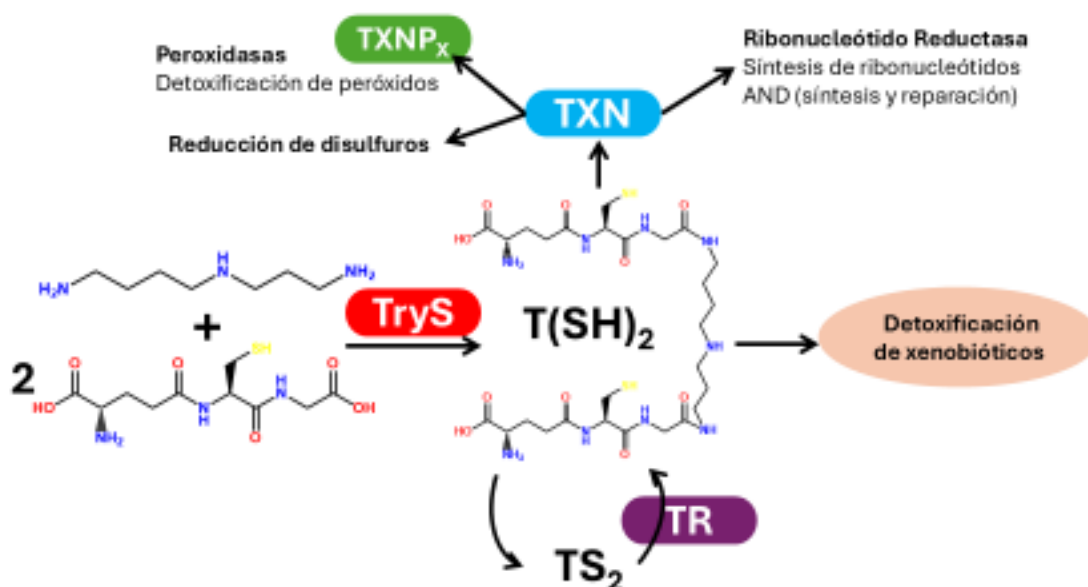


Figura 11. Estructura química, síntesis y metabolismo dependiente de tripanotona.
La tripanotona es sintetizada por la tripanotona sintetasa (TryS) a expensas del ATP y en dos pasos secuenciales de ligación de dos moléculas de GSH a espermidina. La forma reducida de la tripanotona es regenerada a partir de su forma disulfuro (TS_2) mediante la enzima tripanotona reductasa (TR) y a expensas del poder reductor de NADPH. La triparedoxina (TXN) es una oxidorreductasa multifuncional homóloga a la tioredoxina. Las peroxidasa dependientes de triparedoxina ($TXNP_x$) catalizan la detoxificación de hidroperóxidos y peroxinitrito.

Algunos tripanosomátidos (ej. *L. infantum* y *T. cruzi*) poseen también una segunda enzima, la glutathionil-espermidina sintetasa (GspS), la cual solo cataliza la unión de una única molécula de GSH a espermidina para formar monoglutationil espermidina (Gsp). Esta enzima presenta la misma organización estructural y funcional (bidominio, bifunción) que la TryS. Mediante aproximaciones de ingeniería genética y de inhibición química selectiva se demostró que la TryS es indispensable para la supervivencia de las principales especies de tripanosomátidos: *T. b. brucei* (tripanosoma africano; (Ariyanayagam et al., 2005; M. A. Comini et al., 2004b; Wyllie et al., 2009) *T. cruzi* (tripanosoma americano; (Mesías et al., 2019), *L. donovani* (leishmania del viejo mundo (Krieger et al., 2000) y *L. infantum* (leishmania del nuevo mundo; Sousa et al., 2014). Tanto el silenciamiento génico como la inhibición de la TryS afecta directamente los niveles de tripanotona y Gsp, provocando un arresto en el crecimiento, una sensibilidad aumentada a hidroperóxidos y fármacos, y una pérdida de viabilidad. Experimentos realizados en *T. b. brucei* mostraron que la depleción en TryS no altera de manera significativa el potencial redox global del par $T(SH)_2/TS_2$, sugiriendo que los efectos deletéreos observados son en realidad consecuencia de una limitación en las reacciones mediadas por TXN que dependen del $T(SH)_2$ (Ariyanayagam et al., 2005). Como se discutirá en la próxima sección, la reacción entre el $T(SH)_2$ y la TXN constituyen el cuello de botella de este metabolismo.

En su conjunto, todos estos estudios pusieron en evidencia la extrema dependencia de estos organismos en $T(SH)_2$, dado que el GSH, cuyos niveles no se vieron disminuidos sino hasta aumentados al silenciar la expresión o inhibir a la TryS, fue incapaz de sustituir las funciones del ditiol. No obstante, además de ser un precursor metabólico esencial para la síntesis de $T(SH)_2$, los niveles relativamente altos de este monotiol en algunas especies sugieren que podría tener funciones complementarias (ej. regulación redox por glutathionilación; Ulrich et al., 2017).

Por otro lado, evidencias indirectas de la relevancia biológica del $T(SH)_2$ fueron obtenidas mediante inhibición o silenciamiento postranscripcional de enzimas que producen los precursores del $T(SH)_2$. Por ejemplo, la γ -glutamylcisteína sintetasa (GSH1) cataliza el primer paso biosintético del GSH y su inhibición por butionina sulfoximida (BSO) generó una marcada depleción de GSH y $T(SH)_2$, un aumento de la susceptibilidad a NFX y Bzn y la muerte *T. b. brucei* y de *T. cruzi* (Huynh et al., 2003). En *L. donovani*, la inhibición de esta enzima sólo tuvo efectos deletéreos para la forma amastigota del parásito, afectando su replicación en el interior de macrófagos (Mukherjee et al., 2009). Como se mencionó

anteriormente, la inhibición de ODC en *T. b. brucei* mediante DFMO (α -difluorometilornitina), interrumpe la síntesis de putrescina, un precursor clave en la biosíntesis de poliaminas, y compromete la producción de espermidina y, en consecuencia, la generación de $T(SH)_2$. Esto arresta la proliferación del parásito (Fairlamb et al., 1987). Por otro lado, la supresión genética de la espermidina sintetasa (SpS) en *L. donovani*, así como su silenciamiento por RNAi en *T. b. brucei*, genera una dependencia exógena de espermidina (auxotrofia), reduce la disponibilidad de $T(SH)_2$ y desencadena la muerte en estos parásitos (Roberts et al., 2001; Taylor et al., 2008).

Otro tiol de bajo peso molecular que es sintetizado por algunas especies de tripanosomátidos, particularmente del género *Leishmania*, es el ovotiol A (N^1 -metil-4-mercaptohistidina; Figura 13). Se trata de un tiol no peptídico, estructuralmente caracterizado por un residuo imidazólico sustituido con un grupo sulfhidrilo en posición 4 y una metilación en el nitrógeno en posición 1. En formas promastigotas de ciertas especies de *Leishmania* puede alcanzar concentraciones milimolares que, en fases tardías del crecimiento, pueden superar al contenido intracelular de tripanotona. El ovotiol A no participa como sustrato enzimático directo del sistema tripanotona/triparedoxina y su reactividad con peróxidos es inferior a la de la tripanotona y glutationil-espermidina (Turner et al., 1988). Tanto su rol biológico como biosíntesis aún no han sido investigados en detalle.

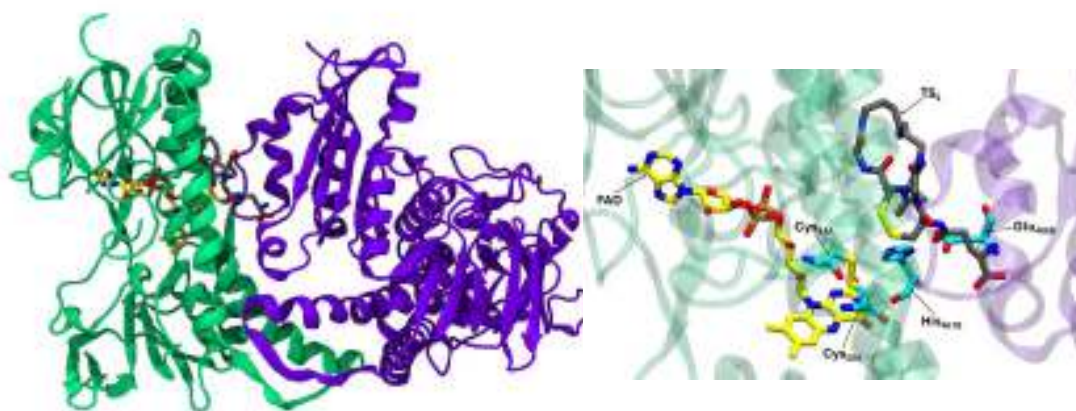


Figura 12. Sitios de unión de FAD, y tripanotona en la tripanotona reductasa (TR). **(Izquierda).** Representación tridimensional de la tripanotona reductasa de *Trypanosoma cruzi* en su forma homodimérica. Cada monómero se muestra en un color diferente (cadena A verde y cadena B morado), evidenciando la organización típica de la enzima, con dominios de unión a FAD y al sustrato tripanotona (TS_2). **(Derecha).** Ampliación del sitio activo, donde se visualizan los cofactores y residuos clave para la catálisis. El FAD (amarillo) se encuentra insertado en su dominio correspondiente, mientras que la tripanotona oxidada (TS_2 , en gris) se posiciona cerca del disulfuro catalítico formado por

Cys53A–Cys58A. Se destacan los residuos **His461B** y **Glu466B**, implicados en la estabilización del sustrato y la transferencia electrónica.

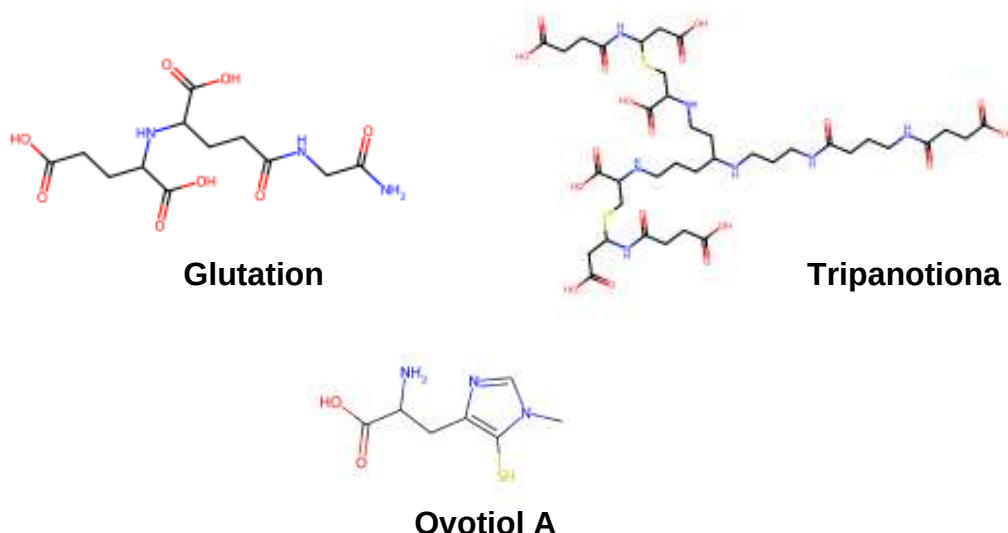


Figura 13. Estructuras químicas de los principales tioles de bajo peso molecular descritos en tripanosomátidos.

1.5.1. El sistema TR/T(SH)₂/TXN y su rol en la biología redox de tripanosomátidos

Una enzima central en este sistema es la TR, una flavoproteína que cataliza la regeneración de tripanotiona reducida a partir de su forma oxidada, utilizando NADPH como donador de electrones (Figura 14). La TR constituye el único vínculo funcional que conecta el metabolismo energético del parásito con el sistema encargado de mantener el balance redox intracelular de tioles. En ese sentido, el NADPH empleado por la TR puede provenir de diferentes vías metabólicas como ser la fase oxidativa de la vía de las pentosas 5-fosfato o la lanzadera malato-aspartato (a través del enzima malato deshidrogenasa citosólica y mitocondrial), entre otras. La estructura cuaternaria de la forma activa de la TR es un homodímero donde cada subunidad tiene un peso molecular de 53 kDa. A nivel tridimensional, la TR presenta el mismo arreglo estructural que la GR a pesar de la baja identidad de secuencia entre ambas (Lantwin et al., 1994; Sandalova et al., 2001). La mayor diferencia radica a nivel del bolsillo del sitio activo, el cual es más amplio y cargado negativamente en la TR (Lantwin et al., 1994). Estas características funcionales y estructurales convierten a la TR en un blanco terapéutico altamente atractivo para el diseño racional de fármacos, y ha motivado múltiples estudios orientados a la identificación de

inhibidores (Jockers-Scherübl et al., 1989; Krauth-Siegel et al., 1987; Leroux & Krauth-Siegel, 2016). No obstante, la TR presenta una alta eficiencia catalítica para la reducción del TS₂, y bajo condiciones fisiológicas y de estrés oxidativo, esta reacción no representa el cuello de botella en la cadena de transferencia de electrones de este sistema (González-Chávez et al., 2015; Olin-Sandoval et al., 2012). Esto explica porque se requiere un alto (>95%) y sostenido nivel de inhibición de su actividad para afectar la viabilidad y sensibilidad a oxidantes de los parásitos (Krieger et al., 2000). La TXN es una oxidorreductasa con un plegamiento tipo tiorredoxina y un sitio activo caracterizado por el motivo WCPPC. Se trata de una proteína monomérica y abundante a nivel intracelular (ej. 100 µM en la forma sanguínea de *T. b. brucei*; Comini et al., 2007) que durante su ciclo catalítico reduce homoo o heterodisulfuros (ej. entre residuos de cisteína proteicos y el GSH o el T(SH)₂) en diferentes proteínas (Figura 14). El disulfuro que se forma en la TXN al ceder sus electrones es reducido por T(SH)₂ en una reacción de intercambio tiol: disulfuro. El potencial redox de la TXN (−249 mV) es similar al de su sustrato reductor (−242 mV para T(SH)₂), lo que sumado a la 100 veces menor eficiencia catalítica de esta reacción de reducción respecto a la de TR sobre TS₂, implica que la liberación de electrones de este par redox hacia las moléculas efectoras está fuertemente condicionado por la relación T(SH)₂/TS₂ (Reckenfelderbaumer et al. 1997; üdemann et al., 1998; Reckenfelderbäumer & Krauth-Siegel, 2002; Comini et al. 2007). En otras palabras, la reacción entre TXN y T(SH)₂ representa el cuello de botella del sistema redox dependiente de tioles de estos parásitos (González-Chávez et al., 2015). Tal es así que, bajo condiciones de estrés oxidativo severo, un cociente T(SH)₂/TS₂ de 1:10 produce una inhibición significativa de la reducción del ribonucleótido reductasa (RR) por parte de TXN (Dormeyer et al., 2001). En línea con esto, el silenciamiento de la expresión de TXN estuvo acompañado de un aumento compensatorio de los tioles de bajo peso molecular, especialmente de T(SH)₂, hasta niveles cuatro veces mayores que en parásitos con contenido normal de esta oxidorreductasa. Este fenómeno adaptativo se observó tempranamente y antes de que se evidencien efectos sobre el crecimiento celular, lo que subraya la importancia de este sistema en el balance redox celular (M. A. Comini et al., 2007; Wilkinson et al., 2003). El silenciamiento de la isoforma citosólica de TXN mediante RNAi provocó un claro bloqueo del crecimiento celular y una mayor sensibilidad al peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en *T. b. brucei*. Por el contrario, su isoforma mitocondrial (TXNm) no produce un fenotipo adverso cuando su expresión es reprimida, lo que sugiere que el rol de esta oxidorreductasa en esta organela es secundario, al menos en condiciones normales de crecimiento (Wilkinson et al., 2003). Por su parte, la

eliminación de la tioredoxina (Trx), una proteína que funcionalmente podría sustituir a la TXN (Reckenfelderbäumer & Krauth-Siegel, 2002), no produce alteraciones fenotípicas notables, lo que destaca el rol funcional indispensable del par TXN/T(SH)₂ (Schmidt et al. 2000). Dos de los blancos moleculares de TXN mejor estudiados son el ribonucleótido reductasa (RR) y diferentes tipos de peroxidases (ej. las peroxiredoxinas: Prx y las glutatión peroxidases: Px; Figura 11). Mediante una reacción redox, la RR convierte los ribonucleótidos en oxiribonucleótidos, los cuales son precursores de la síntesis de ADN y ARN. Esto conlleva a la oxidación de la RR con formación de un disulfuro intramolecular (Thelander & Reichard, 1979), el cual es reducido de manera mucho más eficiente por la TXN que por reacción espontánea con T(SH)₂ (Dormeyer et al., 2001; H. Schmidt & Krauth-Siegel, 2003). Si esta reacción se viera impedida o limitada, la consecuencia sería una caída en los niveles de nucleótidos y por lo tanto un arresto en la proliferación celular y en la síntesis de proteínas. Estos fenotipos son característicos cuando se reprime la expresión de la TryS y la TXN (Ariyanayagam et al., 2005; M. A. Comini et al., 2004a). Los tripanosomátidos están equipados con Prx atípicas de dos cisteínas, las cuales cumplen un rol preponderante y esencial en la descomposición de H₂O₂ y peroxinitrito en distintos compartimentos celulares, y son reducidas eficientemente por la TXN (Castro et al., 2002; Wilkinson et al., 2003) (Figura 14). Por otro lado, las Px son indispensables en reducir lipoperóxidos e hidroperóxidos orgánicos, brindando de esta forma protección contra el daño de las membranas celulares (Hiller et al., 2014). Un desabastecimiento en la provisión de equivalentes de reducción hacia estas peroxidases, claramente compromete el balance redox intracelular y en parte explica el fenotipo adverso (sensibilidad a hidroperóxidos endógenos y exógenos) observado cuando se inhibe o silencia a la TryS y/o la TXN.

En la mitocondria tienen lugar importantes funciones celulares como la generación de ATP, la síntesis de aminoácidos, de esteroides y del grupo hemo, la biogénesis de centros ferrosulfurados, la β -oxidación de ácidos grasos, y la regulación de la muerte celular por apoptosis, entre otras (Zorov et al., 1997). Varios de estos procesos requieren de poder reductor sea para la catálisis de reacciones biosintéticas, para neutralizar especies oxidantes o para reparar del daño que estas generan. Para al menos cuatro proteínas localizadas en este organelo se demostró que sus formas disulfuros son reducidas por la dupla TXN/T(SH)₂: 1) la Universal Minicircle Sequence Binding Protein (UMSBP), la cual participa en el inicio de la replicación y segregación de los minicículos del ADN mitocondrial (Milman et al., 2007; Onn et al., 2004), 2) la glutarredoxina monotiólica 1 (Filser et al., 2008),

la cual actúa como una chaperona indispensable en la biogénesis de centros ferrosulfurados (M. A. Comini et al., 2013), 3) la Prx mitocondrial de trypanosomas, la cual descompone especies reactivas del oxígeno (Bogacz et al., 2020; Castro et al., 2002), y la 4) la Px mitocondrial, la cual reduce lipoperóxidos (Schlecker et al., 2007).

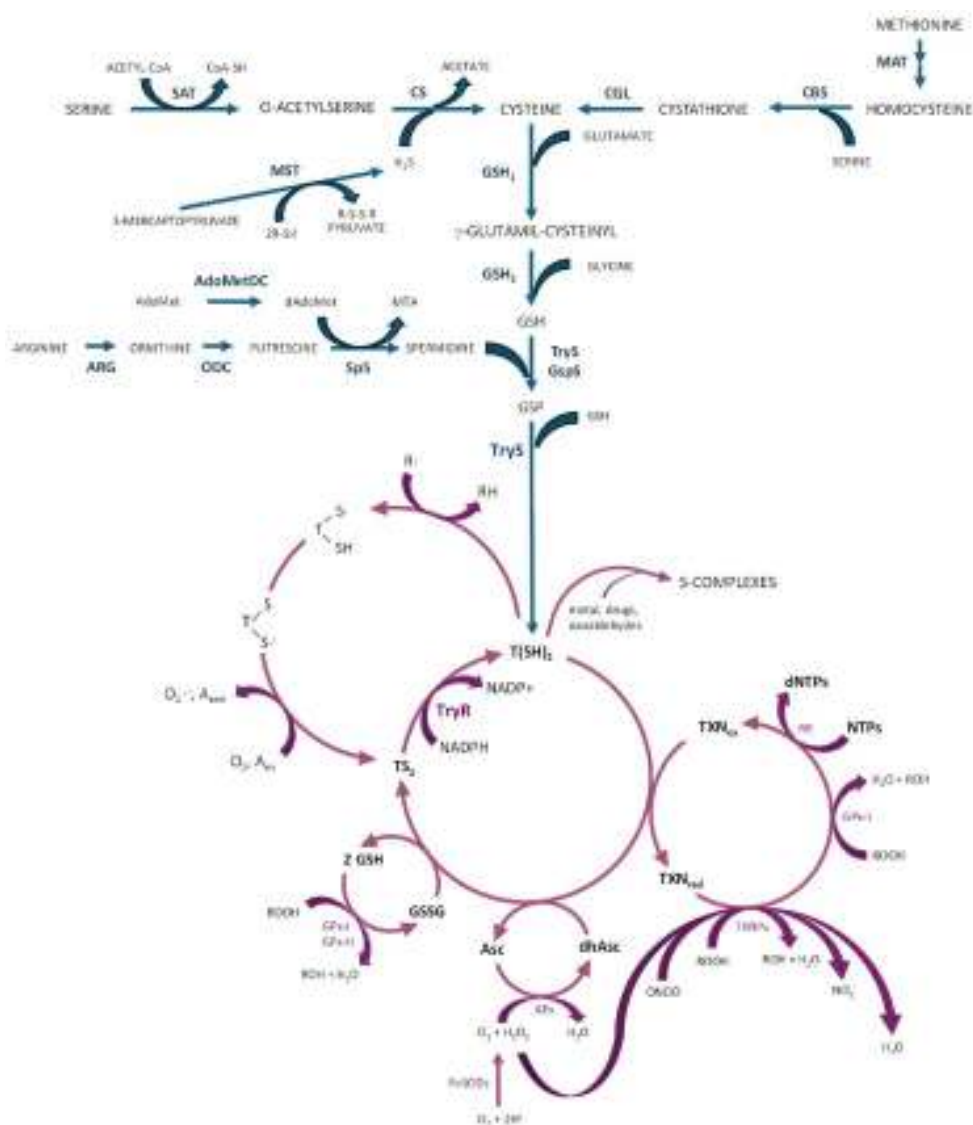


Figura 14. Biosíntesis de tripanotona (azul) y vías metabólicas controladas por procesos de oxidorreducción dependientes de T(SH)₂/TXN.

La parte superior del esquema (coloreado en azul) muestra las rutas de síntesis de glutatión (GSH), espermidina y tripanotona [T(SH)₂]. La parte inferior muestra los ciclos redox en los cuales equivalentes de reducción del T(SH)₂ son consumidos y reciclados (coloreado en violeta). Las enzimas y metabolitos se indican de la siguiente manera: AdoMetDC, S-adenosilmetionina descarboxilasa; APx, peroxidasa dependiente de ascorbato con grupo hemo; ARG, arginasa (ausente en *T. cruzi* y *T. b. brucei*); CBS, cistationina β-sintasa; CGL, cistationina γ-liasa; CS, cisteína sintasa; FeSODs, superóxido dismutasas dependientes de hierro; GPx-I/II, glutatión peroxidasas no dependientes de selenio; GSH, glutatión reducido;

GSH1, γ -glutamylcisteína sintetasa; GSH2, glutatión sintetasa; GSP, mono-glutatión espermidina; GspS, GSP sintetasa; GSSG, glutatión oxidado; MAT, metionina adenosil transferasa; MST, mercaptopiruvato sulfurtransferasa; ODC, ornitina descarboxilasa (ausente en *T. cruzi*); RR, ribonucleótido reductasa; SAT, serina acetiltransferasa; SpS, espermidina sintasa; TryR, tripanotiona reductasa; TryS, tripanotiona sintetasa; TXNPx, triparedoxina peroxidasa. Traducido y adaptado de González-Montero et al., 2024.

El balance redox de tioles en la mitocondria de estos organismos parece estar finamente regulado ya que la sobreexpresión de una proteína tipo citocromo b5 reductasa (CBRL) o de la Prx mitocondrial causaron la pérdida del ADN mitocondrial y detuvieron el crecimiento de *T. b. brucei*, probablemente al desviar electrones desde TXN hacia estas proteínas, dejando a UMSBP en su forma oxidada e inactiva (Motyka et al., 2006). Dicho estudio además demostró que este defecto es revertido parcialmente mediante la sobreexpresión de la TXN mitocondrial. No obstante, algunas de estas afirmaciones no pueden ser generalizadas a todos los tripanosomátidos, ya que, sorprendentemente, el balance redox de tioles en la mitocondria de algunas especies de *Leishmania* parece no depender de la provisión de electrones por el par TXN/T(SH)₂ (Castro et al., 2010) o bien ni la depleción de TXN ni la sobreexpresión de Prx mitocondrial en *T. cruzi* reprodujeron el fenotipo reportado en *T. brucei* (Motyka et al., 2006; Wilkinson et al., 2000).

Otra función importante, aunque no de naturaleza redox (es decir no involucra una cesión de electrones), en la que el T(SH)₂ es un cofactor clave es en la detoxificación de cetoaldehídos, a través del sistema glioxalasa. En este sistema participan un tiol de bajo peso molecular (GSH en mamíferos y tripanotiona en tripanosomátidos) y una o dos enzimas: la glioxalasa I (GLX I; lactoil-tiol liasa) que cataliza la conversión no enzimática del hemitioéster formado entre metilglioxal (MG) y el tiol de bajo peso molecular en S-D-lactoil-tiol, y la glioxalasa II (GLX II) que transforma a este último en D-lactato y regenera al tiol de bajo peso molecular. A diferencia de *T. cruzi* y *Leishmania* sp. (Sousa Silva et al., 2005), *T. brucei* carece de GLX I y se ha planteado la posibilidad que esta reacción ocurra de manera espontánea o catalizada por alcohol-deshidrogenasas o reductasas aún no caracterizadas (Irsch & Krauth-Siegel, 2004; Vickers et al., 2004). En los tripanosomátidos, la neutralización de compuestos dicarbonílicos reactivos como el MG es relevante para prevenir modificaciones irreversibles de proteínas, ADN y lípidos por glicación.

Estudios recientes han expandido el número y tipo de proteínas que podrían estar recibiendo equivalentes de reducción por parte de TXN. Entre ellas se encuentra la metionina sulforeductasa (Arias et al., 2011, 2020) y la glutarredoxina ditiólica (Arias et al.,

2013). La primera de ellas contribuye a revertir la oxidación por un oxígeno de este aminoácido esencial, sea en estado libre o unido a proteínas. La segunda contribuye a reducir el GSSG (Manta et al., 2019) y a recuperar la forma reducida de proteínas oxidadas a disulfuros mixtos con GSH (Ceylan et al., 2010). Además, aplicando una estrategia de captura de interactores covalentes la cual emplea una mutante monotiólica del sitio activo de TXN, se lograron atrapar e identificar (por análisis de espectrometría de masas) varias nuevas proteínas de *T. cruzi* y *T. b. brucei* que estarían interactuando con esta oxidorreductasa. Muchas de ellas regulan importantes procesos celulares (Arias et al., 2015; Manta et al., 2013; Piñeyro et al., 2011).

Por su esencialidad, ausencia de homólogos u ortólogos en mamíferos y singularidades estructurales, son principalmente dos las enzimas de este metabolismo las que han recibido mayor atención para el desarrollo de fármacos contra estos patógenos: la TR y la TryS. Por este motivo y porque las mismas son objeto de estudio de la presente tesis de posgrado es que las siguientes secciones describen los principales hallazgos en materia de inhibidores de estas enzimas.

1.6. Inhibidores de TR

1.6.1. Unión a la cavidad TS₂ (competitivos con tripanotona)

La **quinacrina** (mepacrina) es uno de los inhibidores competitivos mejor caracterizados frente a la TR de *T. cruzi*. Los estudios cristalográficos del complejo enzima-inhibidor (obtenidos a una resolución de 2.9 Å), han permitido identificar las interacciones moleculares que determinan su selectividad por esta enzima respecto a la GR humana. La mepacrina acomoda su anillo acridínico en el sitio activo, en proximidad a la pared hidrofóbica formada por Trp21 y Met113. Con interacciones al nitrógeno del anillo con Met113, el átomo de cloro con Trp21 y el grupo oximetilo con Ser109. A su vez, la cadena alquil-amino se orienta hacia la cavidad interna, estabilizada por un puente de hidrógeno mediado por solvente con Glu18 (Bonse et al., 1999; Jacoby et al., 1996). Estos cuatro residuos no están conservados en la GR. Si bien no constituye un candidato clínico debido a limitaciones de toxicidad y perfil farmacocinético, su estudio ha sido decisivo para establecer principios de diseño en química medicinal

El compuesto **BTCP** (1-(1-benzo[b]tiofen-2-il)-ciclohexil) piperidina) y sus análogos se han evaluado como inhibidores competitivos de la TR y de la proliferación de la forma sanguínea de *T. b. brucei*. El compuesto original mostró una afinidad moderada por la enzima ($K_i \approx 1 \mu\text{M}$) y una actividad antiparasitaria satisfactoria ($\text{CE}_{50} \approx 10 \mu\text{M}$), aunque con baja selectividad frente a células de mamífero (MRC-5, $\text{CE}_{50} \approx 29 \mu\text{M}$). Estos resultados impulsaron la síntesis y caracterización de 32 derivados con el fin de optimizar la potencia y selectividad (Patterson et al., 2009). Mediante el análisis de la relación estructura/actividad se determinó que el grupo benzo[b]tiofeno en posición 2 es esencial para mantener la actividad inhibitoria, mientras que las modificaciones en los anillos de piperidina y ciclohexano generaron efectos variables. El análogo con sustitución por pirrolidina resultó ser el más potente, alcanzando un CI_{50} de $0,91 \mu\text{M}$ sobre TR. Sin embargo, sustituciones adicionales en la posición 4 del ciclohexano no aportaron mejoras significativas en la actividad, lo que evidencia la importancia de conservar el marco estructural básico del BTCP (Patterson et al., 2009). En términos biológicos, los ensayos celulares sugirieron que la inhibición de TR se correlaciona con la inhibición del crecimiento del parásito, pero no se lograron avances sustanciales en la potencia global de la serie ni en su selectividad, subrayando la necesidad de estudios estructurales proteína–ligando para guiar el rediseño racional.

Para la serie de **diaril-sulfuro–tioéter**, el derivado RDS 777 resultó ser un inhibidor competitivo de la TR de *L. infantum* (LiTR). Este compuesto exhibió una afinidad sub- μM por la enzima ($K_i = 0,25 \pm 0,18 \mu\text{M}$) y una actividad anti proliferativa sobre promastigotes de *L. infantum* en el rango micromolar ($\text{CI}_{50} = 29,43 \pm 1,34 \mu\text{M}$). En comparación con otros miembros de la misma serie (como RDS 562), RDS 777 se destacó por su mejor relación entre potencia inhibitoria y actividad biológica (Saccoliti et al., 2017). El RDS 777 pertenece a una familia de tioéteres diarílicos diseñados para explorar la interacción con cavidades hidrofóbicas y regiones cargadas del sitio activo de la TR. Los estudios de cristalografía revelaron que el ligando se acopla directamente al sitio catalítico de la enzima, estableciendo contactos con residuos como las cisteínas catalíticas (Cys52, Cys57) y residuos de interacción con el sustrato (Glu466 y Tyr110). Estas interacciones impiden la reducción de la tripanotona y por lo tanto generan un desbalance redox intracelular (Saccoliti et al., 2017). Aunque la actividad biológica está lejos de ser óptima, los datos estructurales proporcionan una excelente base para la optimización racional de esta familia de compuestos.

Los derivados de **triazol-fenil-tiazol** se diseñaron como parte de una estrategia de tamizaje orientada a la inhibición de la LiTR. Partiendo de 26 compuestos, se exploraron modificaciones en cuatro posiciones del esqueleto químico (R1–R4). Los resultados mostraron que la presencia de un grupo amino-butilo cargado positivamente en R1 del anillo triazólico era determinante de la afinidad por el sitio activo de la enzima. En R2, la incorporación de una imidazolidinona no solo incrementó de forma notable la potencia inhibitoria, sino que además contribuyó a disminuir la citotoxicidad. Para el anillo fenílico (R3), se observó que los sustituyentes hidrofóbicos voluminosos, como el naftilo o bifenilo, potenciaban de manera importante la actividad. Finalmente, en R4, correspondiente al anillo tiazólico, la adición de un fenilo extra reforzó la capacidad inhibitoria (Revuelto et al., 2021).

Dentro de esta serie se destacó el compuesto simétrico 22, diseñado mediante modelado computacional. Este derivado alcanzó una actividad inhibidora elevada ($CI_{50} = 0,4 \mu M$) e impidió la dimerización de TR en el rango micromolar ($CI_{50} = 8,0 \mu M$). En ensayos celulares, el compuesto presentó una CE_{50} de $4,9 \mu M$ frente a la forma amastigota y un índice de selectividad de 6,2. En concordancia con un estudio que destaca la gran identidad estructural y de comportamiento cinético de las TR de diferentes tripanosomátidos (Jones et al., 2010), este compuesto también inhibió las proteínas homologas de *T. b. brucei* y *T. congolense* (Jones et al., 2010; Revuelto et al., 2021).

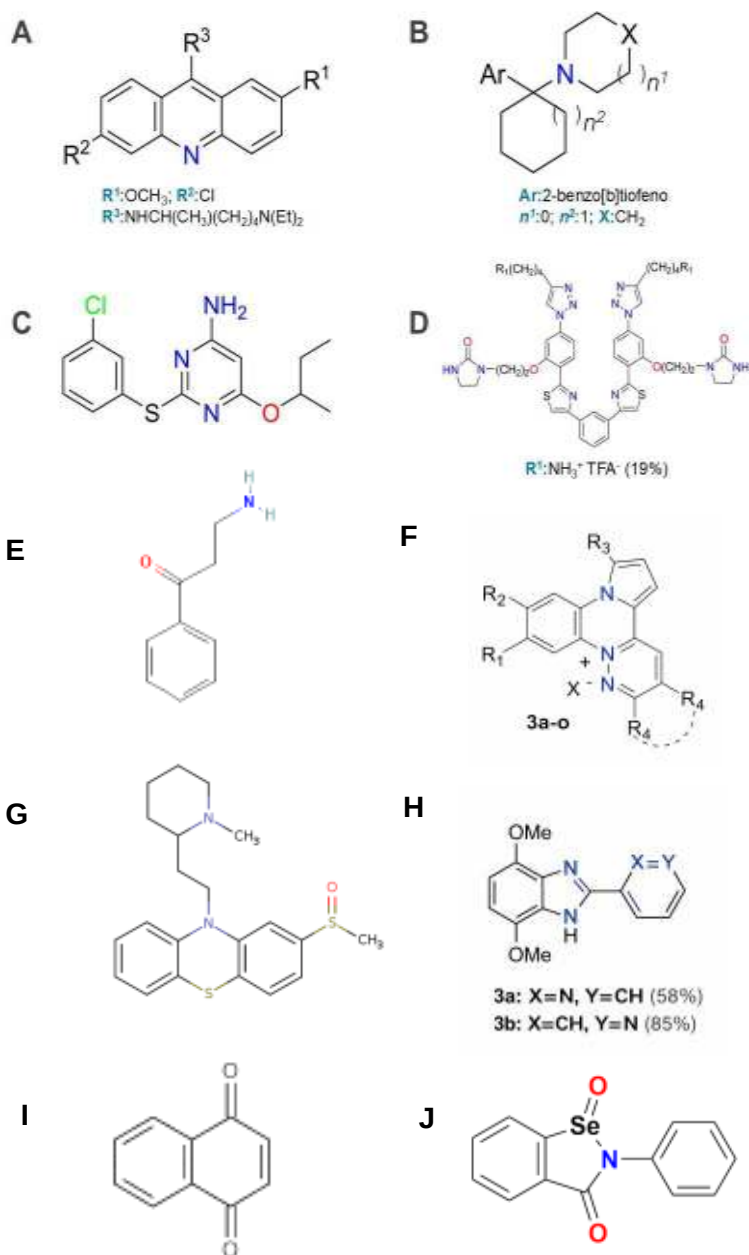


Figura 15. Principales inhibidores de tripanotona reductasa (TR).

Se muestran los compuestos representativos que interactúan con el sitio de unión de tripanotona: (A) **Quinacrina/mepacrina**, cuyo núcleo acridínico se posiciona en el sitio activo de TR de *T. cruzi*, estableciendo contactos con residuos como Trp21, Met113, Ser109 y Glu18; (B) **BTCP y derivados**, con núcleo benzo[b]tiofeno y variaciones estructurales que modulan afinidad y selectividad; (C) **RDS 777**, diaril-sulfuro-tioéter activo en *L. infantum*, que interactúa con Cys52, Cys57, Glu466 y Tyr110; (D) **Derivados triazol-fenil-tiazol**, destacando el compuesto 22, inhibidor de la actividad catalítica ($CI_{50} = 0,4 \mu M$) y de la dimerización de TR; (E) **3-amino-1-arilpropan-1-ona**, β -aminocetona con grupo amino protonable; (F) **Piridazino-pirrolo-quinoxalinium**, sistema aromático policíclico catiónico;

(G) **Tioridazina (3C; $R^1 = H$, $R^2 = Cl$, $R^3 = Br$)**, derivado fenotiazínico halogenado; (H) **Fenoxi-benzo[d]imidazol-4,7-diona**, compuesto quinonoide redox-activo; (I) **Naftoquinonas**, sistemas bicíclicos 1,4-diona; y (J) **EbSe (Ebselen)** con actividad redox dependiente de cisteínas.

Compuestos de origen natural, de la base de datos **ZINC15** (ZINC000008876351 y ZINC000253403245) mostraron alta afinidad de unión hacia dos enzimas esenciales de *L. donovani* para la defensa antioxidante del parásito, la TR y la superóxido dismutasa dependiente de hierro (LdFeSODA). Los estudios de docking molecular revelaron energías de unión favorables en ambos blancos enzimáticos, destacando ZINC000253403245 con valores de -5,834 kcal/mol (LdFeSODA) y -7,035 kcal/mol (LdTR). Estas interacciones fueron corroboradas mediante simulaciones de dinámica molecular de 100 ns, que registraron una estabilidad significativa de los complejos proteína-ligando, con valores promedio de RMSD en el rango de 1,2–2,7 Å (Bora et al., 2023). Los ensayos in vitro confirmaron la bioactividad de los compuestos sobre promastigotes de *L. donovani*. ZINC000253403245 presentó una potencia superior, con una CI_{50} de $7,52 \pm 0,17 \mu M$, valor en el mismo rango que el reportado para el fármaco de referencia miltefosina (CI_{50} de $9,55 \pm 0,36 \mu M$), mientras que ZINC000008876351 mostró una CI_{50} de $24,82 \pm 0,61 \mu M$ (Bora et al., 2023).

1.6.2 Unión a la cavidad NADPH (competitivos con NADPH)

La familia de derivados de la **3-amino-1-arilpropan-1-ona** fue identificada como inhibidor de TR a partir de un cribado de alto rendimiento (HTS) contra la enzima de *L. infantum*. Este estudio detectó ligandos capaces de interactuar con el bolsillo de unión a NADPH, una cavidad lateral amplia y “drogable” que no se encuentra en la GR humana. En esta región, estas moléculas establecen interacciones con residuos clave de unión del cofactor en TR como Tyr221, Arg228 y Gly195 (Madia et al., 2023). El compuesto más activo fue el éster p-4-clorobifenilo, con una CI_{50} de $65 \mu M$ sobre esta enzima. En general, los ésteres fueron más potentes que las amidas, y la introducción de un segundo anillo aromático en posición para favoreció el incremento de afinidad (Madia et al., 2023). Una inhibición competitiva y efectiva por este sitio requiere de compuestos con una afinidad significativamente superior que la de la enzima por su sustrato endógeno (ej. K_M por NADPH = 2-12 μM ; (Angiulli et al., 2015; Krauth-Siegel et al., 1987).

1.6.3. Inhibidores mixtos y “subversivo” (cicladores redox)

Las sales de **piridazino–pirrolo–quinoxalinium** constituyen una familia de derivados heterocíclicos con actividad frente al metabolismo redox de *L. infantum*. De los quince compuestos sintetizados, once mostraron actividad submicromolar contra amastigotes axénicos con baja citotoxicidad en células humanas, entre los cuales destacaron los derivados 3c (10-cloro-8H-piridazino[2,3-a]pirrolo[2,1-c]quinoxal-13-inium), 3e (10-cloro-2,3-di-etil-8H-piridazino[2,3-a]pirrolo[2,1-c]quinoxal-13-inium) y 3f (7-bromo-10-cloro-2,3-di-etil-8H-piridazino[2,3-a]pirrolo[2,1-c]quinoxal-13-inium). Varios compuestos de esta familia (ej. 3c, 3e y 3f) presentaron una destacada actividad frente a amastigotes axénicos y en algunos casos intracelulares (CE_{50} de 0,02-1,23 μ M) e índices de selectividad frente a una línea celular de macrófagos humanos ($IS = 1000-85$). El compuesto 3f se comportó como inhibidor no competitivo y “subversivo” de la LiTR frente a los sustratos TS_2 y NADPH, con valores de CI_{50} de 1,85 y 2,98 μ M, respectivamente. El modo de inhibición subversivo mediante ciclado redox convierte a la enzima en una generadora de anión superóxido, el cual si no es convertido a H_2O_2 por las SOD puede dar lugar a la formación de especies radicalares (de Lucio et al., 2022).

1.6.4. Inhibidores irreversibles: EbS, fenotiazinas (tioridazina, TDZ)

Dentro de los inhibidores irreversibles de tripanotiona reductasa (TryR), uno de los estudios más relevantes es el de (Lu et al., 2013) quienes demostraron que el análogo azufrado de ebselen, ebsulfur (EbS), actúa como inhibidor covalente y suicida de esta enzima. EbS mostró una potente actividad frente a *T. brucei* con una CI_{50} de 92 nM, mientras que el análogo selenado EbSe fue mucho menos activo ($CI_{50} \approx 5 \mu$ M). A nivel bioquímico, EbS ejerció una inhibición irreversible dependiente de NADPH, con cinética tipo Kitz-Wilson, reportándose $k_{inact} = 0,17 \text{ min}^{-1}$ y $K_i = 1,9 \mu$ M. La actividad enzimática no se recuperó tras diálisis prolongada ni en presencia de agentes reductores como DTT o glutatión, confirmando una modificación covalente de residuos catalíticos de TryR (particularmente Cys residuos, evidenciada por LC-MS/MS). En parásitos que expresan el biosensor hGrx1-roGFP2, EbS indujo una oxidación rápida del sensor ($\sim 70-80 \%$ en 1 h a $2 \times CI_{50}$) y un aumento de 3–4 veces en los niveles de ROS intracelular, junto con depleción de tioles. La co-incubación con glutatión 5mM revirtió parcialmente la oxidación y mejoró la viabilidad celular, confirmando que la muerte del parásito ocurre por colapso redox mediado

por inhibición irreversible de TryR. Finalmente, en un modelo murino de infección por *T. brucei*, EbS redujo significativamente la parasitemia y, en combinación con nifurtimox, logró curación completa en algunos animales, lo que valida su mecanismo de acción in vivo. Estos hallazgos convierten a EbS en un inhibidor irreversible de referencia para comparar con las benzisotiazolonas sintetizadas en esta tesis.

La **tioridazina (TDZ)**, un fármaco antipsicótico perteneciente a la familia de las fenotiazinas, ha sido identificada como uno de los inhibidores irreversibles más potentes de la tripanotona reductasa (TR) en *T. cruzi*. Su acción no implica la conversión de la enzima en una oxidasa ni la generación secundaria de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que indica un mecanismo distinto al observado para otros inhibidores suicidas como EbS. Si bien el residuo exacto de TR modificado por TDZ no ha sido determinado experimentalmente, se ha demostrado que la inhibición es irreversible y dependiente de la interacción con el sitio activo de la enzima, muy probablemente comprometiendo los residuos catalíticos implicados en el ciclo redox (como Cys52/Cys57), tal como ocurre con otros inhibidores covalentes de TR.

En modelos murinos de infección por *T. cruzi*, el tratamiento con TDZ (80 mg/kg/día) redujo significativamente la parasitemia, la mortalidad y el daño cardíaco, tanto cuando se administró en la fase aguda de la infección (inicio inmediato) como en la fase crónica (tratamiento iniciado a los 180 días post-infección) (Lo Presti et al., 2015). Estos resultados posicionan a la TDZ como un inhibidor irreversible de TR con eficacia in vivo y la convierten en un referente relevante para contrastar nuevas moléculas con potencial actividad sobre el sistema redox tripanotona.

El cribado de inhibidores de tripanotona reductasa (TR) reportado en este estudio evaluó 4.210 compuestos de una biblioteca inicial y 47.414 de la colección ENAMINE, con tasas de acierto del 0,47 % y 0,13 %, respectivamente (Benítez, Franco, et al., 2022a). De este total, solo 25 compuestos fueron confirmados como inhibidores verdaderos de TbTryS (CI_{50} entre 1,2 y 36,2 μM). Entre ellos, el **Ebselen** destacó como uno de los inhibidores más prometedores por su actividad multi-específica, inhibiendo TryS de *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. infantum* con valores de CI_{50} de 5,3, 13,8 y 2,6 μM , respectivamente. En ensayos celulares, mostró actividad antiparasitaria moderada frente a *T. brucei* (CE_{50} = 8,9 μM ; IS = 11) y *T. cruzi* (CE_{50} = 2,8 μM), aunque con baja selectividad en este último caso (IS $\approx$ 2,4 en U-2 OS). A nivel mecanísticos, el Ebselen se comporta como un inhibidor

de unión lenta e irreversible, capaz de modificar covalentemente el residuo Cys270 del dominio sintasa de TbTryS mediante la formación de un enlace tipo tiol–selenuro, como fue confirmado por espectrometría de masas. Además, induce un ambiente oxidativo intracelular, evidenciado por una oxidación del 48 % del biosensor redox en *T. brucei* (a 18 μM , $2\times\text{CE}_{50}$), y se ha sugerido que también afecta otras enzimas redox como tripanotiona reductasa y hexocinasa. Aunque su elevada reactividad con cisteínas plantea limitaciones para uso clínico, este compuesto se consolidó como el punto de partida racional de mi proyecto de tesis, demostrando que la inhibición del metabolismo de tripanotiona mediante compuestos organoseleniados constituye una estrategia viable para el desarrollo de nuevos fármacos anti-tripanosomátidos.

1.6.5. Inhibidores multidiana: derivados fenoxi-benzo[d]imidazol-4,7-diona

El reemplazo del núcleo bencénico en naftoquinonas por un sistema imidazólico dio origen a los derivados **fenoxi-benzo[d]imidazol-4,7-diona**, una clase prometedora de inhibidores multi-diana. Estas moléculas fueron diseñadas para actuar simultáneamente sobre las enzimas tripanotiona reductasa (TcTR) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (TcGAPDH), ambas esenciales en el metabolismo redox y glucolítico de *Trypanosoma cruzi*. En ensayos biológicos in vitro, los derivados sustituidos con grupos Cl, metoxi, trifluorometilo y metilo exhibieron valores de CI_{50} entre 0,65 y 1,39 μM frente a tripomastigotes, superando la actividad de la naftoquinona parental. Estos resultados confirman que la introducción del anillo fenoxi-imidazólico mejora la afinidad hacia múltiples blancos y potencia la actividad tripanocida (López-Lira et al., 2021).

Desde el punto de vista mecanísticos, el estudio no reporta valores de inhibición directa sobre TcTR (como K_i o CI_{50} enzimática); no obstante, los análisis de acoplamiento molecular mostraron una afinidad favorable de estos derivados por el sitio Z de TcTR, con puntuaciones Glide entre $-5,76$ y $-7,91$ kcal/mol, siendo el compuesto 11a el de mayor interacción teórica ($-7,91$ kcal/mol). Pese a ello, en ausencia de validación bioquímica experimental, no es posible establecer con certeza qué blanco molecular —TcTR o TcGAPDH— contribuye de manera predominante al efecto tripanocida observado. Este tipo de resultados refuerza el valor estratégico de los enfoques multi-diana para contrarrestar la plasticidad metabólica de los tripanosomátidos (López-Lira et al., 2021).

En el estudio realizado por (Paulino et al., 2022) se evaluó el potencial de una serie de **naftoquinonas** como inhibidores de la triptanotiona reductasa de Trypanosoma cruzi (TcTR), enzima central del metabolismo redox del parásito. Mediante enfoques de docking molecular y simulaciones de dinámica molecular, los autores demostraron que los compuestos diseñados (33a–e) se alojan de forma estable en el sitio activo de TcTR, adoptando modos de unión comparables al inhibidor de referencia basado en naftoquinona (compuesto 2).

Los complejos proteína–ligando mostraron interacciones específicas con los residuos Thr335 y Lys61, previamente descritos como puntos clave de anclaje en la cavidad catalítica. Asimismo, se observaron interacciones de apilamiento π – π con Phe367, Phe231 y Phe199, lo cual sugiere que la incorporación de heteroátomos (como nitrógeno) en el esqueleto quinónico puede reforzar la estabilidad del complejo.

los resultados presentados respaldan la hipótesis de que las naftoquinonas constituyen andamios estructurales prometedores para el diseño racional de inhibidores de TcTR, contribuyendo a explicar su actividad tripanocida.

1.7 Inhibidores de TryS

1.7.1. Indazoles

El inhibidor **DDD86243** es un indazol que mostró una CI_{50} contra la enzima (TryS) en Trypanosoma brucei de 181 nM según el ensayo BIOMOL Green y de 274 nM según un ensayo acoplado. Ambos valores son altamente comparables, lo que confirma su eficacia como inhibidor. Además, logró afectar la proliferación de la forma sanguínea de T. b. brucei mediante la reducción de los niveles intracelulares de $T[SH]_2$ a menos del 10%, con la consecuente acumulación de GSH (Torrie et al., 2009a). La optimización de esta serie condujo al diseño de inhibidores con mayor potencia y características farmacológicas mejoradas. Entre los más relevantes se encuentran DDD60632, DDD73385 y DDD85811, que mostraron valores de CI_{50} contra TryS de 181-575 nM. Estos compuestos se comportaron principalmente como inhibidores no competitivos, actuando a través de sitios alostéricos que inducen cambios conformacionales en la enzima. Sin embargo, su potencia biológica fue más moderada (CE_{50} entre 5 y 30 μ M en T. b. brucei), lo cual plantea el desafío de mejorar su permeabilidad y estabilidad (Torrie et al., 2009b).

1.7.2 Paullonas N⁵-sustituidas

El compuesto **FS-554** pertenece a la familia de las paulonas, un grupo de derivados heterocíclicos con un núcleo indol-benzodiazepínico que ha sido ampliamente estudiado como inhibidor de quinasas dependientes de ciclina. En este caso, FS-554 (nombre químico: [1,2,3,4-tetrahidrobenzo[4,5]indolo[2,3-c][2,7]naftiridin-6(5H)-ona]) fue desarrollado como inhibidor selectivo de la LmTrys. Contra esta enzima mostró una destacada capacidad inhibitoria (CI_{50} de 349,5 nM), aunque su efecto sobre la forma promastigota fue significativamente inferior (CI_{50} de 112,3 μ M; Sousa et al., 2014). Experimentos en líneas modificadas genéticamente confirmaron el efecto on-target de este compuesto observándose mayor sensibilidad al mismo en líneas celulares con una sola copia del gen ($tryS^{+/-}$; CE_{50} de 67,8 μ M), mientras que cepas que sobre expresaban TryS fueron más resistentes (CE_{50} de 154,1 μ M). En estudios posteriores estas moléculas fueron optimizadas obteniéndose derivados con valores de actividad biológica y selectividad contra la forma amastigota de *L. infantum* y *L. braziliensis* (Medeiros et al., 2020) significativamente superiores a las de FS-554 y su análogo MOL2008 (Benítez et al., 2016). Estos nuevos compuestos presentaron como característica común una sustituyente piperazina o morfolina en la posición N⁵ y una actividad inhibitoria sobre la TryS de leishmania en el orden sub- μ M a un dígito micromolar. Estos estudios también demostraron que las paulonas actúan como inhibidores competitivos con espermidina y no competitivos con ATP y GSH. Mediante estudios biofísicos, bioquímicos y de modelado molecular se propuso que estas paulonas ocupan el sitio de unión a poliamina y parte de la región de unión de la segunda molécula de GSH (Medeiros et al., 2020). Por otro lado, la enzima de *T. cruzi* mostró mayor propensión a ser inhibida por paulonas con sustituyentes apolares y voluminosos (grupos arilo) en la posición N⁵ (Orban et al. 2012). La co-incubación con un par de los inhibidores más potentes de esta enzima (CI_{50} = 5-10 μ M) incrementó la sensibilidad de *T. cruzi* contra la acción citotóxica de NFX o Bzn, mientras que la sobreexpresión de la TryS ejerció un efecto protector (Mesías et al. 2019). Estos estudios permitieron validar químicamente a la TryS como diana farmacológica en *T. cruzi*. Otro dato revelador fue que solo la paulona como un todo y no sus fragmentos poseen esta propiedad de interaccionar con la TryS (Ihnatenko et al., 2023; Lindhof et al., 2023).

1.7.3 Ebselen y nuevos chasis estructurales

Cribados de alto rendimiento (HTS) dirigidos contra la TryS de *T. brucei* y *Leishmania* mayor permitieron identificar diversas familias de compuestos con actividad inhibitoria sobre esta enzima, varios de los cuales también demostraron efecto antiproliferativo frente a formas clínicamente relevantes de tripanosomátidos (Alcón-Calderón et al., 2022; Benítez, Franco, et al., 2022a; Phan et al., 2022). Entre ellos destacó el Ebselen (EbSe), un derivado selenoorgánico que contiene un átomo de selenio fusionado a un anillo isoselenazólico y que actúa inhibiendo de forma irreversible a la TryS mediante la modificación covalente de residuos de cisteína conservados. EbSe mostró valores de CI_{50} entre 3 y 14 μM frente a la enzima de *T. brucei*, *T. cruzi* y *L. infantum*, y demostró actividad antiparasitaria con CE_{50} de $5,3 \pm 0,2 \mu M$ en *T. brucei* (SI = 11), $13,8 \pm 1,5 \mu M$ en *T. cruzi* (IS = 2,6) y $2,6 \pm 0,2 \mu M$ en *L. infantum* (IS = 3). Otros compuestos evaluados mostraron perfiles diferenciales de potencia y selectividad. El cloruro de calmidazolio, por ejemplo, fue altamente activo frente a *T. brucei* ($CE_{50} = 0,55 \pm 0,03 \mu M$; IS = 182), moderadamente activo contra *T. cruzi* ($CE_{50} = 1,6 \pm 0,1 \mu M$) y prácticamente inactivo frente a *L. infantum* ($CE_{50} > 100 \mu M$). El cloruro de sanguinarina presentó CE_{50} de $3,3 \pm 0,4 \mu M$ en *T. brucei* (IS = 10), $0,37 \pm 0,11 \mu M$ en *T. cruzi* (IS = 1,3–9,5) y $1,7 \pm 0,2 \mu M$ en *L. infantum* (IS = 2). Por su parte, NH125, una sal cuaternaria de imidazólico originalmente descrita como inhibidor de histidina quinasas bacterianas, mostró elevada potencia frente a *T. brucei* ($CE_{50} = 0,34 \pm 0,01 \mu M$; IS = 29), así como frente a *T. cruzi* ($CE_{50} = 0,56 \pm 0,01 \mu M$; IS = 2,6–18) y *L. infantum* ($CE_{50} = 3,2 \pm 0,6 \mu M$; IS = 3). Aunque los valores de CI_{50} enzimática frente a TryS para calmidazolio, sanguinarina y NH125 se encuentran en el rango micromolar, su comportamiento selectivo entre especies evidencia diferencias en la arquitectura del sitio activo de TryS entre tripanosomátidos. Finalmente, se describió un inhibidor adicional que incorpora una unidad adamantano, cuya rigidez y lipofilicidad contribuyen a mejorar la interacción con la enzima; este compuesto presentó una CI_{50} de 1,2 μM frente a la TryS de *T. brucei* y un mecanismo de inhibición alostérica. En conjunto, estos resultados consolidan a TryS como un blanco terapéutico validado y posicionan a Ebselen, NH125 y derivados adamantano como andamios estructurales relevantes para el desarrollo de nuevos agentes antitripanosomátidos (Benítez, Franco, et al., 2022a).

En el estudio desarrollado por Phan (Phan et al., 2022), se implementó un ensayo de cribado de alto rendimiento (HTS) para la identificación de nuevos inhibidores. Los

autores expresaron y purificaron TryS de *L. major* (LmTrys) recombinante, determinaron sus parámetros cinéticos y evaluaron una biblioteca de 35.040 compuestos químicos. Como resultado, 42 moléculas mostraron valores de CI_{50} inferiores a 50 μM , y dentro de ellas se identificaron seis nuevas clases estructurales con actividad inhibitoria frente a la enzima, con CI_{50} entre 9 y 19 μM . El compuesto más activo, denominado TS001, exhibió también actividad antiparasitaria, con valores de CI_{50} de 17 μM en *L. major*, 26 μM en *L. donovani* y 31 μM en *Trypanosoma brucei brucei*. El estudio incluyó además análisis de docking molecular utilizando un modelo por homología de LmTryS, lo que permitió predecir las posibles interacciones enzima–inhibidor y apoyar su mecanismo de unión. Estos resultados posicionan a TS001 como un candidato inicial para el desarrollo de nuevos fármacos leishmanicidas.

En el estudio realizado por Alcon Calderon (Alcón-Calderón et al., 2022) se evaluó una biblioteca de 144 moléculas con el propósito de identificar inhibidores de la (TryS) de *Leishmania infantum* (LiTryS), enzima clave del sistema redox del parásito. Como resultado del cribado inicial, se identificaron trece compuestos con actividad inhibitoria y se seleccionaron seis de ellos por presentar valores de CI_{50} inferiores a 15 μM . Los inhibidores identificados se agruparon en tres clases químicas: (i) derivados triazol–fenil–tiazol (compuesto 1), (ii) híbridos polifenol–carbohidrato (compuesto 4), y (iii) moléculas anfifílicas con cabezas poliamino o bencilamonio (compuestos 3 y 5). Los análisis cinéticos demostraron que los compuestos 1 y 3 actúan como inhibidores competitivos frente a los sustratos de poliaminas, mientras que el compuesto 4 presentó un mecanismo de inhibición mixta hiperbólica ($K_i = 0,8 \mu M$); por su parte, el compuesto 5 mostró una inhibición dependiente de la concentración del sustrato, aunque no ajustable a un modelo competitivo clásico. Estudios de docking y dinámica molecular confirmaron que los compuestos 1 y 3 se posicionan en el sitio catalítico de LiTryS en regiones solapadas con los sustratos naturales. En paralelo, los compuestos 1, 3 y 5 mostraron actividad leishmanicida sobre amastigotes intracelulares, siendo el compuesto 5 el más prometedor ($CE_{50} = 0,6 \mu M$; IS = 35,5). Estos resultados validan a LiTryS como blanco terapéutico y posicionan al compuesto 5 como un candidato inicial para desarrollo farmacológico contra la leishmaniasis.

En conjunto, los hallazgos evidencian que TryS constituye un blanco farmacológico validado y que los derivados identificados, aunque requieren optimización, representan andamios químicos prometedores para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas contra tripanosomátidos.

1.8 Estrategias computacionales para el descubrimiento de inhibidores del metabolismo redox en tripanosomátidos

En la última década, tuvo lugar una expansión sin precedentes del cribado virtual de bibliotecas químicas, combinando docking molecular, dinámica molecular y predicciones ADME-Tox para avanzar en el descubrimiento y caracterización de moléculas bioactivas. Estas aproximaciones no solo permiten anticipar la afinidad ligando-enzima, sino también racionalizar características estructurales con selectividad (Leroux & Krauth-Siegel, 2016; Saccoliti et al., 2020).

Los estudios basados en reposicionamiento farmacológico destacan como una estrategia de bajo costo y alto impacto, particularmente cuando se exploran fármacos aprobados para otras indicaciones. Aplicando el cribado virtual de compuestos de la FDA (Food and Drug Administration), Gómez-Escobedo et al. (2024) identificaron fármacos con actividad contra TR y acción tripanocida contra tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* de las cepas NINOA y INC-5 (Gómez-Escobedo et al., 2024). De modo complementario, O'Sullivan et al. (2015) reportaron que derivados de clomipramina y poliaminas actúan como inhibidores eficaces de la Tripanotiona reductasa, lo que valida la reutilización computacionalmente guiada de andamios clínicamente conocidos (O'Sullivan et al., 2015).

Por otra parte, las estrategias de modelado ligando-dirigido han permitido generar mapas farmacofóricos tridimensionales y modelos QSAR capaces de correlacionar variaciones estructurales con la actividad biológica. Paulino et al., (2022). emplearon esta aproximación con derivados de 2-aryloxinaftoquinonas, diseñando compuestos optimizados frente a *T. cruzi* con validación experimental. A su vez, Pandey y colaboradores han desarrollado estudios sobre derivados alcaloides, imidazólicos y benzoxaborólicos, integrando métodos de docking, dinámica molecular y ADMET para identificar subestructuras farmacológicamente privilegiadas con capacidad de inhibir LmTR (Pandey et al., 2015; Pandey, Kumbhar, Srivastava, et al., 2017; Pandey, Kumbhar, Sundar, et al., 2017).

Otra estrategia computacional es el estudio de sitios alostéricos e interfaces de interacción proteína-proteína que son relevantes desde el punto de vista estructural o funcional para la actividad de la enzima. Aplicando este concepto, Ruiz-Santaquiteria et al. (2017) diseñaron péptidos para interrumpir la dimerización de LmTR que resultaron activos

contra leishmania (Ruiz-Santaquiteria et al., 2017). Estos resultados sugieren que la IA combinada con dinámica molecular puede guiar el modelado de ligando y la identificación de sitios estructurales no convencionales de la macromolécula.

Las moléculas naturales e inspiradas en productos naturales también han sido exploradas mediante plataformas computacionales. Pramanik et al. (2020) validaron al β -sitosterol como inhibidor de TR en *L. donovani* tras un análisis de docking y pruebas biológicas (Pramanik et al., 2020), e identificaron terpenos con potencial antitripanosomático mediante cribado virtual de quimiotecas de compuestos naturales (Nketia et al., 2024). Estos resultados muestran cómo la combinación de quimio informática y biodiversidad química aceleran el hallazgo de candidatos innovadores.

Finalmente, los diseños dual-target representan un horizonte en expansión. Compuestos diseñados para inhibir simultáneamente la TR y otras enzimas redox o rutas asociadas, como los reportados por (Bora et al., 2023), ofrecen una vía para superar mecanismos de escape metabólico y aumentar la robustez terapéutica.

CAPITULO 2. OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

2.1 Objetivo general

Diseñar, sintetizar, caracterizar y evaluar una nueva familia de derivados de benzisotiazolonas como agentes multi-blanco y multi-especie frente a tripanosomátidos, integrando estudios mecanísticos, celulares y de modelo animal, con el propósito de aportar nuevas entidades químicas con potencial farmacológico contra estos patógenos.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Sintetizar y caracterizar derivados de benzisotiazolonas a partir del andamiaje del EbS, empleando técnicas espectroscópicas y análisis quimioinformático para establecer series estructurales.

2.2.2 Evaluar la actividad biológica de los compuestos frente a las formas clínicamente relevantes de *Trypanosoma b. brucei*, *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania infantum*, determinando potencia, selectividad y perfiles especie-específicos.

2.2.3 Analizar el modo de acción de los compuestos más activos y selectivos mediante ensayos sobre líneas celulares reporteras de cambios redox y evaluando la asimilación de glucosa en la forma sanguínea de *T. b. brucei*.

2.2.4 Estudiar el modo de inhibición contra TR y TryS de los compuestos más potentes y selectivos, mediante métodos bioquímicos, de espectrometría de masas, y computacionales.

2.2.5 Validar la toxicidad y eficacia terapéutica del mejor candidato en un modelo murino de infección aguda por *T. b. brucei*.

CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA

3.1 Síntesis iterativa de compuestos derivados de benzisotiazolonas

3.1.1 Datos generales

Los reactivos utilizados fueron adquiridos de SIGMA-Aldrich y Dogueria Industrial Uruguay. Todos los solventes se purificaron según procedimientos de la literatura (Kieboom, 1988). Todas las reacciones se llevaron a cabo en solventes secos, recién destilados, bajo condiciones anhidras, a menos que se indique lo contrario.

Se monitorearon todas las reacciones y separaciones cromatográficas mediante cromatografía en capa delgada (TLC, por sus siglas en inglés), utilizando láminas de gel de sílice de 0,25 mm (Macherey/Nagel, Polygram SIL G/UV 254). Las placas de TLC se examinaron bajo luz ultravioleta de 254 nm y, posteriormente, se revelaron mediante exposición a vapor de yodo, rociado con p-hidroxibenzaldehído o ninhidrina. La cromatografía en columna por técnica de flash se realizó empleando gel de sílice 60 (J.T. Baker) con un diámetro medio de partícula de 40 µm

Los espectros de masa de alta resolución (HRMS) se obtuvieron en un espectrómetro de masas cuadrupolo-orbitrap (Q Exactive Plus, Thermo Scientific) en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del Institut Pasteur de Montevideo

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ¹H-RMN y ¹³C-RMN se realizaron en un espectrómetro de Bruker Advance DPX 400 MHz) a temperatura ambiente. Los desplazamientos químicos se informan en ppm relacionados con el TMS como estándar interno. Los puntos de fusión se midieron utilizando un aparato de punto de fusión Fisher-Johns. Los rendimientos se informan para compuestos puros cromatográfica y espectroscópicamente (RMN de ¹H y ¹³C).

Los compuestos 1-18 fueron proporcionados por el Dr. Marcelo Incerti del Laboratorio de Química Farmacéutica, DQO, Facultad de Química. Los compuestos 19-23 fueron sintetizados en el marco de esta tesis durante una pasantía bajo la dirección del Dr. Marcelo Incerti.

3.1.2 Caracterización fisicoquímica de los compuestos 1-18

La preparación de las iodobenzamidas se llevó a cabo utilizando métodos tradicionales de síntesis de amidas, que consistieron en una primera etapa de amidación del ácido 2-yodobenzoico con diferentes aminas. A partir de cada yodobenzamida (2,0 mmol en DMSO seco, 3 mL) se efectuó un paso de ciclación (Figura 13), que incluyó la adición de CuBr (0,2 mmol), disulfuro de carbono (CS₂, 2,2 mmol) y L-prolina (0,4 mmol), en presencia de aire y bajo agitación a 80 °C. Tras la desaparición del reactivo (monitoreada por TLC), se añadió agua (30 mL) a la mezcla y la fase orgánica se extrajo tres veces con acetato de etilo (10 mL). El extracto se lavó con una solución saturada de NaCl, se secó sobre Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. Los productos de reacción (1–18 y EbS) se purificaron mediante cromatografía en columna sobre sílica gel, utilizando una mezcla de éter de petróleo: acetato de etilo (20:1 a 5:1) como eluyente.

Benzo[d]isotiazol-3(2H)-ona (1)

Sólido blanco, rendimiento (R) = 77 %, punto de fusión (PF= 140–141 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.44 (multiplete, 1H), 7.64 (multiplete, 2H), 8.08 (doblete, J = 11.9 Hz, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 120.8, 124.3, 125.3, 125.9, 131.7, 144.8, 169.1. HRMS (ESI⁺): Calculada para C₇H₅NOS [M + H]⁺: 152.0171, encontrada: 152.0165.

7-Metilbenzo[d]isotiazol-3(2H)-ona (2)

Sólido blanco, R = 58 %, PF= 178–179 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.41 (singulete, 3H), 7.39 (multiplete, 2H), 7.90 (doblete, J = 7.5 Hz, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 18.8, 123.4, 125.9, 130.5, 131.9, 144.7, 169.9. HRMS (ESI⁺): Calculada para C₈H₈NOS [M + H]⁺: 166.0327, encontrada: 166.0330.

7-Metil-2-fenilbenzo[d]isotiazol-3(2H)-ona (3)

Sólido blanco, R = 37 %, PF = 150–151 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.40 (s, 3H), 7.33 (triplete, J = 7.4 Hz, 1H), 7.39 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.47 (multiplete, 3H), 7.73 (doblete, J = 7.7 Hz, 2H), 7.95 (d, J = 7.6 Hz, 2H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 18.6, 124.6, 124.8, 126.4, 127.0, 129.1, 129.4, 129.7, 132.5, 137.5, 140.0, 164.8. HRMS (ESI⁺): Calculada para C₁₄H₁₁NOS [M + H]⁺: 242.0640, encontrada: 242.0635.

2-(4-Tolil)benzo[d]isotiazol-3(2H)-ona (4)

Sólido blanco, R = 28 %, PF = 173–174 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.39 (s, 3H), 7.27 (multiplete, 2H), 7.44 (m, 1H), 7.56 (m, 3H), 7.65 (m, 1H), 8.10 (d, J = 7.9 Hz, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 21.1, 120.1, 124.8, 124.9, 125.7, 127.2, 130.0, 132.2, 134.6, 137.2, 140.0, 164.2. HRMS (ESI⁺): Calculada para C₁₄H₁₁NOS [M + H]⁺: 242.0640, encontrada: 242.0634.

6-Cloro-4-metil-2-(4-tolil)benzo[d]isotiazol-3(2H)-ona (5)

Sólido blanco, R = 19 %, PF = 195–196 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.38 (s, 3H), 2.81 (s, 3H), 7.27 (d, J = 7.7 Hz, 2H), 7.44 (multiplete, 2H), 7.56 (d, J = 7.7 Hz, 2H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 18.6, 21.1, 124.5, 124.7, 126.3, 129.5, 129.7, 132.4, 134.7, 137.2, 140.0, 164.8. HRMS (ESI⁺): Calculada para C₁₅H₁₂ClNOS [M + H]⁺: 290.0407, encontrada: 290.0680.

2-(4-Clorofenil)benzo[d]isotiazol-3(2H)-ona (6)

Sólido blanco, R = 22 %, PF = 108–109 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.44 (multiplete, 3H), 7.57 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.68 (multiplete, 3H), 8.11 (d, J = 7.9 Hz, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 120.1, 124.6, 125.6, 126.0, 127.3, 129.5, 132.5, 132.6, 135.9, 139.6, 164.1. HRMS (ESI⁺): Calculada para C₁₃H₈ClNOS [M + H]⁺: 262.0094, encontrada: 262.0092.

2-(4-nitrofenil) benzo[d]isotiazol-3(2H)-ona (7)

Sólido blanco, R = 35 %, PF = 128–130 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.50 (m, 1H), 7.62 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.73 (ddd, J = 8.2, 7.2, 4.4 Hz, 1H), 8.07 (d, J = 9.3 Hz, 2H), 8.12 (d, J = 7.9 Hz, 1H), 8.35 (d, J = 9.3 Hz, 2H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 117.9, 120.5, 122.1, 122.6, 124.0, 125.2, 131.0, 136.8, 141.0, 161.9. HRMS (ESI⁺): Calculada para C₁₃H₈N₂O₃S [M + H]⁺: 273.0335, encontrada: 273.0330.

2-(4-(trifluorometil) fenil) benzo[d]isotiazol-3(2H)-ona (8)

Sólido blanco, R = 15 %, PF = 129–132 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.47 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.60 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.69 (m, 1H), 7.72 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.92 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 8.11 (d, J = 7.9 Hz, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 120.2, 123.7, 123.8 (q, J = 267.2), 124.7, 126.2, 126.5 (q, J = 3.8 Hz), 128.2 (q, J = 7.8 Hz), 132.9, 139.5, 140.6 (q, J = 1 Hz), 164.2. HRMS (ESI⁺): Calculada para C₁₄H₈F₃NOS [M + H]⁺: 296.0358, encontrada: 296.0350.

2-(2-cloro-6-metilfenil) benzo[d]isotiazol-3(2H)-ona (9)

Sólido amarillo, R = 15 %, PF = 178–179.5 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.27 (s, 3H), 7.25 (m, 2H), 7.46 (m, 2H), 7.59 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 7.68 (ddd, J = 8.2, 6.4, 1.2 Hz, 1H), 8.11 (d, J = 7.8 Hz, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 15.5, 120.3, 123.6, 125.9, 127.2, 127.3, 127.8, 130.5, 132.4, 135.9, 136.1, 136.5, 141.2, 164.6. HRMS (ESI⁺): Calculada para C₁₄H₁₀ClNOS [M + H]⁺: 276.0251, encontrada: 276.0260.

2-fenilbenzo[d]isotiazol-3(2H)-ona (ebsulfur)

Sólido blanco, R = 33 %, PF = 132–133 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 7.32 (t, J = 7.4 Hz, 1H), 7.47 (m, 3H), 7.59 (d, J = 8.0 Hz, 1H), 7.69 (m, 3H), 8.11 (d, J = 7.9 Hz, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 120.1, 124.6, 124.9, 125.8, 127.1, 127.2, 129.4, 132.4, 137.3, 139.9, 164.1. HRMS (ESI⁺): Calculada para C₁₃H₉NOS [M + H]⁺: 228.0484, encontrada: 228.0480.

2-bencilbenzo[d]isotiazol-3(2H)-ona (10)

Líquido amarillo claro, R = 39 %. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 4.60 (d, J = 5.7 Hz, 2H), 7.07 (m, 1H), 7.32 (m, 7H), 7.83 (d, J = 7.2 Hz, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 44.2, 92.5, 127.7, 128.2, 128.3, 128.8, 131.2, 137.6, 139.9, 142.1, 169.2. HRMS (ESI⁺): Calculada para C₁₄H₁₁NOS [M + H]⁺: 242.0640, encontrada: 242.0435.

2-bencil-6-cloro-4-metilbenzo[d]isotiazol-3(2H)-ona (11)

Sólido blanco, R = 18 %, PF = 130–131 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 2.81 (s, 3H), 5.00 (s, 2H), 7.11 (m, 1H), 7.27 (m, 1H), 7.35 (m, 5H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 17.9, 67.4, 117.6, 120.4, 127.9, 128.4, 128.5, 128.9, 136.0, 137.6, 142.3, 142.4, 165.3. HRMS (ESI⁺): Calculada para C₁₅H₁₃ClNOS [M + H]⁺: 290.0407, encontrada: 290.0394.

2-(4-fluorobencil) benzo[d]isotiazol-3(2H)-ona (12)

Sólido blanco, R = 28 %, PF = 107–108 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.01 (s, 2H), 5.59 (ddd, J = 8.2, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 7.03 (m, 2H), 7.34 (m, 2H), 7.40 (m, 1H), 7.49 (d, J = 4.1 Hz, 1H), 8.06 (d, J = 7.9 Hz, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 46.8, 115.7, 115.9, 120.4, 124.4, 125.6, 126.8, 130.2, 130.3, 132.0, 140.3, 165.3. HRMS (ESI⁺): Calculada para C₁₄H₁₀FNOS [M + H]⁺: 260.0546, encontrada: 260.0513.

2-(4-metoxibencil) benzo[d]isotiazol-3(2H)-ona (13)

Sólido blanco, R = 25 %, PF = 156–158 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 3.80 (s, 3H), 4.99 (s, 2H), 6.88 (m, 1H), 7.39 (m, 1H), 7.30 (m, 1H), 7.48 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.58 (ddd, J = 8.4, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 8.06 (d, J = 7.6 Hz, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 47.1, 55.3, 114.2, 120.4, 124.7, 125.4, 126.8, 128.3, 130.0, 131.8, 140.4, 159.7, 166.3. HRMS (ESI⁺): Calculada para C₁₅H₁₃NO₂S [M + H]⁺: 272.0667, encontrada: 272.0671.

2-(4-(trifluorometil)bencil)benzo[d]isotiazol-3(2H)-ona (14)

Sólido blanco, R = 18 %, PF = 190–191 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 5.11 (s, 2H), 7.43 (m, 3H), 7.52 (d, J = 8 Hz, 1H), 7.63 (m, 3H), 8.08 (d, J = 7.9 Hz, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 46.7, 120.5, 124.1, 124.0 (q, J = 270.5 Hz), 125.9 (q, J = 3.8 Hz), 125.8, 127.0, 128.5, 130.3 (q, J = 32.3 Hz), 132.2, 140.2 (q, J = 1.2 Hz), 140.3, 165.5. HRMS (ESI⁺): Calculada para C₁₅H₁₀F₃NOS [M + H]⁺: 310.0514, encontrada: 310.0512.

2-(4-clorofeniletil) benzo[d]isotiazol-3(2H)-ona (15)

Sólido blanco, R = 29 %, PF = 178–179 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 3.04 (t, J = 7.3 Hz, 2H), 4.11 (t, J = 7.2 Hz, 2H), 7.17 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.27 (m, 2H), 7.40 (m, 1H), 7.52 (d, J = 8.1 Hz, 2H), 7.60 (m, 1H), 8.02 (d, J = 7.8 Hz, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 34.9, 45.1, 120.3, 124.5, 125.5, 126.7, 128.8, 130.2, 131.8, 132.7, 136.2, 140.2, 165.3. HRMS (ESI⁺): Calculada para C₁₅H₁₂ClNOS [M + H]⁺: 290.0407, encontrada: 290.0400.

2-(naftalen-2-il) benzo[d]isotiazol-3(2H)-ona (16)

Sólido blanco, R = 21 %, PF = 147–148 °C. ¹H RMN (400 MHz, acetona-d₆): δ 7.57 (m, 3H), 7.80 (ddd, J = 8.4, 7.2, 1.2 Hz, 1H), 7.98 (m, 4H), 8.04 (m, 2H), 8.25 (d, J = 2.0 Hz, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, acetona-d₆): δ 121.1, 122.1, 122.7, 124.9, 126.0, 126.4, 126.5, 126.9, 127.7, 127.9, 129.1, 131.9, 132.7, 135.5, 140.3, 165.7. HRMS (ESI⁺): Calculada para C₁₇H₁₁NOS [M + H]⁺: 278.0640, encontrada: 278.0637.

2-(5-feniltio-1H-benzo[d]imidazol-2-il) benzo[d]isotiazol-3(2H)-ona (17)

Sólido amarillo, R = 22 %, PF = 178–179 °C. ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆): δ 6.62 (brs, 1H), 7.08 (m, 4H), 7.24 (m, 2H), 7.36 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.54 (t, J = 7.9 Hz, 1H), 7.88 (m, 2H). ¹³C RMN (100 MHz, DMSO-d₆): δ 112.8, 117.9, 120.3, 121.5, 124.5, 124.6, 125.7, 126.2, 127.0, 127.2, 129.4, 129.5, 140.3, 148.8, 157.4, 167.8, 173.6. HRMS (ESI⁺): Calculada para C₂₀H₁₃N₃OS₂ [M + H]⁺: 376.0578, encontrada: 375.04890.

N-bencil-2-(2-(3-oxobenzo[d]isotiazol-2(3H)-il)-1H-imidazol-1-il)acetamida (18)

Sólido blanco, R = 11 %, PF = 167–168 °C. ¹H RMN (400 MHz, acetona-d₆): δ 4.46 (d, J = 5.9 Hz, 2H), 5.31 (s, 2H), 7.25 (m, 1H), 7.32 (d, J = 4.4 Hz, 4H), 7.46 (t, J = 7.8 Hz, 1H), 7.51 (s, 1H), 7.66 (t, J = 8.0 Hz, 1H), 7.93 (m, 2H). ¹³C RMN (100 MHz, acetona-d₆): δ 42.9, 52.0, 121.1, 124.7, 124.9, 127.0, 127.4, 127.5, 128.0, 128.2, 128.4, 130.4, 138.9, 147.5, 165.1, 166.6. HRMS (ESI⁺): Calculada para C₁₉H₁₆N₄O₂S [M + H]⁺: 365.1072, encontrada: 364.0989.

Procedimiento general para la preparación de los compuestos 19 y 20

Etil 2-(3-oxobenzo[d]isotiazol-2(3H)-il) acetato (19) y dietil 2-(3-oxobenzo[d]isotiazol-2(3H)-il) succinato (20)

Una solución de 1,2-benzisotiazol-3(2H)-ona (1) (200 mg, 1,3 mmol) en tetrahidrofurano (THF) anhidro (8 mL), bajo atmósfera de N₂, fue enfriada a 0 °C. Luego, se añadió NaH (79,4 mg, 1,3 mmol, dispersión al 90 % en aceite). La mezcla de reacción se agitó durante 20 min y se añadió lentamente bromacetato de etilo (260,5 mg, 1,6 mmol) durante 15 min. Después de agitar por 3 h a temperatura ambiente, la reacción se detuvo añadiendo una solución saturada de NaHCO₃ (10 mL). Posteriormente, se realizaron cinco extracciones con acetato de etilo (10 mL). Las fases orgánicas se combinaron, se secaron con Na₂SO₄ y se evaporó el disolvente al vacío.

La purificación por cromatografía flash (SiO₂, CHCl₃:AcOEt 5 %) permitió aislar el compuesto **19** como un sólido blanco amorfo (248 mg, R = 80 %), punto de fusión = 98–100 °C. ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 4.25 (q, J = 7.2 Hz, 2H), 4.60 (s, 2H), 7.41 (m, 1H), 7.56 (m, 1H), 7.63 (m, 1H), 8.06 (m, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 14.3, 44.8, 62.1, 120.5, 123.6, 125.7, 127.1, 132.4, 141.0, 165.9, 167.8. HRMS calculado para C₁₁H₁₁NO₃S [M + H]⁺ = 238.0539, encontrada: 238.0531.

El compuesto **20** se obtuvo como un aceite amarillo (35 mg, R = 15 %). ¹H RMN (400 MHz, CDCl₃): δ 1.12 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 1.29 (t, J = 7.1 Hz, 3H), 4.11 (m, 3H), 4.23 (m, 2H), 4.80 (d, J = 17.6 Hz, 1H), 5.05 (s, 1H), 7.20 (dd, J = 7.8, 1.2 Hz, 1H), 7.27 (ddd, J = 8.8, 7.2, 1.3 Hz, 1H), 7.37 (dt, J = 7.6, 1.6 Hz, 1H), 8.13 (dd, J = 7.8, 1.5 Hz, 1H). ¹³C RMN (100 MHz, CDCl₃): δ 13.9, 14.2, 49.4, 59.6, 61.7, 62.6, 126.7, 127.0, 128.5, 130.4,

132.3, 132.4, 163.6, 167.8, 168.8. HRMS calculado para $C_{15}H_{17}NO_5S$ $[M + H]^+ = 324.0906$, encontrada: 324.0379.

Preparación del ácido 2-(3-oxobenzod[*d*]isotiazol-2(3*H*)-il) acético (21)

El éster (19) (500 mg, 2,1 mmol) fue suspendido en HCl concentrado (8 mL) y calentado con agitación a 100 °C durante 3 h, hasta completar la hidrólisis. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, se diluyó con agua (20 mL) y se recolectó el precipitado, obteniendo el compuesto 21 como un sólido blanco (339 mg, rendimiento 77 %), punto de fusión = 241–243 °C. 1H RMN (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 4.57 (s, 2H), 7.45 (m, 1H), 7.70 (m, 1H), 7.88 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.99 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 13.10 (brs, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 44.3, 121.9, 123.3, 125.5, 125.7, 132.1, 141.3, 164.9, 169.4. HRMS calculada para $C_9H_7NO_3S$ $[M + H]^+ = 210.0226$, encontrada: 210.0231.

Procedimiento general para la preparación de las amidas (22) y (23)

A una solución del ácido (2,09 g, 10 mmol) en CH_2Cl_2 (20 mL) se añadió cloruro de oxalilo (1,29 mL, 15 mmol) y DMF (73 μ L, 0,95 mmol). La agitación se mantuvo hasta que desapareció el sólido, luego se eliminó el disolvente en condiciones de presión reducida. Se añadió CH_2Cl_2 (20 mL), seguido por la adición de la amina correspondiente (10 mmol) y trietilamina (1,39 mL, 10 mmol). La mezcla se agitó a temperatura ambiente durante una hora más. Luego, se detuvo la reacción con agua y se extrajo la fase acuosa con CH_2Cl_2 . La fase orgánica combinada se lavó sucesivamente con HCl al 10 %, agua, $NaHCO_3$ saturado y salmuera. Finalmente, se secó con Na_2SO_4 . La evaporación del disolvente y purificación por cromatografía flash (SiO_2 , EP:AcOEt 1:1) permitió obtener las amidas 22 y 23.

2-(3-oxobenzod[*d*]isotiazol-2(3*H*)-il)-*N*-fenilacetamida (22)

Sólido blanco, rendimiento = 83 %, PF = 162–163 °C. 1H RMN (400 MHz, $CDCl_3$): δ 4.63 (s, 2H), 7.10 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H), 7.29 (t, *J* = 7.7 Hz, 2H), 7.46 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H), 7.52 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H), 7.60 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 7.68 (m, 1H), 8.09 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H), 8.66 (bs, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, $CDCl_3$): δ 49.4, 120.1, 120.5, 123.2, 124.7, 126.0, 126.9, 129.0, 132.7, 137.3, 141.0, 165.2, 166.5. HRMS calculada para $C_{15}H_{12}N_2O_2S$ $[M + H]^+ = 285.0698$, encontrada: 285.0687.

2-(3-oxobenzo[d]isotiazol-2(3H)-il)-N-(4-(trifluorometil) bencil) acetamida (23)

Sólido blanco, rendimiento = 84 %, punto de fusión = 192–193 °C. ^1H RMN (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2.51 (m, 2H), 4.40 (s, 2H), 7.45 (t, J = 7.5 Hz, 1H), 7.51 (d, J = 8.0 Hz, 2H), 7.70 (m, 3H), 7.90 (d, J = 7.8 Hz, 1H), 7.98 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 8.80 (t, J = 5.8 Hz, 1H). ^{13}C RMN (100 MHz, DMSO- d_6): δ 44.2, 45.9, 122.3, 124.0, 124.5 (q, J = 274.8 Hz), 125.6 (q, J = 3.8 Hz), 125.8, 126.1, 128.1 (q, J = 16.2 Hz), 128.4, 132.4, 141.9, 144.5, 166.4, 167.4. HRMS calculada para $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2\text{S}$ $[\text{M} + \text{H}]^+ = 367.0729$, encontrada: 367.0727.

3.2 Clasificación estructural de las Series Químicas

3.2.1 Categorización

Los compuestos sintetizados en este trabajo (Figura 26) abarcan diferentes variantes del esqueleto fundamental del compuesto 1 al cual se le introdujeron distintos sustituyentes en posiciones del anillo aromático (posiciones R1, R2 y R3) o bien en el átomo de N (posición R4). Estas modificaciones permitieron explorar la influencia de diferentes grupos funcionales en las propiedades biológicas y fisicoquímicas de las moléculas.

Se empleó el servidor ChemMine (Backman et al., 2011) para agrupar a los compuestos de acuerdo a patrones de similitud estructural y química. Los algoritmos quimioinformáticos empleados por este servidor incluyen:

- descriptores estructurales: distancias entre átomos de una molécula, excluyendo al H, el número de electrones pi y los átomos de no-H unidos a ellos; subestructura común máxima en pares de compuestos.

- coeficientes de similitud: coeficiente de Tanimoto (define la proporción de características comunes entre dos compuestos dividido por la suma de las mismas); índice de Tversky (una extensión del coeficiente de Tanimoto que asigna dos variables de normalización), índice de Dice (corroboración de la aproximación de Tversky).

- propiedades de las medidas de similitud: conjunto de valores de propiedad numérica de los compuestos tales como sus diferentes propiedades fisicoquímicas y aplica el coeficiente de correlación de Pearson para calcular (compuesto por compuesto) el grado de similitud. La matriz de similitud generada luego es convertida a una matriz de distancia para el agrupamiento final de las moléculas.

Las estructuras químicas de los compuestos en formato SMILES fueron cargadas en la web del servidor (<https://chemminetools.ucr.edu/similarity/>) y se aplicó un procesamiento de escalamiento multidimensional (3D), con un punto de corte de similitud de 0,9 (rango de 0 a 1 para similitud nula a total, respectivamente). En la Figura 14 se representan los resultados de clasificación obtenidos en escala 2D.

3.3. Ensayos Celulares

3.3.1 Ensayo de viabilidad de la forma sanguínea de *T. b. brucei*

La forma sanguínea de *T. b. brucei* (cepa 427, monomórfica), línea 514–1313 que expresa una luciferasa que emite luz desplazada al rojo (Benítez et al., 2020) fue cultivada en medio HMI-9, suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; GIBCO®), antimicrobianos (100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina, ambos de GIBCO®) y diferentes antibióticos de selección (0,2 µg/mL de bleomicina de Jena Bioscience y 4 µg/mL de sulfato de geneticina, G418 de Sigma-Aldrich). Las células se mantuvieron en crecimiento exponencial en un incubador con temperatura (37°C) y CO₂ (5%) controlados, y 48 h antes del ensayo, se realizaron dos subcultivos consecutivos cada 24 h a una densidad inicial de 5×10^4 parásitos/mL. El número de parásitos viables se evaluó mediante el recuento de células en un microscopio y utilizando una cámara de Neubauer.

El cribado primario (compuestos a 10 µM) y determinación de la CE₅₀ se llevó a cabo siguiendo el protocolo normalizado del ensayo de bioluminiscencia descrito anteriormente (Benítez et al., 2020). Se prepararon soluciones madre (25 mM en DMSO 100%) y de trabajo (20 a 0,05 µM) obtenidas por diluciones seriales de los compuestos utilizando DMSO al 100% v/v como solvente. Una suspensión de 1×10^5 parásitos/mL en fase exponencial de crecimiento se añadió (220 µL/pocillo) a una placa de cultivo de 96 pocillos que contenía 2,2 µL/pocillo de DMSO al 100% v/v (control negativo), nifurtimox (control positivo; concentración final correspondiente a la CE₅₀, 3,5 µM) o los compuestos. Los compuestos y controles se probaron por triplicado y la concentración final de DMSO fue de 1% v/v.

Las placas se colocaron en el incubador durante 24 h. Luego se transfirieron 220 µL de cada pocillo a una placa negra de 96 pocillos y se añadieron 20 µL/pocillo de una solución que contenía 1,5 mg/mL de D-Luciferina (Perkin Elmer, Cat. # 122799) en una

solución salina tamponada con fosfato (PBS) (8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na_2HPO_4 y 0,24 g de KH_2PO_4 en 1 L de agua destilada) con glucosa al 1% p/v y Triton X-100 al 0,05% v/v. La señal de bioluminiscencia se midió cada 8 min en cada ciclo durante un total de 32 min en un luminómetro de placas LUMIstar OPTIMA, utilizando los siguientes ajustes: agitación durante 10 segundos, adquisición de datos por pocillo durante 5 segundos, un retraso de medición de 0,2 segundos, ganancia máxima y temperatura de 37°C. Los valores de CE_{50} se determinaron a partir de curvas de concentración-respuesta ajustadas a una ecuación sigmoidea de cuatro parámetros utilizando el software OriginPro 8.5 / Graph Prisma 8.0. Todos los errores se expresan como desviación estándar (SD).

3.3.2 Ensayos de viabilidad de la forma intracelular de *L. infantum*

3.3.2.1 Aspectos generales de los ensayos y preparación de células

La citotoxicidad de los compuestos sobre la forma intracelular (amastigote) de *L. infantum* se estudió aplicando ensayos de recuento de parásitos por microscopia de fluorescencia o de viabilidad por medición de actividad luciferasa (bioluminiscencia). Para el primero de los ensayos se empleó la cepa salvaje de referencia MHOM/MA/67/ITMAP263 de *L. infantum*, mientras que para el segundo ensayo se trabajó con esta cepa modificada genéticamente para expresar el gen de una mutante de la luciferasa de *Photinus pyralis* que da lugar a un complejo enzima-producto con corrimiento espectral al rojo (emisión de luz a 617 nm). La generación de esta línea celular, así como la puesta a punto del ensayo han sido reportadas recientemente (Benítez, Franco, et al., 2022a). La forma promastigote de ambas líneas celulares fue cultivada en medio RPMI suplementado con 25 mM de HEPES, 10% de suero fetal bovino (SFB) inactivado, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina y sin (línea celular salvaje) o con 15 µg/mL de higromicina B (línea celular reportera). Los cultivos se mantuvieron a 28 °C en frascos de cultivo cerrados. Como célula huésped se seleccionaron a los macrófagos murinos de la línea celular J774.A1 por su facilidad de cultivo, su capacidad para ser infectados por los parásitos y su relevancia en estudios preclínicos. Estos fueron cultivados en medio DMEM suplementado con 10% (v/v) de SFB, 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina, en un ambiente húmedo con 5% de CO_2 y a 37 °C.

Los primeros ensayos de cribado (concentración de compuesto 10 µM) fueron realizados con la línea salvaje de *L. infantum* y aplicando el método de recuento por microscopia. Una vez que el ensayo de bioluminiscencia estuvo puesto a punto y

estandarizado, las evaluaciones de los compuestos (concentración de 20 μM) se realizaron sobre la línea reportera y por el método de bioluminiscencia.

3.3.2.2 Ensayo de microscopia

Los macrófagos de la línea celular J774.A1 en fase de crecimiento exponencial fueron recolectados, resuspendidos en medio DMEM suplementado con 10% de FBS, 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina, y sembrados en un volumen de 0,5 mL con una densidad de $0,5 \times 10^5$ células por pozo en placas de 24 pocillos conteniendo cubreobjetos estériles. Las células fueron incubadas durante 24 h a 37 °C y 5% de CO_2 para permitir su adherencia antes de proceder a la infección. Promastigotes de *Leishmania infantum* (cepa MHOM/MA/67/ITMAP-263), mantenidos en fase estacionaria en medio RPMI 1640, suplementados con 10% FBS, fueron añadidos a los macrófagos en una relación 1:10 o 1:20 (macrófagos: parásitos), y la infección se permitió durante 24 h a 37 °C para favorecer la diferenciación a amastigotes intracelulares. Tras este periodo, se eliminaron los promastigotes no fagocitados mediante tres lavados con PBS pre-calentado a 37 °C y, posteriormente, se añadieron los compuestos a evaluar a una concentración final de 10 μM (cribado primario) o en un rango de 0,01–10 μM para determinación de CE_{50} . La concentración de DMSO no superó el 1% (v/v) en ningún caso, empleándose como control negativo (vehículo), mientras que anfotericina B ($\text{CE}_{50} \approx 120$ nM) se utilizó como control positivo. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C y 5% CO_2 , tras lo cual se retiró el sobrenadante y las células fueron lavadas 2 veces nuevamente con PBS. Los cubreobjetos fueron fijados con paraformaldehído (PFA) al 4% en PBS durante 15 min a temperatura ambiente, lavados, teñidos con DAPI (1 $\mu\text{g/mL}$, 10 min) para marcación nuclear y del cinetoplasto, y montados en portaobjetos utilizando medio de montaje Fluoroshield-DAPI. Las imágenes de campo claro y fluorescencia se adquirieron utilizando un microscopio invertido Olympus IX-81 equipado con objetivo de inmersión en aceite 100 $\times$ /1.4 NA, cámara Hamamatsu ORCA y software $\mu\text{Manager}$; se empleó un filtro de excitación 340–380 nm/emisión 435–485 nm para detección de DAPI. Para cada condición experimental se analizaron entre 100 y 200 macrófagos distribuidos en 4–5 campos aleatorios por cubreobjetos, cuantificándose el número de macrófagos infectados y el número de amastigotes por célula. Los resultados se expresaron como porcentaje de infección [n° de macrófagos infectados/ n° total de macrófagos] $\times 100$ [n° de macrófagos infectados / n° total

de macrófagos] $\times 100$ [nº de macrófagos infectados/nº total de macrófagos] $\times 100$, número promedio de amastigotes por célula infectada e índice de infección % de macrófagos infectados $\times$ nº promedio de amastigotes/macrófago. El efecto de los compuestos se normalizó frente al control DMSO mediante la fórmula: % infección relativa = (macrófagos infectados tratados / macrófagos infectados control) $\times 100$. Los datos fueron analizados utilizando GraphPad Prism 8.0; las CE_{50} se determinaron mediante ajuste de curvas dosis-respuesta a un modelo sigmoidal de cuatro parámetros. Cada condición experimental fue evaluada, al menos, por duplicado independiente y los resultados se expresaron como media $\pm$ desviación estándar.

3.3.2.3 Ensayo de bioluminiscencia

Para obtener una población enriquecida en promastigotes metacíclicos (infectivos), se realizó un procedimiento de selección negativa utilizando aglutinina de maní (PNA), siguiendo la metodología descrita por (Soares et al., 2002), inmediatamente luego de la obtención de los parásitos se preparó una suspensión de macrófagos en fase de crecimiento exponencial (5×10^6 células) y promastigotes metacíclicos (5×10^7 parásitos) en medio RPMI completo que fue distribuida a razón de 200 μ L/pocillo en una placa de 96 pocillos. La placa se incubó a 37 °C con 5% de CO₂ durante 24 h. Posteriormente, y en los correspondientes pocillos, se añadieron los compuestos (concentración de 20 μ M) y los fármacos de referencia, anfotericina B (CE_{50} = 35 nM) y miltefosina (CE_{50} = 38 μ M). Como control se incluyeron muestras de células infectadas tratadas solo con vehículo (1% v/v de DMSO). La placa se incubó por otras 24 h en las mismas condiciones.

Cumplido el tiempo de incubación, se retiró el sobrenadante y se lavaron cuidadosamente los pocillos con 200 μ L de PBS precalentado a 37 °C para eliminar el exceso de compuesto no internalizado, los detritus celulares o células no adherentes. La actividad de la luciferasa se midió utilizando el sistema de ensayo de luciferasa E4530 (Promega). Se añadió el reactivo de lisis y sustrato de luciferasa siguiendo las indicaciones del fabricante y se cuantificó la señal lumínica utilizando un luminómetro de microplacas LUMIstar OPTIMA, configurado con 10 segundos de agitación y 1 segundo de adquisición por pozo.

La señal lumínica obtenida es proporcional al número de parásitos viables presentes en cada pocillo. Para garantizar que las diferencias observadas se debían exclusivamente a la actividad citotóxica de los compuestos y no a cambios en la viabilidad de las células huésped, se normalizaron los resultados utilizando la densidad celular determinada

mediante tinción con yoduro de propidio (PI). Esto permitió corregir cualquier posible variación en el número de células presentes en cada pozo.

Este ensayo fue validado mediante el cálculo del coeficiente de variación ($CV < 17\%$) y el factor ($Z' > 0.5$), obteniéndose valores indicativos de una alta reproducibilidad y robustez del método. Los detalles específicos del desarrollo del ensayo, los parámetros de análisis de datos y los cálculos estadísticos utilizados realizados bajo este proyecto de doctorado se describen en Benítez y col., 2022.

3.3.3 Ensayo de viabilidad de la forma intracelular de *T. cruzi* Dm28c

Con el objetivo de evaluar la actividad de los compuestos frente a la forma intracelular (amastigote) de *T. cruzi* se estableció un ensayo de bioluminiscencia que requirió la generación y caracterización de una línea reportera, y la puesta a punto de la técnica de cribado (Quiroga et al., 2024). En las siguientes secciones se describen las metodologías aplicadas.

3.3.3.1 Generación de línea celular de *T. cruzi* bioluminiscente

El estadio epimastigote de *T. cruzi* cepa Dm28c (Dm28c-WT) se cultivó in vitro en un medio de infusión de hígado y triptosa (LIT) (Camargo, 1963; Rodríguez Durán et al., 2021) suplementado con suero fetal bovino al 10% v/v (SFB, Gibco®), penicilina 100 U/mL, estreptomycin 100 µg/mL (Gibco®) y hemina 0,02 g/L. Los cultivos de parásitos (5 mL en frascos de cultivo cerrados de 25 cm² de Corning®) se incubaron a 28°C y se mantuvieron en fase de crecimiento exponencial sembrando células en medio de cultivo fresco a una densidad celular de 5×10^4 /mL cada cinco días. Las células se contaron en un microscopio óptico (cámara de Neubauer). Este procedimiento se aplicó para sincronizar el crecimiento de los cultivos de la cepa salvaje y la línea celular transgénica.

En un volumen total de 160 µL, se linealizaron 27 µg del plásmido pTRIX2-RE9h (contienen el gen de la luciferasa que emite luz roja al rojo; Lewis y col., 2014)) con AatII (0,75 U/µL) y AscI (0,6 U/µL) en Tampón Smart de Corte (New England Biolabs). La mezcla de reacción fue incubada durante la noche a 37°C. El ADN digerido se precipitó con acetato de sodio 0,3 M (PanReac AppliChem) e isopropanol (0,7 volúmenes) y, después de la centrifugación (10.000 g a 4°C durante 10 min), se resuspendió en 5 µL de agua destilada libre de DNasa/RNasa UltraPure™ (Invitrogen). Los parásitos (~65 millones) en fase exponencial de crecimiento se lavaron con una solución de PBS y luego

con solución salina tamponada con HEPES (50 mM de HEPES, 140 mM de NaCl, 1,5 mM de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 7,4) entre los pasos intermedios de centrifugación a 10.000 g a 4°C durante 10 min. El pellet celular se resuspendió en 100 μL de solución 1 del Kit Básico de NucleofectorTM de Parásitos (Lonza), se mezcló con ADN linealizado (5 μg) y se electroporó en un NucleofectorTM II de AmaxaTM (Lonza) empleando cubetas de 2 mm de ventana y el programa U-033. Los parásitos transfectados se trasvasaron a una botella de cultivo de 25 cm^2 que contenía 2 mL de medio de cultivo sin antibiótico de selección. Luego de una incubación durante la noche a 28°C y en días sucesivos se fueron incorporando concentraciones crecientes del antibiótico de selección (G418) que fueron desde 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en 7 días. Con el fin de confirmar la eficacia de la presión selectiva, epimastigotes fueron sometidos al mismo procedimiento descrito anteriormente excepto que fueron transfectados con agua destilada sin vector de ADN. A partir de la segunda semana después de la transfección, los cultivos correspondientes a la línea reportera de parásitos sobreviven a la presión de selección mientras que los transfectados sin vector de ADN no lo hicieron. De aquí en adelante la línea celular transgénica se denominó Dm28c-luc y fue cultivada en medio con 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de G418.

3.3.3.2 Caracterización de la línea celular de T. cruzi bioluminiscente

3.3.3.2.1 Método de recuperación de capacidad infectiva de la línea celular reportera

Los tripomastigotes metacíclicos altamente infecciosos (TM) de ambas líneas celulares (Dm28c-WT y DM28c-luc) se obtuvieron por estrés nutricional (Daghero et al., 2023). Para ello los epimastigotes en fase exponencial de crecimiento se sembraron a 5×10^4 células/mL en 5 mL de medio LIT (frasco de cultivo de 25 cm^2 con tapa sin filtro de aire) y se incubaron durante 14 días a 28 °C, para luego utilizarlos para infectar células Vero como se describe a continuación (Figura 16, paso 1).

Las células Vero (ATCC CCL-81) se cultivaron al 40% de confluencia (aproximadamente $1,2 \times 10^6$ células) en un frasco de cultivo de 25 cm^2 con tapón ventilado (Corning®) en DMEM suplementado con un 10% v/v de Suero Fetal Bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomina a 37°C y 5% de CO_2 . Los TM se contaron en una cámara de Neubauer, se centrifugaron a 1800 g durante 10 min a 20°C, se resuspendieron en medio de cultivo (DMEM 10% v/v de SFB) y se mezclaron con las células Vero a una MOI (multiplicidad de infección) de 1:10, células: parásitos.

La monocapa celular se incubó durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂, posteriormente se lavó tres veces con PBS y se añadieron 5 mL de medio de mantenimiento (DMEM con 2% v/v de SFB). Cinco días después de la infección, se reemplazó el sobrenadante del cultivo por medio de mantenimiento fresco para evitar la acidificación del cultivo (Figura 16, paso 1 y 2). Se monitoreó diariamente bajo el microscopio la aparición de Tripomastigotes de Cultivo Celular (TCC). Cuando el contenido de TCC en el sobrenadante del cultivo era aproximadamente del 50-60% de la carga total de parásitos (es decir, una semana después de la infección), los parásitos extracelulares se transfirieron a un tubo cónico de 15 mL y se cosecharon por centrifugación (1.250 g durante 10 min a 20°C). Se añadieron cuidadosamente 4 mL de medio de crecimiento al pellet y se incubaron durante 4 h a 37°C, 5% de CO₂, para permitir que los tripomastigotes escaparan del pellet y detritos celulares (Eufrásio y Cordeiro, 2020). Los TCC presentes en el sobrenadante se contaron en una cámara de Neubauer y se utilizaron para infectar un nuevo cultivo de células Vero como se indicó anteriormente (MOI 1:10). Este procedimiento de aislamiento e infección de TCC se repitió nueve veces, lo que produjo una tasa de infección consistente del 80-100%. La tasa de infección se determina mediante el análisis y conteo en microscopio del número de células infectadas con *T. cruzi* comparado con el número total de células Vero cultivadas en un pozo de una placa de 96 pocillos (Figura 16, paso 2).

Al finalizar el tratamiento de infección, la placa se lava dos veces con PBS 1X (150 µL/pocillo) y luego las células se fijan con paraformaldehído 4% p/v en PBS (40 µL/pocillo) durante 20 min a temperatura ambiente. Después de lavar con 100 µL, el ADN celular se tiñe con verde de metilo (100 µL/pocillo de solución 0,0004% p/v en PBS) durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adquieren imágenes (formato TIFF de 16 bits) de múltiples campos de cada pocillo en un microscopio de epifluorescencia invertido (Olympus IX-81) utilizando un objetivo de 40X y filtro de excitación 340–380 nm/emisión. Las imágenes fueron analizadas utilizando el plugin "Segmentación Weka Entrenable" (Arganda-Carreras et al., 2017) del software Fiji (Schindelin et al., 2012). Se analizaron un mínimo de 250 macrófagos por muestra (pocillo) y el porcentaje de células infectadas se calculó como: infección (%) = (número de células infectadas / número total de células contadas) × 100.

Los TCC aislados en el ciclo n.º 9 se criopreservaron (1-2 millones de parásitos en un 90% de medio LIT completo suplementado con un 10 % v/v de glicerol) a -80°C hasta su uso.

3.3.3.2.2 Evaluación de señal de bioluminiscencia en diferentes estadios del desarrollo del parásito.

La actividad de luciferasa fue evaluada en los principales estadios del ciclo de vida del parásito (epimastigote, tripomastigote, amastigote axénico, amastigote intracelular, tripomastigote metacíclicos) tanto para la línea celular DM28c-luc como para la línea celular parental DM28c-WT (control de bioluminiscencia negativa) utilizando el reactivo Bright-Glo™ Luciferase Assay System (E2650 Promega).

Las muestras de parásitos correspondientes a cada uno de los estadios de interés fueron aisladas del sobrenadante de cultivo (epimastigotes, tripomastigote y tripomastigote metacíclicos) o bien del interior de células infectadas (amastigotes). Los amastigotes axénicos fueron obtenidos a partir de TCC, que se concentraron por centrifugación (1.250 g durante 10 min a 20°C) y se resuspendieron a una densidad de 10^6 p/mL en medio BHI. La suspensión se incubó a 28°C, lo que provocó la transformación espontánea en formas amastigotes axénicas que formaban agregados visibles a simple vista.

Los parásitos en sus distintas etapas de desarrollo se lavaron con PBS y después de un ciclo de centrifugación (1.250 g durante 10 min a 20°C), se resuspendieron en 100 µL de glucosa al 1% p/v en PBS. Las células se transfirieron a una microplaca negra de 96 pocillos (Greiner Bio-One) y luego se agregaron 100 µL/pocillo del reactivo Bright-Glo™ Luciferase Assay System (E2650 Promega). La señal de luminiscencia se midió en un luminómetro de microplacas LUMistar OPTIMA (BMG LABTECH) utilizando la siguiente configuración: agitación durante 5 segundos, adquisición de 5 segundos por pocillo, retardo de medición de 0,2 segundos, valor máximo de ganancia y 25 °C. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

La señal de bioluminiscencia, medida en unidades relativas de luz (URL), se expresa como un porcentaje en relación con la señal obtenida para 1×10^6 para los parásitos (en fase exponencial temprana/media), según el tipo de muestra (epimastigotes, tripomastigotes metacíclicos [TM], y amastigotes [TCC]). El cálculo del porcentaje se realiza con la fórmula:

$$\% \text{ Bioluminiscencia} = \frac{(\text{URL muestra} - \text{URL blanco})}{(\text{URL (diferentes estadios)} - \text{URL blanco})} \times 100\%$$

donde URL muestra corresponde a la señal emitida por la muestra en análisis, URL_blanco al control negativo (parásitos en medio de cultivo del estadio correspondiente) y URL_referencia a la señal promedio registrada para 1×10^6 parásitos de cada estadio, cuyas intensidades aproximadas fueron: epimastigotes $\sim 3,5 \times 10^5$ URL, metacíclicos $\sim 1,2 \times 10^5$ URL, CCT a 29 días $\sim 3,2 \times 10^5$ URL, CCT a 72 días $\sim 4,8 \times 10^5$ URL, amastigotes a 18 h $\sim 3,5 \times 10^5$ URL y formas amastigote-like $\sim 1,0 \times 10^5$ URL. Los resultados se expresaron como media $\pm$ desviación estándar (DS), y las diferencias entre grupos se analizaron mediante ANOVA de un factor.

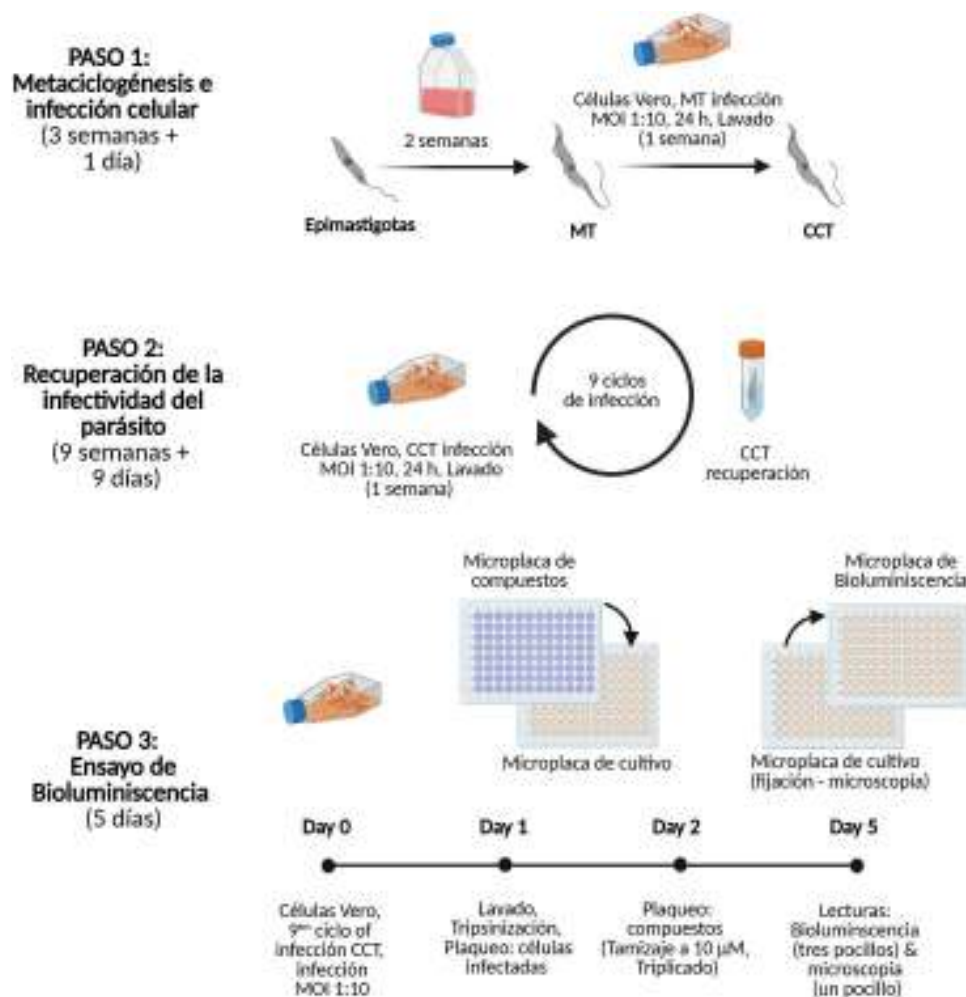


Figura 16. Esquema del procedimiento experimental para evaluar la actividad biológica de compuestos frente a la forma intracelular de *Trypanosoma cruzi*. El diagrama resume las tres etapas principales: (1) **Metaciclogénesis e infección celular**, en la que tripomastigotes metacíclicos (MT) obtenidos por privación de nutrientes son usados para infectar células Vero, a partir de las cuales luego se obtienen los tripomastigotes de cultivo celular (CCT); (2) **Recuperación de la infectividad del parásito**, que incluye nueve ciclos sucesivos de infección en células Vero con CCT para igualar su capacidad infectiva con la de la línea celular parental; y (3) **Ensayo de bioluminiscencia**, en el que las células infectadas se plaquean en microplacas y se exponen a compuestos en condiciones controladas. La lectura de la señal bioluminiscente, complementada con microscopía, se utiliza como medida indirecta de la viabilidad parasitaria.

3.3.3.2.3 Ensayo de cribado

En el Día 0, $1,2 \times 10^6$ células Vero en fase de crecimiento exponencial fueron resuspendidas en 5 mL de medio de cultivo (DMEM + 10% de SFB + 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomycin), transferidas a una botella de cultivo con filtro

de aire de 25 cm² (Corning®) e incubadas durante 4 h a 37°C y 5% de CO₂ para permitir su adhesión a la superficie. Luego, las células fueron infectadas a una MOI 1:10 con parásitos TCC (es decir, $1,2 \times 10^7$ parásitos del ciclo 9 de infección) resuspendidos en DMEM 10% SFB + 100 U/mL de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. Este cultivo de células infectadas se incubó durante 24 h a 37°C y 5% de CO₂. Al día siguiente (Día 1), el monocapa celular se lavó con PBS, y luego se incubó con 1 mL de tripsina-EDTA 0,25% p/v (Thermo Fisher Scientific) durante 5 min a 37°C y 5% de CO₂ para desprender todas las células de la superficie de la botella. Las células fueron luego resuspendidas en medio de cultivo fresco ($1,25 \times 10^5$ células/mL) y transferidas a una microplaca de cultivo de 96 pocillos (Corning®) a razón de 120 µL/pocillo (o 15000 células/pocillo, las cuales cubren del 90 al 100% de la superficie del pocillo). Esta placa se incubó durante 24 h¹ a 37°C y 5% de CO₂ (Figura 16, paso 3).

En el Día 2 se inició la incubación de células infectadas con compuestos o controles. En primer lugar, se prepararon las soluciones de trabajo de los fármacos de referencia NFX (8 mM) y BNZ (10 mM) y de cada uno de los compuestos químicos en estudio (2 mM) mediante dilución con DMSO al 100% v/v de soluciones stock de 25 mM en DMSO. A partir de estas soluciones luego se realizan las correspondientes diluciones que cubran los distintos rangos de concentraciones a ensayar (ej. 10 µM para el cribado inicial de compuestos, o 40 a 0,1 µM y de 100 a 0,1 µM para determinaciones de CE₅₀ para NFX y BNZ, respectivamente). Estas diluciones se realizaron de manera seriada en medio de cultivo de mantenimiento y luego de la homogenización por pipeteo se verificó la solubilidad mediante inspección visual. La concentración final de DMSO en las muestras de compuestos, fármacos y vehículo no superó 0,5% v/v.

A continuación, el sobrenadante del cultivo de la microplaca se reemplaza con 100 µL de medio de mantenimiento que contiene a los compuestos de interés (10 µM), DMSO al 0,5% v/v (control negativo), NFX y BNZ añadidos a diferentes concentraciones o sus respectivas CE₅₀ (control positivo). Se reservaron pocillos sin células a los cuales solo se agregó medio de mantenimiento suplementado con 0,5% v/v de DMSO (blanco). Todas las condiciones se ensayan por triplicado. La microplaca fue luego incubada durante 72

¹ Este tiempo de incubación fue seleccionado porque rinde una tasa de infección del 50% que facilita la cuantificación por recuento microscópico (herramienta de segmentación Weka), el cual fue empleado como método de validación del ensayo.

h a 37°C con 5% de CO₂. En la Figura 17 se muestra el diseño de la microplaca utilizado para el ensayo de cribado.

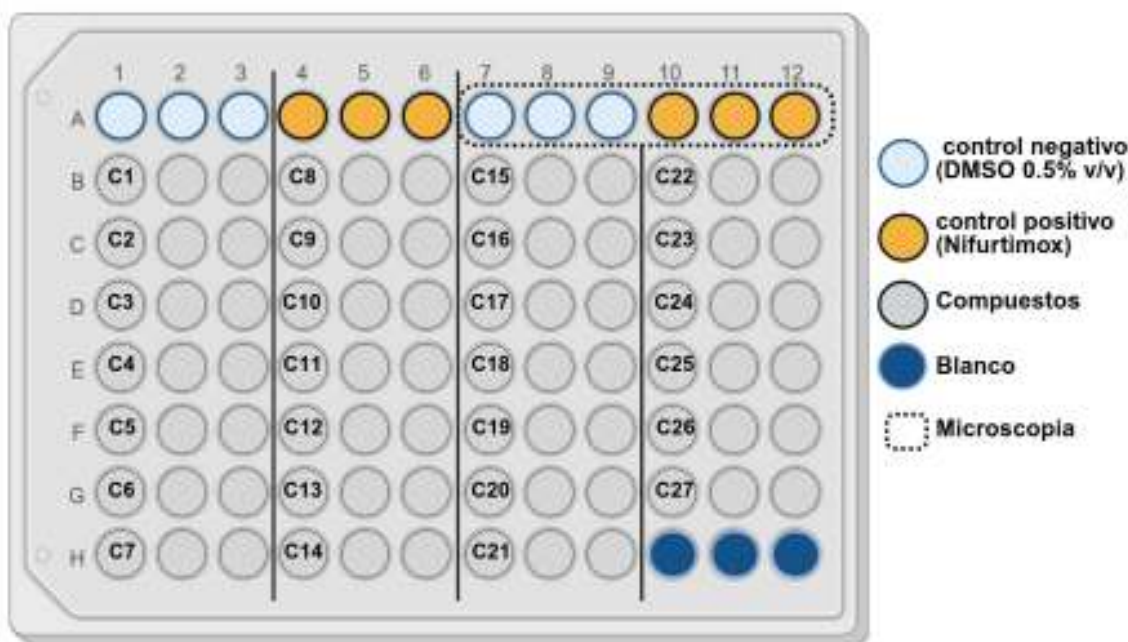


Figura 17. Diseño de microplaca para ensayo de actividad antiparasitaria

Los pocillos en celeste corresponden al **control negativo** (DMSO 0,5 % v/v), mientras que los pocillos en naranja indican el **control positivo** (NFX). Los compuestos de prueba (C1–C27) se dispusieron en los pocillos grises. Los pocillos azul oscuro representan los **blancos** del ensayo, sin células ni tratamientos. La zona señalada con línea punteada corresponde a los pocillos reservados para análisis por **microscopía**.

En el Día 5, pocillos de cada muestra y seleccionados al azar son inspeccionados en un microscopio invertido con un objetivo de 40X para examinar y verificar el grado de infección celular. A continuación, se agregaron 100 µL/pocillo del reactivo Bright-Glo™ utilizando una micropipeta de 8 canales, y la mezcla se homogeneizó pipeteando cuidadosamente para facilitar la lisis celular y evitar la formación de burbujas. Inmediatamente después, el volumen completo de cada pocillo (200 µL) se transfiere a una microplaca negra de 96 pocillos (microplaca bioluminiscente). La señal bioluminiscente se midió en el luminómetro utilizando el equipo y ajustes descritos en la sección 2.3.5.3 (Figura 16, paso 3).

La viabilidad de los parásitos se calculó utilizando la fórmula: Viabilidad (%) = [(BLcpd – BLblanco) / (BLneg – BLblanco) × 100]. Donde BL se refiere a la media de la

señal bioluminiscente correspondiente al compuesto en estudio (cpd), el blanco (blanco) o el control negativo (neg).

El factor Z' se determinó según la siguiente fórmula: $Z' \text{ factor} = [1 - (3 \times \text{DSblanco} + 3 \times \text{DSneg}) / (\text{BLneg} - \text{BLblanco})]$ (J.-H. Zhang et al., 1999).

Finalmente, en el Día 6, la microplaca se lavó dos veces con PBS 1X (150 μL /pocillo) y luego las células se fijaron con paraformaldehído 4% p/v en PBS (40 μL /pocillo) durante 20 min a temperatura ambiente. Después de lavar con 100 μL , el ADN celular se tiñe con verde de metilo (100 μL /pocillo de solución 0,0004% p/v en PBS) durante 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se adquieren imágenes (formato TIFF de 16 bits) de múltiples campos de cada pocillo en un microscopio de epifluorescencia invertido (Olympus IX-81) utilizando un objetivo de 40X y filtro de excitación 340–380 nm/emisión. Las imágenes fueron analizadas utilizando el plugin "Segmentación Weka Entrenable" (Arganda-Carreras et al., 2017) del software Fiji (Schindelin et al., 2012). Se analizaron un mínimo de 250 macrófagos por muestra (pocillo) y el porcentaje de células infectadas se calculó como: $\text{infección (\%)} = (\text{número de células infectadas} / \text{número total de células contadas}) \times 100$.

Las imágenes de campo claro y fluorescencia se adquirieron utilizando un microscopio invertido Olympus IX-81 equipado con objetivo de inmersión en aceite 100 $\times$ /1.4 NA, cámara Hamamatsu ORCA y software $\mu\text{Manager}$; se empleó un filtro 435–485 nm para detección de DAPI.

Los valores de la CE_{50} se calcularon ajustando curvas de concentración-respuesta a una ecuación sigmoidea de cuatro parámetros utilizando el software GraphPad Prism (versión 8.0). Todos los errores se expresaron como una DS.

3.3.4 Ensayos de citotoxicidad sobre macrófagos murinos

Los efectos citotóxicos de las benzisotiazolonas sobre la línea celular de macrófagos murinos (línea celular J774.a1) se evaluaron utilizando el reactivo WST-1 (Roche) (Demoro et al., 2012). Las células se cultivan en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina y 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina en botellas de cultivo de 25 o 75 cm^2 y en incubador humidificado con temperatura (37°C) y CO_2 (5%) controlados.

Las células en crecimiento exponencial se desprenden de la superficie de cultivo por tripsinización (1 mL de tripsina-EDTA 0,25% p/v por 5 min a 37°C y 5% de CO₂) y resuspendió a 6×10^4 células/mL en medio de cultivo DMEM suplementado. Se agregan 200 µL/pocillo de esta suspensión celular a una placa de cultivo de 96 pocillos que luego se incuba durante 24 h a 37°C / 5% CO₂. Luego, las células son tratadas durante 24 h a 37°C, con diferentes concentraciones de compuestos, NFX (fármaco de referencia, 160 µM) o vehículo solo (DMSO 1% v/v: blanco) en 200 µL agregado por pocillo.

Posteriormente, los pocillos se lavan dos veces con 150 µL de DMEM, se agregan 100 µL/pocillo de una solución diluida 1:10 en DMEM del reactivo WST-1 y, después de una incubación de 3 h, se mide la absorbancia a 450 nm y 630 nm utilizando un lector de microplacas de 800 pocillos (Biotek) o Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (ThermoFisher).

Los valores de absorbancia corregidos a 450 nm se obtienen aplicando la siguiente ecuación: $Ac_{450nm} = A_{450nm} - A_{630nm} - A_{blanco450nm}$. El porcentaje de viabilidad celular se calcula como $[100\% \times (Ac_{450nm} \text{ para el compuesto Y a la concentración X} / Ac_{450nm} \text{ del control de blanco de DMSO})]$.

Los valores de la CE_{50} se determinan a partir de las curvas dosis-respuesta, ajustadas a una ecuación sigmoidea de cuatro parámetros o extrapoladas mediante ecuaciones de ajuste no lineales utilizando el software GraphPad Prism 8.0. Los errores se expresan como DS.

3.3.5 Ensayos de citotoxicidad sobre células epiteliales de riñón de mono

De manera similar a lo descrito en el ensayo anterior, la viabilidad de células epiteliales de riñón de mono, Vero (línea celular Vero CCL-81), expuestas a las benzisotiazolonas se evaluó empleando el reactivo WST-1 (Roche). Las células se cultivaron en DMEM suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 10 U/mL de penicilina y 10 µg/mL de estreptomicina en botellas de cultivo de 25 o 75 cm² y en incubador humidificado a 37°C, 5% de CO₂. Para mantener las células en fase de crecimiento exponencial, se realizan subcultivos cuando la confluencia celular alcanza un valor de 40-60%.

Las células en crecimiento exponencial se desprenden por tripsinización (1 mL de tripsina-EDTA 0,25% p/v por 5 min a 37°C y 5% de CO₂) y se resuspendió a $1,5 \times 10^4$ células/mL en medio de cultivo DMEM suplementado. Se agregan 200 µL/pocillo de esta suspensión celular a una placa de microcultivo de 96 pocillos la cual luego se incuba durante 24 h. Al cabo de ese tiempo, las células son tratadas durante 72 h con diferentes concentraciones de compuestos, NFX (fármaco de referencia) o vehículo (DMSO 1% v/v: blanco).

Posteriormente, los pocillos son lavados dos veces con 150 µL de DMEM, se agregan 100 µL/pocillo del reactivo WST-1 (diluido 1:10 reactivo medio suplementado) y, después de una incubación de 3 h, se mide la absorbancia a 450 nm y 630 nm utilizando un lector de microplacas de 800 pocillos (Biotek) o Varioskan LUX Multimode Microplate Reader (ThermoFisher).

El porcentaje de viabilidad celular y los valores de CE₅₀ se calculan tal cual se describió en la sección anterior.

3.3.6 Ensayos sobre línea celular de *T. b. brucei* reportera de cambios redox

La línea celular reportera de cambios redox de *T. b. brucei* (cepa 427, línea celular 449, forma sanguínea) (Franco et al., 2017) se cultiva en medio HMI-9 suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (FBS), 0,2 µg/mL de fleomicina (Gibco®), 5 µg/mL de higromicina (Invitrogen™), y 100 U/mL de penicilina / 100 µg/mL de estreptomicina (Gibco®), en un incubador humidificado con 5% de CO₂ a 37 °C.

Previo al ensayo se sincroniza el crecimiento exponencial de los parásitos y estabiliza la expresión del gen reportero mediante el siguiente procedimiento: se inoculan 5×10^5 parásitos/mL en medio fresco suplementado con 1 µg/mL de oxitetraciclina y a las 24 h se realiza un nuevo subcultivo bajo las mismas condiciones. Luego de ello, los parásitos se cosechan por centrifugación (1.800 g durante 10 min a temperatura ambiente) y se resuspendió en PBS a una densidad de 1×10^6 células/mL. Esta suspensión se transfiere a una placa de cultivo de 96 pocillos (200 µL/pocillo) que contiene 2 µL/pocillo de los compuestos a una concentración final del 0,5, 1 y 2 veces sus respectivos valores de CE₅₀ y con DMSO 1% (v/v) como vehículo. Como control se incluyen pocillos conteniendo solo

vehículo. La placa se incubó el tiempo necesario² a 37 °C y 5% de CO₂ y luego se transfirieron 50 µL de cada pocillo a una nueva placa de 96 pocillos que contiene 100 µL/pocillo de PBS estéril con glucosa al 1% p/v. Las réplicas de cada muestra se incuban separadamente con 1 mM del agente reductor de tioles DTT (ditiotreitól) durante 30 min (condición reductora), 250 µM del agente oxidante de tioles Diamida (DAM) durante 15 min (condición oxidante) y 2 µg/mL de yoduro de propidio (PI). Todas las muestras se analizan con un citómetro de flujo BD AccuriTM C6 utilizando los siguientes pares de láser/filtro: λ_{exc} 488 nm / λ_{em} 613/30 nm para PI y λ_{exc} 488 nm / λ_{em} 530/40 nm para GFP. Se adquiere un máximo de 10.000 eventos por muestra a una velocidad media de 35 µL/min. Las células no viables (positivas para PI) se excluyen del análisis redox (señal GFP) y la intensidad media de fluorescencia (MFI) se analiza solo para las muestras que presentan > 40% de células viables (negativas para PI). Los datos se procesan y analizan con el software BD AccuriTM C6 y GraphPad Prisma 7.00. El estado redox intracelular del biosensor (expresado como % de oxidación del biosensor) se calcula a partir de la MFI del biosensor normalizado contra la diferencia del tratamiento con DTT (MFI correspondiente al 0% de oxidación del biosensor) y el tratamiento con diamida (MFI correspondiente al 100% de oxidación del biosensor).

3.3.7 Ensayos sobre la línea celular de *L. infantum* reportera de cambios redox

Los promastigotes de *L. infantum* (cepa MHOM MA67I7MAP263) que expresan de manera constitutiva el biosensor redox hGrx1-roGFP2 se cultivan a 28°C en medio RPMI 1640 que contiene GlutaMAXTM, 25 mM de sal sódica de HEPES (pH 7,4), suplementado con 10% (v/v) de FBS, 10 U/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomicina y 30 µg/mL de higromicina. Los ensayos se realizan sobre parásitos en fase de crecimiento exponencial (~ 1 x 10⁶ células/mL). En una placa de 96 pocillos conteniendo 2 µL de cada compuesto (concentración final de 10 µM), anfotericina B (0,12 µM) o el vehículo DMSO (1% v/v; control), se siembra (200 µL/pocillo) una suspensión de 5 x 10⁵ parásitos/mL. Luego de incubar la placa a 28°C por 24 h, las muestras se analizan empleando un citómetro FACS-

² Durante la puesta a punto del ensayo se estudiaron diferentes tiempos de exposición: 1, 4 y 24 h. Los análisis fueron realizados sobre muestras incubadas durante 1 h con el fin de obtener un diagnóstico temprano de la causa de pérdida de viabilidad.

Aria Fusion ($\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ / $\lambda_{\text{em}} = 510 \text{ nm}$). Como control se incluyen muestras tratadas con DTT (1 mM, 30 min) y DAM (250 μM uM, 15 min).

3.4 Ensayos in vitro con la proteína fluorescente del biosensor redox

3.4.1 Purificación de la forma recombinante del biosensor roGFP2

La forma recombinante con etiqueta His del biosensor roGFP2 se expresa y purifica a partir de *Escherichia coli* (cepa C41). Se realiza un pre-cultivo nocturno (medio LB + 50 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina, 220 rpm a 37 °C) de células transformadas que luego se diluye 1:100 en medio 2YT (triptona 16 g/L, extracto de levadura 10 g/L, NaCl 5 g/L) fresco con 50 $\mu\text{g/mL}$ de kanamicina, y se cultiva a 220 rpm y 37 °C hasta alcanzar una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de $\sim 0,8$. En este punto, el cultivo se suplementa con isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, concentración final 1 mM) y la incubación se extiende durante la noche a 100 rpm, 20 °C. Las células se recolectan por centrifugación a 5.000 g durante 10 min a 4 °C y el pellet celular se resuspendió en Tampón A (50 mM de fosfato sódico, pH 8,0, 300 mM de NaCl) en una proporción de 5 mL de tampón por gramo de pellet. Se agrega lisozima (50 mg/mL) y DNasa (15 U/mL; Roche) al homogeneizado celular, y la suspensión se incuba durante 1 h en hielo. Luego, la suspensión celular se sonica durante 2 min (pulsos de 30 s encendido/apagado a una amplitud del 40%) y el lisado se centrifuga dos veces a 23.000 g a 4 °C durante 1 h. El sobrenadante clarificado y filtrado (filtro de 0,45 μm) se aplica a una columna HisTrap de 5 mL (GE Healthcare, Chicago, IL, USA) pre-equilibrada con Tampón A. La columna se lava con 15 mL de Tampón A y luego con 15 mL de Tampón A + 20 mM de Imidazol. La proteína recombinante se eluye de la columna con Tampón A + 500 mM de Imidazol. Las fracciones de elución que contenían el biosensor (observación óptica) se agrupan y se realiza un intercambio contra Tampón A usando una columna PD-10 (G25-sepharose, GE Healthcare). Para eliminar la etiqueta His, la proteína recombinante se digiere durante la noche (4 °C) utilizando 4,5 mg/mL de proteasa TEV (van den Berg et al., 2006) en Tampón A que contiene 5 mM de DTT y 2 mM de EDTA. Finalmente, la muestra digerida se aplica a una columna HisTrap de 5 mL pre-equilibrada con Tampón A, y se recoge la fracción no unida que contiene al biosensor sin etiqueta. La pureza del biosensor recombinante se evalúa mediante SDS-PAGE, y la concentración de la proteína se estima midiendo la absorbancia a 280 nm ($\epsilon_{280} = 23.290 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) en un

dispositivo Nanodrop DS-11 FX. El análisis por espectrofluorimetría (ver a continuación) indica que el biosensor purificado se obtiene mayoritariamente en forma disulfuro (oxidado).

3.4.2. Ensayos de fluorescencia con el biosensor roGFP2

El ensayo se realizó en tampón A (50 mM fosfato de sodio, pH 8,0; 300 mM NaCl) utilizando cubetas de cuarzo de 1 cm de camino óptico con un volumen de trabajo de 1 mL. El biosensor roGFP2 purificado se utilizó a una concentración final de 5 μ M. Para establecer el estado reducido se añadió DTT a 10 mM, mientras que los compuestos de interés se evaluaron a 50 μ M, manteniendo una concentración final de DMSO del 1% en todas las condiciones. Las mezclas se incubaron durante 60 minutos a 4 °C y se registraron los espectros de fluorescencia (excitación y emisión) en un equipo Cary Eclipse. La emisión se midió a 510 nm tras excitación a 405 nm y 488 nm, y se calculó el cociente $R = I_{510(ex405)} / I_{510(ex488)}$. El porcentaje de oxidación del biosensor se determinó normalizando dicho cociente con respecto a los valores obtenidos bajo condiciones de roGFP2 totalmente reducido y totalmente oxidado, mediante la fórmula: $\text{Oxidación (\%)} = [(R - R_{\text{reducido}}) / (R_{\text{oxidado}} - R_{\text{reducido}})] \times 100$. Los datos se expresaron como promedio $\pm$ desviación estándar, indicando el número de réplicas técnicas y biológicas utilizadas.

3.5 Ensayo de consumo de glucosa por forma infectiva de *T. b. brucei*

Parásitos *T. b. brucei* (forma sanguínea) en fase de crecimiento exponencial se cosechan por centrifugación (2000 g por 10 min a temperatura ambiente), se resuspendió en medio de cultivo fresco ($5,5 \times 10^6$ células/mL) y se distribuyen en placas de 24 pocillos a razón 1 mL/pocillo. Posteriormente, las células se tratan durante 4 h a 37 °C con los compuestos 1, 10–14, 16, 21, EbS y EbSe a una concentración equivalente al doble de su CE_{50} . Como control negativo se utiliza DMSO al 1 % (v/v).

Al finalizar el tratamiento, se cuantifica el número de parásitos en cada condición mediante recuento microscópico en cámara de Neubauer. Los sobrenadantes de cultivo se

recuperan por centrifugación (2000 × g, 10 min, temperatura ambiente) y la glucosa residual se cuantifica utilizando un analizador automatizado (Bioprofile Basic 2, Nova Biomedicals). Para estimar el porcentaje de glucosa consumida por los parásitos, se comparan los niveles de glucosa entre los cultivos tratados y el control, empleando la fórmula: %Consumo de glucosa = (Consumo compuesto /Consumo vehiculo) × 100. El consumo celular (Δ glucosa/célula) se calcula como la diferencia entre la concentración de glucosa en el medio fresco y la del sobrenadante post-incubación, normalizada por la diferencia en el número de parásitos entre ambas condiciones.

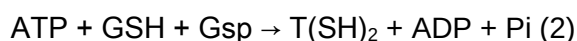
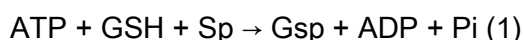
3.6 Ensayos con Tripanotiona Sintetasa (TryS)

3.6.1 Expresión y purificación de la TryS de *T. b. brucei* (TbTryS)

La expresión y purificación de la proteína recombinante de TbTrys *L. infantum* se realizó con alto grado de pureza siguiendo protocolos previamente descritos (Benítez et al., 2016).

3.6.2 Ensayo de cribado sobre TbTryS

Los compuestos de interés fueron cribados contra la TbTrys empleando un ensayo de alto rendimiento y de punto final descrito en (Benítez et al., 2022). Las reacciones de síntesis catalizadas por la TryS pueden describirse de la siguiente manera:



El ensayo consiste en cuantificar el fosfato inorgánico (Pi) liberado del ATP durante la catálisis por TryS, independientemente si este proviene de la primera (1) o segunda (2) reacción de síntesis, y se detecta al completarse con el reactivo colorimétrico BIOMOL GREEN TM (Enzo Life Sciences).

El ensayo se realiza en una placa de 384 pocillos con un volumen de total de reacción de 16 μ L y todas las muestras se ensayan por cuadruplicado. En primer lugar se agregan 10 μ L/pocillo de 650 nM TbTryS en tampón de reacción (5m MDTT, 10 mM MgSO₄, 0,5 mM EDTA, 100 mM HEPES, pH 7,4, 9 mM NaCl, 10%v/v DMSO) seguido de 1 μ L/pocillo de benzisotiazolonas (concentraciones de 0,057 hasta 125 μ M), DMSO (control de reacción al 1,25% v/v) o un inhibidor específico de TryS (ácido aurin-

tricarboxílico a 8 μ M, AUC). La placa se incubó durante 1 hora a 23 - 26°C y luego a todos los pocillos se añade 5 μ L de una mezcla de los sustratos a concentraciones cercanas a las fisiológicas ($\geq$ valores de K_M), 150 μ M de ATP, 2 mM de SP y 150 mM de GSH (Master Mix, MM). Al cabo de 20 min de incubación a 28°C se agrega 200 μ L/pocillo del reactivo BIOMOL Green™ y la absorbancia a 650 nm se mide en un lector de placas Multiscan EX (ThermoFisher). La concentración inhibitoria del 50% de la actividad (CI_{50}) se determinó a partir de curvas de dosis-respuesta con 8 puntos de concentración para cada compuesto. La interferencia de los compuestos con la reacción colorimétrica se corrigió para cada punto de concentración/compuesto mediante la preparación y análisis de muestras procesadas como se describió anteriormente excepto que en lugar de TbTryS se agregó 50 mM de K_2HPO_4 . Los valores de la CI_{50} se obtuvieron a partir de las curvas de dosis-respuesta (% de inhibición de TryS $\pm$ DS frente a Log [compuesto] mM) ajustadas a una ecuación sigmoidea en el Graph Prisma 8.0.

3.6.3 Ensayo de inhibición irreversible y análisis de espectrometría de masas

Se preparan tres muestras conteniendo 1,44 μ M de TbTryS o LiTryS recombinante en tampón de reacción (120 μ L de volumen total) las cuales se tratan de la siguiente manera: 1) Iodoacetamida (IAM) 15 mM por 1 h, 2) IAM 15 mM por 1 h seguido de EbS 20 μ M por 1 h, y 3) EbS 20 μ M por 1 h. Luego de remover el exceso de reactivos mediante filtración en gel con resina de exclusión molecular 7 kDa (Zeba Spin Desalting Column, Thermo Fischer Scientific) las muestras se separan en dos, y una de ellas se trata con DTT 5 mM por 30 min. La actividad de las enzimas sometidas o no a estos tratamientos se mide y calcula siguiendo el protocolo de ensayo y métodos descritos en la sección anterior.

Para el análisis por espectrometría de masas, la cantidad de proteína en las muestras de interés se ajustó a 0,011 mg, con 50 mM de bicarbonato de amonio pH 8 y se realizó una digestión triptica (proteasa: proteína, 1:20 p/p - Promega, Madison, WI) toda la noche a 37 °C. Las digestiones se acidificaron con ácido tricloroacético 10% hasta una concentración final de 1% v/v. Las muestras se concentran en vacío y desalan usando Ziptips C18 (Merck Millipore, Kenilworth, NJ). Los péptidos eluidos se resuspendió en ácido fórmico 0,1% v/v en agua. Posteriormente la muestra se inyecta en el equipo de

cromatografía líquida- MS/MS (Sistema de cromatografía líquida UltiMate 3000; Thermo Fisher Scientific) acoplado a un espectrómetro de masa Q Exactive Plus equipado con una fuente Easy-Spray™ (Thermo Fisher Scientific) de la Unidad de Bioquímica y Proteína Analítica del Institut Pasteur de Montevideo. El espectrómetro de masa se opera en modo positivo y el voltaje del Ion-spray es de 2,5 kV, la temperatura capilar de 250 °C y los niveles de radio frecuencia de los lentes-S de 50. Se adquieren datos de escaneo de masa en el rango de 200 a 2000 m/z con una resolución de 200 m/z, un blanco de control de ganancia automática de 1×10^6 y un tiempo de inyección máximo de 100 ms.

La fragmentación de los precursores se realiza en una celda de disociación por colisión de alta con una resolución de 17,500 a 200 m/z, con un valor de control automático de ganancia de 1×10^5 y un tiempo de inyección del ion máximo de 50 ms. Se usa el PatternLab for Proteomics 4.0 (PatternLab) software para procesar los archivos crudos, contemplando la presencia de los contaminantes habituales en experimentos de proteómica (ej. queratina) así como la masa de la TbTryS y LiTryS. Los parámetros de búsqueda de modificaciones de residuos incluyen: oxidación de metionina, oxidación de cisteína, carbamidometilación de cisteína y modificación covalente en cisteína o lisina por el ebsulfur (227,3 Da). Los resultados se filtran con el algoritmo de PatternLab Search Engine Processor. Para cubrir posibles sitios de modificación no identificados en la búsqueda con el procesador también se buscan modificaciones de ebsulfur con otras posibles masas (m/z). Para identificar espectros de MS/MS conteniendo estos iones los datos de masa se filtran con el software Thermo Scientific Xcalibur™ 4.0.

3.7 Ensayos con Tripanotona Reductasa (TR)

3.7.1 Expresión y purificación de la TR

La enzima recombinante TcTR se produjo con alto grado de pureza siguiendo protocolos previamente publicados (Uliassi et al., 2017) y detallados a continuación.

E. coli (cepa BL21/DE3 pLysS; Invitrogen) transformada con el plásmido pet24b-TcTR que codifica para la expresión de la TcTR se cultiva en medio LB conteniendo Kanamicina (30 µg/mL), a 37°C (220 rpm) y durante una noche. Este pre-cultivo se inocula (relación 1:100) en un medio de crecimiento específico (5 g/L de extracto de levadura, 25 mM de Na_2HPO_4 , 25 mM de KH_2PO_4 , 50 mM de NH_4Cl , 5 mM de Na_2SO_4 , 2 mM de MgSO_4 ,

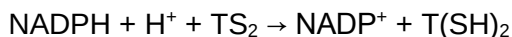
0,5% v/v de glicerol, 0,05% p/v de glucosa, 0,2% p/v de α -D-lactosa) suplementado con MEM (Medio Esencial Mínimo) 1X (10 mL/1000 mL, Gibco) y Kanamicina (30 μ g/mL), y se incubaba hasta alcanzar una $DO_{600\text{ nm}}$ de 0,6. En este punto, la expresión TcTR se induce agregando IPTG (concentración final 1 mM) e incubando durante la noche a 20°C y 120 rpm. Luego las células se recuperaron por centrifugación (4000 g a 4°C, 15 min) y se resuspendió a una relación de 1 g de pellet/10 mL de tampón A (20 mM de Tris-HCl pH 7,5, 400 mM de NaCl y 6 μ M de FAD) conteniendo 10 mM de imidazol. A esta suspensión se añade lisozima (3,1 mg/mL), DNAsa (2 U/mL) y Fenil Metil Sulfonil Fluoruro (1 mM), y luego se incubo durante 1 h en hielo. A continuación, la suspensión se sónico en un equipo Branson utilizando los siguientes parámetros: 2 min con pulsos de 30 s encendido/apagado a una amplitud del 30%. El lisado se centrifugo (23.000 g durante 30 min a 4°C) y el sobrenadante se clarifica por filtración en un filtro de nitrocelulosa de 0,45 μ m.

La purificación de la TcTR recombinante se realiza en dos pasos de cromatografía. Primero, el lisado clarificado se carga en una columna de HisTrap Fast Flow (GE healthcare) de 1 mL pre-equilibrada con 50 mL de tampón A empleando una bomba peristáltica (flujo: 1 mL/min). Después de lavar la columna con 50 mL de una solución de 30 mM de imidazol en tampón A, la proteína se eluye isocráticamente aplicando 300 mM de imidazol en tampón A y recogiendo fracciones de 1 mL. Las muestras eluidas se analizaron en geles de SDS-PAGE al 12% para estimar pureza. Las fracciones con una pureza superior al 60% de TcTR se combinan, y la muestra resultante se concentra por diafiltración utilizando un filtro Ultra-15 de 30 kDa (Amicon) y centrifugación a 5000 g y 4°C.

El segundo paso de purificación consiste en una cromatografía de exclusión molecular en una resina Superdex G-200 empacada en una columna 16/60 o 10/300 (GE healthcare) y conectada a un equipo de cromatografía líquida de baja presión AKTA (GE-Healthcare). La columna se pre-equilibra con 5 volúmenes de tampón B (20 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 1 mM de EDTA, pH 7,5) a un flujo de 1 mL/min. Luego de inyectar la muestra de la TcTR purificada por IMAC, se realiza la elución con tampón B a un flujo de 0,5 mL/min, monitoreando la absorbancia a 280 nm y recogiendo fracciones de 1 mL. La pureza y concentración de la TcTR se estima mediante análisis de geles de SDS-PAGE teñidos con azul de Comassie y midiendo la absorbancia a 280 nm (Nanodrop DS-11 FX), respectivamente. La proteína recombinante se concentra a 244 μ M mediante diafiltración (condiciones descritas en el párrafo anterior) y se almacena a -20°C hasta su uso.

3.7.2 Ensayo de actividad de TR

La actividad enzimática de la TcTR se determina midiendo la oxidación de NADPH (que absorbe a 340 nm) a NADP⁺ (carece de absorción a 340 nm) producto de la reducción de la tripanotona disulfuro de acuerdo a la siguiente ecuación:



Los ensayos de actividad de la TcTR se realizan en tampón B (composición detallada en la sección anterior), utilizando concentraciones saturantes de ambos sustratos (NADPH y TS₂), y midiendo el consumo de NADPH ($\epsilon_{340\text{ nm}} = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) a 25°C con un espectrofotómetro termostatzado (Varian Cary® 50 UV-Vis). En un volumen total de reacción de 120 μL (concentración de DMSO 1 % v/v), se preincuba TcTR (68 nM) durante 1 h a 25°C en ausencia (control de actividad) o presencia de compuestos (6,8 μM y 68 μM) y EbSe (68 μM ; control de inhibición). Tras transferir las muestras a cubetas de cuarzo, se añade 153 μM NADPH (K_M para NADPH = 14,4 μM) y se registra la absorbancia basal a 340 nm durante 1 minuto. A continuación, la reacción se inicia añadiendo 104 μM TS₂ (K_M para TS₂ = 31,2 μM) y se registra la absorbancia a 340 nm durante 5 min. La concentración de NADPH a tiempo inicial y final se determina para cada muestra aplicando la fórmula de la ley de Beer-Lambert: $\Delta\text{Absorbancia} = \epsilon \cdot c \cdot l$, donde ϵ es el coeficiente de extinción molar para NADPH ($6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), c es la concentración de NADPH en μM , y l es la longitud del paso de la cubeta (1 cm). La actividad enzimática (consumo de NADPH/min) luego se expresa en valor porcentual respecto a la actividad de la muestra de TcTR no tratada con compuestos (100% actividad) y la muestra con sustratos, pero sin TcTR (0% actividad).

3.7.3 Ensayo de inhibición irreversible y análisis de espectrometría de masas

Para evaluar si la unión de los inhibidores a la enzima (TcTR) es irreversible, la enzima recombinante (350 nM) se incuba con un exceso de los compuestos 6, 7 y EbS (68 μM) o con vehículo (1% v/v DMSO) durante 1 h a 25°C. Después de eliminar los componentes de baja masa molecular mediante filtración en gel en una columna Zeba Spin de 7 kDa de corte (Thermo Fisher Scientific), una fracción de cada una de las muestras (12 μL ; 28 nM de TcTR) se incuba con y sin 10 mM de DTT durante 3 h a 25°C. Los ensayos se realizan en tampón B y DMSO a una concentración final de 1% (v/v). Para todas estas

muestras, la actividad remanente de TcTR se mide y cuantifica siguiendo los protocolos descritos en la sección anterior, pero omitiendo la preincubación de 1 h.

Para identificar el posible sitio de modificación covalente de la TcTR por parte de los compuestos, la enzima purificada (concentración final de 380 nM) se incuba con un exceso de los compuestos 7 o EbS (95 μ M), en un tampón B con DMSO al 1 % (v/v) y durante 2 h a temperatura ambiente (25 °C). Posteriormente, el exceso de compuesto se remueve mediante diafiltración utilizando filtros Amicon de corte molecular de 10 kDa (Thermo Fisher Scientific) y centrifugando a 14.000 g por 10 min. Cada una de las muestras se divide en dos fracciones que son incubadas durante 30 min en ausencia o presencia de 10 mM DTT. Tras una nueva diafiltración para eliminar el DTT, las muestras son tratadas con 50 mM de IAM durante 30 min en la oscuridad para bloquear los residuos de cisteína libres. Finalmente, el exceso de IAM se remueve por diafiltración bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. Estas muestras son luego digeridas con tripsina de grado para secuenciación (Promega, Madison, WI) durante 16 h a 37 °C y empleando una proporción enzima: proteína de 1:50 (p/p) en el mismo tampón AMBIC (Buffer bicarbonato de amonio 50 mM, pH 8). Los péptidos obtenidos se recuperan aplicando dos pasos de centrifugación (14.000 g, 10 min). Luego de la primera centrifugación se agrega 100 μ L de ácido fórmico (FA) al 0,1 % (v/v) a los filtros y se vuelve a repetir la centrifugación. Ambas fracciones se combinan y concentran al vacío en un concentrador CentriVap (Labcono™). Los péptidos se resuspenden en FA 0,1 % (v/v) y se aplican a columnas StageTips empacadas con membranas Empore™ C18 SPE (Supelco, 66883-U; preactivadas con 100% (v/v) methanol y equilibradas con 0,1% (v/v) FA). Para eluir los péptidos de la membrana se aplica 40% (v/v) acetonitrilo (ACN) y 0.1% (v/v) FA. Luego de secar los péptidos al vacío, se resuspenden en 0,1% (v/v) FA.

El análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) se realizó utilizando un sistema nano-HPLC UltiMate 3000 (Thermo Scientific) acoplado a un espectrómetro de masas Orbitrap Exploris 240 (Thermo Scientific) equipado con una fuente Easy-Spray. Las muestras se cargan en una columna trampa Acclaim PepMap™ 100 C18 (75 μ m $\times$ 2 cm, 3 μ m) y se separan en una columna analítica PepMap™ RSLC C18 (75 μ m $\times$ 50 cm, 2 μ m, 100 Å) a 40 °C, utilizando un sistema de gradiente con solventes A (agua + 0,1 % FA) y B (acetonitrilo + 0,1 % FA). La elución se realiza con un gradiente de 1 % a 35 % de B durante 90 min, seguido de un incremento hasta 99 % en 20 min, a un flujo de 200 nL/min.

El análisis MS se realiza en modo positivo, empleando una estrategia de adquisición dependiente de datos tipo "top-20". El espectrómetro se configura con un voltaje de ionización de 2.0 kV y una temperatura de capilar de 250 °C. Las exploraciones de precursores se adquirieron con una resolución de 90.000 a 200 m/z, mientras que la fragmentación por HCD se realiza con resolución de 22.500. Se excluyeron de la fragmentación los iones con carga no asignada, carga 1+ y mayores a 5+. Se utilizan colisiones con energías normalizadas de 25, 30 y 35 (NCE) y se aplica una exclusión dinámica de 10 segundos.

El análisis de datos se realiza con el software PatternLab for Proteomics (<http://www.patternlabforproteomics.org>). La base de datos combinada (target-reverse) que incluía las secuencias de E. coli BL21 (DE3), TcTR de T. cruzi (cepa CL Brener) y contaminantes comunes se empleó para el análisis de los datos RAW. Se permitieron dos sitios de corte perdidos por tripsina y hasta dos modificaciones variables por péptido, incluyendo oxidación de metionina, carbamidometilación de cisteínas, formación de enlaces disulfuro parciales y modificaciones covalentes con EbS (227.0405 Da) o compuesto 7 (272.0257 Da).

3.8 Métodos Computacionales

3.8.1 Metodología 3D-QSAR

Se llevó a cabo un análisis de relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSAR) tridimensional (3D) para evaluar la correlación cuantitativa entre la actividad anti-Trypanosoma brucei brucei (T. b. brucei) de los compuestos benzisotiazolonas y sus propiedades estéricas y electrostáticas. El análisis fue realizado empleando el software Open3DQSAR (Tosco & Balle, 2011) y el enfoque de Análisis Comparativo de Campos Moleculares (CoMFA). Primero, se construyó y optimizó una base de datos de estructuras de benzisotiazolonas utilizando el campo de fuerza MMFF94x mediante el programa MOE (Molecular Operating Environment, 2019). La actividad biológica de los compuestos, expresada como pCE₅₀, fue incorporada a la base de datos como "campo de bioactividad" para su normalización y linealización. A continuación, se procedió al alineamiento rígido de las moléculas para garantizar una superposición precisa de sus estructuras en una conformación minimizada en energía (Murumkar et al., 2009). Este alineamiento permitió un análisis detallado de los campos moleculares estéricos y electrostáticos. El modelo

QSAR fue construido utilizando el método de Mínimos Cuadrados Parciales (PLS) para establecer una relación cuantitativa robusta entre las propiedades estructurales de los compuestos y su actividad biológica. La validación interna del modelo se llevó a cabo mediante el método de validación cruzada de dejar-uno-fuera (Leave-One-Out, LOO), identificando el número óptimo de componentes principales (PC) que ofreciera el menor error cuadrático medio de predicción (RMSE) y el valor más alto del coeficiente cruzado validado (q^2).

3.8.2 Análisis in silico del complejo TbTryS – EbSe

3.8.2.1 Construcción y comparación de modelos tridimensionales de la TryS

Dada la alta conservación entre las secuencias de TryS y los resultados obtenidos en el análisis de espectrometría de masas, la secuencia de TbTrys se selecciona como entrada en los servidores Phyre2 (Kelley et al., 2015), e I-Tasser (Roy et al., 2010; Yang et al., 2015; Y. Zhang, 2008). Ambos servidores emplean métodos de threading para construir el modelo tridimensional de la secuencia proporcionada (Mishra et al., 2012).

Los resultados obtenidos de los servidores Phyre2 e I-Tasser se comparan entre sí y con la estructura modelo de la TryS de L. major obtenida por cristalografía (PDB: 2VPS) utilizando el programa Molecular Operating Environment (MOE). Para evaluar la calidad de cada modelo se utiliza como métrica de similitud estructural el Root Mean Square Deviation (RMSD) y se examinan los diagramas de Ramachandran. Además, se lleva a cabo un análisis y comparación gráfica de los sitios de unión de interés para seleccionar el modelo más adecuado para los estudios estructurales.

En base a este análisis (ver 4.5.3 en Resultados) se selecciona el modelo generado por I-Tasser, el cual se somete a un estudio de dinámica molecular para evaluar su estabilidad. La preparación del sistema para la simulación se realiza con el módulo QwikMD (Ribeiro et al., 2016) en Visual Molecular Dynamics VMD(Humphrey et al., 1996). La simulación se realiza con el software Nanoscale Molecular Dynamics (NAMD2) (Phillips et al., 2020) y aplicando el campo de fuerza CHARMM36 (Huang & MacKerell Jr, 2013). Se configuran condiciones de contorno periódicas para el sistema, implementando el método Particle Mesh Ewald (PME) para el tratamiento de las interacciones electrostáticas de largo alcance con un valor de corte de 12.0 (parlistdist=14.0). El valor de pairlistdist define la distancia a la cual se actualiza la lista de átomos para el cálculo de interacciones no

enlazantes (electrostáticas) durante cada iteración de la dinámica, como se muestra esquemáticamente en <https://www.ks.uiuc.edu/Research/namd/2.9/ug/node39.html>.

Como solvente, se utiliza una caja de agua y el modelo de solvente TIP3P (Jorgensen et al., 1983; MacKerell et al., 1998). La simulación se realiza en un ensamble isobárico isotérmico (NPT) a una temperatura de 300K y una presión de 1 atm. Para el control de la temperatura y la presión se utilizan el termostato de Langevin y el baróstato Nosé-Hoover Langevin, respectivamente. El paso de tiempo (timestep) explorado es de 2fs y la etapa de producción de la simulación tuvo una duración de 10 ns (Figura 18).

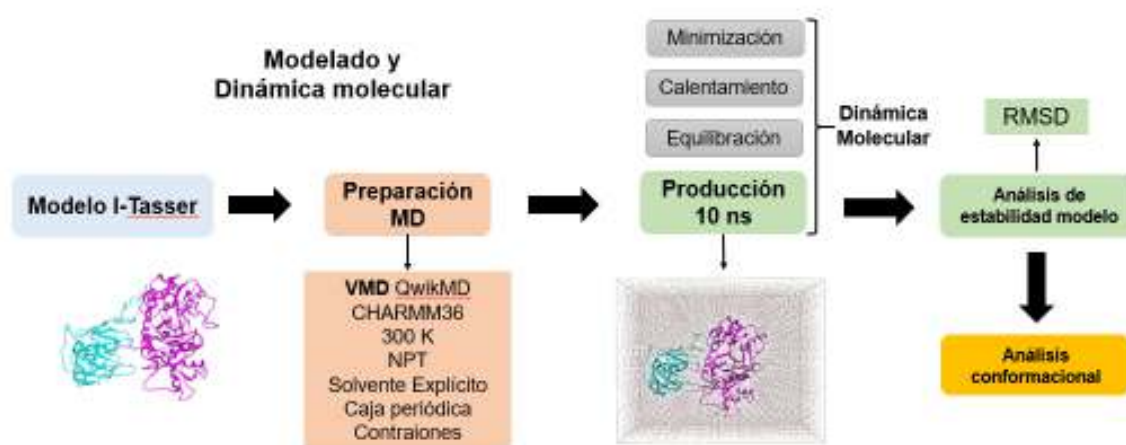


Figura 18. Metodología de modelado y validación del modelo tridimensional de TbTryS

3.8.2.2 Docking y dinámica molecular (Covalente)

Para el estudio de docking molecular, se emplea el modelo tridimensional previamente construido y validado de la TbTryS. La simulación se hizo usando el módulo de docking covalente de MOE. Dado que MOE está limitado a algunas reacciones orgánicas y ninguna incluía al átomo de selenio (Se) y considerando la similitud química entre los enlaces Se-Se y S-S se optó por simular la formación de un puente disulfuro. Para esto fue necesario: 1) romper el enlace Se-N del anillo del EbSe para que este quede libre para la formación del enlace Se-S; 2) reemplazar (temporalmente) el átomo de Se por S (Figura 19). Finalmente, para refinar las poses de docking, se aplicó el método Induce Fit junto con la función de puntuación GVBI/SA en MOE.

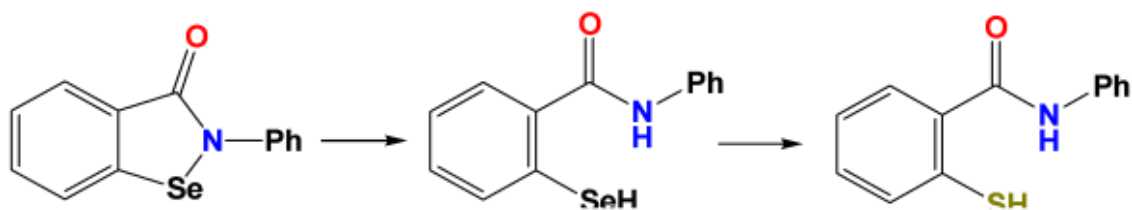


Figura 19. Rompimiento del anillo del EbSe. El selenio es reemplazado por azufre en la simulación.

Finalmente, se realiza un análisis de superposición del modelo computacional de la TbTryS con los modelos cristalográficos de la TryS de *L. major* (PDB: 2VPS; Fyfe et al., 2008) y de la GspS de *E. coli* (PDB: 2IOA; (Pai et al., 2006) para identificar y trasladar las correspondientes coordenadas atómicas de los ligandos (ATP, GSH y Sp) al modelo de la TbTryS. Esto permite obtener un modelo de TbTryS con los sustratos ocupando sus correspondientes sitios de unión y el EbSe está anclado de manera covalente a la enzima.

La simulación de la dinámica molecular del complejo covalente TbTryS + EbSe obtenido por anclaje molecular se realiza aplicando el mismo protocolo y condiciones descritas en la sección 2. Adicionalmente, para simular el enlace covalente se usó la opción extrabonds en la configuración de los archivos input en NAMD y se realizaron 200 ns de simulación.

3.8.2.3 Análisis de las simulaciones

Para el análisis de las simulaciones, se calcula el Root Mean Square Fluctuation (RMSF), el Root Mean Square Deviation (RMSD) y las correlaciones entre dominios utilizando Visual Molecular Dynamics (VMD). Para las correlaciones entre dominios, se utiliza el plugin Carma, disponible dentro de VMD (disponible en <https://github.com/glykos/carma>).

Las variaciones en los volúmenes de los sitios de unión de interés se evalúan con los programas: TRAPP - TRAnsient Pockets (disponible en <https://trapp.h-its.org/>) (Stank et al., 2017) y POVME 2.0 (disponible en <https://doi.org/10.1021/ct500381c>) (Durrant et al., 2014). Estas herramientas proporcionan una evaluación detallada de los cambios en los volúmenes de los sitios de unión definidos por el usuario.

3.8.2.4 Análisis de posibles sitios de unión

La presencia de potenciales sitios de unión de ligandos en el modelo estructural de TbTrys se exploró utilizando el programa Autosite (Ravindranath & Sanner, 2016). Posteriormente, se realizaron estudios de docking molecular, tanto dirigidos a sitios específicos como docking ciegos, empleando los programas MOE y Autodock VINA (Trott & Olson, 2010).

En el caso de MOE, se siguió un protocolo de anclaje ciego. El posicionamiento inicial de los ligandos se realizó aplicando el método Triangle Matcher, y como función de puntuación se empleó LondonDG. Para el refinamiento de las poses se empleó la función de puntuación GBVI/SA de MOE.

Para Autodock VINA, se siguió el protocolo descrito por (Forli et al., 2016) que describe una metodología clásica de ligando flexible y receptor rígido, y la función de puntuación usada fue VINA.

3.8.2.5 Análisis in silico del complejo TcTR – benzisotiazolonas

Para modelar la interacción de EbS y el compuesto 7 con la enzima TcTR, se utilizó como estructura receptora el modelo cristalográfico de TcTR unido a FAD (PDB ID: 1AOG) (Y. Zhang et al., 1996). Esta estructura se preparó con el módulo "Quick Prep" del software MOE™ (versión 2020.22, Chemical Computing Group Inc.), empleando el campo de fuerza AMBER10: EHT.

Los ligandos se construyeron y minimizaron energéticamente con el módulo "Build" usando el campo de fuerza MMFF94x. Para el acoplamiento covalente se emplea el módulo "Covalent Docking" de MOE, definiendo como sitio reactivo el residuo Cys221 de la cadena A (Cys221A), que fue detectado modificado por ensayo de espectrometría de masas. Se seleccionó la reacción tipo "alkylthiol", que genera un enlace disulfuro entre el ligando y la proteína. El refinamiento del complejo se realizó con la opción "Rigid Receptor" y se evaluó mediante la función de puntuación GBVI/WSA dG.

Adicionalmente, se alinearon las coordenadas de tripanotona y NADPH (obtenidas de las estructuras 1BZL (Bond et al., 1999) y 4ADW (Baiocco et al., 2013), respectivamente)

con los complejos generados en 1AOG con EbS y 7. Las representaciones estructurales fueron realizadas utilizando el programa PyMOL (versión 3.0, Schrödinger LLC).

3.9 Ensayos en modelo animal

Los procedimientos experimentales empleados para evaluar la toxicidad y eficacia terapéutica fueron aprobados por el Comisión de Ética en el Uso de Animales (CEUA) del Institut Pasteur de Montevideo, bajo el protocolo 011-18. Todos los estudios se llevaron a cabo en cumplimiento con la Ley Nacional de Experimentación Animal en Laboratorios (Ley Nº 18.611) y de acuerdo con las pautas internacionales establecidas por FELASA. Para todos los ensayos se emplearon ratones hembra BALB/c de 6 a 8 semanas de edad, con un peso promedio de 20-25 g que se alojaron en condiciones controladas (temperatura de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, humedad de $50 \pm 10\%$ y ciclo de luz-oscuridad de 12 h) y con acceso ad libitum a agua y alimentos. Los animales se dividen aleatoriamente en los grupos experimentales correspondientes y se aclimatan a la convivencia durante un periodo de cinco días antes del inicio de cada estudio.

3.9.1 Citotoxicidad Aguda

Se conformaron dos grupos experimentales de cuatro animales cada uno: Grupo Control (vehículo) y Grupo Tratamiento (compuesto 14). El vehículo consistió en PBS con DMSO al 25% v/v. El compuesto 14 se preparó a una concentración de 275 μM en el mismo vehículo. A cada ratón se le administraron 200 μL por vía intraperitoneal una vez al día durante cuatro días consecutivos. Esta dosis corresponde a 2,75 $\mu\text{mol/kg/día}$, equivalente a 0,85 mg/kg/día considerando el peso molecular del compuesto (310,05 g/mol). La cantidad de DMSO administrada equivale a 2,75 g/kg/día. Tras la administración, la evaluación clínica de los animales se realizó siguiendo una batería observacional tipo Irwin (Irwin, 1968), que permite detectar signos tempranos de toxicidad sistémica y neurológica tras la administración de compuestos en modelos murinos como peso corporal, actividad motora, condición física externa (pelaje, postura, hidratación), respuesta al estímulo y letargia, registradas diariamente para monitorear el estado general y posibles signos asociados a progresión de enfermedad o efectos del tratamiento. Adicionalmente, la mortalidad y el tiempo hasta el evento se registraron para análisis de supervivencia. Estas variables son empleadas como indicadores clínicos estándar en estudios preclínicos y de bienestar animal (Festing & Altman, 2002; Kilkenney et al., 2010). En modelos infecciosos,

se consideran complementarias a medidas específicas de eficacia, como reducción de la carga patogénica y aumento de la supervivencia (Romanha et al., 2010).

3.9.2 Eficacia Terapéutica

El diseño experimental incluyó los siguientes grupos de estudio cada uno compuesto por 3 ratones: (A) tratamiento con el compuesto 14 a una dosis de 0,8 mg/Kg×día durante 4 días; (B) tratamiento con una dosis única de 40 mg/kg de aceturato de diminazeno (DAC); y (C) tratamiento con el vehículo (DMSO) 2,75 g/kg×día durante 4 días. Los animales fueron infectados mediante una inyección intraperitoneal de 1×10^3 parásitos de la línea transgénica T. b. brucei LUC, suspendidos en 0,3 mL de medio de cultivo fresco. Los tratamientos se iniciaron a las 48 h postinfección, luego de verificar el establecimiento de la infección mediante técnicas de imagenología in vivo. Siguiendo el régimen de administración descrito arriba, los tratamientos se administran por vía intraperitoneal con volúmenes que no superaron los 300 μ L.

El progreso de la infección se monitorea por técnica de imagenología registrando la bioluminiscencia producida por los parásitos reporteros en animales vivos a los días 2, 6, 9, 13 y 17 post-infección. Para ello, a los ratones se les inyecta 200 μ L de D-luciferina (15 mg/mL en PBS) por vía intra-peritoneal e inmediatamente y durante la adquisición de imágenes se los anestesia con 2,5 % de gas isoflurano. Al cabo de 10 min, los animales se colocan en posición ventral en un equipo Xtremell (Bruker) termostatzado y se inicia la adquisición de imágenes empleando los siguientes parámetros: tiempo total de adquisición de 10 min con exposiciones de 30 segundos seguido de pausas de 1 min. Las imágenes obtenidas se analizan utilizando el software FIJI. El estado de salud de los ratones fue monitoreado diariamente, y aquellos que alcanzaron un puntaje de corte crítico de salud fueron sacrificados, registrándose las curvas de supervivencia. Las curvas de supervivencia (gráficos de Kaplan-Meier) se analizan estadísticamente utilizando la prueba de log-rank, con el software Graph Prisma 8.0.

CAPÍTULO 4. RESULTADOS

4.1 Desarrollo de ensayos biológicos

Un aspecto importante abordado en esta tesis de posgrado fue el desarrollo de ensayos que permitieran estudiar tanto el impacto en la viabilidad como el modo de acción de compuestos sobre las formas infectivas de tripanosomátidos patógenos. Estos estudios incluyeron: 1) la generación y caracterización de una línea celular reportera bioluminiscente de *T. cruzi*, 2) el desarrollo de un ensayo para determinar la viabilidad de la forma intracelular de este patógeno, y 3) la puesta a punto de una técnica para evaluar el estado redox del pool de tioles de bajo peso molecular de manera no invasiva en la forma sanguínea de *T. b. brucei*.

En las próximas secciones se presentan los resultados obtenidos.

4.1.1 Generación y caracterización de línea celular bioluminiscente de *T. cruzi*

Se transfectaron epimastigotes de la cepa Dm28c con una solución que contenía el vector pTRIX2-RE9h (Lewis et al., 2014), un constructo diseñado para integrar el gen de la luciferasa PpyRE9h en el locus del ADN ribosomal (rDNA) de *T. cruzi*. Este vector está compuesto por: (i) el promotor del rRNA de *T. cruzi*, modificado para incluir un sitio de restricción AatII y caracterizado por ser constitutivo lo que permite la expresión continua del transgén en epimastigotes, amastigotes y tripomastigotes, y por conferir una expresión estable debido a la integración en el locus rDNA; (ii) el gen PpyRE9h, que codifica una luciferasa de *Photinus pyralis* con emisión luminosa rojo-anaranjada; y (iii) secuencias homólogas que permiten su integración en el genoma mediante recombinación homóloga. Para favorecer esta integración, el vector fue linealizado utilizando las enzimas de restricción AatII y Ascl. Aproximadamente una semana después de la selección con G418, se observaron parásitos resistentes únicamente en las muestras transfectadas con el vector pTRIX2-RE9h (parásitos Dm28c-luc), mientras que no se detectó crecimiento en el control negativo sin el plásmido.

Primero, se evaluó la actividad de la LUC en muestras que contenían diferentes cantidades de epimastigotes Dm28c-luc obtenidos de cultivos sincronizados (fase logarítmica) utilizando dos kits comerciales diferentes de Promega (Figura 20). Estos kits difieren en su composición y procedimientos necesarios para revelar la luminiscencia. El Sistema de Ensayo de Luciferasa (LAS) es un ensayo que requiere la eliminación del

sobrenadante del cultivo y el lavado de las células antes de la lisis, seguido de la adición del Reactivo de Ensayo de Luciferasa (LAR) que contiene a la luciferina. Por el contrario, el kit de BG-LAS no requiere la remoción del sobrenadante y la lisis y reactivo de luciferasa forman parte de la misma solución. De acuerdo al fabricante, en este último kit, la señal del complejo bioluminiscente se encuentra estabilizada por aditivos, lo cual permite realizar lecturas desfazadas en el tiempo sin pérdida significativa de la señal.

Los parásitos se mantuvieron en fase de crecimiento exponencial mediante subcultivos repetidos cada 5 días. Como se muestra en la Figura 20A, hubo una excelente correlación entre la señal de bioluminiscencia y el número de células para el ensayo leído con el sistema de detección BG-LAS ($R^2 = 0.99$ para la gráfica de regresión lineal). Esta correlación se extendía por cuatro órdenes de magnitud respecto al número de parásitos. Si bien el sistema LAS también mostró una buena correlación señal/parásitos, esta se extendía a un rango menor de células (10^5 - 10^7). Vale la pena remarcar que este fenómeno de menor sensibilidad no se es atribuible a una pérdida involuntaria de células durante el lavado, ya que se repite el recuento de las células lavadas y resuspendidas en PBS previo a su adición a la microplaca. Por otro lado, la señal de bioluminiscencia generada por el kit LAS fue, en varios casos, casi un orden de magnitud inferior a la producida por el sistema BG-LAS. En base a estos resultados se concluye que el kit de BG-LAS es más sensible, presenta un límite detección superior y simplicidad de operacional respecto de LAS. Por estos motivos fue seleccionado para los estudios posteriores.

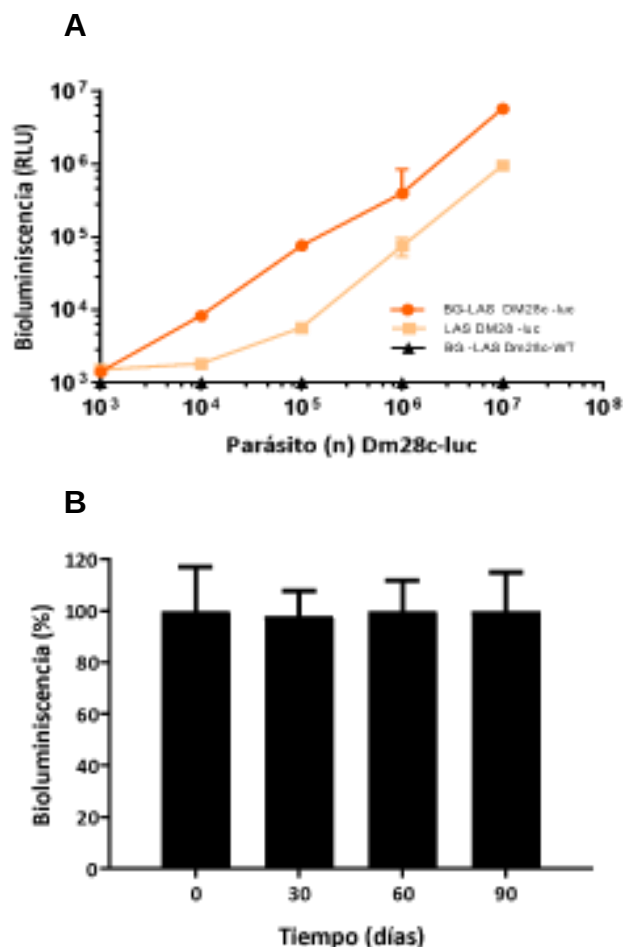


Figura 20. Análisis de bioluminiscencia en epimastigotes de *T. cruzi* Dm28c-luc.

La actividad de la LUC se determinó en epimastigotes de *T. cruzi* Dm28c-luc cultivados hasta la fase exponencial y en ausencia del antibiótico de selección. A) Correlación entre la señal de bioluminiscencia y el número de parásitos determinada con los kits LAS o BG-LAS (los epimastigotes *T. cruzi* Dm28c-WT se usaron como control). B) Estabilidad de la bioluminiscencia en cultivos mantenidos durante 90 días utilizando el kit BG-LAS. Las células se cosecharon, se ajustó el número de células a 1×10^6 epimastigotes (si era necesario) y se analizó la actividad de la LUC (sección 3.3.3.2.2). El análisis estadístico no reveló diferencias significativas en la señal (ANOVA de una vía) en comparación con el día 0. Para todos los gráficos, los errores se expresan como una desviación estándar (DS) del valor medio ($n = 3$).

Otro experimento importante consistió en evaluar la estabilidad de la expresión del gen reportero en ausencia de presión selectiva, lo cual permitiría corroborar de manera indirecta una integración del transgén al genoma del parásito y sentaría las bases para poder llevar a cabo infecciones de células de mamífero en ausencia del mismo, que sería citotóxico para éstas. Como se muestra en la Figura 20B, la señal de bioluminiscencia emitida por epimastigotes permaneció alta y estable durante al menos 3 meses de cultivo continuo y sincronizado.

A continuación, se realizaron diferentes experimentos para caracterizar el fenotipo de crecimiento (Figura 21A), diferenciación y capacidad infectiva (Figura 21B) de la línea celular reportera. Basándose en la expresión estable de la LUC (Figura 20B) y para evitar un sesgo debido al efecto del antibiótico de selección (G418) en el crecimiento celular, todos estos estudios se realizaron en ausencia de presión selectiva en los parásitos *T. cruzi* Dm28c-luc.

Los epimastigotes replicativos fueron obligados a diferenciarse a TM mediante la privación de nutrientes. No hubo diferencias en el tiempo de aparición de los TM (~14 días) en cultivos de *T. cruzi* Dm28c-luc y *T. cruzi* Dm28c-WT privados de nutrientes. Sin embargo, al pasar de epimastigotes a TM, la actividad de la LUC disminuyó significativamente (2,5 veces) (Figura 20B). En varias réplicas biológicas realizadas bajo condiciones experimentales idénticas (MOI 1:10), los TM de *T. cruzi* Dm28c-luc demostraron ser infectivos para las células VERO, aunque en una proporción menor (10-20% de células infectadas) en comparación con la cepa parental (80-100% de células infectadas; Figura S2). Dentro de las células de mamíferos, los TM de *T. cruzi* Dm28c-luc fueron capaces de diferenciarse en amastigotes que replicaron (Figura 21C) y posteriormente se transformaron en tripomastigotes con una cinética similar a la de los parásitos de la cepa WT. Se observó lisis celular mecánica por tripomastigotes intracelulares de *T. cruzi* Dm28c-luc a las 72-96 h post-infección. Durante la amastigogénesis (diferenciación de TM a amastigotes dentro de la célula huésped) y en un plazo de 24 h, la actividad de la LUC aumentó en dos órdenes de magnitud. Para determinar si la menor infectividad mostrada por los TM de *T. cruzi* Dm28c-luc es permanente o transitoria, se realizaron 10 ciclos sucesivos de reinfección de células huésped con tripomastigotes aislados de células Vero.

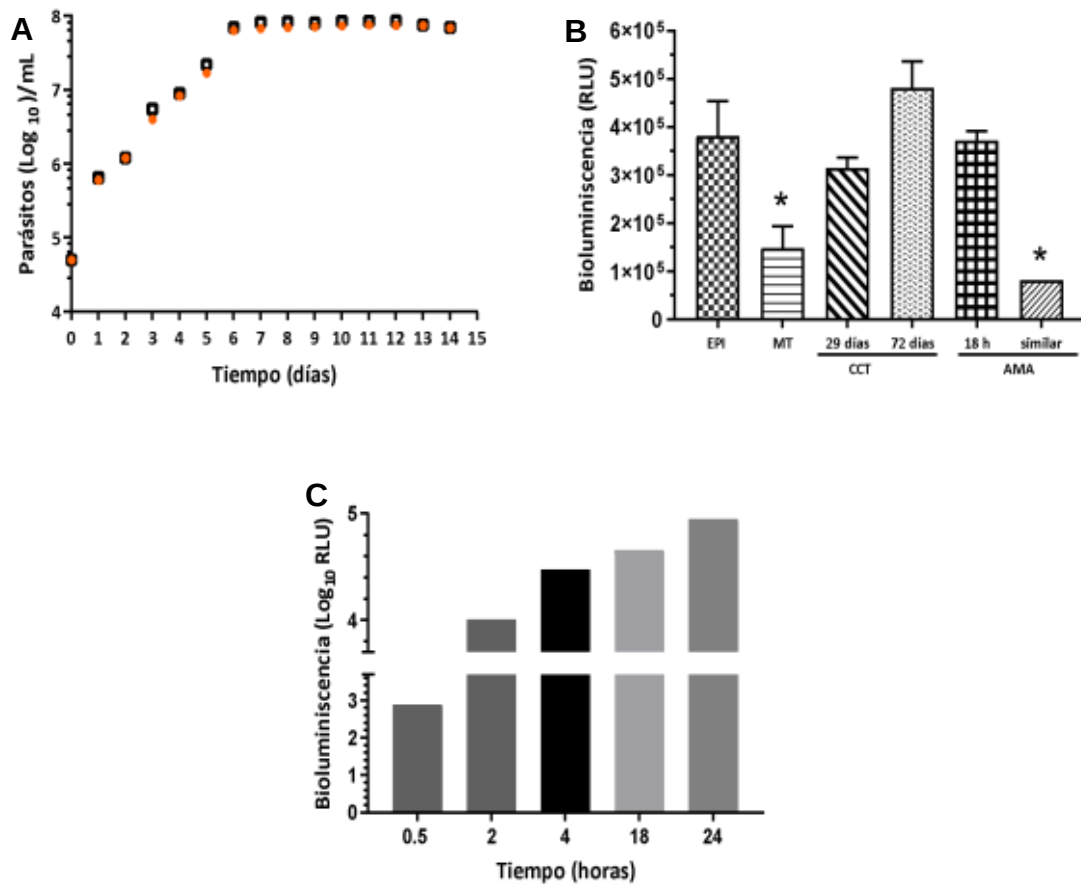


Figura 21. Crecimiento y expresión de luciferasa en diferentes estadios de desarrollo de *T. cruzi* Dm28c-luc.

A) Epimastigotes sincronizados de las líneas celulares parental (Dm28c-WT, cuadros vacíos negros) y transgénica (Dm28c-luc; círculos naranjas) cultivados en ausencia del antibiótico de selección fueron sembrados a 5×10^4 células/mL (Día 0) en frascos de cultivo individuales (uno por día) y la densidad celular se evaluó cada 24 h hasta el día 14 mediante recuento en una cámara de Neubauer. **B)** Actividad de la luciferasa, expresada como unidades relativas de bioluminiscencia, en muestras que contenían 1×10^6 parásitos de *T. cruzi* Dm28c-luc de las siguientes etapas de desarrollo (secciones 2.3 y 2.4): epimastigotes (EPI), tripomastigotes metacíclicos (TM), tripomastigotes de cultivo celular (CCT) aislados en el 4^{to} (29 días) o 9^{no} (72 días) ciclo de infección, amastigotes aislados de células 18 h post-infección (18 h AMA) con CCT de un 9^{no} ciclo de infección y formas similares a amastigotes (AMA-like) obtenidas al cultivar CCT en medio BHI durante 96 h. *, diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.017$; ANOVA de una vía) para la señal de bioluminiscencia de TM y AMA-like en comparación con la producida por parásitos de otros estadios. **C)** La actividad de la luciferasa, expresada en unidades relativas de bioluminiscencia (RLU), se midió en amastigotes intracelulares de *T. cruzi* Dm28c-luc en diferentes tiempos postinfección de células Vero.

En relación con el fenotipo celular, los epimastigotes de *T. cruzi* Dm28c-luc conservaron tasas de crecimiento y diferenciación comparables a la cepa parental,

indicando que la integración del transgén no afectó procesos esenciales. Sin embargo, se observó una infectividad inicial reducida de los tripomastigotes metacíclicos (10–20%) en comparación con la cepa WT (80–100%). Este fenómeno podría explicarse por un “efecto de carga metabólica” asociado a la expresión del transgén, tal como ha sido sugerido en otros modelos de parásitos transgénicos.

Hyland et al., 2008 desarrollaron una línea luminiscente de *T. cruzi* y mostraron que los parásitos transgénicos conservaban una elevada capacidad infectiva en modelos murinos. En su trabajo, la bioluminiscencia fue detectable incluso con inoculaciones de apenas 1×10^4 de tripomastigotes, y todos los animales infectados presentaron diseminación sistémica a las 24 h post-infección. No obstante, es importante resaltar que Hyland no cuantificó tasas de infección en cultivos celulares 2D, sino que basó sus conclusiones en datos in vivo, lo que limita la comparación directa con nuestros resultados iniciales en cultivo celular.

De manera complementaria, Costa et al., 2018 evaluaron el comportamiento de la cepa *T. cruzi* CL-LuNeon y demostraron que la expresión del constructo bioluminiscente-fluorescente no afectaba significativamente la infectividad, proliferación o diseminación del parásito en modelos murinos. Los datos cuantitativos de bioluminiscencia confirmaron la equivalencia entre la cepa parental y la modificada: durante la fase aguda (día 13), la señal alcanzó $\sim 1 \times 10^8$ fotones/segundo, mientras que en la fase crónica (día 117) se redujo a $\sim 1 \times 10^5$ fotones/segundo, manteniendo el patrón típico de tropismo por el tracto gastrointestinal. Incluso bajo inmunosupresión, la cepa transgénica mostró un incremento esperado de la señal en el Tracto Gastrointestinal GIT ($\sim 1 \times 10^6$ fotones/segundo) y reaparición de focos en otros tejidos. Además, el uso del marcador fluorescente permitió identificar parásitos individuales en tejidos crónicos, como el estómago y el ciego.

En conjunto, mientras que los estudios de Hyland y Costa, basados en modelos in vivo, señalan que la introducción de genes reporteros no compromete de manera significativa la infectividad, nuestros resultados en cultivos celulares 2D indican que pueden presentarse reducciones transitorias en la eficiencia infectiva durante la primo infección con MT. Estos hallazgos sugieren que los costos metabólicos asociados a la expresión del transgén pueden manifestarse inicialmente en condiciones in vitro, pero tenderían a atenuarse en ciclos sucesivos de infección.

Como validación final de la herramienta desarrollada se procedió a comparar la sensibilidad a fármacos de referencia (NFX y Bzn) del estadio amastigota intracelular de la línea bioluminiscente y la cepa parental. Como se observa en la (Tabla 2, Figura S3) para ambos fármacos, cuando se aplica el mismo método de medición de actividad anti-tripanosoma (microscopía) y prácticamente que independientemente de la tasa de infección lograda, la línea reportera muestra el mismo nivel de sensibilidad a NFX y Bzn que la línea parental (CE_{50} NFX = 2,5-3,4 μ M vs. 5,3-1,8 μ M, y CE_{50} Bzn = 11,4-11,6 μ M vs. 9,9-10,4 μ M para línea parental vs. reportera, respectivamente). No obstante, los valores de CE_{50} contra estos fármacos obtenidos por la técnica de bioluminiscencia (CE_{50} NFX = 0,72 μ M and CE_{50} Bzn = 2,19 μ M) son entre 3,5-7 veces más bajos y significativamente más reproducibles (menor error en la medida) que los determinados mediante microscopía. También empleando un ensayo de bioluminiscencia, Bot y col. (2010) reportaron para amastigotes de la cepa CL-Brener un valor de CE_{50} para NFX del mismo orden de magnitud (0,24 μ M) que el aquí hallado. La diferencia en la potencia de NFX entre ambos ensayos puede atribuirse al número de células infectadas utilizado en el ensayo de (1,500 células/pocillo, Bot et al., 2010), el cual fue 10 veces menor que el de nuestro ensayo.

Tabla 2. Sensibilidad a fármacos de amastigotes de líneas celulares de T. cruzi Dm28c.

Línea celular	Tasa de infección ^a	Método de Lectura	$CE_{50} \pm DS$ (μ M) ^b	
			NFX ^c	Bzn ^d
Dm28c-WT	50%	Microscopia	2,5 $\pm$ 1,3	11,4 $\pm$ 1,8
	30%		3,4 $\pm$ 1,0	11,6 $\pm$ 3,2
Dm28c-luc	50%	Microscopia	5,3 $\pm$ 1,2*	9,9 $\pm$ 1,5 ^{&}
	30%		1,8 $\pm$ 0,2	10,4 $\pm$ 0,3
	56%	Bioluminiscencia	0,72 $\pm$ 0,03*	2,19 $\pm$ 0,13 ^{&}

^a Tasa de infección: porcentaje de células VERO infectadas con amastigotes de T. cruzi.

^b CE_{50} : concentración efectiva a la cual se alcanza un 50% de pérdida de viabilidad del patógeno en células infectadas determinada por recuento microscópico ($n \geq 2$) o por ensayo de bioluminiscencia ($n = 3$ repeticiones). ^c NFX: nifurtimox. ^d Bzn: benznidazol. * y [&] indican un par de valores estadísticamente significativos ($p \leq 0,05$).

Esto demuestra que la densidad celular y el MOI influyen en la potencia aparente de los fármacos, subrayando la necesidad de estandarizar parámetros experimentales al comparar resultados entre plataformas. A pesar de las diferencias en la configuración del ensayo de bioluminiscencia (por ejemplo, cepas de *T. cruzi*, MOI ~1, reactivos in-house para el ensayo), la CE_{50} de Bzn determinada para *T. cruzi* Dm28c-luc (2,2 μ M) se ubica dentro del rango informado para amastigotes bioluminiscentes de las cepas Y (1,1 μ M; (Lara et al., 2018) y Tulahuen 2 (2,8-4,9 μ M; (Tayama et al., 2023).

Dado que la comparación de susceptibilidad por el método de microscopia no identificó diferencias significativas entre ambas líneas celulares, la mayor sensibilidad del método de bioluminiscencia se puede explicar de la siguiente forma: a diferencia de la microscopía, que solo distingue parásitos por su morfología, la bioluminiscencia refleja la viabilidad de los parásitos, la cual depende directamente de la actividad metabólica, energética, biosintética y/o proliferativa de las células. Por tanto, esta última técnica da una medida más confiable del estado de viabilidad celular que la técnica de microscopia, la cual tiende a sobrestimar la carga parasitaria al contabilizar formas morfológicamente intactas que pueden estar viables o no (muertas). Esta ventaja del ensayo de bioluminiscencia permitiría discriminar con mayor precisión compuestos con actividad marginal y verdaderos hits. Sobre la base de estos resultados se procedió a establecer un ensayo bioluminiscente para el cribado de compuestos contra la forma intracelular de *T. cruzi*.

4.1.2 Desarrollo y validación del ensayo de cribado

La sensibilidad, linealidad y estabilidad de la señal son parámetros importantes a considerar en la puesta a punto de un bioensayo. En ese sentido la señal de bioluminiscencia emitida por los amastigotes intracelulares mostró una buena correlación lineal con el porcentaje de células infectadas o, en otras palabras, con la cantidad de amastigotes intracelulares (Figura 22A, $R^2 = 0,93$ para el gráfico de regresión lineal). Según el recuento por microscopía (29 ± 8 amastigotes/célula VERO) y el número de células VERO por pozo, la señal detectada en la tasa de infección más baja analizada (10%) corresponde a aproximadamente 4×10^4 amastigotes. Aunque no se probaron experimentalmente tasas de infección más bajas, teniendo en cuenta que: a) la señal por célula para amastigotes (1,7 RLU) es similar a la calculada para epimastigotes (1,5 RLU), b) la relación señal-ruido es de 288 ± 16 RLU, y c) la correlación lineal entre la señal y el número de parásitos (Figura

22A y Figura 22B), estimamos que el ensayo de bioluminiscencia es capaz de detectar ~200 amastigotes viables por pozo.

Por otro lado, se determinó la estabilidad en el tiempo de la señal de bioluminiscencia producida por amastigotes intracelulares. Tras la adición del sustrato LUC y el reactivo de lisis celular, la bioluminiscencia alcanzó un nivel máximo y estable dentro de los 10-45 minutos, y comenzó a disminuir posteriormente (Figura 22A). Esta ventana temporal de lectura es adecuada para aplicaciones de cribado de bajo a alto rendimiento, ya que proporciona tiempo suficiente para manejar varias microplacas y reduce la posibilidad de variaciones en las mediciones de la señal entre ensayos.

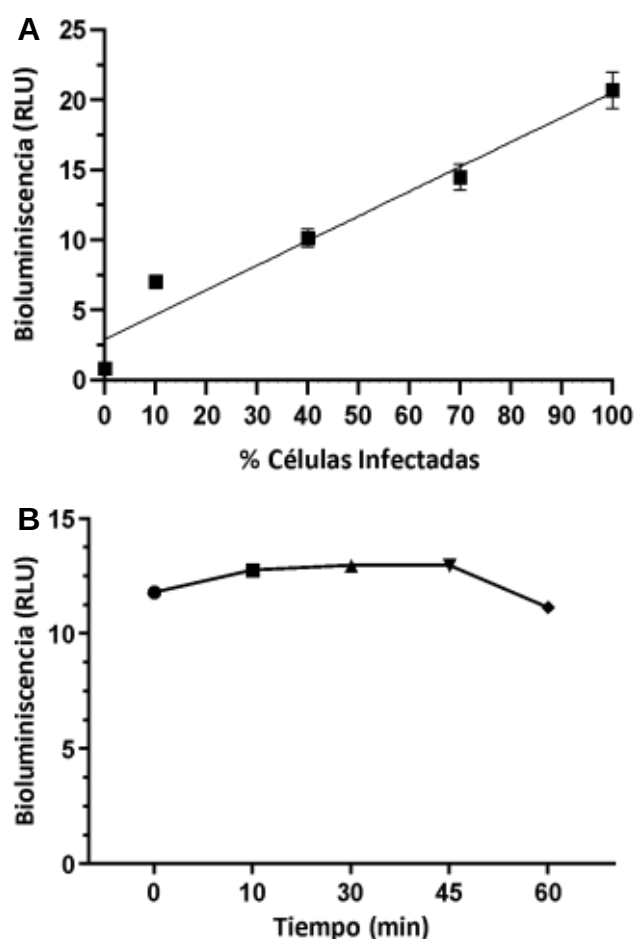


Figura 22. Estabilidad y linealidad de la señal bioluminiscente (RLU) en amastigotes de *T. cruzi* Dm28c-luc.

Señal de bioluminiscencia medida en muestras de células VERO infectadas con amastigotes 72 h post infección A) con diferentes proporciones aparentes de infección (es decir, porcentaje de células infectadas), obtenidas por dilución seriada de una muestra de cultivo donde ~100% de las células VERO estaban infectadas (el valor 0 corresponde a células no infectadas). B) en diferentes momentos tras la adición del reactivo BG-LAS.

El rendimiento del ensayo de bioluminiscencia para la evaluación de compuestos se validó mediante la prueba de un conjunto diverso de moléculas químicas ($n = 52$). La mini-biblioteca incluyó 35 compuestos con actividad no reportada (34 benzoisotiazolonas, 1 rotenoide y 1 péptido) o previamente reportada contra tripanosomátidos: 4 quinonas (Ballesteros-Casallas et al., 2023), 7 lactonas sesquiterpénicas (Elsø et al., 2020; T. J. Schmidt et al., 2002, 2014; Sülsen et al., 2016; Wulsten et al., 2017), 2 esteroides (Ortíz et al., 2021), 2 paullonas (Medeiros et al., 2020; Sousa et al., 2014) y 1 complejo de platino (Rivas et al., 2021). En resumen, el ensayo de cribado en placas de 96 pocillos consistió en incubar los compuestos (concentración de ensayo de $10 \mu\text{M}$) durante 48 h con células VERO infectadas con amastigotes (tasa de infección $65 \pm 6 \%$, $n = 4$ ensayos) y, posteriormente, medir la actividad LUC con el kit BG-LAS. Se realizaron cuatro cribados independientes, que arrojaron los siguientes parámetros de calidad del ensayo: factor $Z' = 0,77 \pm 0,06$, coeficiente de variación (CV) = $6,28 \pm 0,47 \%$. Estos valores superaron ampliamente los puntos de corte (factor $Z' > 0.5$ y $\text{CV} < 20\%$) establecidos para calificar un bioensayo HTS como satisfactorio (Philip et al., 2012) Figura 23.

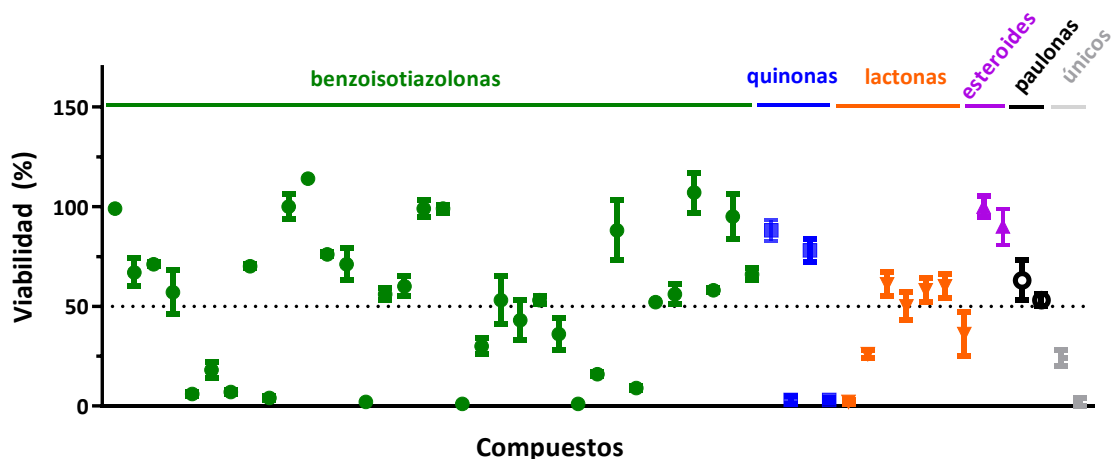


Figura 23. Validación del ensayo de bioluminiscencia para el cribado de compuestos contra amastigotes de *T. cruzi*.

Los compuestos se ensayaron a $10 \mu\text{M}$ contra células VERO infectadas con amastigotes de *T. cruzi* Dm28-luc. Después de 72 h de incubación con los compuestos, se midió la señal de bioluminiscencia con el kit BG-LAS para determinar la viabilidad celular. La línea punteada indica el valor de corte para compuestos activos (viabilidad $\leq 50\%$). Se muestran los valores promedio y el error ($n = 3$). Los compuestos etiquetados como únicos son (de izquierda a derecha): un rotenoide y un complejo de platino

La relevancia y aplicabilidad de este ensayo de cribado trasciende el presente trabajo, como se evidencia en su utilización en el estudio publicado en *European Journal of Medicinal Chemistry* (Ballesteros-Casallas et al., 2023). En dicho artículo, este ensayo permitió cribar una serie de 19 derivados de p-quinonas, que fue integrado a un análisis computacional de relaciones estructura-actividad (QSAR 2D y 3D) y cálculos de DFT. Los resultados mostraron que compuestos como la furano-quinona 9 ($CE_{50} = 0,8 \mu M$) y la tiazol-quinona 14 ($CE_{50} = 1,1 \mu M$) presentaron una potencia comparable a NFX ($0,7 \mu M$) y el Bzn ($2,2 \mu M$). Además, la correlación entre parámetros electrónicos (energía de orbitales LUMO/SUMO, cargas atómicas en C2 y C3) y actividad biológica, validada estadísticamente ($R^2 = 0,82$; RMSE = 0,12 en QSAR), fue posible gracias a la precisión de las lecturas obtenidas con el bioensayo.

4.1.3 Estandarización de ensayo con línea celular de *T. b. brucei* reportera de cambios redox

La metodología descrita en el capítulo 3 estandariza una evaluación no invasiva del estado redox intracelular en la forma sanguínea de *T. b. brucei*. El sistema reportero consiste de una variante mutada de la proteína verde fluorescente (roGFP2) fusionada en su extremo N-terminal a una glutarredoxina 1 humana (hGrx1). La roGFP2 fue ingenierizada para contener un par de residuos de cisteína expuestos en su superficie que al oxidarse a la forma disulfuro inducen un cambio conformacional que afecta el estado de protonación del cromóforo y por lo tanto la intensidad de emisión de fluorescencia a 510 nm cuando es excitado a sus máximos picos de absorción de fluorescencia, 405 nm y 488 nm (Gutscher et al., 2008; Figura 24). El comportamiento espectral de la roGFP2 permite realizar mediciones intensiométricas o radiométricas dependiendo si se cuantifica la señal emitida por solo una de las longitudes de onda de excitación o por ambas expresadas como un cociente, respectivamente. El empleo de esta última propiedad del biosensor permite reducir artefactos que puedan afectar la intensidad de fluorescencia de manera inespecífica, es decir no redox (ej. nivel de expresión del biosensor, fotoblanqueo y auto fluorescencia). En el modo intensiométrico, la contribución de estas interferencias puede ser evaluada realizando una calibración del biosensor con agentes oxidantes y reductores específicos de tioles, como se describe a continuación. La hGrx1 se incorpora al sistema reportero para acelerar (de horas a segundos) y otorgar especificidad a la oxidorreducción de la roGFP2 por parte del par GSH/GSSG. Un aspecto importante de este tipo de

biosensor es que las reacciones de intercambio tiol-disulfuro que sufre son totalmente reversibles dependiendo del ambiente redox en el cual se encuentre. Esta propiedad le otorga al biosensor la capacidad de detectar de manera dinámica cambios en los balances redox de las especies de interés. Otra característica interesante de este tipo de biosensor es que al ser expresado por la célula de interés permite realizar las mediciones de estado redox intracelular de tioles de bajo peso molecular de manera no invasiva, es decir sin alterar la integridad celular y en un contexto fisiológico. No obstante, el potencial redox de roGFP2 ($E^\circ = -280 \text{ mV}$) limita su aplicabilidad a compartimentos subcelulares donde el balance redox de las especies a detectar sea principalmente reducido, como por ejemplo el citosol, la matriz mitocondrial, o el núcleo celular. En organelos que presentan un ambiente redox principalmente oxidativo, como el retículo endoplasmático, el espacio intermembrana mitocondrial y el lisosoma, roGFP2 se encontraría permanentemente oxidada.

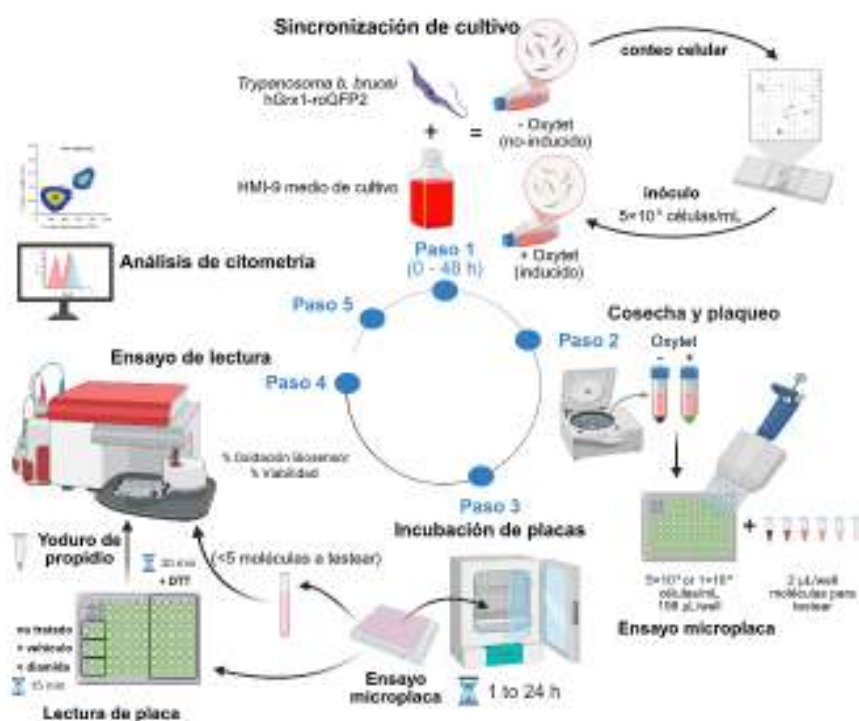


Figura 24. Esquema del ensayo para evaluar el estado redox intracelular y la viabilidad en *Trypanosoma brucei* hGrx1-roGFP2 mediante citometría de flujo.

El protocolo se inicia con la sincronización del cultivo en medio HMI-9, en presencia (+) o ausencia (-) de oxitetraciclina para inducir la expresión del biosensor (Paso 1). Posteriormente, los parásitos se cosechan, se cuantifican y se distribuyen en placas de 96 pozos a una densidad de 5×10^5 – 1×10^6 células/mL (Paso 2). Los compuestos a evaluar se agregan (2 µL/pozo) y los parásitos se incuban entre 1 y 24 h en condiciones controladas (Paso 3).

Finalizado el tratamiento, las células se transfieren a tubos de lectura, se tiñen con yoduro de propidio (PI) para determinar viabilidad y, cuando corresponde, se adiciona DTT para confirmar la reversibilidad redox (Paso 4). La lectura de fluorescencia del biosensor (cociente 405/488 nm) y la cuantificación de células viables (PI⁻) se realiza por citometría de flujo (Paso 5). Los datos obtenidos se expresan como % de oxidación del biosensor y % de viabilidad, permitiendo evaluar de manera simultánea el desbalance redox inducido por los compuestos y su efecto citotóxico.

La reactividad y caracterización de la línea celular reportera empleada en este estudio fue reportada en la tesis de maestría de la Dra. Florencia Sardi (Sardi 2016). En este trabajo se demostró que hGrx1-roGFP2 responde a fluctuaciones en el balance redox del par T(SH)₂/TS₂ con la misma eficiencia que lo hace con el par GSH/GSSG. Esto se debe a que la hGrx1 es oxidorreducida directamente por T(SH)₂/TS₂ y a que, como se mencionara en la Introducción, el estado redox del par GSH/GSSG está en equilibrio con el de T(SH)₂/TS₂ a través de la acción de las glutarredoxina endógenas del parásito (Ceylan et al., 2010; Manta et al., 2019). Esta línea celular de *T. b. brucei*, expresa el biosensor en el citosol del parásito, de manera inducible por tetraciclina.

Para estudiar el modo de acción de las benzisotiazolonas aquí sintetizadas, así como de otros compuestos no relacionados, se puso a punto un ensayo con la línea celular reportera *T. b. brucei* hGrx1-roGFP2 en microplacas de 96 pocillos y análisis por citometría de flujo.

El primer parámetro evaluado fue el estado redox basal de la línea celular, con el fin de determinar la fase óptima para iniciar los ensayos con los compuestos. A partir del cociente de fluorescencia 405/488 nm del biosensor se observó que este se mantiene bajo y estable durante las primeras 24–36 h de cultivo (0,80–0,85), comienza a incrementarse a partir de las 48 h (0,95 ± 0,03) y alcanza sus valores máximos a las 72 h (1,10 ± 0,04), coincidiendo con la transición de los parásitos hacia la fase estacionaria.

En base a estos resultados, se decidió realizar todos los ensayos con compuestos utilizando poblaciones celulares en fase exponencial de crecimiento, lo que permitió evaluar de manera confiable la acción de los compuestos sobre el estado redox, minimizando la oxidación basal y maximizando el rango dinámico de la señal. Para ello, los cultivos se sincronizaron mediante repiques sucesivos cada 24 h en medio fresco, ajustando la

densidad celular inicial a 5×10^5 células/mL. El medio de cultivo en el cual se crece la forma sanguínea de *T. b. brucei* contiene tioles de bajo peso molecular como cisteína y β -mercapto etanol, o macromoléculas como la albúmina bovina (que presenta un tiol en su superficie) proveniente del suero fetal bovino usado como suplemento del medio de cultivo, que eventualmente podrían reaccionar con los compuestos a evaluar. Por ello, aquí se estudió la supervivencia de la línea celular en un medio definido donde dichos potenciales interferentes no estuvieran presentes. Para ello se empleó una solución de PBS pH 7,4 suplementado con glucosa 1% p/v (PBS-G), lo cual permite mantener condiciones de pH homeostáticas con un sistema buffer fisiológico mientras que la glucosa contribuye a sostener los procesos celulares básicos en un estadio del parásito cuyo metabolismo energético es casi exclusivamente glicolítico (Coustou et al., 2008). Se comprobó que los parásitos muestran un buen nivel de viabilidad y estado redox del biosensor hasta por una hora de incubación bajo estas condiciones, 37°C y 1% de DMSO (Figura 25). Si la incubación en este medio se extiende por más de una hora, se observa una pérdida de motilidad, un incremento en la oxidación espontánea del biosensor y una pérdida de la integridad de membrana (medida por incorporación de PI, un colorante de exclusión que no atraviesa membranas celulares intactas; Figura 25). Por lo tanto, esto permite definir que ensayos de exposición a compuestos por ≤ 1 h pueden realizarse en medio PBS-G, mientras que aquellos por tiempos superiores es recomendable realizarlos en medio de cultivo completo. Aquí vale la pena destacar que las exposiciones a tiempos cortos permiten realizar un diagnóstico temprano de la causa de muerte celular. Las determinaciones a tiempos más prolongados podrían ser útiles para compuestos con modos de acción lento o bien donde la descompensación redox es secundaria a la interferencia con otros procesos

celulares (por ej. la inhibición de la síntesis de ATP o la generación de especies oxidantes). De todas formas, cuando no se tiene conocimiento del modo de acción sería recomendable realizar este ensayo a diferentes tiempos de incubación ya que además del fenómeno mencionada anteriormente, también podría pasarse por alto una reversión de la oxidación inicial del biosensor por acción del sistema redox endógeno del parásito que si bien re-equilibra su estado redox puede no reparar el daño irreversible que ocurrió a tiempos cortos en macromoléculas esenciales.

Para evaluar si el DMSO interfería con el estado redox basal del biosensor hGrx1-roGFP2, se analizaron concentraciones entre 0,25 % y 1,5 % en distintos tiempos de incubación. A 1 h (PBS-G), el DMSO mostró un efecto mínimo hasta 1 %, manteniendo valores cercanos al estado reducido (95–100 % respecto al control reducido). En cambio, a 1,5 % se observó una disminución más evidente (~85 %), lo que sugiere una alteración del estado redox celular atribuible al vehículo.

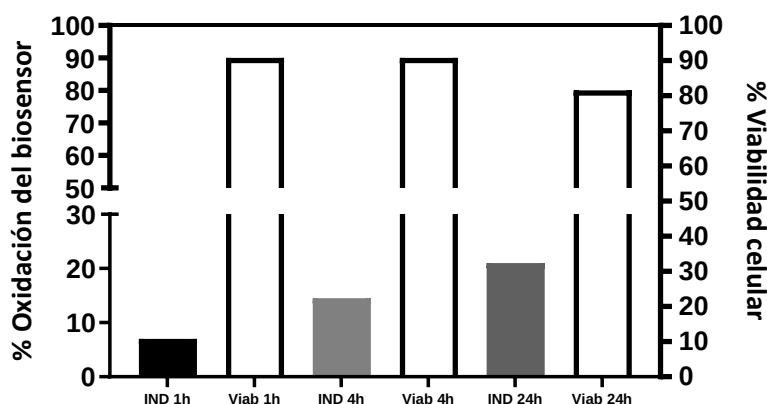


Figura 25. Estado redox del biosensor y viabilidad celular de *T. b. brucei* hGrx1-roGFP2 bajo distintas condiciones de incubación.

Los parásitos inducidos con tetraciclina fueron incubados en PBS-G durante 1 h, y en medio HMI-9 suplementado durante 4 h y 24 h a 37 °C. Se evaluó el % de oxidación del biosensor hGrx1-roGFP2 (barras sólidas IND, eje izquierdo) y la viabilidad celular (barras abiertas Viab, eje derecho).

Tras incubaciones prolongadas (4 y 24 h en HMI-9), el efecto del DMSO sobre el estado redox se volvió más notorio. A 4 h, 1 % de DMSO mantuvo aún valores aceptables de reducción ($\approx 80\text{--}85\%$), mientras que 1,5 % descendió a $\sim 70\%$. A 24 h, el 1 % de DMSO produjo una reducción cercana al $60\text{--}70\%$, mientras que 1,5 % cayó por debajo del 50% y se acompañó de pérdida de viabilidad e incremento de células PI positivas. Si bien algunos compuestos con buenos índices de solubilidad admitirían una reducción en el contenido final de DMSO, los resultados obtenidos indican que los ensayos de evaluación de compuestos con esta línea reportera deberían siempre incluir una muestra control de células tratadas solo con vehículo. Durante el procesamiento de datos, se sustraería el valor basal de oxidación inducido por DMSO a los valores obtenidos para las muestras en estudio, de manera tal de poder cuantificar solo el efecto redox causado por el compuesto.

Como se mencionará anteriormente, este biosensor presenta dos picos de absorción de fluorescencia (405 nm y 488 nm) que analizados de manera individual o complementaria permiten realizar cuantificaciones intensiométricas o ratiométricas de los cambios redox. El equipo de citometría de flujo seleccionado para los ensayos (equipo BD AccuriTM C6) redox carece de láser y filtro de excitación a la menor longitud de onda, por lo tanto, no es posible realizar mediciones ratiométricas que cancelarían algunos posibles artefactos que podrían interferir con la fluorescencia del biosensor. Con el fin de confirmar la base redox de los eventuales cambios en la intensidad de fluorescencia del biosensor y cuantificar de manera más precisa el nivel de oxidación del biosensor a nivel intracelular, se realizaron tratamientos con agentes químicos que atraviesan membranas celulares y oxidan y reducen de manera específica a tioles (tanto de bajo peso molecular como proteicos): diamida y DTT, respectivamente. Empleando concentraciones de estos agentes ($250\text{ }\mu\text{M}$ para diamida y 1 mM para DTT) que fueron seleccionadas en base a estudios previos sobre esta línea celular (F. Sardi 2016 Tesis PEDECIBA), se evaluaron diferentes tiempos de incubación para determinar el tiempo óptimo en el cual se obtienen niveles máximos (reducción total del biosensor) y mínimos (oxidación total del biosensor) de fluorescencia a λ_{ex} 488 nm. Por lo tanto, estas condiciones fueron seleccionadas para

realizar la calibración del biosensor y las pruebas confirmatorias de la base redox de los cambios de fluorescencia del biosensor inducidos (directa o indirectamente) por los compuestos de interés.

Al igual que en los ensayos de viabilidad celular, este ensayo se desarrolló en microplacas de 96 pocillos. En cada pocillo se sembraron aproximadamente 2×10^5 células, mientras que el número de eventos adquiridos por citometría fue de 1×10^4 células. Esto corresponde al análisis de alrededor del 5 % de la población total presente en el pocillo, lo cual resulta suficiente para obtener una población celular representativa. En caso necesario, el número de células analizadas podría incrementarse hasta aproximarse al total presente en cada pocillo. Sin embargo, debido a la alta reproducibilidad observada en distintos ensayos, no fue requerido aumentar el número de eventos adquiridos. Para la adquisición de datos se empleó un citómetro de flujo BD Accuri™ C6, seleccionado porque dispone de un autosampler compatible con placas de 96 pocillos, lo que permitió agilizar el proceso de lectura de las muestras.

Antes de evaluar las benzisotiazolonas sintetizadas, fue necesario confirmar que el sistema reportero hGrx1-roGFP2 en *T. b. brucei* era capaz de detectar cambios tempranos en el estado redox intracelular inducidos por compuestos bioactivos. Para ello, se emplearon dos familias químicas de referencia con mecanismos redox bien caracterizados: lactonas sesquiterpénicas y p-quinonas.

En primer lugar, las lactonas Psi B, Iso-Paullitine, Paullitine, Bepox B y Bepox α se incubaron durante 1 h en PBS-G a $2 \times EC_{50}$. De los cinco compuestos evaluados, tres indujeron un aumento significativo de la oxidación del biosensor: Psi B (~85 %), Bepox α (~40 %) y Bepox B (~33 %). Sin embargo, Paullitine y Bepox α mostraron una viabilidad celular reducida (aproximadamente 43 % y 17 % de células PI⁻, respectivamente), lo que indicó que, en estos casos, el efecto observado podría estar influido por toxicidad celular y no exclusivamente por desbalance redox. Debido a ello, fue necesario reevaluar estos compuestos empleando concentraciones equivalentes a $1 \times EC_{50}$.

Este comportamiento confirma que la oxidación observada para Psi B y Bepox B no se debe a muerte celular, sino a un desbalance redox reversible. En concordancia, la incubación posterior con DTT (1 mM, 30 min) revirtió completamente la señal oxidada del biosensor, evidenciando su naturaleza dependiente del estado redox intracelular.

Para validar la sensibilidad del sistema hGrx1-roGFP2 frente a cambios redox inducidos por compuestos bioactivos, se analizaron p-quinonas previamente caracterizadas. Tras 1 h de incubación a $1\times$ o $2\times CE_{50}$, la mayoría de las quinonas indujeron una oxidación significativa del biosensor (60–100 %), con un patrón creciente de actividad: naftoquinonas < furanoquinonas < oxazolo $\approx$ tiazoloquinonas. Las naftoquinonas 1, 3 y 5 generaron oxidaciones entre 60–80 %, mientras que el derivado 4 produjo ~ 40 % y el compuesto 2 no indujo oxidación detectable.

Todas las furanoquinonas (6–9) mostraron elevada actividad oxidante (70–100 %), mientras que las tiazoloquinonas (10–15) inducen >80 % de oxidación, siendo el compuesto no sustituido (10) el más potente dentro de su serie. Entre las oxazoloquinonas, los compuestos 16, 18 y 19 causaron 80–100 % de oxidación; en contraste, el compuesto 17, pese a ser el más potente de la serie ($CE_{50} = 1.6 \mu M$), no provocó cambios redox relevantes (<10 %).

Estos resultados demostraron que el sistema no responde simplemente a toxicidad general, sino específicamente a desbalances redox intracelulares. En todos los casos, la oxidación fue revertida por tratamiento posterior con DTT (1 mM, 30 min), confirmando la naturaleza redox-dependiente de la señal detectada por el biosensor.

Estos resultados demuestran que: (i) el biosensor es funcional y sensible frente a compuestos redox-activos, (ii) la condición experimental elegida (1 h en PBS-G a 37 °C) permite detectar alteraciones redox tempranas sin afectar significativamente la viabilidad celular, y (iii) el ensayo es aplicable para caracterizar el modo de acción de nuevas moléculas, diferenciando aquellas que inducen estrés oxidativo de aquellas que actúan por otras vías.

4.2. Síntesis iterativa de compuestos análogos y derivados de benzisotiazolonas

Con el objetivo de identificar nuevas benzisotiazolonas con potencia anti-tripanosoma e índices de selectividad (IS) frente a células de mamífero superiores a las reportadas para los compuestos de referencia EbS (T. b. brucei $CE_{50} = 0,092 \mu M$, IS = 815; Lu et al., 2013) y su análogo EbSe (T. b. brucei $CE_{50} = 8,9 \mu M$, IS = 11; Benítez et al., 2022),

se sintetizó una biblioteca de 23 derivados, incluyendo EbS como control. En anillo isotiazol de los nuevos compuestos se incluyeron diversos sustituyentes, tales como halógenos, grupos alquilo, alcóxidos y nitraciones (ver Figura 26). La ruta sintética más efectiva para la construcción de las estructuras de las series I, II y III consistió en un primer paso de amidación del ácido 2-iodobenzoico con diferentes aminas, seguido de un segundo paso de ciclación utilizando disulfuro de carbono (CS_2) en presencia de catalizadores (Figura 26A). Esta parte del trabajo fue realizada en colaboración con el Dr. Marcelo Incerti del Departamento de Química Orgánica, Facultad de Química, Universidad de la República, Uruguay.

Para la síntesis de los compuestos de las series IV y V, se partió del compuesto 1 (perteneciente a la serie I), el cual se sometió a un proceso de alquilación utilizando bromoacetato de etilo e hidruro de sodio, obteniéndose el éster 19 y el di éster 20 como producto secundario. Posteriormente, se llevó a cabo la hidrólisis alcalina del éster 19, resultando en el ácido 21. Para la obtención de los compuestos 22 y 23, se trató el ácido 21 con 4-trifluoroacetil-bencilamina y anilina en condiciones clásicas de amidación (ver Figura 26B). Esta parte de la síntesis de la serie IV y V se realizó como parte de una pasantía en la cátedra de Química Farmacéutica de la Facultad de Química, bajo la dirección del Dr. Marcelo Incerti.

Los rendimientos de todas las síntesis oscilaron entre el 30% y el 50%. La estructura de los compuestos sintetizados fue confirmada mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas Figura S1.

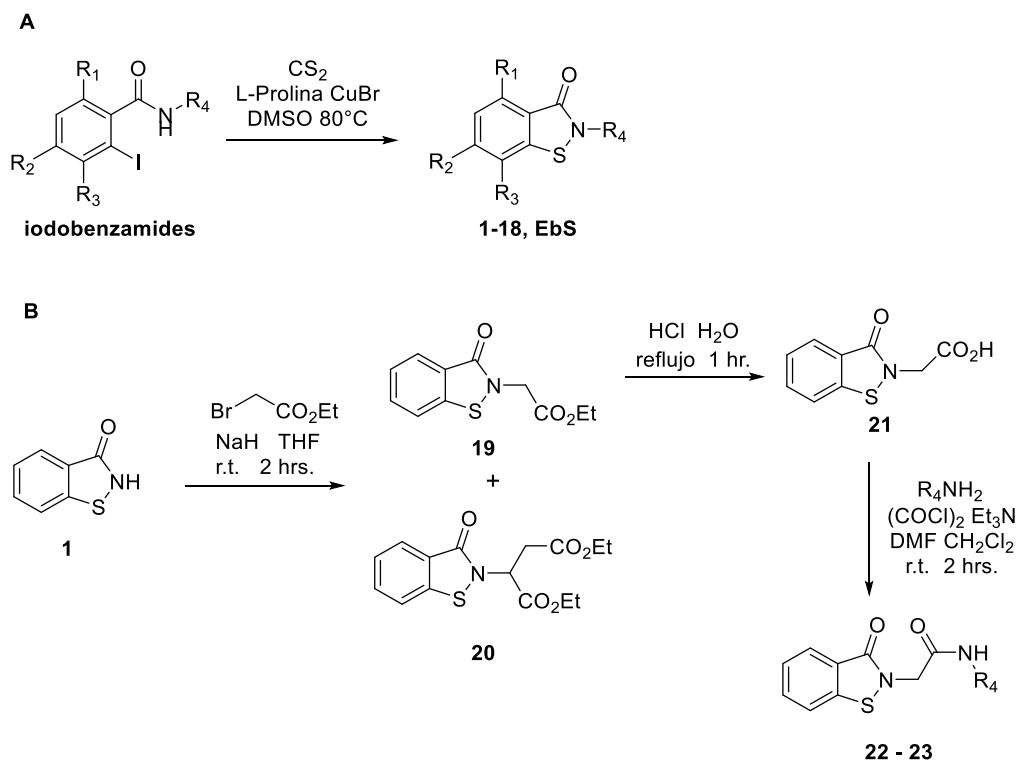


Figura 26. Esquema de síntesis de benzisotiazolonas.

A) Compuestos 1-18 y EbS. **B)** Compuestos 19-23.

4.2.1 Clasificación estructural derivados del EbS

La colección de 24 benzisotiazolonas sintetizadas fue organizada en cinco series químicas definidas a partir de variaciones estructurales específicas (Figura 27). El Compuesto **1** se utilizó como esqueleto de referencia para las modificaciones, incorporándose una versión metilada en la posición 7 del anillo bencénico (Compuesto **2**) como segundo andamiaje de base. A partir de estos esqueletos, se introdujeron sustituciones en la posición N² del heterociclo, así como en el anillo aromático (posiciones R₁, R₂ y R₃) y en la posición N³ (posición R₄).

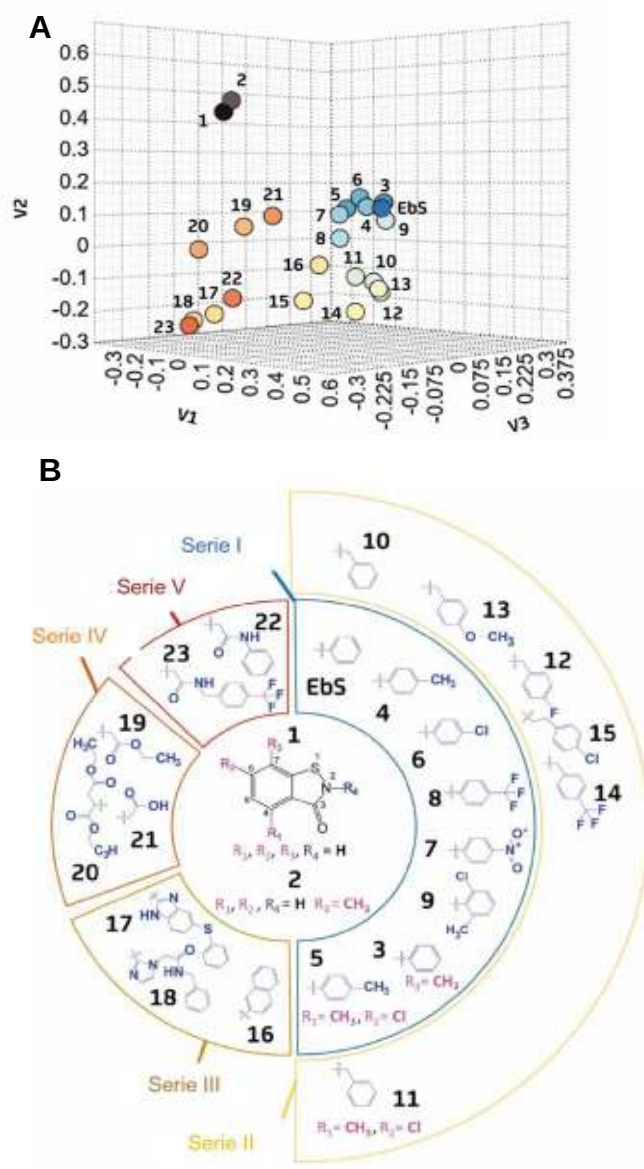


Figura 27. Agrupamiento y estructura de las benzisotiazolonas sintetizadas

A) Resultado del análisis de agrupamiento multidimensional obtenido con el servidor ChemMine (Backman, Cao y Girke 2011) para el conjunto de compuestos estudiados. Se aplicó un valor de corte de similitud de 0,9. **B)** En base a su similitud estructural y química, los compuestos se clasificaron dentro de cinco grupos (clústeres). El compuesto 1, ubicado en el centro, representa el esqueleto básico de benzisotiazolona a partir del cual se generaron los diversos derivados mediante la incorporación de sustituyentes en el nitrógeno N² (indicados en azul, R₄) y en el anillo aromático de la benzisotiazolona (indicados en magenta, R₁, R₂ y R₃). Clúster I: derivados con sustituyentes aromáticos simples o halogenados; Clúster II: compuestos con grupos alquilo y halógenos específicos; Clúster

III: compuestos con anillos heterocíclicos; Clúster IV: derivados con cadenas alifáticas funcionalizadas; Clúster V: compuestos con grupos nitrogenados polares.

Para evaluar las relaciones de similitud estructural entre los derivados, se aplicó un análisis de agrupamiento multidimensional mediante la herramienta ChemMine (Backman et al., 2011). La representación gráfica de los resultados muestra que los compuestos se agrupan en cinco series químicas claramente diferenciadas en función de la naturaleza y disposición de los sustituyentes en N² y en el núcleo aromático. La Serie I incluye compuestos con sustituyentes fenilo en N² (EbS, 3–9), mientras que la Serie II agrupa aquellos con sustituyentes bencilo (10–15). En la mayoría de los casos, estas moléculas presentan modificaciones adicionales en la posición para de los anillos aromáticos o en el esqueleto de benzisotiazolona. La Serie III comprende análogos con sustituyentes arilo, tanto homocíclicos como heterocíclicos (16–18), y la Serie IV reúne derivados con sustituyentes alquil-carboxilato en N² (19–21). Finalmente, la Serie V está conformada por compuestos con una unidad acetamida en N², acoplada a un fenilo (22) o a un bencilo para-trifluorometilado (23).

La organización de los compuestos en estas cinco series químicas permitió delimitar con claridad la influencia de los grupos sustituyentes sobre la arquitectura global de las benzisotiazolonas. Esta categorización constituye la base estructural para el análisis comparativo de los resultados experimentales.

En la siguiente sección se presentan los ensayos biológicos, con el objetivo de establecer correlaciones entre las modificaciones estructurales introducidas y su impacto en la actividad anti-tripanosomal y en los perfiles de selectividad.

4.3 Actividad anti-tripanosomátidos, selectividad y efecto on-target de las benzisotiazolonas.

4.3.1 Actividad biológica y selectividad contra la forma sanguínea de *T. b. brucei*.

El cribado primario realizado sobre la forma infectiva de *T. b. brucei*, la cual presenta una alta tasa de proliferación (tiempo de duplicación ~ 6 h), a una concentración fija compuestos (10 µM) y durante 24 horas, reveló que la mayoría de los derivados benzisotiazolónicos redujeron de manera significativa la viabilidad de los parásitos (Tabla S1). Solo los compuestos 2, 15, 18 y 20 mostraron una actividad anti-tripanosoma marginal (72-85 % viabilidad; Tabla 3). Tomando como criterio de hit biológico compuestos que a 10

μM disminuyan al menos un 50% la viabilidad celular bajo las condiciones de ensayo descritas anteriormente, calculamos que la tasa de hits para el total de benzisotiazolonas evaluadas asciende a 82 % (19 de 23 compuestos).

A todos los compuestos calificados como hits se les determinó su CE_{50} para obtener una estimación más precisa de potencia y poder realizar comparaciones cuantitativas. De acuerdo con los valores de CE_{50} , los compuestos activos se dividieron en dos grupos: aquellos con potencias en el rango nanomolar (1, 3, 4, 6, 8, 10–14, 16, 19, 21 y EbS; $\text{CE}_{50} < 1 \mu\text{M}$) y aquellos con potencias en el rango micromolar bajo (5, 7, 9, 17 y 23; $\text{CE}_{50} = 1\text{--}5 \mu\text{M}$), comparables a las moléculas de referencia EbS ($\text{CE}_{50} = 0,30 \mu\text{M}$) y EbSe ($\text{CE}_{50} = 3,5 \mu\text{M}$), respectivamente. Entre los derivados más potentes destacaron los compuestos 14 ($\text{CE}_{50} = 22 \text{ nM}$), 11 ($\text{CE}_{50} = 90 \text{ nM}$) y 1 ($\text{CE}_{50} = 100 \text{ nM}$), que fueron entre 3 y 14 veces más activos que EbS y entre 35 y 159 veces más potentes que NFX ($\text{CE}_{50} = 3,5 \mu\text{M}$). Otros cuatro derivados (10, 12, 13 y 16) mostraron una potencia similar a la de EbS.

Restringiendo el análisis a los compuestos que presentaron CE_{50} del orden nM, se observaron las siguientes correlaciones: los derivados tipo bencilo (Serie II) presentaron la mayor proporción de activos (5/6, 83 %), seguidos de las Series IV (2/3, 66 %), I (4/7, 57 %), III (1/3, 33 %) y V (0/2, 0 %).

El análisis de SAR reveló que sustituciones voluminosas o flexibles en N^2 fueron altamente perjudiciales para la bioactividad, incluyendo el p-cloroetil benceno (15), la fenilpropilamina conjugada a imidazol (18) y el grupo dietil-acetato (20). Asimismo, la metilación en la posición 7 del esqueleto parental (compuesto 2) abolió la actividad, sugiriendo que las restricciones estéricas son más determinantes de actividad que la naturaleza química del sustituyente. Otros ejemplos que reafirman esta interpretación son los compuestos 2 y 15, donde la adición de un pequeño metilo al andamiaje parental (1) o de un eslabón de dos carbonos a un sustituyente bencilo para-halogenado (12, análogo del 6) redujo marcadamente la bioactividad. Contrariamente, los análogos monoacetilados (19 y 21) retuvieron actividad submicromolar, mientras que el derivado diacetilado (20) fue inactivo.

Para la Serie III, los sustituyentes rígidos tipo bicíclicos (16, naftilo; 17, bencimidazol) resultaron más activos que la variante flexible con un bencilo acetamida-imidazol (18). En la Serie I, las sustituciones en posiciones para (4, 6–8) u orto (9) redujeron la potencia entre

2 y 10 veces respecto a EbS ($CE_{50} = 0,30 \mu M$). En particular, el grupo nitro (7; $CE_{50} = 3,1 \mu M$) fue el menos favorable, mientras que halógenos (6, 8) o metilo (4) fueron tolerados ($CE_{50} = 0,6\text{--}0,9 \mu M$). El compuesto 9, con sustituciones di-orto (metilo y cloro), fue el menos activo de la serie ($CE_{50} = 4,3 \mu M$).

La modificación del núcleo de benzisotiazolona también tuvo un impacto diferencial en la actividad: la metilación en R3 (3, $CE_{50} = 0,9 \mu M$) y la doble sustitución R1-Me/R2-Cl (5, $CE_{50} = 1,4 \mu M$) redujeron la potencia respecto a los correspondientes análogos no sustituidos (1 y 4). La pérdida de actividad por metilación en R3 se confirma al comparar el análogo 1 ($CE_{50} = 0,1 \mu M$) con el 2 ($CE_{50} > 10 \mu M$), con más de 100 veces de diferencia en potencia.

En la Serie II, los derivados bencilo (10–14) fueron más activos que sus análogos fenilo, en el siguiente orden: $10 \geq EbS$ (1,25 veces), $12 > 6$ (1,9 veces), $13 > 4$ (4,3 veces) y $14 \gg 8$ (27 veces). Sin embargo, la extensión del eslabón bencilo (compuesto 15) redujo drásticamente la potencia (72 % de viabilidad a $10 \mu M$), en comparación con sus análogos 6 ($CE_{50} = 0,71 \mu M$) y 12 ($CE_{50} = 0,36 \mu M$).

Los derivados con un conector tipo acetamida en N^2 (Serie V; 22 y 23) fueron claramente desfavorables, con potencias 14 y 81 veces menores que las de sus análogos EbS y 14, respectivamente. Por el contrario, la combinación de metilo en R1 y cloro en R2 incrementó la potencia del derivado bencilo 11 ($CE_{50} = 0,091 \mu M$) en 2,6 veces respecto a su análogo no sustituido 10 ($CE_{50} = 0,24 \mu M$).

Respecto a la citotoxicidad sobre macrófagos murinos, varios compuestos fueron más citotóxicos que los controles de referencia (1, 3, 5, 8, 11 y 17; $CC_{50} < 100 \mu M$) y algunos presentaron una citotoxicidad intermedia (7, 10, 14 y 22; $CC_{50} = 120\text{--}170 \mu M$) y similar a la del EbS ($CC_{50} = 176 \mu M$), EbSe ($CC_{50} = 182 \mu M$) y NFX ($CC_{50} = 150 \mu M$). No obstante, la mayoría las nuevas benzistiazolonas careció de citotoxicidad a la máxima concentración evaluada (4, 6, 9, 12, 13, 16, 19, 21 y 23; $CC_{50} > 200 \mu M$). El compuesto 3 ($CC_{50} = 8 \mu M$), un análogo metilado en R3 de EbS, fue el único derivado que presentó una marcada citotoxicidad.

El cálculo del índice de selectividad ($IS = CC_{50}/CE_{50}$) confirmó que, salvo el compuesto 3 ($IS = 9$), todos los derivados fueron al menos tan selectivos como NFX ($IS = 43$), y en muchos casos ampliamente superiores. En la Serie I, los IS oscilaron entre 9 y >281 , siendo los derivados para-metilado (4; $IS > 217$) y para-clorado (6; $IS > 281$) los más selectivos. La Serie II mostró los índices más altos, con valores entre 462 y 6772. En la Serie III, el derivado naftilo (16; $IS > 832$) fue más selectivo que el bencimidazol (17; $IS = 37$). En la Serie IV, ambos derivados acetilados fueron altamente selectivos, destacando 21 ($IS = 339$) frente a 19 ($IS = 222$). En la Serie V, los valores fueron más bajos (22, $IS > 39$; 23, $IS > 111$). Los compuestos más selectivos fueron 12 ($IS > 555$), 13 ($IS > 952$), 14 ($IS = 6772$) y 16 ($IS > 833$), todos con índices similares o superiores a EbS ($IS = 586$) y 10 a 100 veces por encima de NFX ($IS = 43$).

Tabla 3. Actividad biológica de benzisotiazolonas contra el estadio de especies principales de tripanosomátidos y líneas celulares de referencia de mamíferos.

ID ^d	CE ₅₀ ^a (μM) y/o % viabilidad ^b			CC ₅₀ ^c (μM)	Viabilidad (%) a 100 o ^e 50 μM	Índice de Selectividad CC ₅₀ / CE ₅₀	
	T. b. brucei	T. cruzi amastigotes	L. infantum amastigotes	J774 células	Vero células	J774 vs T. b. brucei	Vero vs T. cruzi
1	0,10 ± 0,01 **	>10; 77 ± 1	97 ± 14	45 ± 4	72,8 ± 2,1	450	≤10
2	>10; 100 ± 4	>10	94 ± 19	>100	100,0 ± 0,2	nd	≥10
3	0,89 ± 0,08 *	>10; 114 ± 5	96 ± 13 ^f	8,4 ± 2,4	84,2 ± 2,0 ^e	9,4	≤5
4	0,92 ± 0,03 *	>10; 80 ± 1,3	89 ± 8	>200	100,0 ± 1,3	>217	≥10
5	1,4 ± 0,2 **	8,7 ± 0,08 ^{ns}	148 ± 2	88 ± 8	100,0 ± 0,5	63	>11
6	0,71 ± 0,01 *	4,7 ± 0,04 ^{ns}	59 ± 10	>200	100 ± 2,0	>281	>21
7	3,1 ± 0,0 ^{ns}	3,0 ± 0,09 ^{ns}	116 ± 2	155 ± 6	29,2 ± 1,2 ^e	50	<16
8	0,61 ± 0,04 **	3,9 ± 0,38 ^{ns}	98 ± 2	60,6 ± 0,3	60,0 ± 3,6	100	~25
9	4,3 ± 0,9 ^{ns}	5,1 ± 0,57 ^{ns}	98 ± 8	>200	85,3 ± 2,2 ^e	>47	>10
10	0,24 ± 0,01 **	>10; 76 ± 6,8	80 ± 9	122 ± 21	100,0 ± 0,6	508	≥10
11	0,091 ± 0,06 **	>10; 60 ± 5,1	104 ± 2	42,1 ± 0,6	100,0 ± 0,2	462	≥10
12	0,36 ± 0,01 **	4,4 ± 0,16 ^{ns}	71 ± 2	>200	83,0 ± 0,3	>555	>23
13	0,21 ± 0,02 **	>10; 110 ± 1,3	118 ± 17	>200	100 ± 0,8	>952	≥10
14	0,022 ± 0,003 **	>10; 70 ± 1,3	104 ± 18	149 ± 1	100,0 ± 0,2	6772	≥10
15	>10; 72 ± 8	>10; 95 ± 10,3	85 ± 7	nd	62,0 ± 0,1	nd	≤10
16	0,24 ± 0,06 **	2,1 ± 0,15 ^{ns}	124 ± 8	>200	88,3 ± 0,4	>833	>47
17	2,4 ± 0,3 *	>10; 102 ± 3,1	103 ± 13	88 ± 13	35,0 ± 0,1	37	<10
18	>10; 106 ± 5	nd	nd	nd	nd	nd	nd
19	0,90 ± 0,02 *	>10; 56 ± 5,4	nd	>200	92,0 ± 0,7	222	≤10
20	>10; 85 ± 4	>10	107 ± 8	nd	95,0 ± 0,3	nd	≤10
21	0,59 ± 0,09 **	>10; 100 ± 10,5	122 ± 13	>200	100,0 ± 0,2	339	≥10
22	4,2 ± 0,2 ^{ns}	>10; 58 ± 1,07	85 ± 13	167 ± 1	100,0 ± 0,6	39	≥10
23	1,8 ± 0,1 *	>10	131 ± 3	>200	100,0 ± 0,9	>111	≥10

EbS	0,30 ± 0,04 **	>10; 66 ± 3	94 ± 4	176 ± 1	66,0 ± 2,0	586	~10
EbSe	3,5 ± 0,0 ^{ns}	>10; 105 ± 11	117 ± 14	182 ± 18	60,0 ± 0,3	52	<10
NFX	5,3 ^g	0,72 ^h	nd	150 ± 5	50,3 ± 0,1	43	143
BNZ	ND	2,2 ^h	nd	nd	100,0 ± 0,8	nd	>45
Anfotericina	ND	nd	0,0035 ± 0,002	8,9 ⁱ	nd	254	nd

CE₅₀: concentración efectiva media.

^b La viabilidad parasitaria se determinó a 10 µM del compuesto para *T. brucei* y *T. cruzi*, o a 20 µM del compuesto para *L. infantum*.

^c **CC₅₀**: concentración citotóxica media.

^d Compuestos evaluados a 50 µM.

^e **ID**: código de identificación de los compuestos o fármacos de referencia (NFX: Nifurtimox; BNZ: Benznidazol; Amph: Anfotericina B).

^f La viabilidad se determinó a 5 µM debido a que el compuesto es citotóxico para macrófagos a 20 µM.

^g Valor reportado en (Benítez et al., 2020).

^h Valor reportado en (Quiroga et al., 2024).

ⁱ Valor reportado en (Medeiros et al., 2020).

nd: no determinado.

Los asteriscos indican diferencias estadísticas (*: $p < 0.0332$; **: $p < 0.0021$; ***: $p < 0.0002$; ****: $p < 0.0001$) y “ns” significa no significativo en comparación con NFX (para los datos de *T. b. brucei*) o BNZ (para los datos de *T. cruzi*), aplicando una prueba t de dos colas no pareada con corrección de Welch o una prueba ANOVA de una vía con el test post hoc de Dunn, respectivamente.

Estos resultados confirman que la serie de benzisotiazolonas presenta una elevada tasa de acierto, potencias en el rango nanomolar, perfiles de citotoxicidad favorables y altos índices de selectividad frente a *T. b. brucei*. En particular, el compuesto 14 se posiciona como el derivado más prometedor, combinando la mayor potencia con un perfil de baja citotoxicidad que da lugar a una selectividad sin precedentes en esta serie.

4.3.2 Actividad biológica y selectividad contra amastigotas intracelulares de *T. cruzi*.

Todas las benzisotiazolonas sintetizadas fueron cribadas contra la forma intracelular de *T. cruzi* cepa Dm-28c-LUC. El ensayo consistió en incubar células VERO infectadas con la cepa bioluminiscente del parásito con los compuestos a una concentración fija de 10 µM y durante 72 h. Bajo estas condiciones, se identificaron siete compuestos (5, 6, 7, 8, 9, 12 y 16) capaces de reducir la viabilidad de los parásitos por más de un 50 % (Tabla 3). Por lo tanto, la tasa de hits es del 32 % (7 activos de un total de 22 ensayados). La mayoría de los compuestos activos pertenecen a la Serie I (derivados fenilo, 5–9), seguido de la Serie II (12, análogo p-fluorobencilo) y Serie III (16, anillo naftilo), cada una de las cuales contuvo un hit.

La determinación de la CE_{50} para un conjunto de hits seleccionados reveló que cinco de estos siete compuestos (6, 7, 8, 12 y 16) presentaron potencias en el rango micromolar bajo (2–5 μM) y comparables al fármaco de referencia Bzn ($CE_{50} = 2,2 \mu\text{M}$). En cambio, las CE_{50} de los compuestos 5 y 9 fueron superiores (9 y 5 μM , respectivamente) aunque dentro del mismo orden de magnitud. El análisis de relaciones estructura–actividad (SAR) reveló que la sustitución en N^2 con grupos arilo es un requisito para la bioactividad. En particular, la introducción de sustituyentes electrófilos en posición para del anillo fenilo, como halógenos (6 y 8) o nitro (7), mejoró la actividad respecto a los análogos no sustituidos (EbS y 3) o metilados (4). Asimismo, la doble modificación con metilo y cloro en la posición meta (9) tuvo un efecto positivo, aunque moderado. En el núcleo de la benzisotiazolona, la metilación en R1 junto con la cloración en R2 transformó un derivado N^2 -tolueno inactivo (4) en un análogo activo (5). Por el contrario, la metilación en R3 abolió la actividad, como se evidenció para el compuesto 3 (114% de viabilidad a 10 μM) respecto del EbS (66% de viabilidad a 10 μM).

Entre los derivados bencilo, la mayoría mostró baja actividad (10, 11 y 14, con una reducción de viabilidad del 24–40% a 10 μM), siendo el análogo p-fluorobencilo 12 el más activo de esta serie ($CE_{50} = 4 \mu\text{M}$). De forma similar a lo observado para los derivados con fenilos, la combinación de sustituciones en el núcleo ($R1=\text{CH}_3$ y $R2=\text{Cl}$) mejora ligeramente la actividad del derivado bencilo 11 (60 % de viabilidad a 10 μM) respecto a su análogo no sustituido 10 (76 % de viabilidad a 10 μM).

En términos de citotoxicidad, los compuestos fueron evaluados sobre células VERO no infectadas (hospedadoras de *T. cruzi*), mostrando que únicamente los compuestos 7 (50 μM) y 17 (100 μM) redujeron la viabilidad celular en más del 50 %. El resto de las moléculas, evaluadas a 50 o 100 μM , presentaron toxicidades similares o menores que las observadas para EbS y EbSe (60–66 % de viabilidad a 100 μM). El cálculo del índice de selectividad ($IS = CC_{50}/CE_{50}$) confirmó que los siete compuestos activos presentaron valores $IS \geq 10$, con el derivado naftilo 16 ($IS > 47$) como el más selectivo, alcanzando un perfil comparable al Bzn ($IS > 45$).

A pesar que la tasa de activos contra *T. cruzi* fue más baja que la obtenida para *T. b. brucei*, algunos derivados, en especial los compuestos 6, 7, 8, 12 y 16, presentan un

perfil de potencia y selectividad suficientemente interesante como para ser considerados en estudios de optimización y validación preclínica.

4.3.3 Actividad biológica y selectividad contra la forma intracelular de *L. infantum*

La actividad de las benzisotiazolonas contra la forma intracelular de *L. infantum* en macrófagos infectados fue globalmente baja. Bajo las condiciones de cribado (exposición a 20 μM compuesto por 24 h), ningún derivado alcanzó el umbral de hit definido como viabilidad $\leq 50\%$ a 20 μM . Solo los derivados 6 (59 % de viabilidad parasitaria) y 12 (71 % de viabilidad) afectaron moderadamente la viabilidad de los amastigotes, mientras que el resto de los compuestos resultó ser prácticamente inactivo con porcentajes de viabilidad $\geq 89\%$. También el EbS y EbSe resultaron inactivos en este modelo, a diferencia del fármaco control anfotericina B, que mostró una marcada eficacia ($\text{CE}_{50} = 0,0035 \mu\text{M}$) y una elevada selectividad ($\text{IS} = 254$). Para el compuesto 6, se estimó un índice de selectividad de al menos $\text{SI} \geq 10$, considerando una CE_{50} aproximada de 20 μM y un valor de $\text{CC}_{50} > 200 \mu\text{M}$ frente a macrófagos (Tabla 3).

El número limitado de compuestos con actividad no permitió realizar un análisis detallado de relación estructura–actividad (SAR). No obstante, se observó que la sustitución por halógenos en posición para de los anillos fenilo (compuesto 6) y bencilo (compuesto 12) favoreció modestamente la actividad, mientras que sustituciones más voluminosas, como el grupo trifluorometilo, presente en los análogos 8 y 14, fueron claramente desfavorables.

4.3.4. Susceptibilidad especie-específica a benzisotiazolonas

En términos comparativos, *T. b. brucei* mostró una susceptibilidad mayor que *T. cruzi* hacia la acción citotóxica de las benzisotiazolonas. Solo un par de los derivados fenólicos (7 y 9) presentó potencias similares frente a ambas especies ($\text{CE}_{50} = 3\text{--}5 \mu\text{M}$), mientras que otros (5, 6, 8, 12 y 16) resultaron entre 6 y 12 veces más activos contra *T. b. brucei*. Particularmente, los derivados bencilo de la Serie II generaron cinco compuestos con CE_{50} en rango nanomolar contra *T. b. brucei*, frente a un solo derivado con actividad micromolar en *T. cruzi* amastigotes (Tabla 3). Como se comentará arriba, la forma

amastigotes de *L. infantum* se mostró marcadamente refractaria a la acción de las benzisotiazolonas, con solo dos compuestos afectando la viabilidad celular a una concentración de dos dígitos μM . Coincidentemente este par de compuestos (6 y 12) con moderada actividad contra leishmania se encontraban dentro de los más activos contra *T. brucei*.

Las diferentes susceptibilidades de las distintas especies de tripanosomátidos a las benzisotiazolonas podrían ser multifactoriales. Entre ellas destacamos las siguientes que muestran correlación con la sensibilidad a compuestos observada: la tasa de proliferación y el hábitat colonizado por el patógeno. Por ejemplo, notamos que las especies y estadios de parásito estudiados pueden ordenarse de la siguiente manera de acuerdo a su capacidad proliferativa: forma sanguínea de *T. b. brucei* (tiempo de duplicación ~ 6 h; Benítez et al., 2020) > amastigotes de *T. cruzi* (tiempo de duplicación ~ 12 h; MacLean et al., 2018) > amastigotes de *L. infantum* (tiempo de duplicación > 20 h; Jara et al., 2017). Este es el mismo orden de tasa de hits o susceptibilidad que se observa por especie para las benzisotiazolonas, lo cual denota que estos compuestos ejercen un mayor efecto citotóxico sobre células con mayor actividad metabólica/proliferativa. A nivel molecular, las diferencias en tasas replicativas también implican la expresión de proteínas asociadas a esos procesos que podrían estar siendo blanco de inhibición selectiva por parte de los compuestos. El otro factor que podría estar jugando un rol determinante en la biodisponibilidad de los compuestos es el entorno y barreras físicas y bioquímicas a las cuales están expuestos y deben superar para ejercer su acción. Por ejemplo, los ensayos contra *T. brucei* se realizan contra la forma extracelular de este patógeno (es decir cultivos axénicos), mientras que para *T. cruzi* y *L. infantum* se estudió la actividad sobre las formas intracelulares (cultivos dixénicos) que residen en el citosol y fagolisosoma, respectivamente, de distintas células de mamíferos: células de epitelio renal y macrófagos, respectivamente. Las células hospederas podrían contribuir a la metabolización o transformación de los compuestos en especies menos reactivas, reduciendo así la concentración efectiva del bioactivo. Nuevamente, notamos una correlación entre tolerancia a los compuestos y las barreras físico-bioquímicas de los modelos celulares: siendo *L. infantum* más resistente que *T. cruzi*, y este último más que *T. brucei*, a la acción de las benzisotiazolonas. Se vuelve relevante destacar que los amastigotes de *Leishmania* residen en el fagolisosoma de los macrófagos, un compartimento ácido y con condiciones redox particulares que pueden limitar la biodisponibilidad y eficacia de los compuestos ensayados. Esta localización

intracelular representa una de las principales barreras para el desarrollo de fármacos antileishmánicos, ya que los candidatos deben atravesar membranas celulares y lisosomales, además de mantener su estabilidad y actividad en un entorno hostil (Antoine et al., 1998; Laufs et al., 2002). La capacidad del parásito para sobrevivir dentro de neutrófilos (PMN) tras fagocitosis independiente de opsoninas indica que puede evadir mecanismos antimicrobianos clásicos.

4.4 Ensayos redox sobre líneas reporteras de *T. b. brucei* y *L. infantum*

4.4.1 Actividad redox de benzisotiazolonas en *T. b. brucei*

EbSe y sus derivados EbS han sido reportados como inhibidores de TR (Lu et al., 2013) y TryS (Benítez et al., 2022). Si estos fueran los blancos moleculares de los compuestos evaluados en este trabajo, se espera que varios de ellos retengan el mismo modo de acción e induzcan un desequilibrio redox a nivel intracelular. Basados en esta hipótesis, evaluamos el efecto de los derivados más activos de benzisotiazolona en el metabolismo redox dependiente de tioles de la forma infectiva de *T. b. brucei* que expresa un biosensor reportero del estado redox del contenido de tioles de bajo peso molecular (GSH y T(SH)₂; Franco et al., 2017). Para verificar los cambios redox en la intensidad de fluorescencia y calibrar los ensayos del biosensor, se incluyeron tratamientos de las muestras con un agente oxidante (Diamida, DAM) y reductor de tioles (DTT).

Para evitar la interacción de los compuestos con el β-mercaptoetanol y la cisteína presente en el medio de cultivo, el ensayo se realizó en solución de PBS con 1% p/v glucosa. Además, con el fin de realizar un diagnóstico temprano de la posible causa de pérdida de viabilidad, la incubación se extendió por solo una hora empleando concentraciones de compuestos que produzcan un fenotipo subletal (viabilidad celular > 40%). Expresadas como relativas a sus correspondientes valores de CE₅₀, las concentraciones ensayadas fueron 0.25X para 7 y 9, 0.5X para 6, 1X para 1, 4, 11 y 14, y 2X para 8, 10, 12, 13, 19, 23 y EbS. La intensidad de fluorescencia del biosensor y viabilidad celular (tinción con PI) se evaluó por técnica de citometría de flujo. Como se muestra en la Figura 28, 13 de los 19 compuestos indujeron la oxidación del biosensor (24-100%), la cual pudo revertirse total o parcialmente después del tratamiento con DTT.

En el caso de la benzisotiazolona 2 (% de oxidación = 0%), su metilación en la posición 7 afectó negativamente el efecto pro-oxidante observado para el compuesto

parental no sustituido (1, % de oxidación = 43%). Si analizamos los análogos de EbS (sin un átomo de carbono como espaciador entre el N2 de la benzisotiazolona y el sustituyente fenilo), solo aquellos carentes de sustituyentes en C3 y C7 de la benzisotiazolona causaron oxidación del biosensor (4, 6-9 y EbS, oxidación = 40-79 %) (Figura 28, Tabla S2).

Todos los compuestos con la incorporación de un átomo de carbono como espaciador entre el N2 de la benzisotiazolona y el sustituyente fenilo indujeron la oxidación del biosensor, pero solo uno causó 100% de oxidación del biosensor, el 11.

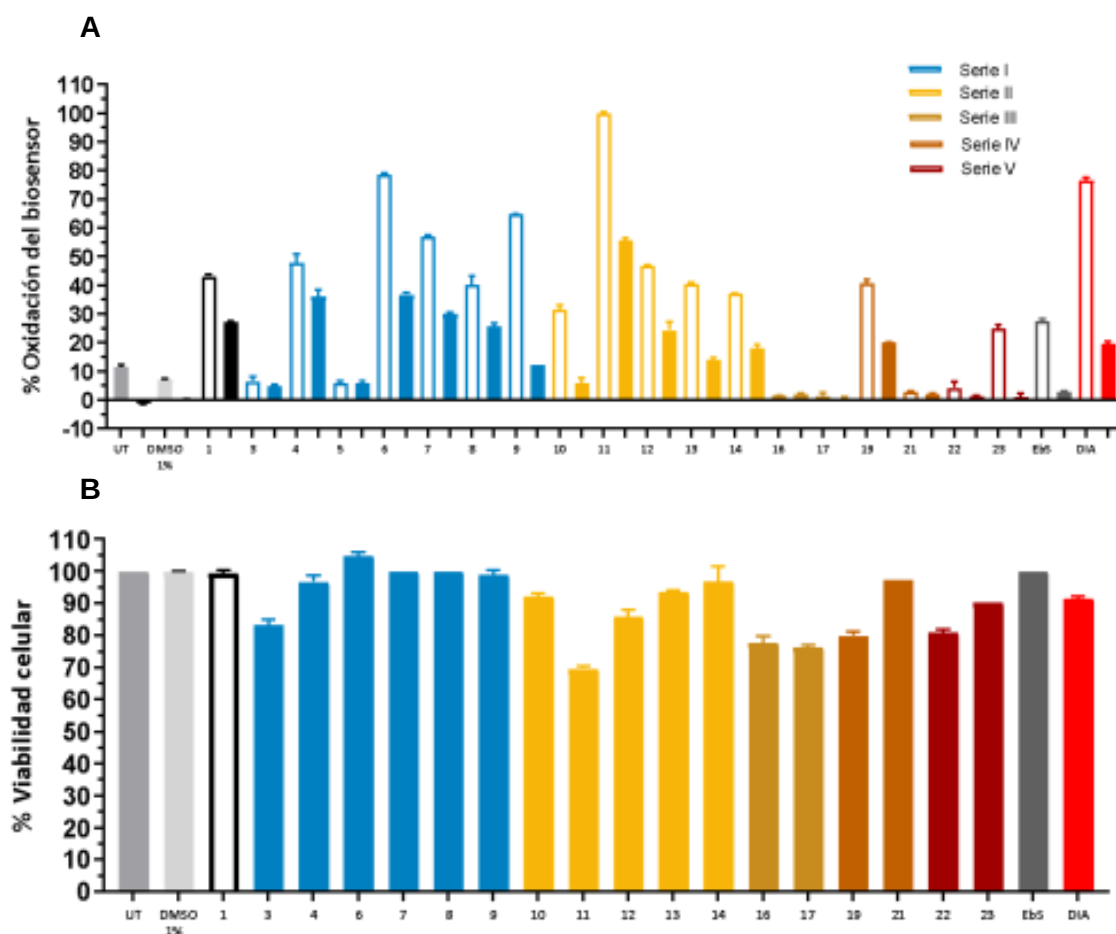


Figura 28. Actividad redox contra la forma infectiva de *T. b. brucei*.

Parásitos reporteros redox en fase exponencial de crecimiento fueron tratados durante 60 min con concentraciones subletales de los compuestos ($0,25 \times CE_{50}$ para 7, 9 y 5; $0,5 \times CE_{50}$ para 6; $1 \times CE_{50}$ para 1, 3, 4, 11, 14, 16, 17, 21 y 22; $2 \times CE_{50}$ para 8, 10, 12, 13, 19, 23 y EbS). El análisis por citometría de flujo se realizó para determinar: A) el balance redox intracelular de tioles de bajo peso molecular. Las condiciones de control incluyeron parásitos no tratados (UT), tratados con vehículo [V, 1 % (v/v) DMSO] o con diamida 250 μ M (DIA). Las barras sólidas corresponden a muestras incubadas adicionalmente con DTT (1 mM, 15 min). Con excepción de los compuestos 3, 5, 16, 17, 21 y 22, todas las benzisotiazolonas restantes indujeron una oxidación estadísticamente significativa del

biosensor en comparación con el control con vehículo (V, barra gris; $p < 0,05$). B) la viabilidad celular mediante tinción con yoduro de propidio.

Distintas modificaciones en las benzisotiazolonas tuvieron como consecuencia la ausencia del efecto pro-oxidante observado para otros análogos. Entre ellas se encuentran: la elongación a dos átomos de carbono como espaciador entre el N² de la benzisotiazolona y el sustituyente fenilo 4-cloro (15, % de oxidación = 0%), inclusión de grupo metil-acetamida como enlace entre la benzisotiazolona y el grupo fenilo (22, % de oxidación = 0%), sustituciones en N² con grupos di-acetato (20 y 21, % de oxidación = 0%), o naftilo (16), incorporación de heterociclos como imidazol conjugado a fenil-tio-benzimidazol (17) o a fenil-propilamina (18) (16-18, % de oxidación = 0%). Por el contrario, cuando el sustituyente es para-trifluorometil bencilo (23, % de oxidación = 24%) o un solo grupo acetato (19, % de oxidación = 42%), los compuestos retienen capacidad pro-oxidante.

Por otro lado, al comparar los análogos con el sustituyente para-trifluorometil bencilo (14, % de oxidación = 37%) o el sustituyente para-trifluorometil fenilo (8, % de oxidación = 40%), no se observó una diferencia significativa en el % de oxidación. Los compuestos con cloro en la posición 6 y metilo en la posición 4 de la benzisotiazolona (11 y 5) mostraron efectos opuestos en el % de oxidación del biosensor (100% y 0%, respectivamente), mientras que el análogo no modificado tuvo una actividad pro-oxidante intermedia (10, % de oxidación = 32%). Como se planteó en los estudios de actividad biológica, la presencia de un C entre el grupo aromático sustituyente en N² y la benzisotiazolona seguramente afecta la interacción con el blanco molecular y por lo tanto su efecto biológico redox.

Para verificar que la oxidación del biosensor a nivel intracelular no se debía a una reacción directa de los compuestos con los componentes del mismo (ej. oxidación de tioles de hGrx1-roGFP2 y/o apantallamiento de fluorescencia de roGFP2), se analizó: 1) el espectro de fluorescencia de las benzisotiazolonas de interés (Figura 29A) y 2) el estado redox de la forma recombinante del biosensor (5 μ M) en estado reducido y oxidado incubado durante 1 h con un exceso (10 $\times$) de cada una de las benzisotiazolonas de interés (Figura 29B). Ninguna de las moléculas ensayadas presentó picos de emisión de fluorescencia que solaparan al del biosensor (Figura 29A) ni indujo la oxidación del biosensor (barras sólidas en Figura 29B) a concentraciones 10-50 veces superiores a las estudiadas en los ensayos celulares. Solo se notó que los compuestos 13 y 14 indujeron una aparente reducción del biosensor (oxidación 68-78%, barras vacías en Figura 29B). Este incremento en la fluorescencia del biosensor podría deberse a una estabilización del

cromóforo o efectivamente a una reducción del disulfuro de roGFP2. Estudios realizados con EbSe indican que este compuesto tiene capacidad de reducir disulfuros formando intermediarios selenil-sulfuro (Noguchi, 2016; Sands et al., 2023). Esta posibilidad debería ser explorada para los compuestos 13 y 14 en futuros trabajos.

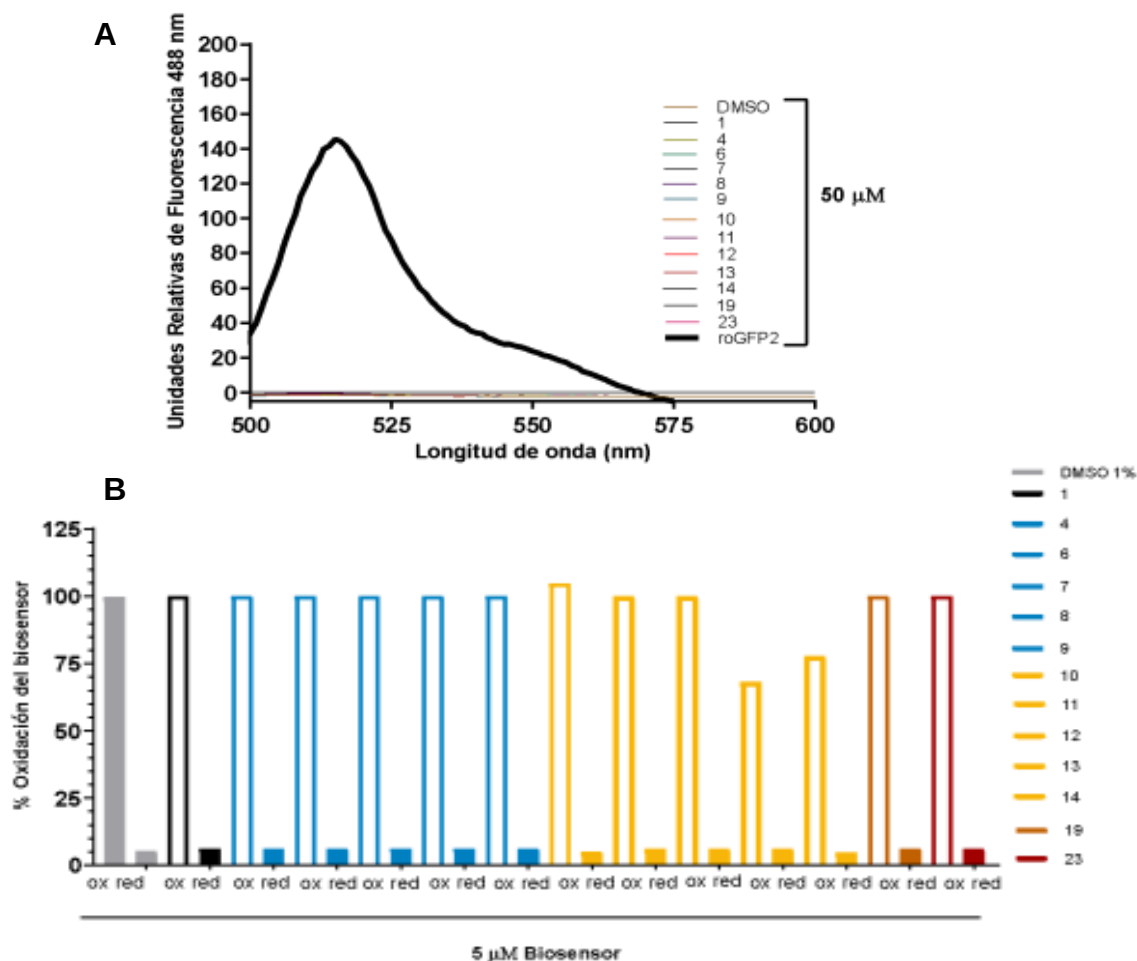


Figura 29. Análisis fluorométrico de los hits que indujeron la oxidación intracelular del biosensor en *T. b. brucei*.

A) Espectros de emisión ($\text{ex} = 488 \text{ nm}$) del biosensor recombinante ($5 \mu\text{M}$, roGFP2) y ($\lambda_{\text{em}} = 500\text{-}550 \text{ nm}$) de los compuestos ($50 \mu\text{M}$) en buffer PBS-1% v/v DMSO. **B)** Porcentaje de oxidación del biosensor recombinante ($5 \mu\text{M}$) en su forma oxidada (ox) y reducida (red) luego de incubación durante 1 h con $50 \mu\text{M}$ de compuestos disueltos en PBS-1% v/v DMSO.

Complementario al análisis SAR, se realizaron estudios de correlación entre el % de oxidación del biosensor y la CE_{50} (Figura 30) o el IS (Figura 31) para las series de compuestos más pobladas (serie I y II) e incluyendo al EbS y compuesto 1 como

referencias. Para los compuestos de la serie I se observa una buena correlación positiva CE_{50} vs. % oxidación de biosensor (es decir, a mayor potencia mayor oxidación), siendo la excepción a la regla el compuesto 9, el cual si bien es el segundo más oxidante (65% oxidación) también es el hit menos activo de la serie ($CE_{50} = 4,3 \mu M$). Para la serie II, la correlación no es tan clara dado que los compuestos 12 y 14 se desvían del comportamiento lineal de los restantes hits (11, 13 y 10). Por ejemplo, el compuesto 14 ($CE_{50} = 0,022 \mu M$), el más activo de todas las series produce una oxidación del biosensor (37%) inferior a la de hits menos activos (11-13, $CE_{50} = 0,091-0,021 \mu M$ y % oxidación >40%). Este análisis también permite afirmar que a diferencia de los compuestos de la serie I, la potencia de los hits de la serie II está dissociada de su actividad oxidante, dado que todos ellos, excepto por el 11, inducen un nivel similar de oxidación (32-47%).

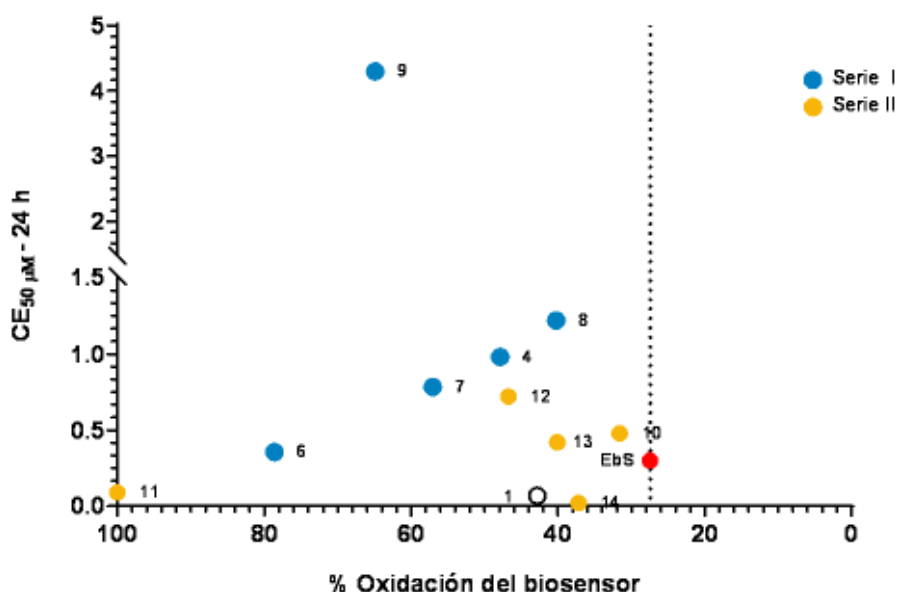


Figura 30. Análisis de correlación de la potencia vs capacidad oxidante de los hits de las series I y II.

Gráfico de correlación de CE_{50} vs % de oxidación del biosensor ($R^2:0.017$), donde la línea punteada vertical indica el valor de oxidación del EbS.

Una característica común de los compuestos de la serie I que mostraron buena correlación entre su CE_{50} y actividad oxidante es que todos ellos contienen sustituyentes en la posición para del fenilo y carecen de modificaciones adicionales en el grupo benzisotiazolona (Figura 27). Llamativamente, este mismo comportamiento no aplica para los hits de la serie II, ya que solo uno de los tres compuestos que mostraron cierta

correlación entre CE_{50} y actividad oxidante estaba modificado en posición para del bencilo (compuesto 13), al igual que los dos hits que se desviaban de esta regla (compuestos 12 y 14).

Respecto al análisis de IS vs. % oxidación del biosensor (Figura 31), solo para los hits de la serie I se observa cierta, aunque baja, correlación positiva ya que para 3 (compuestos 4, 6 y 8) de 5 compuestos la selectividad aumenta (IS de 100 a > 300) con su capacidad oxidante (oxidación de 40% a 78%). Los compuestos 7 y 9 se desvían de esta tendencia, presentando los menores IS de esta serie (IS de 50 a >47) y niveles intermedios de capacidad oxidante (57-65%). Los hits 4, 6 y 8 se caracterizan por contener sustituyentes voluminosos y apolares en posición para del fenilo. Los hits de la serie II muestran un comportamiento más aleatorio para esta correlación, aunque claramente diferenciado de los de la serie I, ya que los compuestos con mayor selectividad fueron los menos oxidantes (10, 12-14). En congruencia con esto, el compuesto de menor selectividad de esta serie fue el que indujo un mayor nivel de oxidación (11). El comportamiento dispar de este compuesto podría explicarse porque el mismo se diferencia marcadamente del resto de los miembros de esta serie al poseer una cloración y metilación en el andamio benzisotiazolona y como sustituyente en N^2 un bencilo sin modificar (Figura 27).

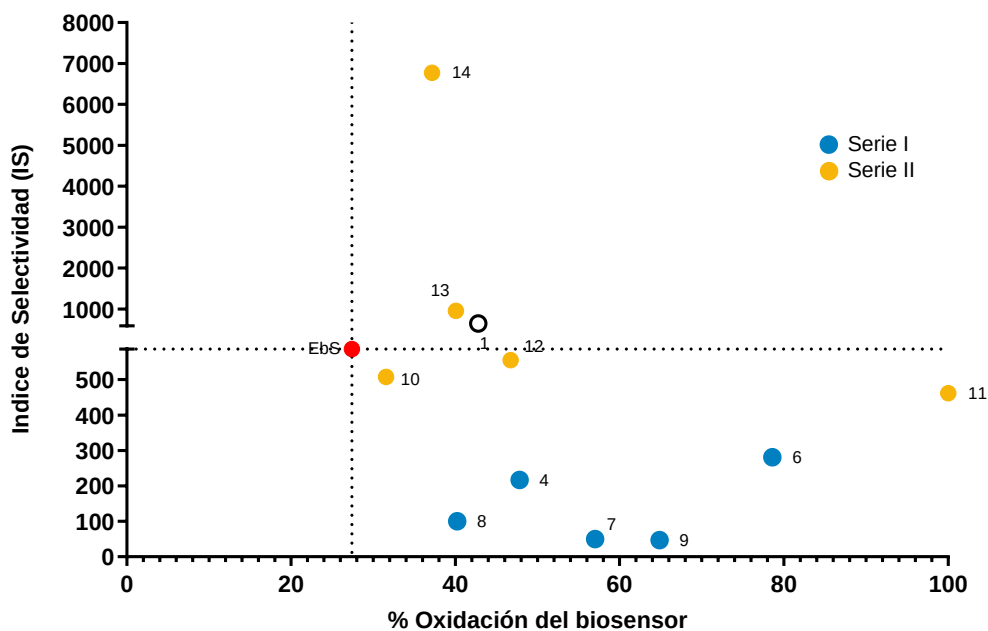


Figura 31. Análisis de correlación de selectividad vs capacidad oxidante de los hits de las series I y II.

Gráfico de correlación del índice de selectividad vs % de oxidación del biosensor, donde las líneas punteadas refieren a los valores correspondientes al EbS.

4.4.2 Relaciones cuantitativas de estructura-actividad en tres dimensiones (3D-QSAR) para los hits de *T. b. brucei*

Complementando el análisis de SAR, para los 15 hits de *T. b. brucei* (1, 3, 4, 6-14, 16, 19 y 21) se realizó un estudio de 3D-QSAR con el fin de correlacionar las actividades biológicas con el campo estérico y electrostático de los mismos (Figura 32). El modelo se construyó utilizando el método CoMFA y se verificó mediante la validación cruzada dejando uno fuera (Leave One Out Cross Validation).

Las regiones verdes muestran las posiciones donde sustituciones de volumen compacto sobre los anillos fenilo y bencilo correlacionan con aumento de actividad biológica (Figura 32A), como es el caso de los compuestos halogenados (serie I: 6, 8, 9, serie II: 11, 12 y 14) o el metoxilado (serie II: 13). Estas regiones abarcan las posiciones para y meta de los anillos aromáticos ocupando la posición N² de la benzisotiazolona. Por el contrario, las regiones amarillas muestran las posiciones donde la pérdida de volumen se correlaciona con una disminución de la actividad biológica (Figura 32A), como ser las aportadas por el grupo éster etílico (19) o el acetato (21) de los hits de la serie IV. Incluso dejando de lado el aporte de los sustituyentes en los anillos aromáticos, esta tendencia es consistente con el mayor volumen de estos últimos (ej. fenilo: ~124 Å³ y bencilo: ~150 Å³) por sobre los grupos acetato (~92 Å³) y éster etílico (~115 Å³).

En relación a la influencia de las propiedades electrostáticas de los hits, se observa una dispersión en la distribución de las cargas debido a la presencia de heteroátomos (O, N, F < S) tanto en el núcleo benzisotiazolona como en los sustituyentes. Las superficies mostradas en la Figura 32 muestran las regiones donde los grupos cargados negativamente (rojo) y los grupos cargados positivamente (azul), son favorables para la actividad biológica contra el patógeno.

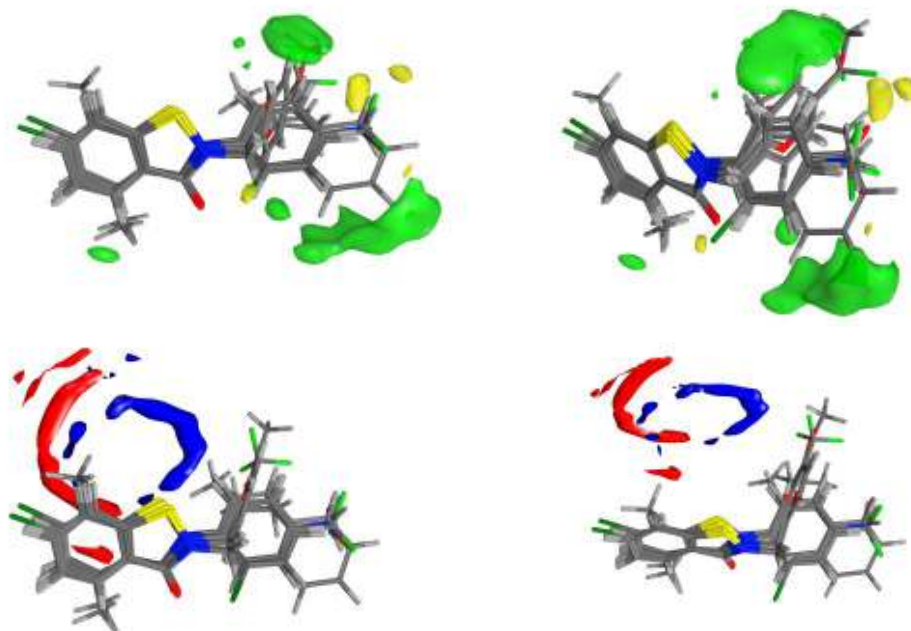


Figura 32. Mapas derivados del análisis 3D-QSAR para los hits contra *T. b. brucei*.
A) Mapas de contorno estérico. Los colores verde y amarillo indican regiones con sustituyentes que por su mayor o menor volumen son favorables o desfavorables, respectivamente, para la actividad biológica contra la forma sanguínea de *T. b. brucei*. **B)** Mapas de contorno electrostáticos. Los colores azul y rojo indican las regiones donde los sustituyentes con cargas positivas y los con carga negativa, respectivamente, son favorables para la actividad biológica.

La relación entre los pCE₅₀ predichos y los experimentales muestra una buena regresión lineal entre ambos (Figura 33). La validación del modelo arrojó un valor de $q^2 = 0,6216$ lo cual indica una buena capacidad predictiva del mismo (Consonni et al., 2009).

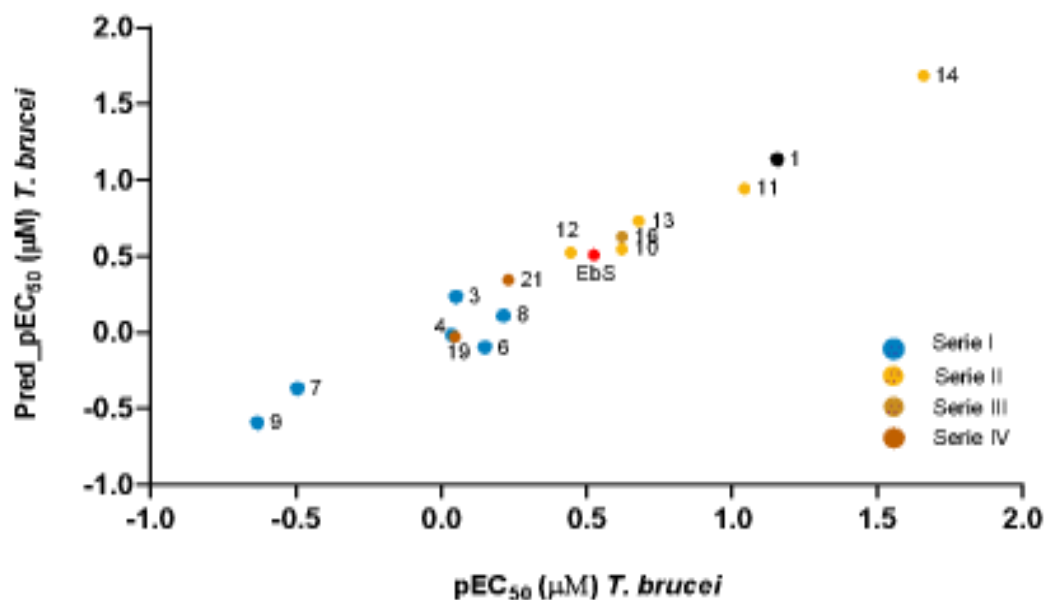


Figura 33. Gráfico de los valores de pEC₅₀ predichos vs. pEC₅₀ experimentales obtenidos mediante CoMFA.

El coeficiente de correlación lineal es de R²: 0,9679 y el Error Cuadrático Medio (RMSE) de 0,1011.

4.4.3 Análisis de Densidad Electrónica para el Cálculo de Reactividad Molecular

La densidad electrónica es una propiedad importante de los compuestos químicos que proporciona información sobre la distribución de electrones en una molécula, la cual generalmente tiene influencia en su reactividad y, por lo tanto, en su actividad biológica. Una estimación teórica de esta propiedad se obtiene a través del cálculo de la brecha HOMO-LUMO (Highest Occupied Molecular Orbital - Lowest Unoccupied Molecular Orbital). Generalmente, valores bajos de este parámetro están asociados a una mayor reactividad de la molécula, ya que los electrones pueden ser promovidos más fácilmente del estado HOMO al LUMO. Los valores de HOMO-LUMO estimados para los hits de *T. b. brucei* no varían significativamente y se ubican en un rango estrecho que va de 0,27507 a 0,28679 (Tabla S3). No obstante, este análisis destaca al átomo de S del anillo de benzotiazolona como un posible centro reactivo electrofílico común a estas moléculas.

Al comparar los valores de HOMO-LUMO y la CE₅₀ contra *T. b. brucei* y *T. cruzi* para los hits en estudio no se observa una correlación con diferencias significativas. Sin embargo, si los compuestos son separados arbitrariamente en dos grupos equitativos (n=6) con brechas de HOMO-LUMO altas (0,28679-0,28445) y bajas (0,28411-0,27507) se

observa una tendencia correlativa positiva con los valores promedio de CE_{50} . Por ejemplo, la CE_{50} promedio contra *T. brucei* para los compuestos con HOMO-LUMO altos (CE_{50} promedio = $2,21 \pm 3,87 \mu M$) es 3 veces superior a la de los hits con brechas HOMO-LUMO más bajas (CE_{50} promedio = $0,76 \pm 0,45 \mu M$). Para *T. cruzi* esta tendencia es menos marcada (CE_{50} promedio = $9,07 \pm 2,28 \mu M$ y de $7,85 \pm 2,87 \mu M$ para HOMO-LUMO altas y bajas, respectivamente). Estos resultados sugieren que la reactividad química de estos compuestos no es el factor determinante de su actividad biológica, la cual estaría también influenciada por una combinación de otras propiedades fisicoquímicas (hidrofobicidad), factores estructurales (efecto estérico) y dinámicos que deberían ser investigados más a fondo para comprender el mecanismo de acción y guiar la optimización de estos hits.

4.4.4 Actividad biológica y redox de benzisotiazolonas contra forma promastigota de *L. infantum*

Por un lado, la mayoría de las benzisotiazolonas careció de actividad contra la forma intracelular de *L. infantum* (Tabla 3). Por otro lado, también la mayoría de los compuestos activos contra la forma sanguínea de *T. b. brucei* (Figura 28) indujeron una marcada oxidación en el contenido citosólico de tioles de bajo peso molecular de este patógeno. Con la finalidad de corroborar si este comportamiento de los compuestos es especie y estadio específico, para una selección de ellos se evaluó de manera simultánea su actividad biológica y redox contra la forma promastigote de *L. infantum* (Figura 34). El ensayo consistió en exponer los parásitos a los compuestos (4, 10-14 y EbS) a una concentración de $10 \mu M$ durante 24 h, y medir la viabilidad celular y oxidación del biosensor.

La evaluación de la viabilidad (Figura 34A) mostró que los compuestos 4, 11, y 14 redujeron la supervivencia de los promastigotes a valores cercanos al 0%, mientras que el compuesto 12 lo hizo en menor medida (23% de viabilidad, respectivamente). Por el contrario, la viabilidad celular estuvo por encima del 85% para el compuesto 13, EbS y los diferentes controles ensayados a 24 h (sin tratamiento, 1% v/v DMSO, $0,12 \mu M$ anfotericina B) o durante 15 min (diamida $250 \mu M$).

Excepto por EbS y el vehículo, el resto de los compuestos evaluados indujeron una oxidación del biosensor que fue de 61 a 91%. Los compuestos 4, 10, 11 y 14 produjeron un nivel de oxidación similar al inducido por el tratamiento corto con una concentración 25

veces superior de diamida (Figura 34B). El nivel de oxidación producido por el compuesto 13 fue inferior (76,3% oxidación) y similar al inducido por Anfotericina B (73,2% oxidación).

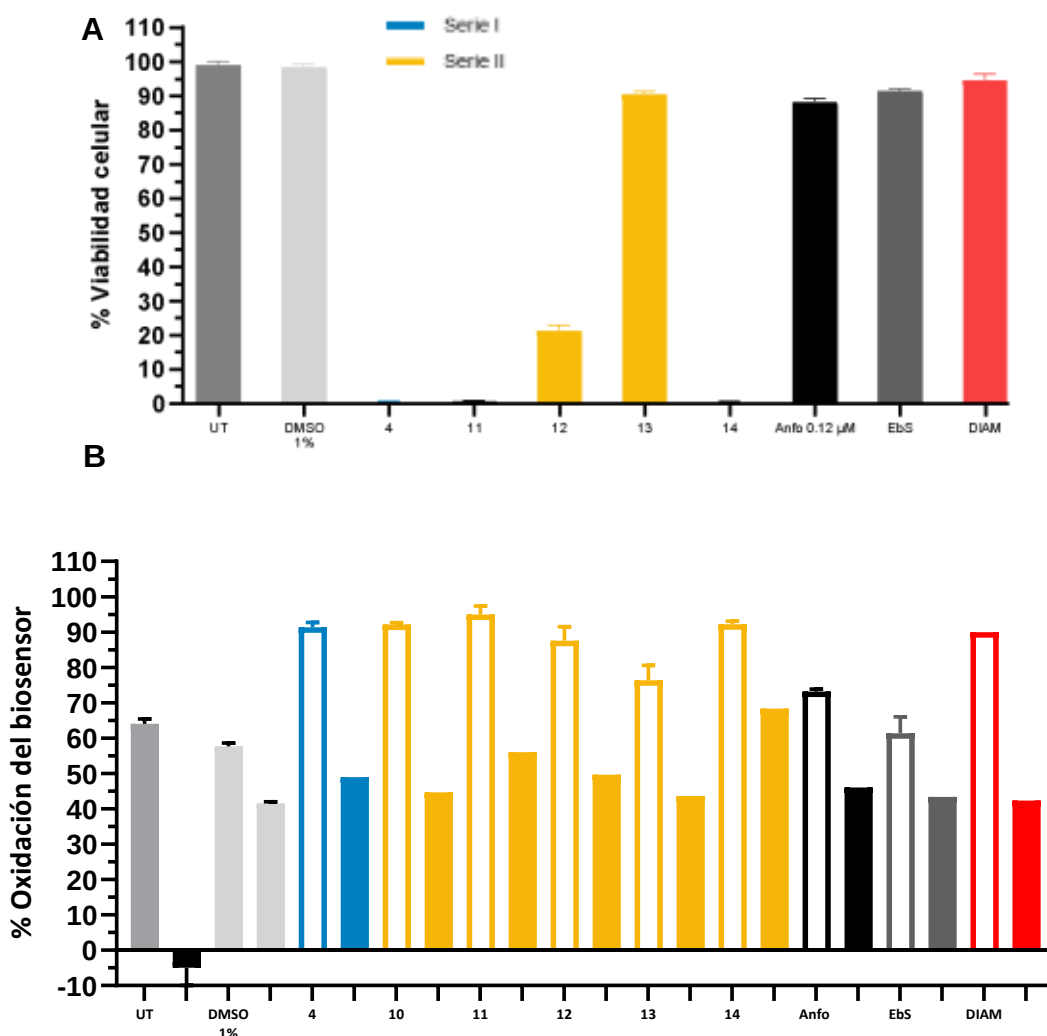


Figura 34. Actividad biológica y redox contra forma promastigote de *L. infantum* de derivados de benzisotiazolonas.

Los parásitos fueron incubados con las benzisotiazolonas (10 μ M durante 24 h) más activas contra la forma sanguínea de *L. infantum* (4, 10-14 y EbS) y diferentes controles (sin tratamiento, 0,12 μ M Anfotericina B, 1% v/v DMSO durante 24 h o 250 μ M diamida: DIAM por 15 min). A partir del análisis por citometría de flujo de la intensidad de fluorescencia de PI y de roGFP2 se grafica el A) % de viabilidad celular y B) % de oxidación del biosensor, las barras vacías son tratamientos sin DTT.

El primer dato revelador de este estudio es que, a diferencia de los resultados obtenidos contra la forma intracelular de este parásito, 4 de las 6 benzisotiazolonas ensayadas bajo condiciones similares (10 μ M y 24 h de exposición) presentaron una

marcada actividad citotóxica contra promastigotes de *L. infantum*. El segundo dato revelador fue que esta actividad estuvo asociada a la acumulación de tioles de bajo peso molecular oxidados, ya que el tratamiento con DTT revirtió la oxidación intracelular del biosensor. Incluso el compuesto con menor actividad biológica, 13, produjo una marcada oxidación del biosensor. A las concentraciones ensayadas, EbS y anfotericina B no afectaron de manera significativa la viabilidad de la forma no infectiva de *L. infantum*. No obstante, el fármaco control, pero no EbS alteró el estado redox de los tioles de bajo peso molecular. Estos resultados permiten inferir que, bajo estas condiciones de ensayo, para que el desbalance redox en el pool de tioles de bajo peso molecular se traduzca en un efecto citotóxico considerable, el nivel de oxidación del biosensor debe ser superior al 80% (compuestos 4, 10-12 y 14).

En la sección 4.3.4. Susceptibilidad especie-específica a benzisotiazolonas se planteó que diferencias en la tasa metabólica y/o proliferativa de las distintas especies/estadio de los tripanosomátidos estudiados podría explicar su susceptibilidad diferencial a las benzisotiazolonas. Los resultados obtenidos contra la forma promastigote, refuerzan esa hipótesis ya que los promastigotes de *L. infantum* (más susceptibles a las benzisotiazolonas) presentan una tasa de duplicación (~12 h) superior a la de amastigotes (>24 h). Además, la mayor vulnerabilidad de los promastigotes a las perturbaciones oxidativas se atribuye a su elevada tasa respiratoria mitocondrial y al consecuente flujo basal de especies reactivas de oxígeno (ROS) endógenas. Este flujo basal facilita la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) y desencadena una muerte celular similar a la inducida por ROS cuando se exponen a compuestos pro-oxidantes (Fonseca-Silva et al., 2011).

Adicionalmente, el hierro y las especies reactivas de oxígeno (ROS) actúan como señales clave en la diferenciación de *Leishmania*, regulando la transición de promastigotes a amastigotes. El hierro desempeña un papel esencial al activar la férrica reductasa (LFR1) y el transportador de hierro ferroso (LIT1), lo que incrementa la concentración intracelular de hierro. Este aumento activa la superóxido dismutasa dependiente de hierro (FeSOD), que convierte el superóxido ($O_2^{\bullet-}$) en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El H_2O_2 , como molécula difusible, actúa como señal para iniciar la diferenciación, incluso bajo condiciones

de estrés oxidativo subletal, destacando su importancia en el destino celular de los parásitos (Mittra et al., 2013).

4.5 Consumo de Glucosa

Reportes previos han demostrado que el EbSe interfiere con el consumo de glucosa en *T. b. brucei* producto de la inhibición de la hexoquinasa del parásito (Joice et al., 2013; Sharlow et al., 2010). La hexoquinasa es la primera enzima de la ruta glucolítica que cataliza la fosforilación de la glucosa incorporada del medio extracelular, impidiendo de esta forma su salida del interior celular y facilitando su posterior metabolización. La obtención de energía por la forma sanguínea de *T. b. brucei* es extremadamente dependiente del catabolismo glicolítico, por lo que la inhibición de componentes de este metabolismo es letal para el parásito (Gualdrón-López et al., 2013). En base en esta evidencia, se planteó la hipótesis que la citotoxicidad de los análogos de EbS sobre *T. brucei* podría deberse a una inhibición de esta enzima y metabolismo.

Para evaluar esta posibilidad, se midió la tasa de incorporación de glucosa en parásitos *T. b. brucei* en estadio sanguíneo, que fueron expuestos durante 4 horas con los compuestos más selectivos (1, 10–14, 16, 21 y EbS) a una concentración equivalente a $2 \times \text{CE}_{50}$. Como controles experimentales se incluyeron parásitos incubados con DMSO al 1% (v/v) (control de vehículo), y con EbSe a $7 \mu\text{M}$ ($2 \times \text{CE}_{50}$, control de inhibición). Bajo estas condiciones experimentales, y en comparación con parásitos tratados con vehículo, la mayoría de las benzisotiazolonas no modificó de manera significativa la tasa de consumo de glucosa. Solo para los compuestos 12 y 16 se observó una leve reducción de este parámetro (~10%), mientras que, tal como se esperaba, el EbSe disminuyó el consumo de glucosa en aproximadamente un 45% (Tabla S2). Estos resultados por lo tanto indican que tanto la hexoquinasa como el metabolismo glicolítico de la forma sanguínea de *T. b. brucei* no serían los principales blancos moleculares del modo de acción de las benzisotiazolonas.

4.6 Evaluación de la actividad y el mecanismo de acción contra TryS y TR de las benzisotiazolonas.

4.6.1 Actividad contra TryS

Evalutados a una concentración de 125 μM , la mayoría de los compuestos no inhibió de manera significativa la actividad de TbTryS (actividad enzimática remanente >80%; Tabla 4). Las excepciones fueron los compuestos 1, 4 y 19, que a dicha concentración mostraron valores de CI_{50} de 87, 64 y 48 μM , respectivamente. En comparación, EbSe (CI_{50} = 5 μM) y EbS (CI_{50} = 4 μM) mostraron una potencia inhibitoria sobre TbTryS al menos 9,6 veces superior a la de estos 3 compuestos (CI_{50} ~48,3 $\pm$ 5,2 μM). Estos resultados indican que solo un grupo discreto de modificaciones de las benzisotiazolonas son toleradas para la retención de actividad anti-TbTryS. Las siguientes relaciones estructura-actividad se pudieron establecer para los compuestos activos contra esta enzima: i) grupo fenilo no sustituido en posición N^2 (EbS y EbSe) es favorable para la actividad, y ii) en menor medida y en el siguiente orden también resultaron favorables las siguientes modificaciones en N^2 : etil-acetato (19) > bencilo (4) > H (1). Por otro lado, resultó evidente que las modificaciones del anillo benzisotiazolona (ej. posiciones R_{1-3}) son desfavorables para la actividad inhibitoria (2, 3, 5 y 11 = 100% actividad TbTryS). De la misma manera lo fue la inclusión en N^2 de grupos voluminosos con heteroátomos (16, 17, 22 y 23 = 100% actividad TbTryS). Restringiendo el análisis a la serie I, resultó llamativo que solo el fenilo no modificado (EbS) o metilado en posición para (4) dieron lugar compuestos activos, mientras que la nitración (7) o halogenación (6, 8) en esta misma posición o en meta (9) resultó contraproducente para la actividad inhibitoria (actividad TbTryS >82%). Otro caso interesante fue el de la serie IV, donde la modificación en N^2 con un grupo acetato (21) o un bis-etilacetato (20) fue detrimental para la actividad inhibitoria (100% actividad TbTryS) en comparación con la inclusión de un mono-etilacetato (19; CI_{50} 48 μM). Esto indica que probablemente existen restricciones estéricas y electrostáticas en el sitio de unión de las benzisotiazolonas a esta enzima.

Contra LiTryS, los compuestos fueron cribados a una concentración de 42 μM , la cual es menor a la ensayada contra TbTryS debido a que la enzima de leishmania es más sensible a la inhibición que la de tripanosoma africano (Benítez et al., 2016; Benítez, Franco, et al., 2022a; Medeiros et al., 2020). Bajo estas condiciones, la benzisotiazolona con mayor actividad inhibitoria sobre LiTryS resultó ser el EbS (CI_{50} = 9 μM), mientras que

el resto de los compuestos se pueden agrupar en el siguiente orden decreciente de actividad: 8 (actividad destacada: >60% de inhibición), 1, 4, 6, 10, 12 y 13 (actividad inhibitoria moderada: 30-50% inhibición) > 7 (actividad inhibitoria baja: 30% inhibición) > 2, 3, 5, 9,11, 14-23 (actividad nula a despreciable: <20% inhibición). A comparación del resto de las benzisotiazolonas, la potencia inhibitoria del EbS supera por un factor de al menos 4 a la del resto de los análogos. Ningún compuesto de las series III-V inhibió a LiTryS, mientras que varios de las series I y II lo hicieron con potencia destacada o moderada. Dos de los hits de LiTryS pertenecientes a la serie I (EbS y 4) también inhibieron a la TbTryS, mientras que el único hit de LiTryS correspondiente a la serie II (10) no tuvo una inhibición recíproca de la TbTryS. Otra diferencia respecto al comportamiento observado para las benzisotiazolonas contra TbTryS, es que los análogos con fenilos sustituidos con halógenos en posición para (6 y 8) retuvieron una actividad inhibitoria de LiTryS similar a la del análogo metilado en dicha posición. Sin embargo, de manera similar a lo observado contra TbTryS, las modificaciones realizadas a la molécula del EbS impactaron negativamente en la actividad contra LiTryS ya que todos los análogos de la serie I resultaron menos activos que el EbS. Por otro lado, llamó la atención que el hit de TbTryS con la función etilacetato en N² (19) careció por completo de actividad contra LiTryS al ser ensayado a una concentración similar (42 μ M) a su Cl₅₀ contra la enzima de tripanosoma (48 μ M). Confirmando reportes anteriores con compuestos no relacionados a los aquí estudiados (Benítez et al., 2016; Benítez, Franco, et al., 2022a; Medeiros et al., 2020), las benzisotiazolonas que resultaron hits de LiTryS presentaron una mediana de Cl₅₀ menor (9-42 μ M y Cl₅₀ promedio = 35 μ M, para EbS, 8, 4, 6, 10) a la de los hits de TbTryS (mediana = 5-87 μ M y Cl₅₀ promedio = 51 μ M, para EbS, 1, 4, 19). La mayor sensibilidad de LiTryS a la acción de varios análogos del EbS sugiere que el sitio de unión de la enzima a estos compuestos presenta una dinámica molecular que favorece conformaciones más accesibles al solvente. Estos resultados motivaron el estudio del modo de inhibición y unión de algunos de estos análogos a las TryS (Sección Docking Molecular) con la finalidad de tener una base mecanísticos y estructural para la interpretación de los resultados bioquímicos y generar un marco racional para el futuro diseño de nuevos análogos.

Tabla 4. Actividad de las benzisotiazolonas sobre la Tripanotona Sintetasa de *T. b. brucei* (TbTryS) y *L. infantum* (LiTrys).

Series	Compuestos	T. b. brucei TryS	L. infantum TryS
		% Actividad a 125 μM^a o CI_{50} (μM) ^b	% Actividad a 42 μM^a o CI_{50} (μM) ^b
I	1	87,5 $\pm$ 0,2^b	62 ,0 $\pm$ 6,0^b
	2	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 4,0
	3	100,0 $\pm$ 0,0	95,0 $\pm$ 7,0
	4	64,1 $\pm$ 0,4^b	$\sim$ 50,0 $\pm$ 0,0 ^a
	5	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
	6	98,0 $\pm$ 2,0	$\sim$ 57,0 $\pm$ 0,0 ^a
	7	89,0 $\pm$ 2,0	$\sim$ 72,0 $\pm$ 0,0 ^a
	8	100,0 $\pm$ 0,0	37,0 $\pm$ 0,2^b
	9	82,0 $\pm$ 1,0	100,0 $\pm$ 0,0
II	10	84,0 $\pm$ 7,0	$\sim$ 57,0 $\pm$ 0,0 ^a
	11	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
	12	82,0 $\pm$ 4,0	$\sim$ 62,0 $\pm$ 0,0 ^a
	13	92,0 $\pm$ 7,0	$\sim$ 62,0 $\pm$ 0,0 ^a
	14	100,0 $\pm$ 0,0	97,0 $\pm$ 6,0
	15	84,0 $\pm$ 1,0	100,0 $\pm$ 0,0
III	16	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0
	17	100,0 $\pm$ 0,0	91,0 $\pm$ 8,0
IV	19	48,3 $\pm$ 5,2^b	100,0 $\pm$ 0,0
	20	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0

	21	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
V	22	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	23	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
	EbS	3,8 ± 0,6^b	8,7 ± 2,6^b
	AUC ^a	9,0 ± 4,0	ND

^a Actividad enzimática determinada a concentraciones fijas de benzisotiazolonas (125 µM) o control inhibitorio AUC (8 µM) para *T. b. brucei* y (42 µM) para *L. infantum*

^b Los valores en negrita se refieren a la CI₅₀.

4.6.2 Estudio del mecanismo de inhibición del EbSe y EbS sobre la TryS

En un estudio previo (Benítez, Franco, et al., 2022b) el EbSe fue identificado como un inhibidor lento e irreversible de la TbTryS. Mediante análisis de espectrometría de masas, se pudo determinar que el EbSe se une covalentemente a al menos dos cisteínas del dominio amidasa (Cys51 y Cys57) y una del dominio sintetasa de esta proteína (Cys270). Mientras las primeras están ubicadas en el sitio catalítico del dominio amidasa, la Cys270 se encuentra en una región de interfase entre los dominios amidasa y sintetasa, aunque alejada del sitio catalítico de este último. Esto plantea el interrogante sobre las bases moleculares del efecto alostérico que esta modificación tendría sobre la actividad sintetasa. Por este motivo y ante la identificación del EbS como el representante de las benzisotiazolonas con mayor capacidad inhibitoria de la TbTryS y LiTryS, en el marco de esta tesis se realizaron los siguientes estudios complementarios que se presentarán y discutirán a continuación: i) análisis de espectrometría de masas de TbTryS tratada con EbS, ii) ensayos de inhibición sobre mutante de Cys270 en TbTryS, y iii) análisis estructural asistido por computadora del complejo EbSe-TbTryS.

En la muestra tratada con EbS se observó una modificación de +227,040 Da, compatible con la masa del EbS, en la Cys51 del dominio amidasa. Como se mencionará arriba, este residuo había sido detectado como blanco de modificación covalente por parte de EbSe. A pesar que los péptidos detectados para esta muestra cubrían un 50 al 60% de la secuencia de la proteína, no se lograron identificar péptidos y residuos adicionales al anterior que presentaron un incremento de masa compatible con la incorporación de EbS. La diferencia en el número y posición del residuo modificado por EbS en TbTryS respecto de lo observado para EbSe podría deberse a artefactos técnicos como una alta labilidad del enlace S-S formado entre el compuesto y el residuo de cisteína proteico. Estos disulfuros mixtos podrían reducirse por las altas energías aplicadas durante el proceso de ionización de los péptidos.

A diferencia del residuo Cys270, la modificación covalente de los residuos del sitio catalítico del dominio amidasa no tendría impacto en la actividad de síntesis del $T(SH)_2$. Por ello, y extrapolando al EbS los resultados de espectrometría de masas obtenidos para el complejo TbTryS-EbSe, se decidió estudiar el rol de este residuo en la actividad de la enzima y en la interacción con el EbSe/EbS. Con esa finalidad es que se generó y caracterizó un mutante de TbTryS donde la Cys270 fue sustituida por una alanina. Como reemplazo de la cisteína se eligió un residuo de alanina y no de serina para mantener cierto carácter apolar de la cadena lateral ya que de acuerdo a la estructura cristalina de la TryS de *L. major* (Fyfe et al., 2008), este residuo se haya inserto en un ambiente hidrofóbico. El otro motivo de esta elección es que el grupo metilo, a diferencia del SH, no sería capaz de formar un enlace covalente con el EbS/EbSe. Se logró expresar la forma recombinante y soluble de este mutante (TbTryS Cys270Ala). Esto indica que esta mutación puntual no alteró el plegamiento y actividad catalítica de la enzima. Los ensayos de actividad TryS en presencia de EbS y EbSe, mostraron que este se volvió al menos 2 veces más refractario a la inhibición por estos compuestos (Figura 35). Por ejemplo, a comparación de la TbTryS salvaje, el CI_{50} para EbS y EbSe de TbTryS Cys270Ala se incrementó de 7 a 15 μM y de 10 a 20 μM , respectivamente. Además, las diferencias en resistencia a la inhibición, al menos para el EbSe, es más marcada a concentraciones bajas del compuesto (Figura 33B). En ese rango de concentraciones (debajo de la CI_{50}) se espera una modificación selectiva de los residuos diana. Un aumento de la misma magnitud se observó para el CI_{50} del compuesto usado como control de inhibición, el ácido aurin-tricarboxílico (AUC; = 20 μM vs. >44 μM). Si bien estos resultados demuestran un rol importante de la Cys270 como punto de interacción con EbS y EbSe, el comportamiento observado para AUC sugiere que esta mutación puede haber perturbado algún otro bolsillo de interacción con inhibidores. Si bien el mecanismo de inhibición de TryS por AUC es desconocido, este compuesto polianiónico aromático es reconocido por inhibir ATPases de manera competitiva con ATP (desplazan a este sustrato del sitio activo). Asumiendo un modo de inhibición similar contra TryS, entonces se podría inferir que la mutación Cys270Ala puede haber alterado la accesibilidad al sitio de unión a ATP. En línea con este razonamiento y como se discutirá más adelante, los modelos estructurales del complejo covalente EbS-TryS indican una perturbación del sitio de unión a ATP.

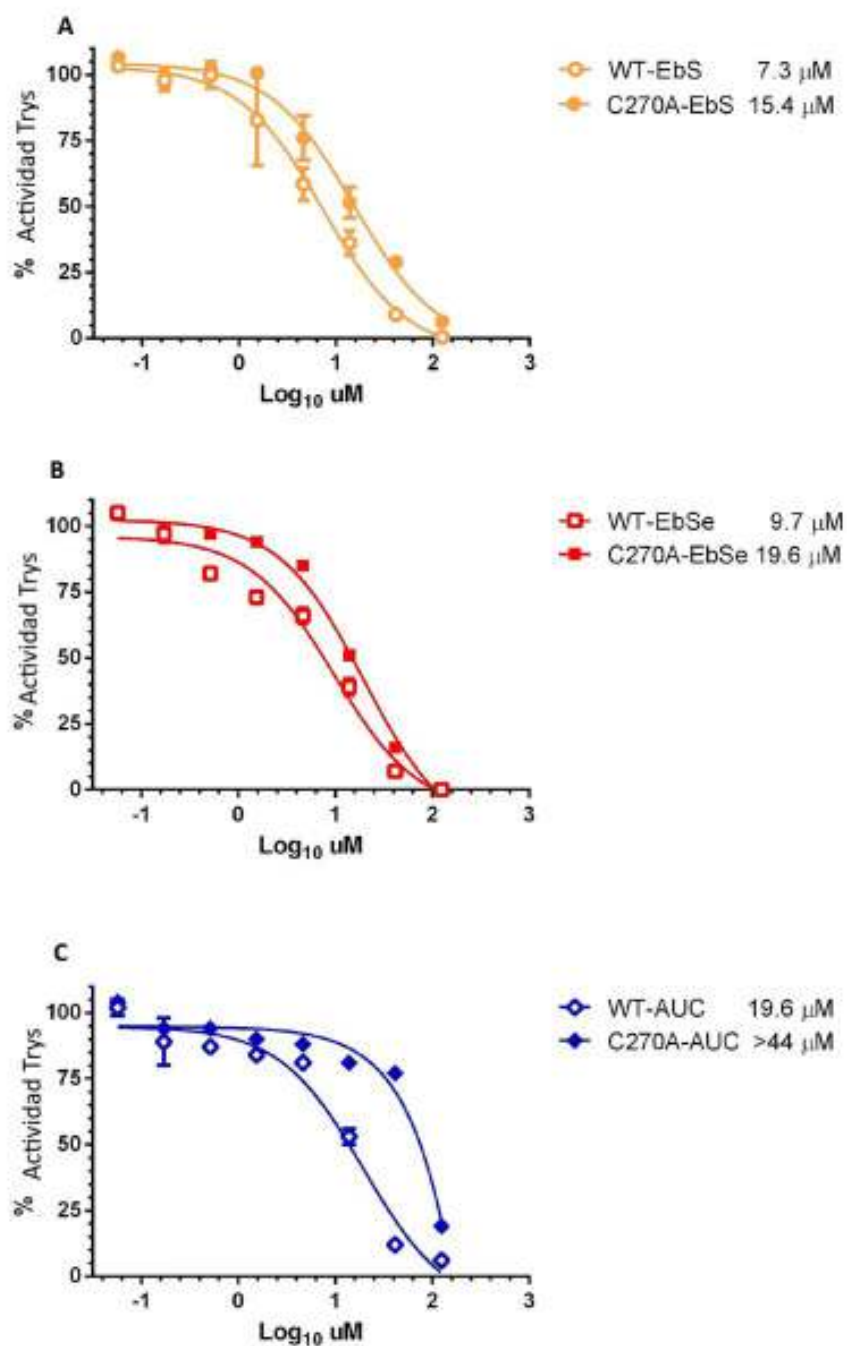


Figura 35. Inhibición de TbTryS silvestre (WT) y mutante en Cys270 (C270A) por EbS, EbSe y AUC.

Se determinó la actividad residual de la enzima tras la incubación con concentraciones crecientes de los compuestos: **A)** EbS, **B)** EbSe y **C)** AUC.

4.6.3 Construcción y validación de modelo estructural de la TryS

Si bien los resultados de los ensayos enzimáticos y de espectrometría de masa indican que el EbS y su análogo con Se (EbSe) se unen covalentemente a cisteínas de la TryS, las bases moleculares sobre cómo esta interacción con un residuo alejado del sitio activo repercute negativamente en la actividad sintetasa aún se desconocen. Con el fin de aportar al entendimiento de esta incógnita, se generaron y validaron modelos 3D de la TbTryS que luego fueron empleados para estudios de anclaje y dinámica molecular con el EbSe como compuesto modelo.

En primer lugar, se realizó un análisis comparativo de las secuencias de TryS de las siguientes especies de tripanosomátidos: *T. b. brucei*, *T. cruzi* y *L. major*. La longitud promedio de las secuencias analizadas es de 635 aminoácidos, con un grado de identidad promedio de pares de 69,8% y una similitud de 80,6%, de acuerdo al análisis con la matriz BLOSUM62. Esto indica un alto grado de conservación de secuencia y permite prever un buen nivel de homología estructural entre las TryS, ya que estos valores son superiores a 30%, el cual es el punto de corte aceptado para considerar homólogas a dos proteínas (Raghava & Barton, 2006). El peso molecular medio de las TryS es de 72.460 kDa y un punto isoeléctrico promedio de 5,57, con una carga neta de -64,85 a pH 7. La distribución de aminoácidos muestra una composición diversa, siendo los residuos leucina (7,8%) y glutamato (7,6%) los más frecuentes. Aproximadamente el 29% de los aminoácidos son cargados, con un equilibrio entre los residuos ácidos (14,3%) y básicos (14,7%). Además, un 48,8% de los aminoácidos son hidrofóbicos, lo que sugiere una abundancia relativa de regiones hidrofóbicas en estas proteínas.

Para la construcción de los modelos tridimensionales de TbTryS, se emplearon tres métodos de threading (Phyre2, I-TASSER y Robetta) y, como molde, la estructura cristalográfica de la LiTryS depositada en el Protein Data Bank (PDB: 2VPM). A la fecha, LiTryS ha sido la única TryS para la cual se logró resolver su estructura 3D de manera experimental (Fyfe et al., 2008). Los resultados globales de los modelos y la calidad de los mismos son mostrados en la Tabla 8. Se utilizó el servidor Protein Structure Analysis

ProSAWeb (<https://prosa.services.came.sbg.ac.at/prosa.php>), una herramienta que evalúa la calidad de modelos de estructuras proteicas tridimensionales generadas computacionalmente (Sippl, 1993; Wiederstein & Sippl, 2007) ProSA compara el modelo generado con estructuras de proteínas conocidas y de alta calidad, utilizando el Z-score como parámetro indicativo de la energía total de la estructura modelada respecto a la de proteínas nativas de tamaño similar. Un valor de Z-score dentro del rango de proteínas nativas sugiere que el modelo computacional es confiable (Figura 36). Por otro lado, el análisis de la desviación cuadrática media de la estructura (RMSD, por sus siglas en inglés) para cada residuo no solo permite verificar la calidad del modelo sino también identificar zonas de la proteína que presentaron dificultades durante el proceso de modelado.

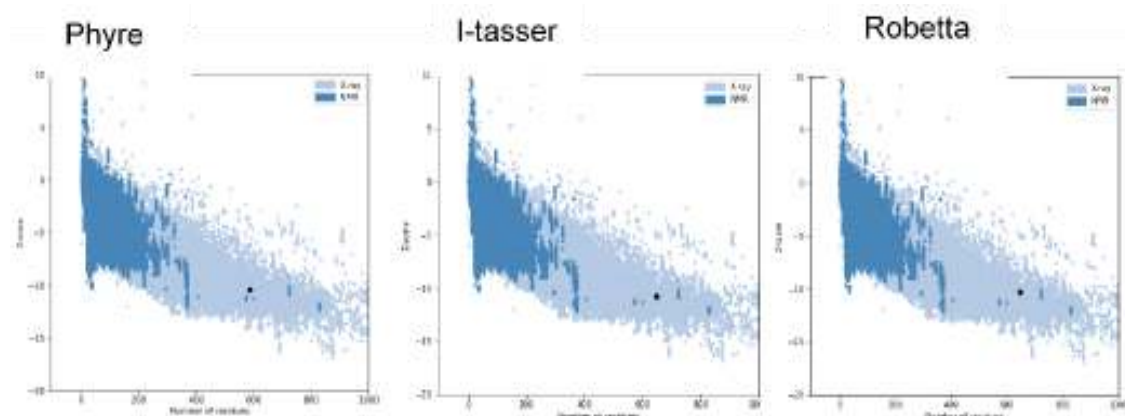


Figura 36. Evaluación ProSA de los modelos de las proteínas TryS.

Para cada servidor (Phyre2, I-TASSER y Robetta) se muestra el Z-score obtenido por ProSA-web para el modelo predicho (punto negro). El fondo azul corresponde a los valores de Z-score reportados por ProSA-web para estructuras experimentales depositadas en el PDB, diferenciadas según su método de determinación (X-ray y NMR). Las nubes de puntos representan la distribución típica de Z-scores para proteínas de tamaños similares, lo que permite evaluar si los modelos predichos se encuentran dentro del rango esperado para estructuras experimentales.

El modelo construido por I-TASSER presentó una cobertura del 100%, un puntaje Z de -10.00, ubicado dentro del rango (-15 a 10 ver Figura 36) de la calidad comparable con modelos cristalográficos de la misma longitud de secuencia, y el RMSD más bajo respecto a la estructura cristalográfica de la TryS de L. major (PDB: 2VPM) mostrado en la Figura 37 A, 37D y Tabla 5 (Donde se muestra la comparación estructural de los modelos generados por los diferentes servidores).

Tabla 5. Comparación de los modelos de TbTryS generados in silico

Servidor	Método	Modelo	Cobertura %	RMSD (Å) vs PDB 2VPM	Puntaje ProSA (Z)
Phyre2	<i>Threading</i>	1	94	1.77	-10.00
Robetta	<i>RoseTTAFold</i>	1	100	6.04	-10.27
I-Tasser	<i>Threading</i>	1	100	1.39	-10.76

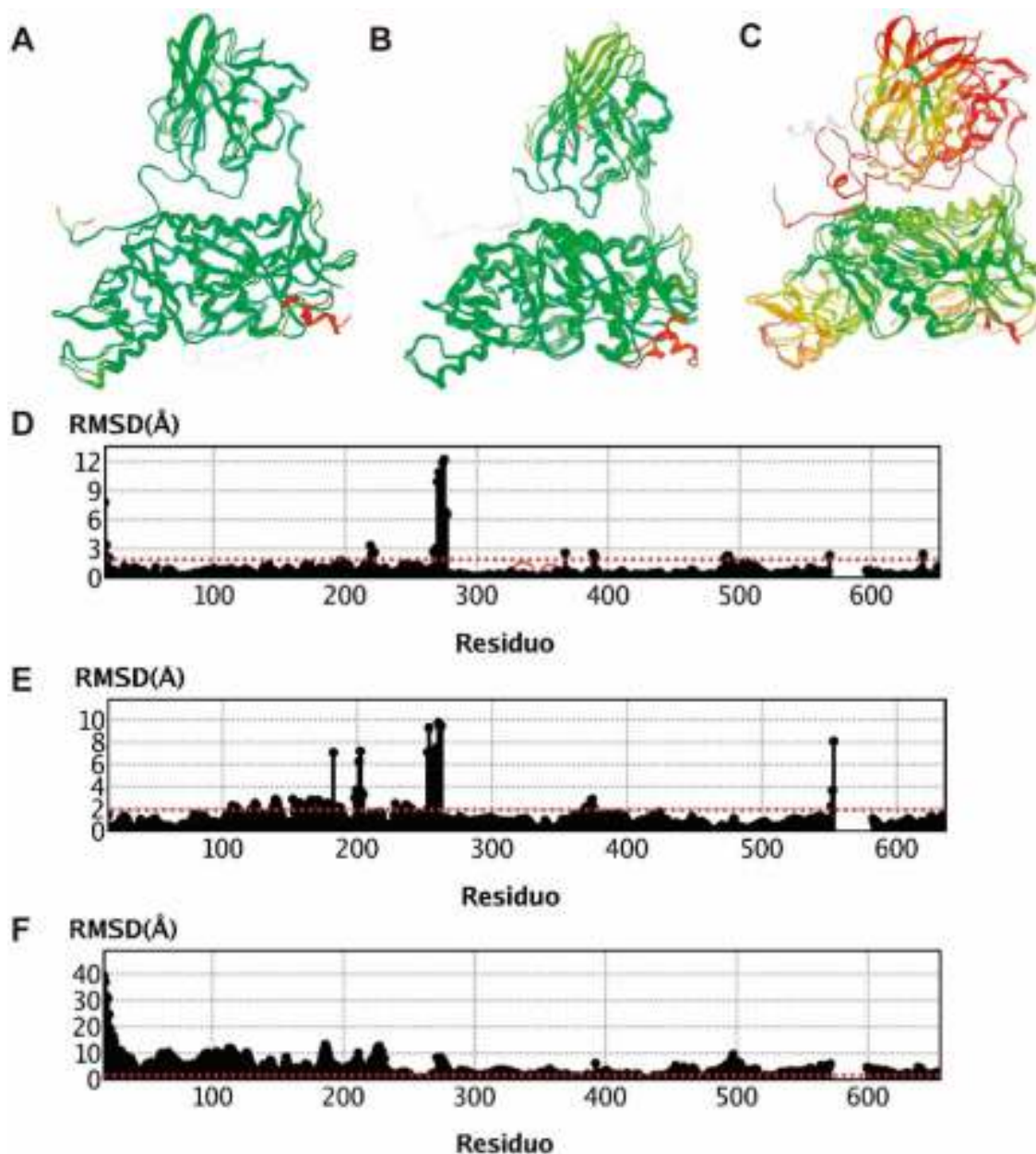


Figura 37. Comparación de modelos in silico de la estructura 3D de TbTryS con respecto a la estructura cristalina de LmTryS.

Superposición de la estructura de LmTryS (PDB 2VPM) con el modelo estructural de TbTryS generado por métodos computacionales aplicando los programas **A)** I-TASSER, **B)** Phyre-2 y **C)** Robetta. Las regiones en verde indican un buen ajuste, mientras que las zonas en rojo indican discrepancias significativas de los modelos. Gráfico de RMSD por residuo para los modelos estructurales de TbTryS generados por **D)** I-TASSER, **E)** Phyre-2 y **F)** Robetta. La línea punteada roja indica el valor promedio de RMSD/residuo determinado para la estructura cristalográfica de LmTryS.

Phyre2 no logró modelar completamente la estructura, dejando regiones importantes sin representar (como la región 1-30 y 566-593) que se corresponden con

elementos estructurales no resueltos en la estructura usada como molde. De acuerdo al análisis por ProSA, este modelo tiene una calidad comparable a estructuras cristalográficas de longitud similar, y un RMSD de 1,77 Å, ligeramente mayor al obtenido con I-TASSER (Tabla 5, Figura 37B y 37E). Esta desviación puede deberse al ajuste deficiente del modelo computacional en la región 265-275 (zona de alfa hélice marcada en rojo en Figura 35B). Si bien el modelo generado por Robetta presentó un Z-score (ProSA) dentro del rango esperado (Figura 36 y Tabla 5), el alto valor de RMSD por encima de 5 Å, con zonas que alcanzan cifras de 40 Å (residuos 1-20), indica un ajuste poco satisfactorio al modelo cristalográfico (Figura 37C y 37F). Al analizar los datos se puede observar que el modelado de la región N-terminal contribuye de sobremanera a este desvío respecto a las coordenadas tridimensionales de la estructura cristalográfica de LmTryS. En particular la región que abarca los residuos 1-230, la cual corresponde al dominio amidasa de esta proteína (ver elementos marcados en escala de amarillo a rojo en la Figura 37C). Aunque de menor grado, ciertas regiones del dominio sintetasa que están involucradas en la unión de sustratos (Comini, 2018) presentaron valores de RMSD intermedios a altos (Figura 37F).

El modelo generado por Robetta presenta valores de RMSD mayores a 5 Å, y por lo tanto una baja confiabilidad. Los modelos de I-TASSER y Phyre2 difirieron en 1.61 Å en su RMSD, lo cual representa un valor bajo y una buena similitud estructural de los mismos. La Figura 38B muestra una superposición de los tres modelos estructurales, destacándose un desalineamiento marcado en la región N-terminal (residuos 1-230) del modelo generado por Robetta. Estas diferencias en la calidad de los modelos pueden deberse a que las metodologías de modelado aplicadas emplean distintas aproximaciones para su construcción. Por ejemplo, I-TASSER y Phyre2 utilizan enfoques basados en 'threading' o enhebrado estructural donde la secuencia de aminoácidos de interés se va encajando a las coordenadas estructurales de la proteína molde. En cambio, para la predicción estructural Robetta emplea RosettaFold, un método basado en inteligencia artificial y redes neuronales profundas, que no requiere moldes estructurales preexistentes (Baek et al., 2021; Kelley et al., 2015; Yang et al., 2015). Este enfoque innovador puede generar variaciones significativas en áreas con menor identidad de secuencia o similitud estructural, lo que explica los malos índices de ajuste estructural obtenido con este programa.

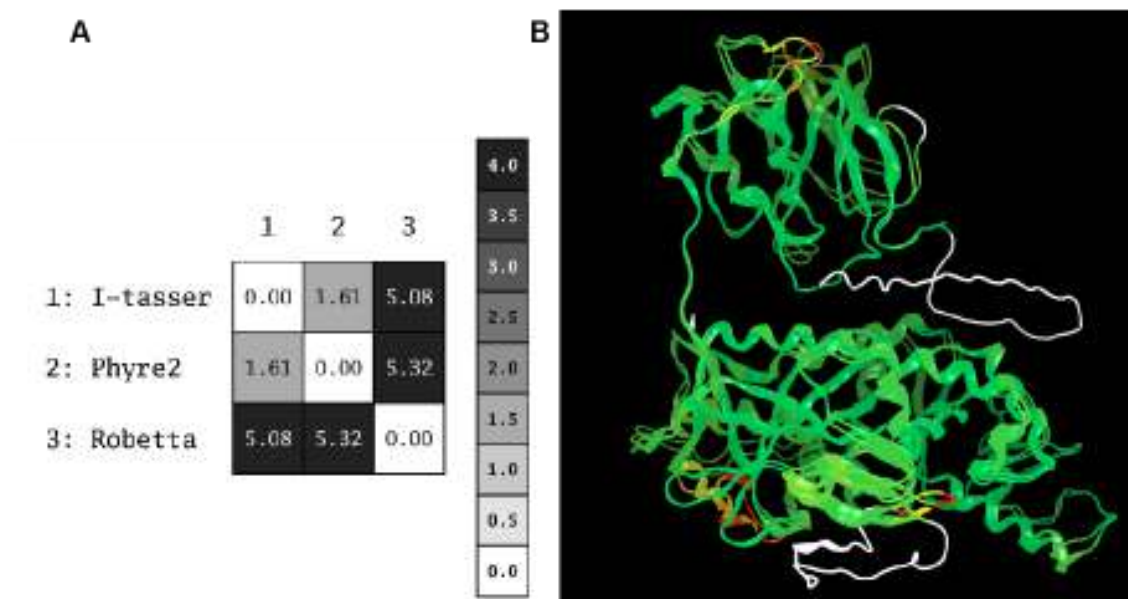


Figura 38. Comparación 3D de los modelos in silico de TbTryS.

A) Matriz de RMSD medio entre los modelos generados por I-TASSER, Phyre2 y Robetta. Los valores más bajos (gris claro) corresponden a similitudes estructurales mayores, mientras que los valores altos (gris oscuro/negro) representan mayores discrepancias (>5 Å). **B)** Superposición tridimensional de los modelos, donde el verde corresponde a regiones bien conservadas, el amarillo a diferencias moderadas, el rojo a desajustes notables, y el blanco a segmentos no modelados en Phyre2. Se observa un buen ajuste global entre I-TASSER y Phyre2 (RMSD = 1,61 Å), mientras que Robetta presenta mayores divergencias estructurales respecto a los otros dos modelos.

En base a este análisis, se procedió a verificar la estabilidad estructural del modelo generado por I-TASSER mediante análisis de dinámica molecular con NAMD 2 y el campo de fuerza CHARMM36. Los resultados muestran que después de los 5 ns de simulación el sistema se estabiliza, ya que se observan variaciones globales y significativas en los valores de RMSD (Figura 39).

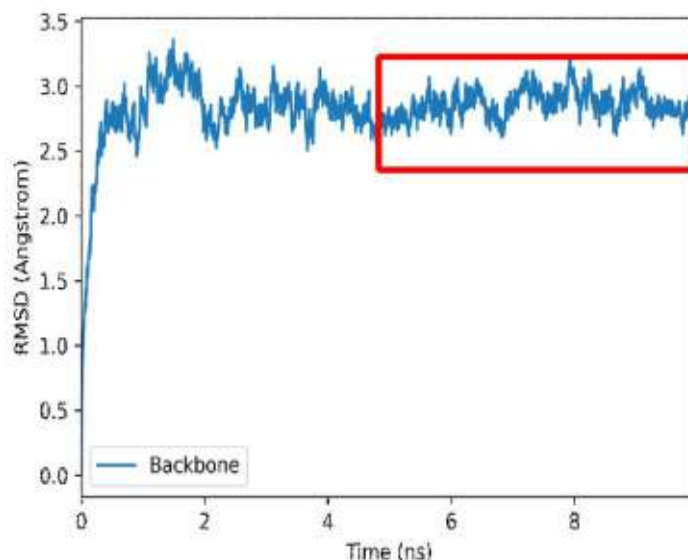


Figura 39. Dinámica molecular del modelo de TbTryS generado por I-TASSER.
El recuadro rojo muestra una zona donde el RMSD se mantiene estable.

4.6.4 Docking y análisis molecular del complejo covalente TbTryS-EbSe

Sobre las evidencias experimentales del sitio de unión covalente del EbSe a TbTryS (Benítez et al., 2022), se realizaron estudios de anclaje molecular y dinámica molecular utilizando al EbSe como inhibidor modelo, con el objetivo de comprender cómo esta interacción afecta la actividad de la enzima. Tal como se describió en la metodología (Sección 3.8.2.2), el primer paso consistió en preparar la molécula de EbSe para representarla como el producto de reacción. De acuerdo con los resultados de espectrometría de masas, el compuesto formaría un enlace seleno-sulfuro entre el átomo de Se del EbSe y el tiol de la Cys270, lo que implica la ruptura del enlace Se–N del heterociclo y la pérdida del protón del residuo de cisteína (asumiendo dicho estado de protonación).

Una vez abierto el anillo heterocíclico, y dado que el programa empleado para el docking (MOE) permite modelar únicamente la formación de enlaces disulfuro (S–S) pero no enlaces Se–S, se sustituyó temporalmente el átomo de Se por un átomo de S (Figura 19), obteniendo así la estructura análoga EbS. Esta sustitución se aplicó exclusivamente para la etapa de docking; una vez identificada la pose del complejo, el átomo de S fue reemplazado nuevamente por el átomo de Se correspondiente.

Con esta estructura final del EbS con su anillo β -lactámico abierto se llevó a cabo el docking covalente sobre la Cys270. El modelo muestra que el compuesto se ancla a una región de alta carga hidrofóbica donde sus anillos aromáticos se encuentran apantallados por una triada de fenilalaninas (345, 347, 354; Figura 39A). En particular, se destaca una interacción π - π stacking del fenilo del anillo benzisotiazolona con la fenilalanina 354 y un puente de hidrógeno entre el oxígeno del EbS y la cadena lateral de la asparagina 289 (Figura 40B).

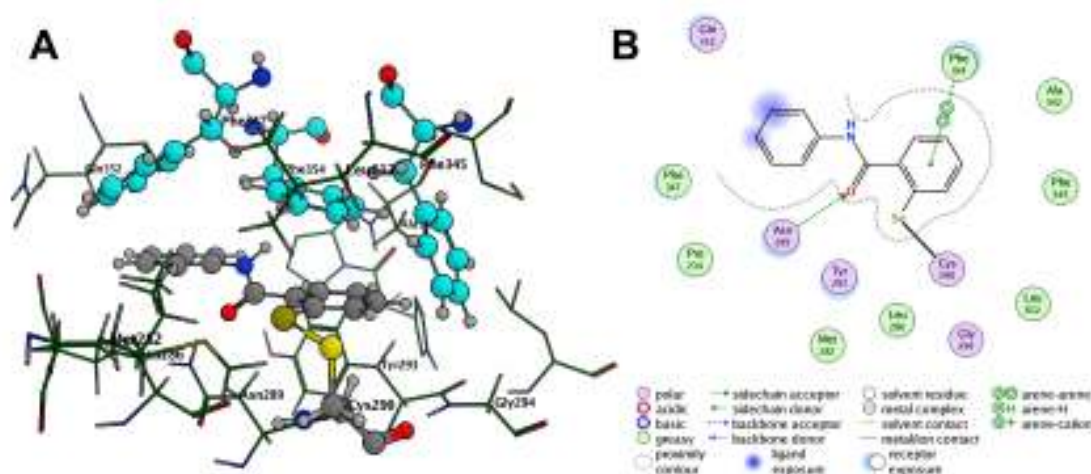


Figura 40. Modelo de unión covalente del EbS a la Cys270 de la TbTryS.

A) Imagen 3D de la pose de docking covalente del EbS con la Cys270. Los átomos y enlaces se presentan como palillos. **B)** Imagen 2D de la interacción ligando-proteína.

Con el fin de estudiar el efecto global que tiene sobre la proteína la unión covalente del EbSe a la Cys270, se realizaron dinámicas moleculares extendidas (230 a 250 ns) sobre los modelos de la TbTryS libre (**APO**; modelo de I-TASSER) o unida a EbSe por su cisteína 270 (**COV270**; modelo de I-TASSER sometido a anclaje molecular con MOE). Durante las simulaciones se calcularon los valores de RMSD y RMSF (Root Mean Square Fluctuation, fluctuación cuadrática media) de los átomos que forman el esqueleto estructural y de cada residuo. Las dos estructuras muestran comportamientos diferentes y, en la ventana de tiempo simulado, ninguna de las dos alcanza un equilibrio completo (Figura 40 A-B). En la estructura APO se observa un sistema equilibrado por debajo de los 180 ns (9000 Frames), la estructura COV270 por su parte no se estabiliza hasta los 150 ns (7500 Frames) y muestra una mayor dispersión temporal de datos en comparación con los registrados para la forma APO. El análisis comparativo de la fluctuación cuadrática media (RMSF) de cada residuo (Figura 41 C y D) permitió identificar que el componente que contribuye a la mayor

inestabilidad del modelo COV270 es una región que abarca los residuos 555-575. Esta región corresponde a un loop próximo al sitio de unión del ATP y que se marca en color rojo sobre la estructura de TbTryS de la Figura 41D.

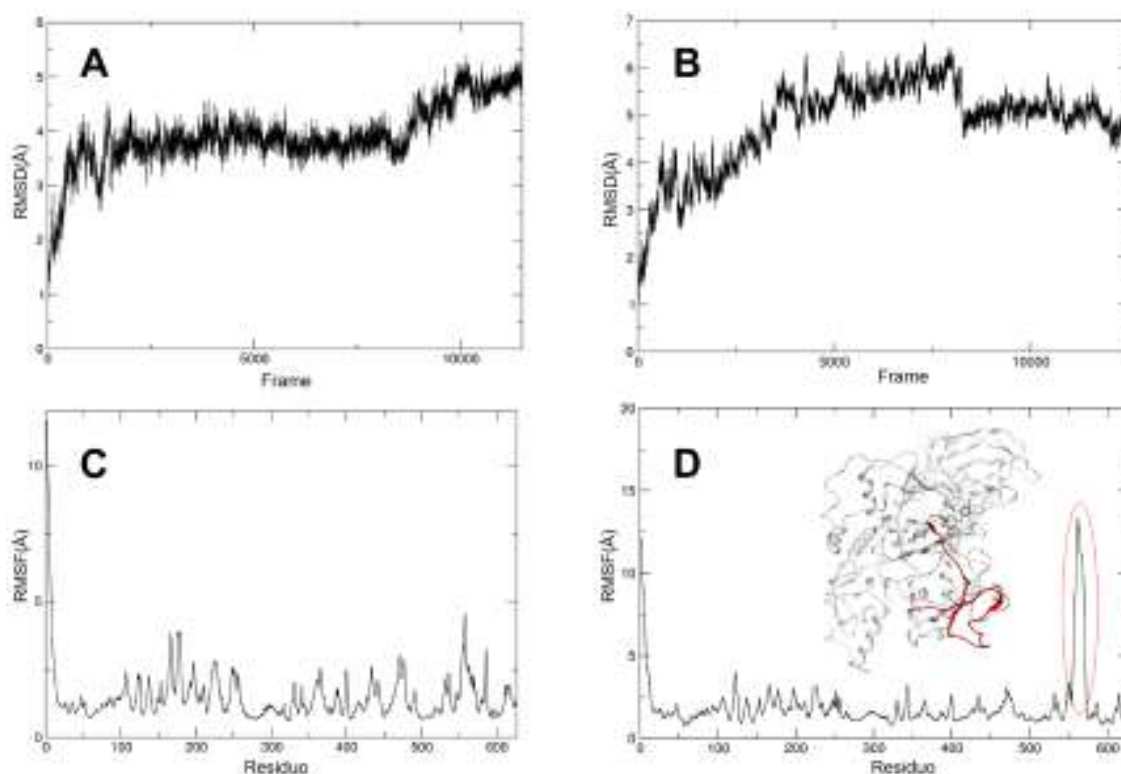


Figura 41. Análisis de dinámica molecular del complejo covalente TbTryS-EbSe. RMSD de los modelos estructurales de la TbTryS en su forma **A)** libre o APO y **B)** unida covalentemente a EbSe por la Cys270, COV270. RMSF de los modelos estructurales de TbTryS **C)** APO y **D)** COV270, donde con una elipse roja se indica la zona de valores de RMSF elevados. En **D** se representa el esqueleto estructural de TbTryS con la región de alto RMSF resaltada en color rojo.

Este resultado es de suma relevancia ya que se alinea con la hipótesis de mecanismo de inhibición alostérico planteado en un estudio previo (Benítez, Franco, et al., 2022a), aportando ahora una base molecular para su comprensión. Para obtener mayor información sobre los cambios conformacionales que dicha interacción enzima-inhibidor podría producir en el sitio catalítico y de unión a sustratos de la TbTryS, se analizó el volumen de estos sitios de interés empleando el programa POVME. A nivel estructural, los bolsillos fueron definidos (delimitados) de la siguiente forma: ATP - radio de 10 Å y área que cubre los residuos 322 a 579; GSH – radio de 7.5 Å y área delimitada por residuos 397, 343

y 456; SP – radio de 6 Å y superficie delimitada por los residuos 345, 349 y 401 (Figura 42A).

Los modelos APO y COV270 presentan diferencias en el volumen promedio estático (Tabla 6) y dinámico (evolución temporal; Figura 42B-D) de los sitios de unión de estos tres sustratos. Las magnitudes de los cambios en el modelo COV270 respecto del APO fueron las siguientes: bolsillo de unión del ATP y de GSH = 31% de incremento de volumen, y bolsillo de unión a SP = 25% de disminución de volumen (Tabla 6). No obstante, los valores absolutos de cambios de volumen entre los modelos COV270 y APO son los siguientes: ATP = 134 Å³, GSH = 98 Å³ y SP = 16 Å³.

Tabla 6. Media del volumen (Å³) de los sitios de unión de sustratos en los modelos APO y COV27 de TbTryS.

Condición	ATP	GSH	SP
APO	426 ± 90	309 ± 52	70 ± 27
COV270	560 ± 123	407 ± 85	54 ± 24

Otro dato relevante es que entre los 80-100 ns (500-600 Frames) de la simulación, el bolsillo de unión a ATP aparece considerablemente extendido (o “conformación abierta”; volumen de 900 Å³) mientras que en el modelo Apo, y para este mismo periodo de tiempo, este sitio alcanza un valor de volumen 3 veces inferior (o “conformación cerrada”; 300 Å³; Figura 42B). Esta variabilidad en el volumen del sitio de unión del ATP coincide con los altos valores de RMSF observados anteriormente en el loop próximo a este sitio de unión. En el caso del sitio de unión de GSH, y al igual que para el ATP, además de observarse un incremento en su volumen en el modelo de COV270, este bolsillo muestra una mayor estabilidad conformacional en el modelo APO (Figura 42C) como también lo sugieren los valores más bajos del error de la media incluidos en la Tabla 8. Con respecto al sitio de unión a la espermidina, las simulaciones indican que éste también sufre alteraciones en el modelo COV270, en el cual parece adoptar una conformación más “cerrada” como lo sugiere la pérdida de volumen respecto del modelo APO (Figura 42D). Llama la atención que, aunque opuestos, los cambios de volumen en el bolsillo del ATP y de SP coincidan temporalmente (región de 400-600 Frames; Figura 42B y 42D), lo cual sugiere cierta comunicación entre estos sitios que es inducida por la unión covalente del EbSe.

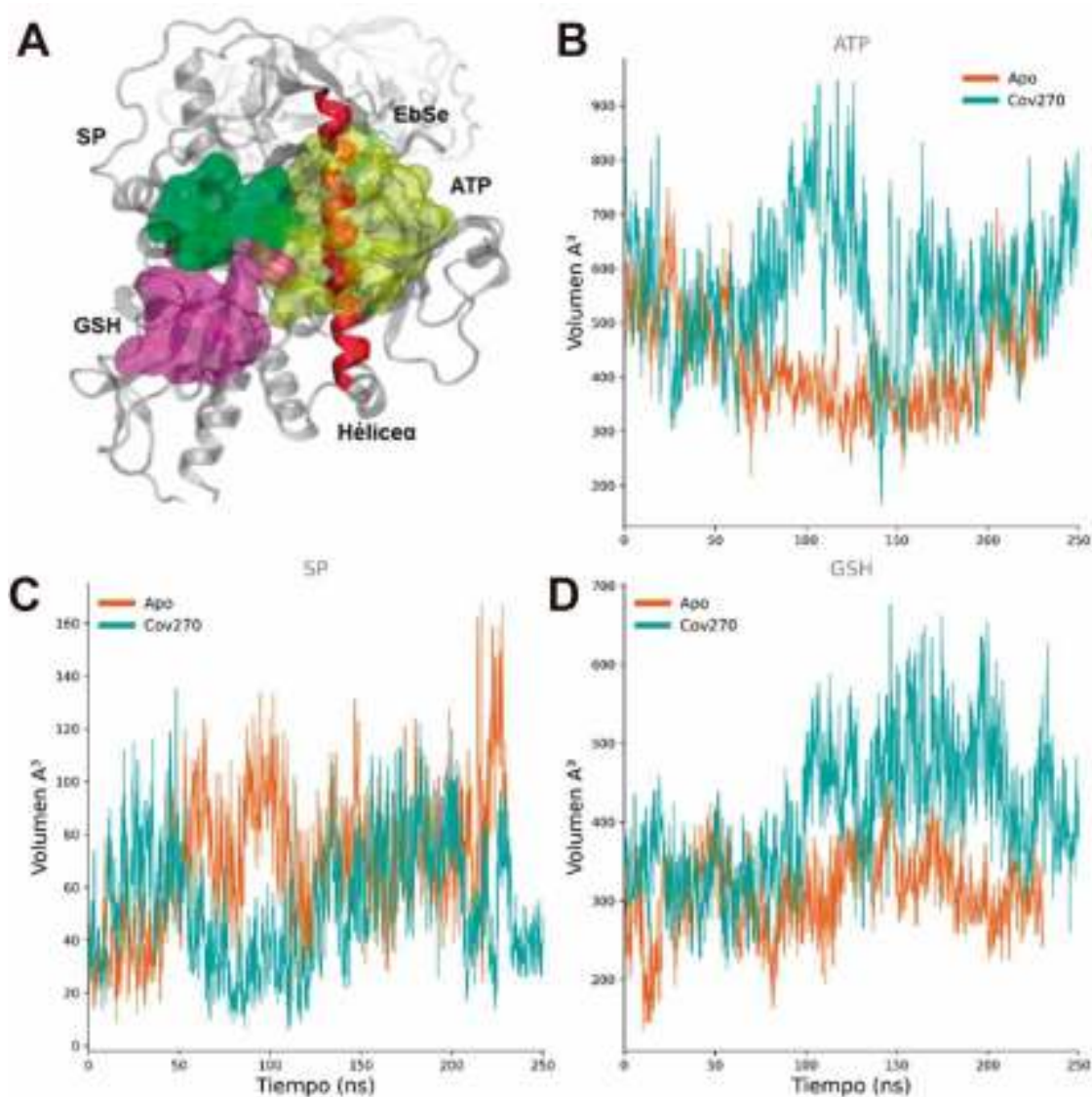


Figura 42. Análisis de dinámica molecular de los sitios de unión a sustratos en los modelos de TbTryS libre y unida a EbSe.

A) Representación gráfica sobre modelo de TbTryS de la zona y volúmenes de cada uno de los sitios de unión a sustratos (SP: espermidina, GSH: glutatión). Variación del volumen en función del tiempo para los bolsillos de **B)** ATP, **C)** SP y **D)** GSH.

Para complementar el análisis, se utilizó el servidor TRAPP (TRAnsient Pockets in Proteins) que permite identificar sitios temporales que se generan a lo largo de una simulación de dinámica molecular. Esto es útil para rastrear los cambios en las propiedades espaciales y fisicoquímicas que pueden tener lugar en un sitio de interés como producto de la flexibilidad intrínseca o inducida (por ejemplo, por unión a inhibidor o ligando) de la proteína. Tomando como referencia el sitio de unión del ATP, dos regiones mostraron un

comportamiento diferencial entre los modelos APO y COV270 (Figura 43): la región entre los residuos 340-350 que forman parte del sitio de unión de la espermidina y marginalmente del glutatión (Figura 43A) y la región alrededor del residuo 610 (Figura 43A). La primera de estas regiones, parece tener mayor estabilidad en el modelo COV270 que en el modelo APO, y lo opuesto aplica para la segunda región.

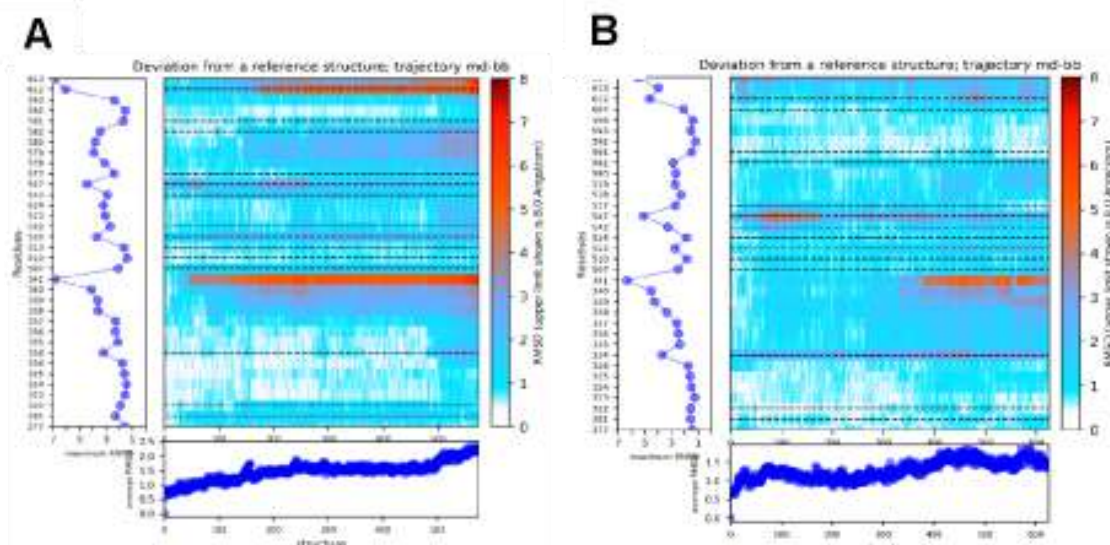


Figura 43. Análisis de estabilidad estructural.

Análisis de identificación de bolsillos transitorios en proteínas (TRAPP: TRAnsient Pockets in Proteins) aplicado al modelo de TbTryS **A)** APO y **B)** COV270.

El loop entre Phe337-Thr346 presenta una secuencia altamente conservada entre TryS de diferentes especies (M. Comini et al., 2005), compuesta por residuos que interaccionan con la adenina del ATP (Phe337), Mg^{2+} (coordinado a los grupos fosfatos del ATP; Glu338 y Asn340), glutatión (Ser343 y Ser345) y espermidina (Thr346) y que facilita el ataque nucleofílico del grupo amino terminal de la poliamina (Ser345; Fyfe et al., 2008; Figura 44A). Estas características, lo hacen un elemento estructural y funcional importante ya que si su conformación o dinámica se viera alterada esto no solo afectaría la interacción con los sustratos sino también la catálisis. El análisis del RMSD de los C α de los residuos de este loop en el modelo APO y COV270 muestra que este elemento posee dinámicas diferentes durante una gran fracción del tiempo de la simulación (Figura 44B). Por ejemplo, en el modelo APO este elemento adquiere rápidamente (~60 ns) un estado estable de dinámica, el cual se sostiene en el tiempo restante. Por el contrario, en el modelo COV270, este elemento presenta una menor dinámica que recién se altera y alcanza nuevos estados

escalonados de estabilidad a los 150 ns y a los 210 ns. Por otro lado, un análisis de las estructuras representativas de los clusters obtenidos a partir del estudio de TRAPP muestra una conformación más extendida de este elemento en el modelo de COV270 respecto del modelo APO (Figura 44C). Esto fue además confirmado mediante medición de la distancia promedio de los C α de los residuos ubicados en los extremos del loop (Glu338 y Thr346), la cual muestra que durante la simulación estos valores para el modelo COV270 son en promedio 2Å más elevados que los registrados para el modelo APO (Figura 44D).

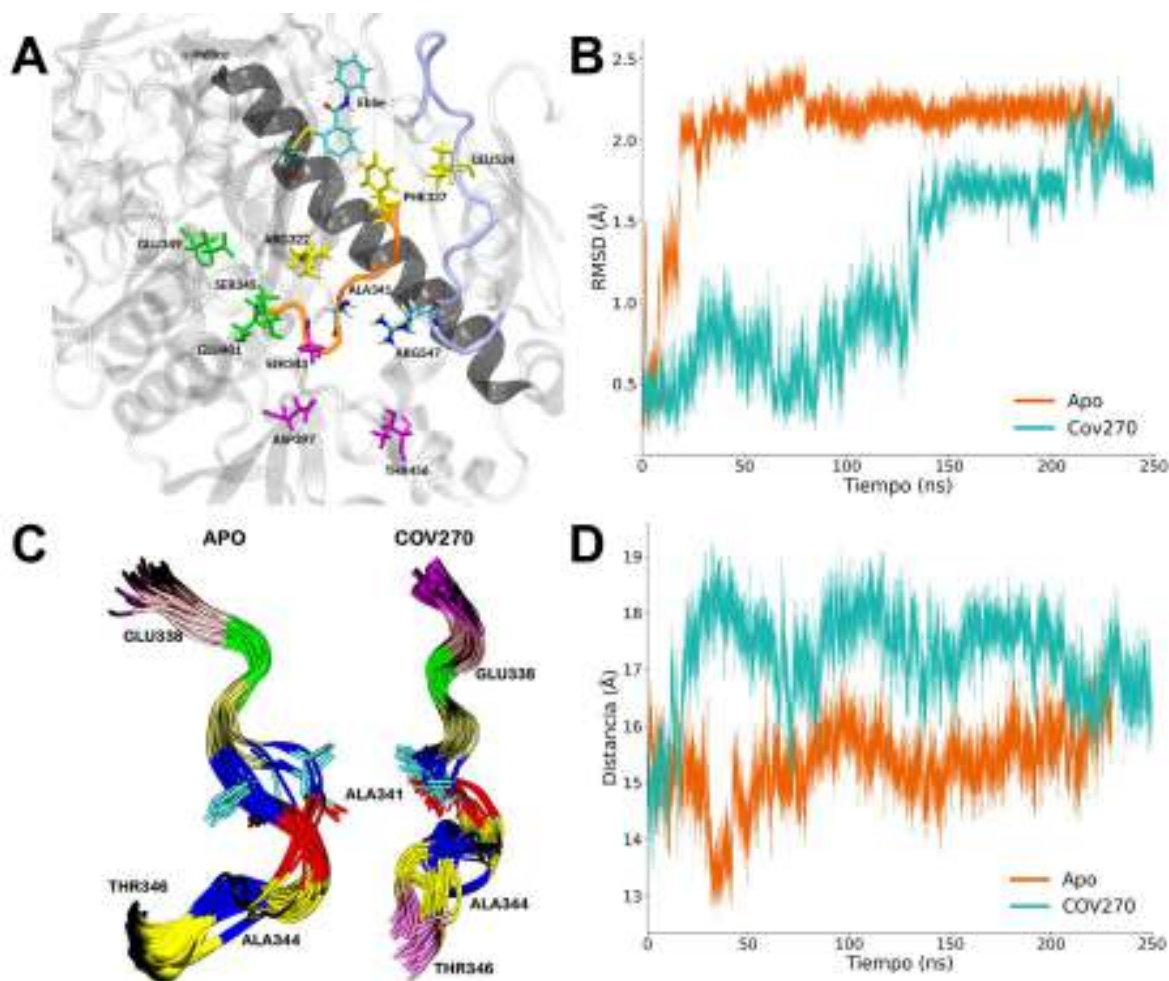


Figura 44. Análisis de dinámica molecular de loop de sitio activo de TbTryS.

A) Residuos de interacción con glutatión (violeta), espermidina (verde) y ATP (amarillo). En naranja el loop entre los residuos Glu337 y Thr346. En lila, el loop entre los residuos Val545 a Lys560. En gris oscuro se muestra la hélice donde se une covalentemente el EbSe a la Cys270. **B)** RMSD de los C α de los residuos Glu337 a Thr346 para los modelos APO y COV270. **C)** Superposición de las estructuras representativas de los clusters generados por TRAPP para la región Glu337 a Thr346 con residuos coloreados por tipo de aminoácido

(visualizador VMD). **D)** Análisis temporal de la distancia entre los C α de los residuos Glu338 y Thr346 para los modelos APO y COV270.

Otra observación interesante es que el residuo central de este elemento, Ala341, presenta un rango bien discreto de orientaciones espaciales en el modelo COV270, lo cual concuerda con la mayor estabilidad de este loop durante la simulación. Por el contrario, en el modelo APO, la región que contiene a Ala341 muestra una mayor flexibilidad lo que le permite a este residuo adoptar orientaciones totalmente opuestas (180°) y, por otro lado, resalta la marcada dinámica de este elemento en la forma libre de TbTryS (Figura 44C).

En resumen, estos resultados aportan un marco molecular que permite comprender el modo de inhibición alostérico inducido por la unión covalente del EbSe (o EbS) a la Cys270 de la enzima. Tal como se describió arriba, la unión del compuesto a un pocket hidrofóbico conlleva a un incremento marcado en el volumen de los sitios de unión a ATP y GSH, y a la estabilización de una conformación extendida (estado “abierto”) de un loop del sitio activo. Este elemento no estructurado de la TryS contiene residuos esenciales para la interacción con los tres sustratos de la enzima y que facilitan la conjugación de la poliamina al intermediario fosforilado del GSH. Vale la pena recalcar que este intermediario es altamente inestable y su exposición al solvente provocaría su hidrólisis inmediata. Esto en parte explica porque las TryS contienen elementos estructurales altamente dinámicos próximos al sitio activo, los cuales alternan entre conformaciones “cerradas” (condensadas) y “abiertas” (relajadas) para proteger los intermediarios de la reacción y facilitar el ingreso/egreso de los sustratos/productos, respectivamente (Comini et al., 2005; Fyfe et al., 2008; Leroux et al., 2013). Por lo tanto, la pérdida de dinámica de este elemento inducida por la unión del EbSe/EbS a una región vecina afectaría de manera irreversible el proceso de catálisis.

4.6.5 Actividad contra TR

Como se mencionó en la Introducción, y al margen del alto grado de conservación de secuencia y estructura entre las TR de diferentes especies de tripanosomátidos, estudios cinéticos y de inhibición comparativos entre la enzima de *T. cruzi* y *T. brucei* demostraron que ambas enzimas pueden usarse indistintamente para fines de cribado o para el diseño de inhibidores basado en estructura (Jones et al., 2010).

Diversos compuestos han demostrado actividad antitripanosomal mediante la inhibición de la TR. Entre ellos, los derivados de quinolinas, pirimidopiridazinas e indatralina muestran eficacia contra *T. b. brucei*, inhibiendo la enzima con valores de CI_{50} en el rango de 2,23 a 12,8 μM (Spinks et al., 2009; Walton et al., 2011), compuestos, como los derivados de la naftoquinona, bases de Mannich y acridinas, han mostrado actividad contra *T. cruzi*, también inhibiendo la TR con baja toxicidad para las células humanas (Bonse et al., 1999; Lee et al., 2005). Además, algunas moléculas como el Chinifur y compuestos nitroaromáticos actúan generando especies reactivas de oxígeno (ROS) dentro del parásito, induciendo estrés oxidativo y llevando a la muerte celular (Adagu et al., 2002).

La variedad de compuestos redox-activos estudiados, desde derivados de quinolinas hasta complejos metálicos, resalta la diversidad de estrategias terapéuticas posibles. Los inhibidores de la TR presentan un mecanismo de acción que, al interrumpir la homeostasis redox de los tripanosomas, ofrece una vía prometedora para superar la resistencia a los medicamentos (Wilkinson & Kelly, 2009). El enfoque en la generación de ROS como mecanismo antitripanosomal complementa esta estrategia, proporcionando una doble acción terapéutica: inhibición enzimática y estrés oxidativo selectivo en los parásitos (Fairlamb, 2003). Estos avances sugieren que los medicamentos redox-activos, especialmente aquellos dirigidos a la TR y al sistema redox de los tripanosomas, podrían ser la base para desarrollar tratamientos más efectivos contra la tripanosomiasis (Battista et al., 2020; González-Montero et al., 2024). Por ese motivo, en esta tesis empleamos la enzima de *T. cruzi* (TcTR) como modelo experimental de referencia para los estudios de inhibición con las benzisotiazolonas.

Para establecer las condiciones óptimas del ensayo enzimático, primero se determinaron las constantes de Michaelis (K_M) para la forma recombinante de TcTR, entendidas como la concentración de sustrato necesaria para alcanzar la mitad de la velocidad máxima. El análisis de las curvas de velocidad obtenidas a distintas concentraciones de sustratos mostró valores de $K_M = 14,4 \mu M$ para NADPH y $31,2 \mu M$ para TS_2 (Figura 45). Estos valores se sitúan dentro del rango reportado previamente para tripanotona reductasas, incluyendo los $30 \mu M$ estimados para TS_2 por (Hamilton et al., 2003) y los $18 \mu M$ reportados para NADPH por (Jockers-Scherübl et al., 1989b)

Adicionalmente, estudios previos han evidenciado que los parámetros cinéticos de la TR pueden variar en función del orden de adición de los sustratos. (Angiulli et al., 2015)

demostró que, en *Leishmania infantum*, iniciar la reacción añadiendo NADPH a una mezcla que contiene la enzima y TS₂ reduce notablemente el K_M para NADPH, pasando de 12 µM (cuando TS₂ se incorpora al final) a 1,9 µM. Estos hallazgos refuerzan que la cinética de la TR es sensible al modo de iniciación de la reacción, un aspecto relevante al estandarizar las condiciones experimentales.

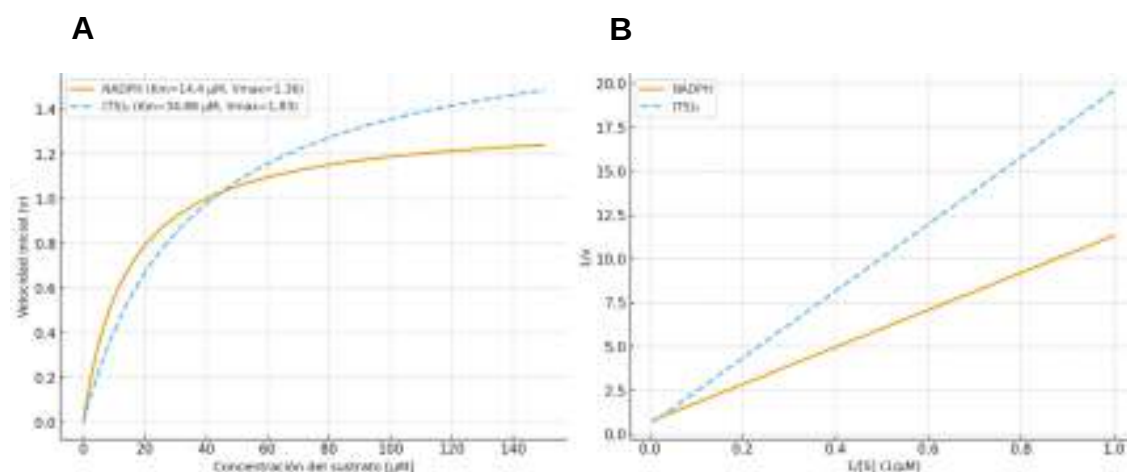


Figura 45. Caracterización cinética de la TcTR recombinante.

A) Curvas de velocidad inicial de la reacción en función de la concentración de sustratos (NADPH y (TS)₂). El ajuste no lineal permitió calcular valores de K_M y V_{max}. **B)** Gráficas de Lineweaver-Burk (doble recíproco) correspondientes a los datos mostrados en el panel de la izquierda. Este procedimiento muestra la relación lineal entre 1/v y 1/[S] y permitió confirmar los parámetros cinéticos determinados para ambos sustratos a partir del análisis de la ecuación hiperbólica.

Los derivados de EbS que fueron cribados contra TcTR comprenden solo las moléculas con una destacada actividad inhibitoria sobre la forma infectiva de *T. brucei* y que además indujeron una marcada oxidación del biosensor. Este sesgo en la selección de compuestos fue con el fin de confirmar si la causa del desbalance redox intracelular en el pool de tioles de bajo peso molecular se origina por la inhibición de esta importante enzima del metabolismo redox dependiente de tioles de estos microorganismos. El ensayo de cribado contra TcTR (68 nM) se realizó bajo condiciones comparables a las descritas en (Lu et al., 2013), como ser una relación compuesto:TR 1000:1, y una preincubación de la enzima con los compuestos durante 1 hora a 25 °C. Al cabo de ese tiempo, NADPH y TS₂ fueron agregados a concentraciones 10 y 3 veces superiores a sus valores de K_M, y el curso temporal de consumo de NADPH fue monitoreado por medida de absorbancia a 340 nm. Los compuestos fueron clasificados en tres categorías de acuerdo con el grado de inhibición ejercido sobre TcTR (Tabla 7): inactivos (% inhibición = 0–14%; 4, 9 y 10–14),

moderadamente activos (% inhibición = 52–68%; 1, 8 y 19), marcadamente activos (% inhibición > 80%; 6, 7 y EbS). Un hallazgo interesante de este estudio es que ninguno de los compuestos de la serie II (10-14) fue un inhibidor destacado de esta enzima. Esto en parte se explica por la presencia de un átomo de carbono adicional en la posición de enlace del N² con el anillo aromático, ya que varios de los derivados que no lo poseen (6, 7, 8 y EbS) mostraron niveles de inhibición >68%. Por otro lado, la metilación en para (4) o meta (incluida la halogenación, 9) del fenilo fueron marcadamente perjudiciales para la inhibición de la TcTR (0% inhibición), al comparar con el derivado no modificado, el EbS (95% inhibición). El conjunto de compuestos moderadamente activos incluye moléculas con sustituyentes en N² de naturalezas químicas divergentes: H (1), trifluormetil-benceno (8) y etilacetato (19). Dentro de los compuestos más activos, EbS, 6 y 7 comparten el sustituyente fenilo en N², mientras que a su vez estos últimos contienen en posición para de este anillo aromático un átomo (Cl) o grupo (grupo nitro), respectivamente, atractor de electrones. Este conjunto de resultados sugiere la existencia de una combinación de componentes estéricos y electrostáticos involucrados en la interacción enzima-benzisotiazolonas.

En base a estos resultados, se puede inferir con cierto grado de confiabilidad que TR no es la diana molecular preferencial de los compuestos que resultaron inactivos o moderadamente activos contra esta enzima. EbS, 6 y 7 podrían calificar como candidatos responsables de desencadenar el rápido desbalance redox en los tioles de bajo peso molecular por medio de la inhibición de TR. Sin embargo, la gran disparidad entre la concentración que induce el efecto biológico (0,3-3 μ M) y la relación compuesto:enzima (100:1) necesaria para inhibir de manera marcada a la TR siembran dudas sobre la hipótesis que este sea el principal blanco molecular de estos compuestos.

Tabla 7. Actividad de las benzisotiazolonas sobre TR de *T. cruzi*

Compuest o	Actividad TcTR (%)		
	Pre-gel filtración ^a	Pos-gel filtración ^b	
		-DTT	+DTT
Control ^c	100,0 ± 0,3	100,0 ± 0,2	97,5 ± 0,7
1	39,2 ± 1,6	NE	NE
4	100,0 ± 0,0	NE	NE
6	18,7 ± 1,7	24,2 ± 2,0	68,2 ± 1,3
7	7,0 ± 2,5	31,4 ± 1,8	59,6 ± 2,4
8	32,2 ± 2,0	NE	NE
9	100,0 ± 0,0	NE	NE
10	86,8 ± 1,1	NE	NE
11	100,0 ± 0,0	NE	NE
12	100,0 ± 0,0	NE	NE
13	86,0 ± 1,0	NE	NE
14	100,0 ± 0,0	NE	NE
19	47,8 ± 2,8	NE	NE
EbS	5,4 ± 0,3	14,5 ± 1,3	68,8 ± 2,2

^a actividad determinada luego de 1 h de incubación de TcTR (68 nM) con los compuestos (68 µM). ^b actividad determinada en muestra de TcTR que fue gel filtrada y tratada (+DTT) o no (-DTT) con DTT (10 mM por 180 min) luego de haber sido incubada durante 1 h con un exceso de los compuestos 6, 7 y EbS (1:200, TR: inhibidor). ^c muestra de TcTR (68 nM) sin compuesto.

Evidencias experimentales previas mostraron que EbSe y EbS inhiben a la TR formando un complejo covalente irreversible (Lu et al., 2013). Además, para EbS se halló que NADPH acelera la inactivación de la enzima. Con el fin de confirmar si los análogos 6 y 7 inhiben a TcTR por un mecanismo similar al del EbS, la enzima fue incubada con un exceso de estos compuestos y la actividad remanente fue medida luego de separar la proteína de las moléculas de bajo molecular. Como se muestra en la Tabla 7, tras eliminar el exceso de compuesto, una fracción importante de la TcTR permaneció inactiva (24-31% actividad), a un nivel similar al observado para el control EbS (15% actividad). Al tratar estas muestras con el agente reductor DTT, se observó una recuperación parcial de la actividad (60–70%). Esto es consistente con un mecanismo de inhibición por modificación covalente de la enzima que involucra una especie oxidada.

Si bien el estudio conducido por Lu y colaboradores (2013) demostró que al menos cinco moléculas de EbSe y de una a dos de EbS se incorporan covalentemente a la TR, los residuos que son blanco de esta modificación no fueron investigados. Aquí se abordó dicha

pregunta para el compuesto 7 y el EbS, empleando la técnica de espectrometría de masa acoplada a cromatografía líquida (LC/MS) La TcTR fue incubada durante 2 h en ausencia o en presencia de EbS y el compuesto 7 (relación TcTR: compuesto, 1:250). Las muestras fueron posteriormente tratadas o no con DTT, alquiladas con yodoacetamida y sometidas a digestión con tripsina, antes del análisis por LC/MS. La cobertura de secuencia obtenida osciló entre el 58 y 61 %, y en la mayoría de las condiciones se detectaron cuatro de los siete residuos de cisteína (Figura 46A). En el control sin compuestos, los residuos Cys 58, Cys 221 y Cys 469 se encontraron carboximetilados o, en el caso de Cys 53, en estado de tiolato, lo que indica que los mismos están expuestos al solvente y son reactivos. Vale la pena destacar que es poco probable que los restantes tres residuos (Cys 176, Cys 375 y Cys 444), no detectados por esta técnica, sean candidatos a reaccionar con las benzisotiazolonas porque la estructura cristalográfica los muestra ocupando regiones de la proteína no expuestas al solvente (Y. Zhang et al., 1996). Tanto para la muestra tratada con EbS o 7 se pudo identificar una única molécula intacta de estos compuestos unida covalentemente a TcTR a través de la C221 (Figura 46B y 46C), mientras que los residuos catalíticos C53 y C58 se detectaron en diferentes estados (disulfuro, tiolato o carboximetilados), y tanto C375 como C469 permanecieron carboximetiladas. Este resultado coincide en gran medida con el análisis de ESI-MS de (Lu et al., 2013) que reportó la formación de un complejo covalente entre, mayoritariamente, una molécula de EbS y la TcTR.

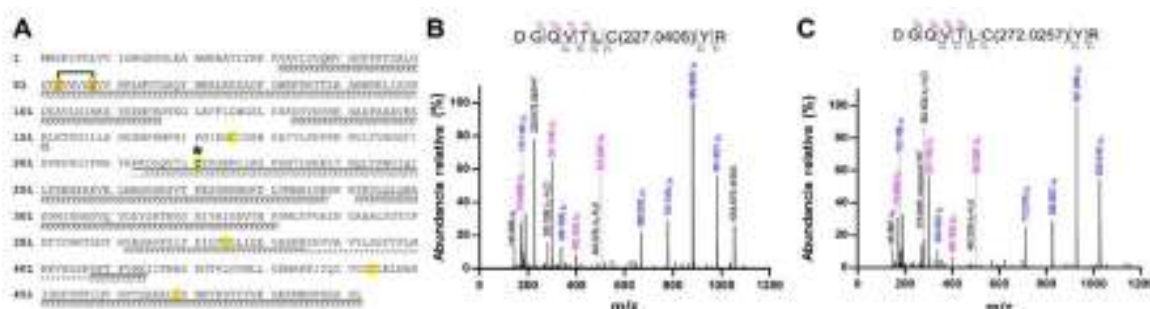


Figura 46. Identificación por espectrometría de masas de la modificación covalente de TcTR por EbS y el compuesto 7.

A) Secuencia de aminoácidos de TcTR. Las cisteínas del sitio activo (C53 y C58) se muestran resaltadas en amarillo oscuro, con una línea superior indicando el puente disulfuro. El resto de las cisteínas se indican en amarillo. El asterisco marca la posición de C221, residuo que constituye el blanco de la modificación covalente por EbS y por el compuesto 7. Las líneas subrayadas en negrita, discontinuas y punteadas representan los péptidos detectados por LC/MS en TcTR tratada con EbS, con el compuesto 7 y sin tratamiento, respectivamente. **B)** Espectros MS/MS representativos de los péptidos de TcTR modificados por **B) EbS** y **C) el compuesto 7**. Los iones reporteros para EbS ($m/z = 228.0478$, correspondiente a EbS protonado, $\text{EbS}+\text{H}^+$) y para el compuesto 7 ($m/z = 273.0326$, correspondiente a 7 protonado, $7+\text{H}^+$) se observan junto con las series de fragmentos y y b de la secuencia nativa. Los fragmentos iónicos y_3 a y_6 están presentes en ambos espectros. Los picos asignados contienen las modificaciones correspondientes. (Para la interpretación de las referencias de color en esta figura, remitirse a la versión web del artículo).

Habiendo identificado el residuo de TcTR que es blanco de modificación por EbS y 7, se procedió a realizar un análisis estructural para comprender como el anclaje de estos a C221 podría afectar la actividad enzimática. C221 se localiza en el extremo C-terminal de una cadena β que conforma el bolsillo de unión del anillo de adenina del NADP(H)^+ (Figura 47A-C). Este residuo se encuentra altamente conservado en TR de tripanosomátidos, pero está ausente en la Glutatió Reductasa humana, pese a la gran similitud estructural entre ambas enzimas. Si bien C221 se encuentra parcialmente enterrado en una hendidura, su átomo de azufre está accesible al solvente (Figura 47B-C), lo cual es una condición esencial para poder interactuar con los compuestos. Al realizar el anclaje molecular del EbS y 7 a esta cisteína se pudo confirmar que ambos compuestos se acomodan satisfactoriamente en esta cavidad conformada por dos paredes de residuos: I286, V195 y N255, y G196, Y222, R223 y R229 (Figura 47D-E). En las diferentes poses de unión EbS y 7, se observa que el sustituyente fenilo ocupa el bolsillo de unión de adenina y parte de la región vecina que corresponde al sitio de unión de la ribosa-fosfato del NADP(H)^+ (Figura 48C-D).

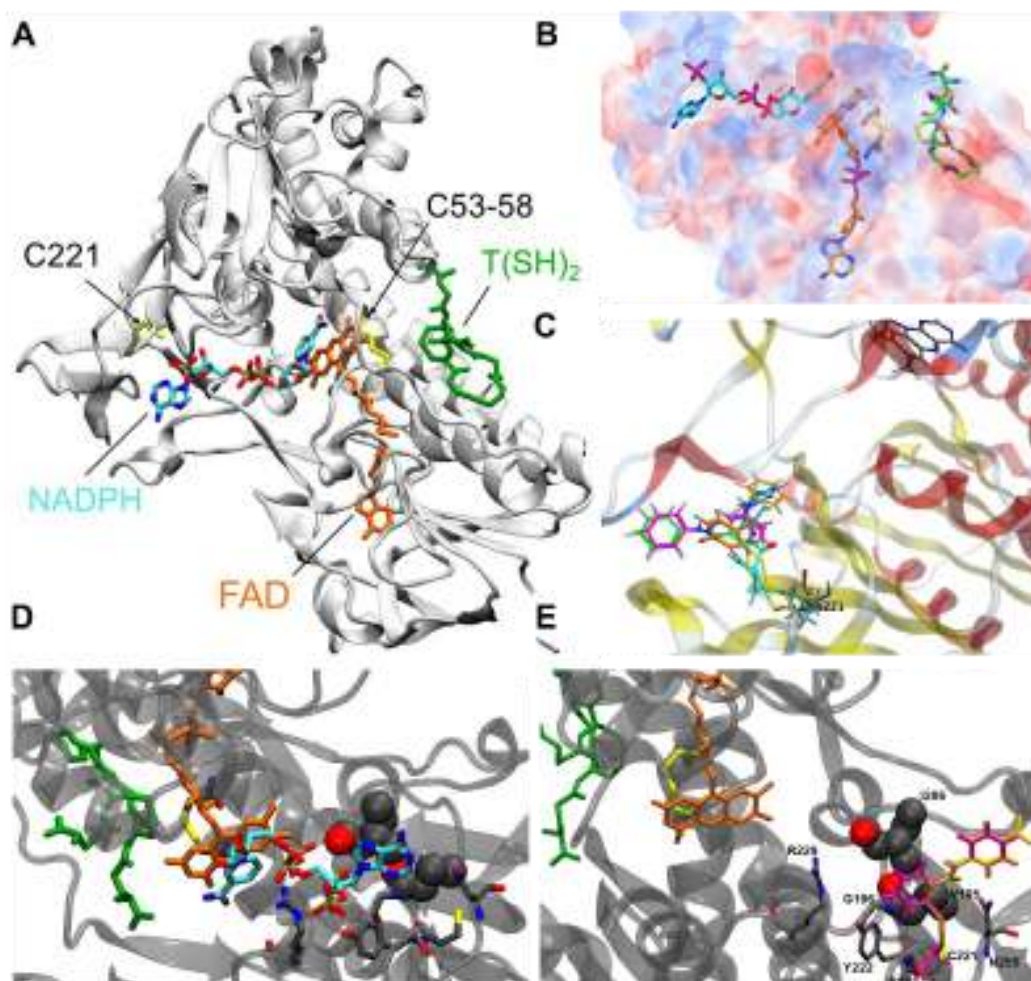


Figura 47. Análisis estructural de la unión de EbS y el análogo 7 a TcTR.

A) Representación en cintas de la cadena A de TcTR obtenida por cristalografía (PDB 1AOG). Con palillos se resaltan los sustratos redox (dihidrotriptanotona, T(SH)₂: verde; NADP(H)⁺: cian), el cofactor (flavín adenín dinucleótido, FAD: naranja), el par de cisteínas del sitio catalítico (C53 y C58) y el residuo C221 (amarillo). **B)** Superficie electrostática de TcTR en complejo con los sustratos y el cofactor. **C)** Poses de docking de TcTR en complejo con los inhibidores EbS (magenta) y 7 (amarillo). **D)** Sitio de unión del anillo de adenina de NADP(H)⁺ (azul y cian). **E)** Conformaciones adoptadas por EbS (magenta) y 7 (amarillo) al unirse covalentemente a la C221.

Los modelos muestran que la unión de los inhibidores a esta estrecha hendidura es estabilizada mediante interacciones electrostáticas y enlaces de hidrógeno aportados por residuos de la pared hidrofóbica (V195, G196 e I286) y por residuos de la pared polar opuesta (Y222, R223, R229 y N255; Figura 47E). Lo notable es que este acoplamiento no implica un costo termodinámico significativo, dado que el sitio mantiene la misma conformación observada cuando aloja el anillo de adenina del cofactor. Las poses más favorables de EbS y 7 arrojaron energías de acoplamiento de $-3,5$ a $-4,4$ kcal/mol (Figs.

S4 y S5). Sin embargo, cuando el disulfuro formado con C221 se orienta de manera ortogonal respecto a los carbonos adyacentes, la interacción no covalente se vuelve altamente desfavorable, alcanzando valores de 16 y 32 kcal/mol para EbS y 7, respectivamente. Otro dato interesante obtenido a partir de este modelo es que el heterodisulfuro resultante queda protegido del solvente por los anillos aromáticos de EbS y 7 que aportan impedimento estérico y repelen al solvente con su marcada hidrofobicidad. Esto en parte explica por qué el tratamiento con DTT logró revertir solo de manera parcial la inhibición de TcTR por estos compuestos.

4.7 Estudios de eficacia terapéutica

Habiendo completado la caracterización biológica de las benzisotiazolonas y obtenida información sobre la interacción con sus posibles blancos moleculares, se procedió a estudiar el potencial terapéutico del compuesto más potente y selectivo contra la forma sanguínea de *T. b. brucei* (14, $CE_{50} = 22$ nM, IS = 6772) empleando un modelo animal de infección aguda por este parásito.

En primera instancia, se evaluó la toxicidad aguda en ratones (cepas BALB/cJ) a los cuales se les administró el compuesto por vía intraperitoneal (i.p.) a 0,8 mg/kg×día. Durante y al finalizar el ensayo, no se detectaron signos clínicos de toxicidad (en la sección 3.9.1 se detallan los parámetros clínicos evaluados en los animales). Para evaluar la actividad in vivo del compuesto, se infectaron tres grupos de ratones (n=3 cada uno) con la cepa monomórfica de *T. b. brucei*-luc la cual produce una infección fulminante en los animales y, al expresar el gen de la luciferasa, permite monitorear el progreso de la infección por técnica de imagenología no invasiva (Rivas et al., 2021). A las 48 h de haber realizado la infección y verificado el establecimiento de la misma en todos los animales en estudio (Figura 48A), los grupos fueron tratados vía i.p. con DMSO (2,75 g/kg×4 días), con compuesto 14 (0,8 mg/kg×4 días) o con aceturato de diminazeno (DAC, 40 mg/kg, dosis única). El monitoreo por bioimagen (Figura 48A) evidenció que, a partir del día 6 postinfección, los animales tratados con DMSO y con el compuesto 14 aún presentaban focos activos de bioluminiscencia, mientras que en el grupo tratado con DAC la señal fue indetectable hasta el final del experimento (día 17), confirmando el efecto curativo de este último. En el día 9 postinfección, dos de los tres animales tratados con el compuesto 14 mostraron una reducción de aproximadamente tres veces en la señal de bioluminiscencia respecto al grupo

vehículo, lo que sugiere un control parcial de la proliferación parasitaria por parte de esta benzisotiazolona.

En términos de supervivencia, los animales tratados con el compuesto 14 alcanzaron una supervivencia media de 17 días, significativamente mayor que la observada en el grupo tratado con DMSO (12 días; $p = 0,0057$). Sin embargo, a diferencia del grupo tratado con DAC, el compuesto 14 no logró impedir la progresión letal de la infección. Estos resultados indican que, bajo el régimen probado, el compuesto 14 no ejerce un efecto curativo, pero sí confiere un beneficio terapéutico parcial al reducir transitoriamente la carga parasitaria y retrasar la progresión de la enfermedad.

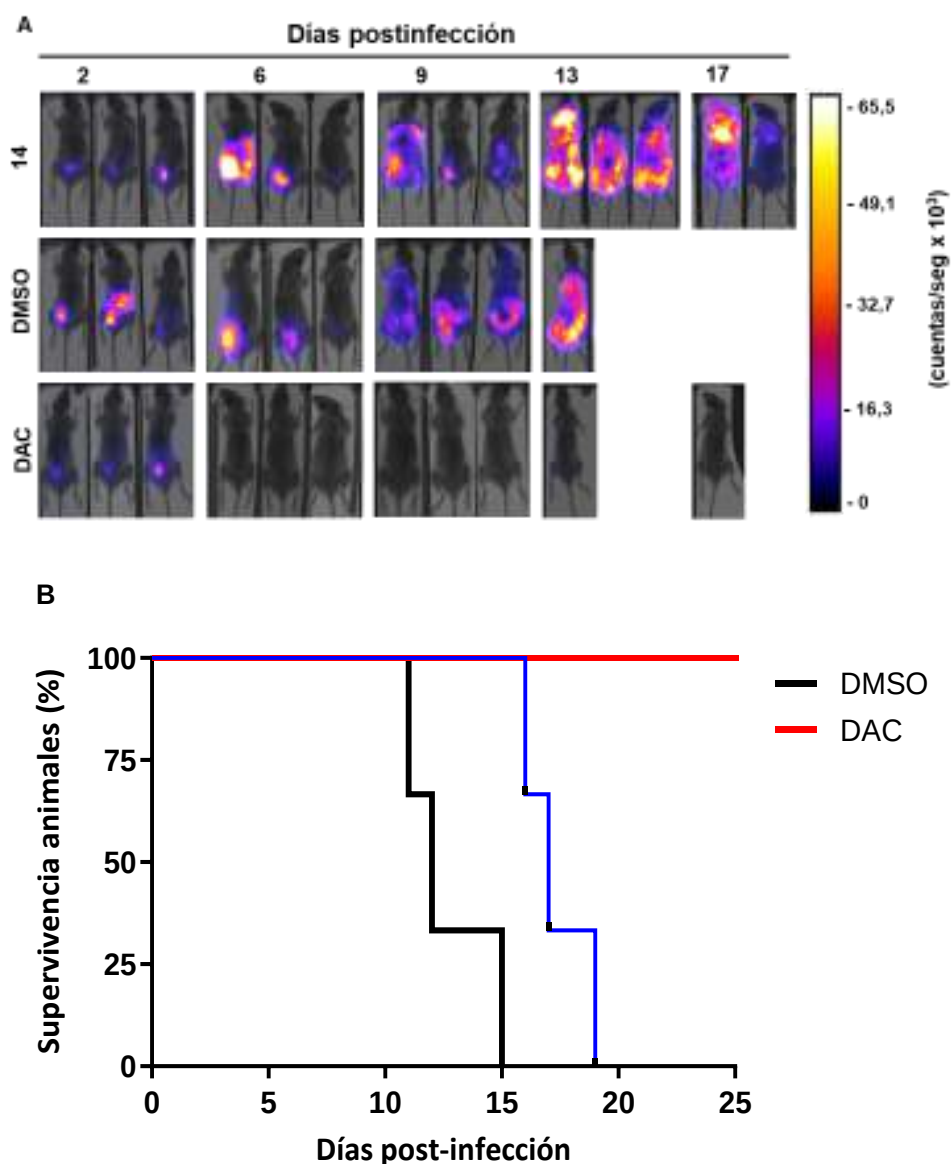


Figura 48. Estudio de eficacia terapéutica en un modelo murino agudo de tripanosomiasis africana.

A) Imágenes de luminiscencia de ratones BALB/cJ (posición ventral) infectados con *T. b. brucei-luc* y tratados con 1) 0,8 mg/kg×4 días de compuesto 14 (grupo 14), 2) 2,75 g/kg×4 días de DMSO (grupo DMSO) y 3) dosis única de 40 mg/kg de aceturato de diminazeno (grupo DAC). Las imágenes se adquirieron durante diferentes días post-infección utilizando un equipo Xtreme II (Bruker). La barra de escala de radiancia indica la intensidad de la señal expresada en cuentas/seg×10³. **B)** Gráfico de supervivencia de Kaplan-Meier para cada grupo. La comparación estadística (test Log-Rank (Mantel–Cox)) mostró diferencias significativas entre el grupo 14 y DMSO ($p = 0,0057$), y entre el grupo DAC y los grupos 14 y DMSO ($p > 0,0001$).

Los resultados obtenidos con el compuesto 14 evidencian una discrepancia clara entre su elevada potencia in vitro (CE_{50} en el rango nanomolar, $SI > 6000$) y su eficacia in vivo, donde se observó únicamente una reducción parcial de la carga parasitaria y un aumento en la mediana de supervivencia, pero sin alcanzar la cura parasitológica. Este fenómeno ha sido reportado en múltiples programas de búsqueda de fármacos frente a *T. b. brucei*, donde candidatos con perfiles de alta selectividad in vitro no logran traducir dichos efectos en modelos murinos debido a limitaciones farmacocinéticas, metabolismo acelerado o pobre biodisponibilidad.

Los resultados in vivo obtenidos para el compuesto 14 muestran un comportamiento comparable al descrito previamente para análogos del EbS. En el estudio de (Lu et al., 2013) los autores administraron EbS a 30 mg/kg/día durante 3 días, iniciando el tratamiento solo 2 h post infección y monitoreando la parasitemia en sangre periférica. Bajo estas condiciones, EbS redujo transitoriamente la parasitemia, pero no alcanzó la cura parasitológica salvo cuando se administró en combinación (p. ej., EbS19 + nifurtimox a 20 + 50 mg/kg por 5 días). En contraste, en el presente estudio se empleó una dosis aproximadamente 40 veces menor (0,8 mg/kg×4 días), con inicio del tratamiento 48 h post infección, es decir, en un punto en el que la infección sanguínea ya se encontraba establecida. Además, el monitoreo se realizó mediante bioimagen con una línea *T. b. brucei*-Luc, capturando la carga parasitaria total a nivel corporal y no únicamente la parasitemia sanguínea, lo que representa un criterio más estricto para evaluar eficacia terapéutica. Bajo este régimen, el compuesto 14 no alcanzó la cura parasitológica, pero redujo la carga total de bioluminiscencia (~3 veces en el día 9) y extendió la supervivencia media de 12 a 17 días, evidenciando un control parcial de la infección. Las diferencias en resultados entre ambos estudios pueden atribuirse a factores farmacocinéticos y de biodisponibilidad, incluyendo la dosis notablemente inferior, el inicio tardío del tratamiento y la posible limitación en la concentración efectiva del compuesto en compartimentos extracelulares donde prolifera *T. b. brucei*. Por lo tanto, la falta de eficacia curativa bajo el régimen ensayado no implica ausencia de actividad intrínseca, sino la necesidad de estudios farmacocinéticos, optimización de formulación o incrementos de dosis para evaluar plenamente el potencial terapéutico de la serie.

Estudios farmacológicos previos con compuestos de la misma familia química muestran que las benzisotiazolonas presentan limitaciones farmacocinéticas que podrían explicar la eficacia in vivo parcial observada en esta tesis. En particular, se ha demostrado

que ebselen (EbSe) alcanza la concentración plasmática máxima una hora después de la administración oral en ratas y luego se elimina mediante una cinética multifásica con vidas medias de 2.1 h, 6.6 h y un componente tardío hacia las 12 h (Masumoto et al., 1997). El compuesto muestra una distribución amplia a tejidos como hígado, riñón, tejido adiposo, piel y glándulas adrenales, pero con menor retención en sangre periférica, y es casi completamente excretado en 48 h (Masumoto et al., 1997). Además, forma complejos Se–S principalmente con albúmina plasmática, con una vida media de aproximadamente 7 h (Masumoto et al., 1997; Noguchi, 2016; Parnham & Sies, 2013), lo que reduce la fracción libre disponible para interactuar con blancos celulares. Esta elevada reactividad con nucleófilos biológicos es consistente con la cinética rápida observada frente a radicales peróxido ($k = 2.9 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) (Schöneich et al., 1990), sugiriendo que parte del compuesto podría ser inactivado químicamente antes de alcanzar concentraciones terapéuticas sostenidas.

En el contexto de *T. b. brucei*, cuya forma sanguínea es extracelular, la eficacia terapéutica requiere exposición plasmática prolongada y no solo una buena distribución tisular. Por lo tanto, si el compuesto 14 comparte las propiedades farmacocinéticas observadas para el EbSe, la concentración efectiva en el compartimento sanguíneo podría ser insuficiente bajo el régimen evaluado, resultando en reducción parcial de la carga parasitaria, pero sin alcanzar cura parasitológica. Esta interpretación es congruente con lo observado previamente para análogos benzisotiazolónicos, donde la actividad *in vitro* no siempre se traduce en eficacia curativa *in vivo* debido a limitaciones de estabilidad y biodisponibilidad sistémica (Lu et al., 2013). En consecuencia, será necesario estudiar la vida media, estabilidad plasmática, metabolismo hepático y distribución del compuesto 14, así como optimizar su formulación o dosificación para maximizar la exposición sistémica y evaluar plenamente su potencial terapéutico.

Más allá de la potencia *in vitro*, la identificación de compuestos líderes exitosos contra tripanosomátidos exige un equilibrio óptimo entre propiedades fisicoquímicas, perfil ADME (absorción, distribución, metabolismo y excreción) y seguridad (Jacobs et al., 2011). Estas condiciones son esenciales para garantizar la eficacia terapéutica en modelos preclínicos y clínicos. Asimismo, se resalta que la eficacia limitada observada con el compuesto 14 probablemente se debe a restricciones relacionadas con estas características en el régimen empleado, subrayando la necesidad de optimizar tanto la actividad biológica como el perfil farmacológico de los compuestos candidatos. De esta

manera, se podría potenciar el efecto observado in vivo y conservando la elevada selectividad que caracteriza a la serie de análogos aquí sintetizada y evaluada.

CAPÍTULO 5. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

El trabajo de esta tesis fue motivado por la necesidad de estudiar nuevas opciones terapéuticas para el tratamiento de las enfermedades causadas por los tripanosomátidos. La selección de la estructura benzisotiazolona como andamio sobre el cual se generaron análogos con diferentes sustituyentes estuvo basada en evidencias experimentales reportadas por otros (Joice et al., 2013; Lu et al., 2013; Sharlow et al., 2010) y nuestro propio grupo de investigación (Benítez et al., 2022a). El objetivo principal era generar derivados del EbS que lo superaran en potencia y selectividad, y que su modo de acción implicara la perturbación de la homeostasis redox dependiente de tioles de tripanosomátidos, mediante la inhibición de algunas de las enzimas esenciales de esta vía (como TR y TryS). Los abordajes empleados para cumplir con estos objetivos incluyeron la síntesis de los derivados de benzisotiazolonas, la evaluación de su actividad biológica sobre los estadios infectivos de diferentes especies de tripanosomátidos que son patógenas para el hombre y los animales (*T. brucei*, *T. cruzi* y *L. infantum*). Por la naturaleza química de los derivados e investigaciones previas, los estudios sobre el mecanismo de acción de los derivados más potentes y selectivos estuvieron sesgados a evaluar como éstos afectaban el balance redox del pool de tioles de bajo peso molecular en dos especies de tripanosomátidos diferentes (*T. brucei* y *L. infantum*) que fueron modificadas genéticamente para expresar un biosensor reportero redox. La concreción de varios de esos estudios requirió la puesta a punto de los ensayos de cribado sobre las formas intracelulares de *T. cruzi* y *L. infantum*, y la optimización del ensayo con las líneas reporteras del biosensor redox. De manera adicional, también se estudió una posible perturbación del consumo de glucosa en la forma sanguínea de *T. brucei*, estadio para el cual la glicólisis es la principal vía metabólica de generación de energía (ATP). Otros objetivos importantes del trabajo consistieron en estudiar a nivel bioquímico y estructural la interacción de los compuestos de interés con sus potenciales blancos moleculares, y a evaluar su capacidad terapéutica en un modelo pre-clínico de infección.

A continuación, se resumen los principales logros, hallazgos y conclusiones obtenidos en este trabajo de posgrado.

En primer lugar, se estableció y validó un bioensayo de bioluminiscencia en formato HTS para la forma amastigote (intracelular) de la línea *T. cruzi* TcDm28c-luc (Quiroga et al., 2024), que permitió cribar 24 benzisotiazolonas junto con fármacos de referencia (nifurtimox

y benznidazol; Quiroga et al., 2025). El ensayo resultó robusto y de gran reproducibilidad, con parámetros de control de calidad excelentes ($Z' = 0,77 \pm 0,06$; $CV = 6,28 \pm 0,47 \%$), obteniéndose valores de CE_{50} para NFX ($0,7 \mu M$) y BNZ ($2,2 \mu M$) que concordaron con los reportados en la literatura. Otro aspecto destacado de este bioensayo es que, comparado con aquellos basados en microscopía convencional, permitió detectar actividad significativa en compuestos con efectos calificados como marginales por recuento de amastigotas, mejorando de esta forma la asertividad en discriminar entre verdaderos hits y falsos positivos. También comparado a la técnica de recuento microscópico, el ensayo de bioluminiscencia redujo de manera significativa los tiempos de adquisición y análisis de datos (ejemplo de días/semanas a unas pocas horas) y la variabilidad experimental ($<15 \%$), la cual suele ser elevada en la técnica de recuento ($>20\%$). La universalidad de este ensayo para la evaluación de entidades químicas de gran diversidad quedó validada mediante el cribado de una mini-biblioteca de compuestos que incluyó 4 quinonas, 7 lactonas sesquiterpénicas, 2 esteroides, 2 paullonas, 1 complejo de platino, 1 rotenoide y 1 péptido; y, por un estudio asociado, que aplicó la misma metodología para la evaluación de 19 derivados de p-quinonas (Ballesteros-Casallas et al., 2023).

El desarrollo y validación del ensayo de bioluminiscencia con amastigotes intracelulares de *T. cruzi* usando la cepa Dm28c-luc constituye uno de los aportes centrales de este trabajo. La caracterización de la estabilidad de la señal demostró que, tras la adición del sustrato LUC y el reactivo de lisis, se obtiene una ventana estable de lectura entre 10 y 45 minutos, lo que permite procesar múltiples microplacas sin afectar la reproducibilidad de los resultados. Este aspecto es particularmente relevante en las metodologías de cribado de alto rendimiento (HTS), donde existe el manejo de lotes de muestras e introduce variaciones. La correlación lineal entre la intensidad lumínica y el porcentaje de células infectadas ($R^2 = 0,93$) refuerza la robustez de la metodología, mostrando que incluso infecciones bajas (10%, equivalentes a $\sim 4 \times 10^4$ amastigotes) producen señales cuantificables. A partir de estas estimaciones, se calculó que el límite de detección del sistema se aproxima a ~ 200 amastigotes viables por pocillo, lo que representa una sensibilidad comparable a otros sistemas de genes reporteros basados en luciferasa descritos en la literatura (Benítez et al., 2022).

Mediante el cribado fenotípico se identificó un alto porcentaje de análogos del EbS con actividad biológica diferencial frente a tripanosomátidos. El 83 % de los compuestos

evaluados calificaron como activos (hits, $CE_{50} \leq 10 \mu M$) contra la forma infectiva de *T. b. brucei*, alcanzando potencias en el rango nanomolar y altos índices de selectividad ($IS > 500$ para los más destacados). El análisis SAR reveló que el tamaño y la rigidez de los sustituyentes desempeñan un papel determinante en la bioactividad: sustituciones voluminosas o flexibles en N^2 redujeron drásticamente la potencia, mientras que grupos bencilo para-halogenados favorecieron la actividad, destacándose los derivados de la Serie II como los más potentes. En conjunto, estos resultados posicionan a las benzisotiazolonas como una plataforma promisoría para la optimización de nuevos agentes anti-*T. brucei*, con un balance favorable entre potencia y selectividad. El 32 % de los compuestos resultaron activos contra la forma amastigotes de *T. cruzi*, exhibiendo CE_{50} en el rango de 2–9 μM y destacándose principalmente los derivados fenil-sustituídos, mientras que ninguno de los compuestos con grupos bencilos, el EbS y el EbSe mostraron actividad significativa. Notablemente, los amastigotes de *L. infantum* se presentaron como el estadio más refractario a la acción citotóxica de las benzisotiazolonas, siendo que solo un compuesto (6) alcanzó el umbral de hit ($CE_{50} \leq 25 \mu M$). Este compuesto además fue el único análogo bioactivo contra las tres especies de tripanosomátidos aquí estudiadas. Estas diferencias de susceptibilidad confirmaron que *T. brucei* es el parásito más vulnerable a las benzisotiazolonas, seguido por *T. cruzi* y finalmente *L. infantum*. Esta susceptibilidad especie-específica sería consecuencia de las diferentes tasas replicativas, metabólicas y barreras físicas que ofrecen cada uno de estos sistemas celulares. Esto quedó en parte manifiesto por el hecho que varias de las benzisotiazolonas que carecieron de actividad contra amastigotes de *L. infantum* (forma intracelular residente en macrófagos y con baja tasa de proliferación) fueron significativamente activos contra la forma promastigota (extracelular y con mayor tasa de proliferación) de esta misma especie. En conjunto, estos resultados validaron a las benzisotiazolonas como una familia prometedora de compuestos antiparasitarios, aunque su eficacia depende estrechamente del contexto metabólico de cada especie.

El análisis de citotoxicidad sobre células de mamífero reveló que la mayoría de los derivados de benzisotiazolonas tienen un perfil de seguridad (in vitro) favorable, ya que la CC_{50} contra macrófagos es $> 200 \mu M$ y la citotoxicidad contra células Vero es menor al 10 % para una concentración de 100 μM . Varias de las benzisotiazolonas resultaron menos citotóxicas que los fármacos actualmente empleados para el tratamiento de las

tripanosomiasis humanas (nifurtimox y benznidazol). Entre ellos se destacan los derivados 6, 9, 12, 13, 16, 19, 21 y 23, con índices de selectividad (IS) superiores a 200, consolidándose como prototipos seguros y altamente prometedores en términos de balance toxicidad celular/actividad biológica. De manera sobresaliente, el compuesto 14 alcanzó un IS de 6772 frente a *T. brucei*, posicionándose como el candidato más selectivo de la serie y justificando su estudio en ensayos de eficacia terapéutica.

Se estableció una plataforma cuantitativa y escalable basada en el biosensor hGrx1-roGFP2 y citometría de flujo en formato de 96 pozos para evaluar el estado redox de *T. brucei* en tiempo real. La implementación de controles de calibración, normalización del porcentaje de oxidación y criterios estrictos de adquisición y gating permitió obtener mediciones comparables entre experimentos y distinguir señales biológicamente relevantes de artefactos asociados a toxicidad o interferencias experimentales.

Pese a su robustez, la plataforma requiere un manejo estricto de variables experimentales como la sensibilidad al vehículo, la solubilidad y estabilidad de los compuestos y la consistencia estadística en la adquisición, aspectos críticos para su reproducibilidad y potencial transferencia.

Los ensayos con la línea transgénica de *T. brucei* portadora del biosensor hGrx1-roGFP2 confirmaron que 13 de 19 benzisotiazolonas, junto con EbS, inducen una rápida (60 min) y significativa oxidación intracelular de los tioles de bajo peso molecular. Este hallazgo junto a los discutidos en los párrafos anteriores de alguna forma valida nuestra hipótesis inicial que proponía diseñar moléculas con alta selectividad y capaces de generar un desbalance redox intracelular en el patógeno. De los compuestos con mayor poder pro-oxidante se destacan el 11 (100% oxidación de biosensor, $CE_{50} = 0.091 \mu M$), seguido del 6 (79% oxidación de biosensor, $CE_{50} = 0,35 \mu M$), mientras que el EbS logró una oxidación del biosensor cercana al 27%. Se pudo observar que modificaciones estructurales puntuales, como la metilación en posición 7, pueden abolir completamente la actividad, mientras que sustituciones en N^2 o en el anillo fenólico pueden potenciarla, como el caso del compuesto 9 (65%), que duplicó la oxidación respecto al análogo no sustituido (EbS). Los derivados de la serie I (principalmente 4, 6, 7 y 8) presentaron una buena correlación entre potencia biológica y actividad pro-oxidante, no así los de la serie II (10-14). Esta correlación se redujo de manera significativa cuando el parámetro a comparar es la selectividad vs. actividad oxidante, notándose lo siguiente: los derivados fenilo (serie I)

presentaron mayor oxidación promedio ($58 \pm 15 \%$) pero menor selectividad ($IS = 50\text{--}281$), en contraste con los derivados bencilo (serie II), que mostraron oxidación moderada ($39 \pm 6\%$) con índices de selectividad más altos ($508\text{--}6772$). Esta información es de suma relevancia para realizar una optimización bioguiada de futuras moléculas. El hecho de haber realizado estos experimentos a un tiempo corto de exposición agrega valor a la comprensión del modo de acción de las benzisotiazolonas ya que permite realizar un diagnóstico temprano de la causa de pérdida de viabilidad. En ese sentido, podemos concluir que estas 13 benzisotiazolonas (1, 4, 6-14, 19 y 23), y el EbS, inducen una pérdida de viabilidad de la forma sanguínea de *T. brucei* por un efecto citotóxico (y no citostático) de origen oxidativo que tiene lugar en el citosol celular. Es importante aclarar que esta última afirmación se puede realizar porque el biosensor con el cual se monitorea el estado redox se localiza en este compartimiento subcelular. Los resultados obtenidos con la línea reportera redox de *L. infantum* sugieren que los compuestos 4 y 10-14 operarían por un mecanismo de acción similar sobre la forma promastigota de este parásito. No obstante, sería conveniente repetir estos experimentos a tiempos de incubación más cortos para confirmar que la causa primaria del efecto citotóxico sea el desbalance redox, ya que otras alteraciones estructurales (ejemplo: pérdida de integridad de membrana celular o lisosomal) o metabólicas (ejemplo: inhibición de la respiración mitocondrial o de la producción de ATP o NADPH) podrían derivar en un desbalance redox. En conjunto, los resultados demuestran que el estrés oxidativo constituye un mecanismo central —aunque no exclusivo— en la acción antitripanosomático de estas moléculas.

El estudio 3D-QSAR (CoMFA) permitió establecer una relación entre la actividad biológica frente a *T. brucei* y las propiedades estéricas y electrostáticas de 15 derivados de benzisotiazolona, alcanzando un modelo predictivo robusto ($q^2 = 0,62$). Se identificaron regiones donde ciertos tipos de sustituyentes (halógenos, nitro y metoxi en compuestos 6-13) potencian la actividad y otros la disminuyen (ésteres, compuestos 19 y 21). Por otro lado, los mapas electrostáticos sugirieron que sustituciones cargadas negativa o positivamente pueden modular la potencia, aunque la dispersión observada apunta a que los heteroátomos tienen un papel relevante en la modulación de la bioactividad. Contra *T. brucei*, la densidad electrónica y la brecha HOMO–LUMO no parecen ser factores que correlacionen con la actividad biológica. Esto en parte es contraintuitivo con la buena correlación observada para la serie I cuando se compara la potencia con la actividad oxidante de los compuestos. Sin embargo, lo que estos análisis dejan ver es que el efecto oxidante ejercido por estos compuestos no es consecuencia de una propiedad redox

intrínseca de los mismos. La incapacidad de varios de estos compuestos de inducir la oxidación directa del biosensor redox (ensayos in vitro on biosensor recombinante) de alguna manera aporta evidencia experimental a esta afirmación. Por el contrario, contra T. cruzi se observó que los compuestos con menores brechas HOMO-LUMO tienden a presentar mayor potencia biológica. Este hallazgo sugiere que la reactividad electrónica contribuye a la bioactividad diferencial entre especies, aunque no constituye el único factor determinante.

En base a la información brindada por los estudios del modo de acción y a reportes previos que destacan a la TryS y a la TR como dianas moleculares del EbSe y el EbS, se exploró esta posibilidad para las benzisotiazolonas con actividad redox. Los resultados confirman que EbS y EbSe son potentes inhibidores de TbTryS ($CI_{50} = 4-5 \mu M$), mientras que la mayoría de los análogos (10 de 12) fueron inactivos, incluso a concentraciones de $125 \mu M$. Entre las excepciones se encuentran el derivado 4 y 19, aunque ambos con potencias de inhibición un orden de magnitud menores que las de EbS y EbSe. Esto de alguna forma resalta la restrictiva selectividad estructural de la TryS de T. brucei. En ese sentido, la presencia de un grupo aromático no polar en N^2 (fenilo) tuvo un efecto favorable para la interacción enzima-inhibidor, mientras que su ausencia, modificación o reemplazo abolieron la actividad inhibitoria. Si bien ninguno de los análogos puede considerarse un inhibidor promisorio de TryS, los estudios de la unión covalente de EbS a Cys270 realizados por modelado computacional sentaron las bases moleculares para comprender el mecanismo alostérico que modifica la dinámica y volumen de los sitios de unión a sustratos (ATP/GSH/espermidina) y de un elemento no estructurado de esta proteína que cumple un rol clave en la catálisis. Esto abre una vía de diseño alternativo, enfocada en warheads y sustituyentes que estabilicen conformaciones menos competentes catalíticamente (p. ej., apertura del bolsillo ATP y cierre del de SP) o bien que interfieran con la función del loop catalítico. La consistencia entre los modelos I-TASSER, el docking covalente, las simulaciones de dinámica molecular y los ensayos de inhibición con el mutante C270A de TbTryS apoyan esta hipótesis. No obstante, futuras validaciones del modelo deberán incluir simulaciones con selenio explícito (en el caso que haya interés en desarrollar análogos del EbSe), estudios dirigidos a los loops 337–346 y 545–560 como nodos alostéricos y la caracterización de los parámetros cinéticos del mutante C270A.

Solo a concentraciones y relaciones enzima-inhibidor relativamente altas ($68 \mu M$ y 1:200) unos pocos derivados fueron capaces de inhibir de manera significativa a la TcTR

(6, 7 y EbS; >80 % inhibición). Al igual que contra la TryS, las benzisotiazolonas actúan como inhibidores lentos e irreversibles de la TcTR que se unen a esta enzima de manera covalente mediante la formación de un heterodisulfuro reducible por DTT, lo cual recupera parcialmente la actividad enzimática. Tomando como compuestos de referencia al EbS y al 7, y aplicando un análisis por espectrometría de masas, se pudo identificar el residuo que es blanco de dicha modificación, la Cys221. Estos resultados convalidan estudios previos que señalaban que una o dos moléculas de EbS se unen a la TcTR luego de reaccionar (Lu et al., 2013), pero que no habían abordado la identificación del residuo blanco. Los estudios estructurales situaron a C221 en el bolsillo de adenina de NADP(H)⁺, una región conservada en TcTR de tripanosomátidos, pero ausente en GR, lo que aporta una base selectiva para la inhibición covalente de TR. A diferencia de lo observado para TryS, la unión de la benzisotiazolona a este sitio ejerce un impedimento estérico directo sobre la unión de una porción importante de la molécula de NADPH. El análisis del sitio de unión de la benzisotiazolona a TryS y TR permitió identificar ciertas características estructurales y fisicoquímicas comunes, como ser: se trata de una hendidura con marcada planaridad en las paredes longitudinales que las forman y una buena carga de residuos hidrofóbicos y polares, en el cual se inserta un residuo de cisteína parcialmente expuesto al solvente. Esto sugiere que los compuestos deben interaccionar y posicionarse en este sitio previo a poder reaccionar con el tiol, el cual además debería desprotonarse para, en la forma tiolato, realizar un ataque nucleofílico sobre el enlace S-N de la benzisotiazolona. Si bien no fue investigado en esta tesis, alguno de los residuos que conforman la pared polar de esta cavidad podría eventualmente participar en la ionización del tiol de estas cisteínas para facilitar la reacción con las benzisotiazolonas. Este escenario molecular concuerda en gran medida con el mecanismo de inhibición lenta que estos compuestos ejercen sobre estas dos proteínas.

Los datos experimentales obtenidos en los ensayos de inhibición con TR y TryS sugieren que estas enzimas, claves en la mantención del balance redox de los tioles de bajo peso molecular en estos patógenos, no serían las dianas moleculares primarias de las benzisotiazolonas, al menos en *T. brucei*. Distintos argumentos sustentan esta afirmación. Por un lado, la marcada disparidad entre la potencia biológica de los compuestos (CE₅₀ nM o un dígito μM) y la inhibición de estas enzimas (con la excepción del EbS, CI₅₀ dos dígitos μM), y la rápida generación de estrés oxidativo. En este sentido, se ha comprobado que para generar un desbalance redox marcado en el pool de tioles de bajo peso molecular se precisa de una inhibición sostenida de la TryS (48 h al menos; (Comini et al., 2004a,

Ariyanayagam et al. 2005) debido a la baja tasa de reposición de estos metabolitos y a la alta eficiencia catalítica de la TR que mantiene al pool de T(SH)₂ (y por consiguiente al de GSH, a través de la Grx o TXN). Por otro lado, tanto estudios genéticos como de flujos metabólicos validados experimentalmente han demostrado que la TR no es el cuello de botella en la mantención del balance redox intracelular (Olin-Sandoval et al., 2010) y que para alterar esto se requiere de una inhibición casi completa de la enzima (>95%; Krieger et al., 2000). Esto plantea el interrogante sobre cuáles son los blancos moleculares primarios de estos compuestos cuya inhibición (o activación, ejemplo: oxidasas) deriva en la marcada depleción de tioles de bajo peso molecular. Un dato importante de los estudios biológicos fue que las especies o estadios con mayor tasa metabólica o proliferativa fueron más susceptibles a la acción citotóxica de las benzisotiazolonas. Una hipótesis interesante y alineada con esa evidencia es que las benzisotiazolonas tengan blancos moleculares específicos y críticos para la viabilidad de células con alta tasa replicativa, a los cuales podrían inactivar de manera permanente o con los cuales podrían actuar como sustratos subversivos o cicladores redox que desacoplarían la transferencia de electrones hacia los sustratos nativos derivándolas al O₂ para generar ROS.

Otro blanco molecular explorado en esta tesis fue el metabolismo de la glucosa. Esto se justificaba por las siguientes razones: el EbSe había sido reportado como inhibidor de la hexoquinasa de *T. brucei* (Joice et al., 2013), ii) esta vía metabólica es la principal fuente de generación de ATP para la forma infectiva de este patógeno (Bringaud et al., 2006), iii) la síntesis de GSH y T(SH)₂ dependen del suministro de ATP (Meister & Anderson, 1983), por lo que niveles bajos de este nucleótido deberían generar una depleción en los niveles de estos tioles. Los ensayos de consumo de glucosa confirmaron que, a diferencia del EbSe (45% de reducción en el consumo de glucosa), el EbS y sus análogos no alteraron significativamente este proceso metabólico en *T. brucei*. En consecuencia, estos resultados permiten descartar al metabolismo de la glucosa como blanco primario de la actividad anti-*T. brucei* de estos compuestos y resaltan la necesidad de investigaciones futuras que aborden la identificación de las proteínas y procesos celulares afectados por esta familia de compuestos.

El ensayo terapéutico en el modelo murino de tripanosomiasis africana aguda demostró que el compuesto 14 fue bien tolerado por animales no infectados, al no evidenciarse signos de toxicidad clínica aguda luego de una administración monodosis durante cuatro días. Bajo este mismo régimen terapéutico, este compuesto reprimió de

manera marginal la proliferación parasitaria en animales infectados. No obstante, fue significativa la extensión en la supervivencia media de los animales (de 12 a 17 días) que alcanzó este tratamiento respecto al grupo control al cual se le administró solo vehículo. Este efecto positivo puede ser consecuencia de la reducción parcial de la carga parasitaria que el compuesto produjo en una fase crítica del proceso infeccioso o bien a un efecto off-target sobre la fisiología del huésped. A pesar de destacada actividad in vitro ($CE_{50} = 0,022 \mu M$), la escasa capacidad del compuesto para eliminar in vivo al patógeno indica problemas de biodisponibilidad del mismo en los sitios colonizados por *T. b. brucei*. A diferencia de *T. cruzi* y *Leishmania*, las especies de tripanosoma africano son parásitos extracelulares que habitan en diferentes fluidos del hospedador (sangre, linfa, líquido intersticial y líquido cefalo-raquídeo). Esto tiene importantes implicancias desde el punto de vista farmacológico ya que desde el punto de vista fisicoquímico el compuesto debe lograr un buen balance entre capacidad de permear membranas (para llegar al interior del parásito o atravesar otras barreras fisiológicas como el endotelio vascular, la barrera hematoencefálica o el epitelio intestinal, si fuera administrado por vía oral) y permanecer en el medio extracelular para interactuar con el patógeno. Estudiar la farmacocinética del compuesto 14, así como de otros análogos con buena potencia y selectividad, será de suma relevancia para ajustar los regímenes terapéuticos en el modelo de infección de tripanosomiasis aguda y crónica, o para explorar su efecto en un modelo murino de la enfermedad de Chagas, el cual exige una buena distribución tisular del compuesto en órganos y tejido blanco (corazón, músculo liso, entre otros).

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral consolidan a las benzisotiazolonas como una familia prometedora de compuestos multi-diana frente a tripanosomátidos y, al mismo tiempo, evidencian las limitaciones y oportunidades que guiarán futuras etapas de investigación.

En primer lugar, consideramos que la optimización estructural y farmacológica de los compuestos más destacados (6, 7, 11 y 14) constituye un paso esencial. La integración de nuestros modelos QSAR y de dinámica molecular, acoplados a un nuevo ciclo de síntesis permitirá desarrollar nuevas moléculas con sustituyentes clave que mejoren su estabilidad metabólica, biodisponibilidad y perfil farmacocinético.

En segundo lugar, reconocemos que, aunque el desbalance redox emergió como un mecanismo central, la falta de correlación en ciertos clústeres sugiere la existencia de mecanismos de acción adicionales aún no caracterizados. La aplicación de herramientas como proteómica química y metabolómica redox podría permitirnos mapear interacciones covalentes y dianas secundarias, ampliando la comprensión del modo de acción de esta serie.

Asimismo, la limitada eficacia terapéutica observada in vivo para el compuesto 14 pone de manifiesto la necesidad de profundizar en estudios de farmacocinética y formulación, además de ensayos en modelos animales crónicos y estrategias de combinación con terapias existentes. También consideramos que podría ser valioso extender los estudios de eficacia terapéutica hacia otras de las benzisotiazolonas que mostraron muy buena potencia y selectividad, y que poseen características fisicoquímicas ligeramente diferentes a las del compuesto 14. Otro aspecto que amerita ser abordado en investigaciones futuras es evaluar la eficacia terapéutica de los compuestos más activos contra *T. cruzi* en un modelo murino de enfermedad de Chagas, ya que la infección por este patógeno presenta una distribución tisular completamente diferentes a la de *T. brucei*. Estos estudios son indispensables para avanzar hacia una validación preclínica sólida.

Por otro lado, las plataformas metodológicas desarrolladas en este trabajo —incluyendo el bioensayo de bioluminiscencia en formato HTS, los biosensores redox y la caracterización enzimática— ofrecen un valor agregado que trasciende los objetivos iniciales. En el futuro, estas herramientas podrán ser transferidas al estudio de otros protozoarios de interés en salud pública, contribuyendo al descubrimiento racional de compuestos con espectro antiparasitario más amplio.

BIBLIOGRAFIA

- (Ginebra: WHO, 2022). (2022). Ensuring the integration of refugees and migrants in *immunization policies, planning and service delivery globally, Box 2* (“Global data on refugees and migrants”). NCBI Bookshelf, NBK583126.
- (OMS), W. H. O. (2023). Leishmaniasis. Leishmaniasis. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- Acardi, S. A., Rago, M. V, Liotta, D. J., Fernandez-Duque, E., & Salomón, O. D. (2013). Leishmania (Viannia) DNA detection by PCR-RFLP and sequencing in free-ranging owl monkeys (*Aotus azarai azarai*) from Formosa, Argentina. *Veterinary Parasitology*, 193(1), 256–259. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.012>
- Adagu, I. S., Nolder, D., Warhurst, D. C., & Rossignol, J.-F. (2002). In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(1), 103–111. <https://doi.org/10.1093/jac/49.1.103>
- Adler-moore, J. P., & Proffitt, R. T. (1993). Development, Characterization, Efficacy and Mode of Action of Ambisome, A Unilamellar Liposomal Formulation of Amphotericin B. *Journal of Liposome Research*, 3(3), 429–450. <https://doi.org/10.3109/08982109309150729>
- Akhoundi, M., Kuhls, K., Cannet, A., Votýpka, J., Marty, P., Delaunay, P., & Sereno, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. In *PLoS Neglected Tropical Diseases* (Vol. 10, Issue 3). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>
- Akinosoglou, K., Rigopoulos, E. A., Papageorgiou, D., Schinas, G., Polyzou, E.,

- Dimopoulou, E., Gogos, C., & Dimopoulos, G. (2024). Amphotericin B in the Era of New Antifungals: Where Will It Stand? *Journal of Fungi*, 10(4). <https://doi.org/10.3390/jof10040278>
- Alcón-Calderón, M., de Lucio, H., García-Soriano, J. C., Revuelto, A., de Castro, S., López-Gutiérrez, C., San-Félix, A., Quesada, E., Gago, F., Camarasa, M.-J., Jiménez-Ruiz, A., & Velázquez, S. (2022). Identification of *L. infantum* trypanothione synthetase inhibitors with leishmanicidal activity from a (non-biased) in-house chemical library. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 243, 114675. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114675>
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., & de Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. In *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Angiulli, G., Lantella, A., Forte, E., Angelucci, F., Colotti, G., Ilari, A., & Malatesta, F. (2015). *Leishmania infantum* trypanothione reductase is a promiscuous enzyme carrying an NADPH:O₂ oxidoreductase activity shared by glutathione reductase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1850(9), 1891–1897. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2015.05.022>
- Antoine, J.-C., Prina, E., Lang, T., & Courret, N. (1998). The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends in Microbiology*, 6(10), 392–401. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(98\)01324-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0966-842X(98)01324-9)
- Arganda-Carreras, I., Kaynig, V., Rueden, C., Eliceiri, K. W., Schindelin, J., Cardona, A., & Sebastian Seung, H. (2017). Trainable Weka Segmentation: a machine learning tool for microscopy pixel classification. *Bioinformatics*, 33(15), 2424–2426. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx180>

- Arias, D. G., Cabeza, M. S., Echarren, M. L., Faral-Tello, P., Iglesias, A. A., Robello, C., & Guerrero, S. A. (2020). On the functionality of a methionine sulfoxide reductase B from *Trypanosoma cruzi*. *Free Radical Biology & Medicine*, 158, 96–114. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.06.035>
- Arias, D. G., Cabeza, M. S., Erben, E. D., Carranza, P. G., Lujan, H. D., Téllez Iñón, M. T., Iglesias, A. A., & Guerrero, S. A. (2011). Functional characterization of methionine sulfoxide reductase A from *Trypanosoma* spp. *Free Radical Biology & Medicine*, 50(1), 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.10.695>
- Arias, D. G., Marquez, V. E., Chiribao, M. L., Gadelha, F. R., Robello, C., Iglesias, A. A., & Guerrero, S. A. (2013). Redox metabolism in *Trypanosoma cruzi*: functional characterization of tryparedoxins revisited. *Free Radical Biology & Medicine*, 63, 65–77. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.04.036>
- Arias, D. G., Piñeyro, M. D., Iglesias, A. A., Guerrero, S. A., & Robello, C. (2015). Molecular characterization and interactome analysis of *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin II. *Journal of Proteomics*, 120, 95–104. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.001>
- Ariyanayagam, M. R., Oza, S. L., Guthrie, M. L. S., & Fairlamb, A. H. (2005). Phenotypic analysis of trypanothione synthetase knockdown in the African trypanosome. *The Biochemical Journal*, 391(Pt 2), 425–432. <https://doi.org/10.1042/BJ20050911>
- Backman, T. W. H., Cao, Y., & Girke, T. (2011). ChemMine tools: An online service for analyzing and clustering small molecules. *Nucleic Acids Research*, 39(SUPPL. 2), 486–491. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr320>
- Baek, M., DiMaio, F., Anishchenko, I., Dauparas, J., Ovchinnikov, S., Lee, G. R., Wang, J., Cong, Q., Kinch, L. N., Schaeffer, R. D., Millán, C., Park, H., Adams, C., Glassman, C. R., DeGiovanni, A., Pereira, J. H., Rodrigues, A. V, van Dijk, A. A., Ebrecht, A. C., ...

- Baker, D. (2021). Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. *Science*, 373(6557), 871–876. <https://doi.org/10.1126/science.abj8754>
- Baginski, M., Czub, J., & Sternal, K. (2006). Interaction of amphotericin B and its selected derivatives with membranes: molecular modeling studies. *The Chemical Record*, 6(6), 320–332. <https://doi.org/10.1002/tcr.20096>
- Baiocco, P., Colotti, G., Franceschini, S., & Ilari, A. (2009). Molecular basis of antimony treatment in leishmaniasis. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(8), 2603–2612. <https://doi.org/10.1021/jm900185q>
- Baiocco, P., Poce, G., Alfonso, S., Cocozza, M., Porretta, G. C., Colotti, G., Biava, M., Moraca, F., Botta, M., Yardley, V., Fiorillo, A., Lantella, A., Malatesta, F., & Ilari, A. (2013). Inhibition of *Leishmania infantum* Trypanothione Reductase by Azole-Based Compounds: a Comparative Analysis with Its Physiological Substrate by X-ray Crystallography. *ChemMedChem*, 8(7), 1175–1183. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201300176>
- Ballesteros-Casallas, A., Quiroga, C., Ortiz, C., Benítez, D., Denis, P. A., Figueroa, D., Salas, C. O., Bertrand, J., Tapia, R. A., Sánchez, P., Miscione, G. Pietro, Comini, M. A., & Paulino, M. (2023). Mode of action of p-quinone derivatives with trypanocidal activity studied by experimental and in silico models. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 246, 114926. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114926>
- Bargues, M. D., Klisiowicz, D. R., Gonzalez-Candelas, F., Ramsey, J. M., Monroy, C., Ponce, C., Salazar-Schettino, P. M., Panzera, F., Abad-Franch, F., Sousa, O. E., Schofield, C. J., Dujardin, J. P., Guhl, F., & Mas-Coma, S. (2008). Phylogeography and genetic variation of *Triatoma dimidiata*, the main Chagas disease vector in Central

- America, and its position within the genus *Triatoma*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 2(5), e233. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000233>
- Barrett, M. P., Priotto, G., Franco, J. R., Lejon, V., & Lindner, A. K. (2024). Elimination of human African trypanosomiasis: The long last mile. In *PLoS neglected tropical diseases* (Vol. 18, Issue 5, p. e0012091). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012091>
- Battista, T., Colotti, G., Ilari, A., & Fiorillo, A. (2020). Targeting Trypanothione Reductase, a Key Enzyme in the Redox Trypanosomatid Metabolism, to Develop New Drugs against Leishmaniasis and Trypanosomiasis. *Molecules*, 25(8). <https://doi.org/10.3390/molecules25081924>
- Benaim, B. G., & Garcia, C. R. S. (2011). Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis - a review. *Tropical Biomedicine*, 28 3, 471–481. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:1229565>
- Benítez, D., Dibello, E., Bonilla, M., & Comini, M. A. (2020). A simple, robust, and affordable bioluminescent assay for drug discovery against infective African trypanosomes. *Drug Development Research*. <https://doi.org/10.1002/ddr.21634>
- Benítez, D., Franco, J., Sardi, F., Leyva, A., Durán, R., Choi, G., Yang, G., Kim, T., Kim, N., Heo, J., Kim, K., Lee, H., Choi, I., Radu, C., Shum, D., No, J. H., & Comini, M. A. (2022a). Drug-like molecules with anti-trypanothione synthetase activity identified by high throughput screening. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37(1), 912–929. <https://doi.org/10.1080/14756366.2022.2045590>
- Benítez, D., Franco, J., Sardi, F., Leyva, A., Durán, R., Choi, G., Yang, G., Kim, T., Kim, N., Heo, J., Kim, K., Lee, H., Choi, I., Radu, C., Shum, D., No, J. H., & Comini, M. A. (2022b). Drug-like molecules with anti-trypanothione synthetase activity identified by high throughput screening. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*,

37(1), 912–929. <https://doi.org/10.1080/14756366.2022.2045590>

Benítez, D., Medeiros, A., Fiestas, L., Panozzo-Zenere, E. A., Maiwald, F., Prousis, K. C., Roussaki, M., Calogeropoulou, T., Detsi, A., Jaeger, T., Šarlauskas, J., Peterlin Mašič, L., Kunick, C., Labadie, G. R., Flohé, L., & Comini, M. A. (2016). Identification of Novel Chemical Scaffolds Inhibiting Trypanothione Synthetase from Pathogenic Trypanosomatids. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004617>

Benítez, D., Medeiros, A., Quiroga, C., & Comini, M. A. (2022). A Simple Bioluminescent Assay for the Screening of Cytotoxic Molecules Against the Intracellular Form of *Leishmania infantum*. In S.-B. Kim (Ed.), *Bioluminescence: Methods and Protocols*, Volume 1 (pp. 127–147). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2453-1_10

Bern, C. (2015). Chagas' Disease. *The New England Journal of Medicine*, 373(5), 456–466. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1410150>

Bern, C., Messenger, L. A., Whitman, J. D., & Maguire, J. H. (2019). Chagas Disease in the United States: a Public Health Approach. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(1). <https://doi.org/10.1128/CMR.00023-19>

Bogacz, M., Dirdjaja, N., Wimmer, B., Habich, C., & Krauth-Siegel, R. L. (2020). The mitochondrial peroxiredoxin displays distinct roles in different developmental stages of African trypanosomes. *Redox Biology*, 34, 101547. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2020.101547>

Boiani, M., Piacenza, L., Hernández, P., Boiani, L., Cerecetto, H., González, M., & Denicola, A. (2010). Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: Is oxidative stress involved? *Biochemical Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.02.009>

- Bond, C. S., Zhang, Y., Berriman, M., Cunningham, M. L., Fairlamb, A. H., & Hunter, W. N. (1999). Crystal structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase in complex with trypanothione, and the structure-based discovery of new natural product inhibitors. *Structure*, 7(1), 81–89. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(99\)80011-2](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(99)80011-2)
- Bonney, K. M., Luthringer, D. J., Kim, S. A., Garg, N. J., & Engman, D. M. (2019). Pathology and Pathogenesis of Chagas Heart Disease. *Annual Review of Pathology*, 14, 421–447. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043711>
- Bonse, S., Santelli-Rouvier, C., Barbe, J., & Krauth-Siegel, R. L. (1999). Inhibition of *Trypanosoma cruzi* Trypanothione Reductase by Acridines: Kinetic Studies and Structure–Activity Relationships. *Journal of Medicinal Chemistry*, 42(26), 5448–5454. <https://doi.org/10.1021/jm990386s>
- Bora, K., Sarma, M., Kanaujia, S. P., & Dubey, V. K. (2023). Dual-target drugs against *Leishmania donovani* for potential novel therapeutics. *Scientific Reports*, 13(1), 18363. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-45448-x>
- Bot, C., Hall, B. S., Bashir, N., Taylor, M. C., Helsby, N. A., & Wilkinson, S. R. (2010). Trypanocidal activity of aziridinylnitrobenzamide prodrugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(10), 4246–4252. <https://doi.org/10.1128/AAC.00800-10>
- Bray, P. G., Barrett, M. P., Ward, S. A., & de Koning, H. P. (2003). Pentamidine uptake and resistance in pathogenic protozoa: past, present and future. *Trends in Parasitology*, 19(5), 232–239. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(03\)00069-2](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(03)00069-2)
- Brener, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology*, 27, 347–382. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.27.100173.002023>

- Bringaud, F., Rivière, L., & Coustou, V. (2006). Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 149(1), 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.03.017>
- Brun, R., Blum, J., Chappuis, F., & Burri, C. (2010). Human African trypanosomiasis. *The Lancet*, 375(9709), 148–159. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60829-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60829-1)
- Burri, C. (2010). Chemotherapy against human African trypanosomiasis: is there a road to success? *Parasitology*, 137(14), 1987–1994. <https://doi.org/10.1017/S0031182010001137>
- Ca, J., Kumar P, V. B., Kandī, V., N, G., K, S., Dharshini, D., Batchu, S. V. C., & Bhanu, P. (2024). Neglected Tropical Diseases: A Comprehensive Review. *Cureus*, 16(2), e53933. <https://doi.org/10.7759/cureus.53933>
- Camargo, E. (1963). Growth and Differentiation in *Trypanosoma Cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 6, 93–100.
- Castro, H., Budde, H., Flohé, L., Hofmann, B., Lünsdorf, H., Wissing, J., & Tomás, A. M. (2002). Specificity and kinetics of a mitochondrial peroxiredoxin of *Leishmania infantum*. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(11), 1563–1574. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(02\)01088-2](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(02)01088-2)
- Castro, H., Romao, S., Carvalho, S., Teixeira, F., Sousa, C., & Tomás, A. M. (2010). Mitochondrial Redox Metabolism in Trypanosomatids Is Independent of Tryparedoxin Activity. *PLOS ONE*, 5(9), 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012607>
- Cerecetto, H., & González, M. (2011). Antiparasitic Prodrug Nifurtimox: Revisiting its Activation Mechanism. *Future Microbiology*, 6(8), 847–850. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.74>

- Ceylan, S., Seidel, V., Ziebart, N., Berndt, C., Dirdjaja, N., & Krauth-Siegel, R. L. (2010). The Dithiol Glutaredoxins of African Trypanosomes Have Distinct Roles and Are Closely Linked to the Unique Trypanothione Metabolism*. *Journal of Biological Chemistry*, 285(45), 35224–35237. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M110.165860>
- Chakravarty, J., & Sundar, S. (2010). Drug resistance in leishmaniasis. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(2), 167–176. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.62887>
- Chatelain, E. (2015). Chagas disease drug discovery: toward a new era. *Journal of Biomolecular Screening*, 20(1), 22–35. <https://doi.org/10.1177/1087057114550585>
- Chatelain, E., & Ioset, J. R. (2011). Drug discovery and development for neglected diseases: The DNDi model. *Drug Design, Development and Therapy*, 5, 175–181. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S16381>
- Chin-Hong, P. V, Schwartz, B. S., Bern, C., Montgomery, S. P., Kontak, S., Kubak, B., Morris, M. I., Nowicki, M., Wright, C., & Ison, M. G. (2011). Screening and treatment of chagas disease in organ transplant recipients in the United States: recommendations from the chagas in transplant working group. *American Journal of Transplantation : Official Journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*, 11(4), 672–680. <https://doi.org/10.1111/j.1600-6143.2011.03444.x>
- Comini, M. (2018). Biosynthesis of Polyamine–Glutathione Derivatives in Enterobacteria and Kinetoplastida (pp. 285–305). <https://doi.org/10.1201/9781351261760-17>
- Comini, M. A., Guerrero, S. A., Haile, S., Menge, U., Lünsdorf, H., & Flohé, L. (2004a). Validation of Trypanosoma brucei trypanothione synthetase as drug target. *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.008>

- Comini, M. A., Guerrero, S. A., Haile, S., Menge, U., Lünsdorf, H., & Flohé, L. (2004b). Validation of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase as drug target. *Free Radical Biology & Medicine*, 36(10), 1289–1302. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.02.008>
- Comini, M. A., Krauth-Siegel, R. L., & Bellanda, M. (2013). Mono- and Dithiol Glutaredoxins in the Trypanothione-Based Redox Metabolism of Pathogenic Trypanosomes. *Antioxidants & Redox Signaling*, 19(7), 708–722. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4932>
- Comini, M. A., Krauth-Siegel, R. L., & Flohé, L. (2007). Depletion of the thioredoxin homologue tryparedoxin impairs antioxidative defence in African trypanosomes. *Biochemical Journal*. <https://doi.org/10.1042/bj20061341>
- Comini, M., Menge, U., Wissing, J., & Flohé, L. (2005). Trypanothione Synthesis in *Crithidia* Revisited*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(8), 6850–6860. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M404486200>
- Comporti, M. (1987). Glutathione depleting agents and lipid peroxidation. *Chemistry and Physics of Lipids*, 45 2-4, 143–169. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:45126658>
- Consonni, V., Ballabio, D., & Todeschini, R. (2009). Comments on the Definition of the Q2 Parameter for QSAR Validation. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 49(7), 1669–1678. <https://doi.org/10.1021/ci900115y>
- Costa, F. C., Francisco, A. F., Jayawardhana, S., Calderano, S. G., Lewis, M. D., Olmo, F., Beneke, T., Gluenz, E., Sunter, J., Dean, S., Kelly, J. M., & Taylor, M. C. (2018). Expanding the toolbox for *Trypanosoma cruzi*: A parasite line incorporating a bioluminescence-fluorescence dual reporter and streamlined CRISPR/Cas9

- functionality for rapid in vivo localisation and phenotyping. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 12(4), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006388>
- Counihan, J. L., Ford, B., & Nomura, D. K. (2016). Mapping proteome-wide interactions of reactive chemicals using chemoproteomic platforms. *Current Opinion in Chemical Biology*, 30, 68–76. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2015.11.007>
- Coura, J. R., & Castro, S. L. de. (2002). A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(1), 3–24. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000100001>
- Coustou, V., Biran, M., Breton, M., Guegan, F., Rivière, L., Plazolles, N., Nolan, D., Barrett, M. P., Franconi, J.-M., & Bringaud, F. (2008). Glucose-induced Remodeling of Intermediary and Energy Metabolism in Procyclic *Trypanosoma brucei**. *Journal of Biological Chemistry*, 283(24), 16342–16354. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709592200>
- Coyne, P. E. J. (2001). The eflornithine story. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 45(5), 784–786. <https://doi.org/10.1067/mjd.2001.117853>
- Cucunubá, Z. M., Gutiérrez-Romero, S. A., Ramírez, J.-D., Velásquez-Ortiz, N., Ceccarelli, S., Parra-Henao, G., Henao-Martínez, A. F., Rabinovich, J., Basáñez, M.-G., Nouvellet, P., & Abad-Franch, F. (2024). The epidemiology of Chagas disease in the Americas. *The Lancet Regional Health – Americas*, 37. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2024.100881>
- Cunningham, M. L., & Fairlamb, A. H. (1995). Trypanothione Reductase from *Leishmania donovani*. *European Journal of Biochemistry*, 230(2), 460–468. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1995.0460h.x>
- Daghero, H., Pagotto, R., Quiroga, C., Medeiros, A., Comini, M. A., & Bollati-Fogolín, M.

- (2023). Murine colon organoids as a novel model to study *Trypanosoma cruzi* infection and interactions with the intestinal epithelium. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1082524>
- Dandugudumula, R., Fischer-Weinberger, R., & Zilberstein, D. (2022). Morphogenesis Dynamics in *Leishmania* Differentiation. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 11(9). <https://doi.org/10.3390/pathogens11090952>
- de Lucio, H., García-Marín, J., Sánchez-Alonso, P., García-Soriano, J. C., Toro, M. Á., Vaquero, J. J., Gago, F., Alajarín, R., & Jiménez-Ruiz, A. (2022). piridazino–pirrolo–quinoxalium zino-pyrrolo-quinoxalium salts as highly potent and selective leishmanicidal agents targeting trypanothione reductase. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 227, 113915. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113915>
- Dekant, W., & Vamvakas, S. (1993). Glutathione-dependent bioactivation of xenobiotics. *Xenobiotica; the Fate of Foreign Compounds in Biological Systems*, 23 8, 873–887. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:5675601>
- Demoro, B., Sarniguet, C., Sánchez-Delgado, R., Rossi, M., Liebowitz, D., Caruso, F., Olea-Azar, C., Moreno, V., Medeiros, A., Comini, M. A., Otero, L., & Gambino, D. (2012). New organoruthenium complexes with bioactive thiosemicarbazones as co-ligands: Potential anti-trypanosomal agents. *Dalton Transactions*. <https://doi.org/10.1039/c1dt11519g>
- Depypere, M., Sliepen, J., Onsea, J., Debaveye, Y., Govaert, G. A. M., IJpma, F. F. A., Zimmerli, W., & Metsemakers, W.-J. (2022). The Microbiological Etiology of Fracture-Related Infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 934485. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.934485>

- Deribe, K. (2015). Neglected tropical disease targets must include morbidity. In *The Lancet. Global health* (Vol. 3, Issue 10, p. e596). [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(15\)00185-0](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(15)00185-0)
- DNDi. (n.d.). Retrieved April 21, 2025, from <https://dndi.org/>
- DNDi. (2022). DNDi. <https://dndi.org/diseases/chagas/>
- DNDi The Drugs for Neglected Diseases initiative. (2024a). Fexinidazole: The first all-oral treatment for sleeping sickness. <https://dndi.org/research-development/portfolio/fexinidazole/>
- DNDi The Drugs for Neglected Diseases initiative. (2024b). La FDA estadounidense aprueba el primer tratamiento totalmente oral para la enfermedad del sueño. <https://dndi.org/es/releases/2021/la-fda-estadounidense-aprueba-el-primer-tratamiento-totalmente-oral-para-la-enfermedad-del-sueno/>
- Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., & Moreno, S. N. J. (2005). Acidocalcisomes? conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 251–261. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1097>
- Dormeyer, M., Reckenfelderbäumer, N., Ludemann, H., & Krauth-Siegel, R. L. (2001). Trypanothione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(14), 10602–10606. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010352200>
- Dorn, P. L., Monroy, C., & Curtis, A. (2007). *Triatoma dimidiata* (Latreille, 1811): A review of its diversity across its geographic range and the relationship among populations. *Infection, Genetics and Evolution*, 7(2), 343–352. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.meegid.2006.10.001>

- Dousti, M., Hosseinpour, M., D Ghasemi, N., Mirfakhraee, H., Rajabi, S. K., Rashidi, S., & Hatam, G. (2023). The potential role of protein disulfide isomerases (PDIs) during parasitic infections: a focus on *Leishmania* spp. *Pathogens and Disease*, 81. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftad032>
- DrugBank. (2024). Eflornithine (DB06243). <https://www.drugs.com/newdrugs/fda-approves-iwilfin-eflornithine-maintenance-therapy-risk-neuroblastoma-6159.html>
- Durrant, J. D., Votapka, L., Sørensen, J., & Amaro, R. E. (2014). POVME 2.0: An Enhanced Tool for Determining Pocket Shape and Volume Characteristics. *Journal of Chemical Theory and Computation*, 10(11), 5047–5056. <https://doi.org/10.1021/ct500381c>
- Elso, O. G., Bivona, A. E., Sanchez Alberti, A., Cerny, N., Fabian, L., Morales, C., Catalán, C. A. N., Malchiodi, E. L., Cazorla, S. I., & Sülsen, V. P. (2020). Trypanocidal Activity of Four Sesquiterpene Lactones Isolated from Asteraceae Species. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(9). <https://doi.org/10.3390/molecules25092014>
- Fairlamb, A. H. (2003). Chemotherapy of human African trypanosomiasis: current and future prospects. *Trends in Parasitology*, 19(11), 488–494. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2003.09.002>
- Fairlamb, A. H., Blackburn, P., Ulrich, P., Chait, B. T., & Cerami, A. (1985). Trypanothione: A Novel Bis(glutathionyl)spermidine Cofactor for Glutathione Reductase in Trypanosomatids. *Science*, 227(4693), 1485–1487. <https://doi.org/10.1126/science.3883489>
- Fairlamb, A. H., & Cerami, A. (1992). Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida. *Annual Review of Microbiology*, 46, 695–729. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.46.100192.003403>
- Fairlamb, A. H., Henderson, G. B., Bacchi, C. J., & Cerami, A. (1987). In vivo effects of

difluoromethylornithine on trypanothione and polyamine levels in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 24(2), 185–191.
[https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-6851\(87\)90105-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0166-6851(87)90105-8)

Fernandes, M. C., & Andrews, N. W. (2012). Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. *FEMS Microbiology Reviews*, 36(3), 734–747. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x>

Festing, M. F. W., & Altman, D. G. (2002). Guidelines for the Design and Statistical Analysis of Experiments Using Laboratory Animals. *ILAR Journal*, 43(4), 244–258.
<https://doi.org/10.1093/ilar.43.4.244>

Filser, M., MA, C., MM, M.-N., Dirdjaja, N., Herrero, E., & RL, K.-S. (2008). Cloning, functional analysis, and mitochondrial localization of *Trypanosoma brucei* monothiol glutaredoxin-1. *Biological Chemistry*, 389(1), 21–32.

Fleta Zaragozano, J., Rodríguez Martínez, G., & Clavel Parrilla, A. (2001). Leishmaniasis visceral y cutaneomucosa: aspectos epidemiológicos y clínicos. *Medicina Integral*, 38(6), 264–269. <https://www.elsevier.es/es>

Fonseca-Silva, F., Inacio, J. D. F., Canto-Cavalheiro, M. M., & Almeida-Amaral, E. E. (2011). Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. *PloS One*, 6(2), e14666.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014666>

Forli, S., Huey, R., Pique, M. E., Sanner, M. F., Goodsell, D. S., & Olson, A. J. (2016). Computational protein–ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite. *Nature Protocols*, 11(5), 905–919. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.051>

Franco, J., Medeiros, A., Benítez, D., Perelmutter, K., Serra, G., Comini, M. A., & Scarone, L. (2017). In vitro activity and mode of action of distamycin analogues against African

trypanosomes. European Journal of Medicinal Chemistry.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.12.002>

Franco, J. R., Cecchi, G., Paone, M., Diarra, A., Grout, L., Ebeja, A. K., Simarro, P. P., Zhao, W., & Argaw, D. (2022). The elimination of human African trypanosomiasis: Achievements in relation to WHO road map targets for 2020. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 16(1), 1–19. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0010047>

Fuentes-vicente, J. A. De, Salazar-schettino, P. M., & Bucio-torres, M. I. (2022). Enfermedad de Chagas: biología y transmisión de. 1–19.

Fyfe, P. K., Oza, S. L., Fairlamb, A. H., & Hunter, W. N. (2008). Leishmania trypanothione synthetase-amidase structure reveals a basis for regulation of conflicting synthetic and hydrolytic activities. *Journal of Biological Chemistry*.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M801850200>

Fyfe, P. K., Westrop, G. D., Silva, A. M., Coombs, G. H., & Hunter, W. N. (2012). Leishmania TDR1 structure, a unique trimeric glutathione transferase capable of deglutathionylation and antimonial prodrug activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(29), 11693–11698.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1202593109>

Garcia, M. N., Burroughs, H., Gorchakov, R., Gunter, S. M., Dumonteil, E., Murray, K. O., & Herrera, C. P. (2017). Molecular identification and genotyping of *Trypanosoma cruzi* DNA in autochthonous Chagas disease patients from Texas, USA. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 49, 151–156. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.01.016>

Gómez-Escobedo, R., Méndez-Álvarez, D., Vázquez, C., Saavedra, E., Vázquez, K., Alcántara-Farfán, V., Cordero-Martínez, J., Gonzalez-Gonzalez, A., Rivera, G., &

- Noguera-Torres, B. (2024). Molecular Docking-Based Virtual Screening of FDA-Approved Drugs Using Trypanothione Reductase Identified New Trypanocidal Agents. *Molecules* (Basel, Switzerland), 29(16). <https://doi.org/10.3390/molecules29163796>
- González-Chávez, Z., Olin-Sandoval, V., Rodríguez-Zavala, J. S., Moreno-Sánchez, R., & Saavedra, E. (2015). Metabolic control analysis of the *Trypanosoma cruzi* peroxide detoxification pathway identifies tryparedoxin as a suitable drug target. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1850(2), 263–273. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.10.029>
- González-Montero, M.-C., Andrés-Rodríguez, J., García-Fernández, N., Pérez-Pertejo, Y., Reguera, R. M., Balaña-Fouce, R., & García-Estrada, C. (2024). Targeting Trypanothione Metabolism in Trypanosomatids. *Molecules*, 29(10). <https://doi.org/10.3390/molecules29102214>
- González-Salazar, C., Meneses-Mosquera, A. K., Aguirre-Peña, A., Fernández-Castel, K. P. J., Stephens, C. R., Mendoza-Ponce, A., Velasco, J. A., Calderón-Bustamante, O., & Estrada, F. (2022). Toward New Epidemiological Landscapes of *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) Transmission under Future Human-Modified Land Cover and Climatic Change in Mexico. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, 7(9). <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7090221>
- González, U., Pinart, M., Sinclair, D., Firooz, A., Enk, C., Vélez, I. D., Esterhuizen, T. M., Tristan, M., & Alvar, J. (2015). Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 2015(8), CD008736. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008736.pub2>
- Goodwin, L. G., & Page, J. E. (1943). A study of the excretion of organic antimonials using a polarographic procedure. *The Biochemical Journal*, 37(2), 198–209.

<https://doi.org/10.1042/bj0370198>

Gray, K. C., Palacios, D. S., Dailey, I., Endo, M. M., Uno, B. E., Wilcock, B. C., & Burke, M. D. (2012). Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7), 2234–2239. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117280109>

Grisard, E. C., Steindel, M., Guarneri, A. A., Eger-Mangrich, I., Campbell, D. A., & Romanha, A. J. (1999). Characterization of *Trypanosoma rangeli* Strains Isolated in Central and South America: An Overview. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(2), 203–209. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761999000200015>

Gualdrón-López, M., Michels, P. A. M., Quiñones, W., Cáceres, A. J., Avilán, L., & Concepción, J.-L. (2013). Function of Glycosomes in the Metabolism of Trypanosomatid Parasites and the Promise of Glycosomal Proteins as Drug Targets. In *Trypanosomatid Diseases* (pp. 121–151). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9783527670383.ch7>

Gutscher, M., Pauleau, A.-L., Marty, L., Brach, T., Wabnitz, G. H., Samstag, Y., Meyer, A. J., & Dick, T. P. (2008). Real-time imaging of the intracellular glutathione redox potential. *Nature Methods*, 5, 553. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1212>

Hall, B. S., Bot, C., & Wilkinson, S. R. (2011). Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(15), 13088–13095. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.230847>

HAMILTON, C. J., SARAVANAMUTHU, A., EGGLESTON, I. M., & FAIRLAMB, A. H. (2003). Ellman's-reagent-mediated regeneration of trypanothione in situ: substrate-economical microplate and time-dependent inhibition assays for trypanothione reductase. *Biochemical Journal*, 369(3), 529–537. <https://doi.org/10.1042/bj20021298>

- Hepburn, N. C. (2003). Cutaneous leishmaniasis: an overview. *Journal of Postgraduate Medicine*, 49(1), 50–54. <https://doi.org/10.4103/0022-3859.928>
- Hiller, C., Nissen, A., Benítez, D., Comini, M. A., & Krauth-Siegel, R. L. (2014). Cytosolic peroxidases protect the lysosome of bloodstream African trypanosomes from iron-mediated membrane damage. *PLoS Pathogens*, 10(4), e1004075. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004075>
- Holzmuller, P., Geiger, A., Nzoumbou-Boko, R., Pissarra, J., Hamrouni, S., Rodrigues, V., Dauchy, F. A., Lemesre, J. L., Vincendeau, P., & Bras-Gonçalves, R. (2018). Trypanosomatid infections: How do parasites and their excreted-secreted factors modulate the inducible metabolism of L-arginine in macrophages? In *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00778>
- Hotez, P. J., Aksoy, S., Brindley, P. J., & Kamhawi, S. (2020). What constitutes a neglected tropical disease? In *PLoS neglected tropical diseases* (Vol. 14, Issue 1, p. e0008001). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008001>
- Hotez, P. J., Fenwick, A., Savioli, L., & Molyneux, D. H. (2009). Rescuing the bottom billion through control of neglected tropical diseases. *The Lancet*, 373(9674), 1570–1575. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60233-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60233-6)
- Huang, J., & MacKerell Jr, A. D. (2013). CHARMM36 all-atom additive protein force field: Validation based on comparison to NMR data. *Journal of Computational Chemistry*, 34(25), 2135–2145. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcc.23354>
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD: Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14(1), 33–38. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0263-7855\(96\)00018-5](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0263-7855(96)00018-5)
- Huynh, T. T., Huynh, V. T., Harmon, M. A., & Phillips, M. A. (2003). Gene Knockdown of γ -

- Glutamylcysteine Synthetase by RNAi in the Parasitic Protozoa *Trypanosoma brucei* Demonstrates That It Is an Essential Enzyme*. *Journal of Biological Chemistry*, 278(41), 39794–39800. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M306306200>
- Hyland, K. V, Asfaw, S. H., Olson, C. L., Daniels, M. D., & Engman, D. M. (2008). Bioluminescent imaging of *Trypanosoma cruzi* infection. *International Journal for Parasitology*, 38(12), 1391–1400. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2008.04.002>
- Ihnatenko, I., Müller, M. J., Orban, O. C. F., Lindhof, J. C., Benítez, D., Ortíz, C., Dibello, E., Seidl, L. L., Comini, M. A., & Kunick, C. (2023). The indole motif is essential for the antitrypanosomal activity of N5-substituted paullones. *PLOS ONE*, 18(11), 1–58. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0292946>
- Irsch, T., & Krauth-Siegel, R. L. (2004). Glyoxalase II of African Trypanosomes Is Trypanothione-dependent *. *Journal of Biological Chemistry*, 279(21), 22209–22217. <https://doi.org/10.1074/jbc.M401240200>
- Irwin, S. (1968). Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia*, 13(3), 222–257. <https://doi.org/10.1007/BF00401402>
- Jackson, Y., Wyssa, B., & Chappuis, F. (2020). Tolerance to nifurtimox and benznidazole in adult patients with chronic Chagas' disease. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 75(3), 690–696. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz473>
- Jacobs, R. T., Nare, B., & Phillips, M. A. (2011). State of the art in African trypanosome drug discovery. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11(10), 1255—1274. <https://doi.org/10.2174/156802611795429167>
- Jacoby, E. M., Schlichting, I., Lantwin, C. B., Kabsch, W., & Krauth-Siegel, R. L. (1996).

Crystal structure of the Trypanosoma cruzi trypanothione reductase.mepacrine complex. Proteins, 24(1), 73–80. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0134\(199601\)24:1<73::AID-PROT5>3.0.CO;2-P](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0134(199601)24:1<73::AID-PROT5>3.0.CO;2-P)

Jansen, A. M., Roque, A. L. R., & Xavier, S. C. C. (2017). 12 - Trypanosoma cruzi enzootic cycle: General aspects, domestic and synanthropic hosts and reservoirs. In J. Telleria & M. Tibayrenc (Eds.), American Trypanosomiasis Chagas Disease (Second Edition) (Second Edi, pp. 265–282). Elsevier. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801029-7.00012-5>

Jara, M., Berg, M., Caljon, G., de Muylder, G., Cuypers, B., Castillo, D., Maes, I., Orozco, M. del C., Vanaerschot, M., Dujardin, J.-C., & Arevalo, J. (2017). Macromolecular biosynthetic parameters and metabolic profile in different life stages of Leishmania braziliensis: Amastigotes as a functionally less active stage. PLOS ONE, 12(7), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180532>

Jayawardhana, S., Ward, A. I., Francisco, A. F., Lewis, M. D., Taylor, M. C., Kelly, J. M., & Olmo, F. (2023). Benznidazole treatment leads to DNA damage in Trypanosoma cruzi and the persistence of rare widely dispersed non-replicative amastigotes in mice. PLoS Pathogens, 19(11), e1011627. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1011627>

Jobanputra, K. S., Rajpal, A. V., & Nagpur, N. G. (2007). Eflornithine. Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology, 73(5), 365–366. <https://doi.org/10.4103/0378-6323.35752>

JOCKERS-SCHERÜBL, M. C., SCHIRMER, R. H., & KRAUTH-SIEGEL, R. L. (1989a). Trypanothione reductase from Trypanosoma cruzi Catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. European Journal of Biochemistry. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb14643.x>

JOCKERS-SCHERÜBL, M. C., SCHIRMER, R. H., & KRAUTH-SIEGEL, R. L. (1989b).

Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi* Catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. *European Journal of Biochemistry*, 180(2), 267–272. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb14643.x>

Joice, A. C., Harris, M. T., Kahney, E. W., Dodson, H. C., Maselli, A. G., Whitehead, D. C., & Morris, J. C. (2013). Exploring the mode of action of ebselen in *Trypanosoma brucei* hexokinase inhibition. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, 3, 154–160. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2013.08.002>

Jones, D. C., Ariza, A., Chow, W. H. A., Oza, S. L., & Fairlamb, A. H. (2010). Comparative structural, kinetic and inhibitor studies of *Trypanosoma brucei* trypanothione reductase with *T. cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.09.002>

Jorgensen, W. L., Chandrasekhar, J., Madura, J. D., Impey, R. W., & Klein, M. L. (1983). Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *The Journal of Chemical Physics*, 79(2), 926–935. <https://doi.org/10.1063/1.445869>

K. Nussbaum¹, J. Honek¹, C. M. C. v. C. C. and T. E. . (2010). Trypanosomatid Parasites Causing Neglected Diseases. *Current Medicinal Chemistry*, 17, 1594–1617. <https://doi.org/https://doi.org/10.2174/092986710790979953>

Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., & Sternberg, M. J. E. (2015). The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*, 10(6), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>

Kennedy, P. G. (2013). Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *The Lancet. Neurology*, 12(2), 186–194. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70296-X](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70296-X)

Kennedy, P. G. E. (2019). Update on human African trypanosomiasis (sleeping sickness).
Journal of Neurology, 266(9), 2334–2337. <https://doi.org/10.1007/s00415-019-09425-7>

Kieboom, A. P. G. (1988). Purification of Laboratory Chemicals, 3rd edition. D.D. Perrin and W. L. F. Armarego. Pergamon Press, Oxford, 1988, X + 392 pp. ISBN 0-08-034714-2, Flexicover, Price £37.50. ISBN 0-08-034715-0, Hardcover, Price £75.00. Recueil Des Travaux Chimiques Des Pays-Bas, 107(12), 685.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/recl.19881071209>

Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010). Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. PLoS Biology, 8(6), e1000412. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000412>

Klein, M. D., Proaño, A., Noazin, S., Sciaudone, M., Gilman, R. H., & Bowman, N. M. (2021). Risk factors for vertical transmission of Chagas disease: A systematic review and meta-analysis. *International Journal of Infectious Diseases : IJID : Official Publication of the International Society for Infectious Diseases*, 105, 357–373. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.074>

Krauth-Siegel, R. L., Enders, B., Henderson, G. B., Fairlamb, A. H., & Schirmer, R. H. (1987). Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and characterization of the crystalline enzyme. *European Journal of Biochemistry*, 164(1), 123–128. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb11002.x>

KRAUTH-SIEGEL, R. L., ENDERS, B., HENDERSON, G. B., FAIRLAMB, A. H., & SCHIRMER, R. H. (1987). Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Biochemistry*, 164(1), 123–128. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb11002.x>

- Krieger, S., Schwarz, W., Arlyanayagam, M. R., Fairlamb, A. H., Krauth-Siegel, R. L., & Clayton, C. (2000). Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01721.x>
- Kwakye-Nuako, G., Mosore, M. T., Duplessis, C., Bates, M. D., Pupilampu, N., Mensah-Attipoe, I., Desewu, K., Afegbe, G., Asmah, R. H., Jamjoom, M. B., Ayeh-Kumi, P. F., Boakye, D. A., & Bates, P. A. (2015). First isolation of a new species of *Leishmania* responsible for human cutaneous leishmaniasis in Ghana and classification in the *Leishmania enriettii* complex. *International Journal for Parasitology*, 45(11), 679–684. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2015.05.001>
- Lantwin, C. B., Schlichting, I., Kabsch, W., Pai, E. F., & Krauth-Siegel, R. L. (1994). The Structure of *Trypanosoma cruzi* trypanothione Reductase in the Oxidized and NADPH Reduced State. *Proteins: Structure*, 18. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:33372557>
- Lara, L. S., Moreira, C. S., Calvet, C. M., Lechuga, G. C., Souza, R. S., Bourguignon, S. C., Ferreira, V. F., Rocha, D., & Pereira, M. C. S. (2018). Efficacy of 2-hydroxy-3-phenylsulfanylmethyl-[1,4]-naphthoquinone derivatives against different *Trypanosoma cruzi* discrete type units: Identification of a promising hit compound. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 144, 572–581. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.052>
- Laufs, H., Müller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J. C., Solbach, W., & Laskay, T. (2002). Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infection and Immunity*, 70(2), 826–835. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.2.826-835.2002>
- Laureano de Souza, M., Thibault Joseph William Jacques Dit, L., gabriel, V. de L. M., Witor

- Ribeiro, F., André Berndt, P., Gustavo, H. G. T., Silvane Maria Fonseca, M., renata Barbosa, de O., celso, de O. R. J., & and Ferreira, R. S. (2023). Molecular targets for Chagas disease: validation, challenges and lead compounds for widely exploited targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 27(10), 911–925. <https://doi.org/10.1080/14728222.2023.2264512>
- Lee, B., Bauer, H., Melchers, J., Ruppert, T., Rattray, L., Yardley, V., Davioud-Charvet, E., & Krauth-Siegel, R. L. (2005). Irreversible Inactivation of Trypanothione Reductase by Unsaturated Mannich Bases: A Divinyl Ketone as Key Intermediate. *Journal of Medicinal Chemistry*, 48(23), 7400–7410. <https://doi.org/10.1021/jm0504860>
- Leroux, A. E., Haanstra, J. R., Bakker, B. M., & Krauth-Siegel, R. L. (2013). Dissecting the catalytic mechanism of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase by kinetic analysis and computational modeling. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(33), 23751–23764. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.483289>
- Leroux, A. E., & Krauth-Siegel, R. L. (2016). Thiol redox biology of trypanosomatids and potential targets for chemotherapy. *Molecular and Biochemical Parasitology*. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.11.003>
- Lewis, M. D., Fortes Francisco, A., Taylor, M. C., Burrell-Saward, H., Mclatchie, A. P., Miles, M. A., & Kelly, J. M. (2014). Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. *Cellular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/cmi.12297>
- Lindhof, J. C., Ihnatenko, I., Müller, M. J., Orban, O. C. F., Ortíz, C., Benítez, D., Dibello, E., Seidl, L. L., Comini, M. A., & Kunick, C. (2023). Discovery of Antitrypanosomal Indolylacetamides by a Deconstruction–Optimization Strategy Applied to Paullones. *ChemMedChem*, 18(10), e202300036.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cmdc.202300036>

Liu, X., Lv, H., Guo, Y., Teka, T., Wang, X., Huang, Y., Han, L., & Pan, G. (2020). Structure-Based Reactivity Profiles of Reactive Metabolites with Glutathione. *Chemical Research in Toxicology*. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:216647107>

Llovera, A., Abras, A., Fernández-Arévalo, A., Ballart, C., Heras, S., Muñoz, C., & Gállego, M. (2024). Genetic Diversity of *Trypanosoma cruzi* in the United States of America: The Least Endemic Country for Chagas Disease. *Life*, 14(7). <https://doi.org/10.3390/life14070901>

Lo Presti, M. S., Bazán, P. C., Strauss, M., Báez, A. L., Rivarola, H. W., & Paglini-Oliva, P. A. (2015). Trypanothione reductase inhibitors: Overview of the action of thioridazine in different stages of Chagas disease. *Acta Tropica*, 145, 79–87. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.02.012>

López-Lira, C., Tapia, R. A., Herrera, A., Lapier, M., Maya, J. D., Soto-Delgado, J., Oliver, A. G., Graham Lappin, A., & Uriarte, E. (2021). New benzimidazolequinones as trypanosomicidal agents. *Bioorganic Chemistry*, 111, 104823. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.104823>

Lu, J., Vodnala, S. K., Gustavsson, A. L., Gustafsson, T. N., Sjöberg, B., Johansson, H. A., Kumar, S., Tjernberg, A., Engman, L., Rottenberg, M. E., & Holmgren, A. (2013). Ebsulfur is a benzisothiazolone cytotoxic inhibitor targeting the trypanothione reductase of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.495101>

MacKerell, A. D. J., Bashford, D., Bellott, M., Dunbrack, R. L. J., Evanseck, J. D., Field, M. J., Fischer, S., Gao, J., Guo, H., Ha, S., Joseph-McCarthy, D., Kuchnir, L., Kuczera, K., Lau, F. T. K., Mattos, C., Michnick, S., Ngo, T., Nguyen, D. T., Prodhom, B., ... Karplus,

- M. (1998). All-Atom Empirical Potential for Molecular Modeling and Dynamics Studies of Proteins. *The Journal of Physical Chemistry B*, 102(18), 3586–3616. <https://doi.org/10.1021/jp973084f>
- MacLean, L. M., Thomas, J., Lewis, M. D., Cotillo, I., Gray, D. W., & De Rycker, M. (2018). Development of *Trypanosoma cruzi* in vitro assays to identify compounds suitable for progression in Chagas' disease drug discovery. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 12(7), e0006612. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006612>
- Madia, V. N., Ialongo, D., Patacchini, E., Exertier, C., Antonelli, L., Colotti, G., Messori, A., Tudino, V., Saccoliti, F., Scipione, L., Ilari, A., Costi, R., & Di Santo, R. (2023). Inhibition of *Leishmania infantum* Trypanothione Reductase by New Aminopropanone Derivatives Interacting with the NADPH Binding Site. *Molecules*, 28(1). <https://doi.org/10.3390/molecules28010338>
- Majeau, A., Murphy, L., Herrera, C., & Dumonteil, E. (2021). Assessing *Trypanosoma cruzi* Parasite Diversity through Comparative Genomics: Implications for Disease Epidemiology and Diagnostics. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 10(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens10020212>
- Malvy, D., & Chappuis, F. (2011). Sleeping sickness. *Clinical Microbiology and Infection*, 17(7), 986–995. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03536.x>
- Manta, B., Comini, M., Medeiros, A., Hugo, M., Trujillo, M., & Radi, R. (2013). Trypanothione: A unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. In *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.01.013>
- Manta, B., Möller, M. N., Bonilla, M., Deambrosi, M., Grunberg, K., Bellanda, M., Comini, M. A., & Ferrer-Sueta, G. (2019). Kinetic studies reveal a key role of a redox-active glutaredoxin in the evolution of the thiol-redox metabolism of trypanosomatid parasites.

The Journal of Biological Chemistry, 294(9), 3235–3248.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006366>

Maroli, M., Feliciangeli, M. D., Bichaud, L., Charrel, R. N., & Gradoni, L. (2013). Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology*, 27(2), 123–147.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01034.x>

Martinez, P. G., Winston, G. W., Metashdickey, C., Ohara, S. C. M., & Livingstone, D. R. (1995). Nitrofurantoin-Stimulated Reactive Oxygen Species Production and Genotoxicity in Digestive Gland Microsomes and Cytosol of the Common Mussel (*Mytilus edulis* L.). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 131(2), 332–341.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1006/taap.1995.1076>

Masumoto, H., Hashimoto, K., Hakusui, H., Takaichi, M., Yokota, T., Honda, T., & Esumi, Y. (1997). Studies on the Pharmacokinetics of Ebselen in Rats (1): Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion after Single Oral Administration. *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 12, 596–609.
<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:84243147>

Maya, J. D., Cassels, B. K., Iturriaga-Vásquez, P., Ferreira, J., Faúndez, M., Galanti, N., Ferreira, A., & Morello, A. (2007). Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 146(4), 601–620. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.03.004>

Mayrink, W., De Carvalho Botelho, A. C., Magalhães, P. A., Batista, S. M., Lima, A. D. O., Genaro, O., Da Costa, C. A., De Melo, M. N., Marques Michalick, M. S., Williams, P., Dias, M., Caiaffa, W. T., Do Nascimento, E., & Lins Machado-Coelho, G. L. (2006).

- Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 39(1), 14–21. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822006000100003>
- Medeiros, A., Benítez, D., Korn, R. S., Ferreira, V. C., Barrera, E., Carrión, F., Pritsch, O., Pantano, S., Kunick, C., de Oliveira, C. I., Orban, O. C. F., & Comini, M. A. (2020). Mechanistic and biological characterisation of novel N5-substituted paullones targeting the biosynthesis of trypanothione in *Leishmania*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 35(1), 1345–1358. <https://doi.org/10.1080/14756366.2020.1780227>
- Meisner, J., Kato, A., Lemerani, M. M., Miaka, E. M., Ismail, A. T., Wakefield, J., Rowhani-Rahbar, A., Pigott, D., Mayer, J. D., Lorton, C., & Rabinowitz, P. M. (2023). Does a One Health approach to human African trypanosomiasis control hasten elimination? A stochastic compartmental modeling approach. *Acta Tropica*, 240, 106804. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2022.106804>
- Meister, A., & Anderson, M. E. (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*, 52, 711–760. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.52.070183.003431>
- Mejia, A. M., Hall, B. S., Taylor, M. C., Gómez-Palacio, A., Wilkinson, S. R., Triana-Chávez, O., & Kelly, J. M. (2012). Benznidazole-Resistance in *Trypanosoma cruzi* Is a Readily Acquired Trait That Can Arise Independently in a Single Population. *The Journal of Infectious Diseases*, 206(2), 220–228. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis331>
- Merida-de-Barros, D. A., Chaves, S. P., Belmiro, C. L. R., & Wanderley, J. L. M. (2018). Leishmaniasis and glycosaminoglycans: a future therapeutic strategy? *Parasites & Vectors*, 11(1), 536. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2953-y>
- Mesías, A. C., Sasoni, N., Arias, D. G., Pérez Brandán, C., Orban, O. C. F., Kunick, C.,

- Robello, C., Comini, M. A., Garg, N. J., & Zago, M. P. (2019). Trypanothione synthetase confers growth, survival advantage and resistance to anti-protozoal drugs in *Trypanosoma cruzi*. *Free Radical Biology and Medicine*, 130, 23–34. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.10.436>
- Mesu, V. K. B. K., Kalonji, W. M., Bardonneau, C., Mordt, O. V., Blesson, S., Simon, F., Delhomme, S., Bernhard, S., Kuziena, W., Lubaki, J. P. F., Vuvu, S. L., Ngima, P. N., Mbembo, H. M., Ilunga, M., Bonama, A. K., Heradi, J. A., Solomo, J. L. L., Mandula, G., Badibabi, L. K., ... Tarral, A. (2018). Oral fexinidazole for late-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a pivotal multicentre, randomised, non-inferiority trial. *The Lancet*. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32758-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32758-7)
- Milman, N., Motyka, S. A., Englund, P. T., Robinson, D., & Shlomai, J. (2007). Mitochondrial origin-binding protein UMSBP mediates DNA replication and segregation in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(49), 19250–19255. <https://doi.org/10.1073/pnas.0706858104>
- Ministerio de Educación de Argentina. (1976). Educación y desarrollo en Argentina. <http://www.bnm.me.gov.ar/giga1/documentos/EL003968>
- Mishra, S., Demo, G., Koc?a, J., & Wimmerová, M. (2012). In Silico Engineering of Proteins That Recognize Small Molecules. <https://doi.org/10.5772/28001>
- Mittra, B., Cortez, M., Haydock, A., Ramasamy, G., Myler, P. J., & Andrews, N. W. (2013). Iron uptake controls the generation of *Leishmania* infective forms through regulation of ROS levels. *The Journal of Experimental Medicine*, 210(2), 401–416. <https://doi.org/10.1084/jem.20121368>
- Motyka, S. A., Drew, M. E., Yildirim, G., & Englund, P. T. (2006). Overexpression of a Cytochrome *b*₅ Reductase-like Protein Causes Kinetoplast DNA Loss in

*Trypanosoma brucei**. Journal of Biological Chemistry, 281(27), 18499–18506. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602880200>

Mukherjee, A., Padmanabhan, P. K., Sahani, M. H., Barrett, M. P., & Madhubala, R. (2006). Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. Molecular and Biochemical Parasitology, 145(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2005.08.016>

Mukherjee, A., Roy, G., Guimond, C., & Ouellette, M. (2009). The γ -glutamylcysteine synthetase gene of *Leishmania* is essential and involved in response to oxidants. Molecular Microbiology, 74. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:205367491>

Murumkar, P. R., Gupta, S. Das, Zambre, V. P., Giridhar, R., & Yadav, M. R. (2009). Development of predictive 3D-QSAR CoMFA and CoMSIA models for beta-aminohydroxamic acid-derived tumor necrosis factor- α converting enzyme inhibitors. Chemical Biology & Drug Design, 73(1), 97–107. <https://doi.org/10.1111/j.1747-0285.2008.00737.x>

Namazi, M. R. (2008). Hypothesis: the potential utility of topical eflornithine against cutaneous leishmaniasis. In Indian journal of dermatology, venereology and leprology (Vol. 74, Issue 2, pp. 158–159). <https://doi.org/10.4103/0378-6323.39709>

Nketia, P. B., Gasu, E. N., Mensah, J. O., & Borquaye, L. S. (2024). In silico identification of α -bisabolol and letestuiarin C as potential inhibitors of *Trypanosoma brucei* trypanothione reductase. Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 42(16), 8660–8672. <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2247084>

Noguchi, N. (2016). Ebselen, a useful tool for understanding cellular redox biology and a promising drug candidate for use in human diseases. Archives of Biochemistry and Biophysics, 595, 109–112. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2015.10.024>

- O'Sullivan, M. C., Durham, T. B., Valdes, H. E., Dauer, K. L., Karney, N. J., Forrestel, A. C., Bacchi, C. J., & Baker, J. F. (2015). Dibenzosuberyl substituted polyamines and analogs of clomipramine as effective inhibitors of trypanothione reductase; molecular docking, and assessment of trypanocidal activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 23(5), 996–1010. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.01.018>
- Okello, I., Mafie, E., Eastwood, G., Nzalawahe, J., & Mboera, L. E. G. (2022). African Animal Trypanosomiasis: A Systematic Review on Prevalence, Risk Factors and Drug Resistance in Sub-Saharan Africa. *Journal of Medical Entomology*, 59(4), 1099–1143. <https://doi.org/10.1093/jme/tjac018>
- Olin-Sandoval, V., González-Chávez, Z., Berzunza-Cruz, M., Martínez, I., Jasso-Chávez, R., Becker, I., Espinoza, B., Moreno-Sánchez, R., & Saavedra, E. (2012). Drug target validation of the trypanothione pathway enzymes through metabolic modelling. *FEBS Journal*. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08557.x>
- Olin-Sandoval, V., Moreno-Sánchez, R., & Saavedra, E. (2010). Targeting trypanothione metabolism in trypanosomatid human parasites. *Current Drug Targets*, 11(12), 1614–1630. <https://doi.org/10.2174/1389450111009011614>
- Oliveira, I. M., Bonatto, D., António, J., Henriques, P., & Vargas, R. F. G. (2010). Nitroreductases: Enzymes with Environmental, Biotechnological and Clinical Importance. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:52229052>
- Onn, I., Milman-Shtepel, N., & Shlomai, J. (2004). Redox potential regulates binding of universal minicircle sequence binding protein at the kinetoplast DNA replication origin. *Eukaryotic Cell*, 3(2), 277–287. <https://doi.org/10.1128/EC.3.2.277-287.2004>
- Organización Mundial de la Salud. (n.d.-a). Enfermedad de Chagas (trypanosomiasis americana). <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease->

(american-trypanosomiasis)

Organización Mundial de la Salud. (n.d.-b). Enfermedades tropicales desatendidas (ETD).

<https://www.who.int/es/news-room/questions-and-answers/item/neglected-tropical-diseases>

Organización Panamericana de la Salud (OPS). (n.d.-a). Enfermedad de Chagas.

<https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>

Organización Panamericana de la Salud (OPS). (n.d.-b). Iniciativa para la Eliminación de

Enfermedades 30+. <https://www.paho.org/es/iniciativa-eliminacion>

Ortíz, C., Moraca, F., Laverriere, M., Jordan, A., Hamilton, N., & Comini, M. A. (2021).

Glucose 6-Phosphate Dehydrogenase from Trypanosomes: Selectivity for Steroids and Chemical Validation in Bloodstream Trypanosoma brucei. *Molecules*, 26(2). <https://doi.org/10.3390/molecules26020358>

Otranto, D., Cantacessi, C., Pfeffer, M., Dantas-Torres, F., Brianti, E., Deplazes, P., Genchi,

C., Guberti, V., & Capelli, G. (2015). The role of wild canids and felids in spreading parasites to dogs and cats in Europe: Part I: Protozoa and tick-borne agents. *Veterinary Parasitology*, 213(1), 12–23.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.04.022>

Pai, C., Chiang, B., Ko, T. P., Chou, C., Chong, C., Yen, F., Chen, S., Coward, J. K., Wang,

A. H., & Lin, C. (2006). Dual binding sites for translocation catalysis by *Escherichia coli* glutathionylspermidine synthetase. *The EMBO Journal*, 25(24), 5970–5982. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601440>

Palatnik-de-Sousa, C. B., & Day, M. J. (2011). One Health: the global challenge of epidemic

and endemic leishmaniasis. *Parasites & Vectors*, 4, 197. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-197>

- Pandey, R. K., Kumbhar, B. V., Srivastava, S., Malik, R., Sundar, S., Kunwar, A., & Prajapati, V. K. (2017). Febrifugine analogues as *Leishmania donovani* trypanothione reductase inhibitors: binding energy analysis assisted by molecular docking, ADMET and molecular dynamics simulation. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 35(1), 141–158. <https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1135298>
- Pandey, R. K., Kumbhar, B. V., Sundar, S., Kunwar, A., & Prajapati, V. K. (2017). Structure-based virtual screening, molecular docking, ADMET and molecular simulations to develop benzoxaborole analogs as potential inhibitor against *Leishmania donovani* trypanothione reductase. *Journal of Receptor and Signal Transduction Research*, 37(1), 60–70. <https://doi.org/10.3109/10799893.2016.1171344>
- Pandey, R. K., Sharma, D., Bhatt, T. K., Sundar, S., & Prajapati, V. K. (2015). Developing imidazole analogues as potential inhibitor for *Leishmania donovani* trypanothione reductase: virtual screening, molecular docking, dynamics and ADMET approach. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 33(12), 2541–2553. <https://doi.org/10.1080/07391102.2015.1085904>
- Parnham, M. J., & Sies, H. (2013). The early research and development of ebselen. *Biochemical Pharmacology*, 86(9), 1248–1253. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.08.028>
- Patterson, S., Jones, D. C., Shanks, E. J., Frearson, J. A., Gilbert, I. H., Wyatt, P. G., & Fairlamb, A. H. (2009). Synthesis and evaluation of 1-(1-(Benzo[b]thiophen-2-yl)cyclohexyl)piperidine (BTCP) analogues as inhibitors of trypanothione reductase. *ChemMedChem*, 4(8), 1341–1353. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900098>
- Patterson, S., & Wyllie, S. (2014). Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends in Parasitology*, 30(6), 289–298.

<https://doi.org/10.1016/j.pt.2014.04.003>

Patterson, S., Wyllie, S., Stojanovski, L., Perry, M. R., Simeons, F. R. C., Norval, S., Osuna-Cabello, M., De Rycker, M., Read, K. D., & Fairlamb, A. H. (2013). The R enantiomer of the antitubercular drug PA-824 as a potential oral treatment for visceral Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(10), 4699–4706. <https://doi.org/10.1128/AAC.00722-13>

Paulino, M., Espinosa-Bustos, C., Bertrand, J., Cabezas, D., Mella, J., Dávila, B., Cerecetto, H., Ballesteros-Casallas, A., & Salas, C. O. (2022). Development of 3D-QSAR and pharmacophoric models to design new anti-Trypanosoma cruzi agents based on 2-aryloxynaphthoquinone scaffold. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 33(9), 701–728. <https://doi.org/10.1080/1062936X.2022.2120069>

Penning, T. M., Su, A. L., & El-Bayoumy, K. (2022). Nitroreduction: A Critical Metabolic Pathway for Drugs, Environmental Pollutants, and Explosives. *Chemical Research in Toxicology*, 35(10), 1747–1765. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.2c00175>

Pérez-Molina, J. A., & Molina, I. (2018). Chagas disease. *The Lancet*, 391(10115), 82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4)

Pettersson, J. H. O., Eldholm, V., Seligman, S. J., Lundkvist, Å., Falconar, A. K., Gaunt, M. W., Musso, D., Nougairède, A., Charrel, R., Gould, E. A., & De Lamballerie, X. (2016). How did zika virus emerge in the Pacific Islands and Latin America? *MBio*, 7(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.01239-16>

Phan, T.-N., Park, K. P., Benítez, D., Comini, M. A., Shum, D., & No, J. H. (2022). Discovery of novel Leishmania major trypanothione synthetase inhibitors by high-throughput screening. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 637, 308–313. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.11.044>

Philip W. Iversen, PhD, Benoit Beck, PhD, Yun-Fei Chen, PhD, Walthere Dere, MS, Viswanath Devanarayan, PhD, Brian J Eastwood, PhD, Mark W. Farmen, PhD, Stephen J. Iturria, PhD, Chahrzad Montrose, PhD, Roger A. Moore, MS, Jeffrey R. Weidner, PhD, and G. Si, P. (2012). HTS Assay Validation. Assay Guidance Manual [Internet]., 26.

Phillips, J. C., Hardy, D. J., Maia, J. D. C., Stone, J. E., Ribeiro, J. V, Bernardi, R. C., Buch, R., Fiorin, G., Hénin, J., Jiang, W., McGreevy, R., Melo, M. C. R., Radak, B. K., Skeel, R. D., Singharoy, A., Wang, Y., Roux, B., Aksimentiev, A., Luthey-Schulten, Z., ... Tajkhorshid, E. (2020). Scalable molecular dynamics on CPU and GPU architectures with NAMD. The Journal of Chemical Physics, 153(4), 44130. <https://doi.org/10.1063/5.0014475>

Piñeyro, M. D., Parodi-Talice, A., Portela, M., Arias, D. G., Guerrero, S. A., & Robello, C. (2011). Molecular characterization and interactome analysis of Trypanosoma cruzi tryparedoxin 1. Journal of Proteomics, 74(9), 1683–1692. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.04.006>

Pinto-Martinez, A. K., Rodriguez-Durán, J., Serrano-Martin, X., Hernandez-Rodriguez, V., & Benaim, G. (2018). Mechanism of Action of Miltefosine on Leishmania donovani Involves the Impairment of Acidocalcisome Function and the Activation of the Sphingosine-Dependent Plasma Membrane Ca(2+) Channel. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 62(1). <https://doi.org/10.1128/AAC.01614-17>

Pramanik, P. K., Chakraborti, S., Bagchi, A., & Chakraborti, T. (2020). Bioassay-based Corchorus capsularis L. leaf-derived β -sitosterol exerts antileishmanial effects against Leishmania donovani by targeting trypanothione reductase. Scientific Reports, 10(1), 20440. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77066-2>

Priotto, G., Kasparian, S., Mutombo, W., Ngouama, D., Ghorashian, S., Arnold, U., Ghabri, S., Baudin, E., Buard, V., Kazadi-Kyanza, S., Ilunga, M., Mutangala, W., Pohlig, G., Schmid, C., Karunakara, U., Torreele, E., & Kande, V. (2009). Nifurtimox-eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei gambiense* trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. *Lancet* (London, England), 374(9683), 56–64. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61117-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61117-X)

Quiroga, C., Cevallos, V., Morales, D., Baldeón, M. E., Cárdenas, P., Rojas-Silva, P., & Ponce, P. (2017). Molecular Identification of *Leishmania* spp. in Sand Flies (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) From Ecuador. *Journal of Medical Entomology*. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx122>

Quiroga, C., Incerti, M., Benítez, D., Luzardo, M., Manta, E., Leyva, A., Paulino, M., Comini, M. A., & Medeiros, A. (2025). Restyling an old scaffold: Ebsulfur analogs with improved activity and selectivity against the infective stage of trypanosomes. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 292, 117675. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2025.117675>

Quiroga, C., Incerti, M., Benitez, D., Manta, E., Medeiros, A., & Comini, M. A. (2024). Development of bioluminescent reporter *Trypanosoma cruzi* and bioassay for compound screening. *Frontiers in Chemical Biology*, 3. <https://doi.org/10.3389/fchbi.2024.1423430>

Raghava, G. P. S., & Barton, G. J. (2006). Quantification of the variation in percentage identity for protein sequence alignments. *BMC Bioinformatics*, 7, 415. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-415>

Rajão, M. A., Furtado, C., Alves, C. L., Passos-Silva, D. G., de Moura, M. B., Schamber-

- Reis, B. L., Kunrath-Lima, M., Zuma, A. A., Vieira-da-Rocha, J. P., Garcia, J. B. F., Mendes, I. C., Pena, S. D. J., Macedo, A. M., Franco, G. R., de Souza-Pinto, N. C., de Medeiros, M. H. G., Cruz, A. K., Motta, M. C. M., Teixeira, S. M. R., & Machado, C. R. (2014). Unveiling benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 55(4), 309–321. <https://doi.org/10.1002/em.21839>
- Rassi, A. J., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *Lancet* (London, England), 375(9723), 1388–1402. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X)
- Ravindranath, P. A., & Sanner, M. F. (2016). AutoSite: an automated approach for pseudo-ligands prediction—from ligand-binding sites identification to predicting key ligand atoms. *Bioinformatics*, 32(20), 3142–3149. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw367>
- Ready, P. D. (2013). Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. *Annual Review of Entomology*, 58, 227–250. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153557>
- Reckenfelderbäumer, N., & Krauth-Siegel, R. L. (2002). Catalytic properties, thiol pK value, and redox potential of *Trypanosoma brucei* tryparedoxin. *The Journal of Biological Chemistry*, 277(20), 17548–17555. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112115200>
- Revuelto, A., de Lucio, H., García-Soriano, J. C., Sánchez-Murcia, P. A., Gago, F., Jiménez-Ruiz, A., Camarasa, M.-J., & Velázquez, S. (2021). Efficient Dimerization Disruption of *Leishmania infantum* Trypanothione Reductase by Triazole-phenyl-thiazoles. *Journal of Medicinal Chemistry*, 64(9), 6137–6160. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.1c00206>
- Ribeiro, J. V., Bernardi, R. C., Rudack, T., Stone, J. E., Phillips, J. C., Freddolino, P. L., &

- Schulten, K. (2016). QwikMD — Integrative Molecular Dynamics Toolkit for Novices and Experts. *Scientific Reports*, 6(1), 26536. <https://doi.org/10.1038/srep26536>
- Rivas, F., Medeiros, A., Quiroga, C., Benítez, D., Comini, M., Rodríguez-Arce, E., Machado, I., Cerecetto, H., & Gambino, D. (2021). New Pd–Fe ferrocenyl antiparasitic compounds with bioactive 8-hydroxyquinoline ligands: a comparative study with their Pt–Fe analogues. *Dalton Trans.*, 50(5), 1651–1665. <https://doi.org/10.1039/D0DT03963B>
- Roberts, S. C., Jiang, Y., Jardim, A., Carter, N. S., Heby, O., & Ullman, B. (2001). Genetic analysis of spermidine synthase from *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 115(2), 217–226. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(01\)00293-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-6851(01)00293-6)
- Robledo, S. M., Puerta, J. A., Muñoz, D. L., Guardo, M., & Vélez, I. D. (2006). Eficacia y tolerancia de la pentamidina en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea producida por *Leishmania (V.) panamensis* en Colombia. *Biomédica*, 26, 188–193. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572006000500020&nrm=iso
- Rodríguez Durán, J., Muñoz-Calderón, A., Gómez, K. A., & Potenza, M. (2021). In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes into metacyclic trypomastigotes using a biphasic medium. *STAR Protocols*, 2(3). <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2021.100703>
- Román, L.-O. J., & Luis, R. (2007). Miltefosine (Hexadecylphosphocholine) Inhibits Cytochrome c Oxidase in *Leishmania donovani* Promastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51(4), 1327–1332. <https://doi.org/10.1128/aac.01415-06>
- Romaña, C. (1963). *Enfermedad de Chagas*. López Libreros. Editores S.R.L, 242pp.

- Romanha, A. J., Castro, S. L. de, Soeiro, M. de N. C., Lannes-Vieira, J., Ribeiro, I., Talvani, A., Bourdin, B., Blum, B., Olivieri, B., Zani, C., Spadafora, C., Chiari, E., Chatelain, E., Chaves, G., Calzada, J. E., Bustamante, J. M., Freitas-Junior, L. H., Romero, L. I., Bahia, M. T., ... Andrade, Z. de A. (2010). In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(2), 233–238. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762010000200022>
- Romano, P. S., Arboit, M. A., Vázquez, C. L., & Colombo, M. I. (2009). The autophagic pathway is a key component in the lysosomal dependent entry of *Trypanosoma cruzi* into the host cell. *Autophagy*, 5(1), 6–18. <https://doi.org/10.4161/auto.5.1.7160>
- Roy, A., Kucukural, A., & Zhang, Y. (2010). I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nature Protocols*, 5(4), 725–738. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.5>
- Ruiz-Santaquiteria, M., Sánchez-Murcia, P. A., Toro, M. A., de Lucio, H., Gutiérrez, K. J., de Castro, S., Carneiro, F. A. C., Gago, F., Jiménez-Ruiz, A., Camarasa, M.-J., & Velázquez, S. (2017). First example of peptides targeting the dimer interface of *Leishmania infantum* trypanothione reductase with potent in vitro antileishmanial activity#. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 135, 49–59. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.04.020>
- Russo, R., Nigro, L. C., Minniti, S., Montineri, A., Gradoni, L., Caldeira, L., & Davidson, R. N. (1996). Visceral leishmaniasis in HIV infected patients: treatment with high dose liposomal amphotericin B (AmBisome). *The Journal of Infection*, 32(2), 133–137. [https://doi.org/10.1016/s0163-4453\(96\)91343-2](https://doi.org/10.1016/s0163-4453(96)91343-2)
- Saccoliti, F., Angiulli, G., Pupo, G., Pescatori, L., Madia, V. N., Messori, A., Colotti, G., Fiorillo, A., Scipione, L., Gramiccia, M., Di Muccio, T., Di Santo, R., Costi, R., & Ilari, A.

- (2017). Inhibition of *Leishmania infantum* trypanothione reductase by diaryl sulfide derivatives. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 32(1), 304–310. <https://doi.org/10.1080/14756366.2016.1250755>
- Saccoliti, F., Di Santo, R., & Costi, R. (2020). Recent Advancement in the Search of Innovative Antiprotozoal Agents Targeting Trypanothione Metabolism. *ChemMedChem*, 15(24), 2420–2435. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cmdc.202000325>
- Salloum, T., Khalifeh, I., & Tokajian, S. (2016). Detection, molecular typing and phylogenetic analysis of *Leishmania* isolated from cases of leishmaniasis among Syrian refugees in Lebanon. *Parasite Epidemiology and Control*, 1(2), 159–168. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2016.02.002>
- Salvatella, R. (2016). Chagas en Uruguay , 1937-2016 . control y atención. 87(1), 49–52.
- Sánchez, G. M. (2005). Especies reactivas del oxígeno y balance redox, parte I: aspectos básicos y principales especies reactivas del oxígeno. *Revista Cubana de Farmacia*, 39, 0. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:74329357>
- Sandalova, T., Zhong, L., Lindqvist, Y., Holmgren, A., & Schneider, G. (2001). Three-dimensional structure of a mammalian thioredoxin reductase: Implications for mechanism and evolution of a selenocysteine-dependent enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(17), 9533–9538. <https://doi.org/10.1073/pnas.171178698>
- Sands, K. N., Burman, A. L., Ansah-Asamoah, E., & Back, T. G. (2023). Chemistry Related to the Catalytic Cycle of the Antioxidant Ebselen. *Molecules*, 28(9). <https://doi.org/10.3390/molecules28093732>
- Santana, K. H., Oliveira, L. G. R., Barros de Castro, D., & Pereira, M. (2020). *Epidemiology*

- of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in the Americas: systematic review and meta-analysis. *Tropical Medicine & International Health : TM & IH*, 25(7), 752–763. <https://doi.org/10.1111/tmi.13398>
- Sarabi Asiabar, A., Jabbari, A., Rezapour, A., Jabbari Khanbebin, M., Atafimanesh, P., Mazaheri, E., & Hadian, M. (2024). Policy and Executive Barriers in Preventing and Eradicating Neglected Tropical Diseases: A Systematic Review. *International Journal of Preventive Medicine*, 15, 49. https://doi.org/10.4103/ijpvm.ijpvm_251_23
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schlecker, T., Comini, M. A., Melchers, J., Ruppert, T., & Krauth-Siegel, R. L. (2007). Catalytic mechanism of the glutathione peroxidase-type trypanothione peroxidase of *Trypanosoma brucei*. *The Biochemical Journal*, 405(3), 445–454. <https://doi.org/10.1042/BJ20070259>
- Schmidt, H., & Krauth-Siegel, R. L. (2003). Functional and Physicochemical Characterization of the Thioredoxin System in *Trypanosoma brucei**. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 46329–46336. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:27195676>
- Schmidt, T. J., Brun, R., Willuhn, G., & Khalid, S. A. (2002). Anti-trypanosomal activity of helenalin and some structurally related sesquiterpene lactones. *Planta Medica*, 68(8), 750–751. <https://doi.org/10.1055/s-2002-33799>
- Schmidt, T. J., Da Costa, F. B., Lopes, N. P., Kaiser, M., & Brun, R. (2014). In Silico

- prediction and experimental evaluation of furanoheliangolide sesquiterpene lactones as potent agents against *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(1), 325–332. <https://doi.org/10.1128/AAC.01263-13>
- Schöneich, C., Narayanaswami, V., Asmus, K.-D., & Sies, H. (1990). Reactivity of ebselen and related selenoorganic compounds with 1,2-dichloroethane radical cations and halogenated peroxy radicals. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 282(1), 18–25. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(90\)90081-9](https://doi.org/10.1016/0003-9861(90)90081-9)
- Shamovsky, I., Ripa, L., Blomberg, N., Eriksson, L. A., Hansen, P., Mee, C. D., Tyrchan, C., O'Donovan, M. R., & Sjö, P. (2012). Theoretical studies of chemical reactivity of metabolically activated forms of aromatic amines toward DNA. *Chemical Research in Toxicology*, 25(10), 2236–2252. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:24519671>
- Sharlow, E. R., Lyda, T. A., Dodson, H. C., Mustata, G., Morris, M. T., Leimgruber, S. S., Lee, K. H., Kashiwada, Y., Close, D., Lazo, J. S., & Morris, J. C. (2010). A target-based high throughput screen yields *Trypanosoma brucei* hexokinase small molecule inhibitors with antiparasitic activity. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000659>
- Silvestrini, M. M. A., Alessio, G. D., Frias, B. E. D., Sales Júnior, P. A., Araújo, M. S. S., Silvestrini, C. M. A., Brito Alvim de Melo, G. E., Martins-Filho, O. A., Teixeira-Carvalho, A., & Martins, H. R. (2024). New insights into *Trypanosoma cruzi* genetic diversity, and its influence on parasite biology and clinical outcomes. *Frontiers in Immunology*, 15, 1342431. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2024.1342431>
- Simarro, P. P., Cecchi, G., Paone, M., Franco, J. R., Diarra, A., Ruiz, J. A., Fèvre, E. M., Courtin, F., Mattioli, R. C., & Jannin, J. G. (2010). The Atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases.

International Journal of Health Geographics, 9, 57. <https://doi.org/10.1186/1476-072X-9-57>

Singh, R. P., Picado, A., Alam, S., Hasker, E., Singh, S. P., Ostyn, B., Chappuis, F., Sundar, S., & Boelaert, M. (2012). Post-kala-azar dermal leishmaniasis in visceral leishmaniasis-endemic communities in Bihar, India. *Tropical Medicine and International Health*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2012.03067.x>

Singh, S., & Sivakumar, R. (2004). Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 10(6), 307–315. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10156-004-0348-9>

Sippl, M. J. (1993). Recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 17(4), 355–362. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/prot.340170404>

Soares, R. P. P., Macedo, M. E., Ropert, C., Gontijo, N. F., Almeida, I. C., Gazzinelli, R. T., Pimenta, P. F. P., & Turco, S. J. (2002). *Leishmania chagasi*: lipophosphoglycan characterization and binding to the midgut of the sand fly vector *Lutzomyia longipalpis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 121(2), 213–224. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(02\)00033-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0166-6851(02)00033-6)

Sousa, A. F., Gomes-Alves, A. G., Benítez, D., Comini, M. A., Flohé, L., Jaeger, T., Passos, J., Stuhlmann, F., Tomás, A. M., & Castro, H. (2014). Genetic and chemical analyses reveal that trypanothione synthetase but not glutathionylspermidine synthetase is essential for *Leishmania infantum*. *Free Radical Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.05.007>

Sousa Silva, M., Ferreira, A. E. N., Tomás, A. M., Cordeiro, C., & Ponces Freire, A. (2005). Quantitative assessment of the glyoxalase pathway in *Leishmania infantum* as a

- therapeutic target by modelling and computer simulation. *The FEBS Journal*, 272(10), 2388–2398. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04632.x>
- Spinks, D., Shanks, E. J., Cleghorn, L. A. T., McElroy, S., Jones, D., James, D., Fairlamb, A. H., Frearson, J. A., Wyatt, P. G., & Gilbert, I. H. (2009). Investigation of trypanothione reductase as a drug target in *Trypanosoma brucei*. *ChemMedChem*, 4(12), 2060–2069. <https://doi.org/10.1002/cmdc.200900262>
- Stank, A., Kokh, D. B., Horn, M., Sizikova, E., Neil, R., Panecka, J., Richter, S., & Wade, R. C. (2017). TRAPP webserver: predicting protein binding site flexibility and detecting transient binding pockets. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W325–W330. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx277>
- Sülsen, V. P., Puente, V., Papademetrio, D., Batlle, A., Martino, V. S., Frank, F. M., & Lombardo, M. E. (2016). Mode of Action of the Sesquiterpene Lactones Psilostachyin and Psilostachyin C on *Trypanosoma cruzi*. *PloS One*, 11(3), e0150526. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150526>
- Sundar, S., & Chakravarty, J. (2010). Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: dose and response. *Journal of Global Infectious Diseases*, 2(2), 159–166. <https://doi.org/10.4103/0974-777X.62886>
- Sunter, J., & Gull, K. (2017). Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biology*, 7(9). <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>
- Swe, M. M. M., Phyo, A. P., Cooper, B. S., White, N. J., Smithuis, F., & Ashley, E. A. (2023). A systematic review of neglected tropical diseases (NTDs) in Myanmar. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 17(11), e0011706. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011706>

- Tamay-Segovia, P., Alejandre-Aguilar, R., Martínez, F., Villalobos, G., de la Serna, F. J. Z.-D., de la Torre, P., Laclette, J. P., Blum-Domínguez, S., & Espinoza, B. (2008). Two *Triatoma dimidiata* clades (Chagas disease vector) associated with different habitats in southern Mexico and Central America. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78(3), 472–478.
- Tarleton, R. L., Gürtler, R. E., Urbina, J. A., Ramsey, J., & Viotti, R. (2014). Chagas Disease and the London Declaration on Neglected Tropical Diseases. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(10), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003219>
- Tayama, Y., Mizukami, S., Toume, K., Komatsu, K., Yanagi, T., Nara, T., Tieu, P., Huy, N. T., Hamano, S., & Hirayama, K. (2023). Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *Coptis* rhizome extract and its constituents. *Tropical Medicine and Health*, 51(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s41182-023-00502-2>
- Taylor, M. C., Kaur, H., Blessington, B., Kelly, J. M., & Wilkinson, S. R. (2008). Validation of spermidine synthase as a drug target in African trypanosomes. *The Biochemical Journal*, 409(2), 563–569. <https://doi.org/10.1042/BJ20071185>
- Thelander, L., & Reichard, P. (1979). Reduction of ribonucleotides. *Annual Review of Biochemistry*, 48, 133–158. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.48.070179.001025>
- Tonelli, R. R., Silber, A. M., Almeida-de-Faria, M., Hirata, I. Y., Colli, W., & Alves, M. J. M. (2004). L-Proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cellular Microbiology*, 6(8), 733–741. [https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00397.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00397.x)
- Torrie, L. S., Wyllie, S., Spinks, D., Oza, S. L., Thompson, S., Harrison, J. R., Gilbert, I. H., Wyatt, P. G., Fairlamb, A. H., & Frearson, J. A. (2009a). Chemical validation of trypanothione synthetase: A potential drug target for human trypanosomiasis. *Journal*

of Biological Chemistry. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.045336>

Torrie, L. S., Wyllie, S., Spinks, D., Oza, S. L., Thompson, S., Harrison, J. R., Gilbert, I. H., Wyatt, P. G., Fairlamb, A. H., & Frearson, J. A. (2009b). Chemical Validation of Trypanothione Synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, 284(52), 36137–36145. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.045336>

Tosco, P., & Balle, T. (2011). Open3DQSAR: a new open-source software aimed at high-throughput chemometric analysis of molecular interaction fields. *Journal of Molecular Modeling*, 17(1), 201–208. <https://doi.org/10.1007/s00894-010-0684-x>

Trossero, C., Caffarena, G. E., Hure, E., & Rizzotto, M. G. (2006). Detección de mutagenicidad en compuestos N-Nitroso con el test de Ames. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:93650537>

Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31(2), 455–461. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/jcc.21334>

Turner, E., Hager, L. J., & Shapiro, B. M. (1988). Ovothiol Replaces Glutathione Peroxidase as a Hydrogen Peroxide Scavenger in Sea Urchin Eggs. *Science*, 242(4880), 939–941. <https://doi.org/10.1126/science.3187533>

Tyler, K. M., & Engman, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*, 31(5), 472–481. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00153-9](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00153-9)

Uliassi, E., Fiorani, G., Krauth-Siegel, R. L., Bergamini, C., Fato, R., Bianchini, G., Carlos Menéndez, J., Molina, M. T., López-Montero, E., Falchi, F., Cavalli, A., Gul, S., Kuzikov, M., Ellinger, B., Witt, G., Moraes, C. B., Freitas-Junior, L. H., Borsari, C., Costi, M. P.,

- & Bolognesi, M. L. (2017). Crassiflorone derivatives that inhibit *Trypanosoma brucei* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (TbGAPDH) and *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase (TcTR) and display trypanocidal activity. *European Journal of Medicinal Chemistry*. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.005>
- Ulrich, K., Finkenzeller, C., Merker, S., Rojas, F., Matthews, K., Ruppert, T., & Krauth-Siegel, R. L. (2017). Stress-Induced Protein S-Glutathionylation and S-Trypanothionylation in African Trypanosomes—A Quantitative Redox Proteome and Thiol Analysis. *Antioxidants & Redox Signaling*, 27(9), 517–533. <https://doi.org/10.1089/ars.2016.6947>
- Unidas, N. (2025). Objetivos de Desarrollo Sostenible. <https://www.un.org/sustainabledevelopment/es/objetivos-de-desarrollo-sostenible/>
- van Bladeren, P. J. (2000). Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chemico-Biological Interactions*, 129 1-2, 61–76. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:31420929>
- Van Den Abbeele, J., Caljon, G., De Ridder, K., De Baetselier, P., & Coosemans, M. (2010). *Trypanosoma brucei* Modifies the Tsetse Salivary Composition, Altering the Fly Feeding Behavior That Favors Parasite Transmission. *PLOS Pathogens*, 6(6), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000926>
- van den Berg, S., Löfdahl, P.-Å., Härd, T., & Berglund, H. (2006). Improved solubility of TEV protease by directed evolution. *Journal of Biotechnology*, 121(3), 291–298. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2005.08.006>
- Vercesi, A. E., & Docampo, R. (1992). Ca²⁺ transport by digitonin-permeabilized *Leishmania donovani*. Effects of Ca²⁺, pentamidine and WR-6026 on mitochondrial membrane potential in situ. *The Biochemical Journal*, 284 (Pt 2(Pt 2), 463–467.

<https://doi.org/10.1042/bj2840463>

Vickers, T. J., Greig, N., & Fairlamb, A. H. (2004). A trypanothione-dependent glyoxalase I with a prokaryotic ancestry in *Leishmania major*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36), 13186–13191. <https://doi.org/10.1073/pnas.0402918101>

Vincendeau, P., & Bouteille, B. (2006). Immunology and immunopathology of African trypanosomiasis. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 78(4), 645–665. <https://doi.org/10.1590/s0001-37652006000400004>

Voak, A. A., Gobalakrishnapillai, V., Seifert, K., Balczo, E., Hu, L., Hall, B. S., & Wilkinson, S. R. (2013). An Essential Type I Nitroreductase from *Leishmania major* Can Be Used to Activate Leishmanicidal Prodrugs. *Journal of Biological Chemistry*, 288(40), 28466–28476. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.M113.494781>

Walton, J. G. A., Jones, D. C., Kiuru, P., Durie, A. J., Westwood, N. J., & Fairlamb, A. H. (2011). Synthesis and Evaluation of Indatraline-Based Inhibitors for Trypanothione Reductase. *ChemMedChem*, 6(2), 321–328. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/cmdc.201000442>

Ward, A. I., Olmo, F., Atherton, R. L., Taylor, M. C., & Kelly, J. M. (2020). *Trypanosoma cruzi* amastigotes that persist in the colon during chronic stage murine infections have a reduced replication rate. *Open Biology*, 10(12), 200261. <https://doi.org/10.1098/rsob.200261>

Wiederstein, M., & Sippl, M. J. (2007). ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Research*, 35(suppl_2), W407–W410. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>

Wilkinson, S. R., Bot, C., Kelly, J. M., & Hall, B. S. (2011). Trypanocidal activity of

nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 11, 16, 2072–2084.
<https://api.semanticscholar.org/CorpusID:22627081>

Wilkinson, S. R., Horn, D., Prathalingam, S. R., & Kelly, J. M. (2003). RNA interference identifies two hydroperoxide metabolizing enzymes that are essential to the bloodstream form of the african trypanosome. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(34), 31640–31646. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303035200>

Wilkinson, S. R., & Kelly, J. M. (2009). Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 11, e31.
<https://doi.org/10.1017/S1462399409001252>

Wilkinson, S. R., Temperton, N. J., Mondragon, A., & Kelly, J. M. (2000). Distinct Mitochondrial and Cytosolic Enzymes Mediate Trypanothione-dependent Peroxide Metabolism in *Trypanosoma cruzi* *. *Journal of Biological Chemistry*, 275(11), 8220–8225. <https://doi.org/https://doi.org/10.1074/jbc.275.11.8220>

Wishart, D. S., Feunang, Y. D., Guo, A. C., Lo, E. J., Marcu, A., Grant, J. R., Sajed, T., Johnson, D., Li, C., Sayeeda, Z., Assempour, N., Iynkkaran, I., Liu, Y., Maciejewski, A., Gale, N., Wilson, A., Chin, L., Cummings, R., Le, D., ... Wilson, M. (2018). DrugBank 5.0: a major update to the DrugBank database for 2018. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D1074–D1082. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1037>

World Health Organization (WHO). (n.d.). Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness). [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness))

World Health Organization (WHO). (2025). Neglected tropical diseases (NTDs). https://www.who.int/health-topics/neglected-tropical-diseases#tab=tab_1

World Health Organization (WHO). (2023). Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness).

Wulsten, I. F., Costa-Silva, T. A., Mesquita, J. T., Lima, M. L., Galuppo, M. K., Taniwaki, N. N., Borborema, S. E. T., Da Costa, F. B., Schmidt, T. J., & Tempone, A. G. (2017). Investigation of the Anti-Leishmania (Leishmania) infantum Activity of Some Natural Sesquiterpene Lactones. *Molecules*, 22(5).
<https://doi.org/10.3390/molecules22050685>

Wyllie, S., Oza, S. L., Patterson, S., Spinks, D., Thompson, S., & Fairlamb, A. H. (2009). Dissecting the essentiality of the bifunctional trypanothione synthetase-amidase in *Trypanosoma brucei* using chemical and genetic methods. *Molecular Microbiology*.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06761.x>

Wyllie, S., Patterson, S., & Fairlamb, A. H. (2013). Assessing the essentiality of *Leishmania donovani* nitroreductase and its role in nitro drug activation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57(2), 901–906. <https://doi.org/10.1128/AAC.01788-12>

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J., & Zhang, Y. (2015). The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. In *Nature methods* (Vol. 12, Issue 1, pp. 7–8).
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3213>

Yuil, J. M. R., & Sousa, O. E. (2010). Inmunología en la Infección por *Leishmania*: conceptos actuales. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:201206430>

Zambrano-Barragán, P., Ramírez Hernández, S., Freier, L. F., Luzes, M., Sobczyk, R., Rodríguez, A., & Beach, C. (2021). The impact of COVID-19 on Venezuelan migrants' access to health: A qualitative study in Colombian and Peruvian cities. *Journal of Migration and Health*, 3, 100029.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jmh.2020.100029>

- Zer, R., Yaroslavski, I., Rosen, L. J., & Warburg, A. (2001). Effect of sand fly saliva on Leishmania uptake by murine macrophages. *International Journal for Parasitology*, 31(8), 810–814. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:24932230>
- Zhang, J.-H., Chung, T. D. Y., & Oldenburg, K. R. (1999). A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *SLAS Discovery*, 4(2), 67–73. <https://doi.org/https://doi.org/10.1177/108705719900400206>
- Zhang, Y. (2008). I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-40>
- Zhang, Y., Bond, C. S., Bailey, S., Cunningham, M. L., Fairlamb, A. H., & Hunter, W. N. (1996). The crystal structure of trypanothione reductase from the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at 2.3 Å resolution. *Protein Science*, 5(1), 52–61. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/pro.5560050107>
- Zhou, L., Stewart, G., Rideau, E., Westwood, N. J., & Smith, T. K. (2013). A Class of 5-Nitro-2-furancarboxylamides with Potent Trypanocidal Activity against *Trypanosoma brucei* in Vitro. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(3), 796–806. <https://doi.org/10.1021/jm301215e>
- Zingales, B., & Bartholomeu, D. C. (2022). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: impact on transmission cycles and Chagas disease. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 117, e210193. <https://doi.org/10.1590/0074-02760210193>
- Zingales, B., Miles, M. A., Campbell, D. A., Tibayrenc, M., Macedo, A. M., Teixeira, M. M. G., Schijman, A. G., Llewellyn, M. S., Lages-Silva, E., Machado, C. R., Andrade, S. G., & Sturm, N. R. (2012). The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infection, Genetics and Evolution : Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious*

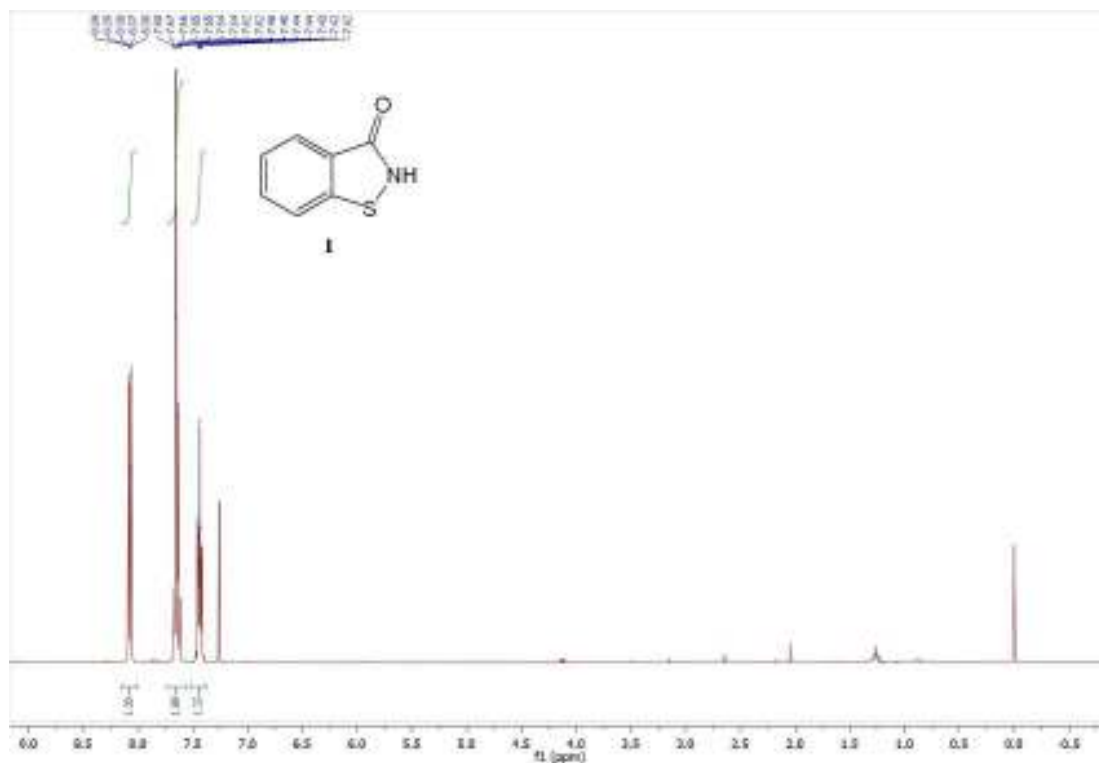
Diseases, 12(2), 240–253. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>

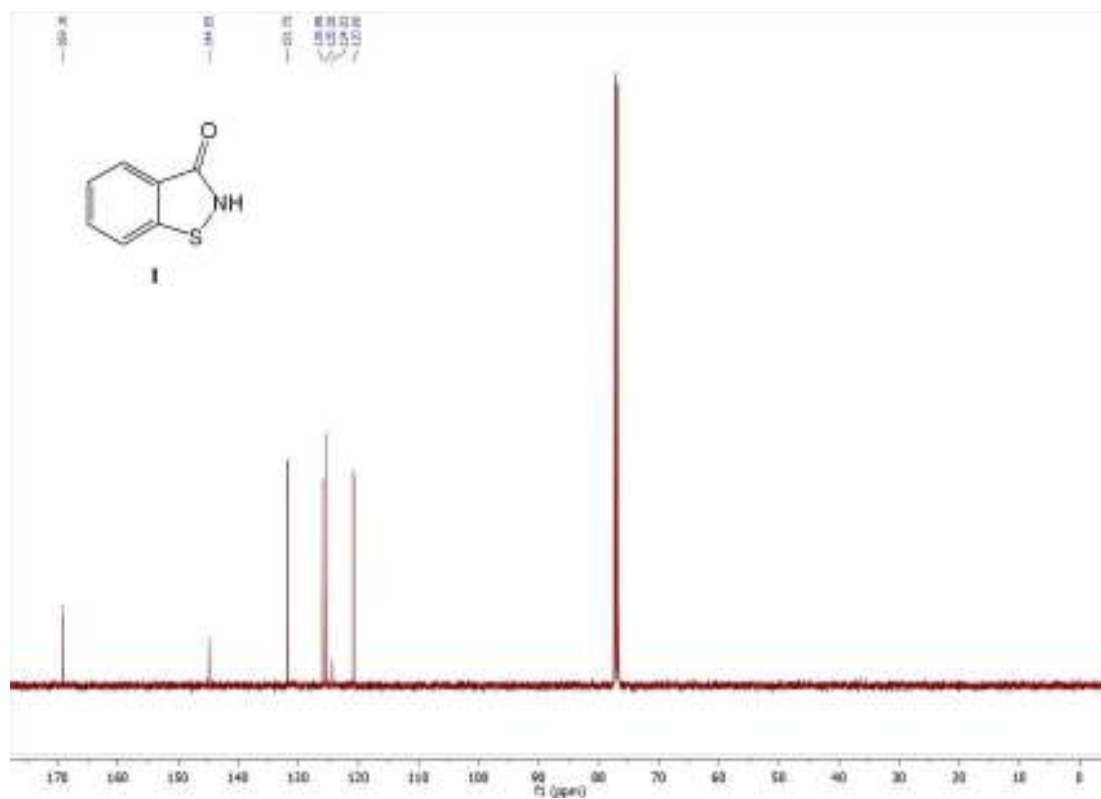
Zorov, D. B., Krasnikov, B. F., Kuzminova, A. E., Vysokikh, M. Y., & Zorova, L. D. (1997). Mitochondria Revisited. Alternative Functions of Mitochondria. *Bioscience Reports*, 17, 507–520. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:30252274>

MATERIAL SUPLEMENTARIO

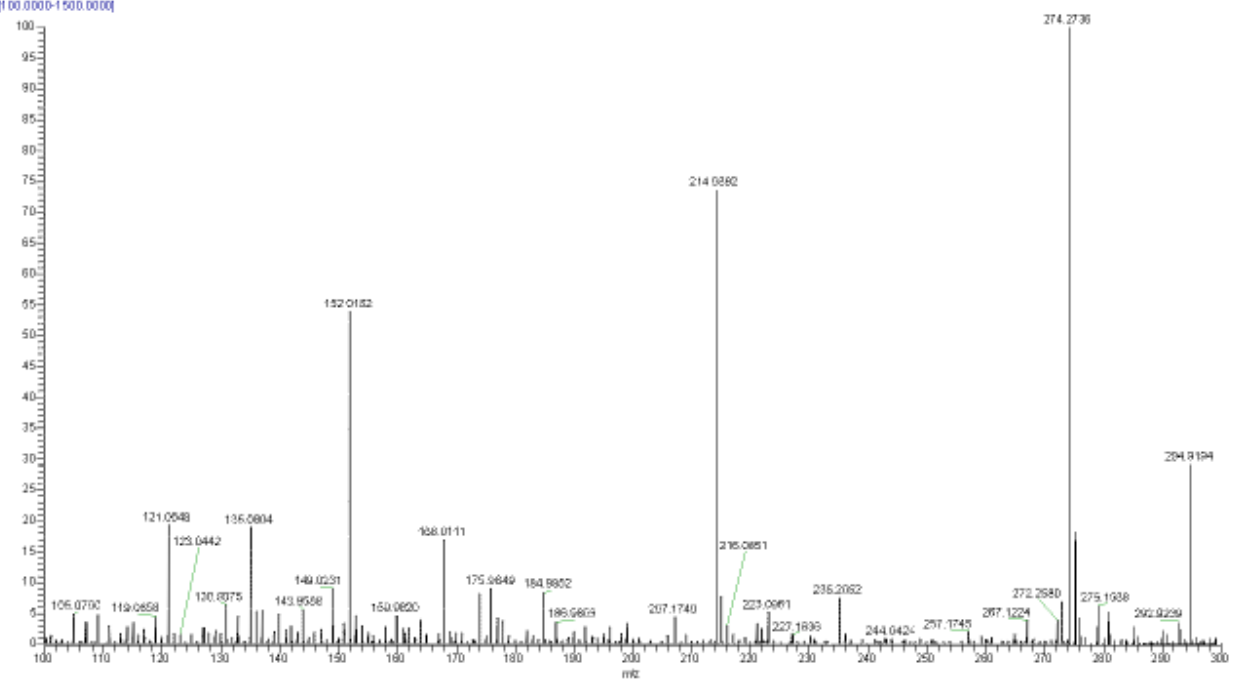
Figura S1. Espectros de RMN/HRMS de los Compuestos Sintetizados

Compound 1

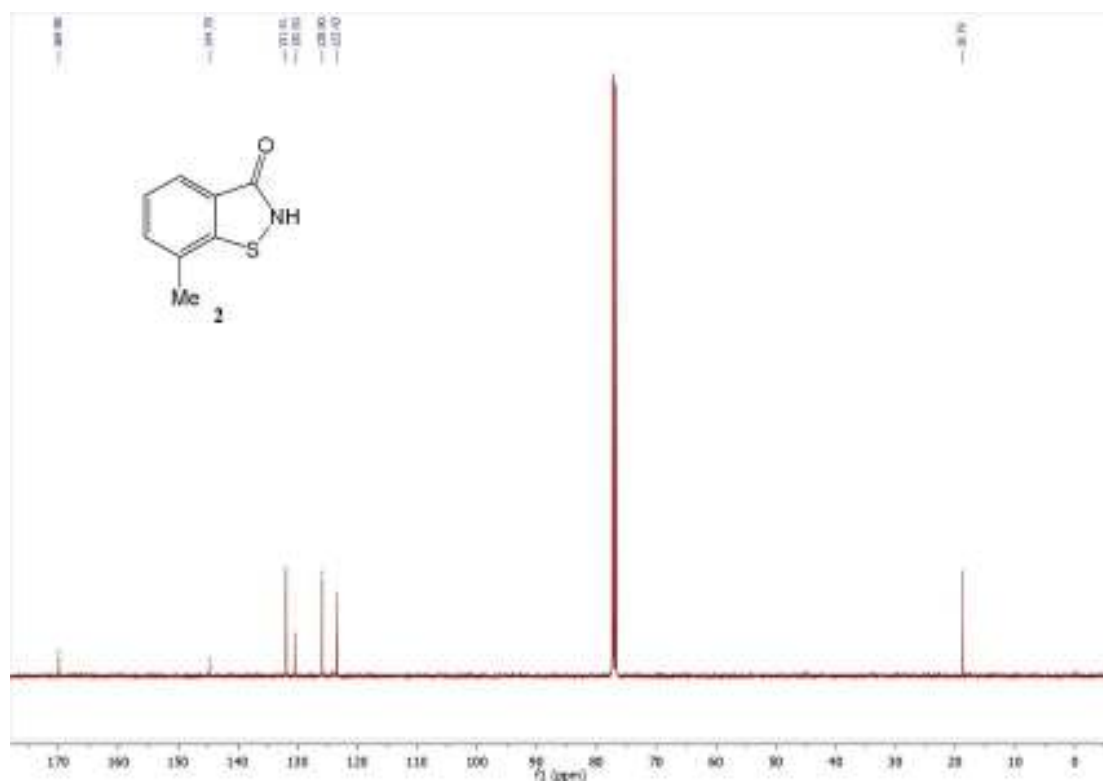
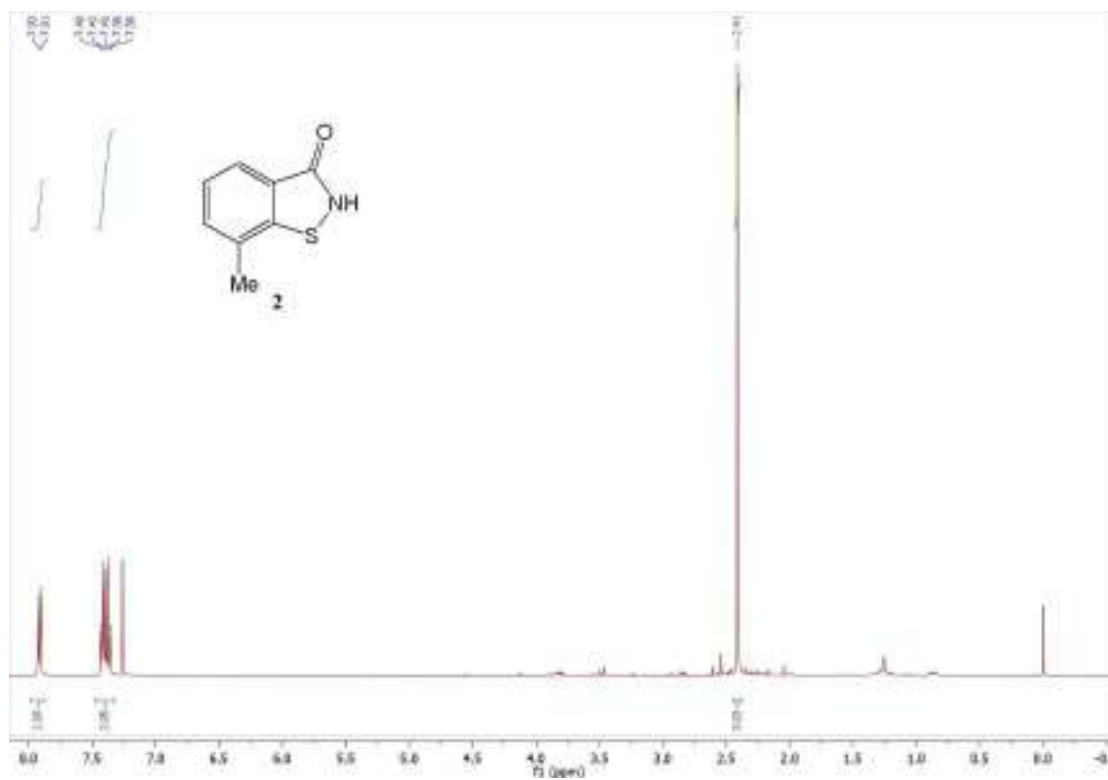




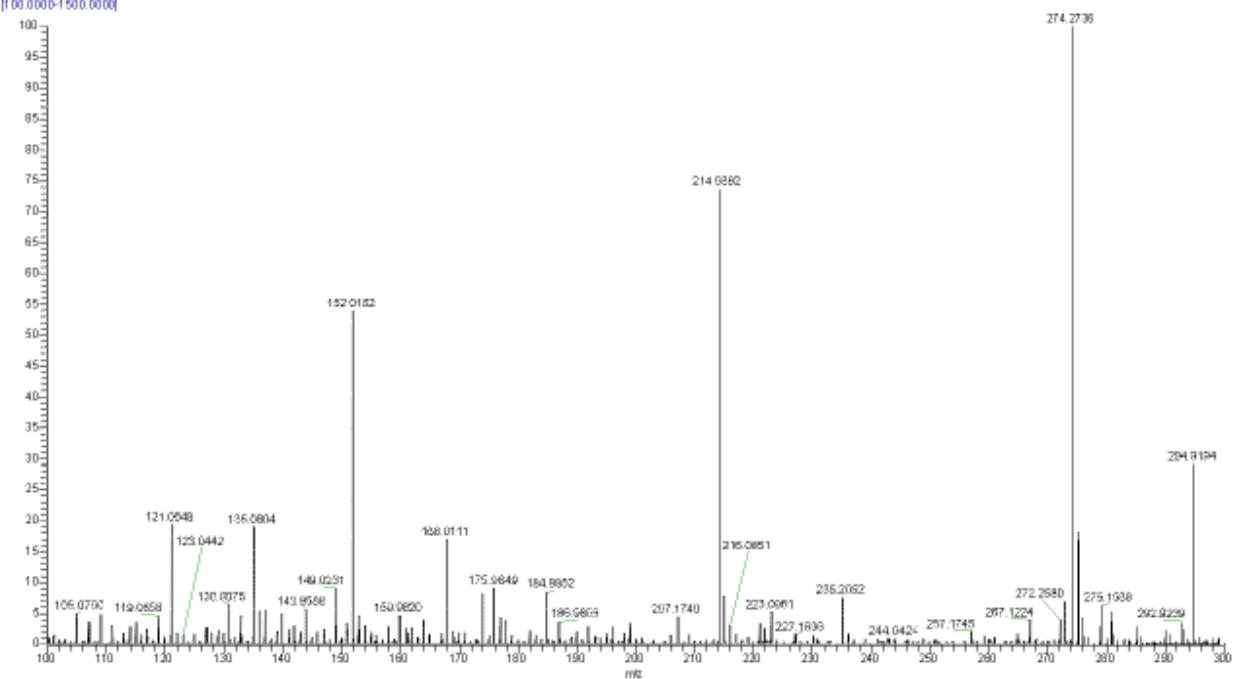
MS compound 1 #20 RT: 0.09 AV: 1 NL
7.08E7 T: FTMS + p ESI Full ms
[100.0000-1500.0000]



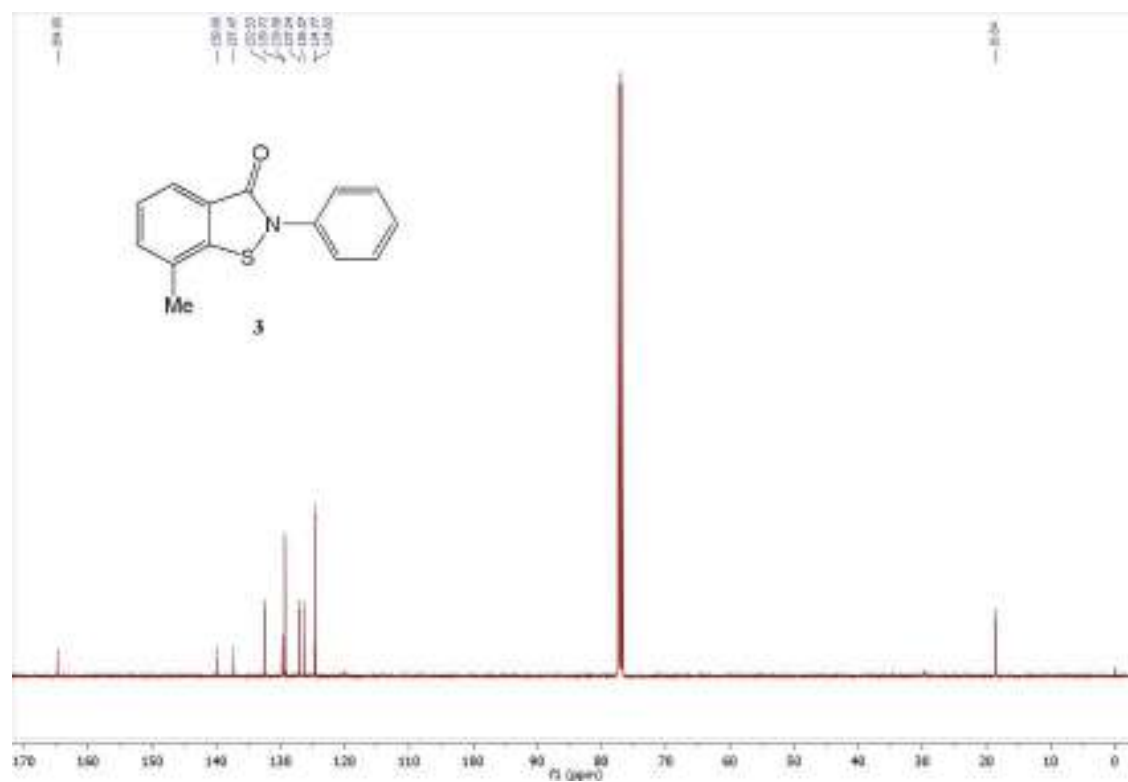
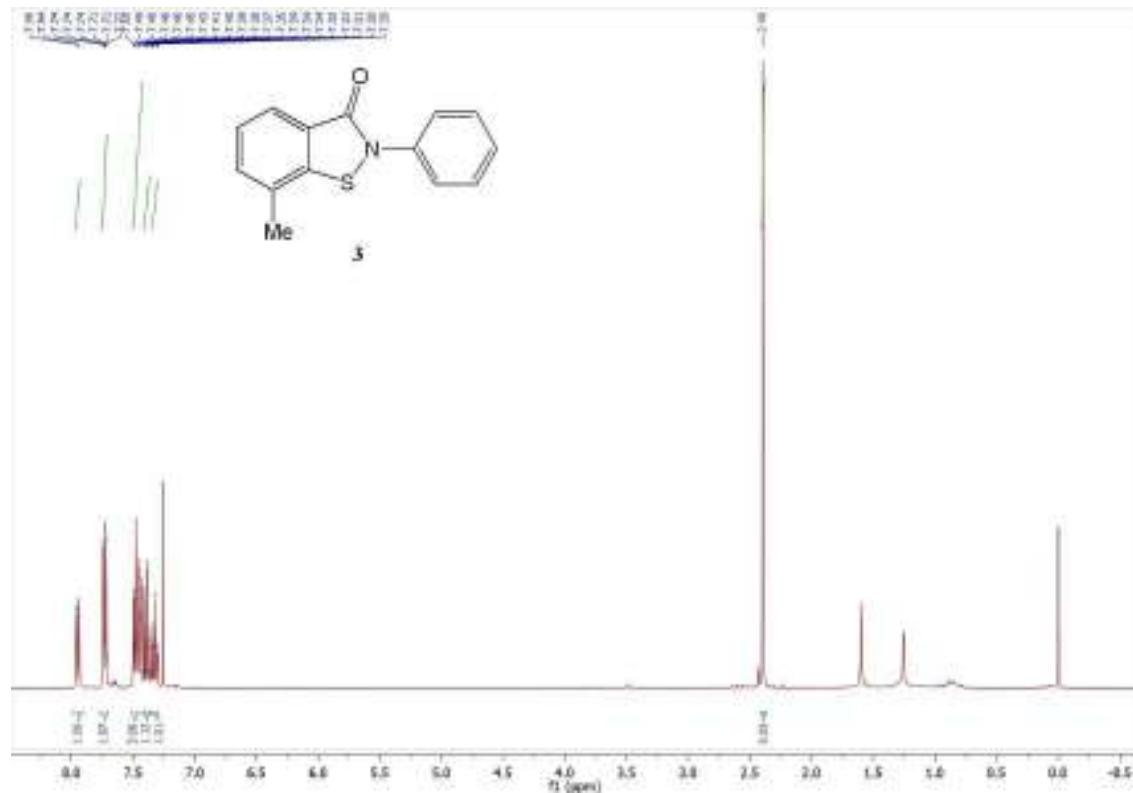
Compound 2



MS compound 1 #20 RT: 0.09 AV: 1 NL
7.08E7 T: FTMS + p ESI Full ms
[1 00.0000-1500.0000]

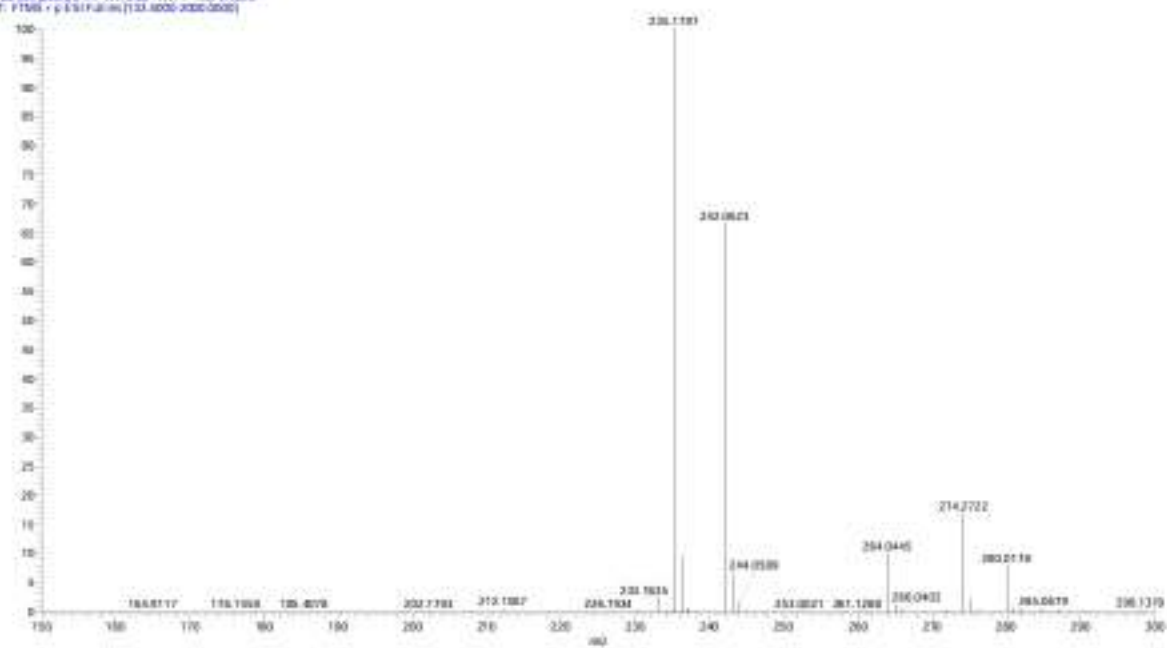


Compound 3

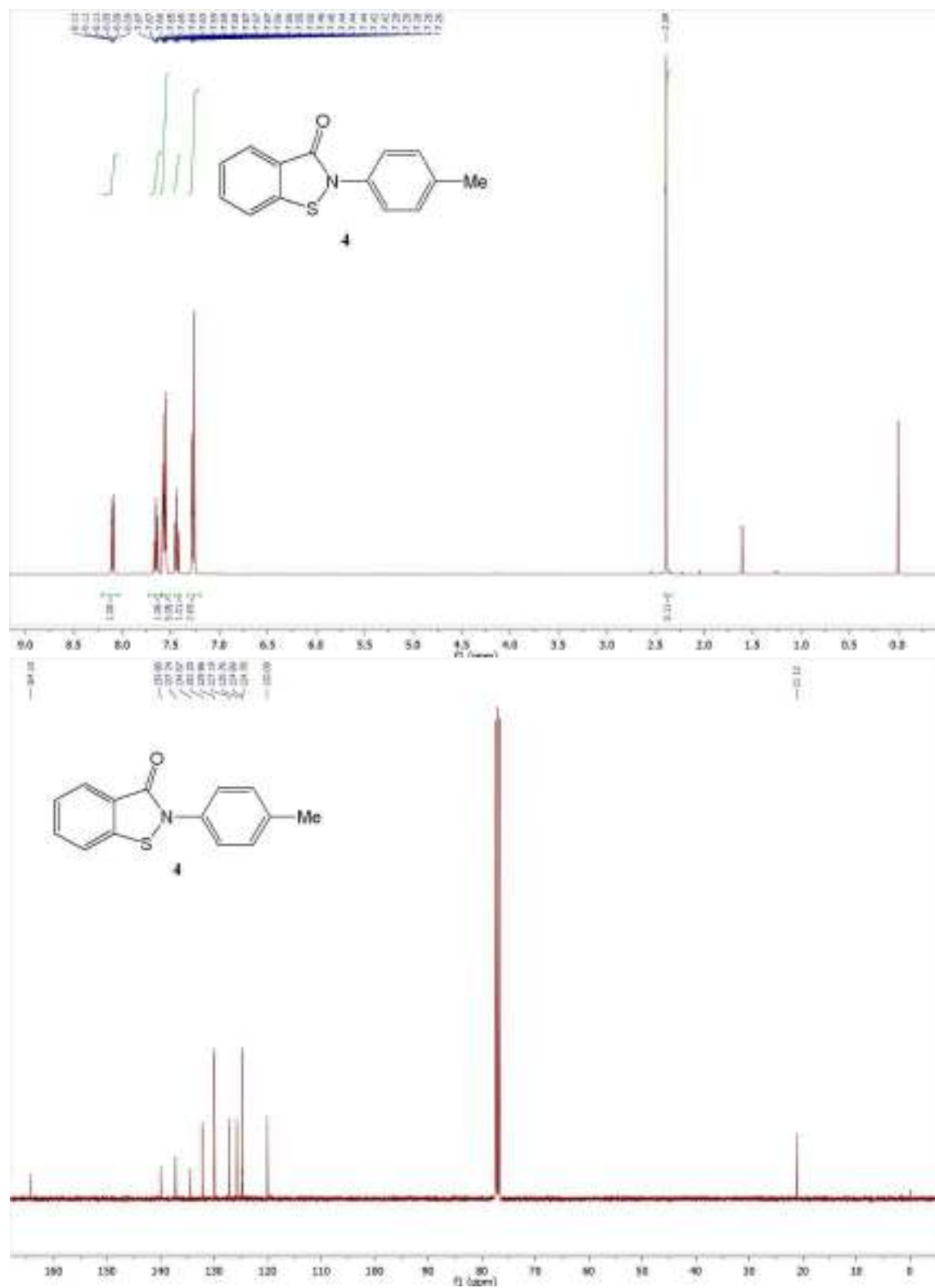


1

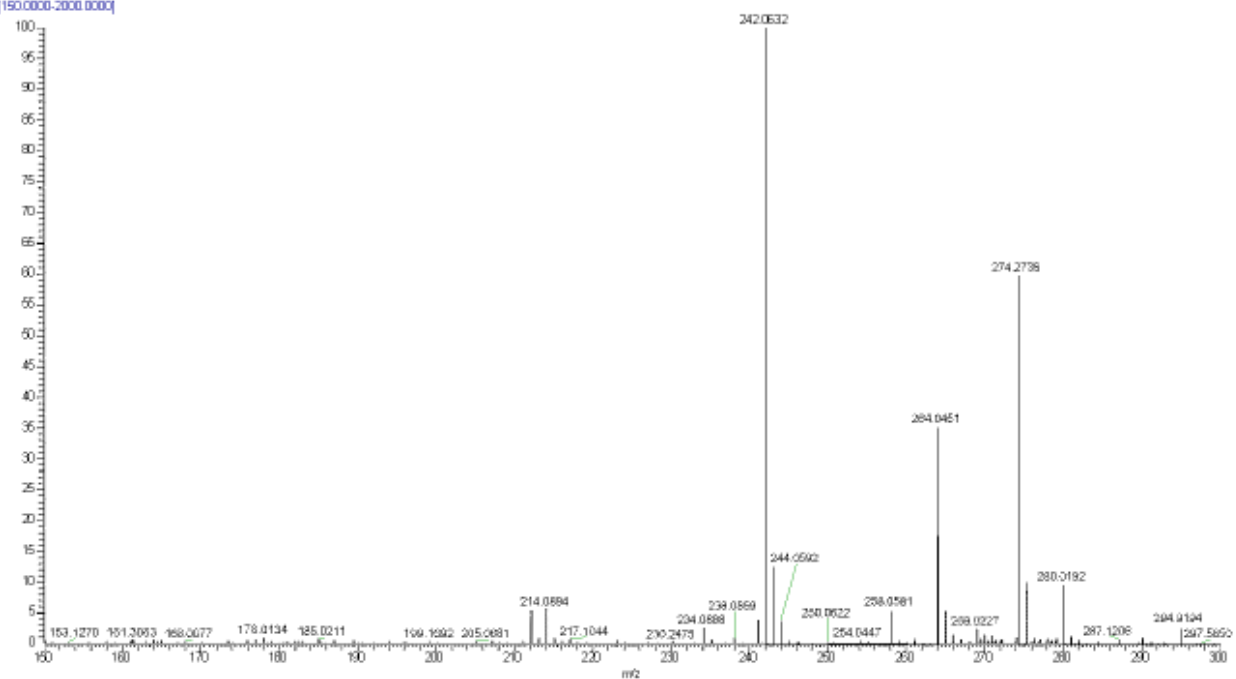
MS compound 3.44 RT: 0.22 AM: 1. ML: 5.12E8
T: 11568 + p 5.517461m (133.8000-3000.0000)



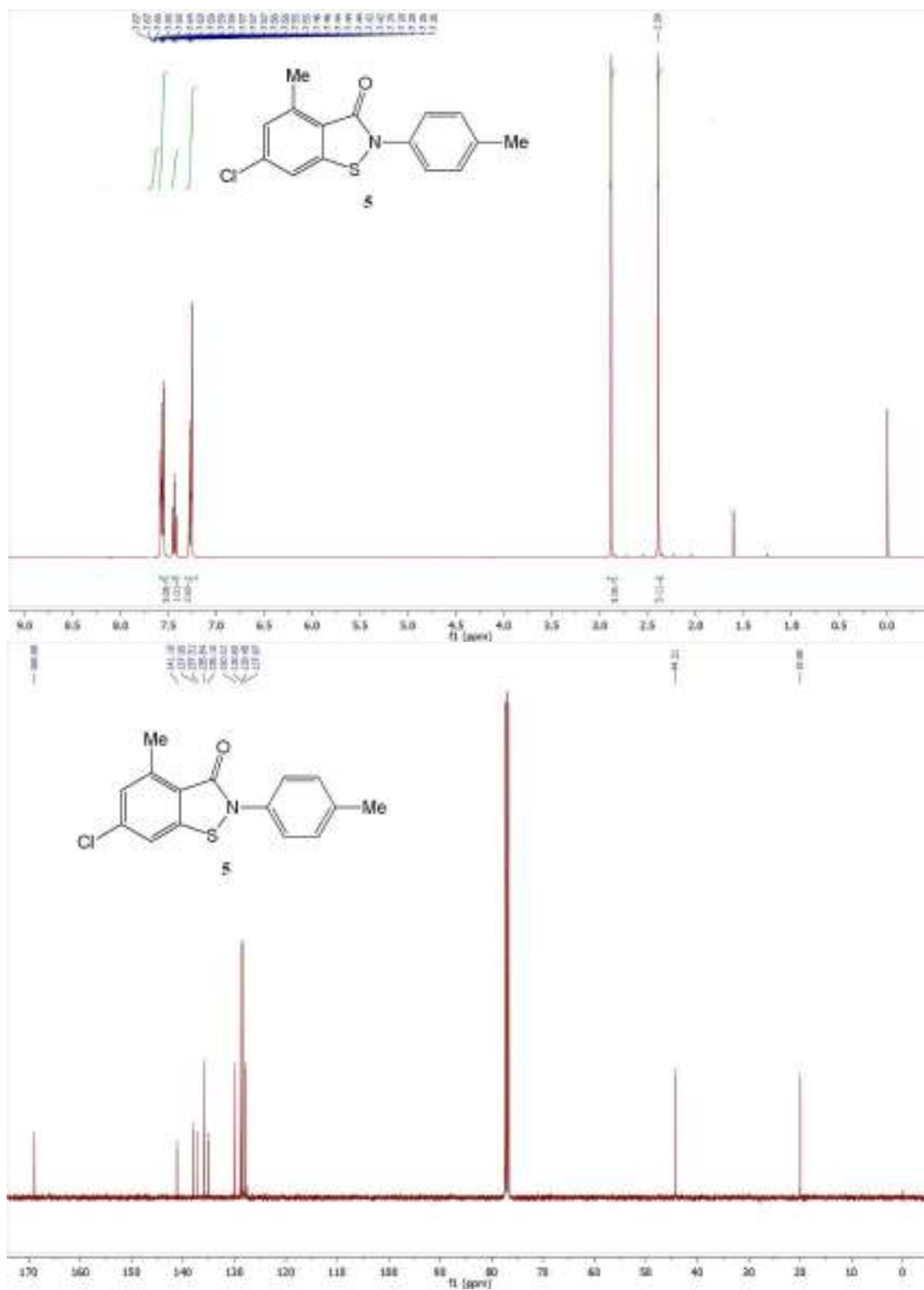
Compound 4



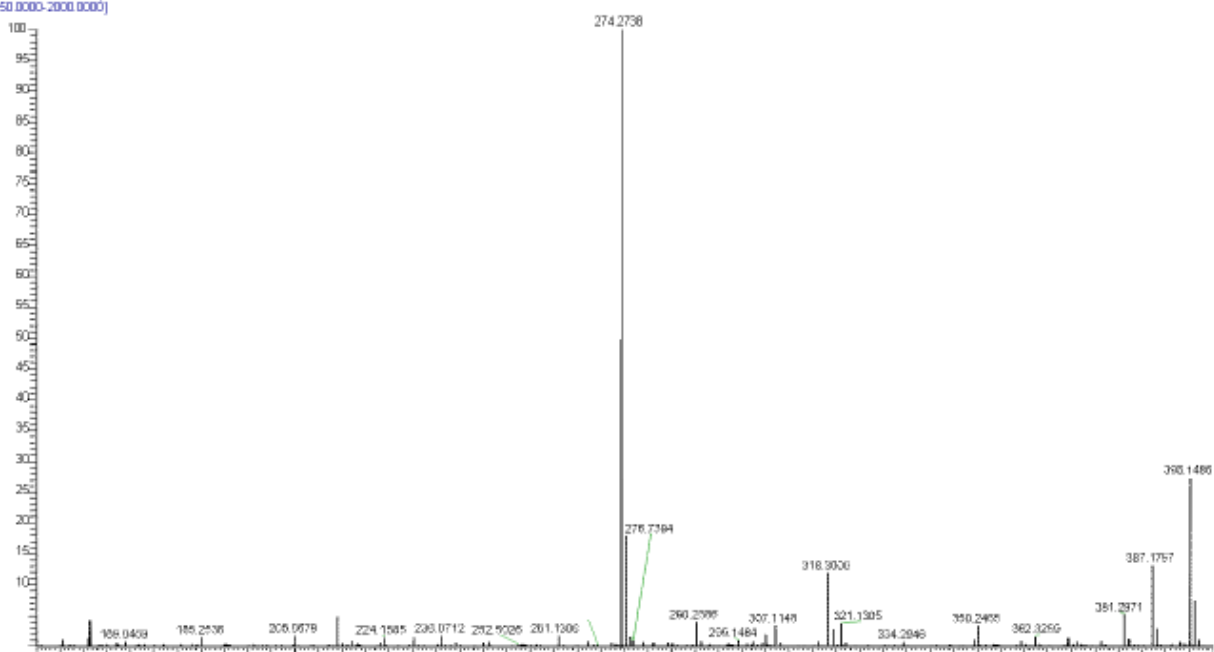
MS compound 4 #22 RT: 0.10 AV: 1 NL
5.4658 T: FTMS+ p E3 Full ms
[150.0000-2000.0000]



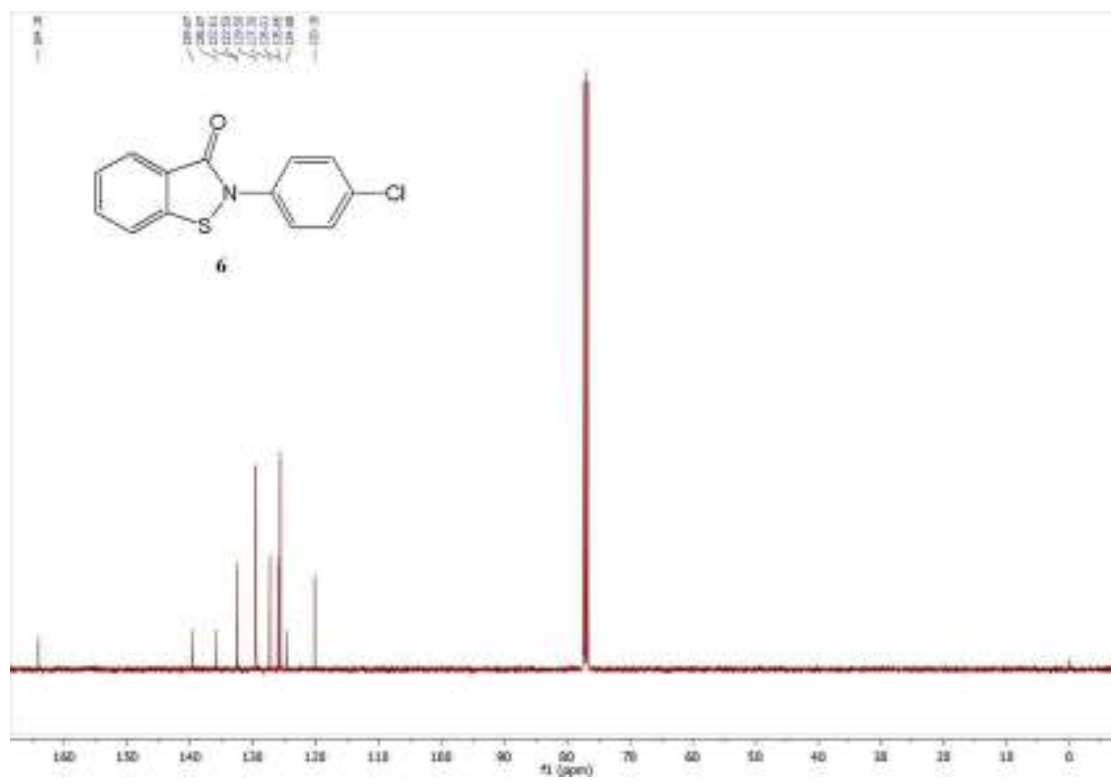
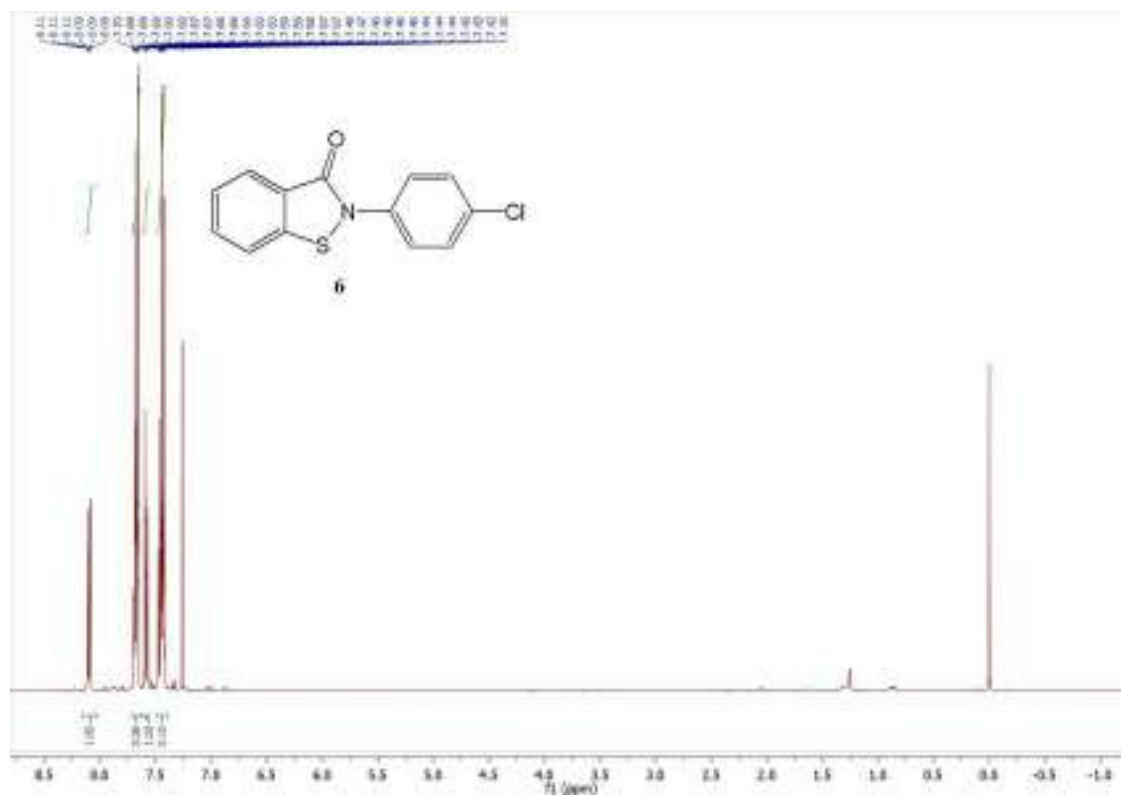
Compound 5



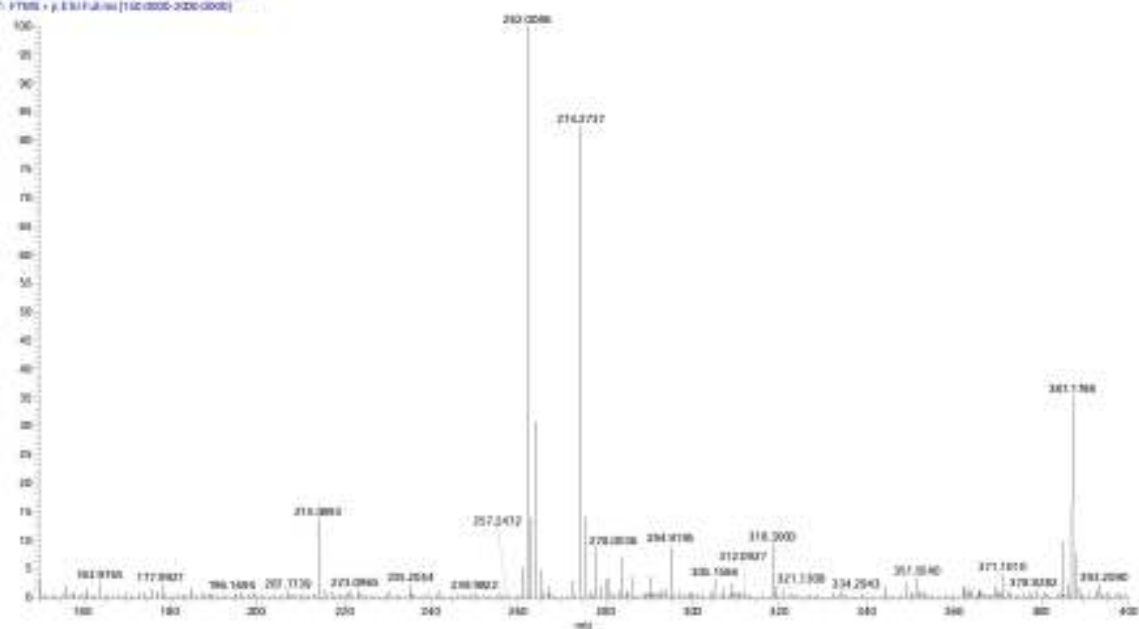
MS compound 5 #69 RT: 0.26 AV: 1 NL
1.62EB T: FTMS + p ESI Full ms
[150.0000-2000.0000]



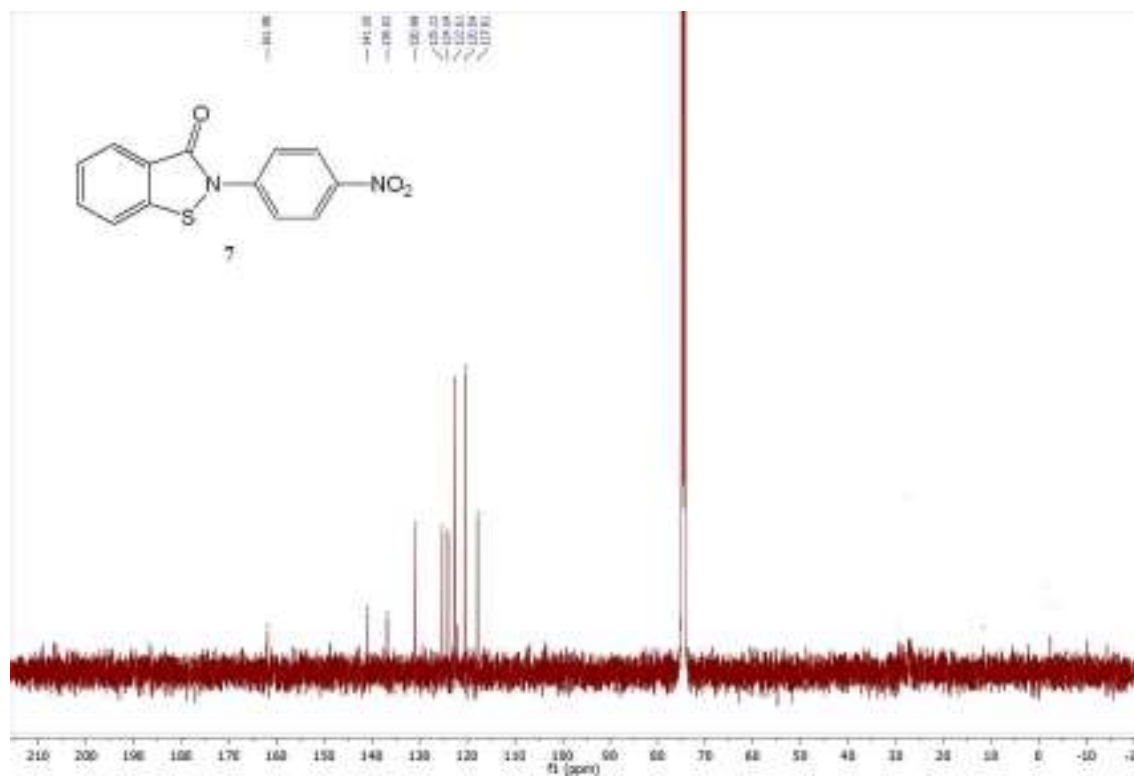
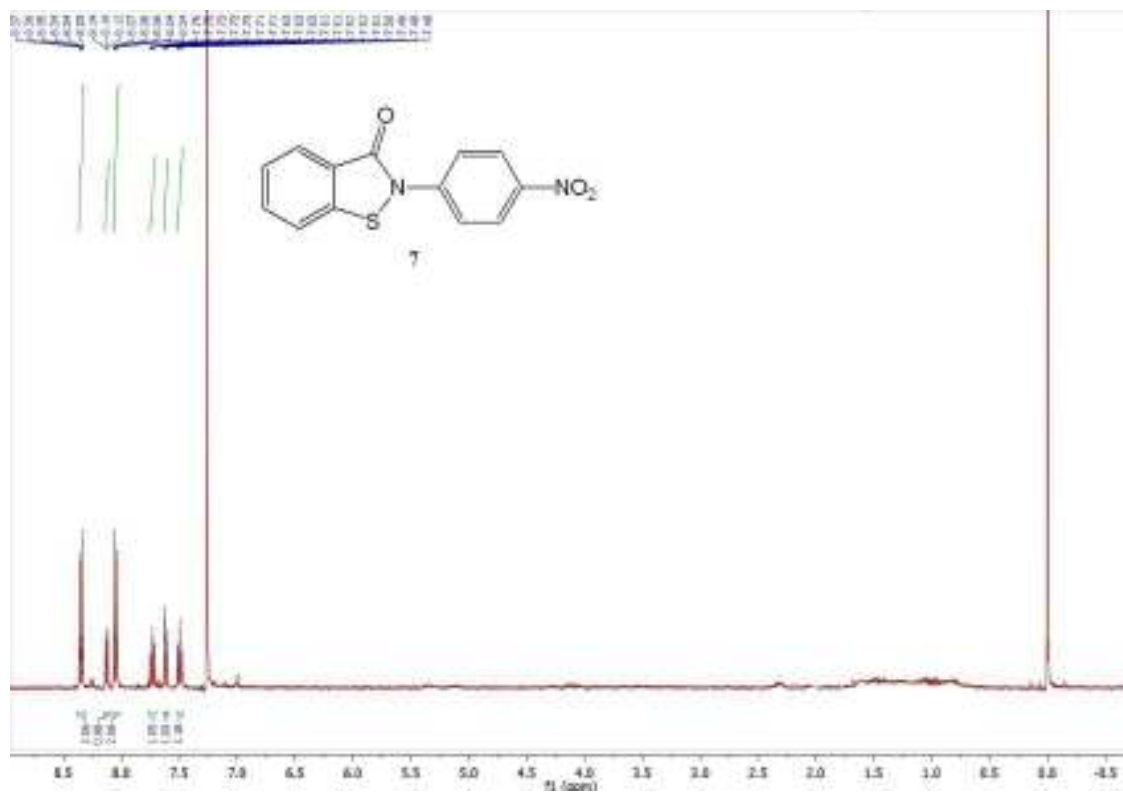
Compound 6



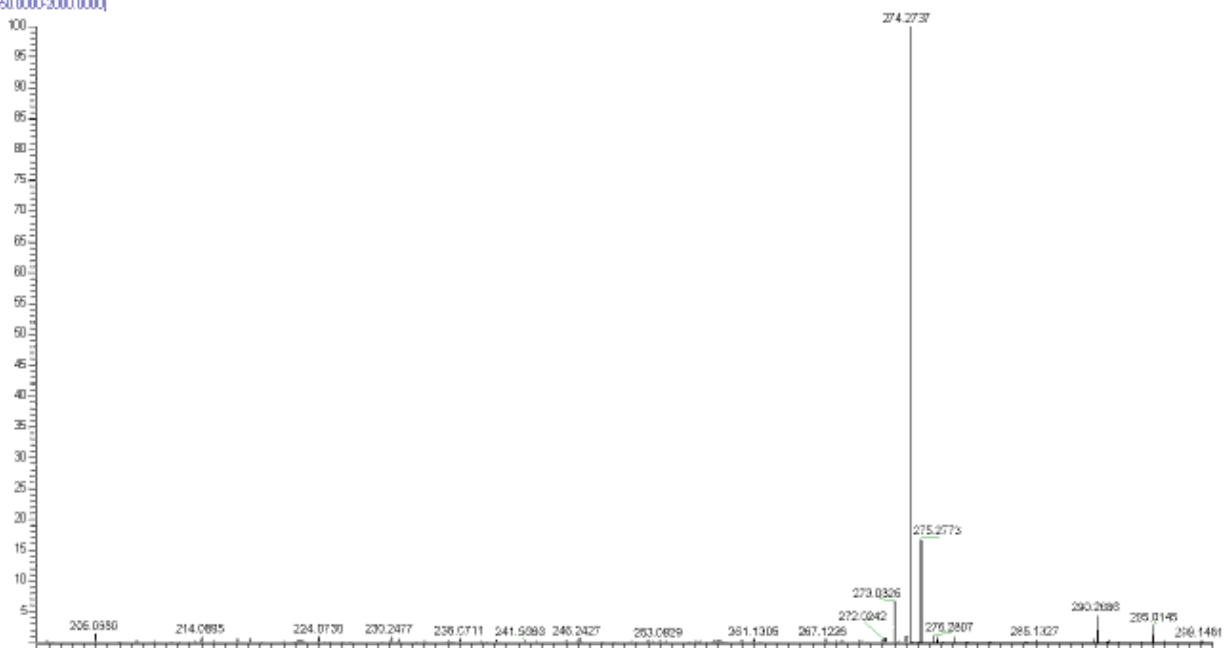
MS compound #96 RT: 0.41 AC: 1 NL: 2.21E8
 T: FTMS v.p. 4.3/FullScan (1400000-3000000)



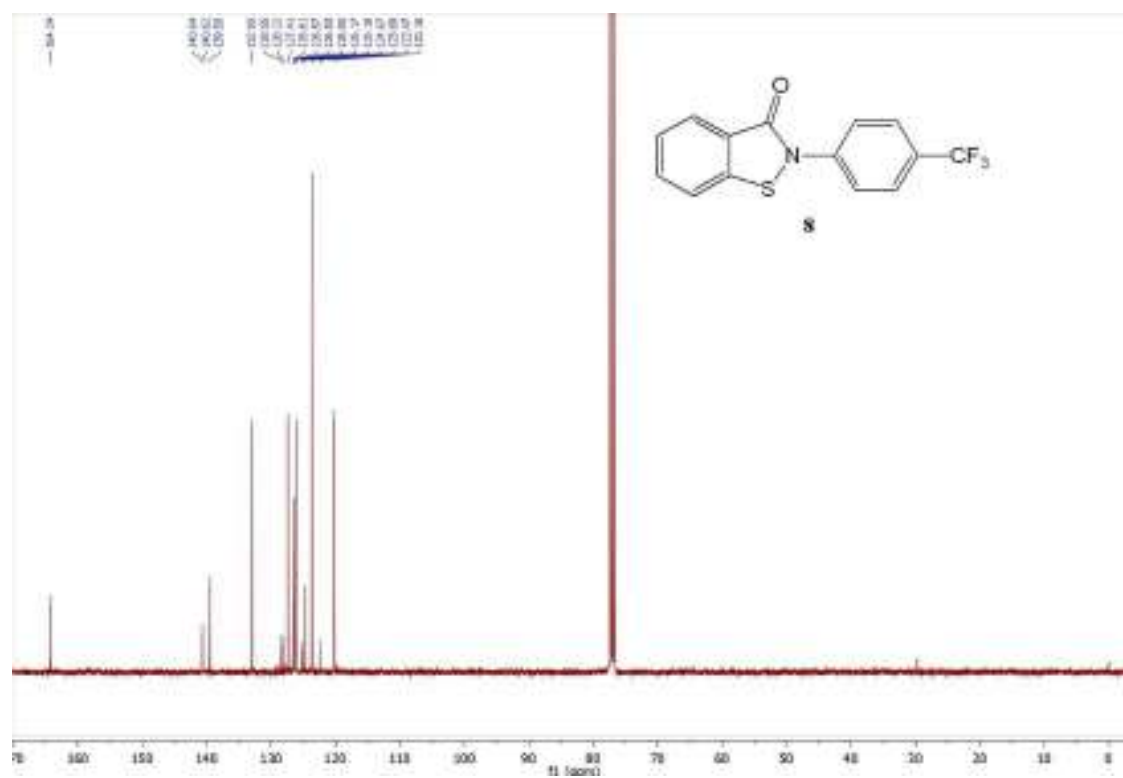
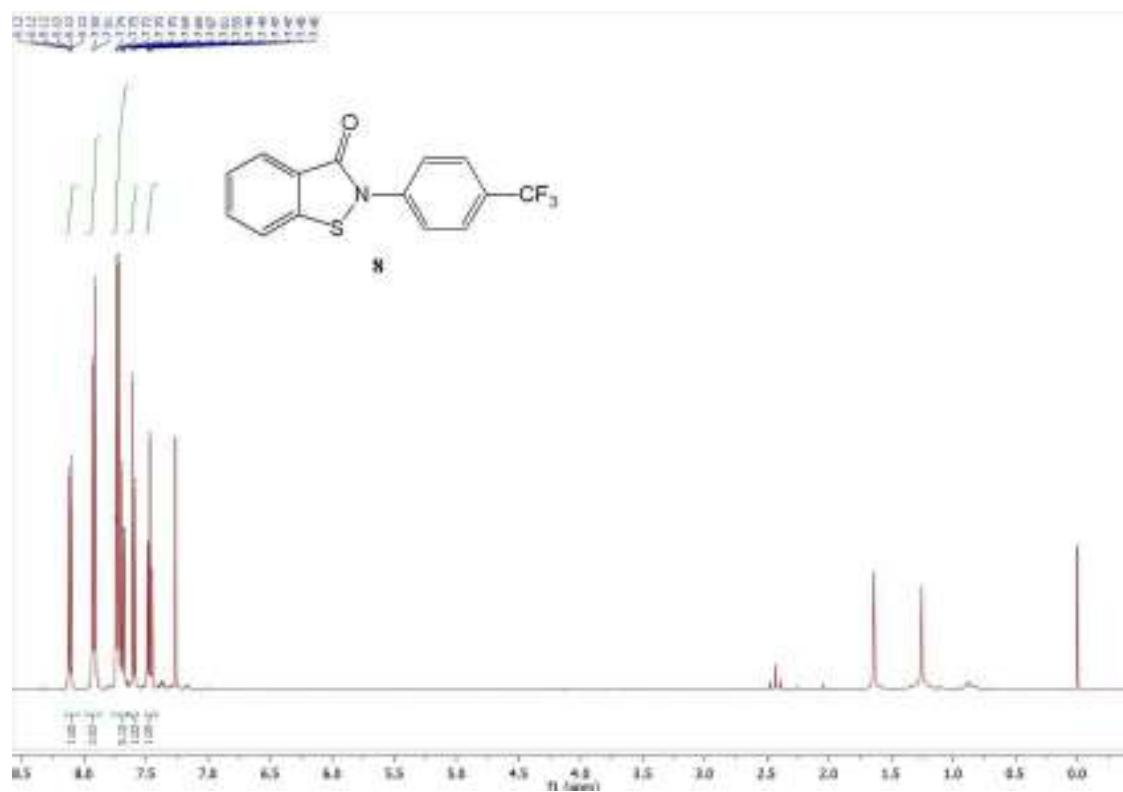
Compound 7



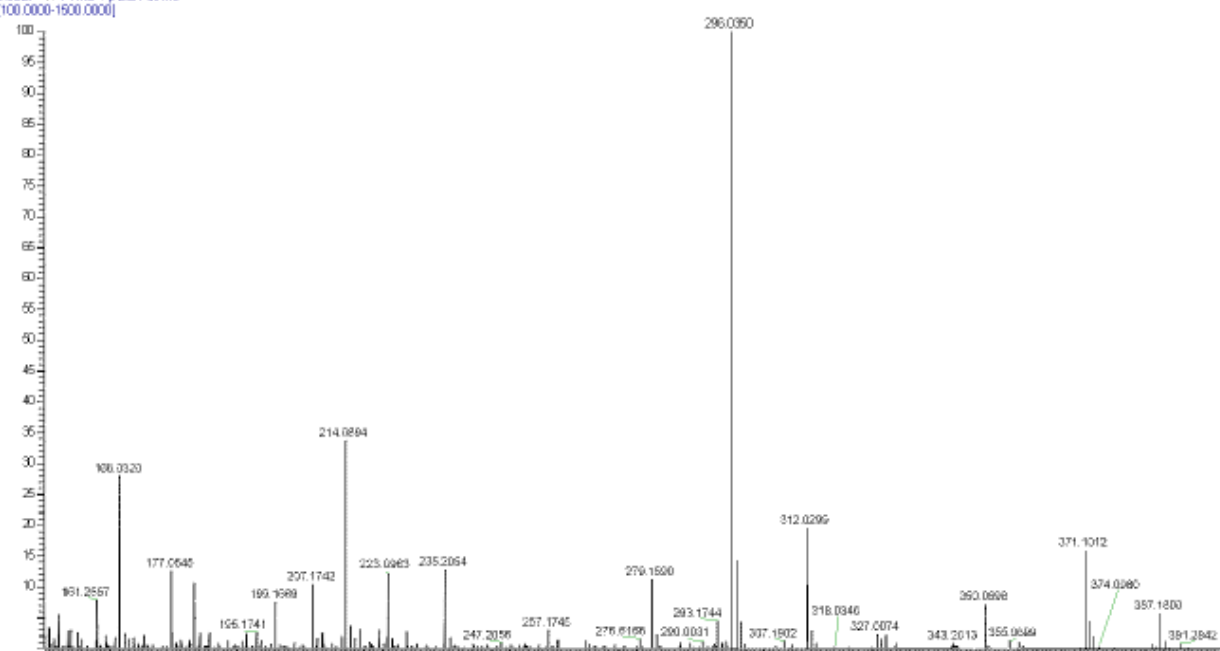
MSCompound 7 #60 RT: 0.22 AV: 1 NL:
499B8 T: FTMS+pE3 Full.ms
[150.0000-2000.0000]



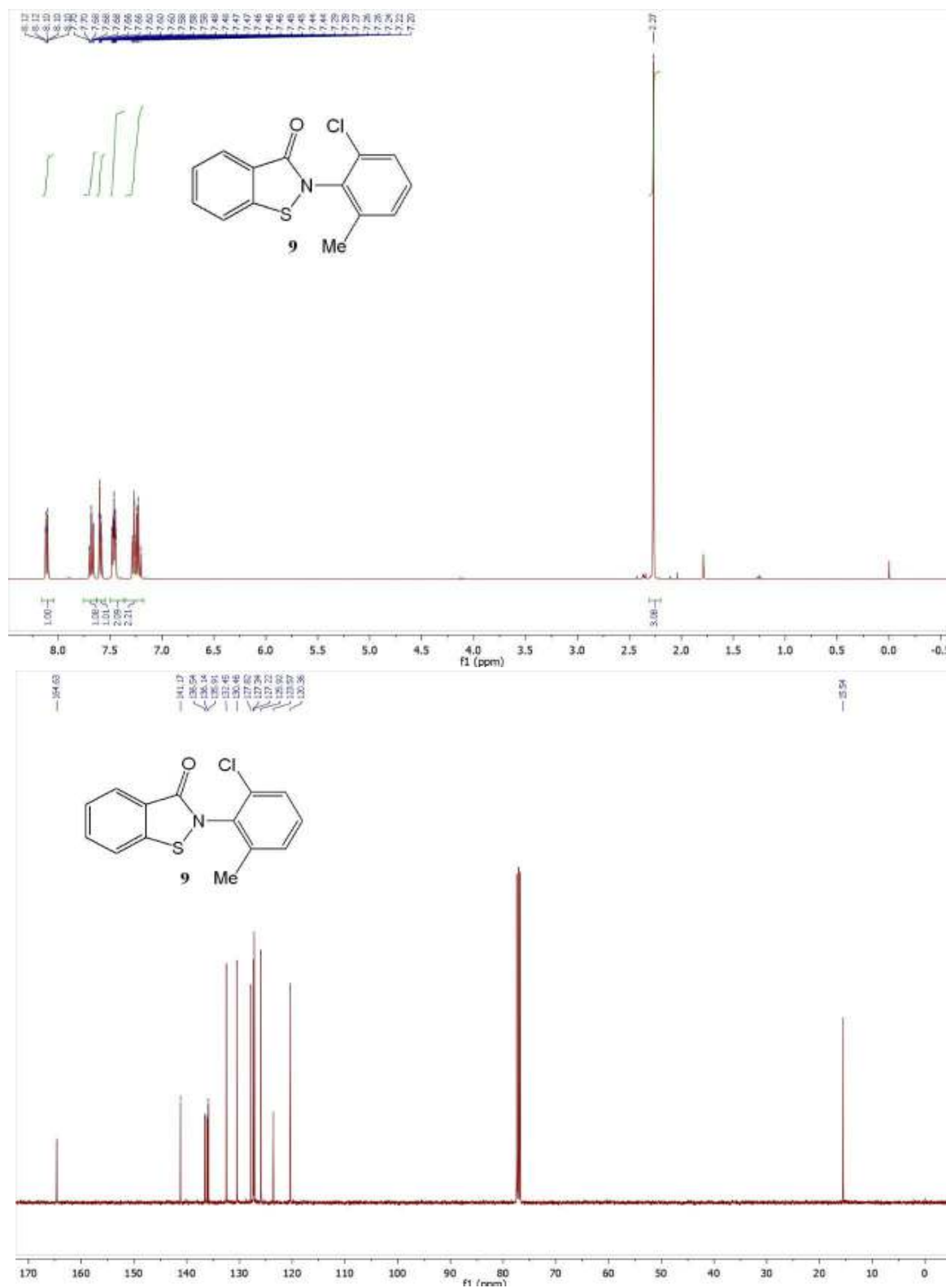
Compound 8



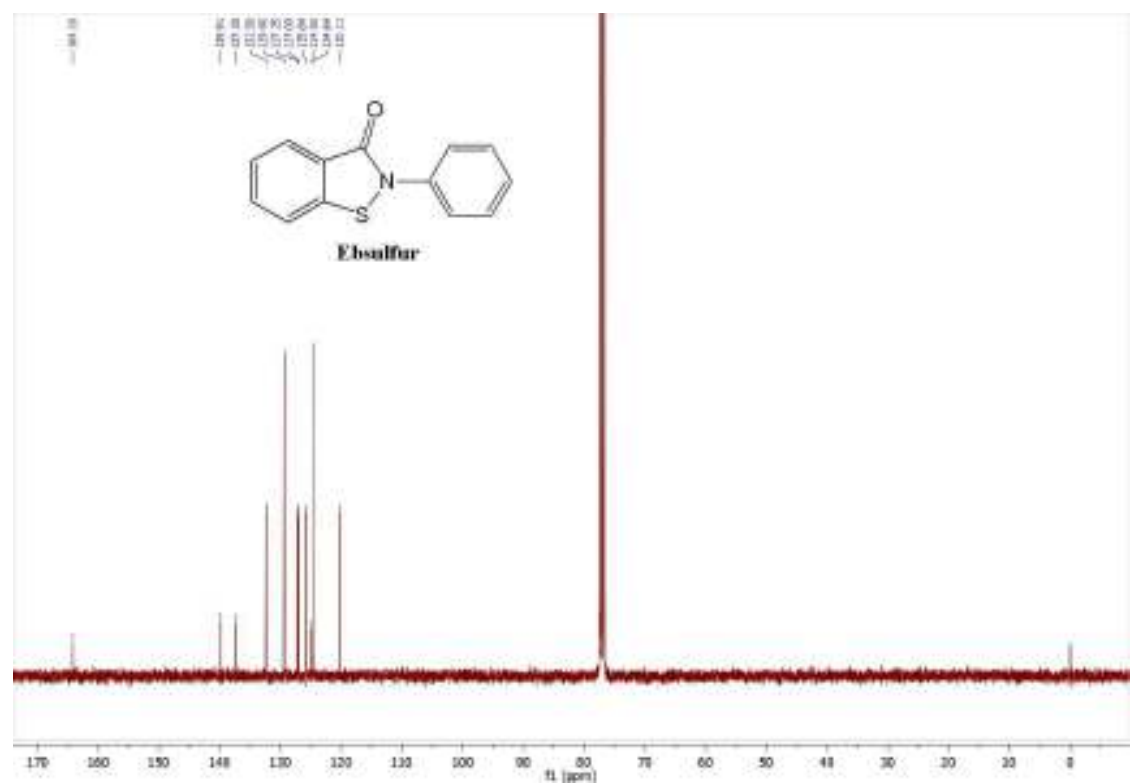
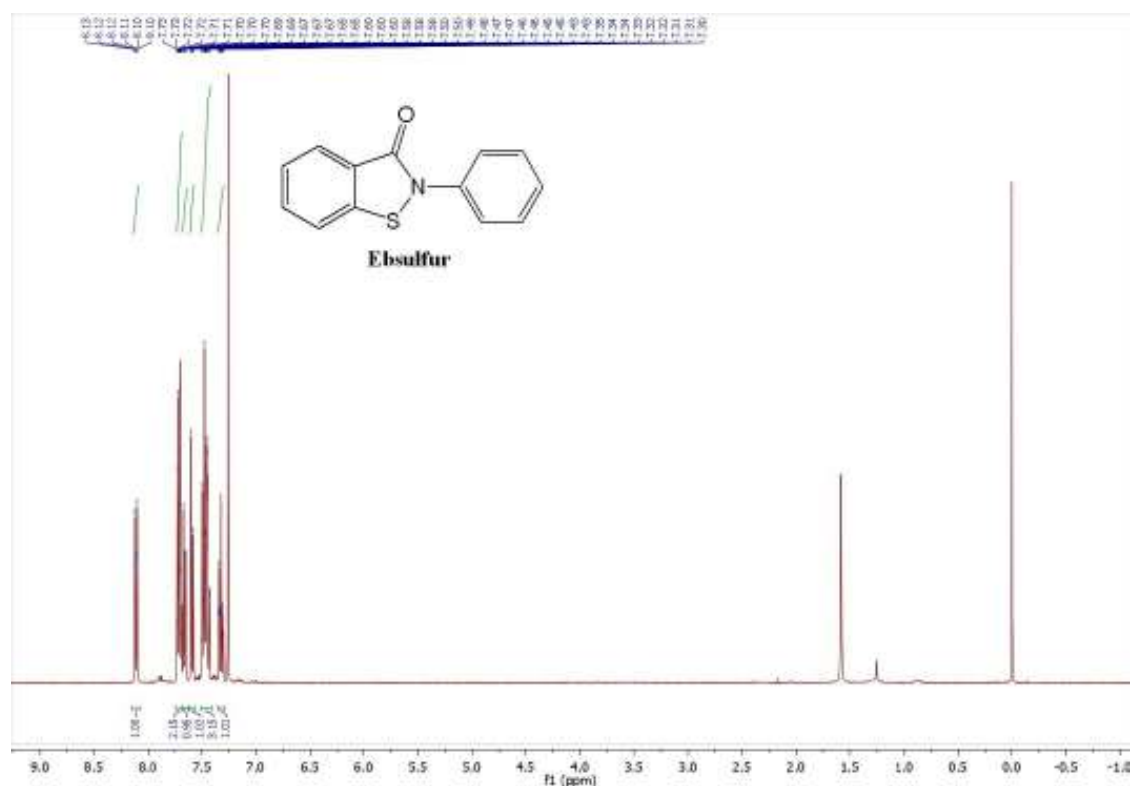
MS compound#51 RT: 0.22 AV: 1 NL:
9.96E7 T: FTMS + pESI Full ms
[100.0000-1500.0000]



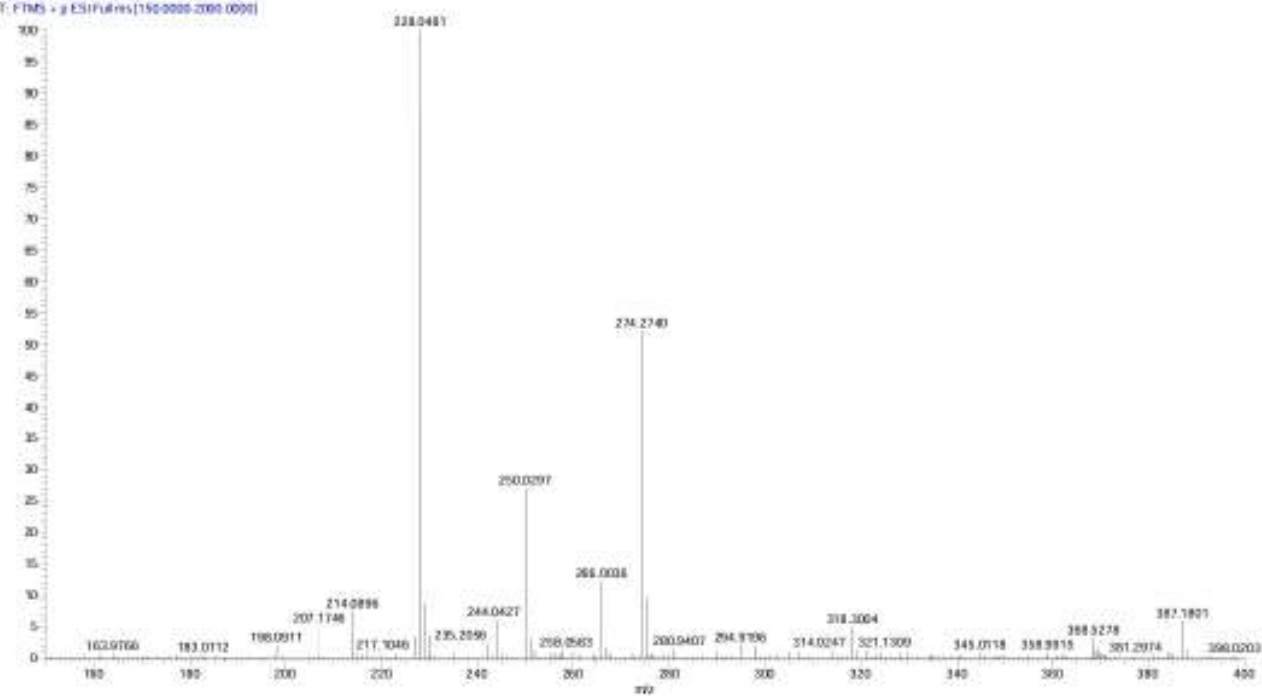
Compound 9



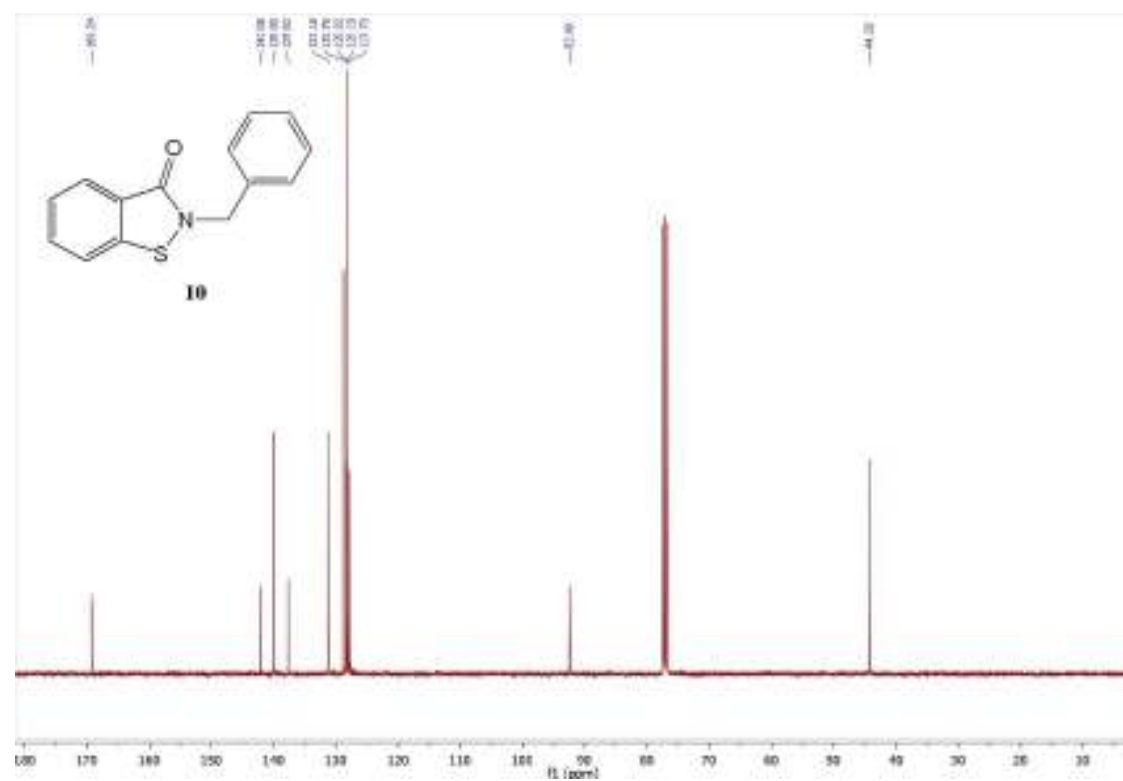
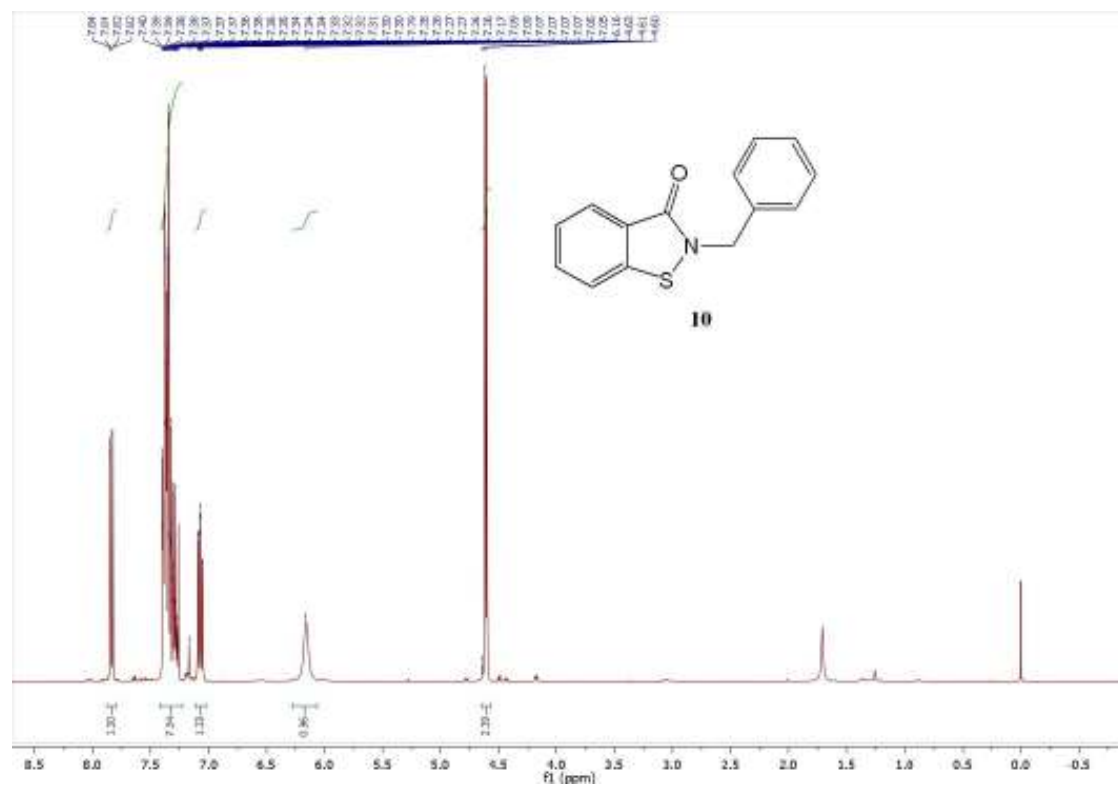
Ebsulfur (EbS)



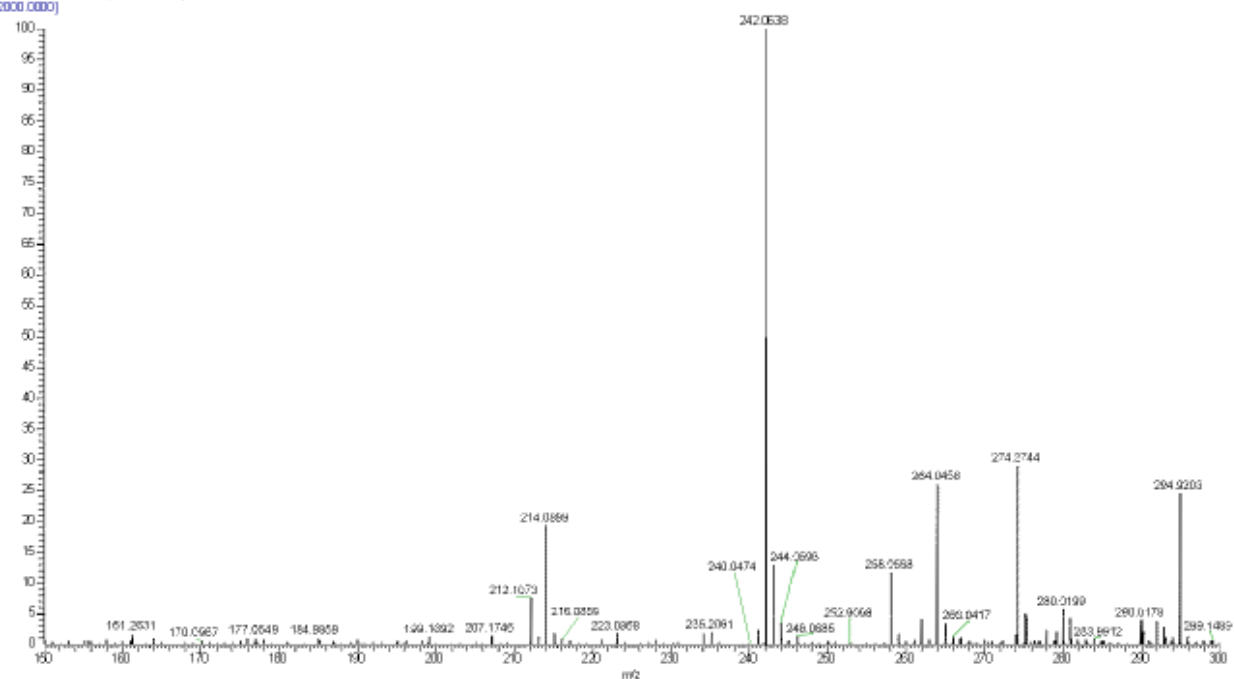
MS ESI #138 RT 0.80 AV: 1 NL: 533ER
T: FTMS - g ESIFulres[150.0000.2000.0000]



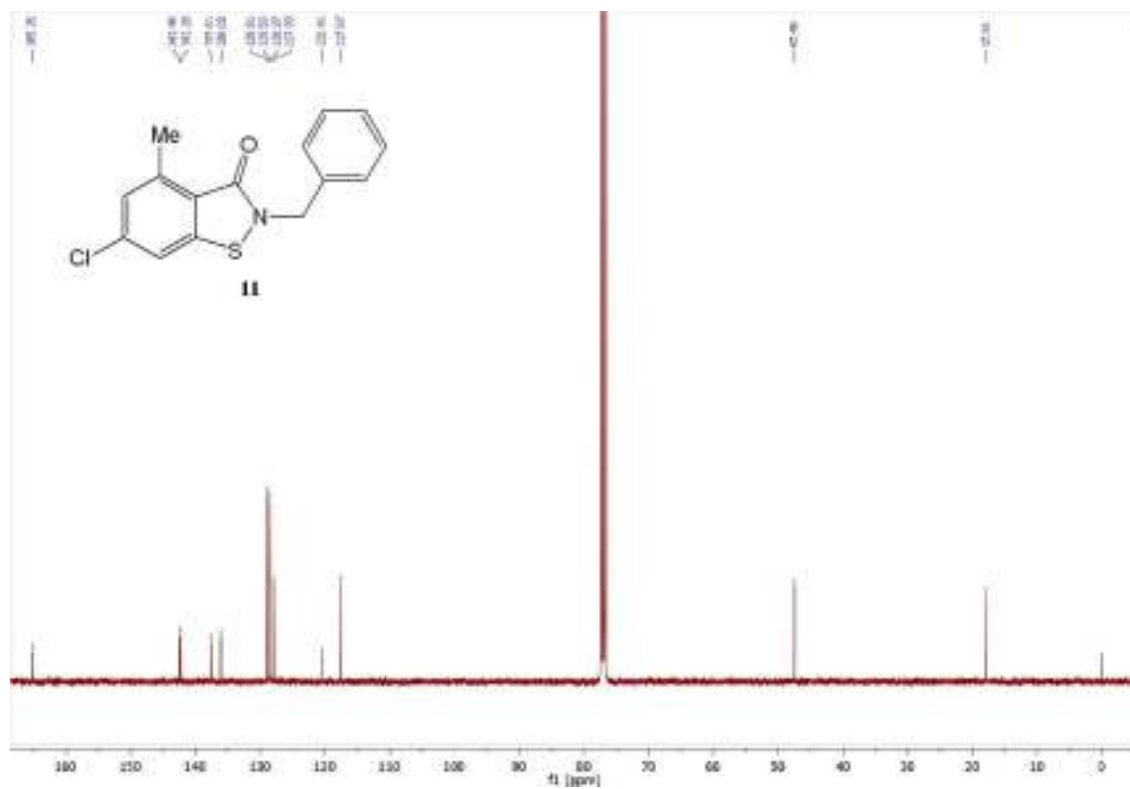
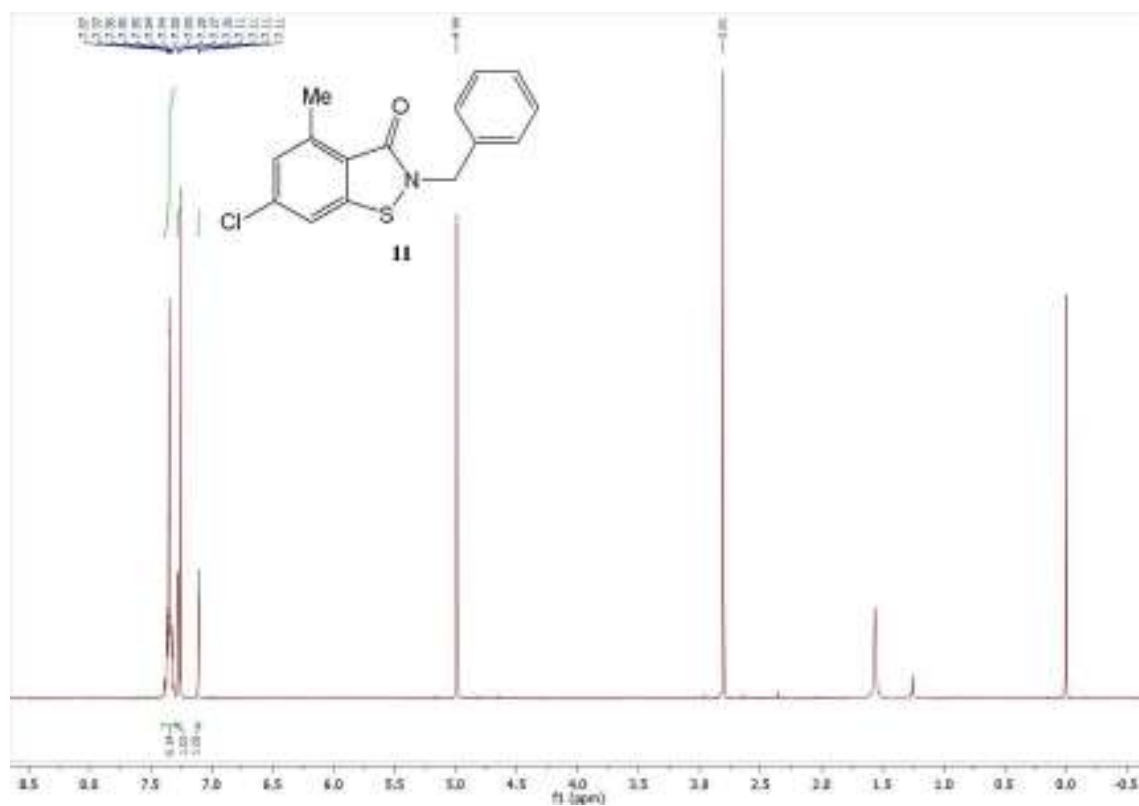
Compound 10



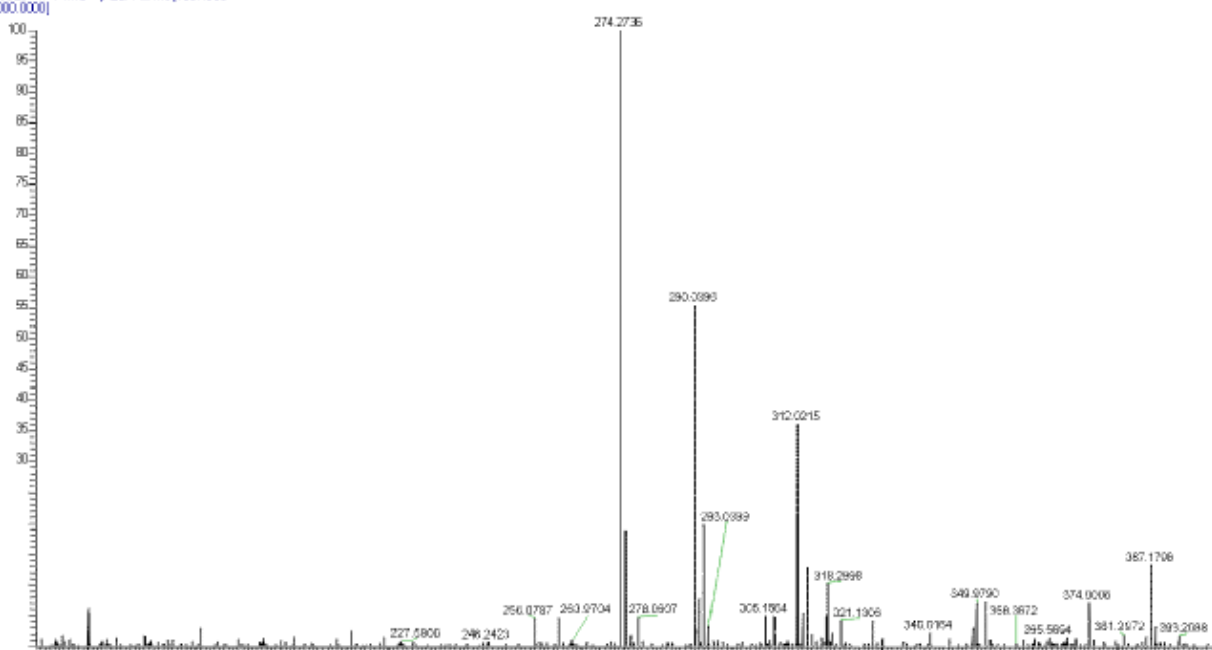
MS compound 10461 RT: 2.02 AV: 1 NL:
2.0626 T: FTMS+ p ESI Full ms [160.0000-
3000.0000]



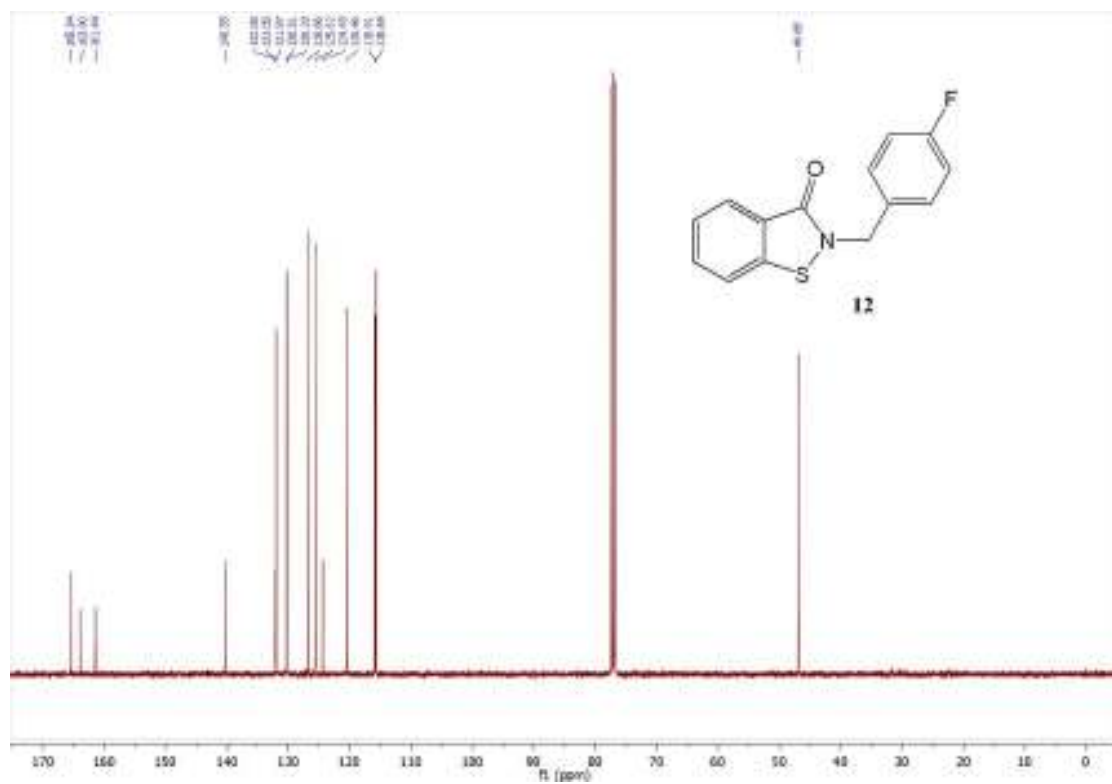
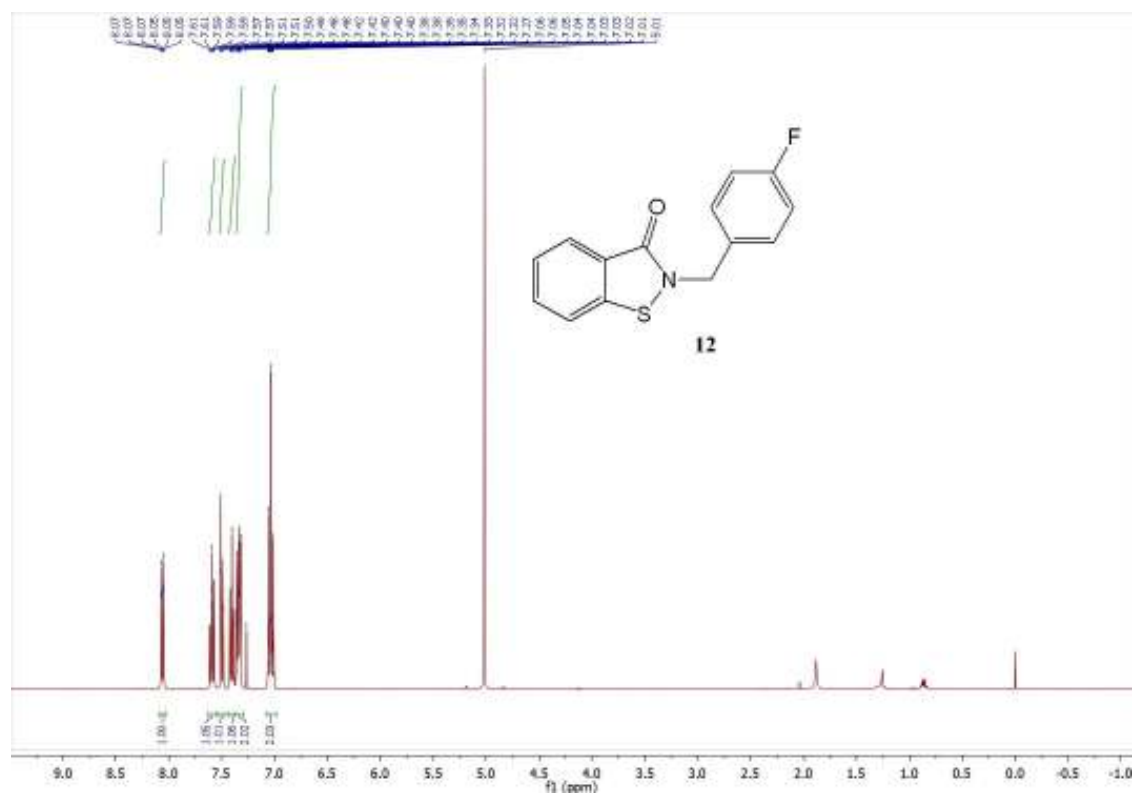
Compound 11



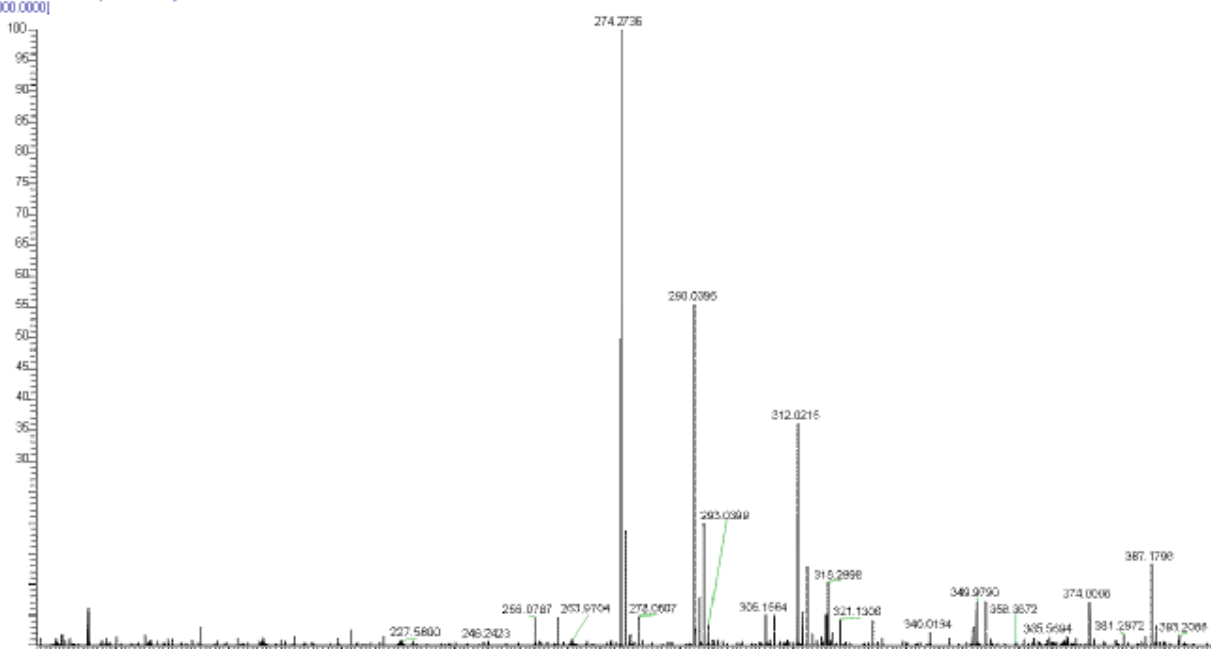
MS compound 11 982 RT: 0.40 AV: 1 NL
1.95EB.T FTMS+ p ESI Full ms[133.4000-
2000.0000]



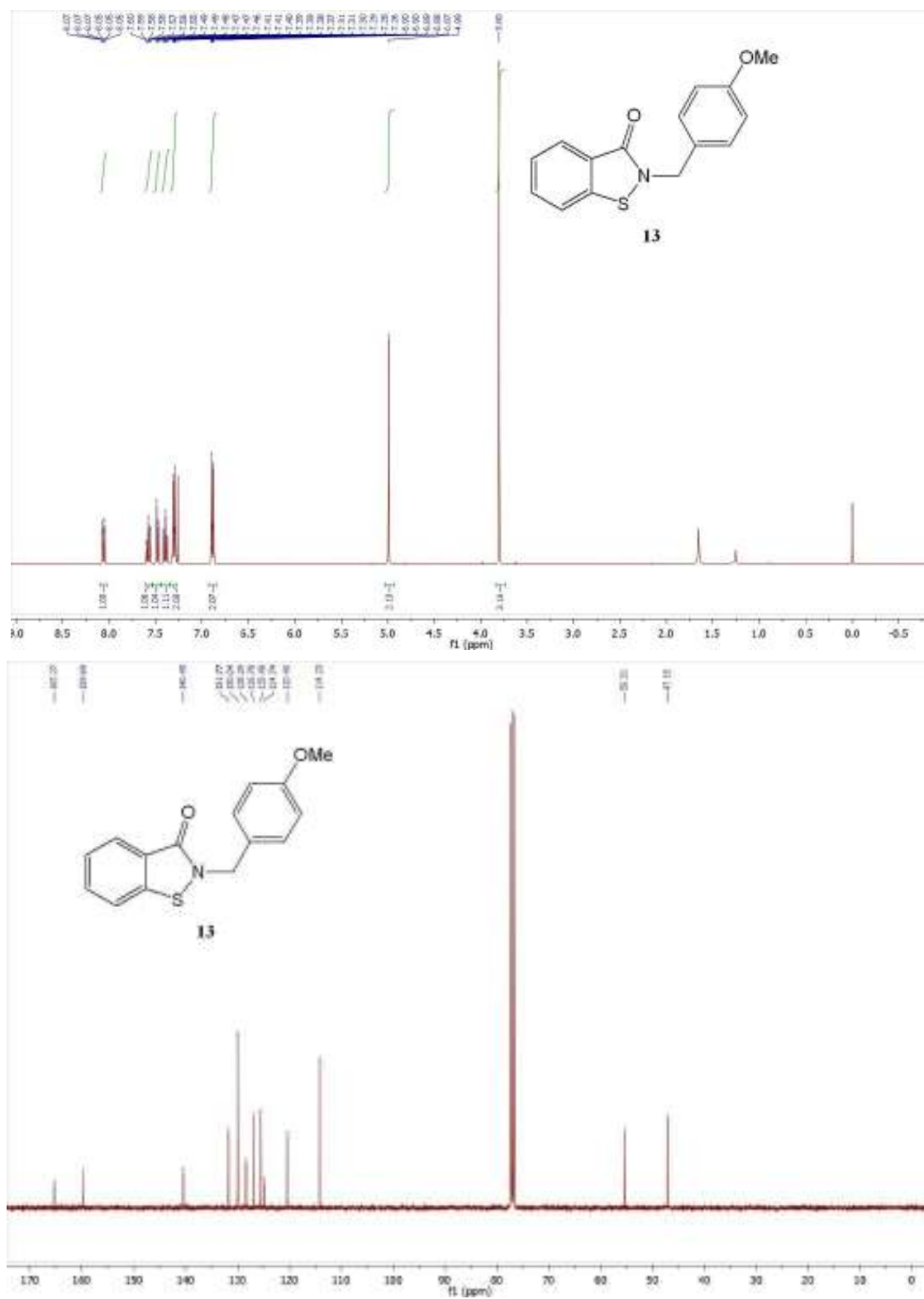
Compound 12



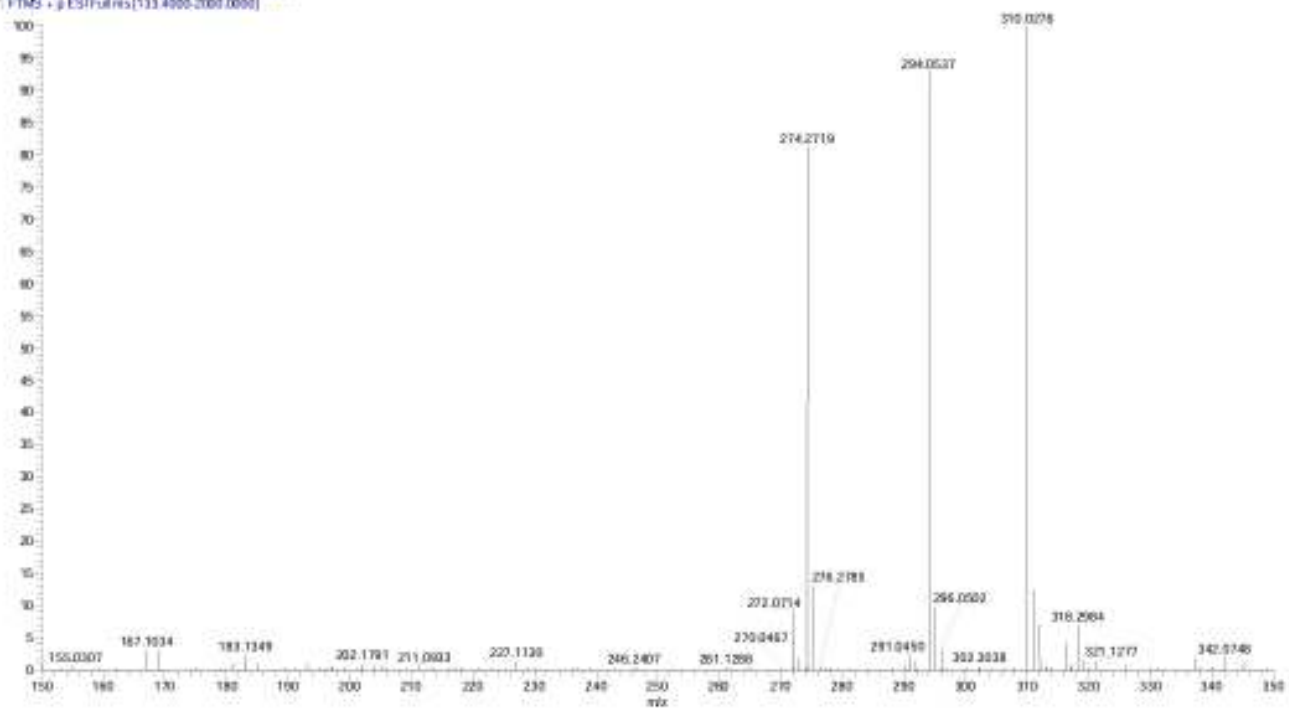
MS compound 11 #82 RT: 0.40 AV: 1 NL
1.95EB T: FTMS +p ESI Full ms [133.4000-
2000.0000]



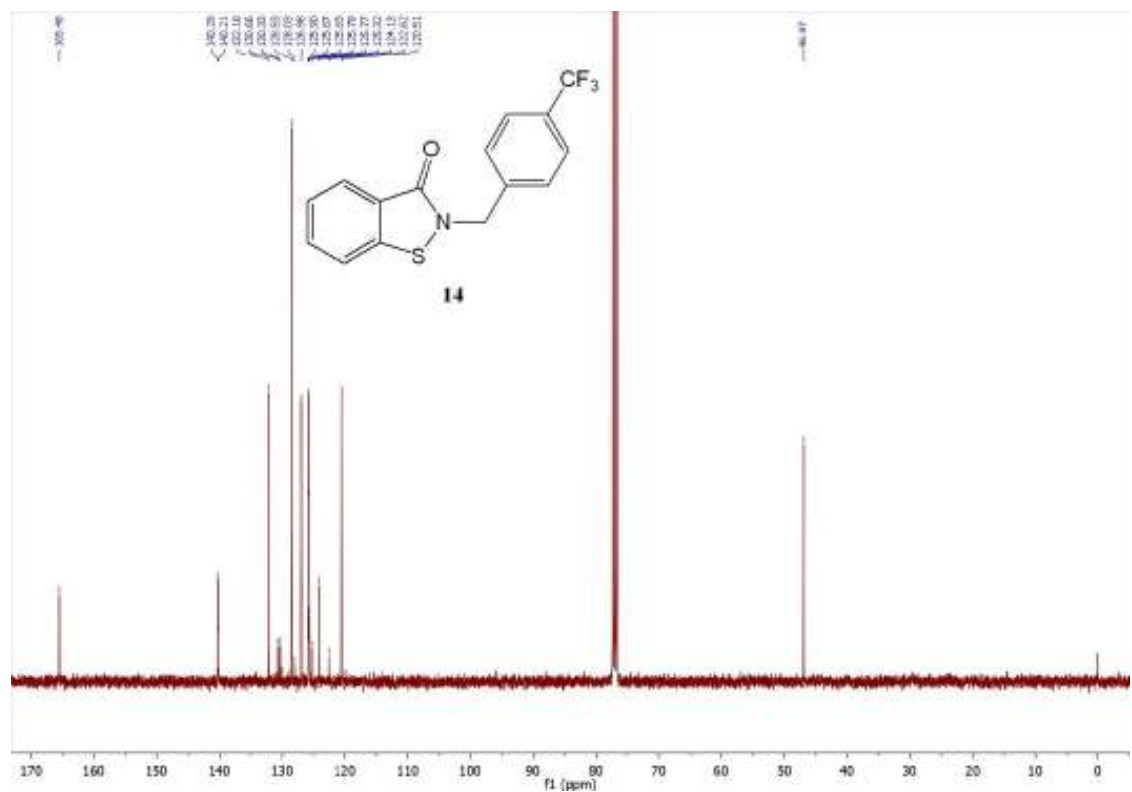
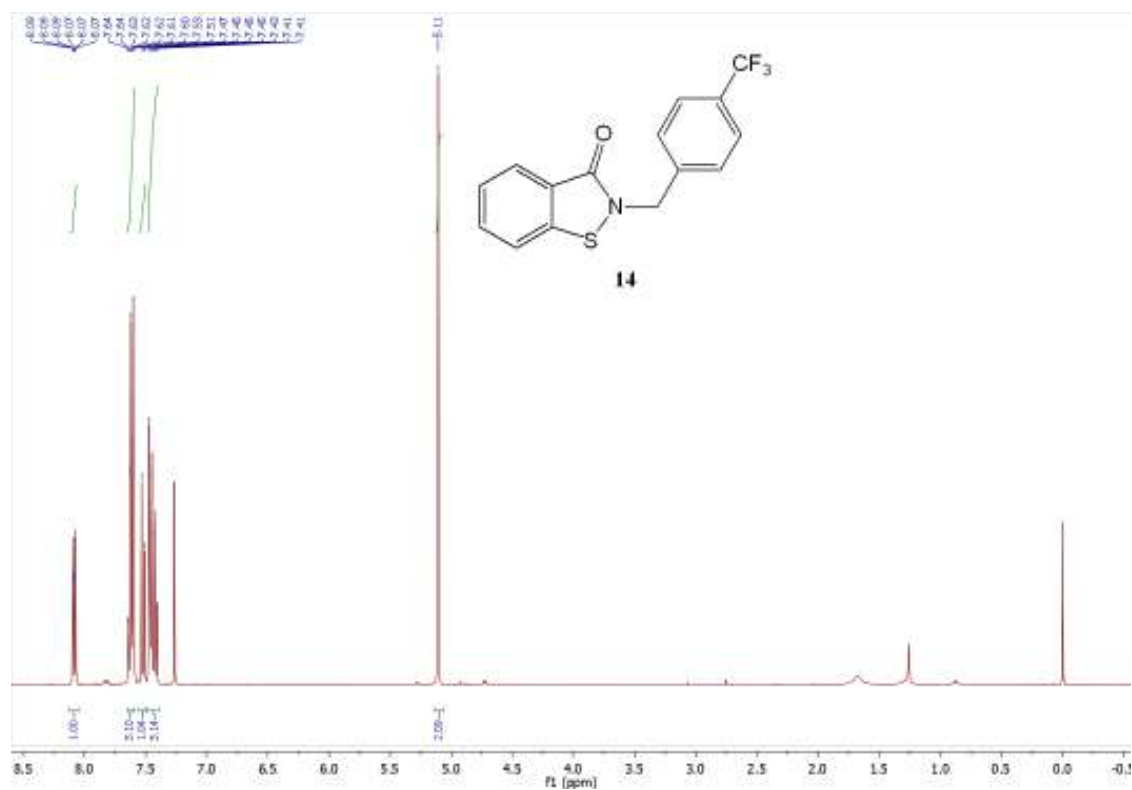
Compound 13



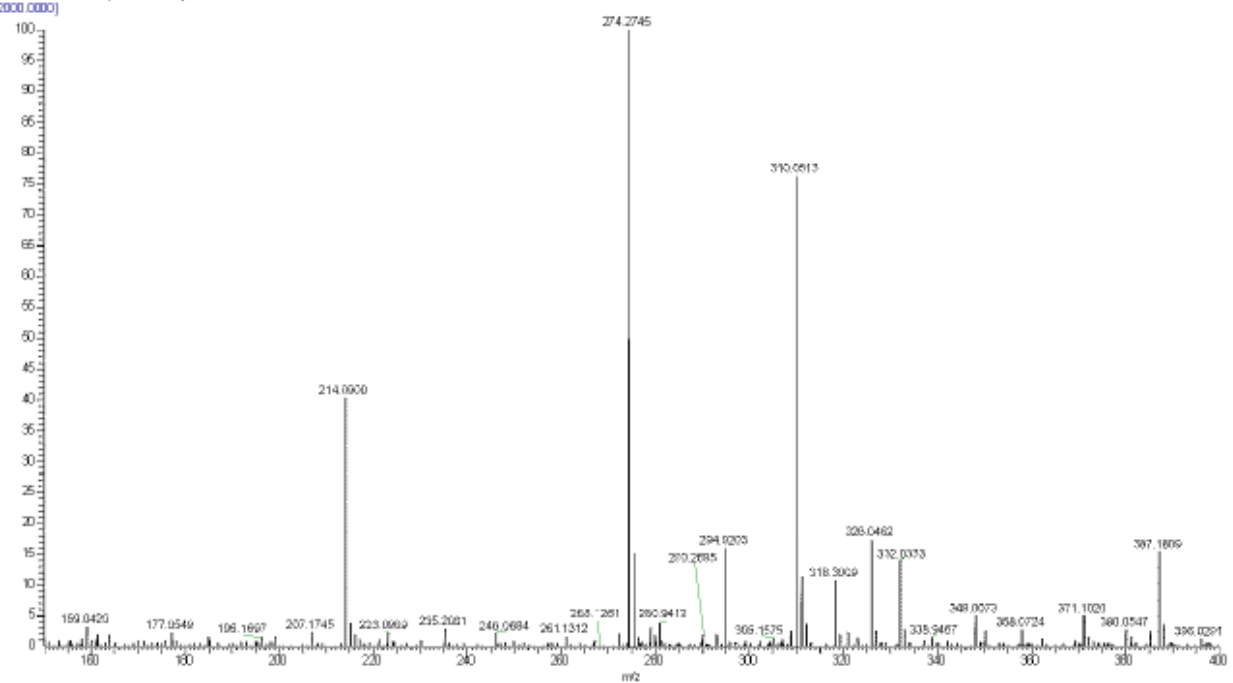
MS compound 13 4190 RT: 0.81 AV: 1 NL: 6.94E7
1) F TMS + p ESIFulres[133.4000-2000.0000]



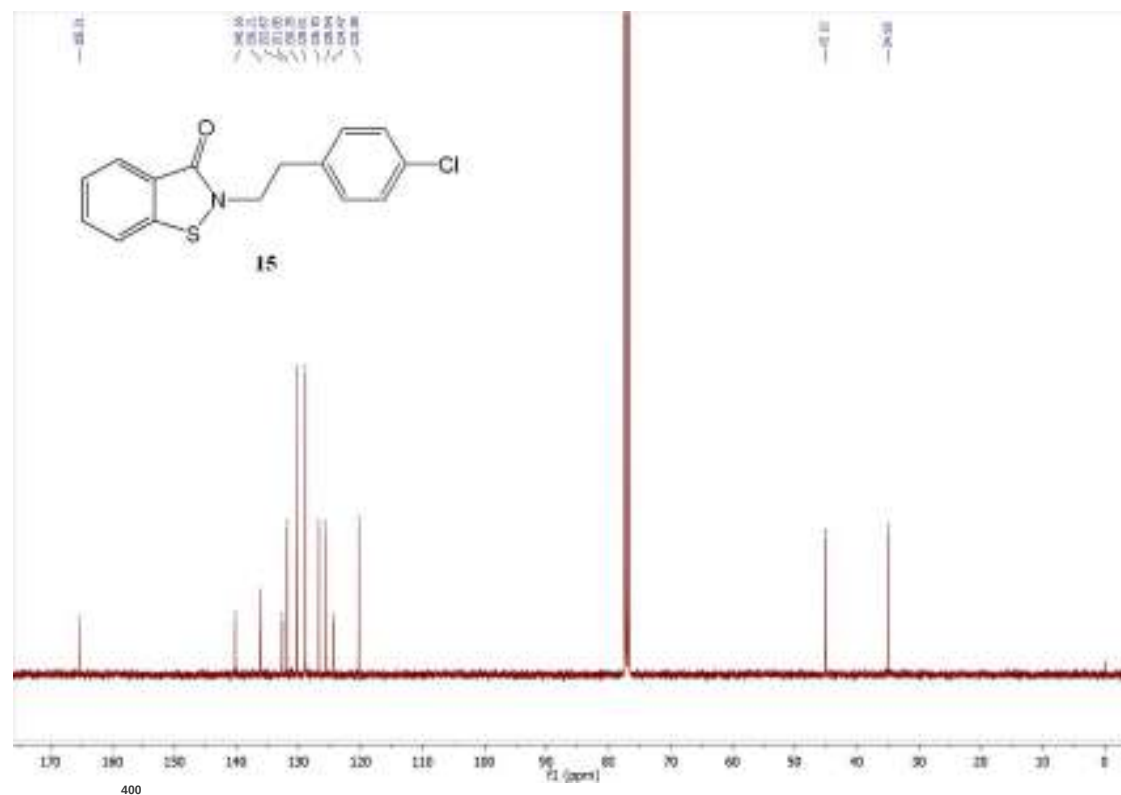
Compound 14



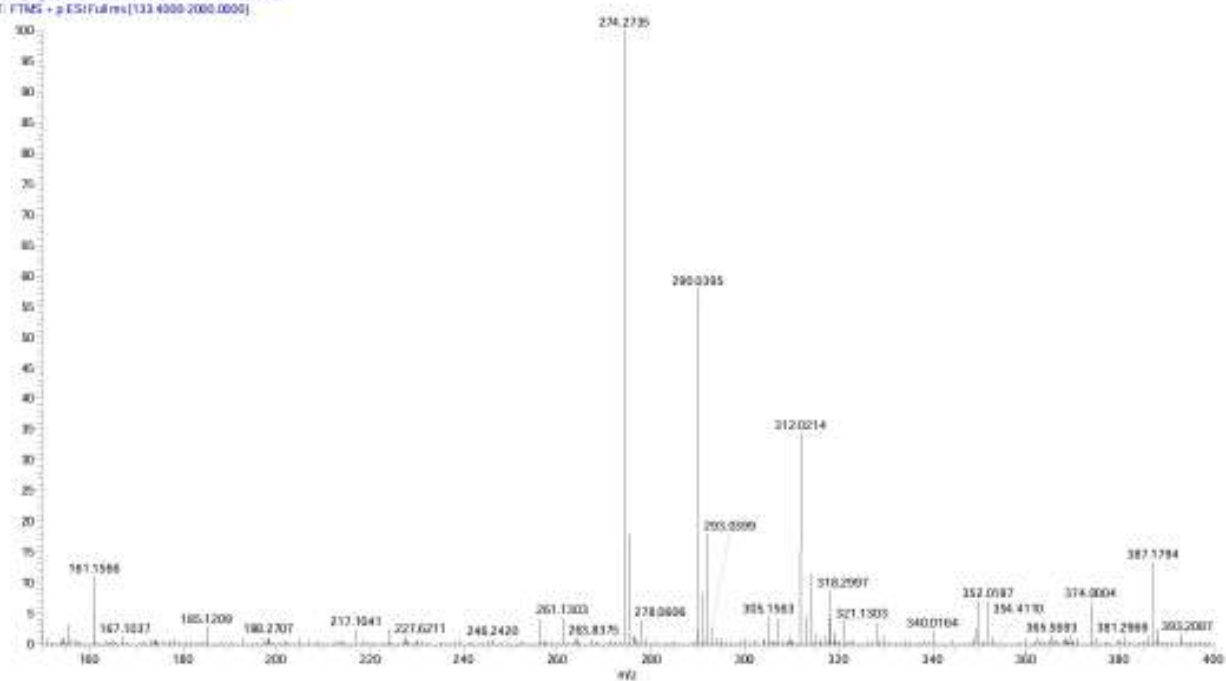
MS compound 14 #60 RT: 0.36 AV: 1 NL
1.60E8 T: FTMS+ p ESI Full ms [150.0000-
2000.0000]



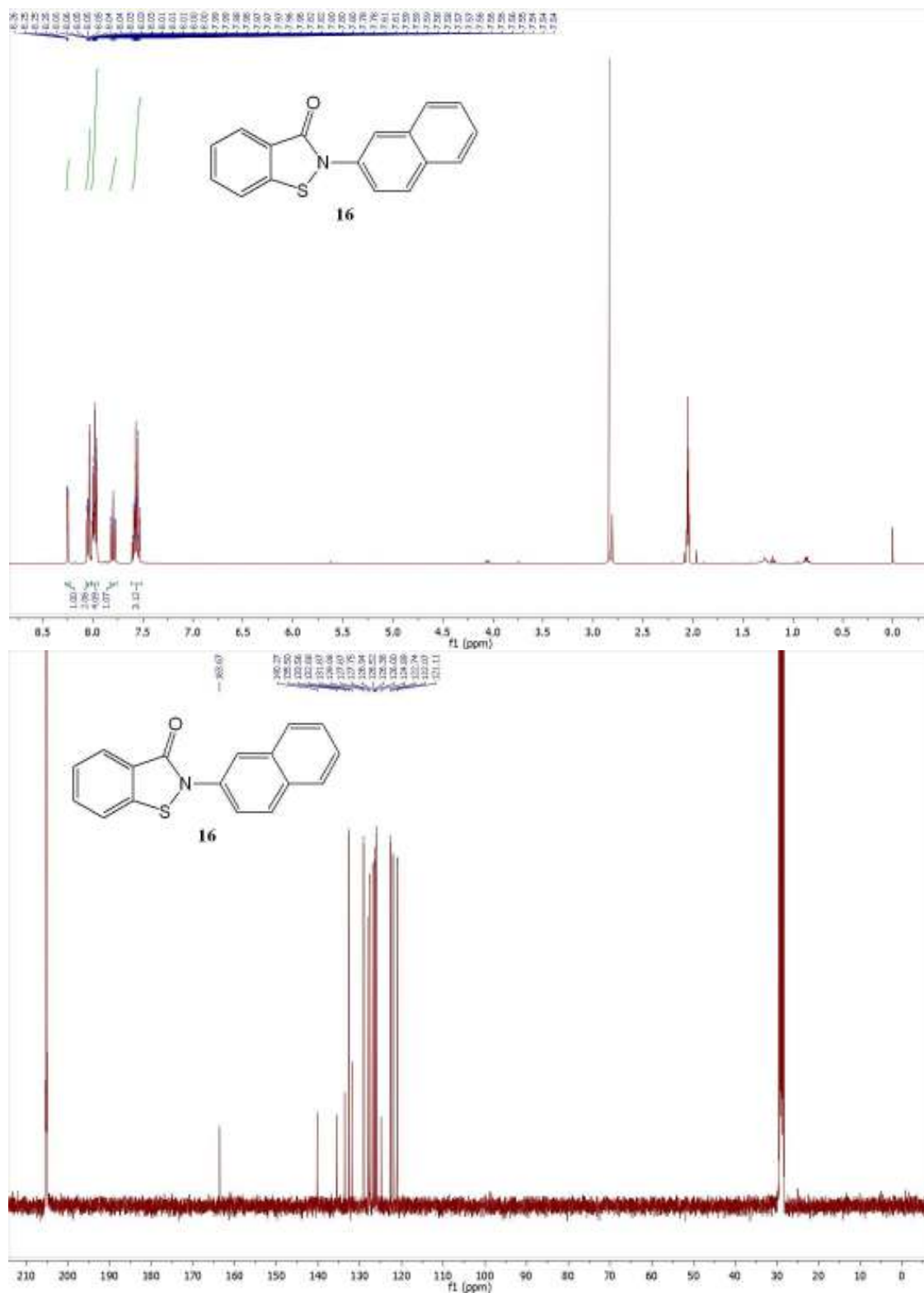
340



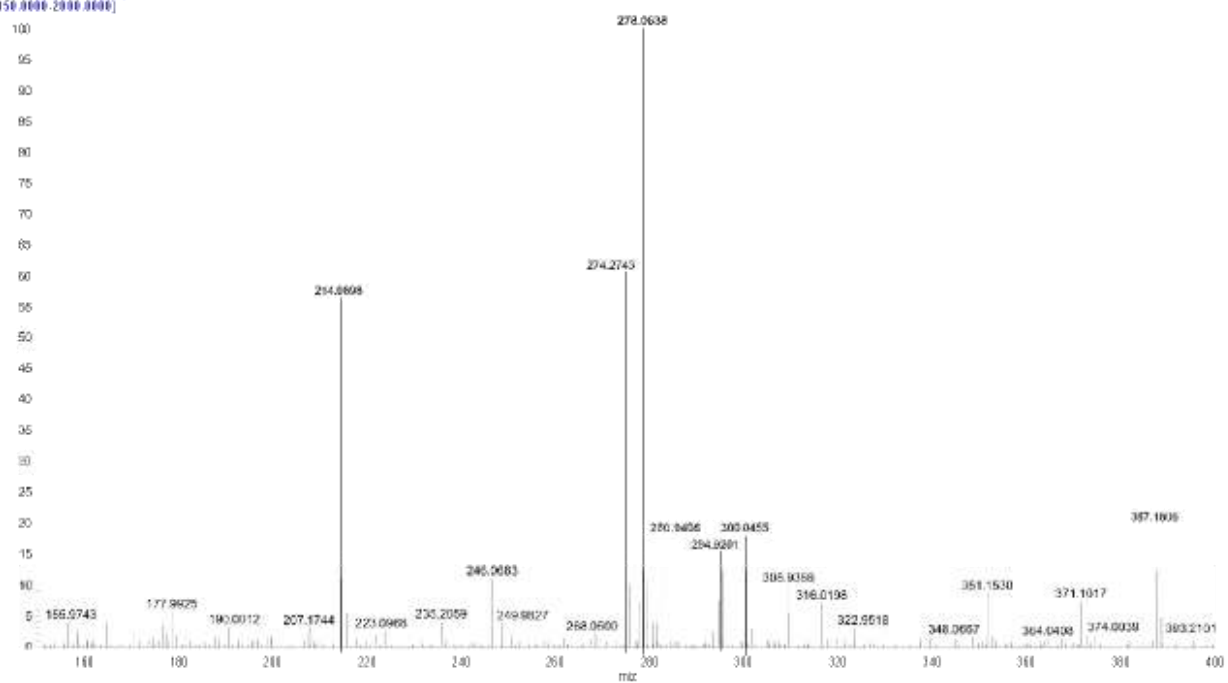
MS compound 15 #96 RT: 0.42' AV: 1 NL: 2-0218
T: FTMS - p-ES(Fullres)[133.4000-2000.0000]



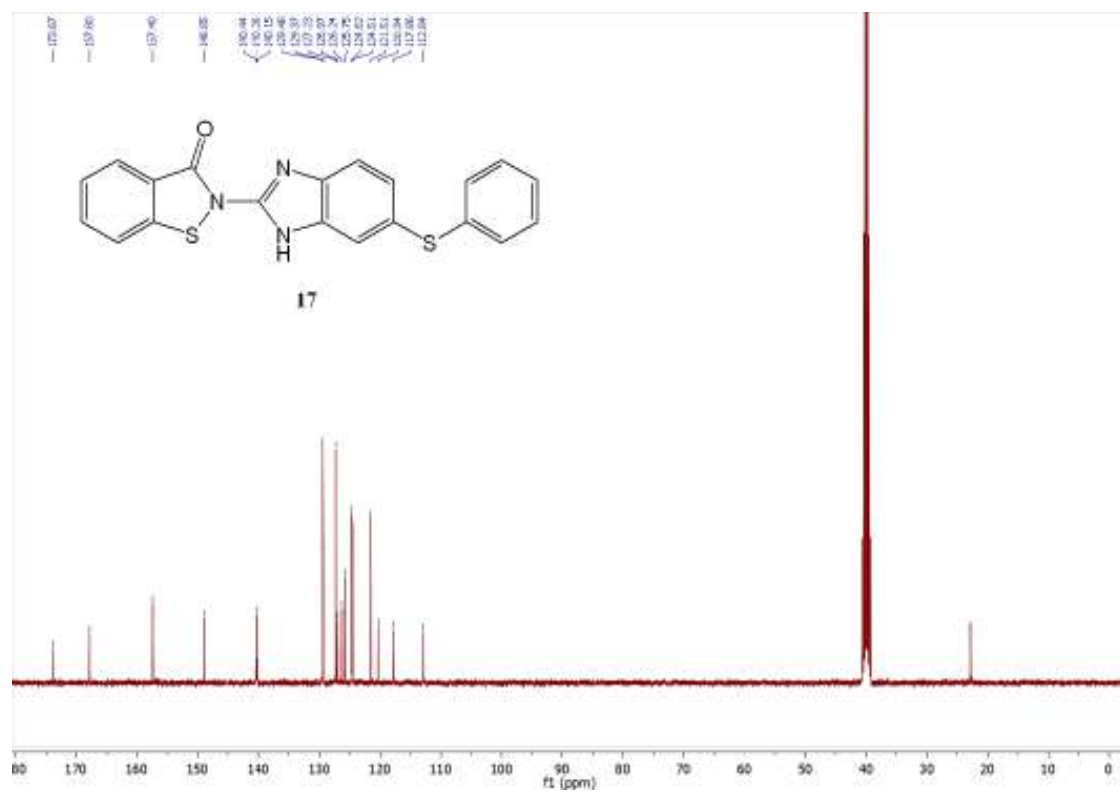
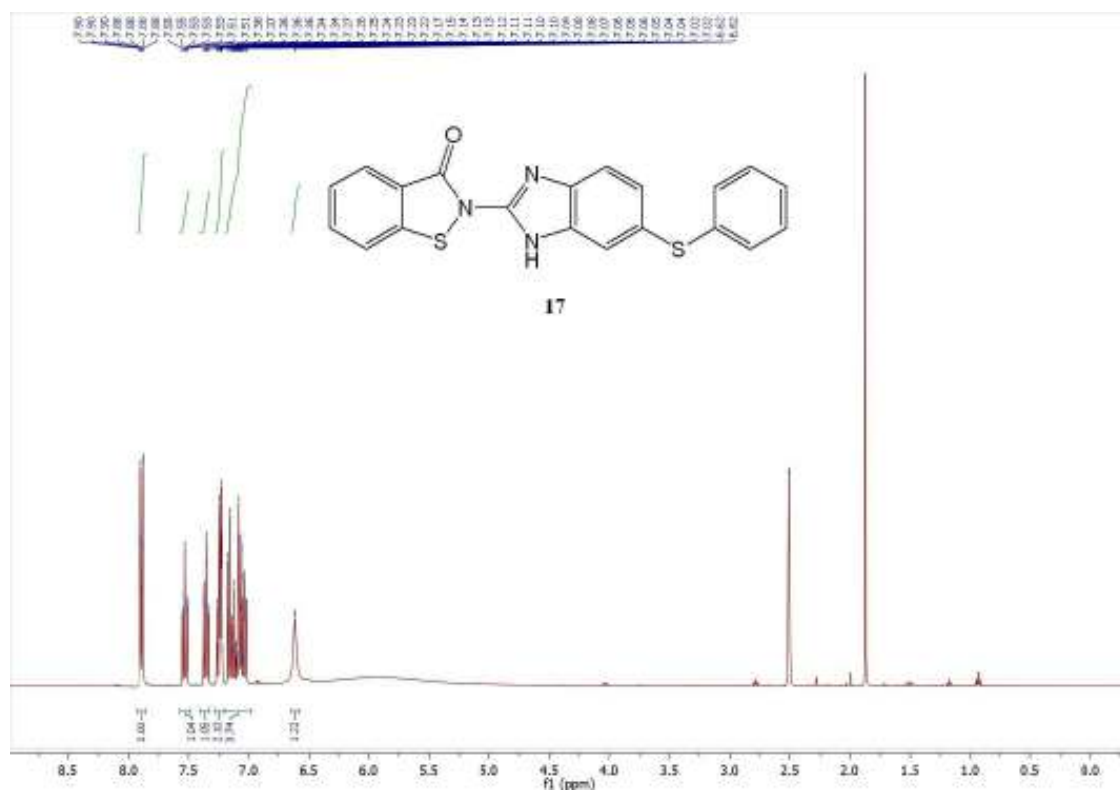
Compound 16



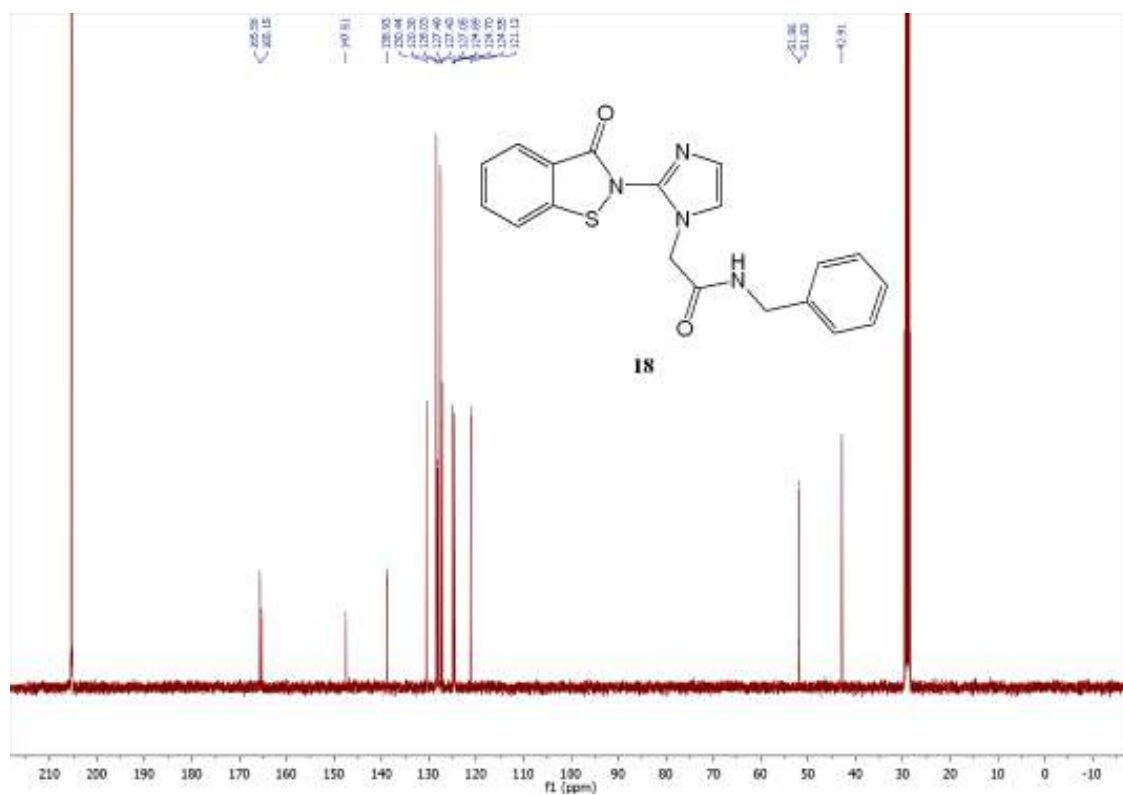
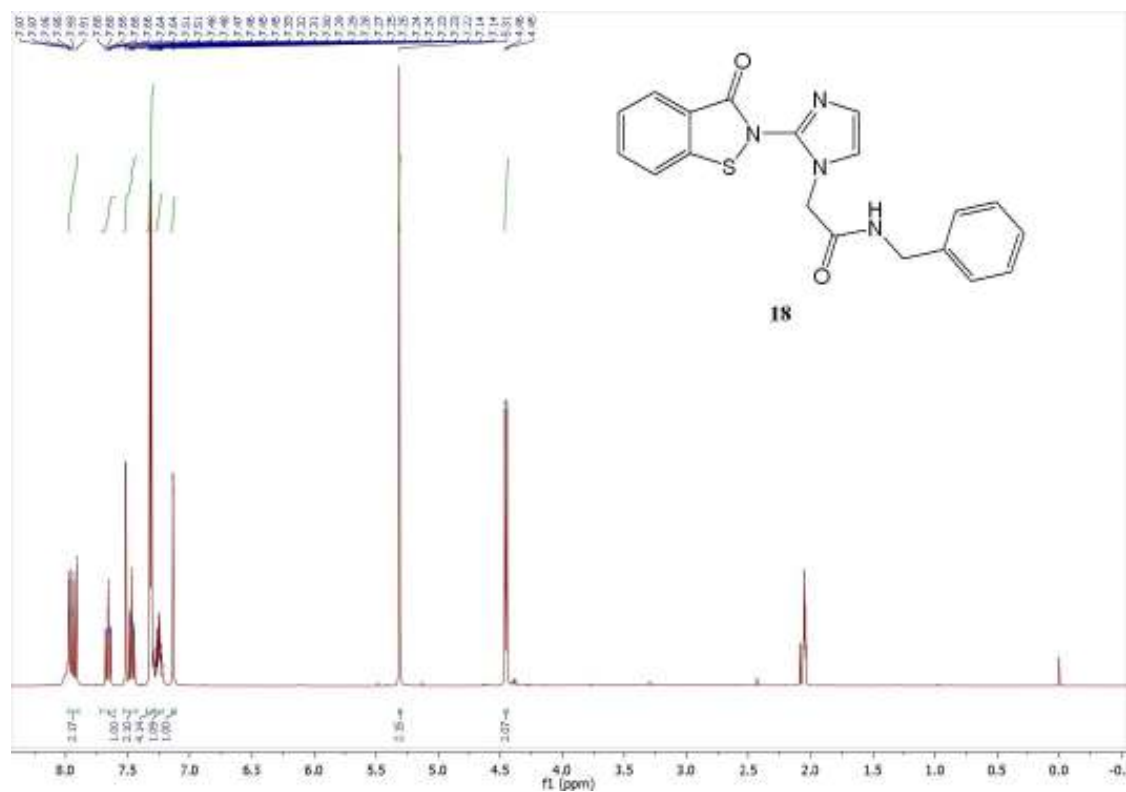
MS Compounds 169134 RT 9.59 AV:1
NL 1.10E8 T: FTMS *p ESIFall.ms
[150.0000:2000.0000]



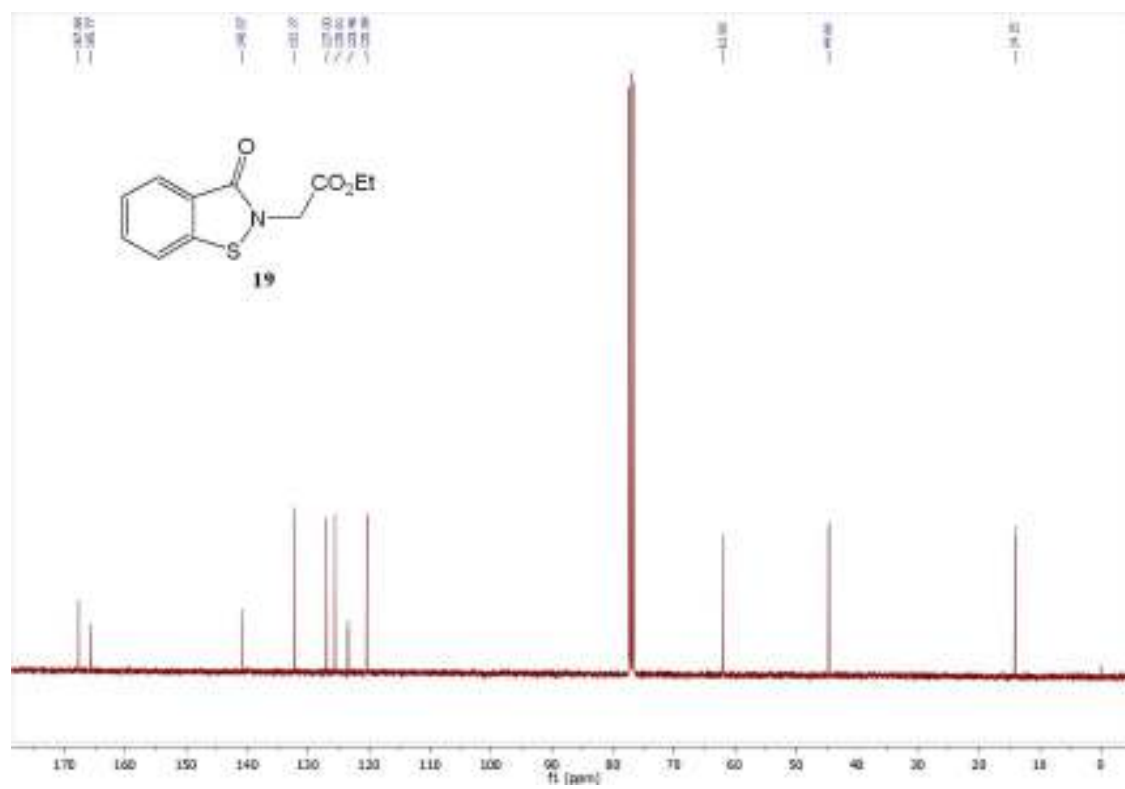
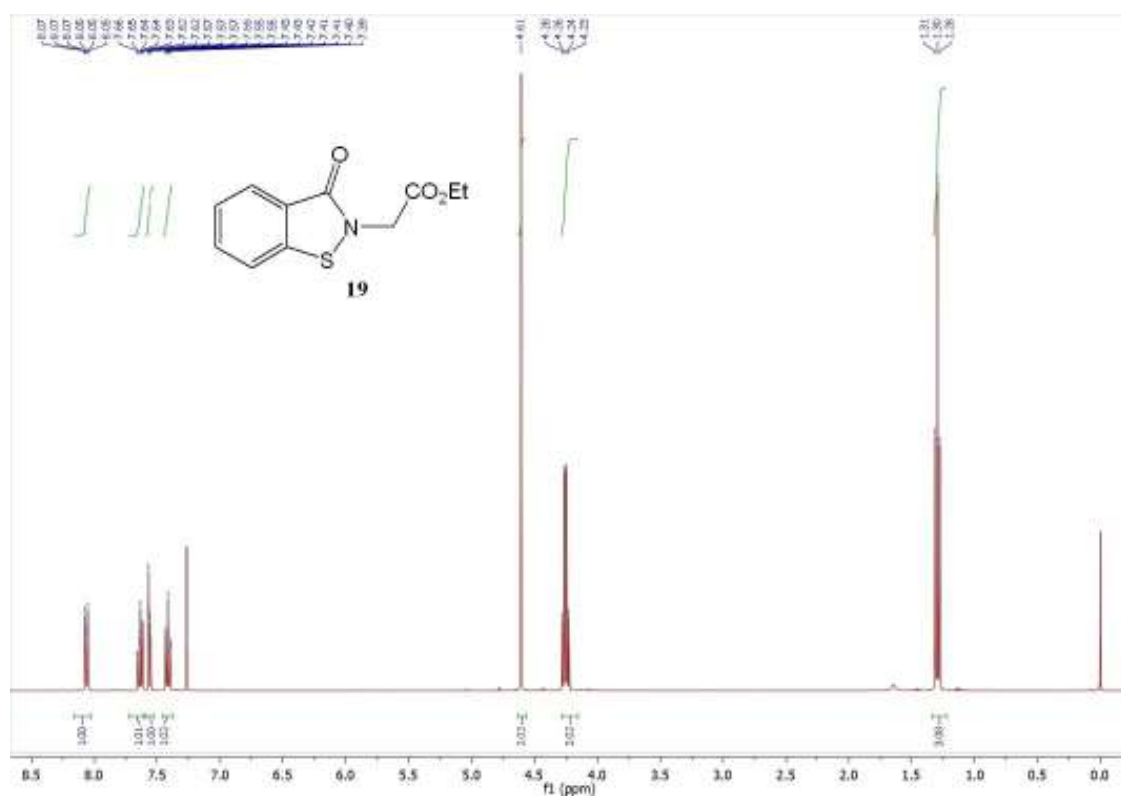
Compound 17



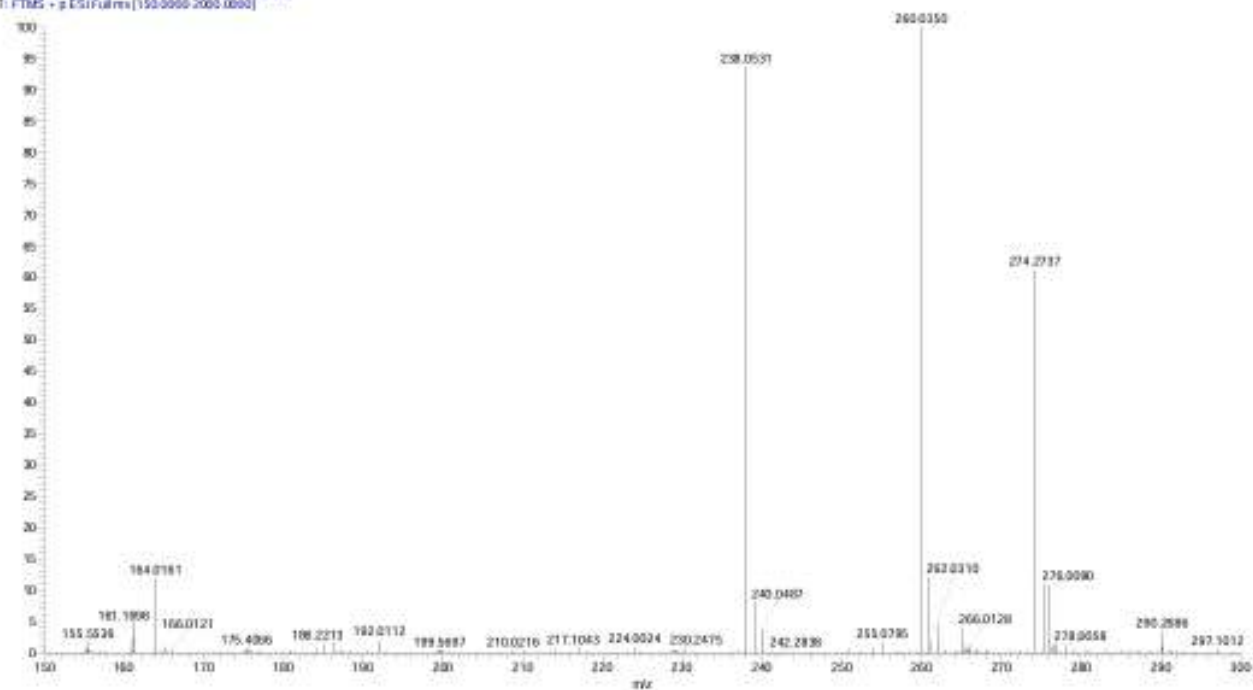
Compound 18



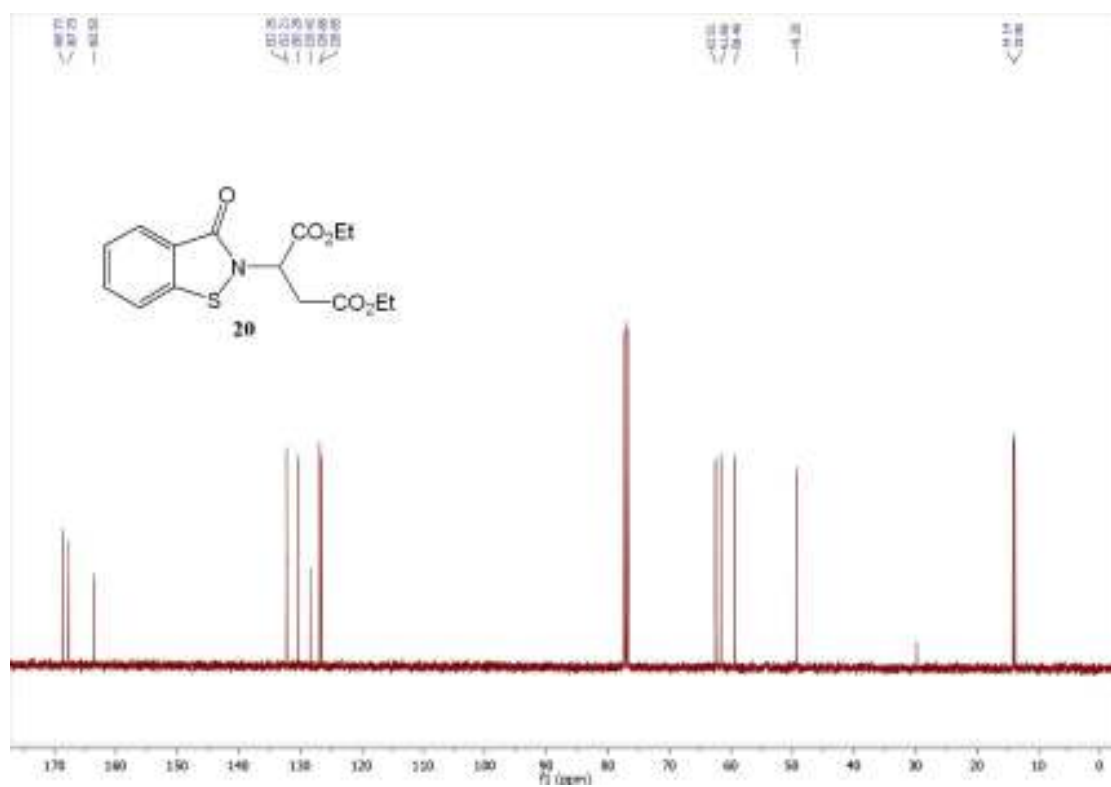
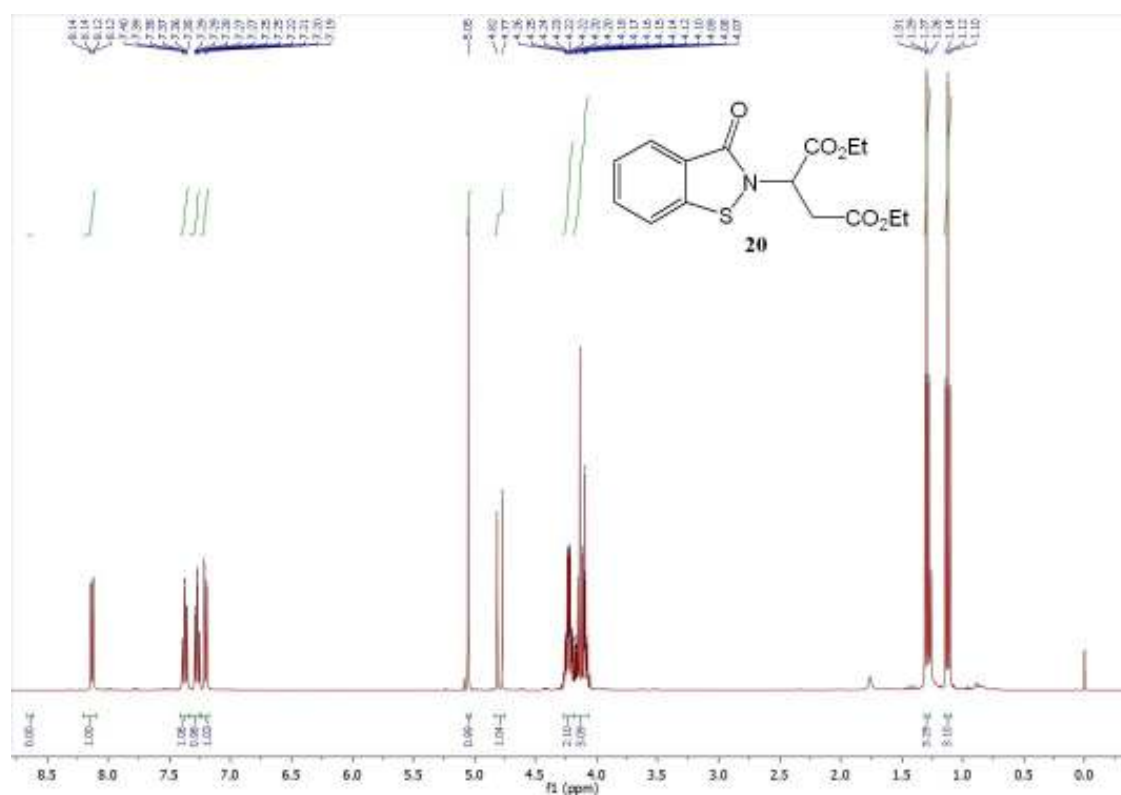
Compound 19



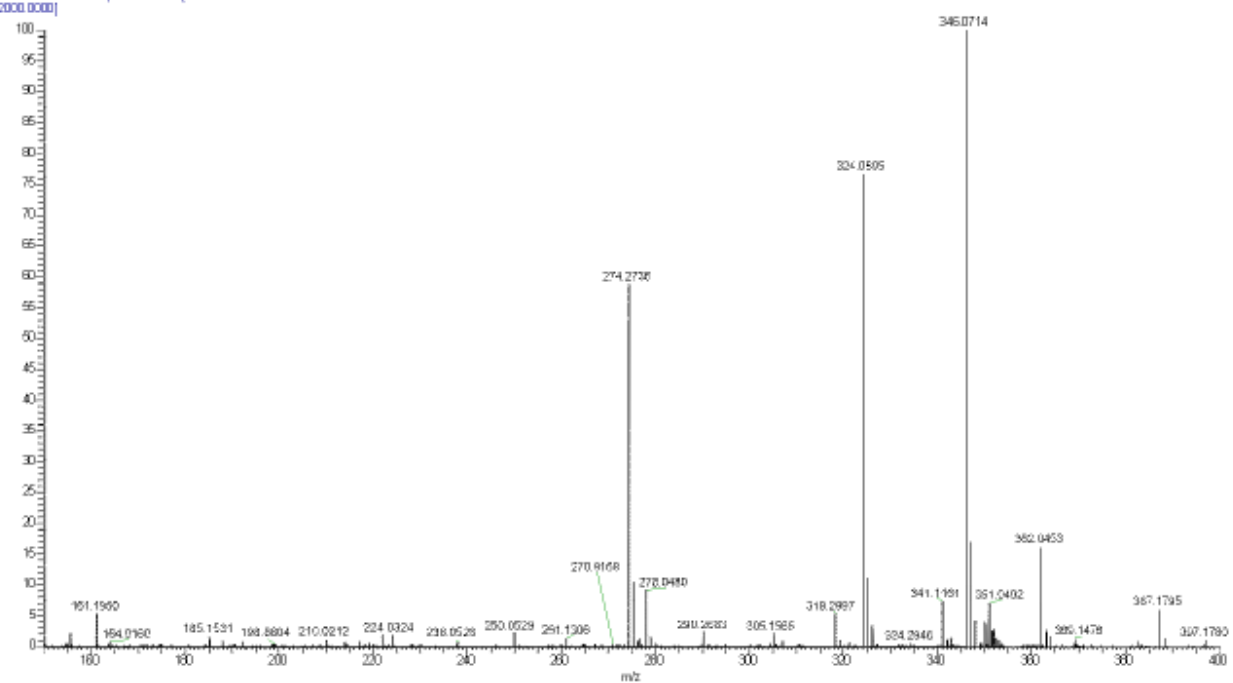
MS compound 19.408 RT: 0.39 AV: 1 NL: A.32EB
T: FTMS + p [SIF/ulms[150-0000-2000.0000]]



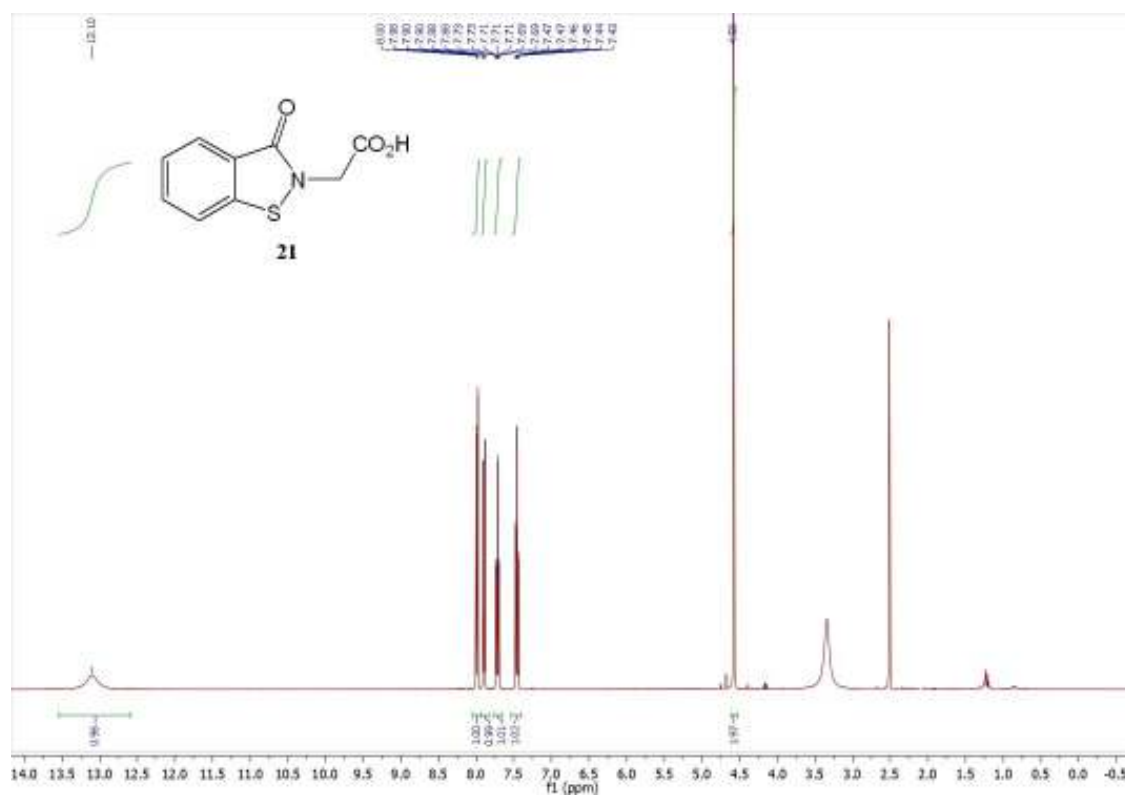
Compound 20



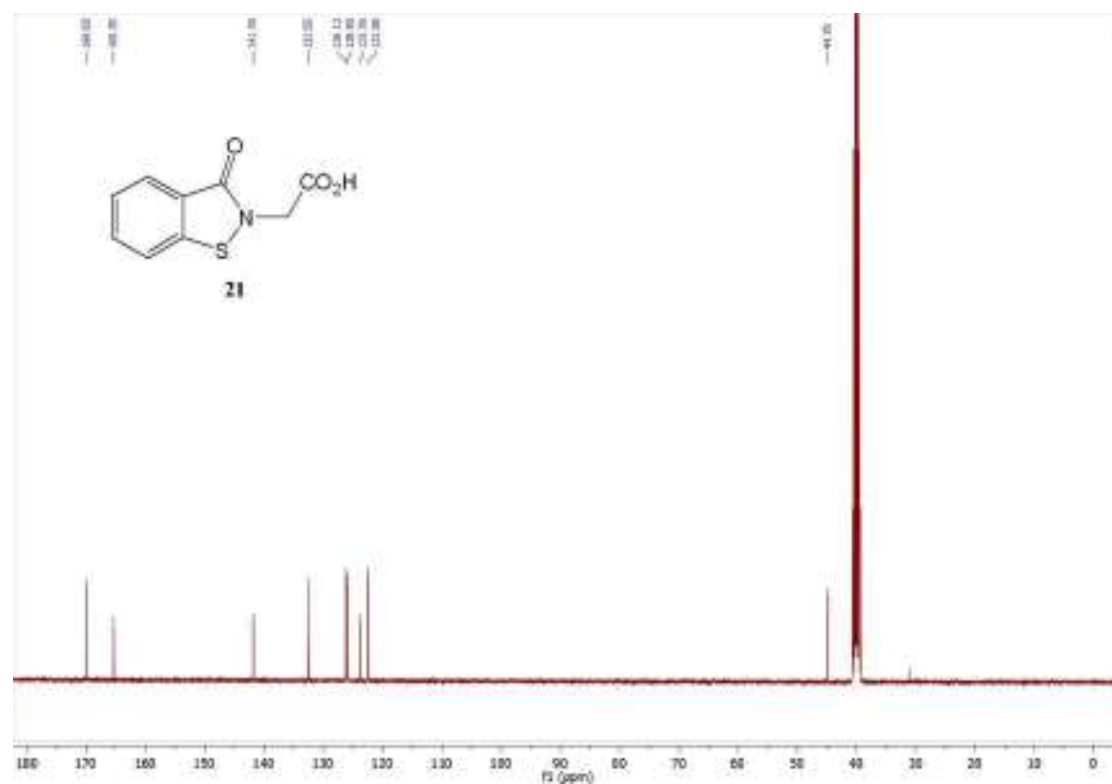
MS compound 20 #18 RT: 0.08, AV: 1 NL:
3.52EB T: FTMS + p EB Full ms [190.0000-
2000.0000]



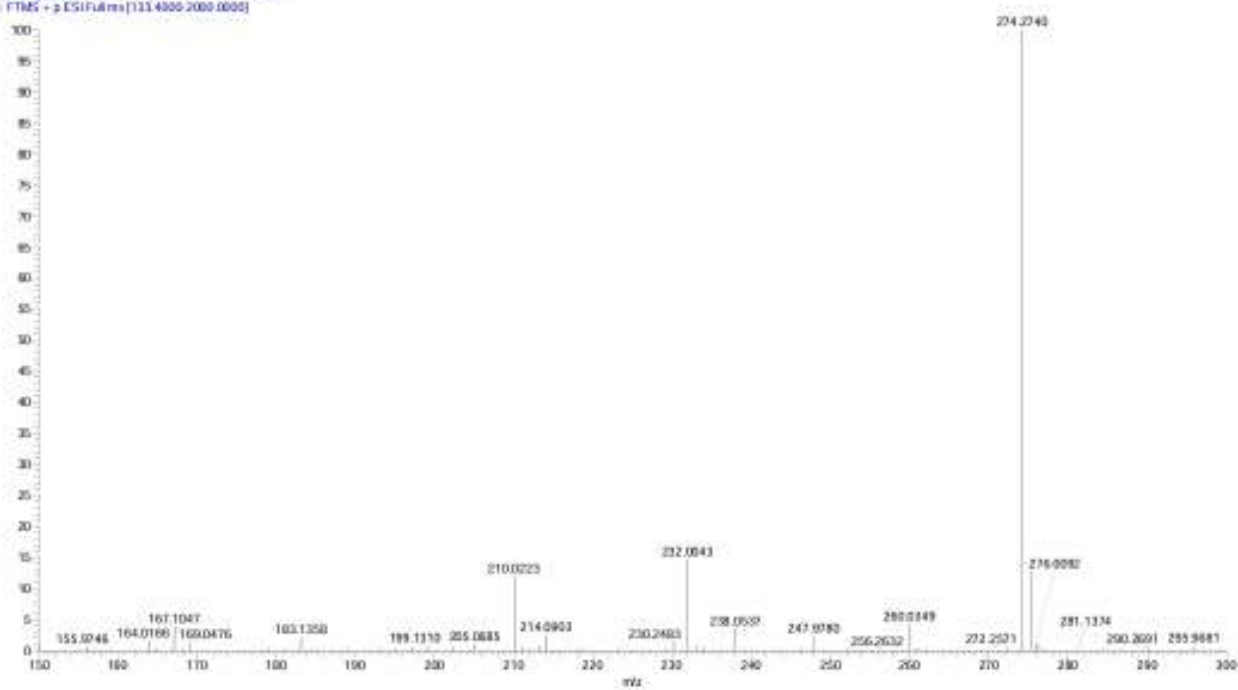
Compound 21



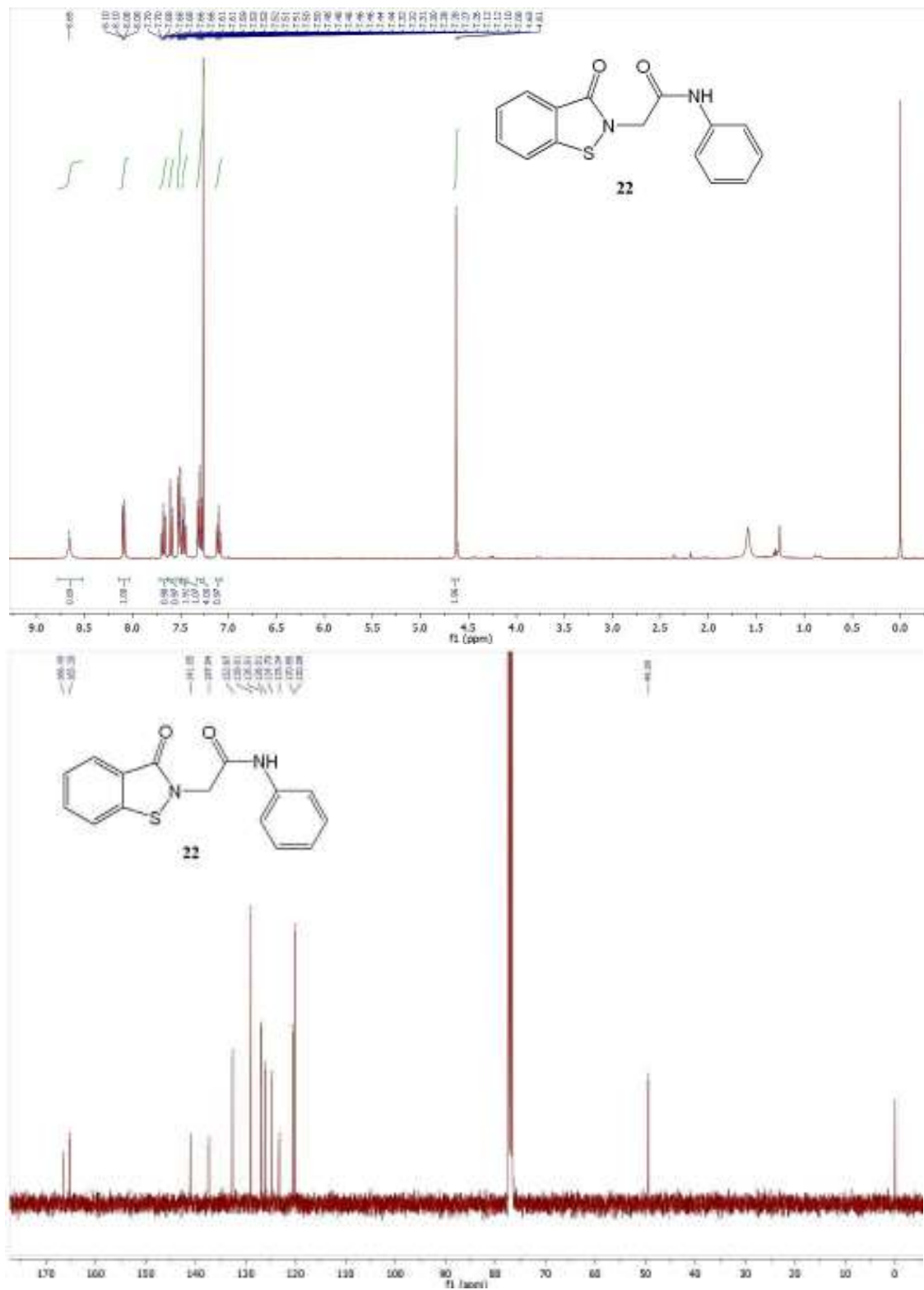
280



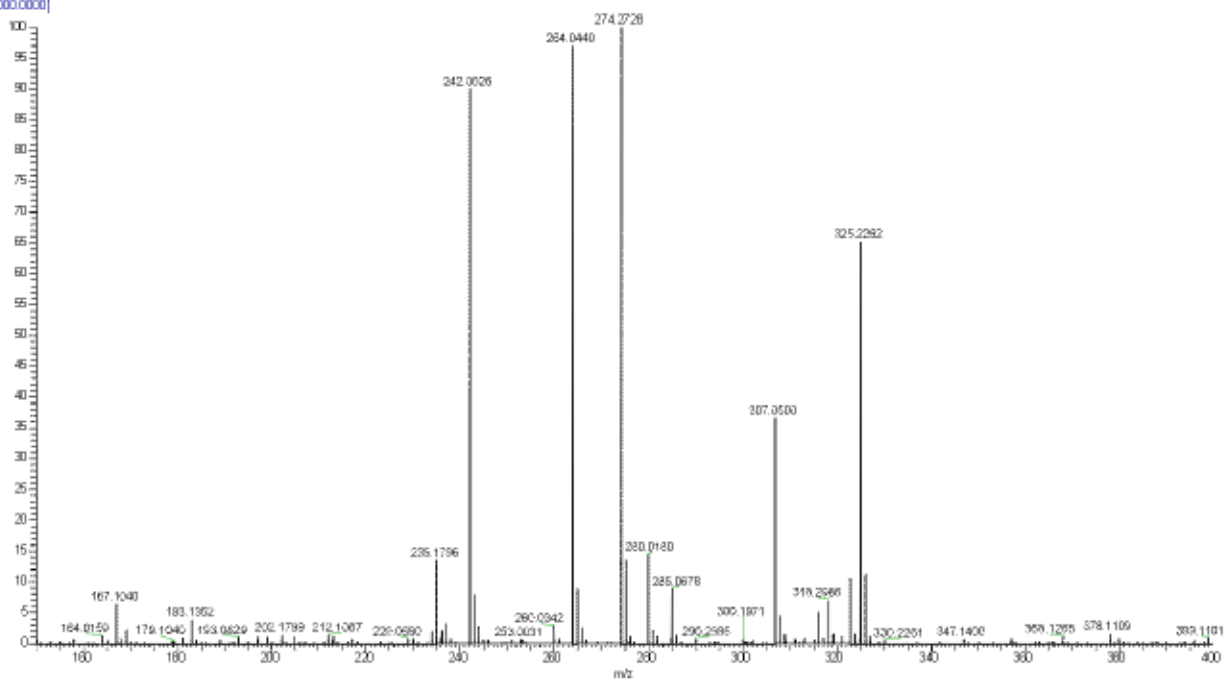
MS compound 21.465 RT: 0.26, AV: 1, NL: 8.74E8
T: FTMS + p ESI Fullres [111.4000 2000.0000]



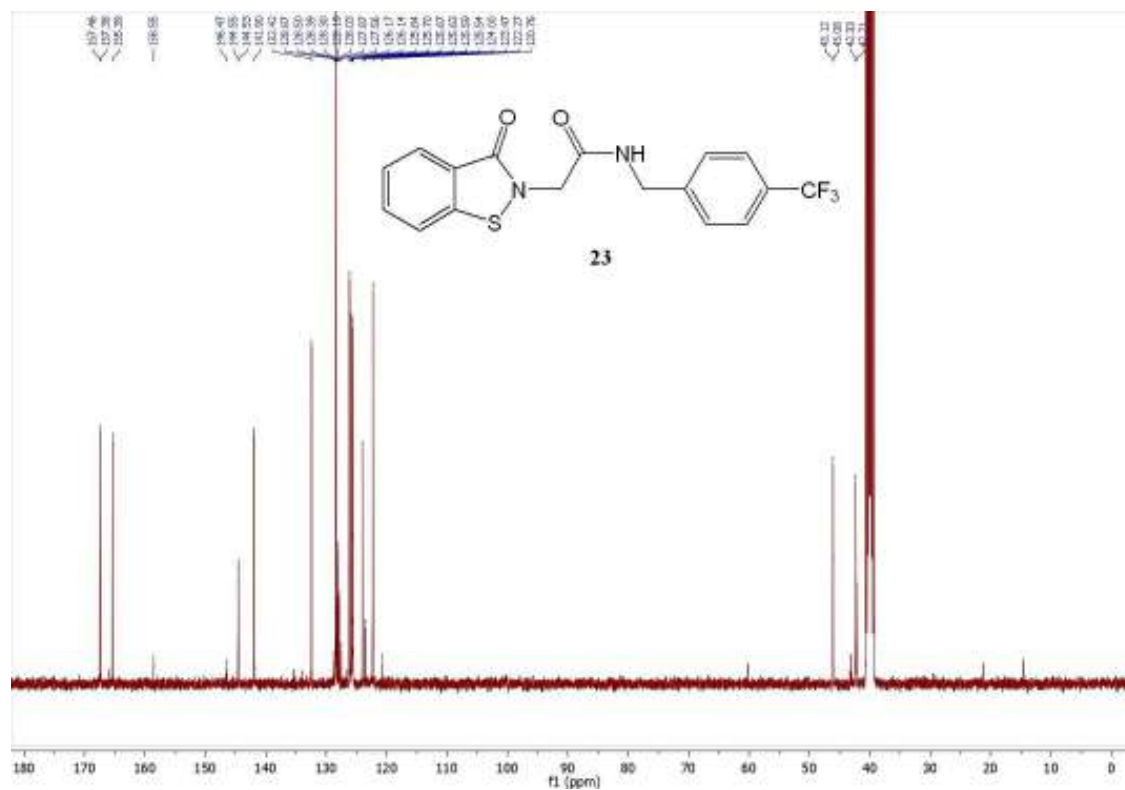
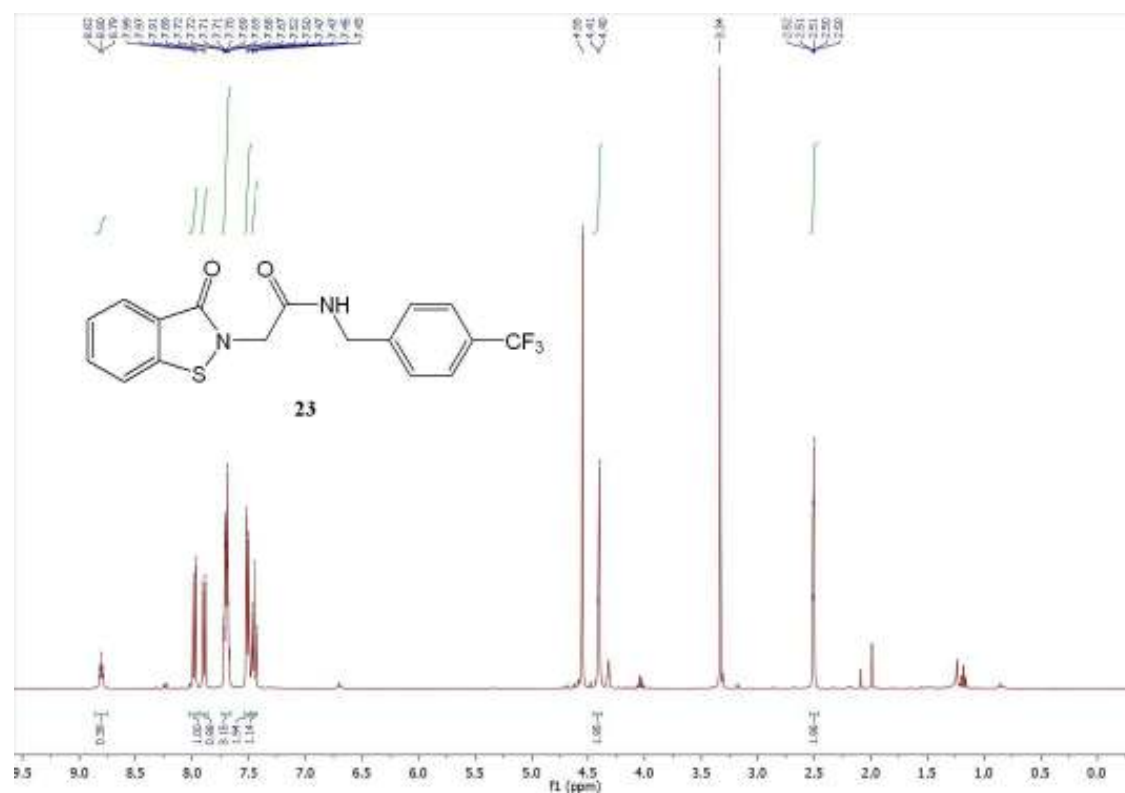
Compound 22



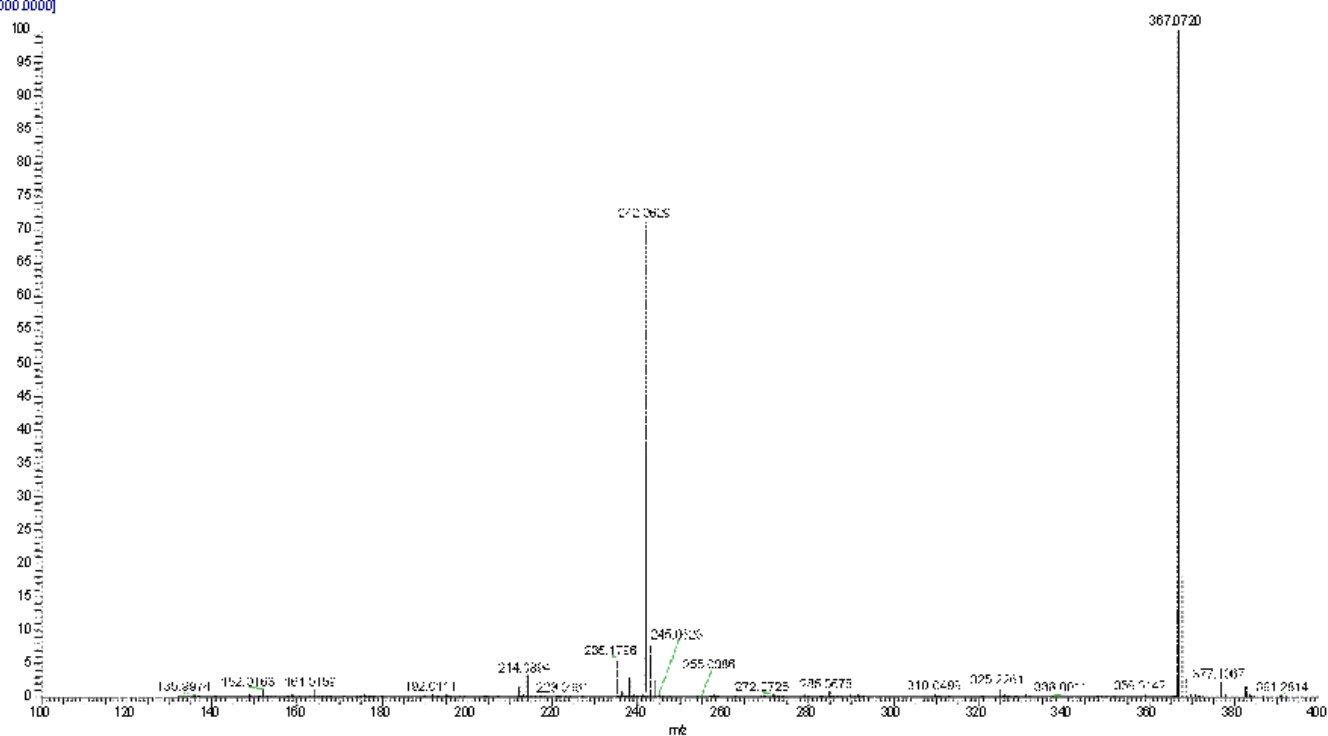
MS compound 22 #111 RT: 0.49 AV: 1 NL:
4.40E8 T: FTMS + p ESI Full ms [133.4000-
2000.0000]



Compound 23



MS compound 23 #40 RT: 0.17 A/A: 1 NL:
3.92E9 T: FTMS + p ESI Full ms [133.000-
2000.0000]



220823 Blanco_MetOH#55 RT: 0.24 A/A: 1 NL:
4.54E9 T: FTMS + p ESI Full ms [150.000-
2000.0000]

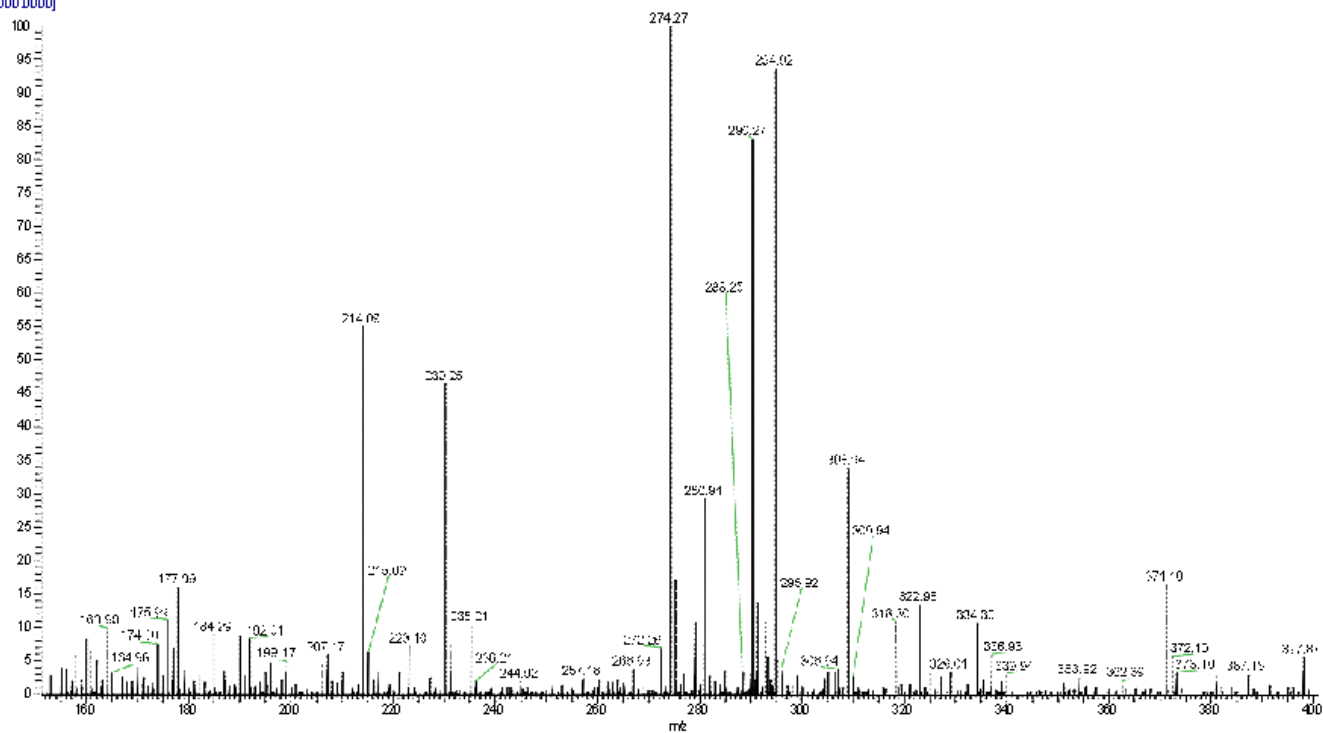


Tabla S1. Porcentajes de viabilidad T. b. brucei

Compuestos	T. b. brucei sanguineo
	% viabilidad 10 μ M
1	0
2	>10; 100 $\pm$ 4
3	0
4	0
5	19 $\pm$ 12
6	0
7	0
8	6 $\pm$ 0
9	0
10	0
11	6 $\pm$ 1
12	0
13	0
14	0
15	72 $\pm$ 8
16	2 $\pm$ 1
17	0
18	>10; 119 $\pm$ 13
19	0
20	85 $\pm$ 4
21	0
22	57 $\pm$ 7
23	0 $\pm$ 1

Tabla S2. Evaluación de la oxidación del biosensor en la forma infectiva de *T. b. brucei* tratada con compuestos hits

Serie	Compuestos	% Biosensor Oxidation	% Consumo de glucosa
I	1	43 ± 1	>100
I	2	0	NE
I	3	7 ± 2	NE
I	4	48 ± 3	NE
I	5	6 ± 1	NE
I	6	79 ± 0	NE
I	7	57 ± 0	NE
I	8	40 ± 3	NE
I	9	65 ± 0	NE
II	10	32 ± 2	>100
II	11	100 ± 0	>100
II	12	47 ± 0	90 ± 9
II	13	41 ± 3	>100
II	14	37 ± 0	>100
II	15	0	NE
III	16	2 ± 0	90 ± 5
III	17	1 ± 1	NE
III	18	0	NE
IV	19	41 ± 1	NE
IV	20	0	NE
IV	21	3 ± 0	>100
V	22	4 ± 2	NE
V	23	25 ± 2	NE
	EbS	27 ± 1	>100
	EbSe	NE	45 ± 7
	DMSO 1% v/v	7 ± 0	100

NE: No evaluado

Tabla S3. Análisis de densidad electrónica y brechas HOMO–LUMO de los derivados de EbS y su correlación con la actividad biológica (CE₅₀ frente a *T. b. brucei* y *T. cruzi*).

Compounds	Electron Density	HOMO-LUMO_gap	EC ₅₀ <i>T. brucei</i> (μM)	EC ₅₀ <i>T. cruzi</i> (μM)
1		0.28678	0.10	10
2		0.28679	10.00	10
23		0.28462	1.80	10
12		0.28459	0.36	4.42
19		0.28448	0.90	10
11		0.28445	0.08	10
8		0.28411	0.71	4.85
14		0.28386	0.02	10
9		0.28043	0.61	3.8
3		0.28029	0.89	10
4		0.27882	0.92	10
5		0.27507	1.40	8.88

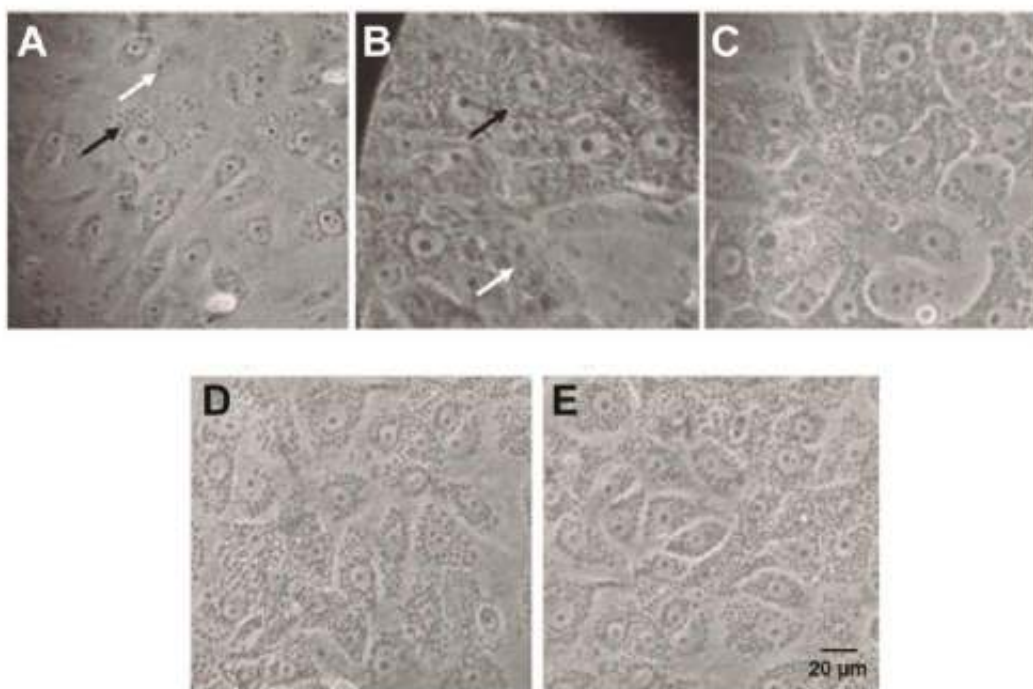


Figura S2. Comparación de la capacidad infectiva de las líneas celulares *T. cruzi* Dm28c-luc vs. -WT. Imágenes representativas de microscopía de luz (400× de aumento) de células Vero infectadas con tripomastigotes metacíclicos (MT) de la línea celular **A)** Dm28c-luc (tasa de infección 10–20%) y **B)** Dm28c-WT (tasa de infección 80%), o infectadas con tripomastigotes derivados de cultivo celular (CCT) provenientes de **C)** ciclo 7 de reinfección con Dm28c-luc (tasa de infección 80–100%), **D)** ciclo 9 de reinfección con Dm28c-luc (80–100%) y **E)** ciclo 9 de reinfección con Dm28c-WT (80–100%). Las células no infectadas e infectadas están señaladas con flechas blancas y negras, respectivamente. Las tasas de infección se refieren al número de células infectadas de un total de al menos 250 células contadas por muestra. La barra de escala mostrada en **E** aplica a todas las imágenes.

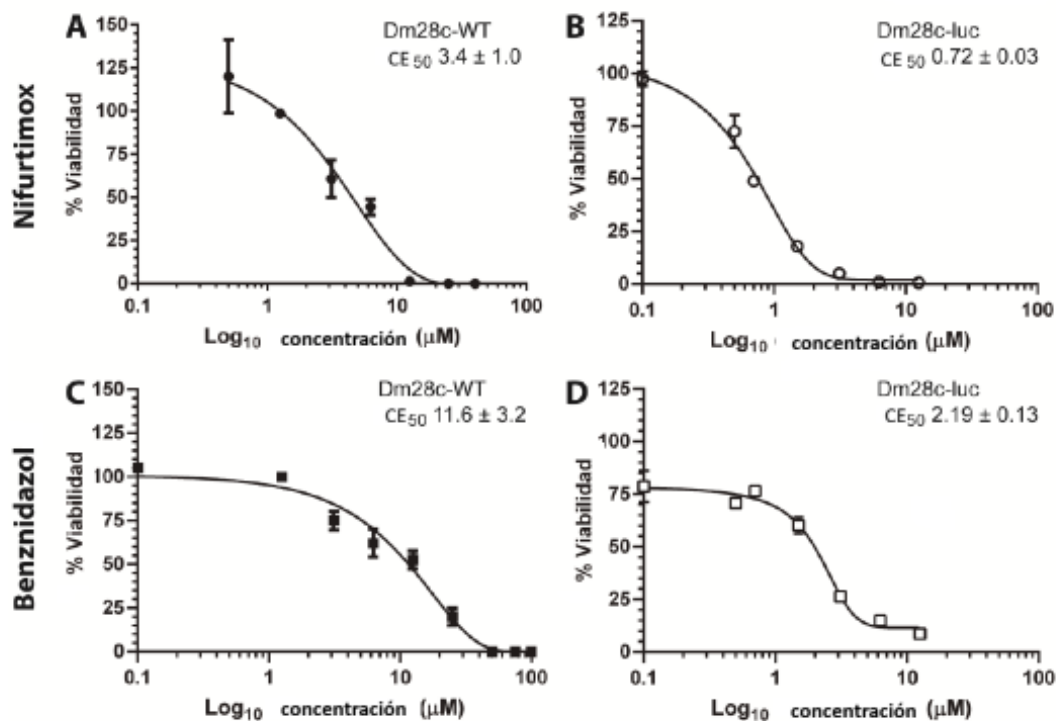


Figura S3. Gráficas de concentración-respuesta de fármacos para Dm28c-luc y Dm28c-WT. EC_{50} para Nifurtimox determinadas en A) Dm28c-WT por el método de microscopía y en B) Dm28c-luc por el ensayo de bioluminiscencia. EC_{50} para Benznidazol determinadas en C) Dm28c-WT por el método de microscopía y en D) Dm28c-luc por el ensayo de bioluminiscencia. Los valores de EC_{50} (mostrados en μM) se obtuvieron mediante el ajuste de los datos a una ecuación sigmoide de cuatro parámetros (software GraphPad Prism, versión 8.0).

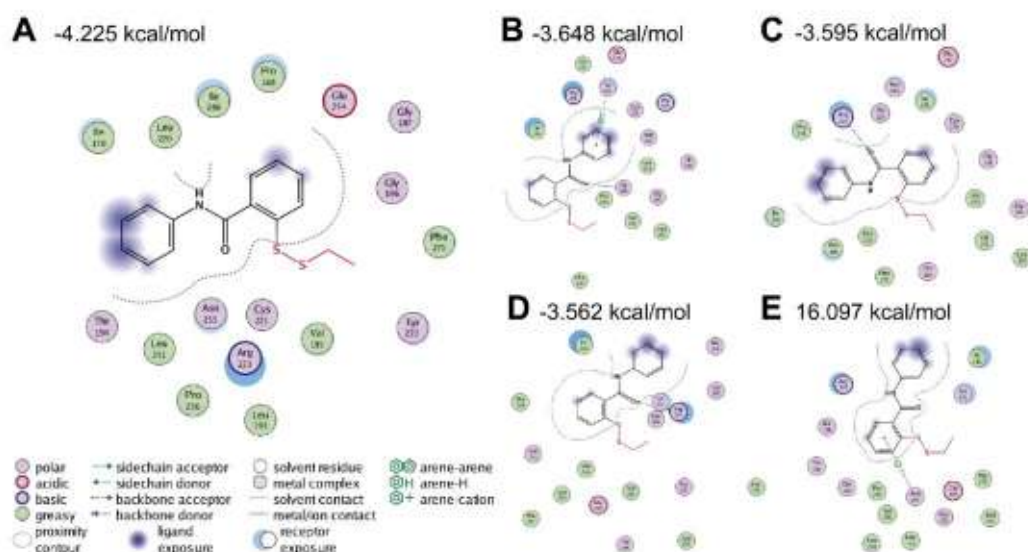


Figura S4. Análisis de interacción para el complejo TcTR-EbS. Se muestran las poses representativas de acoplamiento y las correspondientes energías de unión calculadas para A) pose 1, B) pose 2, C) pose 3, D) pose 4 y E) pose 5.

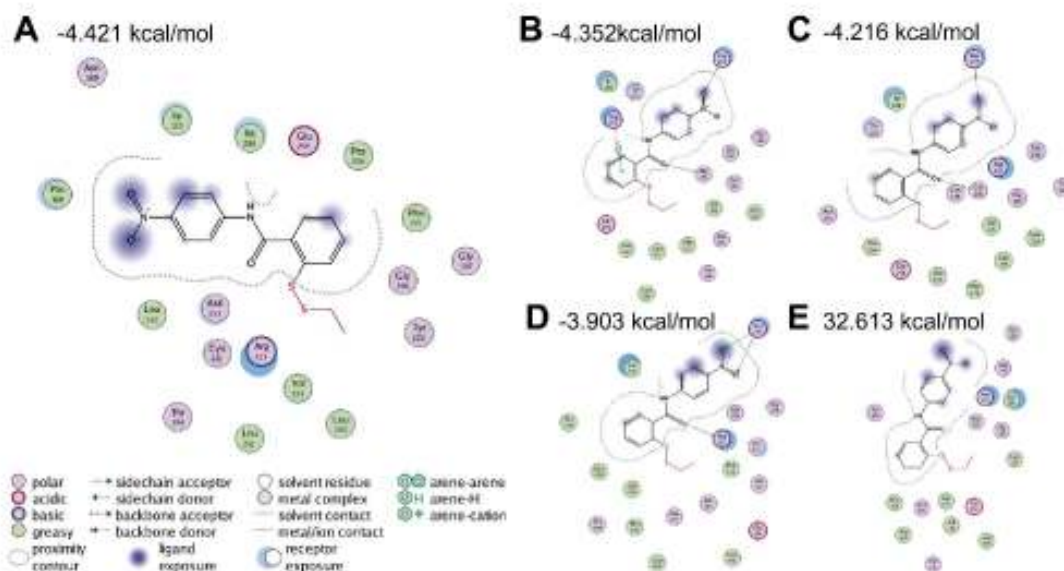


Figura S5. Análisis de interacción para el complejo TcTR-7.
Se muestran las poses representativas de acoplamiento y las correspondientes energías de unión calculadas para A) pose 1, B) pose 2, C) pose 3, D) pose 4 y E) pose 5.

PUBLICACIONES CIENTÍFICAS

2022. A Simple Bioluminescent Assay for the Screening of Cytotoxic Molecules Against the Intracellular Form of *Leishmania infantum*. https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-2453-1_10.

2024. Development of bioluminescent reporter *Trypanosoma cruzi* and bioassay for compound screening. <https://doi.org/10.3389/fchbi.2024.1423430>.

2025. Restyling an old scaffold: Ebsulfur analogs with improved activity and selectivity against the infective stage of trypanosomes. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2025.117675>.

2025. Non-invasive, fluorescent-based detection of perturbations in the thiol-redox homeostasis of bloodstream *Trypanosoma brucei brucei*. Springer-Nature; Methods in Molecular Biology – Euglenozoa. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-5146-9_20.

2021. New Pd–Fe ferrocenyl antiparasitic compounds with bioactive 8- hydroxyquinoline ligands: a comparative study with their Pt–Fe analogues. <https://doi.org/10.1039/d0dt03963b>

2022. Evaluation of the Anti-*Leishmania mexicana* and *Trypanosoma brucei* Activity and Mode of Action of 4,4'-(Arylmethylene) bis (3-methyl-1-phenyl- 1H-pyrazol-5-ol). <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081913>.

2022. Mode of action of p-quinone derivatives with trypanocidal activity studied by experimental and in silico models. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2022.114926>.

2023. Murine colon organoids as a novel model to study *Trypanosoma cruzi* infection and interactions with the intestinal epithelium. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1082524>.