

TRABAJO FIN DE GRADO

**QUIMIOTERAPIA ANTI-*TRYPANOSOMA*
CRUZI: ACCIÓN DE NUEVOS COMPUESTOS
FRENTE A DIFERENTES DIANAS
TERAPÉUTICAS**

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA Y GEOLOGÍA

ÁREA DE PARASITOLOGÍA

AUTOR:

LÓPEZ BECERRA, DAVID

DIRECTORES:

MESA VALLE, CONCEPCIÓN MARÍA

GARRIDO CÁRDENAS, JOSÉ ANTONIO



ÍNDICE

1. Resumen	4
2. Abstract	5
3. Objetivos	6
4. Generalidades de la enfermedad	6
5. El parásito	10
5.1. Clasificación taxonómica.....	10
5.2. Formas morfológicas.....	10
5.3. Ciclo de vida.....	11
5.4. Diversidad genética	13
5.5. Ultraestructura	14
5.6. Tratamiento	17
6. Dianas terapéuticas en <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
6.1. Enzimas compartimentalizadas en el glicosoma	18
6.1.1. Hexoquinasa (HK)	19
6.1.2. Triosafosfato isomerasa (TIM)	20
6.1.3. Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPHD)	22
6.2. Tripanotión reductasa, enzima de tripanosomátidos	23
6.3. Cruzipaína, proteasa específica de <i>T. cruzi</i>	25
6.4. Ruta de biosíntesis del ergosterol.....	28
6.4.1. Inhibidores de la escualeno epoxidasa	29
6.4.2. Inhibidores de la lanosterol sintasa	30
6.4.3. Inhibidores de la C14 α -lanosterol desmetilasa (CYP51).....	30
6.4.4. Inhibidores de la escualeno sintasa (SQS).....	31
6.5. Dianas en los mecanismos de regulación del calcio.....	32
6.5.1. Regulación del calcio en la mitocondria.....	34
6.5.2. Regulación del calcio en los acidocalcisomas.....	35
6.6. Otras dianas terapéuticas	36
6.6.1. Quinasas dependientes de ciclinas	36
6.6.2. Topoisomerasas.....	37
6.6.3. Inhibidores de purinas	38
6.7. Nuevos agentes anti- <i>T. cruzi</i>	38

7. Bibliografía	40
------------------------------	----

1. Resumen

La tripanosomiasis americana es la enfermedad parasitaria más grave de América del Sur. Conocida como la enfermedad de Chagas, es producida por el protozoo parásito *Trypanosoma cruzi* y ha causado millones de muertes desde su descubrimiento hace más de un siglo. Las medidas adoptadas para prevenir la enfermedad han disminuido el número de casos, aunque en la actualidad se considera que hay entre 6 y 7 millones de personas infectadas por *T. cruzi*. Actualmente, los dos fármacos utilizados frente al parásito presentan una elevada toxicidad y producen numerosos efectos adversos. Esto hace necesaria la búsqueda de nuevos fármacos frente a diferentes dianas moleculares en el parásito que estén exentos de toxicidad o que sean menos tóxicos que los actuales utilizados.

En el presente trabajo se recogen las principales enzimas y rutas metabólicas del parásito consideradas como dianas terapéuticas frente a las que se han diseñado, sintetizado y evaluado la acción de nuevos compuestos.

2. Abstract

American trypanosomiasis is the most serious parasitic disease in South America. Known as Chagas disease, it is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and has caused millions of deaths since its discovery more than a century ago. Measures taken to prevent the disease have reduced the number of cases, although there are now estimated to be 6-7 million people infected with *T. cruzi*. Currently, the two drugs used against the parasite are highly toxic and produce numerous adverse effects. This makes it necessary to search for new drugs against different molecular targets in the parasite that are free of toxicity or that are less toxic than those currently used.

In the present work, the main enzymes and metabolic pathways of the parasite considered as therapeutic targets against which the action of new compounds have been designed, synthesised and evaluated.

3. Objetivos

Se plantean los siguientes objetivos:

- 1) Conocer la biología de *Trypanosoma cruzi*.
- 2) Estudiar las principales dianas terapéuticas en *Trypanosoma cruzi*.
- 3) Analizar la actividad anti-*Trypanosoma cruzi* de compuestos ensayados frente a las diferentes dianas terapéuticas.

4. Generalidades de la enfermedad

La enfermedad de Chagas, también conocida como tripanosomiasis americana, es una antropozoonosis propia de América del Sur. Fue descrita en 1909 por Carlos Chagas y es causada por el protozoo parásito flagelado *Trypanosoma cruzi* (Toso et al., 2011). Es un problema de salud pública en 21 países latinoamericanos, donde es endémica, con una estimación de 6 millones de personas que padecen la infección (unas 12 mil muertes por año) y alrededor de 70 millones en riesgo de adquirirla (OPS/OMS, 2020). Los países con un mayor número de infectados son Argentina, Brasil, México y Bolivia (Stanaway y Roth, 2015), seguidos de Chile, Paraguay, el sur de Perú y Uruguay (López-Vélez, 2020).

Esta parasitosis puede cursar con dos fases clínicas en el hospedador, una fase aguda y una crónica (Aguirre, 2019):

- En la fase aguda, el parásito se encuentra en la fase inicial de infección (Murcia et al., 2013; Aguirre, 2019). Se da principalmente en niños, pasando la mayoría de los casos desapercibidos por la levedad e inespecificidad del cuadro clínico, y se caracteriza por ausencia de síntomas. En algunos casos la primera manifestación es el chagoma, que se trata de una lesión eritematosa e indurada, normalmente indolora; o un edema indoloro conocido como signo de Romaña. Rara vez se producen mayores complicaciones y la probabilidad de muerte es muy baja (Aguirre, 2019).
- Tras esta fase, un 60-80% de los infectados permanecen asintomáticos con anticuerpos anti-*T. cruzi* positivos (Aguirre, 2019), a lo que se le denomina fase indeterminada (Pérez, 2013), y que persiste durante toda la vida del hospedador (Murcia et al., 2013). Los pacientes infectados que desarrollan la fase crónica de la enfermedad presentan graves consecuencias como la cardiomiopatía, que es la manifestación clínica más frecuente y grave, seguida por casos de megavísceras (Figura 1) (Guhl, 2013) y de afecciones en el sistema nervioso periférico (Aguirre, 2019).

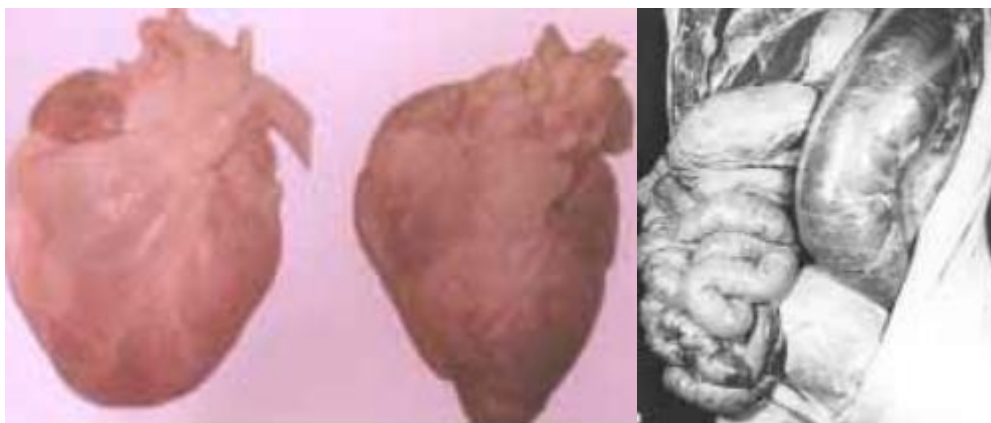


Figura 1. Patologías graves más comunes que causa la enfermedad. A la izquierda, miocarditis chagásica aguda, donde el corazón crece y se dilata, se vuelve de color más pálido y con hemorragias focales. A la derecha, megacolon chagásico, donde el colon sufre una enorme dilatación (Carrada-Bravo, 2004).

La enfermedad de Chagas es una parasitosis con una epidemiología compleja que se transmite principalmente a través de un insecto vector, las chinches de la subfamilia *Triatominae* (orden Hemiptera, familia Reduviidae) (López-Vélez et al., 2020), denominados triatominos o triatomidos, de las cuales más de 150 especies están implicadas en la transmisión de la enfermedad. Además, más de 100 especies de mamíferos silvestres y animales pueden actuar como reservorios. (Molina et al., 2016). La transmisión es zoonótica y dependiendo de los reservorios y los hospedadores implicados se distinguen tres ciclos: el doméstico, relacionado con ambientes asociados al hombre y animales de su entorno que actúan de reservorios; el selvático, donde no entra el hombre e involucra la interacción entre vectores silvestres y diferentes mamíferos salvaje; y el peridoméstico, que se da como puente entre ambos ciclos anteriores (WHO, 2002).

La transmisión vectorial, a pesar de ser la forma mayoritaria de infección, sólo se da en áreas endémicas donde habitan los vectores. En estos países, la prevalencia de la enfermedad se ve incrementada por las altas tasas de vivienda mal estructurada y sin calidad (principalmente en zonas rurales y suburbanas), la carencia de recursos derivada de la inestabilidad social y económica o incluso las altas tasas de inmigración (OPS/OMS, 2014). Además, el traslado de la mayoría de las personas infectadas a entornos urbanos, los últimos flujos migratorios, las rutas comerciales entre países y la modernización de los métodos de transporte, hacen difícil controlar esta enfermedad, habiéndose visto acuciada su distribución con la globalización (Toso et al., 2011; Molina et al., 2016).

La vía de transmisión por transfusiones sanguíneas fue, junto a la vectorial, una de las vías de transmisión más importante hasta 1993. Sin embargo, gracias a la tamización en bancos de sangre realizada en los países endémicos a partir de este año, se consiguió disminuir la prevalencia de la infección por transfusiones (Rueda et al., 2014). El riesgo de esta radica en el paso a través de sangre infectada hacia zonas más allá de las áreas endémicas, pudiendo llegar a países de Norteamérica, Europa, Asia y Oceanía. Aunque se desconocen las cifras concretas, en los países europeos se estima que alrededor del 2% de los inmigrantes latinos están infectados con *T. cruzi*, pudiendo estos actuar como donantes de sangre (Gascón et al., 2010). Al igual que las transfusiones sanguíneas, existen otras vías de transmisión no vectoriales, las cuales son:

- Transmisión congénita: Es el principal modo de infección en los lugares en los que la transmisión vectorial y por transfusión de sangre han sido controladas (Soriano-Arandes et al., 2016). Uno de los peligros de esta forma de transmisión es que los bebés infectados en zonas no endémicas pueden no ser detectados a causa de la baja prevalencia de esta enfermedad y, por tanto, la baja familiarización con ella. A ello hay que sumar que en ellos la enfermedad se desarrolla sin síntomas hasta evolucionar a una fase crónica (Gascón et al., 2010; López-Nicolás, 2019).
- Transmisión por trasplantes de órganos: El principal problema de la transmisión de la enfermedad mediante trasplantes es la situación de inmunosupresión en la que se encuentran los receptores, lo que puede generar una fase aguda de la enfermedad dando como resultado la muerte. Para evitarlo, es necesario realizar pruebas para comprobar la ausencia de *T. cruzi* tanto en el donante como en el receptor (Antinori et al., 2017; López-Nicolás, 2019). El riesgo varía según sea el órgano trasplantado (por ejemplo, hay un riesgo mucho mayor en trasplantes de corazón que de riñón) (Chin-Hong et al., 2011; López-Vélez et al., 2020) y el grado de inmunosupresión (Chin-Hong et al., 2011).
- Transmisión por ingestión de alimentos contaminados: Recientemente se ha prestado una atención creciente a la vía oral de transmisión de *T. cruzi*, con varios brotes atribuidos a jugos de frutas contaminados reportados desde Brasil y Venezuela (López-Vélez et al., 2020). La mayoría de los brotes se han asociado al consumo de bebidas preparadas a base de frutas u otros vegetales contaminados con las heces de triatominos o secreciones de mamíferos infectados. Otra fuente de infección es el consumo de carne de animales mal cocida o de sangre de algunos reservorios del parásito como el armadillo (*Dasypus spp*) (Rueda et al., 2014).
- Transmisión por accidente de laboratorio: Las infecciones adquiridas en el laboratorio ocurren normalmente por inoculación de aerosoles producidos al centrifugar muestras contaminadas, por pinchazos con agujas infectadas o exposición de membranas mucosas a un cultivo de parásitos y por trabajar con materiales infectados (Aguirre, 2019). Sin embargo, gracias a unas buenas prácticas de laboratorio y siguiendo las normas de bioseguridad hacen que la incidencia de estos casos sea muy baja (López-Nicolás, 2019).

Respecto a la situación en regiones no endémicas, la prevalencia va en aumento debido a la inmigración desde América a otros países y continentes, incluyendo Europa, Canadá, Japón, Australia y Estados Unidos (Guhl, 2013; Aguirre, 2019). La carga de la enfermedad fuera de América incluye aproximadamente 42.000 inmigrantes infectados con *T. cruzi* en España y decenas de miles en Italia, Francia y Suiza (Requena-Méndez et al., 2015; López-Vélez et al., 2020). También se sabe que hay inmigrantes con la enfermedad de Chagas que se encuentran en Japón, Australia y Canadá (Figura 2) (López-Vélez et al., 2020).

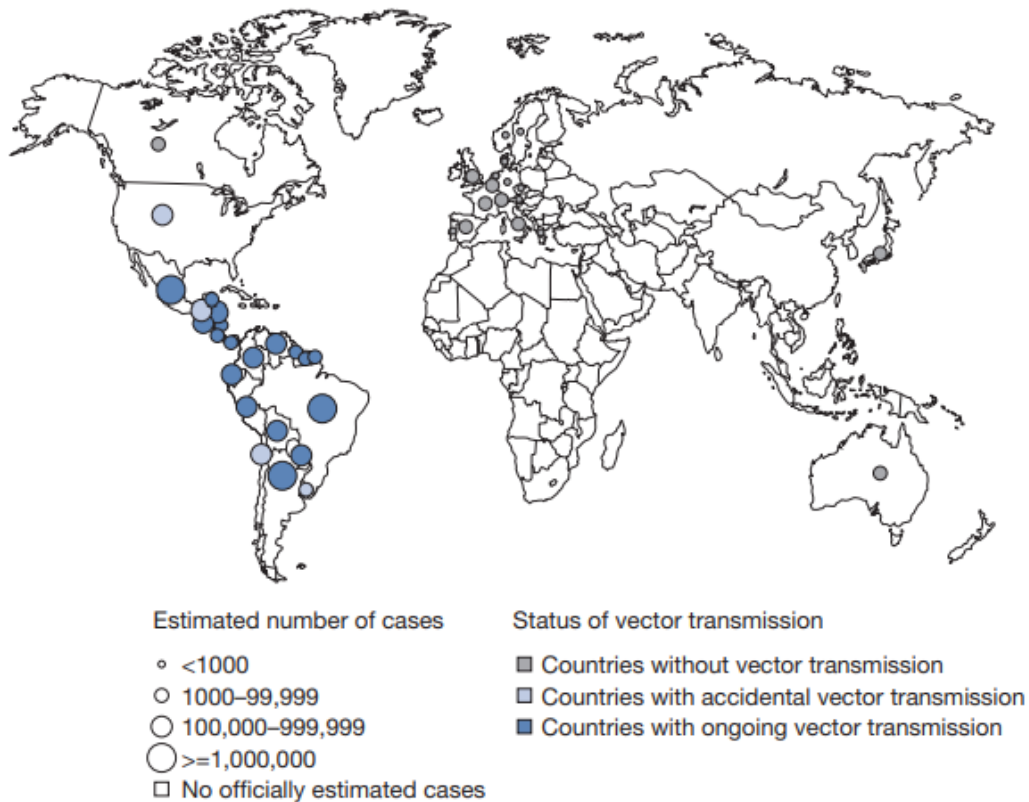


Figura 2. Expansión geográfica de la Enfermedad de Chagas (López-Vélez, 2020).

La enfermedad tiene mayor prevalencia en las regiones rurales más pobres de los países endémicos, donde se encuentran las chinches y las condiciones higiénico-sanitarias son deficientes (Briceño-León, 2009). La acción antropogénica está influyendo también en la expansión epidemiológica de la enfermedad debido a que los cambios ambientales, como la deforestación y el calentamiento global, han afectado a los ecotopos y el comportamiento de los vectores y los reservorios de *T. cruzi*, de manera que se han desplazado a nuevas zonas (Rueda et al., 2014), haciendo que se transmita la enfermedad mediante vectores en áreas donde antes no ocurría. Todos estos factores hacen que esta parasitosis no pueda erradicarse. Los objetivos para controlar la enfermedad consisten en eliminar la transmisión y conseguir un tratamiento temprano de la población que contrae la enfermedad.

Con todo, más de 100 años después de su descubrimiento, la enfermedad de Chagas continúa siendo un reto para los profesionales de la salud. Los avances tecnológicos y los cambios sociodemográficos han supuesto una gran visibilidad de la enfermedad y una generación de conocimiento sobre una de las patologías más olvidadas (Molina et al., 2016). La Organización Mundial de la Salud (OMS) la reconoció como unas de las 20 enfermedades tropicales más desatendidas del mundo (Vélez, 2018) causado, entre otras cosas, por la presencia mayoritaria de personas en regiones rurales y pobres (Aguirre, 2019). Sin embargo, las medidas de control aplicadas en los países endémicos han conseguido una disminución en la prevalencia de la enfermedad (Días, 2009; Pinto-Días, 2012; WHO, 2021), pasando de 18 millones en 1991 a 6 millones en 2020 (OPS/OMS, 2020).

5. El parásito

5.1. Clasificación taxonómica

El agente etiológico de la enfermedad, *Trypanosoma cruzi*, es un protozoo parásito del orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae (García-Jordán, 2015). La clasificación para *T. cruzi* acordada por Levine et al. (1980) es la siguiente:

Reino: Protozoa

Filo: Sarcomastigophora

Subfilo: Mastigophora

Clase: Zoomastigophora

Orden: Kinetoplastida

Familia: Trypanosomatidae

Género: *Trypanosoma*

Especie: *Trypanosoma cruzi*

5.2. Formas morfológicas

La morfología de *Trypanosoma cruzi* cambia a lo largo de su ciclo de vida, principalmente distinguiéndose en cada etapa: la posición relativa del cinetoplasto con relación al núcleo, el grado de desarrollo o emergencia del flagelo y la presencia o ausencia de membrana ondulante (Concha-Valdez, 2015). Así, *Trypanosoma cruzi* presenta cuatro formas morfológicas a lo largo de su ciclo de vida: amastigote y tripomastigote en el hospedador vertebrado y epimastigote y tripomastigote metacíclico en el hospedador invertebrado (De Fuentes-Vicente et al., 2019). Las características de cada una de estas formas son (Figura 3) (Apt-Baruch, 2020):

- **Amastigote:** Forma esférica u ovalada (2-4 μm), sin movilidad y que carece de flagelo libre (es corto y no emergente). Es la forma de reproducción intracelular (llamados pseudoquistes) (Vargas-Vásquez, 2005) en los hospedadores vertebrados.
- **Tripomastigote:** Forma infectante del parásito de aspecto fusiforme (20-25 x 2 μm), citoplasma granuloso y un núcleo central vesiculoso. Tiene el cinetoplasto posterior al núcleo y el flagelo emerge del extremo posterior y se dobla hacia delante a lo largo del cuerpo del tripomastigote, formando una membrana ondulante a lo largo de todo el parásito y emergiendo en forma libre en su extremo anterior al parásito, presentando membrana ondulante a lo largo de su cuerpo (López-Nicolás, 2019). Tiene gran movilidad y carece de la capacidad de multiplicación. En la sangre de los mamíferos adopta una forma ancha o "strout", responsable de infectar al vector durante su alimentación, mientras que

en la parte terminal del intestino de los vectores adopta una forma más delgada o “slender”, que es responsable del establecimiento de la enfermedad, a lo que se le denomina tripomastigote metacíclico (Vargas-Vasquez, 2005).

- **Epimastigote:** Es la forma de reproducción del parásito en el vector. Tiene aspecto fusiforme (20 x 2 µm) con un cinetoplasto localizado a nivel del núcleo o por delante de este, del cual emerge el flagelo de forma libre. Tiene gran movilidad.

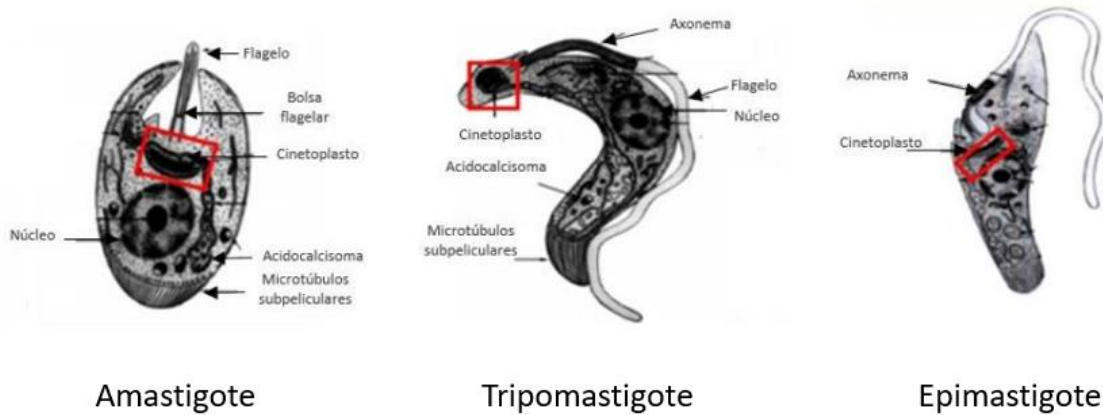


Figura 3. Formas morfológicas de *Trypanosoma cruzi* (Basado en Querales y Torres, 2009).

5.3. Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. cruzi* es el siguiente (Figura 4):

- 1) Al alimentarse el triatomino de la sangre de un hospedador mamífero infectado ingiere a la vez tripomastigotes que pasan al intestino medio del insecto. Es aquí donde los tripomastigotes se transforman en epimastigotes (Tyler y Engman, 2001).
- 2) Los epimastigotes se replican y migran al intestino posterior y recto, donde se diferencian en tripomastigotes metacíclicos, los cuales son liberados mediante las deyecciones. Esta sería la forma infectiva del parásito, puesto que, cuando el insecto se está alimentando de la sangre del hospedador, este deposita sus heces en la zona de la picadura, y al rascarse, estas heces entran en contacto con la picadura o las mucosas (como los ojos), produciéndose así la entrada del parásito en él (López-Nicolás, 2019).
- 3) Los tripomastigotes metacíclicos, una vez dentro del mamífero, son capaces de parasitar una amplia gama de células fagocíticas y no fagocíticas. El proceso de entrada del parásito en las células sigue dos pasos, el primero es la adhesión a la célula, y el segundo es la internalización, que culmina con la formación de la vacuola parasitófora (Maeda et al., 2012). Luego, los parásitos escapan de la vacuola y pasan a la matriz citoplasmática, donde se diferencian a forma amastigote (López-Nicolás, 2019).

- 4) Los amastigotes proliferan en el citoplasma celular formando un pseudoquiste (Tyler y Engman, 2001). Estos se diferencian posteriormente en tripomastigotes, que generalmente escapan del pseudoquiste hacia la sangre y la linfa como formas delgadas, que pueden invadir nuevas células de una manera esencialmente similar a la invasión metacíclica, preferentemente células musculares esqueléticas o cardíacas, células gliales del sistema nervioso entérico y adipocitos, aunque pueden invadir cualquier tipo de célula nucleada (López-Nicolás, 2019). Las formas delgadas que no invaden una nueva célula experimentan un cambio morfológico, en primer lugar, a la forma ancha y luego, al amastigote. Las células que se lisan prematuramente también pueden liberar amastigotes que pueden servir para propagar la infección, ya que también son capaces de infectar las células (Tyler y Engman, 2001).
- 5) Finalmente, los tripomastigotes presentes en la sangre de un mamífero infectado sirven para completar el ciclo de vida cuando el insecto se vuelve a alimentar de la sangre de un hospedador infectado por este parásito (Tyler y Engman, 2001).

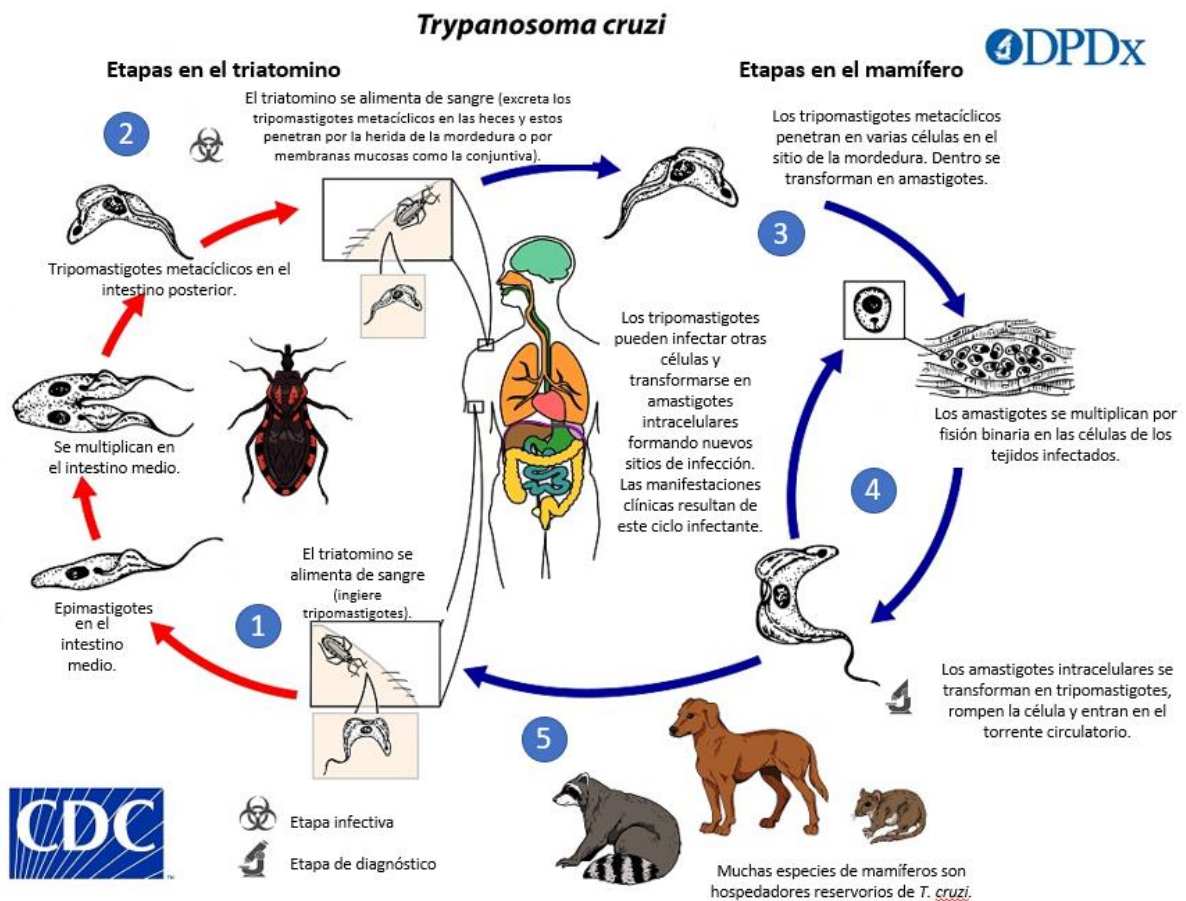


Figura 4. Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi* obtenido de CDC (2021).

5.4. Diversidad genética

Una característica importante de *T. cruzi* es su amplia diversidad genética y bioquímica y un comportamiento biológico muy variable (De Fuentes-Vicente et al., 2019). En concreto, se han observado diferentes mecanismos de reproducción en el parásito, lo que podría explicar su diversidad genética. Así, a pesar de que su reproducción es normalmente asexual por fisión binaria, es decir, clonal, se ha descrito en muchos estudios que también puede llevar a cabo una reproducción sexual en la que se verían envueltos procesos de fusión nuclear y recombinación (Berry et al., 2019).

Así, se ha encontrado una alta diferencia de hasta un 48% del contenido de ADN total entre distintas cepas, observando que entre ellas hay variación entre el número y tamaño de sus cromosomas (Zingales, 2018). Ante ello, diversos autores proponen diferentes clasificaciones para facilitar su estudio (De Fuentes-Vicente et al., 2019).

Esta gran variabilidad genética ha provocado que durante los últimos 40 años se haya realizado un importante trabajo para dilucidar las relaciones entre cepas de *T. cruzi* con respecto a su distribución geográfica y a su asociación con diferentes especies de triatomíneos, reservorios y los seres humanos (Gaunt et al., 2003). Recientemente, se ha propuesto una nueva nomenclatura para *T. cruzi* basada en los diferentes tamaños obtenidos tras digerir el ADN de los genes que dan lugar al ARN ribosómico y la proteína chaperona HSP60 con diferentes enzimas de restricción (marcador tipo RFLP, "Restriction fragment length polymorphisms"). De esta forma, se distinguen seis unidades discretas de tipificación (DTUs), nombradas como *T. cruzi* I (TcI) o DTU I, *T. cruzi* II (TcII) o DTU II, *T. cruzi* III (TcIII) o DTU III, *T. cruzi* IV (TcIV) o DTU IV, *T. cruzi* V (TcV) o DTU V y *T. cruzi* VI (TcVI) o DTU VI (Zingales et al., 2009). Estas DTUs tienen además distintas localizaciones geográficas asociadas a los ciclos doméstico y selvático, como se puede ver en la Figura 5 (derecha) (Guhl, 2013).

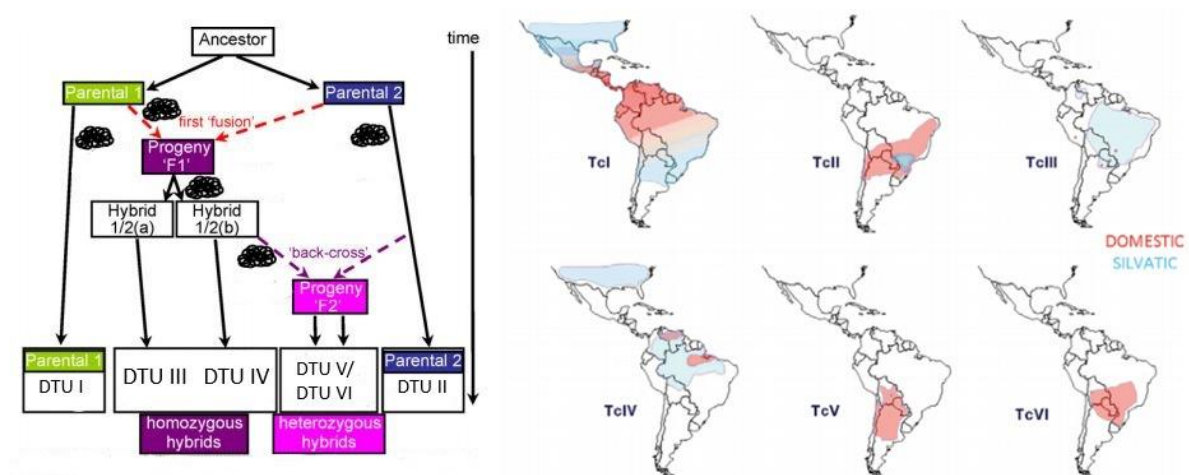


Figura 5. Izquierda: Esquema de la formación de los diferentes DTU (Sturm y Campbell, 2010). Derecha: Distribución geográfica de las 6 DTUs y su correspondencia con ciclos de transmisión asociados al entorno silvestre o doméstico (Guhl, 2013).

Según esta clasificación, las DTUs I y II son las equivalentes a los genomas ancestrales, mientras que las DTUs III y IV provendrían de la progenie producto de la fusión nuclear de ambos genomas (híbridos homocigóticos). Por último, las DTUs V y VI serían producto de las recombinaciones

generadas en el genoma de la DTU II y la III (híbridos heterocigóticos) (Figura 5, izquierda). De igual manera, recientemente se ha reportado un nuevo genotipo con el nombre TcBat, con una asociación estricta a los murciélagos en Brasil y Panamá (Marcili et al., 2013), que se ha considerado como un séptimo DTU.

En 2016 se propuso otra clasificación, la cual se basa en una nueva agrupación considerando la expresión de tres genes, uno nuclear (*Gpi*) y dos mitocondriales (*CytB* y *COII*), dando lugar a tres grupos: mtTcI, equivalente al ancestral DTU I, mtTcII, equivalente al ancestral DTU II, y mtTcIII, el cual reúne al resto de los DTUs híbridos. En el caso de TcBat, sigue siendo una cadena independiente, aunque está filogenéticamente relacionado con mtTcI (Herrerros-Cabello et al., 2020) (Figura 6).

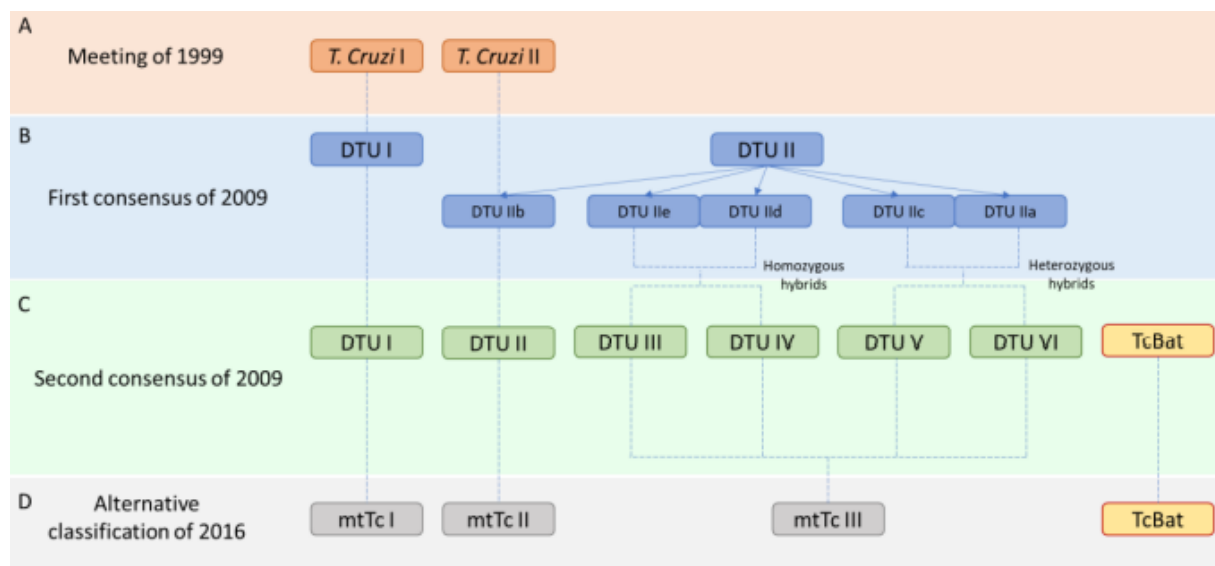


Figura 6. Clasificación de las diferentes unidades de tipificación de *T. cruzi* desde la primera reunión en 1999 hasta la última en 2016 (Herrerros-Cabello et al., 2020).

El estudio de la epidemiología molecular de *T. cruzi* ha permitido establecer el posible efecto de las diferentes DTUs en el desarrollo clínico de la enfermedad de Chagas. La presencia de diferentes poblaciones del parásito en pacientes enfermos ha sugerido que cada genotipo causa diferentes daños celulares, así, por ejemplo, los daños cardíacos eran causados principalmente por DTU II, DTU V y DTU VI, aunque recientemente se ha demostrado que DTU I juega un papel importante en las formas severas de cardiopatía chagásica (Guhl, 2013).

5.5. Ultraestructura

T. cruzi, a pesar de ser un organismo unicelular eucariota, presenta ciertas diferencias en su estructura celular respecto a la estructura general en este tipo de organización (Figura 7). Además, a lo largo de su vida va variando tanto la forma del parásito como la distribución y tamaño de sus orgánulos.

- **Superficie celular:** está compuesta por la membrana plasmática y una capa bajo esta de microtúbulos subpelículaes, los cuales tienen conexiones mediante pequeños filamentos entre sí y con la membrana, lo que hace que la célula tenga gran rigidez y sea difícil deformarla

mecánicamente. La mayor densidad de microtúbulos se encuentra entre el núcleo y el cinetoplasto del protozoo (donde se encuentra el aparato de Golgi) y la menor en las regiones posterior y anterior (Souza, 2002).

- **Citoesqueleto:** los microtúbulos subpeliculares se encuentran asociados a una red de microtúbulos que recorre el interior del parásito. Los microtúbulos están asociados a monómeros acetilados y tirosinados, actina, proteínas derivadas de esta y miosina. En *T. cruzi*, a diferencia de otros eucariotas, se ha observado que la actina presenta importantes diferencias en su estructura tridimensional, lo que afectaría a sus interacciones con otras proteínas, y además esta se encuentra acumulada en estructuras puntuales y en la estructura flagelar (Rodrigues et al., 2014; Souza, 2009).
- **Flagelo:** este emerge de una invaginación llamada bolsillo flagelar, responsable de actividades endocíticas y exocíticas (Martins et al., 2012). Además, se caracteriza por carecer de la subpelícula de microtúbulos y por tener una membrana de composición diferente a la plasmática (Souza, 2009). En su interior, se puede encontrar un axonema similar al de otros seres vivos, con 9 pares de microtúbulos rodeando a una pareja de microtúbulos centrales. Sin embargo, a lo largo del axonema del flagelo de *T. cruzi* se asocian varios filamentos formando una estructura de enrejado llamada vara paraxial o paraflagelar de la que aún no se han caracterizado todos sus componentes pero que se sabe son vitales para la supervivencia del parásito (Souza, 2009). Algunos estudios han determinado que la membrana flagelar se une al cuerpo celular del parásito en ciertas etapas de vida, y este, al moverse, crea una impresión visual de membrana ondulante (Souza, 2002).
- **Cinetoplasto-mitocondria:** el parásito presenta una única mitocondria que está ligada íntimamente con otro orgánulo, el cinetoplasto, de manera que se consideran la misma estructura por la continuidad de sus membranas. Estas, además de formar una estructura peculiar, contienen altas concentraciones del ADN extranuclear del parásito (entre el 16 y el 30% del ADN total) (Coura, 2015). El tamaño del cinetoplasto varía según la etapa en la que se encuentre el parásito en su ciclo de vida. Por su parte, el ADN del cinetoplasto es ADN circular compuesto por maxicírculos y minicírculos, encontrando de 5.000 a 20.000 minicírculos y 50 copias de maxicírculos. Los minicírculos son moléculas cuya longitud oscila entre 100 y 2.500 bp y codifican pequeños ARN que dirigen el procesamiento de ARN mitocondriales (ARNmt) los cuales están codificados por maxicírculos. Los maxicírculos son moléculas mayores de ADN, con una longitud entre 30.000 y 50.000 bp, y son homólogos al ADN mitocondrial eucariota. Los genes que contienen codifican ARN ribosómicos (ARNr) y enzimas implicadas en el proceso de respiración celular (Martins et al. 2012). Este material genético difiere del ADN nuclear en la ausencia de unión a histonas y se replica perdiendo la estructura de minicírculos y luego volviendo a reintegrarse (Degraeve et al., 1988; Martins et al., 2012).
- **Glicosoma:** son orgánulos esféricos de origen peroxisomal que presentan una matriz homogénea y ligeramente densa. Contienen catalasas y oxidasas como los peroxisomas, y además presentan enzimas glicolíticas relacionadas con la conversión de la glucosa en 3-

fosfoglicerato. Por otro lado, también se lleva a cabo en ellos el metabolismo de los ácidos grasos y de los carbohidratos. Este orgánulo no presenta genoma (Souza, 2002; Rodrigues et al., 2014). A nivel de metabolismo energético, gran parte de la glicólisis se lleva a cabo dentro del glicosoma (ocho de las diez enzimas que participan en la vía se encuentran compartimentalizadas en este orgánulo) (García-Torres y Pérez-Montfort, 2011).

- **Acidocalcisoma:** son orgánulos con forma de vacuola con alta densidad electrónica que actúan de reserva de productos metabólicos y que presentan gránulos de polifosfatos en su interior. Además, acumulan altas concentraciones de calcio y otros cationes como Mg, Na, Zn y Fe (Docampo et al., 2005). Presentan ATPasas que permiten el movimiento de iones mediante la translocación de Ca^{2+} y H^+ . Su finalidad es almacenar calcio y usarlo en ciertos momentos del ciclo de vida del parásito, actúan como almacenamiento de energía al acumular pirofosfatos (PPi), regulan el pH citoplasmático y participan en la osmorregulación (Souza, 2002).
- **Citostoma y reservosoma:** el citostoma es una invaginación de la membrana plasmática donde se llevan a cabo actividades endocíticas, aparte de las ocurridas en el bolsillo flagelar (Martins et al., 2012). La invaginación adquiere una forma de embudo que llega a alcanzar la región nuclear, denominándose la estructura formada como citostoma-citofaringe. Las macromoléculas extracelulares se unen a esta región y luego se internalizan mediante vesículas endocíticas que se forman al final de la citofaringe. Tras incorporarse al protozoo, las macromoléculas son procesadas en el reservosoma. Los reservosomas se acumulan en la parte posterior del parásito con forma esférica y con una única membrana. La matriz de los reservosomas es ligeramente densa y contiene proteínas, y presenta algunas inclusiones que contienen lípidos (Souza, 2002).
- **Complejo retículo endoplasmático-aparato de Golgi:** ambos presentan funciones similares a las presentes en otros eucariotas. Así, el retículo endoplasmático se expande a lo largo de toda la célula, alcanzando a veces la membrana plasmática (Souza, 2009). Por su parte, las cisternas del aparato de Golgi se observan en la porción anterior, cerca del cinetoplasto y del bolsillo flagelar. Una característica concreta de *T. cruzi* es que las vesículas provenientes del aparato de Golgi vacían su contenido en el bolsillo flagelar para liberarlo al medio extracelular con más frecuencia que en el sistema endosomal-lisosomal (Souza, 2002).
- **Núcleo:** El núcleo es igual que el de células eucariotas con variaciones en la forma y en la localización celular dependiendo de la etapa de vida del parásito (Martins et al., 2012). Durante la división celular, la membrana nuclear se mantiene intacta durante todo el proceso y no aparecen centriolos en conexión con los microtúbulos ni ninguna otra estructura que participe en su formación (Souza, 2009). Los microtúbulos intranucleares parecen ser los encargados de mover el material genético a los dos nuevos núcleos en formación, aunque aún no es algo que se sepa con precisión. Por otro lado, el nucleolo no aparece en todas las etapas de vida del parásito (Souza, 2002).

Las características genéticas de estas estructuras, así como ciertas rutas metabólicas que ocurren en estos orgánulos, son diferentes a las que ocurren en las células de los mamíferos, lo que permitiría seleccionar dianas quimioterapéuticas en el parásito y desarrollar nuevos fármacos más selectivos y menos tóxicos para los pacientes infectados.

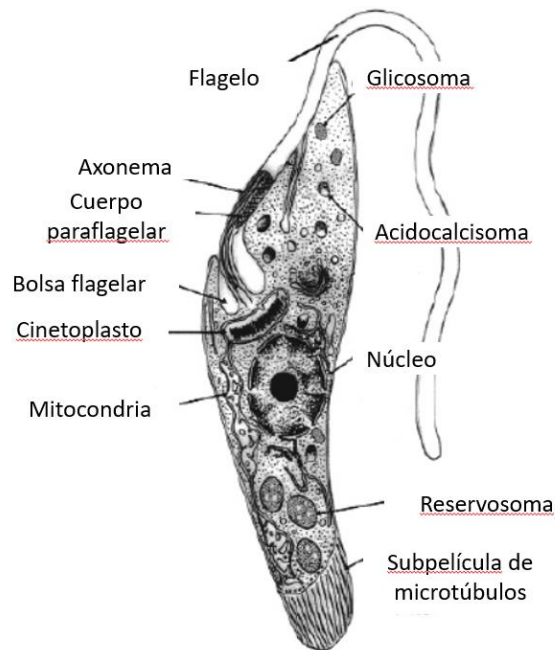


Figura 7. Estructura celular de *Trypanosoma cruzi* (Montero, 2002).

5.6. Tratamiento

Los fármacos tradicionales, que se vienen utilizando desde hace más de 40 años para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, son el nifurtimox y el benznidazol. Ambos fármacos son compuestos heterocíclicos nitrogenados con un grupo nitro unido a un furano o a un anillo imidazol, respectivamente. Ambos compuestos generan radicales nitrogenados producidos por las nitrorreductasas humanas, que, en presencia de oxígeno, se transforman en radicales libres. El mecanismo de acción del nifurtimox involucra la producción de radicales libres, aniones superóxido, peróxido de hidrógeno y metabolitos electrofílicos que afectan al parásito. El benznidazol, un derivado del nitroimidazol, actúa inhibiendo la síntesis de proteínas y la cadena respiratoria y, se ha demostrado que los metabolitos reducidos de este fármaco unidos covalentemente a macromoléculas interaccionan con el DNA del parásito (García-Torres y Pérez-Montfort, 2011). Varios estudios clínicos han demostrado que el benznidazol es más seguro y eficaz que el nifurtimox, siendo el tratamiento utilizado en primera línea (Le Loup et al., 2011).

El tratamiento antiparasitario está indicado para todos los casos de enfermedad de Chagas aguda o reactivada y para infección crónica por *T. cruzi* en pacientes de hasta 18 años de edad. Las infecciones congénitas se consideran enfermedad aguda. El tratamiento se recomienda para los adultos de hasta 50 años de edad con infección crónica que todavía no tengan cardiomiopatía chagásica avanzada. En adultos mayores de 50 años con infección crónica por *T. cruzi*, la decisión de

administrar tratamiento con fármacos antiparasitarios debe hacerse en forma individual, después de ponderar los posibles riesgos y beneficios para el paciente. Se deben tener en cuenta factores como la edad del paciente, el cuadro clínico, la preferencia y el estado de salud en general (CDC, 2019), además de que no debe administrarse a mujeres embarazadas y en pacientes con insuficiencia renal o hepática (OPS/OMS, 2014).

Desafortunadamente, ambos fármacos solo son eficientes en la fase aguda de la enfermedad o bien en aquellos pacientes que presentan recaídas de la infección por estar inmunodeprimidos. Mientras que en la fase aguda de la enfermedad de Chagas se establecen cifras serológicas de curación cercanas al 100% con el tratamiento con benznidazol (Cançado, 2002), en la fase crónica de la enfermedad se habla de cifras de curación mucho más bajas, aunque muy variables, hasta de un 60% en menores de 12 años y entre un 8 y un 25% en adultos (Ferreira, 1990).

La terapia no es del todo exitosa debido a que se produce toxicidad sistémica y efectos adversos, especialmente en adultos, como la formación de una dermatitis alérgica localizada en el tratamiento con benznidazol y síntomas gastrointestinales en el tratamiento con nifurtimox. La gravedad de estos efectos lleva a la necesidad de retirar de forma permanente el tratamiento en el 6-40% de los pacientes que reciben nifurtimox y en el 7-30% de los que reciben benznidazol. (Ribeiro dos Santos et al., 2012). También se ha reportado diferencia en la susceptibilidad a estos fármacos, dependiendo de la cepa del parásito involucrada.

Actualmente no existe ningún fármaco que sea eficaz en ambas fases de la enfermedad y que esté exento de toxicidad. Por otra parte, la ausencia de una vacuna, así como la aparición de resistencias a los medicamentos existentes, hace muy necesaria la búsqueda de nuevos compuestos que actúen contra el parásito. En esta búsqueda de nuevos fármacos antiparasitarios se sigue haciendo un cribado testando grandes cantidades de moléculas genéricas. Sin embargo, el diseño racional de nuevos fármacos se basa en un conocimiento profundo de la biología del parásito y de su interacción con la célula hospedadora, lo que conduce a la selección de dianas terapéuticas sobre las que actuar de manera selectiva sin alterar el metabolismo del hospedador (García-Torres y Pérez-Montfort 2011).

6. Dianas terapéuticas en *Trypanosoma cruzi*

Existen diferencias importantes en el metabolismo de tripanosomátidos con respecto a sus hospedadores mamíferos, las cuales cobran vital importancia para el diseño de fármacos antiparasitarios, interfiriendo en el metabolismo del parásito sin afectar al del mamífero. Mediante el análisis detallado de estas diferencias metabólicas, se han revelado un importante número de dianas potenciales para el desarrollo de nuevos fármacos que, de manera prometedora, y con base en el conocimiento de estas moléculas, han permitido que algunos de estos compuestos se encuentren en las primeras fases preclínicas (García-Torres y Pérez-Montfort, 2011).

6.1. Enzimas compartimentalizadas en el glicosoma

A nivel de metabolismo energético existe una diferencia notable, ya que en los tripanosomátidos gran parte de la glicólisis se lleva a cabo dentro del glicosoma. Ocho de las diez

enzimas que participan en la vía se encuentran compartimentalizadas en este orgánulo (Figura 8). Algunas de estas enzimas presentan diferencias notables respecto a las humanas, lo que las hace dianas terapéuticas muy interesantes para ciertos fármacos que se han ensayado o se están ensayando.

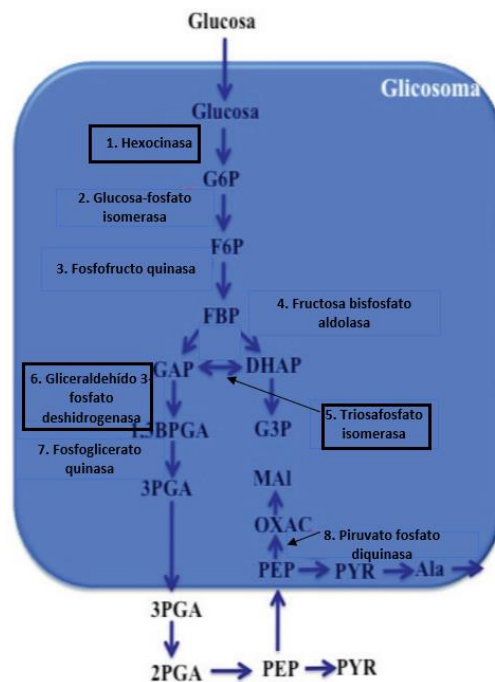


Figura 8. Enzimas glucolíticas compartimentalizadas en el glicosoma de *T. cruzi* (García-Torres y Pérez-Montfort, 2011).

6.1.1. Hexoquinasa (HK)

La hexoquinasa es la primera enzima de la glucólisis, la cual convierte la glucosa en glucosa-6-fosfato (G6P) (Sanz-Rodríguez et al., 2007). *Trypanosoma cruzi* posee una hexoquinasa dependiente de ATP (TCHK) poco común ya que no se ve afectada por la D-glucosa 6-fosfato (principal regulador en vertebrados), sin embargo, es inhibida de manera no competitiva por el pirofosfato inorgánico (PPi). Esto ha llevado a diversos investigadores a ensayar la acción de bifosfonatos (análogos de pirofosfato inorgánico metabólicamente inertes) frente a las formas del parásito.

Los bifosfonatos se acumulan selectivamente en el parásito y pueden inhibir además enzimas involucradas en las reacciones del pirofosfato orgánico e inorgánico, como la farnesil-pirofosfato sintetasa y la escualeno sintetasa, o las pirofosfatasa. que representarían otro blanco terapéutico. En *Trypanosoma cruzi* existen pirofosfatasa localizadas en los acidocalcisomas, orgánulos que como ya mencionamos anteriormente están involucrados en el almacenamiento de polifosfato y cationes, regulando la entrada y salida del Ca^{2+} (Rodríguez-Morales, 2005). Los bifosfonatos son fármacos usados en el tratamiento de los trastornos de reabsorción ósea (como la osteoporosis). En este grupo de fármacos se encuentran: alendronato (Fosamax®, MSD), risedronato (Actonel®, Aventis), pamidronato (Aminomux®, Leti), ibandronato (Bondronat®, Roche), entre otras. A excepción del alendronato, con muy poca actividad tripanocida, las demás han demostrado una potente actividad, tanto *in vitro* e *in vivo*, frente a *T. cruzi* (Montalvetti et al., 2001; Rodríguez-Morales, 2005).

Hudock et al. (2006) demostraron que ciertos bifosfonatos mostraban actividad *in vitro* frente a las formas amastigotes del parásito inhibiendo la TCHK. Sanz-Rodríguez et al. (2007) también pusieron de manifiesto la acción inhibitoria específica de ciertos bifosfonatos frente a TCHK y por lo tanto podrían representar una nueva clase de agentes selectivos anti-*Trypanosoma cruzi* (Figura 9).

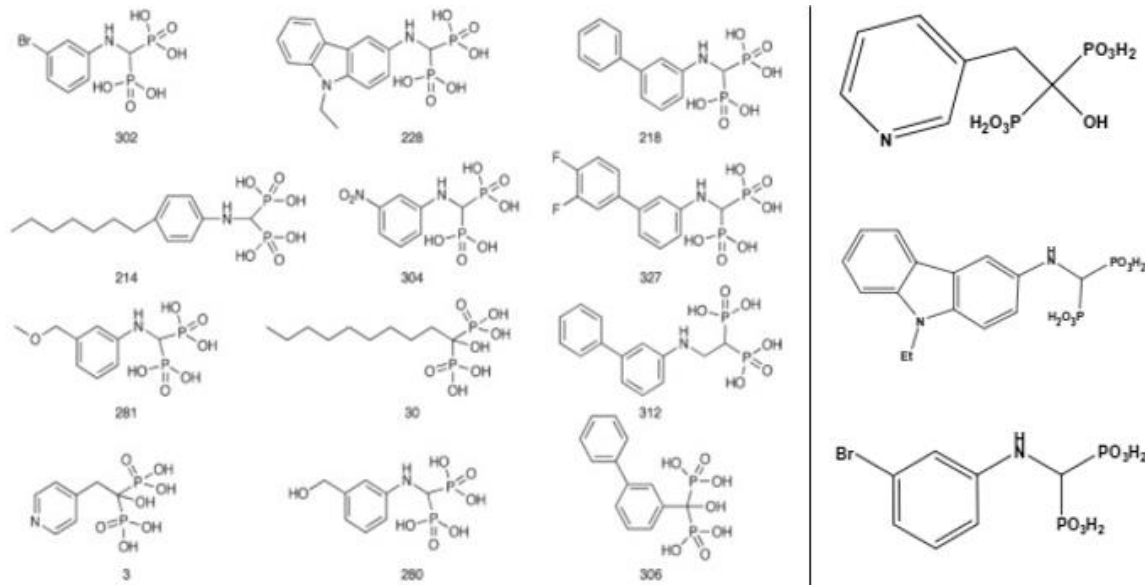


Figura 9. Izquierda: Compuestos que actúan inhibiendo la hexoquinasa de *T. cruzi*, entre los que se encuentran el (9-etil-9H-3-carbazolil)-aminometileno-1,1-bisfosfonato (228), el (3-bromo-fenil)-aminometileno-1,1-bisfosfonato (302) y el (2-(piridin-4-il)-1-hidroxietano-1,1-bisfosfonato (3) (Sanz-Rodríguez et al., 2007). Derecha: Tres de las estructuras moleculares de los bifosfonatos con mayor actividad inhibitoria frente a TCHK según el modelo topológico-matemático de García-Domenech et al. (2008).

García-Domenech et al. (2008) desarrollaron un modelo topológico-matemático para la búsqueda de nuevos derivados bisfosfonatos activos frente a la hexoquinasa de *Trypanosoma cruzi*. El modelo matemático seleccionado en este trabajo retiene características estructurales y puede ser utilizado en la búsqueda de nuevos compuestos activos a través de bases moleculares. Este modelo propuesto por estos autores se ha aplicado además a una librería molecular y se han propuesto nuevas estructuras potencialmente activas frente al parásito (Figura 9).

6.1.2. Triosafosfato isomerasa (TIM)

La TcTIM es una enzima esencial en la vía glicolítica del parásito ya que asegura la producción neta de ATP en la conversión de glucosa a piruvato (Aguilera, 2013). Respecto a la humana, tiene una identidad del 52%. Es una enzima catalíticamente activa sólo en su forma y su interés radica en la cavidad hidrofóbica que se encuentra entre los dos monómeros, ya que, aunque los sitios catalíticos están altamente conservados, los aminoácidos de esta cavidad lo están menos, por lo que puede ser utilizada como diana de fármacos. La cavidad hidrofóbica está formada por 8 aminoácidos, de los cuales sólo 3 son idénticos en la TIM humana (Olivares-Illana et al., 2007).

Entre los compuestos más eficaces se encuentra el 6,6'-benzotiazol-2,2'-diamina, que tiene más afinidad por las TIM de tripanosomátidos que por la humana, y la ditiodianilina (DTDA), muy activa

frente a las formas epimastigotes del parásito, aunque a concentraciones altas es citotóxica (Olivares-Illana et al., 2007)

En estudios recientes se han probado más de 230 compuestos diferentes (Figura 10), entre los que se encuentran las 1,2,6-tiadiazinas, fenazinas 5,9-dióxidos y tiazoles, que presentaron mayor selectividad por la TcTIM que por la humana, siendo la segunda la que más eficacia ha tenido contra *T. cruzi* (Álvarez et al., 2010).

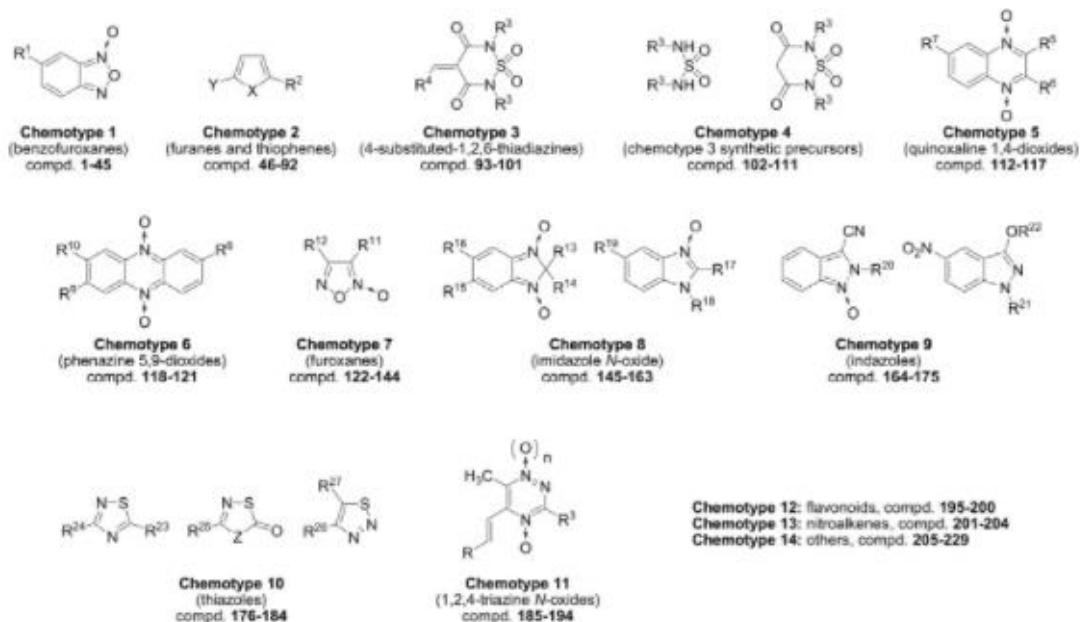


Figura 10. Grupos de compuestos que se han ensayado para inhibir la TcTIM, entre los que se encuentran las 1,2,6-tiadiazinas (quimiotipo 3), los fenazinas 5,9-dióxidos (quimiotipo 6) y los tiazoles (quimiotipo 10) (Álvarez et al., 2010).

Otros compuestos que han demostrado actividad específica frente a la la TcTIM han sido algunos derivados del carboxilato de brevifolina aislados de *Geranium bellum* Rose, una planta perenne de las montañas de Hidalgo en México, conocida localmente como “Pata de león” y empleada en la medicina tradicional mexicana para tratar la fiebre, el dolor y los trastornos gastrointestinales (Gayosso-De-Lucio et al. 2009). Los ensayos realizados por estos autores mostraron que estos compuestos son muy selectivos con respecto a la enzima del parásito, ya que no mostraron ningún efecto sobre la actividad del TIM humano incluso a concentraciones altas. Por tanto, los derivados del carboxilato de brevifolina podrían ser buenos candidato en la búsqueda de una nueva quimioterapia para el tratamiento de la enfermedad de Chagas (Figura 11).

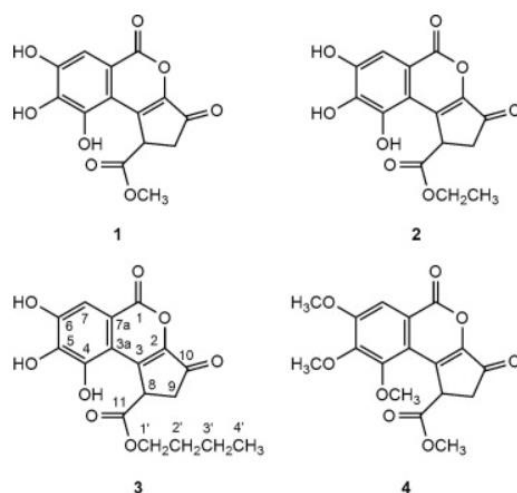


Figura 11. Compuestos derivados del brevifolin carboxilato que actúan inhibiendo la TcTIM. (1) metilbrevifolin carboxilato, (2) etilbrevifolin carboxilato, (3) butilbrevifolin carboxilato y (4) metil tri-O-metilbrevifolin carboxilato (Gayosso-De-Lucio et al., 2009).

6.1.3. Glicer aldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPHD)

La enzima GAPHD es la sexta enzima en la vía glucolítica, cataliza la reacción de fosforilación oxidativa del D-gliceraldehído-3-fosfato (GAP) en 1,3-bisfosfoglicerato (1,3BPGA) en presencia de NAD⁺ y fosfato inorgánico y juega un papel esencial en el control del flujo glucolítico (Lambeir et al., 1991; Bakker et al., 1999). Como los amastigotes intracelulares dependen predominantemente de la glucólisis para la producción de ATP, la inhibición de la GAPDH evitaría que *T. cruzi* aumente en población (Coura y De Castro, 2002; Kennedy et al., 2001).

Esta enzima en tripanosomátidos presenta diferencias respecto a la humana en el sitio de unión a NAD⁺. Aunque en ambos organismos la enzima posee una región en la cual se acomoda el grupo hidrofóbico N⁶ de la adenosina, la cavidad donde lo hace en la de tripanosomátidos es más hidrofóbica que en humanos como consecuencia de la sustitución de una valina en la posición 113 en la enzima humana, que corresponde a una leucina en la GAPDH de tripanosomátidos, por lo que compuestos análogos a la adenosina pueden bloquear de forma selectiva y competitiva la unión de NAD⁺ a la enzima de *T. cruzi* (Bressi et al., 2001).

Aronov et al. (1999), mediante ensayos *in vitro*, mostraron que un análogo de adenosina, el N6-(1-maftalenmetil)-2'-(3-clorobenzamida), inhibía el crecimiento de amastigotes. Diferentes investigadores han diseñado nuevos compuestos dirigidos a inhibir la GAPDH de *T. cruzi* evaluando su actividad frente al parásito (Tomazela et al., 2000; Maluf et al., 2013). Maluf et al. (2013) desarrollaron inhibidores competitivos basándose en estudios químico-físicos y bioquímicos de la estructura del sitio activo de la enzima y realizaron ensayos *in vitro* de inhibición del crecimiento de *T. cruzi* obteniendo resultados prometedores con algunas de las moléculas ensayadas pertenecientes a tres clases químicas diferentes (Figura 12). Otros compuestos obtenidos del extracto de la fruta de *Neoraptua magnifica* fueron ensayados por Tomazela et al. (2000) para inhibir esta enzima, siendo el flavonoide 3',4',5',5',7- pentametametoxiflavona el de mejores resultados (Figura 12).

Compound	ZINC code	Inhibition (%)
1	ZINC02105634	61 ± 1
2	ZINC02116233	0 ± 1
3	ZINC01066912	51 ± 1
4	ZINC02279303	6 ± 1
5	ZINC02100696	2 ± 2
6	ZINC02113485	1 ± 1
7	ZINC02154707	0 ± 1
8	ZINC0377283	0 ± 3
9	ZINC04278776	63 ± 4
10	ZINC02105670	0 ± 2
11	ZINC03865013	1 ± 4
12	ZINC02342223	0 ± 1
13	ZINC02426687	2 ± 3
14	ZINC04821118	1 ± 3
15	ZINC13081001	28 ± 3
16	ZINC039927050	0 ± 3
17	ZINC02471987	9 ± 2
18	ZINC00360239	10 ± 1
19	ZINC00852566	2 ± 2
20	ZINC00678560	1 ± 4
21	ZINC00308330	10 ± 1
22	ZINC00367727	1 ± 1
23	ZINC02832313	0 ± 1
24	ZINC00611293	23 ± 1
25	ZINC02858425	22 ± 1
26	ZINC02858925	3 ± 1
27	ZINC00386208	0 ± 1
28	ZINC00386210	2 ± 3
29	ZINC01061154	1 ± 2
30	ZINC04842725	0 ± 2
31	ZINC01424796	2 ± 1

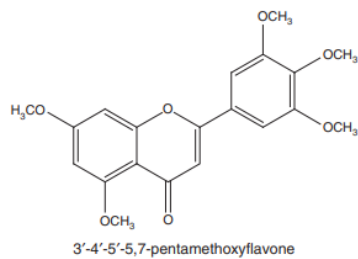
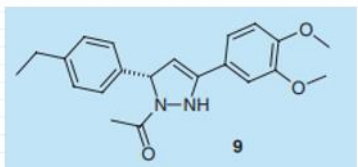
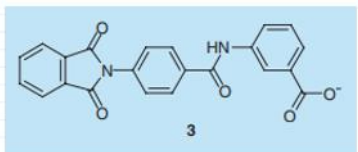
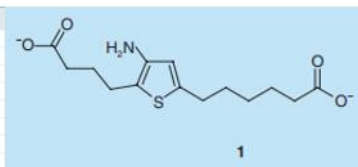


Figura 12. A la izquierda, 31 compuestos ensayados contra la TcGADPH, en el centro, tres de los compuestos ensayados con mejores porcentajes de inhibición de la enzima (Maluf et al., 2013) y a la derecha, el compuesto 3',4',5',5',7-pentametametoxiflavona, flavonoide que actúa inhibiendo la TcGADPH (Tomazela et al., 2000).

Puesto que el control de la infección es dependiente de la activación de macrófagos y de la producción de óxido nítrico (NO), con la consecuente destrucción del parásito, Silva et al. (2010) utilizaron compuestos de rutenio (Ru) que contienen donadores de NO para evaluar su acción *in vitro* e *in vivo* frente a diferentes formas del parásito y comprobar la eficacia para inhibir la actividad de la GAPDH de *T. cruzi*. Los resultados obtenidos mostraron que dichos compuestos de Ru mostraban actividad tripanocida frente a las formas epimastigotes y amastigotes. Así mismo, observaron una inhibición de la enzima GAPDH y propusieron que el mecanismo de acción podría ser por la S-nitrosilación de la cisteína 166 (Cys166) del sitio catalítico de la GAPDH de *T. cruzi*.

6.2. Tripanotión reductasa, enzima de tripanosomátidos

Las poliaminas y el glutatión (l-γ-glutamil-cisteinil-glicina, GSH) se encuentran en concentraciones milimolares en la mayoría de los sistemas biológicos. Se cree que las poliaminas son esenciales para la proliferación y diferenciación celular en la mayoría de los organismos (Marton y Pegg, 1995; Cohen, 1998). El GSH tiene un papel importante en varios procesos bioquímicos importantes, incluida la regulación del equilibrio tiol-redox intracelular y la defensa contra el daño inducido por oxidantes u otras sustancias químicas (Meister, 1981; Carmel-Harel y Storz, 2000). A diferencia de la mayoría de las células procariontas y eucariotas, en las que el principal componente tiol es el glutatión (GSH), los miembros del orden Kinetoplastida dependen de un conjugado glutatión-espermidina llamado tripanotión [N 1, N 8-bis (glutatiónil) espermidina] (Fairlamb y Cerami, 1985; Fairlamb et al., 1985) (Figura 13).

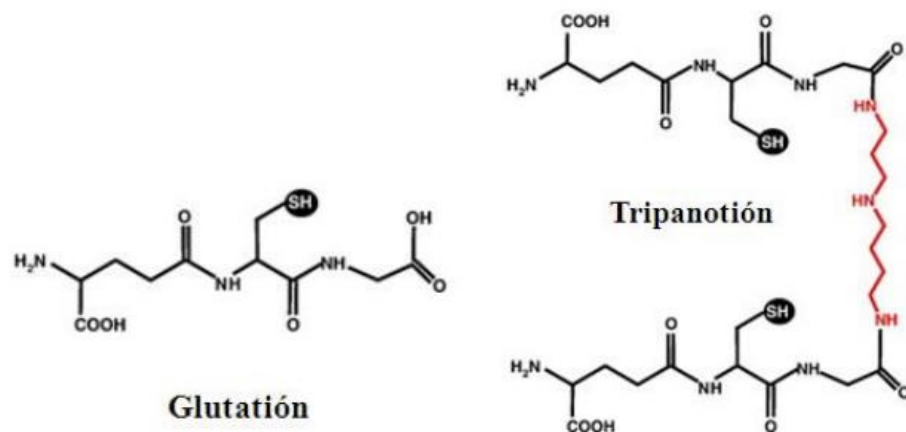


Figura 13. Estructuras moleculares de los tioles glutatión y tripanotión (Fiestas-Puppo, 2014).

En casi todos los organismos, el GSH y la glutatión reductasa (GR) participan en el mantenimiento del entorno reductor intracelular. Esto es importante para la reducción de disulfuros, la desintoxicación de hidroperóxidos y la síntesis de precursores de ADN (Penninckx y Elskens, 1993).

Los protozoos del orden Kinetoplastida carecen de glutatión reductasa (Souto y Zingales, 1993), además de que muchas de las funciones atribuidas al glutatión y la glutatión reductasa parecen haber sido asumidas por el tripanotión y por la tripanotión reductasa (TryR). (Tibayrenc et al., 1993; Souto et al., 1996). El tripanotión y la tripanotión reductasa proporcionan por tanto un entorno reductor intracelular que sustituye al sistema glutatión-glutatión reductasa.

TryR y la GR son miembros de la familia de la flavoproteína oxidoreductasa dependiente de NADPH. La TryR tiene un 35% de identidad de secuencia con la GR humana, ambas comparten propiedades físicas y químicas, sin embargo, su especificidad por los disulfuros para ser reducidos es diferente ya que TryR interacciona con formas oxidadas cargadas positivamente de conjugados glutatión-poliamina como T(SH)₂ y glutatiónespermedina, mientras que la GR sólo se une el glutatión oxidado (GSSG) cuya carga neta es negativa. Además, los tripanosomátidos patógenos también carecen de catalasa y glutatión peroxidasa, por lo que se espera que sean inusualmente dependientes del sistema de tripanotión para la defensa contra el estrés oxidativo. Esto convierte a TryR en un objetivo potencial atractivo para el diseño de nuevos agentes quimioterapéuticos (Krieger et al., 2000).

El grupo de inhibidores de la TryR más estudiado ha sido las poliaminas. Dentro de este grupo, Li et al. (2001) hallaron que, de los compuestos utilizados en sus ensayos, el inhibidor más potente era el derivado N1,N1,N4,N8,N12-penta(3-fenilpropil)espermina (Figura 14), y, aunque presenta una excelente actividad tripanocida *in vitro*, no se ha observado una clara correlación entre la inhibición enzimática y la actividad antiparasitaria. En concreto, se han llevado a cabo estudios observando resultados positivos con una importante reducción de la mortalidad causada por la enfermedad tanto en las fases aguda como crónica (Presti et al., 2015), siendo en este último caso, la fase crónica, donde existe mayor diferencia en los resultados obtenidos (Mendonça et al., 2018), lo que hace necesario continuar con las investigaciones.

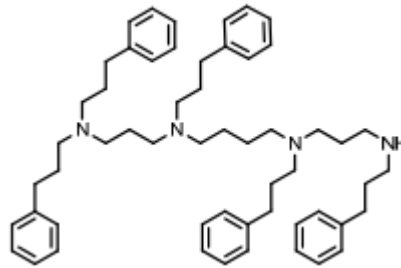


Figura 14. *N1,N1,N4,N8,N12-penta(3-phenilpropil)espermina, derivado de las poliaminas con potente actividad inhibitoria frente a la TryR (Mellognio et al., 2010).*

En la última década se ha desarrollado como estrategia alternativa la combinación de medicamentos. Se trata de identificar fármacos ya disponibles en el mercado y ver si la administración simultánea de dos o más fármacos con diferentes mecanismos de acción, diferentes especificidades frente a cepas de parásitos y diferentes dianas, y con menos efectos secundarios adversos podían optimizar el tratamiento. Así, con la clomipramina, que es un fármaco tricíclico utilizado en el tratamiento psiquiátrico y que se ha encontrado que inhabilita la TryR (Rivarola et al., 2005) y tiene pocos efectos secundarios, se han realizado ensayos de este tipo. Gobbi et al (2010) evaluaron el efecto de la asociación de clomipramina y alopurinol, un análogo de la hipoxantina que se incorpora al ARN bloqueando la síntesis *de novo* de purinas y que es efectivo en la eliminación de la parasitemia en pacientes en la fase crónica (Pérez-Mazliah et al., 2013). Esta combinación se usó en el tratamiento de la enfermedad de Chagas experimental en etapa aguda, obteniendo como resultado que hace el mismo efecto la administración de clomipramina sola que en combinación con alopurinol.

De igual manera Strauss et al. (2013) combinaron la clomipramina con el benzonidazol como una estrategia alternativa para mejorar la eficacia del tratamiento de la enfermedad de Chagas y disminuir los efectos adversos, obteniendo como resultado que la administración conjunta de ambos disminuía los efectos adversos respecto a la administración sola de benzonidazol.

6.3. Cruzipaína, proteasa específica de *T. cruzi*

Otra de las dianas terapéuticas más estudiadas, y exclusivas de *T. cruzi*, es la cruzipaína. Miembro de la superfamilia de la papaína, es la principal proteasa de *T. cruzi*. Es una cisteín-proteinasa lisosomal (aunque también se han localizado algunas isoformas minoritarias en la membrana plasmática o alguna que puede ser liberada al medio) (Parussini et al., 1998; Cazzulo et al., 2001), presente en todas las formas morfológicas del parásito, aunque en los epimastigotes se encuentra a una concentración bastante superior. La enzima está codificada por numerosos genes polimórficos, colocados en serie y separados por espacios intergénicos de algo más de 400 pares de bases. Estas series ("tándems") se encuentran ubicadas, según la cepa o clon del parásito, en dos o cuatro cromosomas diferentes. Esta variabilidad genética da lugar a diversas isoformas, algunas de las cuales presentan variaciones no conservativas en la secuencia de aminoácidos que influyen en la especificidad de la enzima. Probablemente la diferente composición de las isoformas entre las cepas y entre las diferentes formas morfológicas del ciclo de vida del parásito podría ser una de las causas para las

variaciones observadas en la susceptibilidad a diferentes inhibidores de la cruzipaina (Lima et al., 2001).

En la proteína sintetizada se distinguen cuatro partes bien diferenciadas: un péptido señal de 18 aminoácidos, que se pierde al entrar la enzima naciente al retículo endoplásmico; un dominio propéptido de 104 aminoácidos que, como en otras proteinasas, sería esencial para el plegamiento correcto de la enzima madura y la mantendría inhibida, hasta que se separa proteolíticamente, probablemente al activarse el lisosoma; una parte catalítica de 214 aminoácidos, altamente homóloga a las catepsinas S y L de mamífero y, en menor grado, a la papaína, formado a su vez por dos dominios que dejan entre ellos el surco correspondiente al sitio activo; y un dominio C-terminal de 130 aminoácidos, que caracteriza a las cisteína proteinasas de Tipo I de los tripanosomátidos y con un alto poder inmunogénico (Cazzulo, 1999; Rudenskaya y Pupov, 2008; Klemba y Godberg, 2002).

La enzima es un factor de virulencia importante y un antígeno inmunodominante en la enfermedad de Chagas crónica humana. Parece ser fundamental en la relación huésped/parásito, ya que participa en varios pasos cruciales como son la invasión celular, y la supervivencia, diferenciación y multiplicación del parásito dentro de la célula (Bonaldo et al., 1991). Más recientemente, se descubrió que la cruzipaina también participa en la movilización de los receptores de endotelina durante la invasión del músculo liso (Uehara et al., 2012). Además, la cruzipaina puede intervenir en el escape del parásito de la respuesta inmune adaptativa de todas las subclases de IgG humanas. Esta enzima participa también en los procesos de diferenciación que llevan de una fase a otra en el ciclo de vida del parásito, debido a que inhibe la apoptosis de la célula hospedadora y además estimula la producción de arginasa-2, que se metaboliza a putrescina, lo cual se relaciona con la diferenciación celular y favorece el crecimiento del parásito dentro de las células infectadas (Aoki et al., 2004). La participación de la cruzipaina en el proceso de metaciclologénesis ha sido demostrada indirectamente por varios enfoques. Salas-Sarduy et al. (2017) también demostraron el papel destacado de la cruzipaina en la interacción del parásito con el huésped invertebrado mediante el estudio de inhibidores reversibles, de los cuales 404 compuestos de descubrimiento reciente con una alta diversidad estructural han resultado prometedores con una alta potencia antiparasitaria frente a *T. cruzi in vitro*. Los ensayos de Cazzulo et al. (2002) además mostraron que inhibidores de la cruzipaina provocaban la eliminación de los parásitos y curaban a los ratones infectados.

Uno de los inhibidores más estudiados, el K777, resulta efectivo para curar infecciones por *T. cruzi* en ratones de infección aguda y no aguda (Figura 15). De igual manera tiene un efecto importante en la disminución del daño cardíaco en perros. Utilizando estos modelos se pudo determinar la dosis que puede ser usada en el humano para implantar un régimen terapéutico, pero en el 2005 se detuvieron los estudios debido a que tenía altos niveles de toxicidad (Ferreira y Andricopulo, 2017).

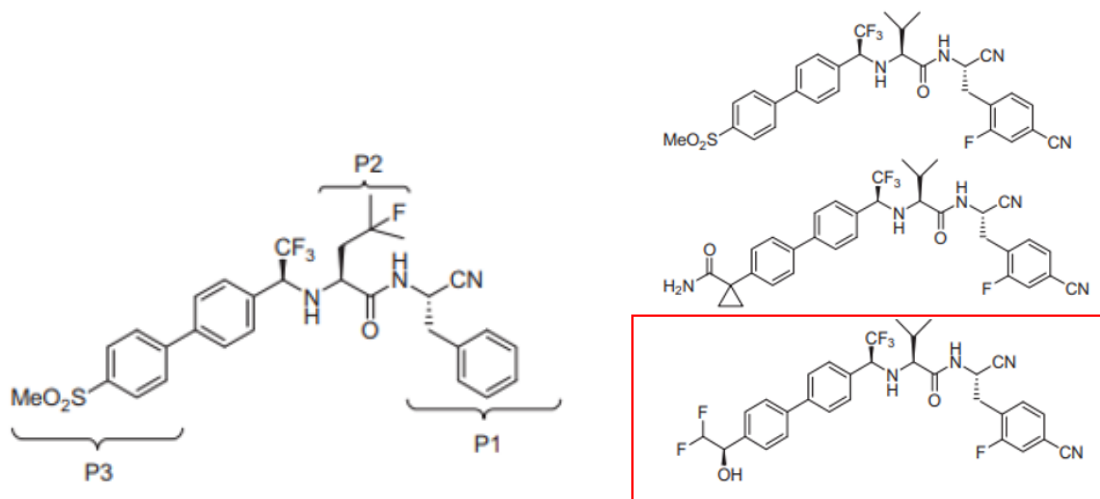


Figura 16. A la izquierda, esqueleto de inhibidores reversibles de la cruzipaina con 3 porciones P1, P2 y P3 que equivalen a sustituyentes diferentes. A la derecha, tres de los inhibidores reversibles más potentes contra la cruzipaina, de los cuales el del recuadro rojo es el que mejores resultados ha dado (Beaulieu et al., 2010).

Los resultados obtenidos por Beaulieu et al. (2010) han servido para el desarrollo de otros inhibidores, cuyo estudio *in vivo* en modelos animales han dado resultados prometedores, observando una reducción en la concentración del parásito en sangre de ratones infectados similar e incluso superior a la obtenida mediante benznidazol (Ndao et al., 2014; Avelar et al., 2015), siendo el principal problema encontrado el reducido tiempo de vida de estos compuestos en el organismo. Es por ello por lo que, en la actualidad, se trabaja para encontrar nuevos inhibidores variando los sustituyentes estudiados (Álvarez et al. 2020).

Recientemente, el estudio de fármacos guiado por ordenador condujo al descubrimiento de los efectos tripanocidas de la clofazimina y la benidipina. Estos compuestos mostraron efectos inhibidores sobre la cruzipaina de *T. cruzi*, de diferentes estadios del parásito y en un modelo murino de enfermedad de Chagas aguda. Sbaraglini et al. (2016) determinaron la eficacia de estos inhibidores de la cruzipaina cuando se administraron en un modelo murino de enfermedad de Chagas crónica. Ambos compuestos consiguieron reducir la carga de parásitos en los músculos cardíacos y esqueléticos de los ratones infectados crónicamente en comparación con los ratones no tratados, así como disminuir el proceso inflamatorio en estos tejidos.

6.4. Ruta de biosíntesis del ergosterol

La investigación durante las últimas dos décadas ha demostrado de manera consistente que *T. cruzi*, como la mayoría de los hongos y levaduras, requiere esteroides específicos para la viabilidad y proliferación celular en todas las etapas de su ciclo de vida. Gracias a importantes estudios bioquímicos se sabe que los tripanosomátidos sintetizan ergosterol en lugar de colesterol, con lo cual, la vía de síntesis del ergosterol se considera una ruta metabólica que puede ser una diana importante para el diseño de fármacos antiparasitarios (Hudock et al., 2006). Varios estudios demostraron que algunos inhibidores de la biosíntesis del ergosterol disponibles comercialmente, que son muy exitosos para el tratamiento de enfermedades fúngicas (como ketoconazol, itraconazol o terbinafina), tenían efectos

supresores, pero no curativos, contra las infecciones por *T. cruzi* en humanos o animales de experimentación y no pueden detener la progresión de la enfermedad (Urbina, 2002; Urbina y Docampo, 2003). Estudios posteriores con nuevos derivados de triazol y posaconazol, como el albaconazol y el variconazol (Sales-Junior et al., 2017), los cuales son inhibidores potentes y selectivos de hongos, indujeron una cura parasitológica radical en modelos murinos de enfermedad de Chagas aguda y crónica (Urbina, 2009). Estos fueron los primeros compuestos de los que se informó que mostraron actividad curativa en ambas formas de la enfermedad. Además, tales compuestos fueron efectivos en ratones infectados con cepas de *T. cruzi* resistentes al nitrofurano y nitroimidazol, incluso si los huéspedes estaban inmunosuprimidos (Urbina, 2002; Urbina y Docampo, 2003).

En la ruta de síntesis de esteroides de tripanosomátidos (Figura 17) se producen unas clases especiales de esteroides, entre los que se incluyen el ergosterol y otros 24 metil-esteroides que son importantes para el crecimiento y viabilidad de los parásitos y que además no se encuentran en el hospedador mamífero. Existen muchos fármacos que interfieren la ruta de biosíntesis de esteroides, incluso algunos de ellos se utilizan para disminuir los niveles de colesterol en los humanos (Urbina, 2009). Los fármacos actúan sobre diferentes enzimas de la ruta de síntesis del ergosterol, siendo importantes aquellos que inhiben la síntesis final de estos esteroides y que no afectan a la ruta en humanos.

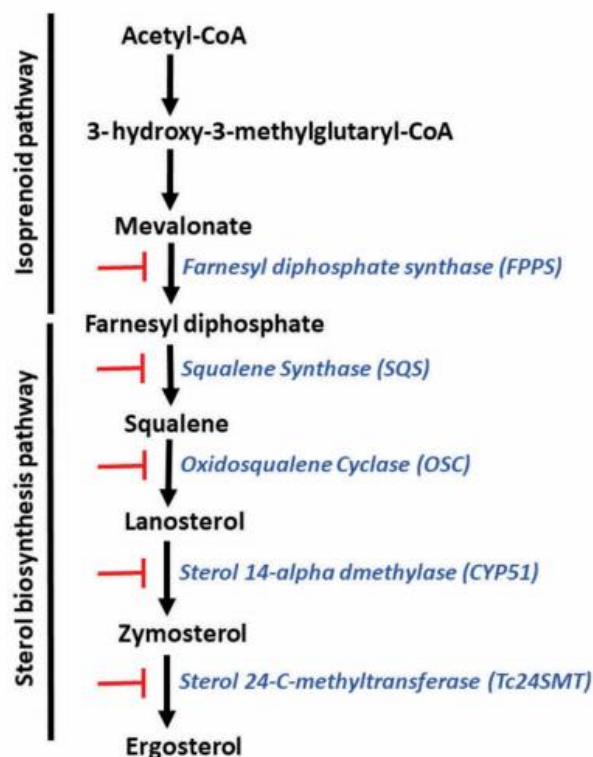


Figura 17. Ruta de biosíntesis del ergosterol (Villalta y Rachakonda, 2019).

6.4.1. Inhibidores de la escualeno epoxidasa

Las alilaminas, inhibidores de la escualeno epoxidasa, de las cuales el principal ejemplo es la terbinafina, es un inhibidor comercial con actividad antimicótica que bloquea la actividad de esta

enzima con la consecuente disminución del ergosterol (Urbina, 2009). Otro ejemplo son los azosteroles que inhiben a la esterol aminotransferasa, sin embargo, se ha demostrado que estos compuestos tienen efectos supresores, pero no curativos, en infecciones de *T. cruzi* en humanos y animales de experimentación, y son incapaces de detener la progresión de la enfermedad (Urbina, 2002).

6.4.2. Inhibidores de la lanosterol sintasa

La lanosterol sintasa (oxidoescualeno ciclasa (OSC)) también se ha observado como una buena diana terapéutica en *T. cruzi*. Se han ensayado compuestos *in vitro* que bloquean la actividad de esta enzima, como la amiodarona, utilizado como antiarrítmico en la enfermedad de Chagas crónica, que con la acción combinada con el posaconazol ha tenido efectos sinérgicos, bloqueando la homeostasis del Ca^{2+} y bloqueando la síntesis *de novo* del ergosterol a nivel de la OSC (Benaim et al., 2006; Urbina, 2009).

6.4.3. Inhibidores de la C14 α -lanosterol desmetilasa (CYP51)

Estudios recientes, basados en ensayos de edición de genes con CRISPR-Cas9 han demostrado que esta enzima es esencial para la viabilidad del parásito (Soares et al. 2017). En los últimos años se han desarrollado nuevos derivados triazólicos como el D0870 y el posaconazol (POS) (Figura 18), usados en el mercado como antifúngicos, que actúan como inhibidores selectivos del citocromo P450 dependiente de la C14 α -lanosterol desmetilasa (CYP51), enzima que cataliza la conversión de lanosterol a ergosterol (Urbina, 2009), y en los cuales se ha encontrado que tienen actividad antiparasitaria en ratones tanto en su fase aguda como crónica (Urbina y Docampo, 2003). Además, estos compuestos son capaces de actuar frente a las cepas resistentes para nitrofurano y nitroimidazol de *T. cruzi* en ratones infectados. En concreto, el POS se presenta como uno de los compuestos más prometedores frente a la tripanosomiasis americana. Así, este ha demostrado en modelos animales una efectividad similar a la del benznidazol (Molina et al., 2000), siendo, a diferencia de este, bien tolerado, observándose síntomas gastrointestinales de forma ocasional y, en raras ocasiones, insuficiencia renal (Loup et al., 2011). El POS fue registrado en el 2005 en la Unión Europea y en Australia como alternativa en el tratamiento y en 2006 en los Estados Unidos de América para ser usado en la profilaxis de infecciones fúngicas; en el 2010 comenzaron los estudios clínicos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas, convirtiéndose en el primer fármaco diseñado racionalmente que se encuentra en estudios clínicos para el tratamiento de esta enfermedad (García-Torres y Pérez-Montfort, 2011). Sin embargo, los resultados de este estudio concluyeron que el posaconazol era efectivo en enfermos asintomáticos únicamente a corto plazo, no manteniéndose su efecto. Además, se observó que el tratamiento únicamente con posaconazol presentaba una eficacia mucho más reducida (13,3%) respecto al tratamiento combinado con benznidazol (80%) y el tratamiento sólo con benznidazol (86%). En lo referente a efectos adversos, los pacientes con tratamiento combinado presentaron efectos secundarios similares al tratamiento únicamente con benznidazol, por lo tanto, son necesarios futuros estudios hasta que el POS pueda usarse como tratamiento efectivo (Morillo et al., 2017).

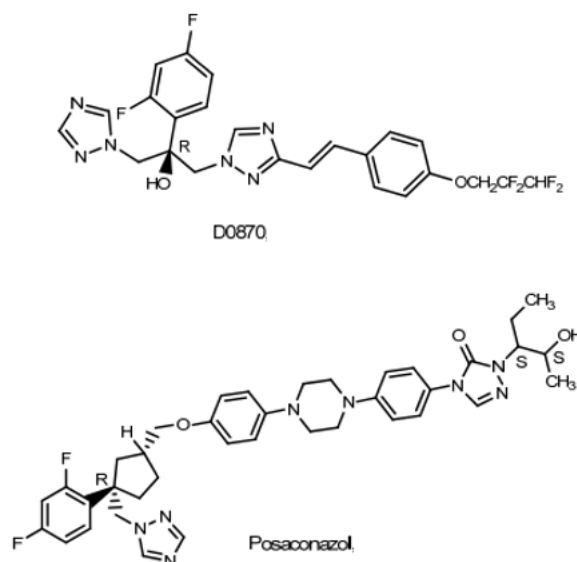


Figura 18. Inhibidores de la biosíntesis de esteroides con actividad anti-*T. cruzi* que inhiben el citocromo P450 dependiente de la C14 α -lanosterol desmetilasa (CYP51) (Mellognio et al., 2010).

Algunos otros triazoles como el TAK-187, el UR-9825 y el ravuconazol, inhibidores selectivos del citocromo P450 dependiente de la C14 α -lanosterol desmetilasa (CYP51), presentaron actividad tripanosomacida tanto *in vitro* como *in vivo*. El más efectivo de los tres era el TAK-187, que era capaz de curar la enfermedad en sus dos fases, aún en las cepas resistentes a nitrofurano y nitroimidazol. (Urbina et al., 2003a). En estudios posteriores, el compuesto ravuconazol ha dado mejores resultados, llegando a fase II en estudios clínicos, mientras que el TAK-187 no ha pasado de estudios *in vivo* (Sales-Junior et al., 2017).

Otro compuesto, el fenarimol, es utilizado como fungicida en plantas y ha sido tomado como base para la elaboración de análogos que han demostrado una importante actividad antiparasitaria que inhibe la CYP51. Así, estos han mostrado reducir la concentración de formas parasitarias en el plasma celular de ratones (Keenan et al., 2012), pudiendo llegar incluso a curar la enfermedad (Keenan et al., 2013).

6.4.4. Inhibidores de la escualeno sintasa (SQS)

Otra clase de compuestos que interfieren en la biosíntesis de esteroides son los inhibidores de la escualeno sintasa (SQS). La SQS es una enzima asociada a membrana que cataliza el primer paso en la biosíntesis del esteroide. Utilizando 3-(bifenilo-4-il)-3-hidroxiquinuclidina (BPQ-OH) (Figura 19), un inhibidor de la SQS de mamíferos, también se ha demostrado que actúa como inhibidor no competitivo de la SQS de los parásitos, inhibiendo su crecimiento y produciendo la lisis celular de estos debido al agotamiento total de escualeno y esteroides, ya que no pueden llevar a cabo la síntesis *de novo* de ellos. La reducción de los esteroides hace que los parásitos pierdan totalmente su viabilidad por no poder utilizar el colesterol exógeno, al contrario que las células del mamífero. Por eso, aunque se vea bloqueada la actividad de las SQS del mamífero, tiene la capacidad de sintetizar *de novo* colesterol, mientras que el parásito no tiene manera de compensar la biosíntesis de ergosterol por el bloqueo por

parte del BPQ-OH. Todo ello hace de la SQS una diana terapéutica de gran interés frente a *T. cruzi* (Urbina et al., 2002).

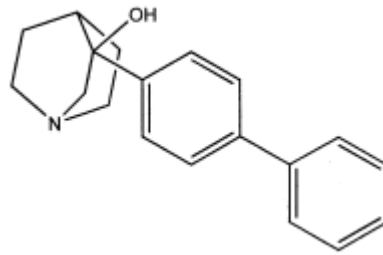


Figura 19. Estructura química del 3-(bifenilo-4-il)-3-hidroxiquinuclidina (BPQ-OH) (Urbina et al., 2002).

Otra forma para bloquear la escualeno sintasa solo de tripanosomátidos es la búsqueda de compuestos inhibidores altamente específicos de la misma. Se ha observado que el compuesto WC-9 (4-fenoxifenoxietil tiocianato) actúa inhibiendo selectivamente la SQS de *T. cruzi*, con el correspondiente bloqueo de la biosíntesis *de novo* y el agotamiento de los esteroides endógenos esenciales para la vida del parásito, dando como resultados la inhibición del crecimiento de epimastigotes (Urbina et al., 2003b).

Otros compuestos que se han ensayado contra esta diana son el E5700 y el ER-119884, dos inhibidores de la SQS que se están estudiando como agentes para disminuir el colesterol y los triglicéridos en humanos y que han tenido una potente actividad anti-*T. cruzi* en ensayos *in vitro*. El primero de ellos proporciona una protección completa contra el parásito en ensayos con ratones tomado mediante vía oral. Estos compuestos también bloquean la SQS humana, pero esto es compensado como ocurría con el BPQ-OH (Urbina, 2009).

6.5. Dianas en los mecanismos de regulación del calcio

El calcio, al igual que el ATP y el PPI, tiene un papel importante en la generación de energía. Es necesario el mantenimiento de baja concentración de este ion en el citoplasma, por lo que numerosos mecanismos están implicados en la homeostasis de este, lo cual requiere la acción de los acidocalcisomas, el retículo endoplasmático y la mitocondria (Figura 20), teniendo este último, junto al acidocalcisoma, papeles importantes en la producción de energía (Urbina y Docampo, 2003; Benaim et al., 2020), siendo ambos importantes para la búsqueda de fármacos que actúan inhibiendo sus funciones.

El Ca^{2+} es un ion con funciones importantes y esenciales en todas las células eucariotas y mantener su homeostasis es fundamental para su supervivencia. La diferencia entre las concentraciones intracelulares y extracelulares es mucho mayor para Ca^{2+} que para cualquier otro ion normalmente presente dentro de las células (por ejemplo, Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , H^+). Mantener esta diferencia de concentración está asociado a un elevado coste energético. Sin embargo, a lo largo de la evolución, las células se han aprovechado de este gran gradiente electroquímico de Ca^{2+} para utilizarlo como un mensajero de señalización, esencial en todas las células eucariotas incluidas las de los protozoos tripanosomátidos (Schoijet et al., 2019; Docampo y Huang, 2015). La alteración de la homeostasis del

Ca²⁺ intracelular por cualquier medio es letal para todas las células de mamíferos, ya que es un factor que conduce a procesos apoptóticos o necrosis, y parece ser también el caso de los tripanosomátidos (Benaim y García, 2011), incluido *T. cruzi*.

Las funciones del Ca²⁺ en los tripanosomátidos como mensajero intracelular son muy diversas. En algunos tripanosomátidos se ha visto que juega un papel importante en la infectividad, aumentando su capacidad para invadir las células huésped. En el caso de *T. cruzi*, los tripomastigotes del torrente sanguíneo invaden las células a través de un conjunto de interacciones mediadas por Ca²⁺ que desencadenan una cascada de señalización tanto en la célula huésped como en el parásito (Cortez et al., 2003; Walker et al., 2014). También hay evidencias de que la señalización de Ca²⁺ influye en la diferenciación de epimastigotes de *T. cruzi* en tripomastigotes metacíclicos (Lammel et al., 1996) y participa en la osmorregulación (Docampo y Huang, 2015), y en las rutas de transducción del óxido nítrico (Paveto et al., 1995).

La fluctuación de la concentración de Ca²⁺ intracelular ([Ca²⁺]_i) está perfectamente regulada por diversos mecanismos a nivel de la membrana plasmática y de ciertos orgánulos intracelulares. Se ha demostrado que existen diferencias importantes en los diversos mecanismos responsables de la regulación de [Ca²⁺]_i en los tripanosomátidos y los de la contraparte del hospedador. Aprovechando estas diferencias se han identificado nuevas dianas terapéuticas en el parásito. En el tripanosomátido, la regulación del Ca²⁺ intracelular requiere la acción concertada de tres orgánulos intracelulares, el retículo endoplásmico, la mitocondria única y los acidocalcisomas. La mitocondria única y los acidocalcisomas también juegan un papel central en la bioenergética del parásito. Los acidocalcisomas son vacuolas ácidas cargadas con Ca²⁺, polifosfatos y otros iones, que son esenciales para la viabilidad en tripanosomátidos, pero que solo están presentes en células especializadas (por ejemplo, plaquetas, mastocitos, basófilos) en humanos (Patel y Docampo, 2010). En consecuencia, los acidocalcisomas se consideran un objetivo potencial para la acción de los fármacos contra estos parásitos (Figura 20). Las mitocondrias pueden acumular Ca²⁺ en grandes cantidades, a través de un uniportador mitocondrial de Ca²⁺ (MCU) que utiliza el gradiente electroquímico de H⁺ a través de la membrana mitocondrial interna (De Stefani et al., 2011) para disipar energía a medida que se acumula Ca²⁺ (Figura 20). Este MCU es muy conservado y está presente en todas las mitocondrias descritas hasta ahora, incluida la mitocondria única tripanosomátida (Docampo y Vercesi, 1989; Benaim et al., 1990).

Diversos estudios han puesto de manifiesto que el MCU en *T. cruzi* posee dos subunidades adicionales que no se encuentran en mamíferos, llamados TcMCUc y TcMCUd, que son esenciales para la captación de Ca²⁺ mitocondrial (Huang y Docampo, 2018). Dado que TcMCUc y TcMCUd no están presentes en mamíferos y son de gran importancia en varias funciones en *T. cruzi*, principalmente relacionadas con su bioenergética, representan una atractiva diana farmacológica alternativa contra estos parásitos (Bertolini et al., 2019).

El retículo endoplásmico que posee una bomba de Ca²⁺, Ca²⁺-ATPasa (SERCA), acumula grandes cantidades de Ca²⁺ al transportar el catión a expensas de la hidrólisis del ATP, y tiene una alta afinidad por Ca²⁺ (Benaim y García, 2011), lo que permite una alta concentración del ion dentro de este orgánulo, similar al medio extracelular (es decir, alrededor de 2 mM) (Figura 20).

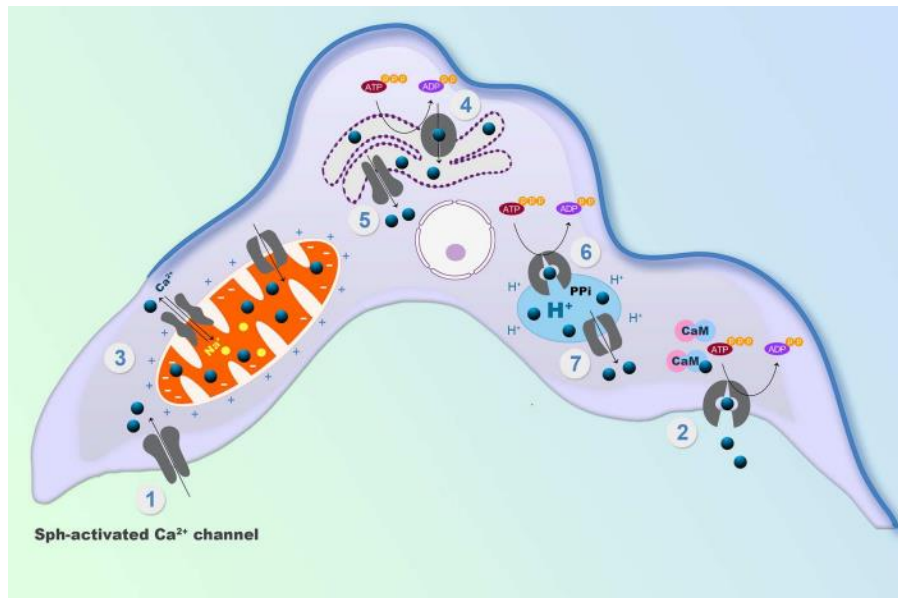


Figura 20. Representación del mecanismo de regulación del Ca^{2+} intracelular en *Trypanosoma cruzi*. (1) Canal de Ca^{2+} activado por esfingosina, responsable de la entrada del Ca^{2+} . (2) Bomba de Ca^{2+} regulada por calmodulina de la membrana plasmática, responsable de la salida de Ca^{2+} . (3) Uniporte de Ca^{2+} mitocondrial (MCU) y bomba $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de la mitocondria del parásito. (4) Bomba de Ca^{2+} tipo SERCA del retículo endoplasmático. (5) Canal de Ca^{2+} de salida del catión de retículo endoplasmático. (6) Ca^{2+} -ATPasa tipo PMCA, responsable de la acumulación de Ca^{2+} en los acidocalcisomas. (7) Receptor IP_3 para la salida de Ca^{2+} del acidocalcisoma hacia el citoplasma (Benaim et al., 2020).

6.5.1. Regulación del calcio en la mitocondria

Numerosos fármacos se han probado para modular el mecanismo de regulación del Ca^{2+} , como la amiodarona y sus derivados (Figura 21), que han presentado efectos antiparasitarios. En concreto, la amiodarona, que es utilizada en la actualidad como medicamento frente a las arritmias consecuencia de la enfermedad de Chagas, ha demostrado también una importante actividad antiparasitaria ligada a la alteración de dos procesos clave. Así, esta tiene un importante efecto sobre la homeostasis del Ca^{2+} al provocar un aumento en la concentración citoplasmática del parásito actuando sobre los canales de calcio de la mitocondria, lo que hace colapsar el potencial de membrana mitocondrial (Benaim et al., 2020) además de como agente inhibidor de la ruta de formación de ergosterol (Benaim et al., 2006). Junto a la amiodarona, también se ha investigado la eficacia de la dronedarona, un derivado de la amiodarona, que también bloquea la homeostasis del Ca^{2+} . El estudio *in vitro* de ambas ha permitido observar que provocan alteraciones en la membrana y el cinetoplasto, pudiendo, por la acción de la dronedarona, afectar incluso a otros canales iónicos, por lo que se plantea el uso conjunto de ambas para el tratamiento de la enfermedad (Benaim et al., 2012). Además, se han desarrollado estudios *in vivo* en perros donde se ha comprobado la eficacia del tratamiento combinado de amiodarona junto a inhibidores de la síntesis de ergosterol, con resultados positivos (Madigan et al., 2019).

El mismo mecanismo se ha observado para los fármacos SQ109 y miltefosina, que se ha visto que también afecta a la homeostasis del Ca^{2+} de los acidocalcisomas (Benaim et al., 2020).

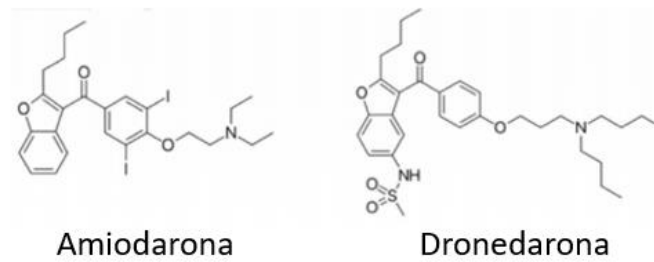


Figura 21. Estructura molecular de los fármacos amiodarona, y su derivado, dronedarona, que bloquean la homeostasis del Ca^{2+} y colapsan el potencial de membrana mitocondrial de *T. cruzi* (Benaim et al., 2020).

La utilización del sistema CRISPR/Cas9 en la investigación de la biología de *T. cruzi* (Bertolini et al., 2019) ha permitido la reciente identificación de una piruvato fosfato deshidrogenasa mitocondrial (TcPDP) que es sensible a la concentración fisiológica de Ca^{2+} y es capaz de estimular la actividad de una piruvato deshidrogenasa mitocondrial, estimulando el metabolismo energético a través de la activación del ciclo de Krebs. Esto ha proporcionado más información sobre el papel del Ca^{2+} en la bioenergética de *T. cruzi*. Se demostró también que la actividad de esta enzima es necesaria para el crecimiento, la diferenciación y la infectividad de *T. cruzi* (Lander et al., 2018).

6.5.2. Regulación del calcio en los acidocalcisomas

Los acidocalcisomas presentan diferentes transportadores para el intercambio de Ca^{2+} y otros cationes, como H^+ -ATPasas de tipo vacuolar y Ca^{2+} -ATPasas similares a las de la membrana plasmática (PMCA). Estos orgánulos también poseen bombas de protones de tipo pirofosfatasa (H^+ -PPasa), que permiten la acumulación de H^+ en el orgánulo. Dentro del orgánulo se encuentran acumulados ortofosfatos (P_i), polifosfatos y pirofosfatos (PP_i); estos últimos muy importantes para el parásito debido a que, a diferencia de las células hospedadoras que dependen de la hidrólisis del ATP, estos pueden utilizar el PP_i como método de obtención de energía alternativa (Docampo y Huang, 2015). El uso de bisfosfonatos (Figura 22), análogos de pirofosfatos inorgánicos, se usan como tratamiento para la reabsorción de calcio en huesos, pero también se ha observado que inhiben las enzimas relacionadas con reacciones con pirofosfatos orgánicos e inorgánicos como la farnesil-pirofosfato sintasa, la escualeno sintasa o pirofosfatasas. Estos compuestos, como el risedronato, el pamidronato y el ibandronato, tienen una potente actividad y selectividad contra *T. cruzi* según algunos ensayos que se han hecho *in vitro* e *in vivo* (Urbina y Docampo, 2003).

Más recientemente, se ha demostrado que un nuevo derivado de benzofurano con un diseño de construcción basado en la estructura de amiodarona (amioder) muestra un efecto potente sobre epimastigotes y amastigotes infectados con células de *T. cruzi* (Pinto-Martínez et al., 2018). Como era de esperar, el mecanismo de acción fue similar al de la amiodarona, provocando un aumento del $[\text{Ca}^{2+}]_i$, colapsando el potencial de membrana electroquímica de la mitocondria y alcalinizando los acidocalcisomas del parásito.

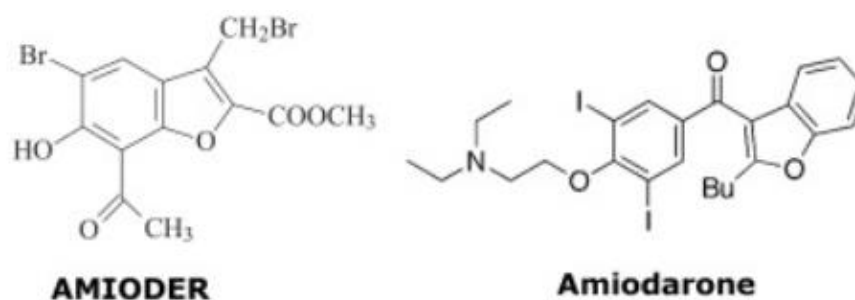


Figura 22. Estructuras químicas de la amiodarona y el amioder, un derivado de benzofurano con diseño basado en la estructura de la amiodarona (Pinto-Martínez et al., 2018).

Las H⁺-PPasas, que también se encuentran en la membrana plasmática y en el aparato de Golgi, pueden ser bloqueadas por análogos de pirofosfatos como el aminometilendifosfonato y el imidodifosfato (Benaim et al., 2020). En mamíferos, hay al menos dos canales de Ca²⁺ en el retículo endoplasmático, el receptor inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃R) y el receptor ryanodina (RyR), que permiten el paso de Ca²⁺ al citoplasma. IP₃R es modulado por IP₃, en cambio, en tripanosomátidos, el IP₃R se encuentra en el acidocalcisoma, no en el retículo endoplasmático, y es totalmente funcional en presencia de IP₃ (Hashimoto et al., 2013). Debido a que el IP₃R, que es regulado mediante una cascada de señales mediadas por Ca²⁺, es importante en muchos procesos celulares del parásito como la transformación y replicación en sus diferentes etapas de vida, el uso de inhibidores de este receptor podría ser una diana importante para fármacos (Lander et al., 2016; Benaim et al., 2020).

6.6. Otras dianas terapéuticas

6.6.1. Quinasas dependientes de ciclinas

Las proteín-quinasas (PK) regulan gran variedad de eventos celulares. Estas enzimas se han clasificado en siete grandes grupos para facilitar su estudio, de los cuales el más abundante en los tripanosomátidos es la familia de las CMGC, cuyo nombre proviene de las iniciales de las quinasas a las que integra: las quinasas dependientes de ciclina (CDK), las quinasas activadas por mitógeno (MAPquinasas), las glucógeno sintasas quinasas (GSK) y las quinasas con actividad parecida a las CDK (CDK-like). La actividad de las CDK en *T. cruzi* está regulada por ciclinas por fosforilación, de igual forma que en el humano (Naula et al., 2005). Cabe destacar la acción de los derivados del purvalanol B, los cuales son inhibidores de la quinasa CDK1 de *T. cruzi*, que, aunque también está presente en el mamífero, la afinidad de la enzima del parásito por estos compuestos es muy superior a la afinidad que muestra la del mamífero, lo que define a la CDK1 de *T. cruzi* como una diana importante para el desarrollo de nuevos fármacos (Knockaert et al., 2000).

Trabajos recientes han experimentado con un compuesto llamado paullone, que consiste en moléculas híbridas de calcona (cetona aromática) y que actúa directamente sobre el parásito inhibiendo ciclinas dependientes de quinasas, consiguiendo una mayor selectividad y eliminando efectos adversos en un porcentaje no despreciable (Vickers, 2017).

6.6.2. Topoisomerasas

Varios estudios han identificado también las ADN topoisomerasas como dianas farmacológicas. Estas enzimas, capaces de realizar cortes monocatenarios (tipo I) o bicatenarios (tipo II), presentan una función vital para la correcta replicación, transcripción y recombinación del DNA. Así, estas han sido objeto de estudio para el tratamiento de enfermedades parasitarias desde hace años. En concreto, se han estudiado las diferencias entre las topoisomerasas del mamífero y el protozoo, poniendo un especial énfasis en las características específicas de aquellas ligadas al DNA del cinetoplasto (Cerecetto y González, 2002). Se han caracterizado tres tipos de ADN topoisomerasas en función de sus propiedades catalíticas, gasto energético y estructura de su proteína: las ADN topoisomerasas de tipo I (TOPI, subtipos IA y IB) y las ADN topoisomerasas de tipo II (TOPII). Las TOPII generan cambios topológicos complejos del ADN (relajación, desanudado y desencadenado) mediante la ruptura transitoria de las dos cadenas de la doble hélice, mientras que las TOPI rompen sólo una de las hebras del ADN y únicamente permiten relajar el ADN superenrollado. La anulación de las TOPII produce la pérdida del cinetoplasto y la consecuente muerte del parásito, mientras que el silenciamiento de cualquiera de las subunidades de la TOPI origina pérdida de viabilidad, y, por tanto, la imposibilidad de continuar el desarrollo de *T. cruzi*, siendo por tanto ambas esenciales la supervivencia de estos parásitos (Deterding et al., 2005).

Las importantes diferencias estructurales entre las ADN topoisomerasas de tipo I de tripanosomátidos con respecto a sus homólogas de mamíferos las hacen interesantes para actuar como dianas terapéuticas, ya que poseen una estructura dimérica, filogenéticamente única de la enzima de tripanosomátidos, y además tienen una localización dual, asociada tanto al ADN genómico como al ADN de cinetoplasto (Reguera et al., 2007). Se han estudiado compuestos inhibidores para las TOPI, que son las que difieren en estructura respecto a las de los mamíferos, clasificando los compuestos según si estabilizan el complejo de escisión entre la enzima y el ADN (clase I) o si interfieren en sus funciones catalíticas (clase II) (Capranico et al., 2004; Reguera et al., 2007). La camptotecina (CPT) pertenece a los compuestos de clase I (Figura 23). Es un potente inhibidor no competitivo que establece un complejo irreversible junto al ADN mellado (complejo de escisión) que no puede ser reparado de nuevo por la topoisomerasa. Como consecuencia, se producen mellas en aquellas zonas del genoma que estén replicándose en ese momento, lo que provoca la muerte de la célula si no se induce la reparación de estas (Sriram et al., 2005). Debido a sus prometedores efectos, se han realizado estudios *in vitro* para determinar su potencial actividad anti-*T. cruzi*, encontrando que la proliferación celular se ve detenida e incluso se reducen el número de parásitos 48 horas tras la incorporación de la camptotecina al medio. En las células, además, se podía observar un menor empaquetamiento de la cromatina, lo que confirma los efectos de este compuesto sobre el material genético (Zuma et al., 2014). Zuma et al., 2014 probaron también que tanto la camptotecina como la rebeccamicina fueron los compuestos más efectivos inhibiendo la TOPI, mientras que el mitoxantron fue efectivo inhibiendo la TOPI eucariótica y el norfloxacin y el enoxacin fue efectivo contra la TOPII procariótica del cinetoplasto. También se han investigado múltiples compuestos derivados de la camptotecina, como son el topotecan y el irinotecan, que han demostrado reducir a un tercio la proliferación celular de *T. cruzi in vitro* (Lacombe et al., 2014)

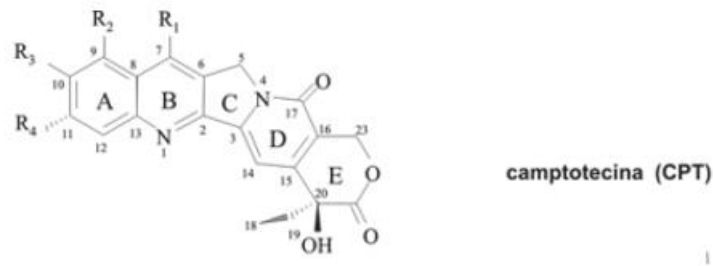


Figura 23. Estructura química del inhibidor camptotecina (CPT) de la TOPI (Reguera et al., 2007).

6.6.3. Inhibidores de purinas

Los tripanosomátidos también obtienen las purinas del medio extracelular ya que no son capaces de biosintetizarlas *de novo*. Una enzima clave en esta ruta es la hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa (HGPRT). Así, para el tratamiento de la enfermedad de Chagas se ha planteado el uso del alopurinol. El alopurinol ha sido utilizado en humanos como un potente inhibidor de la xantina-oxidasa para el tratamiento de la hiperuricemia (este se convierte a oxipurinol, el cual es un potente inhibidor de la xantina-oxidasa) (Rodríguez-Morales, 2005). En tripanosomátidos, que son carentes de esta enzima, el alopurinol actúa como un análogo de purinas y se utiliza para la formación de nuevos nucleótidos del parásito gracias a la HGPRT. Una vez incorporado, los nucleótidos se usan para la síntesis del ADN, provocando por su presencia el bloqueo de la síntesis de ARN y proteínas (Urbina y Docampo, 2003). Su eficacia se demostró *in vitro* e *in vivo* en modelos animales hace décadas (Marr et al., 1978; Avila & Avila, 1981). Sin embargo, los resultados en estudios en humanos han dado resultados contradictorios. Así, en algunos casos se ha encontrado una efectividad en fases crónicas de la enfermedad similares a la conseguida mediante nitrofurano pero con un menor número de efectos adversos (Gallerano et al., 1990), mientras que, en otros estudios, el tratamiento con alopurinol se muestra inefectivo (Rassi et al, 2007; Apt et al., 2005). Tales diferencias podrían deberse a la presencia de diferentes cepas de *T. cruzi* en los pacientes estudiados, siendo necesarios futuros estudios acerca de la eficacia de esta quimioterapia (Sales-Junior et al., 2017).

6.7. Nuevos agentes anti-*T. cruzi*

El desarrollo de fármacos es caro y requiere mucho tiempo, por lo tanto, hasta hace unos años, “Big Pharmas” tenían poco interés en el desarrollo de nuevos fármacos para la Enfermedad de Chagas, una enfermedad tropical muy desatendida. Actualmente gran parte de las investigaciones de nuevos medicamentos anti-*T. cruzi* se basan en fármacos ya existentes en el mercado para el tratamiento de otras patologías.

Cabe destacar que los esfuerzos de los investigadores por encontrar compuestos efectivos frente a *T. cruzi* han dado pocos resultados en los últimos 40 años. Son muy numerosas las moléculas ensayadas, pero desafortunadamente, solo unos pocos ensayos clínicos para el tratamiento de la Enfermedad de Chagas están en curso o se han realizado recientemente.

Se ha descubierto también que la actividad de medicamentos existentes como los que se utilizan para el cáncer (camptotecina), antidepresivos (clomipramina y thioridazina), micosis (fenarimol), hiperuricemia (alopurinol), etc, han demostrado utilidad para la eliminación del parásito, siendo gran parte de los compuestos en fase experimental parte de este grupo. También se están probando numerosos derivados de otros compuestos, como la miltefosina, derivado de la amiodarona; el fexinidazol, derivado del nitroimidazol; o el albaconazol, el ketoconazol y el variconazol, derivados triazólicos. Por otro lado, se han probado también compuestos con elementos metálicos como el boro (oxaborol) y el selenio (Tabla 1) (Sales-Junior et al., 2017).

Compuesto	In vitro	In vivo	Fase I	Fase II	Fase III	Aprobado
Benznidazol	+	+	+	+	+	+
Nifurtimox	+	+	+	+	+	+
Posaconazol	+	+	+	+	-	-
Ravuconazol	+	+	+	+	-	-
Voriconazol	+	+	+	-	-	-
Albaconazol	+	+	+	-	-	-
TAK-187	+	+	-	-	-	-
K-777	+	+	-	-	-	-
Fenarimol	+	+	+	-	-	-
Fexinidazol	+	+	+	+	-	-
Miltefosina	+	+	+	-	-	-
Selenio	+	+	+	+	-	-
Alopurinol	+	+	+	-	-	-
Amiodarona	+	+	+	+	-	-
Oxaborol	+	+	+	-	-	-
Camptotecina	+	+	-	-	-	-

Tabla 1. Estado actual de los compuestos utilizados para tratar la Enfermedad de Chagas (Sales-Junior et al., 2017).

A su vez, se están llevando a cabo estudios con compuestos de origen natural para analizar sus posibles propiedades tripanocidas. Moléculas como los terpenoides han sido postuladas como opciones terapéuticas con menos efectos adversos y más efectividad contra la tripanosomiasis. Entre los productos de origen vegetal se encuentran por ejemplo los derivados de la *Eugenia uniflora*, una planta tropical conocida comúnmente como “cereza de cayena”, de la cual se ha demostrado su actividad biológica antimicrobiana y se han aislado algunos de sus fitocomponentes, como los flavonoides de iricitrina, quercitina y quercetrina, además de esteroides y compuestos terpenoides, entre otros (Sánchez et al., 2016). Otras plantas de origen brasilero también han mostrado actividad antitripanosoma; especies como *Ampelozizyphus amazonicus*, planta endémica de la región amazónica, ha demostrado tener utilidad profiláctica contra la parasitosis (Santos et al., 2012). Otras moléculas que están siendo estudiadas son las lactonas sesquiterpenas, que cuentan con diferentes actividades y usos en humanos, entre ellos, anticancerígeno, antiinflamatorio, antimicrobiano y antiprotozo (Cogo et al., 2012).

7. Bibliografía

Aguilera, E. (2013). Síntesis y evaluación biológica de productos activos frente a *Trypanosoma cruzi* con capacidad de inhibición de TcTIM.

Aguirre Salegui, O. (2019). Chagas: una enfermedad emergente.

Álvarez, G., Aguirre-López, B., Varela, J., Cabrera, M., Merlino, A., López, G. V., ... & Gómez-Puyou, A. (2010). Massive screening yields novel and selective *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase dimer-interface-irreversible inhibitors with anti-trypanosomal activity. *European journal of medicinal chemistry*, 45(12), 5767-5772.

Álvarez, V. E., Iribarren, P. A., Niemirowicz, G. T., & Cazzulo, J. J. (2020). Update on relevant trypanosome peptidases: Validated targets and future challenges. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 140577.

Antinori, S., Galimberti, L., Bianco, R., Grande, R., Galli, M., & Corbellino, M. (2017). Chagas disease in Europe: a review for the internist in the globalized world. *European Journal of Internal Medicine*, 43, 6-15.

Aoki, M. P., Guiñazú, N. L., Pellegrini, A. V., Gotoh, T., Masih, D. T., & Gea, S. (2004). Cruzipain, a major *Trypanosoma cruzi* antigen, promotes arginase-2 expression and survival of neonatal mouse cardiomyocytes. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 286(2), C206-C212.

Apt, W., Arribada, A., Zulantay, I., Solari, A., Sánchez, G., Mundaca, K., ... & Osuna, A. (2005). Itraconazole or allopurinol in the treatment of chronic American trypanosomiasis: the results of clinical and parasitological examinations 11 years post-treatment. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 99(8), 733-741.

Apt-Baruch, W. L. (2020). *Parasitología Humana* (1.^a ed.). MCGRAW HILL EDUCATION. https://www--ingeboc.com.ual.debiblio.com/ib/NPcd/IB_Escritorio_Visualizar?cod_primaria=1000193&libro=5330.

Aronov, A. M., Suresh, S., Buckner, F. S., Van Voorhis, W. C., Verlinde, C. L., Opperdoes, F. R., ... & Gelb, M. H. (1999). Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(8), 4273-4278.

Avelar, L. A., Camilo, C. D., de Albuquerque, S., Fernandes, W. B., Gonçalves, C., Kenny, P. W., ... & Saidel, M. E. (2015). Molecular design, synthesis and trypanocidal activity of dipeptidyl nitriles as cruzain inhibitors. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(7), e0003916.

Avila, J., & Avila, A. (1981). *Trypanosoma cruzi*: allopurinol in the treatment of mice with experimental acute Chagas disease. *Experimental parasitology*, 51(2), 204-208.

Bakker, B. M., Michels, P. A., Opperdoes, F. R., & Westerhoff, H. V. (1999). What controls glycolysis in bloodstream form *Trypanosoma brucei*?. *Journal of Biological Chemistry*, 274(21), 14551-14559.

Beaulieu, C., Isabel, E., Fortier, A., Massé, F., Mellon, C., Méthot, N., ... & Black, W. C. (2010). Identification of potent and reversible cruzipain inhibitors for the treatment of Chagas disease. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 20(24), 7444-7449.

Benaim, G. y Garcia, C RS (2011). Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishma... *Tropical Biomedicine*, 28(3), 471-481.

Benaim, G., & Mondolfi, A. E. P. (2012). The emerging role of amiodarone and dronedarone in Chagas disease. *Nature Reviews Cardiology*, 9(10), 605.

Benaim, G., Bermudez, R., & Urbina, J. A. (1990). Ca²⁺ transport in isolated mitochondrial vesicles from *Leishmania braziliensis* promastigotes. *Molecular and biochemical parasitology*, 39(1), 61-68.

Benaim, G., Paniz-Mondolfi, A. E., Sordillo, E. M., & Martinez-Sotillo, N. (2020). Disruption of intracellular calcium homeostasis as a therapeutic target against *Trypanosoma cruzi*. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 46.

Benaim, G., Sanders, J. M., Garcia-Marchán, Y., Colina, C., Lira, R., Caldera, A. R., ... & Urbina, J. A. (2006). Amiodarone Has Intrinsic Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity and Acts Synergistically with Posaconazole. *Journal of medicinal chemistry*, 49(3), 892-899.

Berry ASF, Salazar-Sánchez R, Castillo-Neyra R, Borrini-Mayorí K, Chipana-Ramos C, Vargas-Maquera M, et al. (2019) Sexual reproduction in a natural *Trypanosoma cruzi* population. *PLoS Negl Trop Dis* 13(5): e0007392. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007392>.

Bertolini, M. S., Chiurillo, M. A., Lander, N., Vercesi, A. E., & Docampo, R. (2019). MICU1 and MICU2 play an essential role in mitochondrial Ca²⁺ uptake, growth, and infectivity of the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. *MBio*, 10(3), e00348-19.

Bonaldo, M. C., d'Escoffier, L. N., Salles, J. M., & Goldenberg, S. (1991). Characterization and expression of proteases during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Experimental parasitology*, 73(1), 44-51.

Bressi, J. C., Verlinde, C. L., Aronov, A. M., Shaw, M. L., Shin, S. S., Nguyen, L. N., ... & Gelb, M. H. (2001). Adenosine analogues as selective inhibitors of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Trypanosomatidae* via structure-based drug design. *Journal of medicinal chemistry*, 44(13), 2080-2093.

Briceño-León, R. (2009). La enfermedad de Chagas en las Américas: una perspectiva de ecosalud. *Cadernos de saúde pública*, 25, S71-S82.

Cançado, J. R. (2002). Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 44(1), 29-37.

Capranico, G., Zagotto, G., & Palumbo, M. (2004). Development of DNA topoisomerase-related therapeutics: a short perspective of new challenges. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents*, 4(4), 335-345.

Carmel-Harel, O., & Storz, G. (2000). Roles of the glutathione-and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 439-461.

Carrada-Bravo, T. (2004). *Trypanosoma cruzi*. *Natural history and diagnosis of Chagas disease. Rev. Mex. Patol. Clin*, 51(4), 205-219.

Cazzulo, J. (2002). Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. *Current topics in medicinal chemistry*, 2(11), 1261-1271.

Cazzulo, J. J. (1999). La cruzipaina, cisteína proteinasa principal del *Trypanosoma cruzi*: secuencia y organización genómica de los genes que la codifican. *MEDICINA-BUENOS AIRES*, 59, 7-10.

Cazzulo, J., Stoka, V., & Turk, V. (2001). The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Current pharmaceutical design*, 7(12), 1143-1156.

CDC (16 de junio de 2021). American Trypanosomiasis. Encontrado en: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/>.

CDC (9 de octubre de 2019). *Tratamiento antiparasitario*. Encontrado en: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/es/hcp/tratamiento.html>.

Cerecetto, H., & González, M. (2002). Chemotherapy of Chagas' disease: status and new developments. *Current topics in medicinal chemistry*, 2(11), 1187-1213.

Chin-Hong, P. V., Schwartz, B. S., Bern, C., Montgomery, S. P., Kontak, S., Kubak, B., ... & 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*, 11(4), 672-680.

Cogo, J., de Oliveira Caleare, A., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., Ferreira, I. C. P., & Nakamura, C. V. (2012). Trypanocidal activity of guaianolide obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip. and its combinational effect with benznidazole. *Phytomedicine*, 20(1), 59-66.

Cohen, S. S. (1998). *Guide to the Polyamines*. Oxford University Press.

Concha-Valdez, F. G. (2015). *Diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas (Chagas congénito y en donantes de sangre): validación del antígeno Hierro Superóxido Dismutasa excretada (Fe-SODE) de Trypanosoma cruzi*. (Tesis doctoral, Universidad de Granada, Ed.).

Coura, J. R. (2015). Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. In *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias* (pp. 1175-2045).

Coura, J. R., & De Castro, S. L. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(1), 3-24.

De Fuentes-Vicente, J. A., Vidal-López, D. G., Flores-Villegas, A. L., Moreno-Rodríguez, A., De Alba-Alvarado, M. C., Salazar-Schettino, P. M., ... & Gutiérrez-Cabrera, A. E. (2019). *Trypanosoma cruzi*: A review of biological and methodological factors in Mexican strains. *Acta tropica*, 195, 51-57.

De Stefani, D., Raffaello, A., Teardo, E., Szabò, I., & Rizzuto, R. (2011). A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476(7360), 336-340.

Degrave, W., Fragoso, S. P., Britto, C., van Heuverswyn, H., Kidane, G. Z., Cardoso, M. A., ... & Morel, C. M. (1988). Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology*, 27(1), 63-70.

Deterding, A., Dungey, F. A., Thompson, K. A., & Steverding, D. (2005). Anti-trypanosomal activities of DNA topoisomerase inhibitors. *Acta tropica*, 93(3), 311-316.

Días, J. C. P. (2009). Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 41-45.

Docampo, R., & Vercesi, A. E. (1989). Ca²⁺ transport by coupled *Trypanosoma cruzi* mitochondria in situ. *Journal of Biological Chemistry*, 264(1), 108-111.

Docampo, R., and Huang, G. (2015). Calcium signaling in trypanosomatid parasites. *Cell Calcium* 57, 194–202. doi: 10.1016/j.ceca.2014.10.015.

Docampo, R., de Souza, W., Miranda, K., Rohloff, P., & Moreno, S. N. (2005). Acidocalcisomes? Conserved from bacteria to man. *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 251-261.

Duschak, V. G. (2019). Major kinds of drug targets in Chagas disease or American Trypanosomiasis. *Current drug targets*, 20(11), 1203-1216.

Fairlamb, A. H., & Cerami, A. (1985). Identification of a novel, thiol-containing co-factor essential for glutathione reductase enzyme activity in trypanosomatids. *Molecular and biochemical parasitology*, 14(2), 187-198.

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.

Ferreira, H. D. O. (1990). Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com nifurtimox e benzonidazol. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 23(4), 209-211.

Ferreira, L. G., & Andricopulo, A. D. (2017). Targeting cysteine proteases in trypanosomatid disease drug discovery. *Pharmacology & therapeutics*, 180, 49-61.

Fiestas-Puppo, M. L. (2014). Biosíntesis de tripanotión en trypanosoma cruzi: validación biológica de su potencial como blanco terapéutico contra la enfermedad de chagas.

Gallerano, R. H., Marr, J. J., & Sosa, R. R. (1990). Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 43(2), 159-166.

García-Domenech, R., Espinoza, N., Galarza, R. F., Moreno-Padilla, M. J., Rojas-Ruiz, B., Roldan-Arroyo, L. L., ... & Gálvez, J. (2008). Aplicación de la topología molecular en la predicción de la inhibición de Trypanosoma cruzi Hexokinasa y un grupo de derivados bifosfonatos. *Ars Pharmaceutica (Internet)*, 49(3), 199-209.

García-Jordán, N., Berrizbeitia, M., Concepción, J. L., Aldana, E., Cáceres, A., & Quiñones, W. (2015). Estudio entomológico de vectores transmisores de la infección por Trypanosoma cruzi en la población rural del estado Sucre, Venezuela. *Biomédica*, 35(2), 247-257.

García-Torres, I., & Pérez-Montfort, R. (2011). Avances en la identificación de blancos terapéuticos y el diseño racional de fármacos contra la enfermedad de Chagas. *Revista de Educación Bioquímica*, 30(2), 68-81.

Gascón, J., Bern, C., & Pinazo, M. J. (2010). Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta tropica*, 115(1-2), 22-27.

Gaunt, M. W., Yeo, M., Frame, I. A., Stothard, J. R., Carrasco, H. J., Taylor, M. C., ... & Miles, M. A. (2003). Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. *Nature*, 421(6926), 936-939.

Gayosso-De-Lucio, J., Torres-Valencia, M., Rojo-Domínguez, A., Nájera-Peña, H., Aguirre-López, B., Salas-Pacheco, J., ... & Téllez-Valencia, A. (2009). Selective inactivation of triosephosphate isomerase from Trypanosoma cruzi by brevifolin carboxylate derivatives isolated from Geranium bellum Rose. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(20), 5936-5939.

Gobbi, P., Baez, A., Presti, M. S. L., Fernández, A. R., Enders, J. E., Fretes, R., ... & Rivarola, H. W. (2010). Association of clomipramine and allopurinol for the treatment of the experimental infection with Trypanosoma cruzi. *Parasitology research*, 107(5), 1279-1283.

Guhl, F. (2013). Epidemiología molecular de Trypanosoma cruzi. *Revista Española de Salud Pública*, 1-8.

Hashimoto, M., Enomoto, M., Morales, J., Kurebayashi, N., Sakurai, T., Hashimoto, T., ... & Mikoshiba, K. (2013). Inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor regulates replication, differentiation, infectivity and virulence of the parasitic protist T trypanosoma cruzi. *Molecular microbiology*, 87(6), 1133-1150.

Herrerros-Cabello, A., Callejas-Hernández, F., Gironès, N., & Fresno, M. (2020). Trypanosoma Cruzi Genome: Organization, Multi-Gene Families, Transcription, and Biological Implications. *Genes*, 11(10), 1196.

Huang, G., and Docampo, R. (2018). The Mitochondrial Ca²⁺ uniporter complex (MCUC) of Trypanosoma brucei is a hetero-oligomer that contains novel subunits essential for Ca²⁺ uptake. *MBio* 2018:e01700–e01718. doi: 10.1128/mBio.01700-18.

Hudock, M. P., Sanz-Rodriguez, C. E., Song, Y., Chan, J. M., Zhang, Y., Odeh, S., ... & Oldfield, E. (2006). Inhibition of Trypanosoma cruzi Hexokinase by Bisphosphonates. *Journal of medicinal chemistry*, 49(1), 215-223.

Keenan, M., Abbott, M. J., Alexander, P. W., Armstrong, T., Best, W. M., Berven, B., ... & White, K. L. (2012). Analogues of fenarimol are potent inhibitors of Trypanosoma cruzi and are efficacious in a murine model of Chagas disease. *Journal of medicinal chemistry*, 55(9), 4189-4204.

Keenan, M., Chaplin, J. H., Alexander, P. W., Abbott, M. J., Best, W. M., Khong, A., ... & Charman, S. A. (2013). Two analogues of fenarimol show curative activity in an experimental model of Chagas disease. *Journal of medicinal chemistry*, 56(24), 10158-10170.

Kennedy, K. J., Bressi, J. C., & Gelb, M. H. (2001). A disubstituted NAD⁺ analogue is a nanomolar inhibitor of trypanosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 11(2), 95-98.

Klemba, M., & Goldberg, D. E. (2002). Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annual review of biochemistry*, 71(1), 275-305.

Knockaert, M., Gray, N., Damiens, E., Chang, Y. T., Grellier, P., Grant, K., ... & Meijer, L. (2000). Intracellular targets of cyclin-dependent kinase inhibitors: identification by affinity chromatography using immobilised inhibitors. *Chemistry & biology*, 7(6), 411-422.

Krieger, S., Schwarz, W., Ariyanayagam, 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*, 35(3), 542-552.

Lacombe, O. K., Zuma, A. A., da Silva, C. C., de Souza, W., & Motta, M. C. M. (2014). Effects of camptothecin derivatives and topoisomerase dual inhibitors on Trypanosoma cruzi growth and ultrastructure. *Journal of negative results in biomedicine*, 13(1), 1-8.

Lambeir, A. M., Loiseau, A. M., Kuntz, D. A., Vellieux, F. M., Michels, P. A., & Opperdoes, F. R. (1991). The cytosolic and glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Trypanosoma brucei: Kinetic properties and comparison with homologous enzymes. *European journal of biochemistry*, 198(2), 429-435.

Lammel, E. M., Barbieri, M. A., Wilkowsky, S. E., Bertini, F., & Isola, E. L. (1996). Trypanosoma cruzi: involvement of intracellular calcium in multiplication and differentiation. *Experimental parasitology*, 83(2), 240-249.

Lander, N., Chiurillo, M. A., Bertolini, M. S., Storey, M., Vercesi, A. E., & Docampo, R. (2018). Calcium-sensitive pyruvate dehydrogenase phosphatase is required for energy metabolism, growth, differentiation, and infectivity of Trypanosoma cruzi. *Journal of Biological Chemistry*, 293(45), 17402-17417.

Lander, N., Chiurillo, M. A., Storey, M., Vercesi, A. E., and Docampo, R. (2016). CRISPR/Cas9-mediated endogenous C-terminal tagging of Trypanosoma cruzi genes reveals the acidocalcisome localization of the Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. *J. Biol. Chem.* 291, 25505–25515. doi: 10.1074/jbc.M116.749655.

Le Loup, G., Pialoux, G., & Lescure, F. X. (2011). Update in treatment of Chagas disease. *Current opinion in infectious diseases*, 24(5), 428-434.

Levine, N. D., Corliss, J. O., Cox, F. E. G., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B. M., ... & Merinfeld, E. G. (1980). A Newly Revised Classification of the Protozoa* THE COMMITTEE ON SYSTEMATICS EVOLUTION OF THE SOCIETY OF PROTOZOOLOGISTS. *The Journal of protozoology*, 27(1), 37-58.

Li, Z., Fennie, M. W., Ganem, B., Hancock, M. T., Kobašlija, M., Rattendi, D., ... & O'Sullivan, M. C. (2001). Polyamines with N-(3-phenylpropyl) substituents are effective competitive inhibitors of trypanothione reductase and trypanocidal agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 11(2), 251-254.

Lima, A. P. C., dos Reis, F. C., Serveau, C., Lalmanach, G., Juliano, L., Ménard, R., ... & Scharfstein, J. (2001). Cysteine protease isoforms from *Trypanosoma cruzi*, cruzipain 2 and cruzain, present different substrate preference and susceptibility to inhibitors. *Molecular and biochemical parasitology*, 114(1), 41-52.

López-Nicolás, M. M. (2019). *Enfermedad de Chagas en Europa*. (Trabajo Fin de Grado, Universidad Complutense de Madrid, Ed.).

López-Vélez, R., Norman, F. F., & Bern, C. (2020). American trypanosomiasis (Chagas Disease). In *Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases* (pp. 762-775).

Madigan, R., Majoy, S., Ritter, K., Luis Concepción, J., Márquez, M. E., Silva, S. C., ... & Paniz-Mondolfi, A. E. (2019). Investigation of a combination of amiodarone and itraconazole for treatment of American trypanosomiasis (Chagas disease) in dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 255(3), 317-329.

Maeda, F. Y., Cortez, C., & Yoshida, N. (2012). Cell signaling during *Trypanosoma cruzi* invasion. *Frontiers in immunology*, 3, 361.

Maluf, F. V., Andricopulo, A. D., Oliva, G., & Guido, R. V. (2013). A pharmacophore-based virtual screening approach for the discovery of *Trypanosoma cruzi* GAPDH inhibitors. *Future medicinal chemistry*, 5(17), 2019-2035.

Marcili, A., Lima, L., Valente, V. C., Valente, S. A., Batista, J. S., Junqueira, A. C., ... & Teixeira, M. M. (2009). Comparative phylogeography of *Trypanosoma cruzi* TCIIC: new hosts, association with terrestrial ecotopes, and spatial clustering. *Infection, Genetics and Evolution*, 9(6), 1265-1274.

Marr, J. J., Berens, R. L., & Nelson, D. J. (1978). Antitrypanosomal effect of allopurinol: conversion in vivo to aminopyrazolopyrimidine nucleotides by *Trypanosoma curzi*. *Science*, 201(4360), 1018-1020.

Martins, A. V., Gomes, A. P., de Mendonça, E. G., Fietto, J. L. R., Santana, L. A., de Almeida Oliveira, M. G., ... & Siqueira-Batista, R. (2012). Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. *Infectio*, 16(1), 45-58.

Marton, L. J., & Pegg, A. E. (1995). Polyamines as targets for therapeutic intervention. Annual review of pharmacology and toxicology, 35(1), 55-91.

McKerrow, J. H., Caffrey, C., Kelly, B., Loke, P. N., & Sajid, M. (2006). Proteases in parasitic diseases. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 1, 497-536.

Meister, A. (1981). Metabolism and functions of glutathione. *Trends in Biochemical Sciences*, 6, 231-234.

Mellognio, A. B. M., & González, M. (2010). Investigación y Desarrollo de Nuevos Fármacos Anti-T. cruzi: Inhibidores de Cruzipaína Derivados del Sistema Benzofuroxano y 1, 3-Dióxido de Benzimidazol.

Mendonça, A. A. S., Coelho, C. M., Veloso, M. P., Caldas, I. S., Goncalves, R. V., Teixeira, A. L., ... & Novaes, R. D. (2018). Relevance of trypanothione reductase inhibitors on Trypanosoma cruzi infection: A systematic review, meta-analysis, and in silico integrated approach. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2018.

Molina, I., Salvador, F., & Sánchez-Montalvá, A. (2016). Actualización en enfermedad de Chagas. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 34(2), 132-138.

Molina, J., Martins-Filho, O., Brener, Z., Romanha, A. J., Loebenberg, D., & Urbina, J. A. (2000). Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 44(1), 150-155.

Montalvetti, A., Bailey, B. N., Martin, M. B., Severin, G. W., Oldfield, E., & Docampo, R. (2001). Bisphosphonates are potent inhibitors of Trypanosoma cruzi farnesyl pyrophosphate synthase. *Journal of Biological Chemistry*, 276(36), 33930-33937.

Montero, L. F. L. (2002). Purificación y caracterización cinética de la fosfoglicerato kinasa B (PGKB) de Trypanosoma cruzi.

Morillo, C. A., Waskin, H., Sosa-Estani, S., del Carmen Bangher, M., Cuneo, C., Milesi, R., ... & Yusuf, S. (2017). Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic T. cruzi carriers: the STOP-CHAGAS trial. *Journal of the American College of Cardiology*, 69(8), 939-947.

Murcia, L., Carrilero, B., Saura, D., Iborra, M. A., & Segovia, M. (2013). Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica*, 31, 26-34.

Naula, C., Parsons, M., & Mottram, J. C. (2005). Protein kinases as drug targets in trypanosomes and Leishmania. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, 1754(1-2), 151-159.

Ndao, M., Beaulieu, C., Black, W. C., Isabel, E., Vasquez-Camargo, F., Nath-Chowdhury, M., ... & Nicoll-Griffith, D. A. (2014). Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a Chagas disease cure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 58(2), 1167-1178.

Olivares-Illana, V., Rodríguez-Romero, A., Becker, I., Berzunza, M., García, J., Pérez-Montfort, R., ... & Gómez-Puyou, A. (2007). Perturbation of the dimer interface of triosephosphate isomerase and its effect on Trypanosoma cruzi. *PLoS Negl Trop Dis*, 1(1), e1.

OPS/OMS (10 de septiembre de 2014). Organización Panamericana de la Salud. Enfermedad de Chagas. Encontrado en: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>.

OPS/OMS (3 de abril de 2020). Organización Panamericana de la Salud. Enfermedad de Chagas. Encontrado en: <https://www.paho.org/es/temas/enfermedad-chagas>.

Parussini, F., Duschak, V. G., & Cazzulo, J. J. (1998). Membrane-bound cysteine proteinase isoforms in different developmental stages of Trypanosoma cruzi. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 44(3), 513-519.

Patel, S., & Docampo, R. (2010). Acidic calcium stores open for business: expanding the potential for intracellular Ca²⁺ signaling. *Trends in cell biology*, 20(5), 277-286.

Paveto, C., Pereira, C., Espinosa, J., Montagna, A. E., Farber, M., Esteva, M., ... & Torres, H. N. (1995). The nitric oxide transduction pathway in Trypanosoma cruzi. *Journal of Biological Chemistry*, 270(28), 16576-16579.

Penninckx, M. J., & Elskens, M. T. (1993). Metabolism and functions of glutathione in microorganisms. *Advances in microbial physiology*, 34, 239-301.

Pérez, E. G. R. (2013). *Parasitología Médica* (1.ª ed.). Editorial El Manual Moderno. <https://elibro-net.ual.debiblio.com/es/ereader/ual/39680>.

Pérez-Mazliah, D. E., Alvarez, M. G., Cooley, G., Lococo, B. E., Bertocchi, G., Petti, M., ... & Viotti, R. (2013). Sequential combined treatment with allopurinol and benznidazole in the chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a pilot study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(2), 424-437.

Pinto-Días, J. C. (2012). Tendencias sociales de la enfermedad de Chagas para las próximas décadas. *Salud colectiva*, 8, 39-48.

Pinto-Martínez, A., Hernández-Rodríguez, V., Rodríguez-Durán, J., Hejchman, E., & Benaim, G. (2018). Anti-*Trypanosoma cruzi* action of a new benzofuran derivative based on amiodarone structure. *Experimental parasitology*, 189, 8-15.

Presti, M. S. L., 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.

Querales, I., & Torres, J. (2009). Ejemplo Utilidad Enzimas. slideshare. <https://es.slideshare.net/miquerales/ejemplo-utilidad-enzima>.

Rassi, A., Luquetti, A. O., Rassi Jr, A., Rassi, G. G., Rassi, S. G., Da Silva, I. G., & Rassi, A. G. (2007). Specific treatment for *Trypanosoma cruzi*: lack of efficacy of allopurinol in the human chronic phase of Chagas disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 76(1), 58-61.

Reguera, R. M., Pérez-Pertejo, Y., Redondo, C. M., Díaz-González, R., & Balaña-Fouce, R. (2007). La ADN topoisomerasa tipo I de protozoos patógenos como Diana terapéutica de fármacos antitumorales. *MEDICINA (Buenos Aires)*, 67(6), 747-757.

Requena-Méndez, A., Aldasoro, E., de Lazzari, E., Sicuri, E., Brown, M., Moore, D. A., ... & Muñoz, J. (2015). Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(2), e0003540.

Ribeiro dos Santos, R., Rassi, S., Feitosa, G., Grecco, O. T., Rassi Jr, A., da Cunha, A. B., ... & Campos de Carvalho, A. C. (2012). Cell Therapy in Chagas Cardiomyopathy (Chagas Arm of the Multicenter Randomized Trial of Cell Therapy in Cardiopathies Study) A Multicenter Randomized Trial. *Circulation*, 125(20), 2454-2461.

Rivarola, H. W., Bustamante, J. M., Presti, S. L., Fernández, A. R., Enders, J. E., Gea, S., ... & Paglini-Oliva, P. (2005). *Trypanosoma cruzi*: chemotherapeutic effects of clomipramine in mice infected with an isolate obtained from an endemic area. *Experimental parasitology*, 111(2), 80-86.

Rodrigues, J. C. F., Godinho, J. L. P., & de Souza, W. (2014). Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. *Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma*, 1-42.

Rodríguez-Morales, A. J. (2005). Nuevas perspectivas en el manejo terapéutico de la enfermedad de Chagas. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública*, 22(2), 123-133.

Rudenskaya, G. N., & Pupov, D. V. (2008). Cysteine proteinases of microorganisms and viruses. *Biochemistry (Moscow)*, 73(1), 1-13.

Rueda, K., Trujillo, J. E., Carranza, J. C., & Vallejo, G. A. (2014). Transmisión oral de *Trypanosoma cruzi*: una nueva situación epidemiológica de la enfermedad de Chagas en Colombia y otros países suramericanos. *Biomédica*, 34(4), 631-641.

Salas-Sarduy, E., Landaburu, L. U., Karpiak, J., Madauss, K. P., Cazzulo, J. J., Agüero, F., & Alvarez, V. E. (2017). Novel scaffolds for inhibition of Cruzipain identified from high-throughput screening of anti-kinetoplastid chemical boxes. *Scientific reports*, 7(1), 1-12.

Sales-Junior, P. A., Molina, I., Murta, S. M. F., Sánchez-Montalvá, A., Salvador, F., Corrêa-Oliveira, R., & Carneiro, C. M. (2017). Experimental and clinical treatment of Chagas disease: a review. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 97(5), 1289-1303.

Sánchez, E., Vélez, M. C., Restrepo, M., Sebastián Marín, J., & Gallego, D. (2016). Tripanosomiasis americana, una mirada desde el tratamiento. In *Anales de la Facultad de Medicina* (Vol. 77, No. 1, pp. 39-44). UNMSM. Facultad de Medicina.

Santos, K. K., Matias, E. F., Tintino, S. R., Souza, C. E., Braga, M. F., Guedes, G. M., ... & Coutinho, H. D. (2012). Anti-*Trypanosoma cruzi* and cytotoxic activities of *Eugenia uniflora* L. *Experimental Parasitology*, 131(1), 130-132.

Sanz-Rodríguez, C. E., Concepción, J. L., Pekerar, S., Oldfield, E., & Urbina, J. A. (2007). Bisphosphonates as inhibitors of *Trypanosoma cruzi* hexokinase: kinetic and metabolic studies. *Journal of Biological Chemistry*, 282(17), 12377-12387.

Sbaraglini, M. L., Bellera, C. L., Fraccaroli, L., Larocca, L., Carrillo, C., Talevi, A., & Soto, C. D. A. (2016). Novel cruzipain inhibitors for the chemotherapy of chronic Chagas disease. *International journal of antimicrobial agents*, 48(1), 91-95.

Schoijet, A. C., Sternlieb, T., & Alonso, G. D. (2019). Signal transduction pathways as therapeutic target for Chagas disease. *Current medicinal chemistry*, 26(36), 6572-6589.

Silva, J. J. N., Guedes, P. M. M., Zottis, A., Balliano, T. L., Nascimento Silva, F. O., França Lopes, L. G., ... & Silva, J. S. (2010). Novel ruthenium complexes as potential drugs for Chagas's disease: enzyme inhibition and in vitro/in vivo trypanocidal activity. *British journal of pharmacology*, 160(2), 260-269.

Soares Medeiros, L. C., South, L., Peng, D., Bustamante, J. M., Wang, W., Bunkofske, M., ... & Tarleton, R. L. (2017). Rapid, selection-free, high-efficiency genome editing in protozoan parasites using CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *MBio*, 8(6), e01788-17.

Soriano-Arandes, A., Angheben, A., Serre-Delcor, N., Treviño-Maruri, B., Gomez i Prat, J., & Jackson, Y. (2016). Control and management of congenital chagas disease in Europe and other non-endemic countries: current policies and practices. *Tropical Medicine & International Health*, 21(5), 590-596.

Souto, R. P., & Zingales, B. (1993). Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 62(1), 45-52.

Souto, R. P., Fernandes, O., Macedo, A. M., Campbell, D. A., & Zingales, B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology*, 83(2), 141-152.

Souza, W. D. (2002). Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current pharmaceutical design*, 8(4), 269-285.

Souza, W. D. (2009). Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 89-100.

Sriram, D., Yogeewari, P., Thirumurugan, R., & Ratan Bal, T. (2005). Camptothecin and its analogues: a review on their chemotherapeutic potential. *Natural product research*, 19(4), 393-412.

Stanaway, J. D., & Roth, G. (2015). The burden of Chagas disease: estimates and challenges. *Global Heart*, 10(3), 139-144.

Strauss, M., Presti, M. S. L., Bazán, P. C., Baez, A., Fauro, R., Esteves, B., ... & Rivarola, H. W. (2013). Clomipramine and benznidazole association for the treatment of acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology international*, 62(3), 293-299.

Sturm, N. R., & Campbell, D. A. (2010). Alternative lifestyles: the population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica*, 115(1-2), 35-43.

Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabe, C., Guerrini, F., Skarecky, D., & Ayala, F. J. (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(4), 1335-1339.

Tomazela, D. M., Pupo, M. T., Passador, E. A., da Silva, M. F. D. G., Vieira, P. C., Fernandes, J. B., ... & Pirani, J. R. (2000). Pyrano chalcones and a flavone from *Neoraputia magnifica* and their *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-inhibitory activities. *Phytochemistry*, 55(6), 643-651.

Toso, A., Vial, F., & Galanti, N. (2011). Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista médica de Chile*, 139(2), 258-266.

Tyler, K. M., & Engman, D. M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International journal for parasitology*, 31(5-6), 472-481.

Uehara, L. A., Moreira, O. C., Oliveira, A. C., Azambuja, P., Lima, A. P. C. A., Britto, C., ... & d'Avila-Levy, C. M. (2012). Cruzipain promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to *Rhodnius prolixus* midgut. *PLoS neglected tropical diseases*, 6(12), e1958.

Urbina, J. A. (2002). Chemotherapy of Chagas disease. *Current pharmaceutical design*, 8(4), 287-295.

Urbina, J. A. (2009). Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104, 311-318.

Urbina, J. A., & Docampo, R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in parasitology*, 19(11), 495-501.

Urbina, J. A., Concepción, J. L., Montalvetti, A., Rodriguez, J. B., & Docampo, R. (2003b). Mechanism of action of 4-phenoxyphenoxyethyl thiocyanate (WC-9) against *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(6), 2047-2050.

Urbina, J. A., Concepción, J. L., Rangel, S., Visbal, G., & Lira, R. (2002). Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. *Molecular and biochemical parasitology*, 125(1-2), 35-45.

Urbina, J. A., Payares, G., Sanoja, C., Molina, J., Lira, R., Brener, Z., & Romanha, A. J. (2003a). Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. *International journal of antimicrobial agents*, 21(1), 39-48.

Vargas-Vasquez, F. R. (2005). Epidemiología molecular de la tripanosomiasis americana (*trypanosoma cruzi* y *trypanosomma rangeli*) en la región norte y nororiental del Perú.

Vélez, I. D. (2018). El drama de las enfermedades tropicales desatendidas. *Biomédica*, 38, 5-7.

Vickers, N. J. (2017). Animal communication: when i'm calling you, will you answer too?. *Current biology*, 27(14), R713-R715.

Villalta, F., & Rachakonda, G. (2019). Advances in preclinical approaches to Chagas disease drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, 14(11), 1161-1174.

WHO (1 de abril de 2021). Organización Mundial de la Salud. La enfermedad de Chagas (triplanosomiasis americana). Encontrado en: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).

WHO (2002). Expert Committee on the Control of Chagas Disease, & World Health Organization. *Control of Chagas disease: Second report of the WHO Expert Committee* (Vol. 2). World Health Organization.

Zingales, B. (2018). *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. *Acta Tropica*, 184, 38-52.

Zingales, B., Andrade, S. G., Briones, M. R. D. S., Campbell, D. A., Chiari, E., Fernandes, O., ... & Schijman, A. G. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104(7), 1051-1054.

Zuma, A. A., Mendes, I. C., Reignault, L. C., Elias, M. C., de Souza, W., Machado, C. R., & Motta, M. C. M. (2014). How *Trypanosoma cruzi* handles cell cycle arrest promoted by camptothecin, a topoisomerase I inhibitor. *Molecular and biochemical parasitology*, 193(2), 93-100.