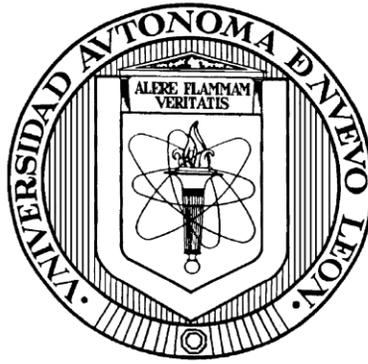


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA



**“CRIBADO VIRTUAL BASADO EN ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE
INHIBIDORES POTENCIALES DE LA ANHIDRASA CARBÓNICA DE
Trypanosoma cruzi”**

POR

EYRA LILIANA ORTIZ PÉREZ

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIA ANIMAL

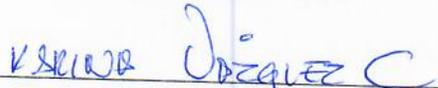
2024

**“CRIBADO VIRTUAL BASADO EN ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE
INHIBIDORES POTENCIALES DE LA ANHIDRASA CARBÓNICA DE
Trypanosoma cruzi”**

Aprobación de tesis por el comité particular de

Eyra Liliana Ortiz Pérez

COMITÉ DE TESIS



Dra. Karina Wendoline Vázquez Cisneros

Nombre y Firma

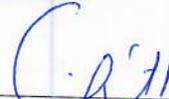
Presidente



Dr. Gildardo Rivera Sánchez

Nombre y Firma

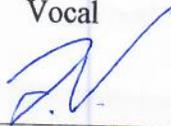
Secretario



Dr. Juan José Zárate Ramos

Nombre y Firma

Vocal



Dr. José Pablo Villarreal Villarreal

Nombre y Firma

Vocal



Dr. Edgar Eduardo Lara Ramírez

Nombre y Firma

Vocal

**“CRIBADO VIRTUAL BASADO EN ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE
INHIBIDORES POTENCIALES DE LA ANHIDRASA CARBÓNICA DE
Trypanosoma cruzi”**

Aprobación de tesis por el comité particular de

Eyra Liliana Ortiz Pérez

COMITÉ DE TESIS



Dra. Karina Wendoline Vázquez Cisneros
Directora



Dr. Gildardo Rivera Sánchez
Codirector Externo



Dr. Uziel Castillo Velázquez
Subdirector de Posgrado e Investigación

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios mi Señor y Salvador por prestarme un poco de su creación para conocerlo y asombrarme aún más de sus maravillas. Todo viene de Él y es para Él.

Al Posgrado Conjunto de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - Facultad de Agronomía, por darme la oportunidad de este crecimiento profesional.

Al Centro de Biotecnología Genómica, por permitir el desarrollo y conclusión de este proyecto.

A la Dra. Karina Wendoline Vázquez Cisneros, por la dirección de este trabajo, sus consejos y el apoyo incondicional.

Al Dr. Gildardo Rivera Sánchez, por la dirección de este proyecto que, dicho sea de paso, ha sido un ejemplo de perseverancia, constancia, apoyo incondicional, disciplina y resiliencia. Le agradezco por enseñarme que cuando lo único que tenemos seguro es el “no”, con trabajo y constancia se puede ir por el “sí”. Como alguien dice por ahí: -You are the best mentor.

A los Dres. Edgar Lara, José Pablo Villarreal y Juan José Zarate, por sus observaciones y correcciones a este escrito.

Al Dres. Domingo Méndez y Alfredo Juárez, por todo el conocimiento que compartieron tan amablemente conmigo cuando más pérdida estaba, sin ustedes no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Farmacéutica por su amistad, compañerismo y apoyo.

DEDICATORIA

A mis padres

Dedico con todo mi amor esta etapa de crecimiento profesional a mis padres (**Raúl Ortiz** † y **Martha Pérez** †) que desde niña me imaginaron aquí, siendo algo que ellos no tuvieron la oportunidad de ser. Hoy gracias a ellos sé que el límite para esta tierra es solo el cielo, lo demás, es cuestión de trabajo y perseverancia.

A mi familia

Mi amado esposo Julio Cesar y mis dos príncipes azules Sebastián y Cesarin. Ojalá mis logros algún día sean una referencia de inspiración para ellos.

Los amo infinitamente.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	2
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 La enfermedad de Chagas o trypanosomiasis americana.....	3
2.2 Epidemiología de la enfermedad de Chagas	4
2.3 Manifestaciones clínicas	5
2.3.1 Tripanosomiasis americana.....	5
2.3.2 Trypanosomiasis canina.....	6
2.4 Tratamiento actual.....	7
2.4.1 Quimioterapia en humanos	7
2.4.2 Quimioterapia en perros.....	8
2.5 Agente etiológico	10
2.5.1 Taxonomía y morfología	10
2.5.2 Ciclo biológico.....	11
2.6 Blancos farmacológicos emergentes	12
2.6.1 Anhidrasas carbónicas	13
2.6.2 Anhidrasa carbónica de <i>T. cruzi</i> (α -ACTc).....	15
2.6.3 Inhibidores de la anhidrasa carbónica de <i>T. cruzi</i>	16
2.6.4 Derivados de sulfonamidas como potenciales inhibidores	19
3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS DEL PROYECTO	22
5.1 Objetivo general.....	22
5.1.1 Objetivos específicos.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS.	23
6.1 Lugar de procesamiento de las muestras	23
6.2 Área y tiempo de muestreo.....	23
6.3 Metodología	23
6.3.1 Modelado de la proteína anhidrasa carbónica de <i>T. cruzi</i>	23
6.3.2 Cribado virtual	24

6.3.3 Acoplamiento molecular de los ligandos candidatos	24
6.3.4 Evaluación biológica en epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	25
6.3.5 Ensayos de citotoxicidad	25
7. RESULTADOS	27
7.1 Modelado y selección de las proteínas	27
7.2 Cribado virtual	31
7.2.1 Máxima Subestructura Común (MSC)	31
7.2.2 Cribado virtual	33
7.2.3 Acoplamiento molecular y análisis de interacciones	33
7.2.3.1 Validación del acoplamiento	33
7.2.3.2 Acoplamiento molecular de los compuestos candidatos	36
7.2.3.3 Análisis de interacciones de los compuestos candidatos	40
7.2.3.4 Análisis de las propiedades biofarmacéuticas y farmacocinéticas	43
7.3 Evaluación de los compuestos en un modelo <i>in vitro</i>	44
8. DISCUSIÓN	47
9. CONCLUSIONES	57
10. PERSPECTIVA	58
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXOS	73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas	4
Figura 2. Estructura químicas de los fármacos aprobados para el tratamiento anti-trypanosoma.	7
Figura 3. Representación esquemática de la morfología y organelos de los estadios . . .	10
Figura 4 . Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	12
Figura 5. Familias de anhidrasas carbónicas.	14
Figura 6. Mecanismo catalítico propuesto para la α -AC.	15
Figura 7. Mecanismo de acción de los derivados de sulfonamidas.	20
Figura 8. Modelos tridimensionales generados en las diferentes plataformas.	27
Figura 9. Alineamiento de secuencias aminoacídicas de los modelos generados.	29
Figura 10. Alineamiento de secuencias de las proteínas de trabajo y ubicación de las coordenadas de los sitios activos.	30
Figura 11. Treinta y dos derivados de sulfonamidas inhibidores de α -ACTc agrupados por similitud estructural	31
Figura 12. Validación del acoplamiento molecular.	34
Figura 13. Fármacos candidatos de la base de datos del DrugBank.	40
Figura 14. Análisis de interacciones de los compuestos de Zinc y MolPort	42
Figura 15. Análisis de interacciones de los compuestos del DrugBank	43
Figura A1. Veintidós compuestos que muestran valores $\Delta\Delta > 0$	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Compuestos líderes inhibidores de la α -ACTc reportados en la literatura en el periodo 2013 al 2023.....	17
Tabla 2. Compuestos FDA reportados en la literatura como inhibidores de la α -ACTc	19
Tabla 3. Evaluación en Swiss Model Structure Assessment	28
Tabla 4. Agrupamiento de los derivados de sulfonamidas con actividad inhibitoria sobre la α -ACTc.....	32
Tabla 5. MSC's utilizadas para el cribado virtual en las quimiotecas	32
Tabla 6. Perfil de interacciones de los treinta y dos controles derivados de sulfonamidas	36
Tabla 7. Energía de unión de compuestos candidatos sobre el sitio activo	37
Tabla 8. Fármacos probados que tuvieron EU (Kcal/mol) superior al fármaco control .	38
Tabla 9. Análisis de interacciones de los compuestos candidatos de las tres bases de datos	40
Tabla 10. Predicción <i>in silico</i> de las propiedades biofarmacéuticas y farmacocinéticas de los compuestos candidatos	44
Tabla 11. Evaluaciones <i>in vitro</i> de los fármacos FDA en cepas de epimastigotes de NINOA y A1	45
Tabla A1. Máxima Subestructura Común (MSC) seleccionadas para el cribado virtual	73
Tabla A2. Fármacos probados que tuvieron EU (Kcal/mol) superior al fármaco control y que interactuaron con al menos un residuo de interés	76

Lista de símbolos y abreviatura

SÍMBOLO O ABREVIATURA	DESCRIPCIÓN
%	Porcentaje
°C	Grados centígrados
μM	Micromolar
μL	Microlitros
mL	Mililitros
mmol	Milimol
mm	Milímetros
g	Gramos
h	Hora
d	Día
min	Minutos
CI ₅₀	Máxima Concentración Media Inhibitoria
IS	Índice de Selectividad
H ₂ O	Agua
ACTc	Anhidrasa Carbónica de <i>Trypanosoma cruzi</i>

RESUMEN

La Tripanosomiasis Americana es una enfermedad de importancia clínica y veterinaria también llamada enfermedad de Chagas. Se encuentra dentro de las enfermedades consideradas como desatendidas por la Organización Mundial de la Salud, debido a los escasos avances en el desarrollo de fármacos. Actualmente, solo existen el benznidazol y el nifurtimox usado para el tratamiento en humanos. Estos fármacos, tienen efectos severos y limitados por lo que, se han considerado diferentes blancos farmacológicos para la búsqueda de nuevos inhibidores, entre ellos se ha considerado la enzima α -anhidrasa carbónica, debido a que cataliza una reacción considerada como vital en el parásito. Las sulfonamidas son la clase principal de inhibidores de anhidrasa carbónica por su capacidad de coordinar el ion metálico (Zn^+) ubicado en el sitio activo de la enzima, lo que perjudica la reacción de hidratación del CO_2 a bicarbonato.

En este proyecto, se propuso el uso de herramientas bioinformáticas para el diseño de modelos proteicos, así como el cribado virtual y acoplamiento molecular de compuestos derivados de sulfonamidas, los cuales fueron evaluados en un modelo *in vitro* contra epimastigotes de las cepas mexicanas A1 y NINOA, y la citotoxicidad de los compuestos seleccionados en macrófagos de ratón J774.2, como una potencial opción para el tratamiento de la tripanosomiasis en animales.

1. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana) es una enfermedad zoonótica causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Se estimada como una de las parasitosis más graves en el Territorio de las Américas y debido al escaso y limitado tratamiento, está en la lista de las 14 enfermedades rezagadas o desatendidas según la Organización Mundial de la Salud (OMS). Además del hospedero y el vector (insecto triatoma), este parásito se ha encontrado en más de 100 especies de reservorios mamíferos, principalmente en animales con cercanía y participación en el ciclo doméstico y peri-doméstico como lo son: el perro, el gato, las aves de corral, entre otros. Los fármacos usados en humanos son el benznidazol y nifurtimox (1966-1970), sin embargo, hasta ahora no hay medicamentos aprobados en la medicina veterinaria. Se han documentado los diversos inconvenientes de estos fármacos en cuanto a costo, eficacia limitada y toxicidad, lo que ha trazado la exploración de alternativas terapéuticas. A lo largo del tiempo se han estudiado una gama de blancos terapéuticos para la búsqueda de nuevos fármacos tripanocidas, entre ellas se encuentran la vía del ergosterol, la triosa fosfato isomerasa, la *trans*-sialidasa, la cruzaína, la dihidrofolato reductasa-timidilato sintetasa, la tripanotión reductasa y recientemente la **anhidrasa carbónica**. Las anhidrasas carbónicas (ACs) son metaloenzimas presentes en todos los organismos vivos y son las encargadas de catalizar una sencilla pero primordial reacción $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$. En *T. cruzi*, se ha caracterizado recientemente una isoforma única perteneciente a la familia α con parámetros cinéticos de actividad catalítica similar (k_{cat} de $1.21 \times 10^6 \text{ (s}^{-1}\text{)}$, K_m de $8.1 \times 10^{-3} \text{ (M)}$, k_{cat}/K_m de $1.49 \times 10^8 \text{ (M}^{-1} \times \text{s}^{-1}\text{)}$) a la más importante isoforma II humana, debido a esto, se ha considerado que esta enzima juega un papel crucial en el ciclo del parásito. Por otra parte, las sulfonamidas por su parte han sido ampliamente estudiadas por su interacción en el sitio activo de la enzima, por lo que, han sido usadas en la clínica como inhibidoras de ACs de humanos. En este trabajo se propuso la búsqueda de nuevos compuestos con potencial inhibitorio selectivo sobre la α -ACTc a través de la propuesta de un modelo proteico, un cribado virtual basado en acoplamiento

molecular y la evaluación en un modelo *in vitro*, con la finalidad de encontrar candidatos con potencial actividad tripanocida.

2. ANTECEDENTES

2.1 La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana

La enfermedad de Chagas (Tripanosomiasis Americana) fue nombrada en honor al médico e investigador Carlos Ribeiro Justiniano Chagas de origen brasileño, quien identificó en 1909 al parásito haciendo una descripción preliminar de algunos síntomas de esta enfermedad. Inicialmente, este parásito fue nombrado como *Schizotrypanum cruzi* sin embargo, después se reconoció como *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) (Rojo-Medina et al., 2018) en honor al bacteriólogo y médico Oswaldo Cruz (Peña-Callejas et al., 2022). Chagas y su grupo de colaboradores lograron aislar este parásito del intestino medio de insectos hematófagos (chinchas), que picaban frecuentemente a la gente, logró posteriormente infectar a algunos animales de laboratorio detectando los tripanosomas días después de ser picados (Peña-Callejas et al., 2022).

La enfermedad de Chagas ha sido considerada como zoonótica, debido a que es transmitida tanto a animales como a personas principalmente por un insecto vector (*Centers for Disease Control and Prevention*, 2022). En el continente Americano se ha encontrado en al menos 100 especies de reservorios mamíferos domésticos y de vida silvestre (*The Center of Food Security and Public Health*, 2009). Principalmente animales como el gato (*Felis silvestris catus*) y el perro (*Canis lupus familiaris*) son considerados como un factor en la infección en humanos por su relación cercana en el ciclo doméstico y peri doméstico (Enriquez et al., 2013). La vía de infección más común es a través del contacto directo con las heces del vector en la zona de picadura, sin embargo, existen otras vías de infección como; la congénita (madre a hijo), transfusiones sanguíneas (Rojo-Medina et al., 2018), agua o alimento contaminado (Toso et al., 2011), accidentes de laboratorio, trasplante de órganos (Rojo-Medina et al., 2018) y vía sexual (Gomes et al., 2019).

2.2 Epidemiología

De acuerdo con la OMS, esta enfermedad es endémica en 21 países de las Américas (**Figura 1**) con 30,000 casos nuevos por año a nivel mundial, en promedio hay 14,000 muertes y 8,000 recién nacidos son afectados en la gestación (*WHO, 2021*).



Figura 1. Distribución geográfica de la enfermedad de Chagas en los 21 países de las Américas, ordenada por frecuencia y prevalencia (*Paho, 2023*).

Aunque la enfermedad es endémica de América Latina, se ha encontrado en regiones no endémicas como son: Norte América, Europa (Alemania, Austria, Suecia, Bélgica, Francia, Holanda, Italia, Portugal, Reino Unido, y España), Japón y Australia, debido a la migración internacional, transfusión de sangre, infección congénita, trasplante de órganos o bien por la transmisión oral a través de la comida (*Mansoldo et al., 2020*).

Se estima que en México aproximadamente 1.1 millones de personas están infectadas. En 2017, los Estados con el número mayor número de casos fueron; Veracruz, Yucatán, Oaxaca, Morelos, Chiapas, Jalisco y Estado de México con 17.8, 10.3, 10.5, 9.2, 8.1, 5.9 y 5.2 % respectivamente, siendo la tasa anual por cada 100,000 habitantes de 0.7 (*Roj-*

Medina et al., 2018; *Secretaria de Salud*, 2023). En 2018, la tasa de incidencia estuvo encabezada por los estados de Yucatán, Quintana Roo y Nayarit con 0.8, 0.8 y 0.7 % respectivamente (Rojo-Medina et al., 2018).

La infección es transmitida principalmente por triatominos del género *Reduviidae*, orden *Hemiptera* y subfamilia *Triatominae*. En 2015, el Sistema Nacional de Salud identificó 8 géneros y 31 especies de triatomas en México destacando *Triatoma longipennis*, *Triatoma pallidipennis* y *Triatoma dimidiata* en un 34, 23 y 29% respectivamente. En este estudio se pudo concluir que en dos terceras partes de nuestro país se encuentran las condiciones óptimas para la transmisión vectorial (Rojo-Medina et al., 2018).

Este dato es alarmante debido a que estos insectos se alimentan tanto de sangre de personas como de reservorios domésticos (perros, gatos y aves de corral), lo que indica que se reproducen prolíficamente mientras cohabitan cerca de los seres humanos, algunos reportes indican que el perro puede estar involucrado activamente en la transmisión del ciclo doméstico y peri doméstico (Barr, 2009).

Durante el periodo del 2006 al 2017 se llevaron a cabo estudios en perros en diferentes estados de la república, en el estado de México se encontró una seroprevalencia del 17.5% (Estrada-Franco et al., 2006), Yucatán de 9.8 a 34% (Jimenez-Coello et al., 2008), Chiapas de 4.5 – 42.8% (Jimenez-coello et al., 2010), Campeche 7.6%, Jalisco 8.1% (López et al., 2014) y Sonora 4.4% (Arce-Fonseca et al., 2017). Es importante destacar que tanto Yucatán como Chiapas, son estados considerados con el mayor número de casos en humanos, por lo que la presencia de este agente patógeno en la población de perros callejeros y domésticos demuestra que es un reservorio importante y una fuente potencial de la infección.

2.3 Manifestaciones clínicas

2.3.1 Tripanosomiasis americana

En los seres humanos la enfermedad puede presentar tres fases (aguda, latente o indeterminada y crónica), aunque no necesariamente en cada caso se presentan todas (Singh et al., 2019; Rodrigues et al., 2014; Guarner, 2019).

La **fase aguda** es sintomática y su duración puede ser de dos a ocho semanas (Rojo-Medina et al., 2018), el paciente puede presentar; fiebre, inflamación de ganglios linfáticos e hígado, malestar general, e incluso una erupción cutánea en el portal de entrada, si este fue cerca del parpado se llama signo de Romaña. Los síntomas de infección por vía oral se caracterizan por manifestaciones más graves que la vectorial presentando síntomas como: fiebre prolongada, miocarditis aguda acompañada de insuficiencia cardíaca y meningoencefalitis en algunos casos (Filigheddu et al., 2017).

En la **fase latente** o **indeterminada**, el paciente puede pasar por años o décadas asintomático, sin embargo, hay evidencia serológica de la infección por *T. cruzi*. Los pacientes en esta fase son un riesgo significativo para la transmisión tanto transfusional como vectorial (Rojo-Medina et al., 2018).

La **fase crónica**, se presenta después de 10 hasta 30 años aproximadamente y se considera que solo el 10% de los individuos contagiados llegan a esta fase. De esta proporción más del 90% desarrollarán enfermedades cardíacas (arritmias, cardiomegalia, aneurismas apicales, insuficiencia cardíaca, trombosis y muerte) y solo el 5% desarrolla complicaciones gastrointestinales (megaesófago o megacolon con complicaciones como obstrucción, ruptura, peritonitis y muerte).

2.3.2 *Trypanosomiasis canina*

Al igual que en los seres humanos, en la Tripanosomiasis canina se pueden presentar las tres etapas antes mencionadas.

Se ha reportado que el periodo de incubación en la **fase aguda** puede ser de 5 a 42 días, la signología reportada incluye; fiebre, anorexia, hepatomegalia, esplenomegalia, linfadenopatía, diarrea y por consiguiente ascitis o pérdida de peso. En los casos más graves, en esta etapa se produce disfunción cardíaca, miocarditis aguda, arritmias y muerte repentina (*The Center of Food Security and Public Health*, 2009).

Los animales que logran superar esta fase entran a la **fase latente** o **indeterminada**, donde no hay síntomas aparentes y es difícil encontrar los parásitos. En animales experimentales, esta etapa se ha reportado en un periodo de 27 días, sin embargo, se cree que en infecciones

naturales esta fase puede durar años (*The Center of Food Security and Public Health*, 2009).

Por su parte, durante la **fase crónica** el signo más frecuente es la insuficiencia cardíaca (principalmente del ventrículo derecho). En esta fase puede surgir la muerte súbita, debido a las complicaciones que conllevan la miocarditis crónica, dilatación cardíaca y arritmias (*The Center of Food Security and Public Health*, 2009).

2.4 Tratamiento actual

2.4.1 Quimioterapia en humanos

La gama quimioterapéutica es bastante limitada, los nitroazoles: N-benzil-2-nitroimidazol acetamida (benznidazol) y 3-metil-4-[5 9-nitrofurfurildeneamina] (nifurtimox) son los fármacos comercializados y usados desde hace ya varias décadas (1971 y 1977 respectivamente) (Güzel-Akdemir et al., 2013). Sin embargo, estos fármacos tienen efectos limitados y adversos que llevan a que la mayoría de los pacientes abandonen el tratamiento, además, de que en los últimos años se ha detectado desarrollo de resistencia en el parásito (Campos et al., 2014; Wilkinson et al., 2008; Mejia et al., 2012) (**Figura 2**). Principalmente, nifurtimox es el que presenta una alta toxicidad y efectos adversos, razón por la cual ha sido discontinuado en países de Sur y Centro América (Mansoldo et al., 2020).

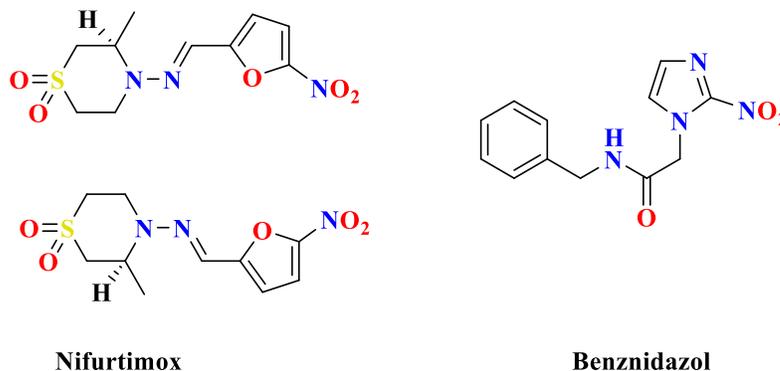


Figura 2. Estructuras químicas de los fármacos aprobados para el tratamiento de la tripanosomiasis.

Nifurtimox (Nfx) es manufacturado por Lampit® y está disponible en tabletas de 120 mg, prescrito en dosis de 8 a 10 mg/kg/día en un periodo de 90 a 120 días. Beznidazol (Bzn) por su parte, es manufacturado por Rochagan® (Brazil) o Radanil® (Argentina), en presentación de tabletas de 100 mg y prescrito en dosis usuales de 5 a 7 mg/kg/día en periodos de 30 a 60 días.

Ambos agentes antiparasitarios tienen un radio de curación del 80% aproximadamente en la fase aguda, desafortunadamente han sido considerados menos efectivos en la fase crónica (Vermelho et al., 2020). A pesar de este infortunio, el mayor de los problemas como ya se ha mencionado son los efectos adversos que estos fármacos tienen en el paciente.

En pacientes tratados con Nfx, se han presentado serios de desórdenes digestivos, mientras que los pacientes tratados con Bzn, presentan polineuritis, dermatitis con erupciones cutáneas, mialgias, polineuropatía e incluso trastornos de la medula ósea. A pesar de esto, Bzn es considerado como la primera elección de tratamiento por ser el más tolerado (Salomon, 2012). Entre los sectores más afectados está la población infantil, debido a que estos dos fármacos están disponibles solamente en presentación en tabletas, lo que ha llevado a que se dosifique el tratamiento en fracciones de sólidos equivalentes al peso y tamaño del infante, lo que puede aumentar aún más los efectos indeseables debido a una dosificación errónea e imprecisa (Vermelho et al., 2020).

2.4.2 Quimioterapia en perros

En la medicina veterinaria no existe un fármaco aprobado para el tratamiento de la Tripanosomiasis en animales, sin embargo, los perros han sido considerados como un modelo experimental para la quimioterapia de la enfermedad de Chagas desde 1909, cuando por primera vez se realizaron estudios de infecciones experimentales. Esto es, debido al conocimiento avanzado y similitud de la morfología cardíaca canina, así como la similitud de la fisiología del sistema de conducción cardíaca con la de los seres humanos. Gracias a esto, los estudios electrocardiográficos y ecocardiográficos pueden ser evaluados y comparados con casos clínicos humanos. Otra de las ventajas, es la vida

relativamente larga del animal (11 a 16 años), por lo que es posible monitorear detalladamente las fases de la enfermedad (de Lana & Giunchetti, 2020).

Las investigaciones experimentales de tratamiento en perros inicio en la década de los 80's, cuando por primera vez se utilizó un esquema de quimioterapia basado en Nfx (60 mg/Kg/24h) en un periodo de 5 a 10 días en combinación con dexametasona y betametasona en perros contagiados con la cepa 12SF o colombiana. La descripción de los resultados fue bastante global, no distinguiendo entre el tratamiento utilizado en cada grupo de perros, sin embargo, los autores mencionan una reducción del parasitismo (parecido a la fase indeterminada presentada en humanos), una completa eliminación de la inflamación y cambios positivos en el electrocardiograma (Andrade & Andrade, 1980; de Lana & Giunchetti, 2020).

Después de este primer estudio, pasaron un poco más de dos décadas sin avances en el tema, hasta que en el 2002 da Matta Guedes y cols., realizaron estudios con perros con enfermedad en la fase aguda y crónica, contagiados con las cepas colombianas Y/Be-78 con dosis de Bzn de 7mg/Kg/12 h por 45 días. Los autores destacaron que la tasa de curación y el comportamiento en todas las pruebas posteriores al tratamiento, fueron similares a los obtenidos en los humanos principalmente en la reducción parasitaria en la fase aguda (da Matta Guedes et al., 2002). Después del 2012 se realizaron otros estudios con Bzn (Santos et al., 2012; Caldas et al., 2013; Daliry et al., 2014; Santos et al., 2016; Caldas et al., 2019; Carvalho et al., 2019; Cunha, Torchelsen, et al., 2019) e incluso en combinación con otros fármacos como el Itraconazol (Cunha, da Silva Torchelsen, et al., 2019; Zao et al., 2019). En estas investigaciones, la curación clínica no se demostró eficazmente debido a la ausencia de un biomarcador seguro y confiable, sin embargo, en algunos estudios se utilizaron electrocardiografía y ecodopplercardiografía en las evaluaciones posteriores que, aunque en estos se demostró cierta mejoría clínica, no hay datos suficientes para demostrar la curación clínica (de Lana & Giunchetti, 2020).

Uno de los estudios más completos fue el realizado por Santos y cols., en el 2016, donde utilizaron dos grupos de estudio infectados con *T. cruzi* en la etapa crónica de la enfermedad. Uno fue tratado con Bzn durante 60 días, mientras que el otro no recibió tratamiento. La carga parasitaria se monitoreó mediante PCR (sangre), PCR tiempo real

(tejido cardíaco) en cultivos antes y después del tratamiento, así como a través de análisis histopatológicos para evaluar la inflamación y la fibrosis. Los resultados mostraron que el tratamiento redujo la carga parasitaria en la sangre y tejido cardíaco, así como la inflamación y fibrosis en el músculo cardíaco, sin embargo, con el tiempo hubo un aumento progresivo en la carga parasitaria e incluso se mostraron lesiones miocárdicas y disfunción diastólica a largo plazo (Santos et al., 2016).

2.5 Agente etiológico

2.5.1 Taxonomía y morfología

T. cruzi es un protozoo flagelado perteneciente al orden Kinetoplastida, suborden Trypanosomatina y familia Trypanosomatidae (*Secretaría de Salud. Manual Enfermedad de Chagas.*, 2019). Se caracteriza por una sola mitocondria donde se encuentra su genoma en una compleja y compacta región (cinetoplasto) (Ruiz Aguilar, 2013).

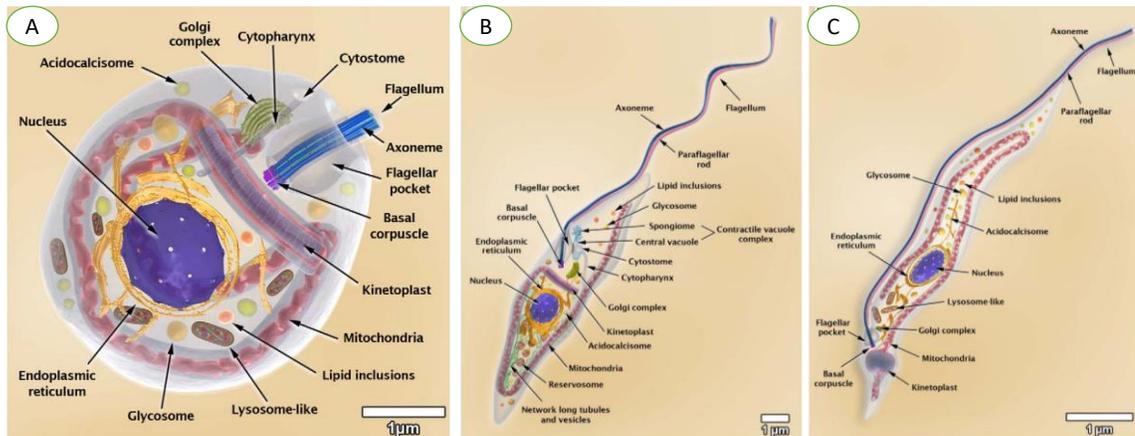


Figura 3. Representación esquemática de la morfología y organelos de los estadios amastigote (A), epimastigote (B) y tripomastigote (C). Modificado de Teixeira et al., 2012.

A. **Amastigote.** En este estadio, el parásito se multiplica por fisión binaria y se localiza en los tejidos del huésped. Una de las características especiales es que carece del típico flagelo exterior (epimastigote) y del flagelo ondulante

(tripomastigote), su morfología es redonda con un diámetro de 2 a 6.5 μm y cerca del núcleo se encuentra el cinetoplasto.

- B. **Epimastigote.** La morfología es alargada a diferencia del amastigote y presenta un flagelo semi ondulante, su diámetro está entre 20 a 40 μm y en posición anterior al núcleo se encuentra su cinetoplasto. La forma de replicación es por fisión binaria y se puede encontrar en el intestino medio del triatomino (vector).
- C. **Tripomastigote.** Son de localización extracelular, poseen un flagelo con una membrana ondulante y se aíslan en los hospederos triatominos (invertebrados), así como en los animales y humanos (vertebrados). Se le llama tripomastigote **metacíclicos** cuando se ubican en el recto y heces del vector, mide 17 μm aproximadamente, tiene un núcleo grande y el cinetoplasto se ubica en la posición terminal posterior. Por otro lado, se le llama tripomastigote **sanguíneo** cuando se encuentra en fluidos y sangre de los huéspedes vertebrados, su característica principal es un flagelo largo que puede ampliar su longitud a 20 μm . El núcleo y cinetoplasto se ubican en la misma posición que en el metacíclico (Peña-Callejas et al., 2022; Teixeira et al., 2012; *Secretaria de Salud. Manual Enfermedad de Chagas.*, 2019).

2.5.2 Ciclo Biológico

El ciclo biológico de este parásito involucra un insecto vector y huéspedes mamíferos (perro, gato, entre otros), incluyendo el ser humano (**Figura 4**). Este ciclo inicia cuando el insecto vector (macho o hembra) pica al hospedero mamífero e ingiere los tripomastigotes sanguíneos (1) dentro del insecto vector (2), estos se transforman en epimastigotes y algunos esferomastigotes (3) y pasan al tramo medio del intestino del insecto donde se multiplican (4) y se transforman en tripomastigotes metacíclicos (5). Cuando el vector pica y se alimenta del huésped defeca en el sitio, dando entrada (6) a la forma de tripomastigote metacíclico al huésped (7). Estos, infectan a macrófagos que son la primera línea de defensa del huésped (8) donde se convierte en amastigote (9 y 10) los cuales inician con la replicación en el citoplasma (11) y a su vez inician la transformación a tripomastigotes (12), los cuales posteriormente son liberados a circulación sanguínea (Peña-Callejas et al., 2022; Teixeira et al., 2012).

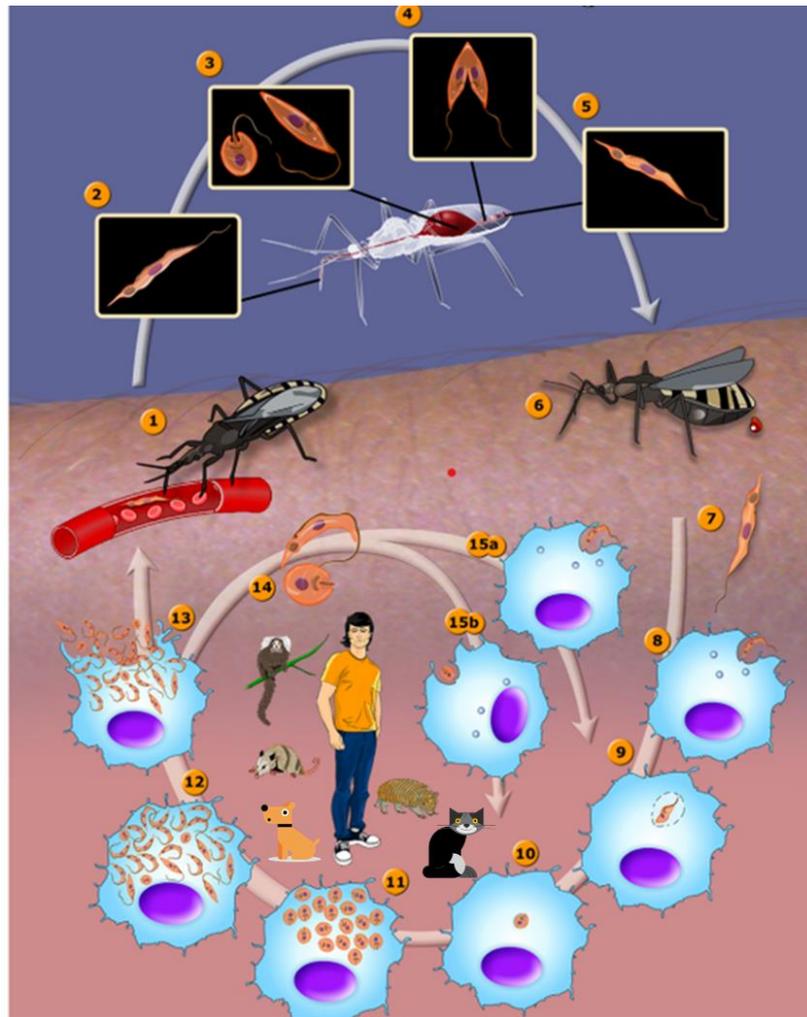


Figura 4. Ciclo de vida de *T. cruzi* y los principales huéspedes en el ciclo doméstico y peri doméstico (Teixeira et al., 2012).

2.6 Blancos farmacológicos emergentes

Un amplio rango de blancos terapéuticos han sido estudiados para el desarrollo de nuevos fármacos contra *T. cruzi* (Adasme et al., 2020). Dentro de ellos se pueden mencionar enzimas de la ruta del ergosterol, la triosa fosfato isomerasa (Vázquez-Jiménez et al., 2021; Vázquez-Jiménez et al., 2022), *trans*-sialidasa (Lara-Ramirez et al., 2017; Vázquez-Jiménez et al., 2020), cruzaina (Palos et al., 2017; Herrera-Mayorga et al., 2019),

dihidrofolato reductasa-timidilato sintetasa (Juárez-Saldivar et al., 2020), Tripanotión reductasa (Vázquez et al., 2017) y recientemente la **anhidrasa carbónica** (Mansoldo et al., 2020).

2.6.1 Anhidrasas carbónicas

Las anhidrasas carbónicas (ACs) son metaloenzimas presentes en todos los organismos vivos (Pan, Vermelho, Scozzafava, et al., 2013^a; Reungprapavut et al., 2004). Se descubrieron en 1920, cuando se establecieron un par de teorías referentes al transporte del CO₂ en la sangre (Ozensoy Guler et al., 2016). La teoría más común afirmaba que el CO₂ era transportado a los pulmones en forma de HCO₃⁻ éste, a su vez era convertido a ácido carbónico por proteínas en la sangre que deshidrataban para liberar CO₂. Se propuso que el radio de producción de CO₂ era incrementado por un catalizador (aislado en 1932) presente en los glóbulos rojos, el cual se determinó que era distinto a la hemoglobina y se le dio el nombre de anhidrasa carbónica (AC), enzima responsable de catalizar la hidratación reversible de CO₂ para producir HCO₃⁻ y un protón (Capasso & Supuran, 2015; Lomelino et al., 2018).

Desde el descubrimiento de las ACs en mamíferos a la fecha, se han identificado 8 familias de metaloenzimas genéticamente únicas y muy diferentes en su estado de oligomerización (**Figura 5**).

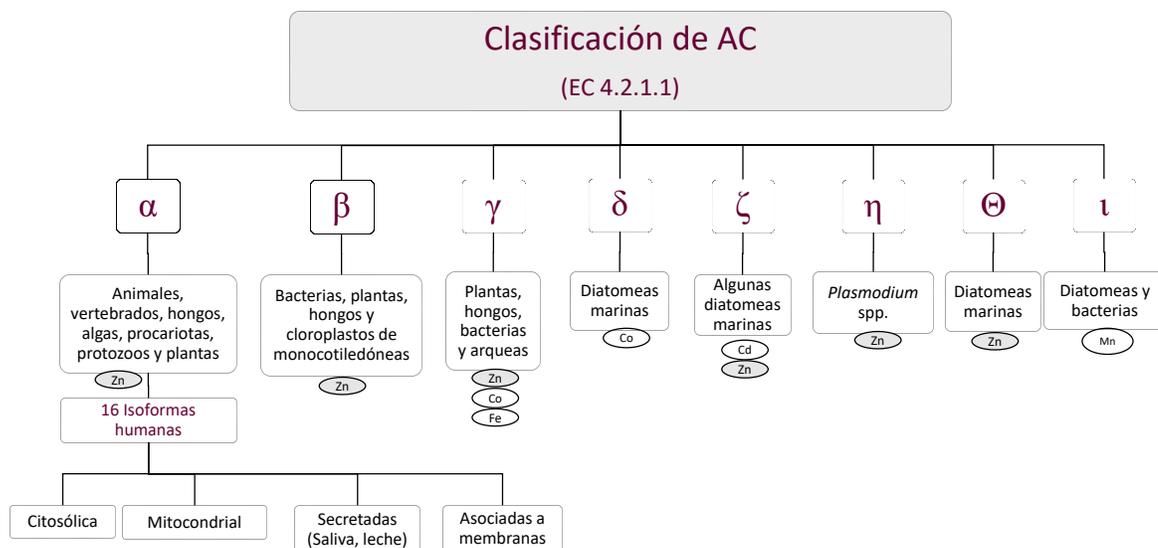


Figura 5. Clasificación de las diferentes familias de anhidrasas carbónicas, los organismos donde están presentes, así como el cofactor metálico (Lomelino et al., 2018).

En la actualidad existen más de 900 estructuras de ACs en el Protein Data Bank (PDB) (*Protein Data Bank*, 2022).

La forma activa de la enzima inicia con el hidróxido unido al cofactor, al sufrir un ataque nucleofílico de una molécula de CO_2 unido a un bolso hidrofóbico, permitiendo la formación de HCO_3^- coordinado por el Zn^{2+} . El HCO_3^- es posteriormente desplazado por moléculas de agua y liberado en la solución, permitiendo la forma ácida de la enzima con una molécula de H_2O coordinada por el cofactor, quedando en forma catalíticamente inactiva (Krungkrai & Supuran, 2008) (**Figura 6**).

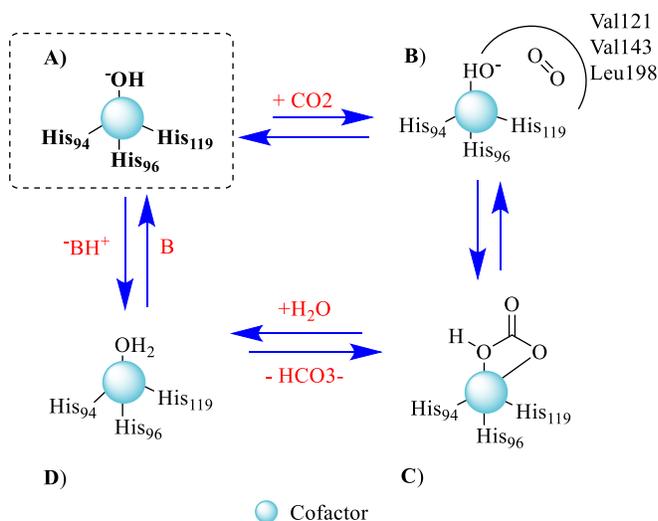


Figura 6. Mecanismo catalítico propuesto para la α -AC (Supuran, 2010).

2.6.2 Anhidrasa carbónica de *T. cruzi*

La primera investigación sobre la anhidrasa carbónica de *T. cruzi* (ACTc) fue hecha por el equipo de trabajo de Pan et al., 2013, donde analizaron el genoma de *T. cruzi* y de esta manera se dieron cuenta que solo se codifica una AC perteneciente a la familia de las α -anhidrasa carbónica (α -ACs) (Figura 6). Una parte truncada de esta enzima fue clonada en un sistema de expresión de baculovirus Bac-to-Bac permitiendo así, que fuera purificada para posteriores análisis. En el análisis de la secuencia, se encontró que la triada catalítica encargada de coordinar al Zn(II) estaba compuesta por tres residuos de His (94, 96 y 119 de acuerdo con el sistema de enumeración para la isoforma I humana). Además, también se pudo establecer la presencia de otros dos aminoácidos importantes para la catálisis en la familia de las α -ACs, los residuos porteros Glu106 y Thr199, responsables de orientar el sustrato a la catálisis. Sorprendentemente, His64 uno de los residuos conservados en las ACs pertenecientes a esta familia no se encontró, siendo reemplazado por un residuo de Asn (Pan, Vermelho, Capaci Rodrigues, et al., 2013). Los parámetros cinéticos de actividad catalítica (k_{cat} de $1.21 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, K_m de $8.1 \times 10^{-3} \text{ M}$ y un k_{cat}/K_m de $1.49 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \times \text{s}^{-1}$) (Pan, Vermelho, Scozzafava, et al., 2013a; Nocentini et al., 2018; Supuran, 2016b), resultaron ser altamente similares a los de la isoforma II humana,

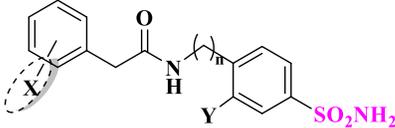
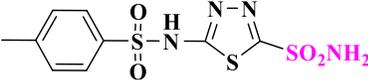
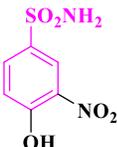
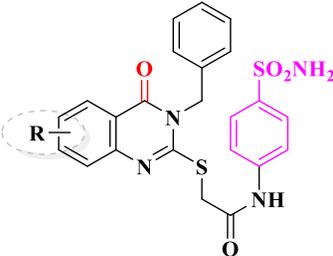
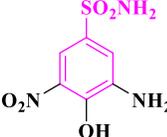
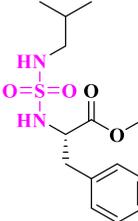
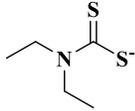
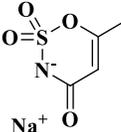
una de las mejores catalistas conocidas en la naturaleza. Debido a esto, se hipotetiza que la enzima juega un rol decisivo en el ciclo de vida de este parásito (Pan, Vermelho, Capaci Rodrigues, et al., 2013; Supuran, 2016d).

2.6.3 Inhibidores de la anhidrasa carbónica de T. cruzi

Hasta el año 2013, la presencia y drogabilidad de las ACs solo había sido investigado en *Plasmodium spp.* La α -AC perteneciente a *T. cruzi* (ACTc) presentó una alta actividad catalítica y se estimó que es sensible a la inhibición por sulfonamidas aromáticas/heterocíclicas, N-sulfonamidas, sulfamatos, hidroxamatos (Winum & Supuran, 2015), aniones, ditiocarbamatos, benzoxaboroles y tioles (Supuran, 2016b), las dos últimas familias de inhibidores demostraron actividad tripanocida inhibiendo *in vivo* las tres fases de ciclo de vida del patógeno. Los aniones inorgánicos y otras pequeñas moléculas también han sido reportados como inhibidores de la ACTc (Nocentini et al., 2018).

En la **Tabla 1** y **2** se hace una recopilación de los compuestos y fármacos FDA con potencial inhibitorio, explorados en la última década donde se puede apreciar que los compuestos líderes desde la caracterización de la isoforma son las sulfonamidas.

Tabla 1. Lista de los compuestos líderes inhibidores de la α -ACTc reportados en la literatura en el periodo del 2013 - 2023.

Grupo	Compuestos / Datos reportados	
Derivados Sulfonamidas		
	<p>ACTc K_i (nM) X, Y, n a = (4-Cl, F, 0) = 1.2 b = (2-Br, F, 0) = 1.6 (Güzel-Akdemir et al., 2013)</p>	<p>ACTc K_i (nM) = 88.5 (Pan, Vermelho, Capaci Rodrigues, et al., 2013)</p>
		
	<p>ACTc K_i (μM) = 0.08</p>	<p>ACTc K_i (nM) R = 6-CH₃ = 6.6 (Alafeefy et al., 2015)</p>
		
	<p>ACTc K_i (μM) = 0.16</p>	<p>ACTc K_i (nM) = 261.4 Docking score: -9.13 kcal/mol (Llanos et al., 2020)</p>
		
<p>ACTc K_i (μM) = 0.11</p>		
<p>(Nocentini et al., 2016)</p>		
Aniones		
	<p>ACTc K_i (μM) = 5.0 (Pan, Vermelho, Scozzafava, et al., 2013b)</p>	<p>ACTc K_i (nM) = 348.1 (Llanos et al., 2020)</p>

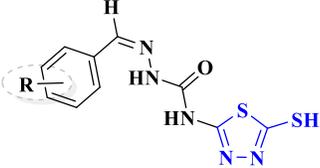
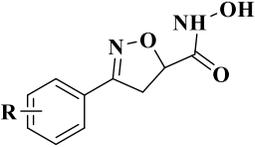
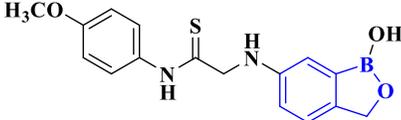
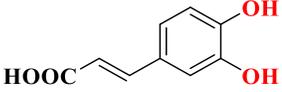
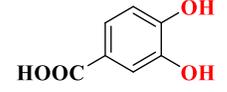
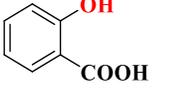
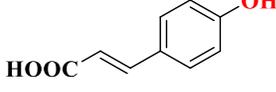
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Tidiazoles</p>	 <p>ACTc K_i (nM) a), R= H, = 21.2 b), R = 4-Cl, = 64.3</p> <p>(Pan, Vermelho, Capaci Rodrigues, et al., 2013)</p>
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Ácido Hidroxámico</p>	 <p>R = 4-phenylmethoxy ACTc K_i (nM) = 39.8 IC₅₀ (<i>in vivo</i>) = 7.0 μM SI = 6.7</p> <p>(Rodrigues et al., 2014)</p>
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Benzoxaboroles</p>	 <p>ACTc K_i (μM) = 12.6</p> <p>(Nocentini et al., 2018)</p>
<p style="writing-mode: vertical-rl; transform: rotate(180deg);">Fenoles</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div data-bbox="526 1163 808 1304">  <p>ACTc K_i (μM) = 1.8</p> </div> <div data-bbox="1062 1163 1289 1304">  <p>ACTc K_i (μM) = 2.4</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 20px;"> <div data-bbox="591 1373 781 1514">  <p>ACTc K_i (μM) = 4.5</p> </div> <div data-bbox="1036 1373 1312 1514">  <p>ACTc K_i (μM) = 4.8</p> </div> </div> <p>(Bonardi et al., 2022)</p>

Tabla 2. Lista de los compuestos FDA reportados en la literatura como inhibidores de la α -ACTc.

Grupo	Fármacos FDA / Datos reportados	
Derivados Sulfonamidas		
	ACTc K_i (nM)	ACTc K_i (nM)
	Acetazolamida (AAZ) = 61.6	Metazolamida (MZA) = 74.9
	ACTc K_i (nM)	ACTc K_i (nM)
	Etazolamida (EZA) = 88.2	Dorzolamida (DZA) = 92.9
ACTc K_i (nM)	ACTc K_i (nM)	
Brinzolamida (BRZ) = 87.3	Benzolamida BZA = 93.6	
	(Pan, Vermelho, Capaci Rodrigues, et al., 2013)	
ACTc K_i (nM)		
Topiramato (TPM) = 85.5		
(Pan, Vermelho, Capaci Rodrigues, et al., 2013)		

2.6.4 Derivados de sulfonamidas como potenciales inhibidores

Las sulfonamidas son el grupo más importante de inhibidores de ACs en humanos, existen al menos 20 fármacos aprobados en el área clínica utilizados como diuréticos, agentes

anti-glaucoma, antiepilépticos, etc. El mecanismo de acción de estos compuestos radica en que el grupo sulfonamida se une a esta enzima justo en el sitio activo en su forma desprotonada cargada negativamente, con el NH^- reemplazando a la molécula H_2O y coordinando al ion metálico con una geometría tetraédrica. El NH^- además participa en enlazar al átomo de hidrógeno de T199, que a su vez participa también en otro enlace de hidrógeno con el carboxilato de E106 (Supuran, 2016a).

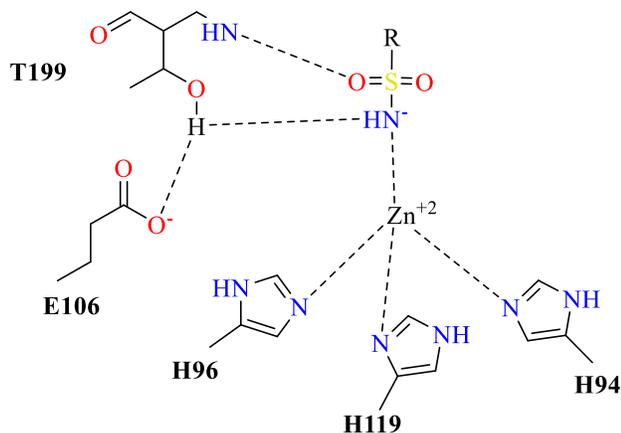


Figura 7. Mecanismo de acción de los derivados de sulfonamidas (Supuran, 2016a).

Considerando las características antes mencionadas, en este proyecto se realizó el cribado virtual de derivados de sulfonamidas y el acoplamiento molecular en la búsqueda de potenciales inhibidores de dos cepas mexicanas (NINOA y A1) de *T. cruzi*.

3. JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A pesar de que se han hecho algunos esfuerzos por desarrollar nuevos tratamientos para las infecciones por *T. cruzi*, en la actualidad no se ha podido concretar un nuevo fármaco efectivo y seguro, lo que ha llevado a seguir recurriendo a los antiguos fármacos y los efectos indeseables que estos conllevan.

La enzima α -ACTc está asociada a factores y mecanismos vitales del parásito, por lo que ha sido recientemente caracterizada y emerge como un nuevo blanco farmacológico prometedor para el desarrollo de un fármaco efectivo contra *T. cruzi*.

Las sulfonamidas han sido ampliamente reportadas como el principal grupo de inhibidores de ACs, capaces de interactuar con el ion zinc mediante el átomo de nitrógeno, debido a esto, en este trabajo se propone el cribado virtual y acoplamiento molecular de compuestos derivados de sulfonamidas con potenciales efectos inhibitorios sobre la ACTc, y su acción tripanocida en un modelo *in vitro* de *T. cruzi*.

4. HIPÓTESIS

Los compuestos obtenidos por cribado virtual y acoplamiento molecular sobre la enzima α -ACTc, mostrarán actividad tripanocida superior al compuesto control, produciendo un bajo efecto citotóxico en macrófagos.

5. OBJETIVOS DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

5.1 Objetivo general

Obtener compuestos nuevos como inhibidores potenciales de la enzima α -anhidrasa carbónica de *T. cruzi* (α -ACTc).

5.1.1 Objetivos específicos

1. Construir y analizar la estructura tridimensional de la enzima α -ACTc mediante modelado por homología.
2. Obtener inhibidores potenciales de α -ACTc a través de cribado virtual basado en ligando de las quimiotecas ZINC20, MolPort y DrugBank.
3. Analizar la interacción ligando-receptor por acoplamiento y dinámica molecular sobre el sitio activo de la α -ACTc.
4. Determinar los efectos tripanocidas de los compuestos seleccionados en un modelo *in vitro* contra epimastigotes de las cepas NINOA y A1 de *T. cruzi*.
6. Determinar la citotoxicidad de los compuestos seleccionados en la línea celular tipo macrófago (J774.2).

6. MATERIALES Y MÉTODOS.

6.1 Lugar de procesamiento de muestras

Este proyecto de investigación se realizó en el Laboratorio de Parasitología perteneciente a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (UANL), en colaboración con el Laboratorio de Biotecnología Farmacéutica en el Centro de Biotecnología Genómica (CBG) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

6.2 Área y tiempo de muestreo

Para este proyecto no fue necesario muestreo de campo.

6.3 Metodología

6.3.1 Modelado de la proteína anhidrasa carbónica de T. cruzi

La proteína ACTc fue modelada en los siguientes servidores: SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018), Rosseta (Kim et al., 2004), Modeller (Eswar et al., 2008) y RaptorX (*Raptor X: Protein Structure and Function Prediction*, 2021), utilizando la secuencia aminoacídica en formato FASTA, posteriormente se hizo una búsqueda de plantillas pertenecientes a proteínas relacionadas. La plantilla de Neisseria Gonorrhoeae (PDB ID: 1KOP) fue la que tuvo el porcentaje de similitud más alto 33.7%, por lo que se utilizó para realizar el plegamiento de la proteína y generar los modelos. Los modelos generados fueron evaluados en el servidor de SWISS-MODEL structure assessment, los cuales fueron alineados para la verificación de regiones en la proteína objetivo. Se generó un modelo tridimensional automáticamente para cada plantilla, transfiriendo las coordenadas de átomos conservados y definidos por la plantilla objetivo con PDB ID: 1KOP. Posteriormente, mediante la estimación de la calidad del modelo (QMEAN, por sus siglas en inglés) se cuantificaron los errores y la precisión del modelo (Waterhouse et al., 2018).

La selección de las proteínas control o no blanco se llevaron a cabo en el Protein Data Bank (PDB) en el caso de la ACII humana (3B4F) (<http://www.pdb.org>) (Berman et al., 2013) y en Uniprot en el caso de la ACVI de perro (Q865C0), debido a que esta última aún no está cristalizada mediante métodos experimentales.

6.3.2 Cribado virtual

En Google Scholar y en el NCBI se realizó una búsqueda de inhibidores de AC reportados en *T. cruzi* (Llanos et al., 2020; Supuran, 2016c), de los cuales, se seleccionaron 87 compuestos (principalmente sulfonamidas, sulfamatos, tioles, aniones e hidroxamatos). Para el cribado virtual por similitud, de los compuestos antes mencionados, se seleccionaron únicamente los que en su estructura contuvieran la sulfonamida mediante el programa DataWarrior. La clasificación por similitud se realizó con un coeficiente de Tanimoto > 80% y se usó RDKit (*RDKit*, 2022), para realizar la agrupación y calcular la Máxima Subestructura Común (MSC), que fue posteriormente usada para realizar el cribado virtual en ZINC20 (Irwin et al., 2020) y MolPort (*MolPort*, 2022) por similitud y subestructura. En el primer filtro, se eliminaron los duplicados y se aplicó la regla de Lipinski (PM <500; número de donadores de enlace = o <5 suma de OH y NH en la molécula; número de aceptores de enlace = o <10 suma de O y N en la molécula; LogP <5).

Para los fármacos de DrugBank, se tomaron los compuestos de acceso libre en la página. Dichos fármacos se filtraron en DataWarrior para seleccionar solamente los que fueran derivados de sulfonamidas.

6.3.3 Acoplamiento molecular de los ligandos candidatos

Se llevó a cabo en PyMol (DeLano, 2002), la preparación de los receptores y en OpenBabel la de los ligandos (O'Boyle et al., 2011), el acoplamiento molecular se llevó a cabo en gmina 1.0 (McNutt et al., 2021) sobre las tres proteínas de interés: la ACTc **Q4CVY4** (*AlphaFold Protein Structure Database*, 2022), ACVI de perro (Uniprot: **Q865C0**) y ACII de humano (PDB: **3B4F**). Los archivos de acoplamiento se obtuvieron en formato .sdf, seleccionando el mejor punto de corte que superara al fármaco control

Acetazolamida (Aaz), la pose con el mejor puntaje se obtuvo al separar y enumerar las conformaciones. Una vez obtenidos los archivos únicos, los complejos proteína-ligando se generaron para el análisis de interacciones en PLIP (por sus siglas en inglés Protein-Ligand Interaction Profile)(Adasme et al., 2021; Salentin et al., 2015). Se utilizó un entorno interactivo (Google COLAB) (Adasme et al., 2021) para ejecutar los códigos con comandos Phyton. Se analizó la accesibilidad comercial de los mejores compuestos y la evaluación de las propiedades de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) se llevó a cabo en la plataforma de Swiss-ADME (Adasme et al., 2021; Daina et al., 2017).

6.3.4 Evaluación biológica en epimastigotes de *T. cruzi*

Para la evaluación *in vitro* se utilizó la metodología propuesta por Domínguez-Díaz y cols., en el 2021, donde se utilizó el estadio epimastigote de las cepas NINOA y A1 de *T. cruzi* para la evaluación de los diferentes compuestos. Ambas cepas se mantuvieron en medio de triptosa de infusión hepática (LIT), suplementado con FBS (suero fetal bovino) al 10% y estreptomycin-penicilina al 0.1%. Estas cepas se preservaron transmitiendo 1×10^6 parásitos/mL a un medio nuevo una vez por semana. Se evaluaron los compuestos candidatos, así como los fármacos control (Nfx, Bzn y Aaz). Los compuestos candidatos fueron resuspendidos a una concentración de 10 mg/mL utilizando DMSO (dimetilsulfóxido) como diluyente. Las diluciones seriadas se realizaron con medio LIT en un rango de 100 a 0.46 $\mu\text{g/mL}$. Se cultivaron 1×10^6 epimastigotes de *T. cruzi* en cada pocillo y se incubaron durante 48 h / 28°C para un volumen total de 200 μL . El DMSO al 0.1% (concentración máxima usada) se usó como control negativo y los fármacos Bzn, Nfx y Aaz como controles positivos. Pasado el periodo de incubación, se agregaron 20 μL de solución de resazurina 2.5 mM a cada pozo y se incubaron durante 3 h. Los ensayos se realizaron por triplicado y el IC_{50} se determinó mediante análisis Probit (Domínguez-Díaz et al., 2021).

6.3.5 Evaluación de Citotoxicidad en Macrófagos

Los ensayos se realizaron mediante la metodología propuesta por Domínguez-Díaz y cols., en el 2021 sobre macrófagos de ratón (J774.2). Las células se cultivaron en medio

LIT con SFB al 10 % y de penicilina (100 U $\mu\text{g}/\text{mL}$) - estreptomina (100 U $\mu\text{g}/\text{mL}$), a 37 °C y CO_2 al 5 %. El medio de cultivo se reemplazó cada 2 a 3 días. Para la evaluación de citotoxicidad se colocó 50, 000 células/pocillo en una placa (96 pocillos) y se dejaron adherir por 24h a 37 °C. Posteriormente, se agregaron los compuestos en concentraciones de 0.8 a 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en un volumen final de 200 μL , incubándose por 48 h a 37 °C con CO_2 al 5%. Se incluyó DMSO al 0.1% (concentración máxima usada) como control negativo y los fármacos como controles positivos. Se utilizó el método de resazurina para medir la actividad metabólica celular, calculando la viabilidad celular (%) y la concentración letal medio (CL_{50}) que fue calculada mediante un análisis Probit (Adasme et al., 2020).

7. RESULTADOS

7.1 Modelado y selección de las proteínas

Los modelos proteicos generados de α -ACTc en los diferentes servidores, así como el gráfico de Ramachandran con las regiones favorecidas se muestran en la **Figura 8**.

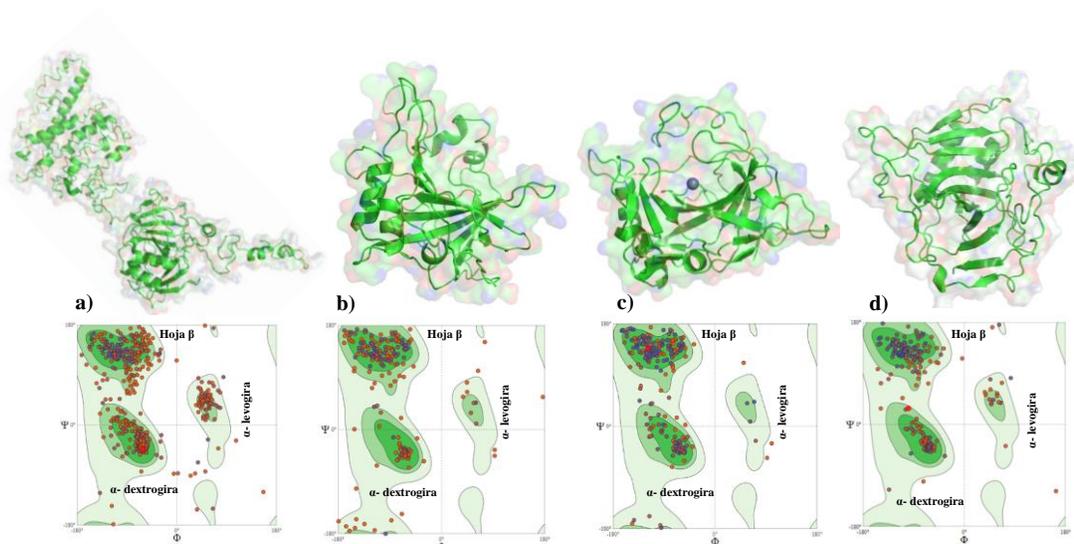


Figura 8. Modelos generados de α -ACTc en las diferentes plataformas; a) Rosetta, b.) Modeller, c) Swiss Model y d) Raptor X. Los gráficos de Ramachandran representan los ángulos diedros phi (Ψ) y psi (Φ) de las lamina β y hélice α en las regiones favorecidas (área verde intenso).

Los resultados de Molprobit, el porcentaje de regiones favorecidas, obtenidas por medio de los gráficos de Ramachandran, el puntaje QMEAN y la longitud de la secuencia obtenidas en SWISS-MODEL Structure Assessment, se muestran en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Valores de MolProbity (\downarrow), Ramachandran ($>98\%$) y QMEANDisCo (0.6 ± 0.05).

Resultados obtenidos en Swiss Model Structure Assessment.

	Modelos				
	a. Rosetta	b. Modeller	c. Swiss-Model	d. Raptor X	e. AlphaFold
Puntaje Molprobity	2.74	3.51	2.99	2.52	1.66
% Regiones favorecidas	87.11	88.26	92.37	89.11	92.92
QMEAN Global	0.052 ± 0.05	0.44 ± 0.05	0.061 ± 0.05	0.61 ± 0.05	0.052 ± 0.05
Tamaño	638	638	264	259	638

Debido a que el modelo proteico propuesto por AlphaFold (ID: Q4CVY4) presentó los mejores parámetros de calidad la secuencia de aminoácidos, fue alineada con algunas proteínas miembros de la familia α : isoformas humanas I (PDB ID: 3LXE), II (3B4F), IX (5F14), XII (5MSA), *Neisseria gonorrhoeae* (1KOP) y *Shistosoma mansoni* (6QQM), usando PDBe Fold (<https://www.ebi.ac.uk/msd-srv/ssm/>) (Krissinel & Henrick, 2005), SeaView (<https://doua.prabi.fr/software/seaview>) (Gouy et al., 2010) and PyMol para visualizar los residuos conservados, la identidad de la secuencia y las coordenadas del sitio activo.

Considerando como referencia los residuos del sitio activo de la isoforma II humana 3B4F (H94, H96, H119, E106 y T199), los residuos para Q4CVY4 fueron H158, H160, H177, E164 y T256. Estos residuos además se encontraron conservados en el resto de las proteínas pertenecientes a la familia α (**Figura 9**).

Para el acoplamiento molecular, se seleccionó el modelo proteico correspondiente a la ACII humana, mediante un análisis de las estructuras y datos publicados en la base de datos PDB con ID PDB: **3B4F** obtenida mediante estudios cristalográficos de rayos X, la cual muestra una resolución de 1.89 Å, una longitud de secuencia de 260 aa, sin mutaciones y con un ligando cristalizado en el sitio activo con ID: TUO / 2-(hydrazinocarbonyl)-3-phenyl-1H-indole-5-sulfonamide.

Las anhidrasas carbónicas de *Canis lupus familiares* no han sido resueltas mediante métodos experimentales y la información es escasa, por lo que se seleccionó el modelo de la ACVI (**Q865C0**) encontrada en la base de datos de Uniprot.

Tanto la proteína blanco (Q4CVY4) como las no blanco (3B4F y Q865C0) se alinearon en Clustal W2 para conocer la posición de los aminoácidos en el sitio activo, así como las coordenadas para el acoplamiento molecular dirigido (**Figura 10**).

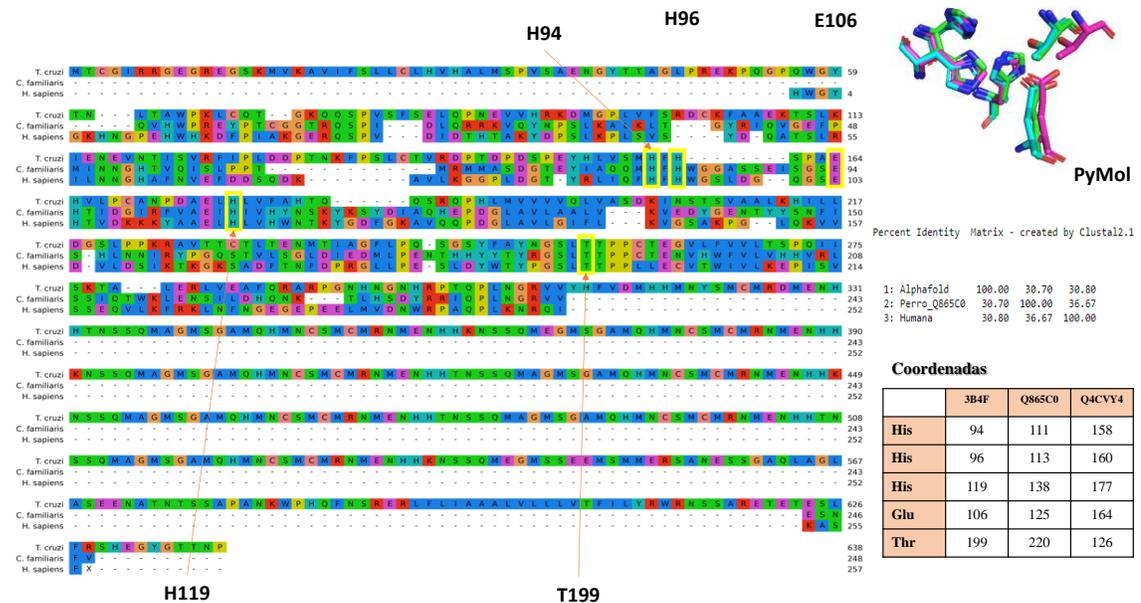


Figura 10. Alineamiento de secuencias de las proteínas, así como la ubicación de las coordenadas de los sitios activos de cada una.

7.2 Cribado virtual

7.2.1 Máxima Subestructura Común (MSC)

Se analizaron inhibidores reportados en la literatura (tioles, hidroxamatos, aniones, sulfonamidas, entre otros) de los cuales se tomaron treinta y dos derivados de sulfonamidas con datos de energía de unión (*in silico*) así como de actividad inhibitoria (*in vitro*). Los compuestos fueron agrupados por similitud tomando como referencia un coeficiente de Tanimoto > 0.8 . Posteriormente un mapa de calor y un dendograma fue generado para ubicar los grupos por similitud, resultando cinco grupos distintos, los cuales fueron visualizados y confirmados en un dendograma utilizando distancias euclidianas. En el mapa de calor, los colores guindos indican los grupos más similares (**Figura 11a**), mientras que en el dendograma se pueden apreciar las identificaciones por grupo (**Figura 11b**).

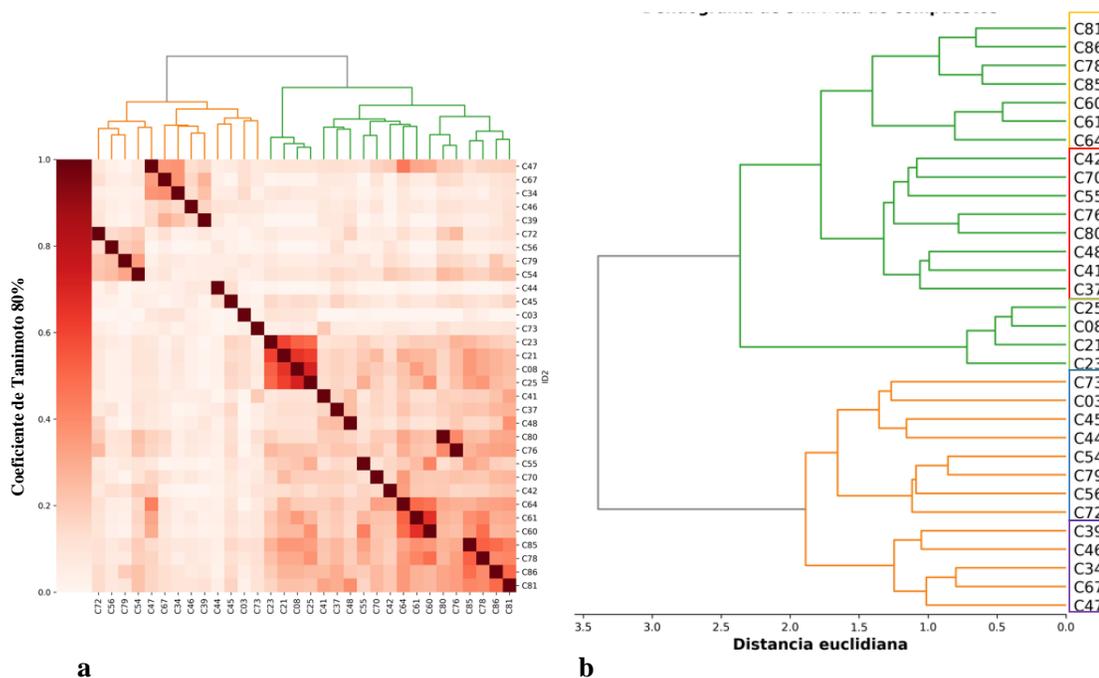


Figura 11. Treinta y dos derivados de sulfonamidas inhibidores de α -ACTc agrupados por similitud estructural

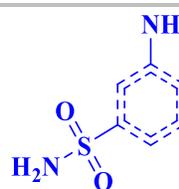
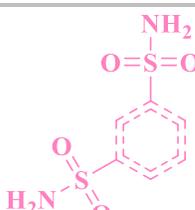
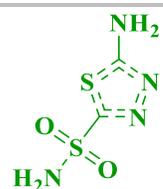
Adicionalmente, se muestran los rangos de inhibición (pKi) y puntaje de acoplamiento molecular (kcal/mol) reportados en la literatura para cada grupo (**Tabla 4**).

Tabla 4. Agrupamiento de derivados de sulfonamidas con actividad inhibitoria sobre la α -ACTc con datos de pKi y energía de unión.

Grupo	Compuestos ID	pKi	(kcal / mol)
1	60, 61, 64, 78, 81, 85, 86	4.13 – 6.72	-8.01 a -11.65
2	37, 41, 42, 48, 55, 70, 76, 80	4.59 – 7.14	-8.0 a -11.22
3	25, 08, 21, 23	8.04 – 8.43	-9.35 a -10.36
4	03, 44, 45, 54, 56, 72, 73, 79	5.03 – 9.02	-8.52 a -13.41
5	34, 39, 46, 47, 67	6.27 – 7.21	-7.8 a -10.47

Basado en el análisis estructural de los ligandos control (Anexo, **Tabla A1**), la MSC representativa de cada grupo fue seleccionado (**Tabla 5**). Estas estructuras representativas fueron posteriormente utilizadas para el cribado de compuestos en las bases de datos ZINC20 y Molport.

Tabla 5. MSC's utilizadas para el cribado virtual en las quimiotecas.

MCS				
1	2	3	4	5
				
4-metilbenzenosulfonamida	4-aminobenzenosulfonamida	N-(4-sulfamoylphenyl)formamida	benzeno-1,3-disulfonamida	5-amino-1,3,4-tiazol-2-sulfonamida
-8.14 kcal/mol pKi: 4.35	-8.22 kcal/mol pKi: 4.59	--	--	-8.77 kcal/mol pKi: 6.27

7.2.2 Cribado virtual en Zinc20 y Molport

La identificación de los nuevos derivados de sulfonamidas con potencial inhibitorio de la α -ACTc, se realizó por similitud y subestructura en ZINC20 y Molport utilizando los 5 andamios (**Tabla 5**). Inicialmente, un total de 1,255 compuestos fueron seleccionados por similitud de ambas quimiotecas, al aplicar la regla de Lipinski, este número se redujo a 232 compuestos. Por otro lado, 1,000 compuestos se obtuvieron a través de la búsqueda por subestructura, resultando en 938 compuestos después de aplicar la regla de Lipinski. Los duplicados fueron eliminados de ambas listas, resultando en un total de 956 compuestos para el análisis de acoplamiento molecular.

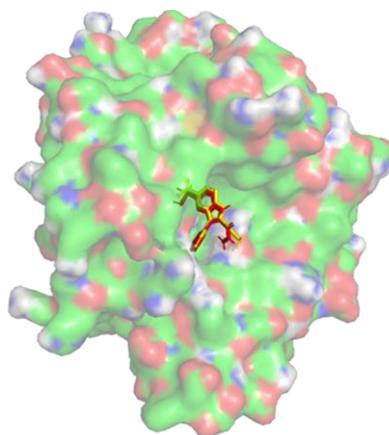
De la base de datos del DrugBank, se obtuvieron 11,585 compuestos de acceso libre de los cuales se filtraron en DataWarrior 642 fármacos derivados de sulfonamidas para llevar a acoplamiento molecular.

En total, se evaluaron 1,830 compuestos de las tres bases de datos cribadas por acoplamiento molecular.

7.2.3 Acoplamiento molecular y análisis de interacciones

7.2.3.1 Validación del acoplamiento

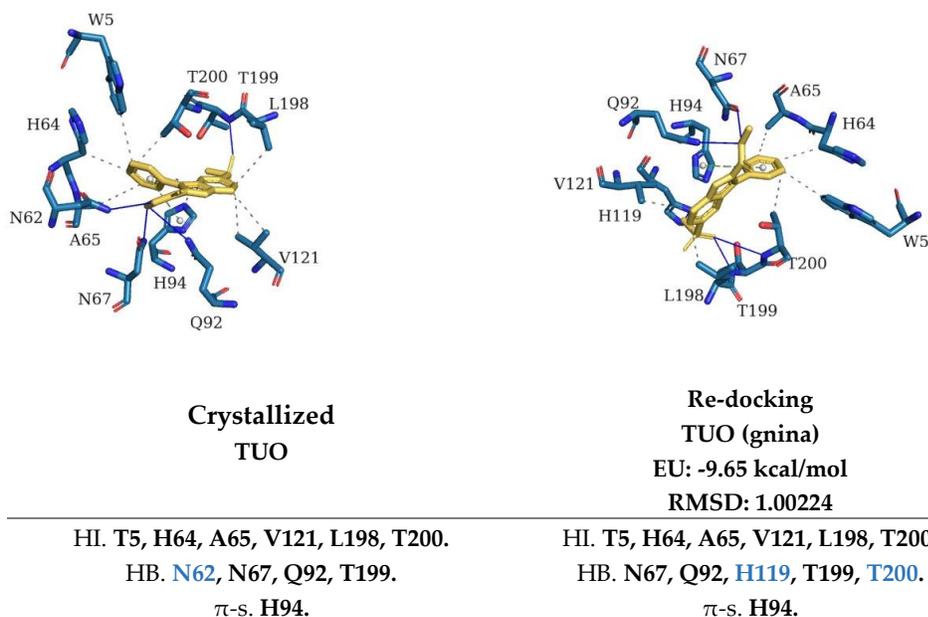
La validación del acoplamiento molecular fue realizada mediante un re-docking obteniendo 9 poses. La mejor de las poses exhibió una energía de unión de -9.65 kcal/mol y una desviación cuadrática media (RMSD) de 1.00224. La proteína cristalizada con el ligando TUO, así como la mejor de las poses obtenidas en el acoplamiento molecular fueron visualizados en PyMol (**Figura 12**). El valor de RMSD fue usado para comparar las diferencias entre las distancias de los átomos del compuesto acoplado y la pose del ligando co-cristalizado, un umbral de 2.0 Å es ampliamente aceptado como un parámetro de acoplamiento aceptable, tal y como lo menciona Coimbra et al., 2020 (Coimbra et al., 2020).



Pose	Afinidad (kcal/mol)	RMSD
1	-9.65	1.00224
2	-8.87	1.39298
3	-9.58	5.78643
4	-6.17	3.24912
5	-7.02	5.68035
6	-6.34	4.53707
7	-4.07	5.55617
8	-6.00	5.7596
9	-4.98	6.50309

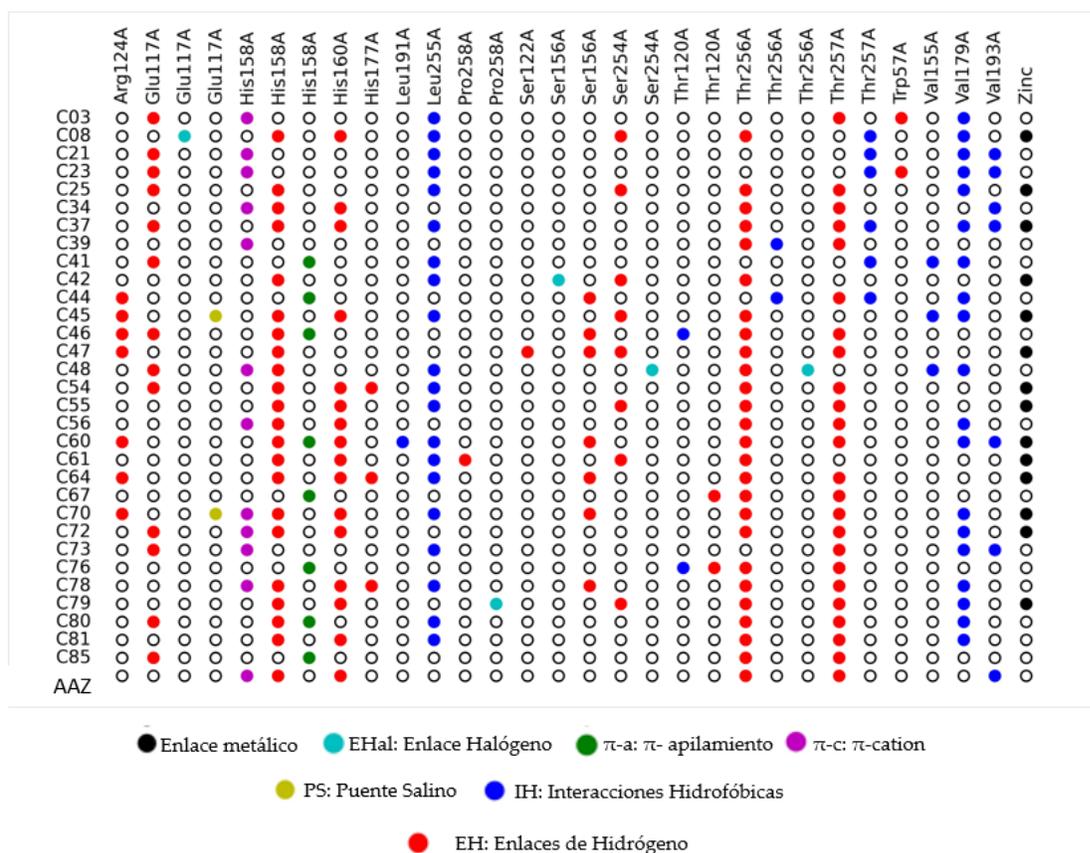
Figura 12. Validación del acoplamiento molecular usando la proteína 3B4F y el ligando cristalizado TUO (rojo), en comparación con la mejor pose generada en Gnina (amarillo).

El análisis de las interacciones se realizó con el software PLIP. Sólo tres interacciones diferían entre las obtenidas en el re-docking y las descritas para el ligando cristalizado (N62, H119, y T200). La comparación de las interacciones antes y después del re-docking se realizaron en PLIP (**Figura 13**).



Adicionalmente, los treinta y dos controles derivados de sulfonamidas usados para obtener las MSC's fueron acopladas sobre el sitio activo de la proteína Q4CVY4 (α -ACTc). El propósito fue evaluar y obtener el patrón de interacción de los controles en términos de energía de unión e interacciones con residuos de aminoácidos en el sitio activo (**Figura 14**). Los compuestos control interactuaron con dos de las histidinas de la triada catalítica, 100% con H158 mediante puentes de hidrogeno (PH), enlaces π -catión (π -c) y π -apilamiento (π -a), 50% con H160 con PH y 44% directamente con el cofactor Zn. Además, más del 80% interactuaron con T256 con PH, interacciones hidrofóbicas (IH) y puentes de halógeno (PHal). Otros residuos también estuvieron involucrados, entre ellos T257 (75% - PH), L255 (63% - IH), V179 (59% - IH), S156 (>20% - PH / PHal), R124 (22% - PH) y V155 (9% - IH).

Figura 14. Perfil de interacciones de los treinta y dos controles derivados de sulfonamidas sobre el sitio activo de la α -ACTc.



**Análisis de interacciones en PLIP.

7.2.3.2 Acoplamiento molecular de los compuestos candidatos de ZINC20 y Molport

956 derivados de sulfonamidas provenientes de las bases de datos ZINC20 y MolPort fueron analizados a través de acoplamiento molecular sobre el sitio activo de la α -ACTc, solo treinta y un compuestos de ellos mostraron un valor de afinidad más bajo que el compuesto control Aaz (-6.94 kcal/mol). Posteriormente, la ecuación de energía de unión (EU) fue aplicada para comparar las afinidades de estos compuestos con respecto a la isoforma II humana y calcular el delta-delta ($\Delta\Delta$). Veintidós compuestos mostraron un valor de $\Delta\Delta > 0$, indicando una selectividad hacia la α -ACTc (Anexo, **Figura A1**). El rango

de $\Delta\Delta$ es de 0.41 a 1.97. Estos veintidós compuestos fueron seleccionados para realizar el análisis de interacciones (**Tabla 6**).

Tabla 6. Energía de unión de compuestos candidatos sobre la enzima α -ACTc con respecto a la isoforma II humana.

ID	α -ACTc EU (kcal/mol)	ACh	* $\Delta\Delta$ (>0)	ID	α -ACTc EU (kcal/mol)	ACh	* $\Delta\Delta$ (>0)
C14	-8.31	-7.19	1.12	C22	-7.27	-6.05	1.22
C24	-8	-6.66	1.34	C25	-7.23	-5.83	1.4
C20	-7.83	-6.56	1.27	C28	-7.19	-5.7	1.49
C3	-7.77	-7	0.77	C19	-7.17	-6.61	0.56
C21	-7.74	-6.42	1.32	C1	-7.14	-5.59	1.55
C7	-7.7	-6.14	1.56	C5	-7.08	-6.31	0.77
C6	-7.61	-6.65	0.96	C9	-7.08	-6.66	0.42
C16	-7.56	-6.05	1.51	C4	-7.03	-5.88	1.15
C18	-7.52	-6.31	1.21	C2	-7.01	-6.05	0.96
C30	-7.48	-6.05	1.43	C8	-7.01	-5.04	1.97
C23	-7.46	-6.36	1.1	C29	-6.97	-6.56	0.41
Punto de corte				Aaz	-6.94	-	-

* $\Delta\Delta > 0$: Energía de unión con más afinidad hacia *T. cruzi*.

7.2.3.2 Acoplamiento molecular de los compuestos candidatos del DrugBank

Al hacer el análisis de los 642 fármacos llevados a acoplamiento, un total de 206 compuestos pasaron el punto, los cuales fueron depurados de aquellos que se encontraban en fase experimental o de investigación, quedando un total de 46 fármacos candidatos (**Tabla 7**). El criterio de aceptación para ligandos candidatos se basó en tres características principales: la energía de unión (kcal/mol) igual o superior al fármaco control (AAZ - 6.94), interacciones con al menos un residuo de interés en el sitio activo o con el cofactor (Anexo, **Tabla A2**) y la disponibilidad comercial del mismo (no en fase experimental y/o investigación).

Tabla 7. Fármacos probados que tuvieron EU (kcal/mol) superior al fármaco control y que interactuaron con al menos un residuo de interés.

#	ID DrugBank	Nombre / Uso actual	EU (Kcal/mol)
1	DB00222	Glimepirida / control glicémico	-8.89059
2	DB11395	Deracoxib / antiinflamatorio no esteroideo	-8.78784
3	DB00214	Torasemida / diurético	-8.3576
4	DB05015	Belinostat / inhibidor de la histona deacetilasa (HDAC)	-8.06812
5	DB00774	Hidroflumetiazida / diurético	-7.99744
6	DB06268	Sitaxentan / hipertensión arterial pulmonar (HAP)	-7.95306
7	DB00310	Clortalidon / diurético	-7.89634
8	DB08881	Vemurafenib / inhibidor de quinasa	-7.80617
9	DB00414	Acetohexamida / agente hipoglucémico	-7.75513
10	DB14033	Acetil sulfisoxazol / antibacterial	-7.73766
11	DB08942	Isoxicam / antiinflamatorio no esteroideo	-7.68557
12	DB00278	Argatroban / inhibidor directo de trombina	-7.678
13	DB00482	Celecoxib / antiinflamatorio no esteroideo	-7.65757
14	DB11461	Sulfaclorpiridazina / antimicrobiano usado para infecciones en el tracto urinario y en la medicina veterinaria	-7.59793
15	DB00263	Sulfisoxazol / antibiótico	-7.50449
16	DB00999	Hidroclorotiazida / diurético	-7.44746
17	DB00695	Furosemida / diurético	-7.43053
18	DB13532	Ciclopentiazida / diurético	-7.41642
19	DB06729	Sulfafenazol / antibacterial	-7.41281
20	DB09289	Tianeptina / antidepresivo	-7.41022
21	DB14973	Abrocitinib / inhibidor de quinasa	-7.40931
22	DB13284	Meticran / diurético	-7.39256
23	DB00808	Indapemida / diurético	-7.36577
24	DB00580	Valdecoxib / inhibidor de COX-2	-7.36238
25	DB13773	Sulfametoxipyridazina / antibiótico	-7.31968
26	DB00436	Bendroflumetiazida / diurético	-7.3034
27	DB15861	Butiazida / diurético	-7.30084
28	DB01120	Gliclazida / antihiper glucémico oral	-7.26964
29	DB11739	Vonoprazan / antiácido	-7.25423
30	DB01015	Sulfametoxazol / antibiótico	-7.22332
31	DB00554	Piroxicam / antiinflamatorio no esteroide	-7.19356

32	DB11462	Sulfametoxipiridazina / antimicrobiano bacteriostático en medicina veterinaria	-7.155
33	DB11464	Sulfaquinoxalina / aprobado en medicina veterinaria para el tratamiento de la coccidiosis	-7.15374
34	DB00880	Clorotiazida / diurético	-7.13221
35	DB06150	Sulfadimetoxina / antibiótico	-7.12105
36	DB01298	Sulfacitina / antibiótico	-7.08479
37	DB08439	Parecoxib / inhibidor COX-2	-7.07132
38	DB01325	Quinetazona / diurético	-7.0671
39	DB00814	Meloxicam / antiinflamatorio no esteroideo	-7.05906
40	DB08912	Dabrafenib / inhibidor de quinasa	-7.03978
41	DB00606	Ciclotiazida / diurético	-7.03976
42	DB01021	Triclormetiazida / diurético	-7.03239
43	DB13165	Ripasudil / inhibidor de quinasa	-6.99768
44	DB09215	Droxicam / antiinflamatorio no esteroideo	-6.94451
45	DB00819	Acetazolamida /Epilepsia y glaucoma	-6.94269
46	DB01124	Tolbutamida / antihiper glucémico	-6.91087

Entre los 46 fármacos candidatos, surgieron principalmente diuréticos, antibacteriales, antiinflamatorios, antihiper glucémicos, etc., incluso dos fármacos utilizados en la medicina veterinaria: sulfacloropiridazina, antimicrobiano utilizado en infecciones de vías urinarias; y sulfaquinoxalina, utilizado para el tratamiento de coccidiosis en ganado vacuno y ovino. La EU osciló en un rango de -6.9 a -8.8 Kcal/mol siendo Glimpirida el fármaco con el valor más bajo.

Para la evaluación *in vitro*, se seleccionaron cuatro fármacos antihiper glucémicos por su disponibilidad comercial (**Figura 15**), sin embargo, no se descartan el resto de los fármacos para evaluaciones posteriores.

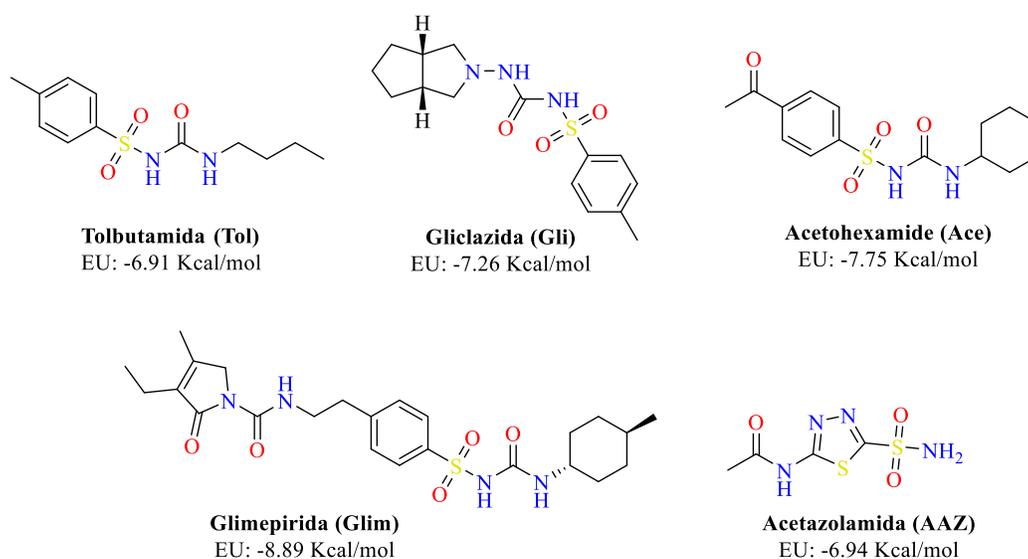


Figura 15. Fármacos candidatos de la base de datos del DrugBank.

7.2.3.3 Análisis de interacciones de los compuestos candidatos

Después del acoplamiento molecular, se realizó el análisis de interacciones de los 27 compuestos candidatos de las tres bases de datos. Todos los ligandos interactuaron con al menos uno de los residuos de la triada catalítica, particularmente H158 e H160 mediante enlaces de puentes de hidrogeno (PH) e interacciones π -catión, además de interacciones con el residuo T256 responsable de orientar al substrato hacia la catálisis. Notablemente, se pudo observar que no hubo interacciones con el residuo H177, un componente crucial de la triada catalítica, o con E164 residuo clave en el proceso de transporte (**Tabla 8**).

Tabla 8. Análisis de interacciones de los compuestos candidatos de las tres bases de datos.
EH: enlaces hidrofóbicos; PH: puentes de hidrogeno; π -c: enlace π -catión; Met: metálico.

ID	Análisis de Interacciones
C14	HI. V179; HB. H158, H160, T256, T257; Met. Zn; π -c. H158.
C24	HI. V155, V179, V193, L255, F266; HB. E117, H158, H160, T256, T257; π -c. H158.
C20	HI. V155, V179, V193, L255, F266; HB. E117, H158, H160, T256, T257; π -c. H158.
C3	HI. V179, V193, L255, F266; HB. H160, T256, T257; SB. E117.

C21	HI. V155, V179, V193, L255, F266; HB. E117, H158 , H160 , T256 , T257; Met. Zn ; π -c. H158 .
C7	HI. V193, L255, F266; HB. H158 , H160 , T256 , T257; SB. E117; π -s. H158 ; Met. Zn .
C6	HI. V179, V193, L255; HB. S156, H158 , H160 , T256 , T257; SB. E117; π -c. H158 .
C16	HI. V179, V193, L255; HB. H158 , H160 , T256 , T257; SB. E117; π -c. H158 .
C18	HI. V179, V193; HB. H158 , H160 , T256 , T257; π -c. H158 .
C30	HI. V179, V193; HB. E117, H158 , H160 , T256 , T257; π -c. H158 .
C23	HI. V155, V179, V193, L255, T256 , F266; HB. H158 , H160 , T256 , T257; SB. E117; π -c. H158 .
C22	HI. V155, V179, V193; HB. E117, H158 , H160 , T256 , T257; π -c. H158 .
C25	HI. V179, V193, L255, F266; HB. H158 , H160 , T256 , T257; π -c. H158 .
C28	HI. V179, V193; HB. E117, H158 , H160 , T256 ; π -c. H158 .
C19	HI. V193, L255, F266; HB. R124, S156, H158 , H160 , T256 , T257; Met. Zn ; π -c. H158 .
C1	HI. V179, V193; HB. E117, H158 , H160 , T256 , T257; π -c. H158 .
C5	HI. V179, V193; HB. H158 , H160 , T256 , T257; π -c. H158 .
C9	HB. H158 , H160 , S254, T256 , T257; Met. Zn .
C4	HI. V193, L255, F266; HB. R124, S156, H158 , H160 , T256 , T257; π -s. H158 .
C2	HI. V179, V193; HB. H158 , H160 , T256 , T257; π -c. H158 .
C8	HI. V193; HB. H158 , H160 , T256 , T257; SB. E117; π -c. H158 .
C29	HI. V193; HB. T120, H158 , H160 , T256 , T257; π -c. H158 .
Glim	HI. W57, E117, V179, V227, L255, T256 , T257, F266; HB. T257; π -c. H158 .
Aceto	HI. P55, W57, E117, V193, L255, F266; HB. T256 , P258; Met. Zn .
Glic	HI. V155, V179, V193, L255; HB. S122, T256 .
Tol	HI. V155, V179, V193, L255, T256 , F266; HB. T257; Met. Zn .
Aaz	HI. V193; HB. H158 , H160 , T256 , T257; π -c. H158 .

Es importante mencionar que un patrón de interacciones no reportadas se pudo observar en la mayoría de los compuestos, principalmente con residuos de V(155, 179, 193), L255, T257 y F266 predominantemente mediante interacciones hidrofóbicas. Además, se encontraron interacciones con E117 mediante puentes salinos. Este patrón de residuos es consistente con los mostrados en los compuestos controles utilizados en este estudio (**Figura 14**).

Por otro lado, cinco compuestos de ZINC y MolPort (C7, C9, C14, C19 y C21), así como dos del DrugBank (Aceto, y Tol) exhibieron interacciones además de los residuos de

interés, con el cofactor en el sitio activo Zn^{+} (**Figura 16 y 17**), característica por la cual estos compuestos fueron seleccionados para su evaluación hacia epimastigotes de las cepas mexicanas A1 y NINOA de *T. cruzi*.

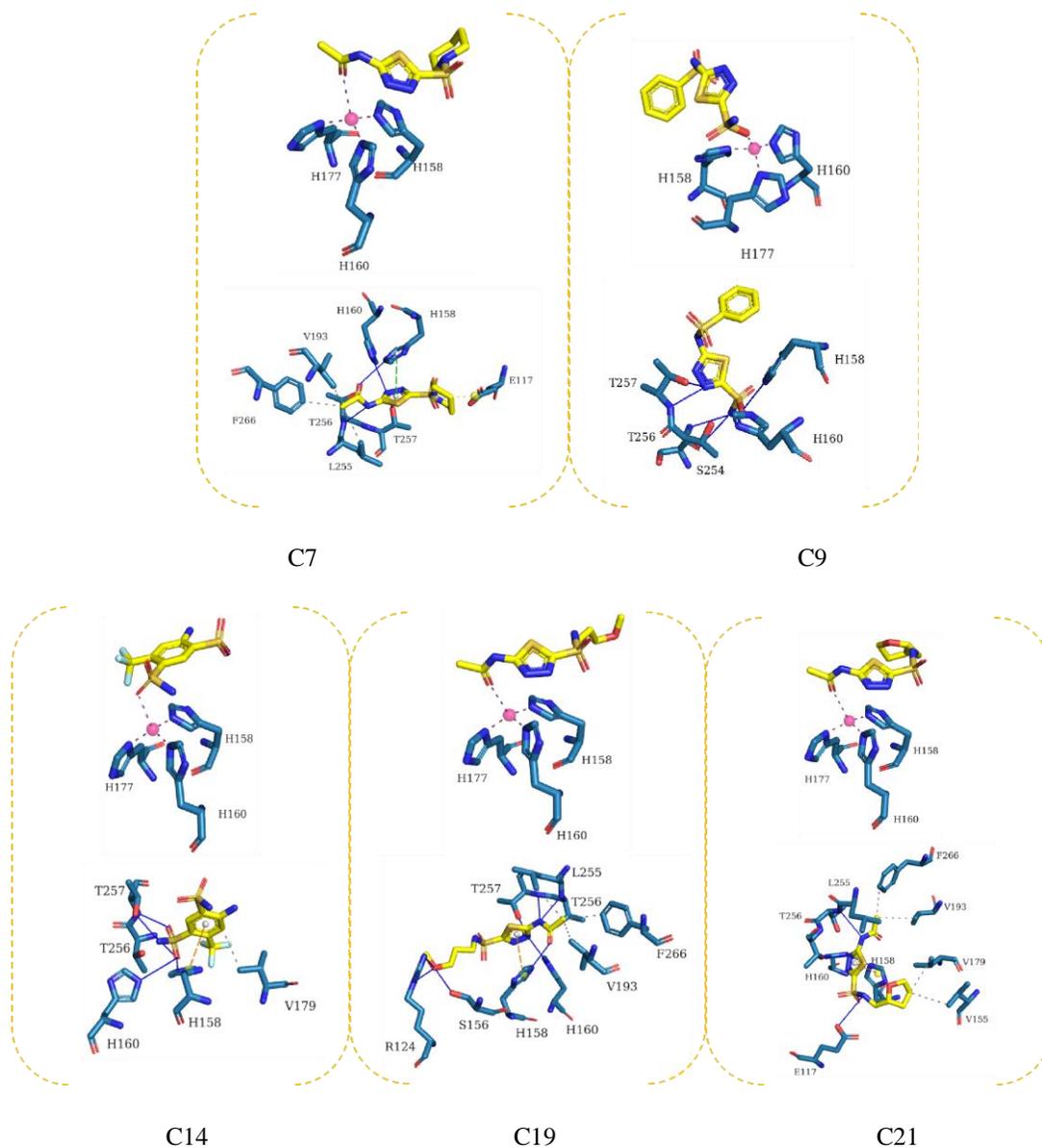


Figura 16. Análisis de interacciones de los compuestos de ZINC y MolPort (amarillo) con los diferentes residuos aminoácidos (azules) sobre el sitio activo de la α -ACTc. El círculo rosa representa al cofactor Zn^{+} .

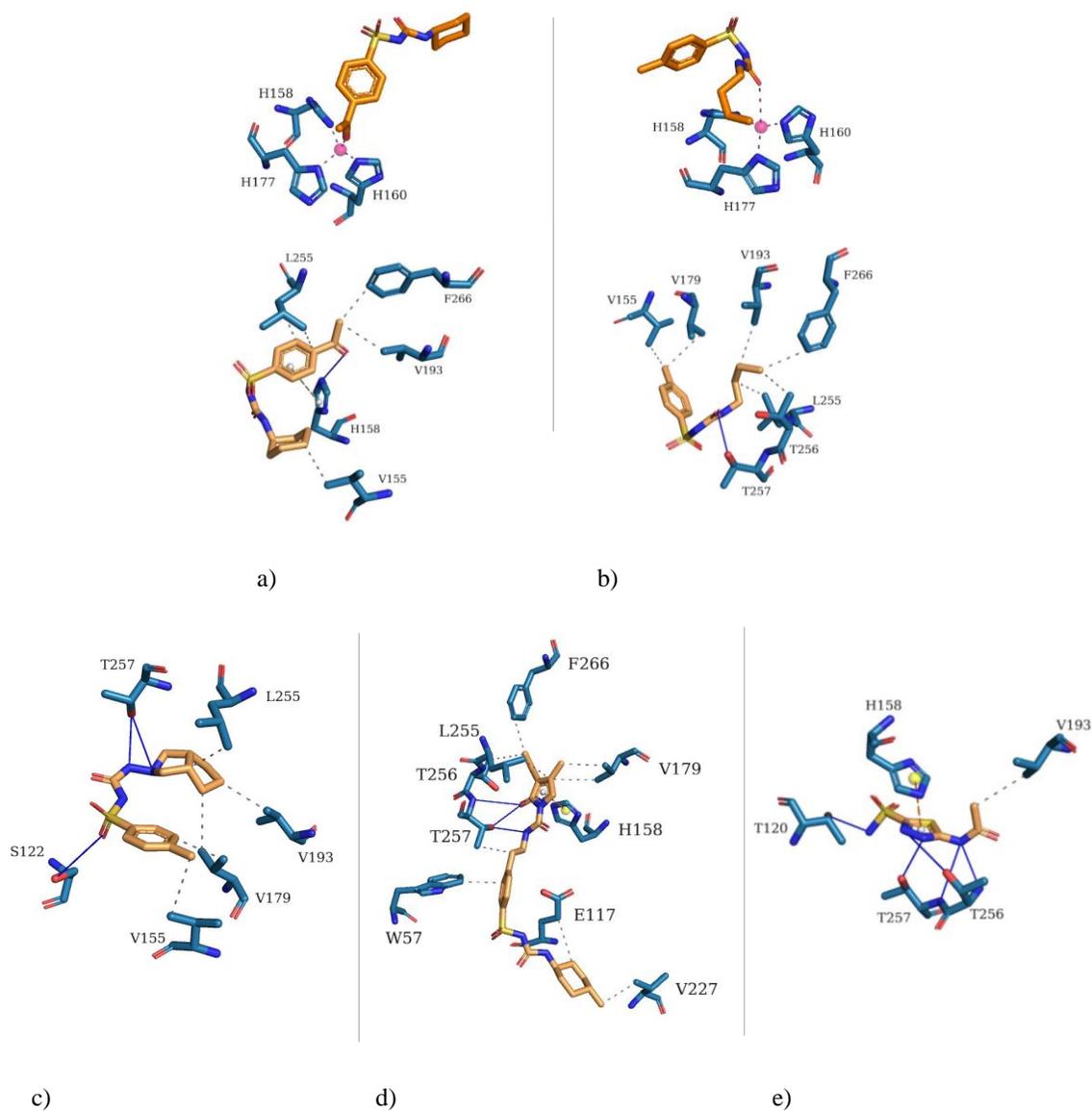


Figura 17. Análisis de interacciones de los compuestos (naranja) del DrugBank con los diferentes residuos aminoacídicos (azules) sobre el sitio activo de la α -ACTc. El círculo rosa representa al cofactor Zn^+ . a) Acetohexamida; b) Tolbutamida; c) Gliclazida; d) Glimepirida; e) Acetazolamida.

7.2.3.4 Análisis de las propiedades biofarmacéuticas y farmacocinéticas

Debido a que los compuestos **C7**, **C9**, **C14**, **C19** y **C21** no son considerados fármacos aprobados para el uso en humanos y/o animales, se realizó un análisis *in silico* de las propiedades lipofílicas, solubilidad, nivel de absorción, permeabilidad a través de la

barrera hematoencefálica (BBB), sustrato de la glicoproteína P (P-gp), inhibidores del citocromo P-450 y accesibilidad sintética a través de Swiss-ADME en comparación con los resultados arrojados por la plataforma AdmetLab (**Tabla 9**).

En general, de acuerdo a lo obtenido en ambas plataformas, las propiedades fisicoquímicas (log P o/w, solubilidad en agua), la absorción (absorción GI), la distribución (unión a proteínas plasmáticas o PPB, permeabilidad BBB, sustrato gP-p) y el metabolismo (inhibidor P450) están dentro de los parámetros aceptables establecidos por ambos servidores. Sólo hubo algunas discrepancias en la comparación de los resultados de absorción GI y permeabilidad hacia la barrera hematoencefálica (BH).

Tabla 9. Predicción *in silico* de las propiedades biofarmacéuticas y farmacocinéticas de los compuestos candidatos.

ID	C7		C9		C14		C19		C21		AAZ	
	SA	AL 2.0	SA	AL 2.0	SA	AL 2.0	SA	AL 2.0	SA	AL 2.0	SA	AL 2.0
Servidor	0.73	1.465	0.23	0.993	0.10	0.046	0.028	0.727	0.045	0.915	-0.62	0.017
Consenso Log P_{ov}	👍	👍	👍	👍	👍	👍	👍	👍	👍	👍	⚠️	👍
Consenso solubilidad en agua	Soluble 👍	-2.465 👍	Soluble 👍	-2.74 👍	Soluble 👍	-2.919 👍	Soluble 👍	-1.851 👍	Soluble 👍	-2.12 👍	Soluble 👍	-2.138 👍
Unión a Proteínas plasmáticas	--	85.85% 👍	--	78.47% 👍	--	52.51% 👍	--	20.55% 👍	--	31.95% 👍	--	38.45% 👍
Absorción GI	Alto 👍	Excelente 👍	Baja ⚠️	Excelente 👍	Baja ⚠️	Excelente 👍	Alto 👍	Excelente 👍	Baja ⚠️	Excelente 👍	Baja ⚠️	Excelente 👍
Permeación BH	No 👍	Baja 👍	No 👍	Excelente ⚠️	No 👍	Excelente ⚠️	No 👍	Baja 👍	No 👍	Baja 👍	No 👍	Baja 👍
Sustrato (P-gp)	No 👍	No 👍	No 👍	No 👍	No 👍	No 👍	No 👍	No 👍	No 👍	No 👍	No 👍	No 👍
Inhibidor P450 (1A2, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4 y 3A5)	No 👍	No 👍	No 👍	No 👍	No 👍	No 👍	No 👍	No 👍	No 👍	No 👍	No 👍	No 👍
Accesibilidad sintética	3.27 👍	--	3.33 👍	--	2.36 👍	--	3.35 👍	--	3.82 👍	--	3.0 👍	--

*SA: Swiss-ADME.

*AL: ADMETLab 2.0.

7.3 Evaluación *in vitro* de los compuestos candidatos

Los compuestos candidatos se llevaron a una evaluación biológica *in vitro* sobre la cepa A1 y NINOA (epimastigotes), así como en células de macrófagos (J774.2) de ratón como (**Tabla 10 y 11**).

En los resultados obtenidos para la cepa NINOA, Ace y Tol mostraron el mejor IC₅₀ con valores de 6.5 ± 2.1 y 8.5 ± 1.4 μM , respectivamente, valores similares al de Nfx (7.1 ± 0.1 μM) y superiores al de Bzn (30.3 ± 0.03 μM), mostrando valores de IS de superior

(30.7 y 23.5) a los fármacos control. C7 mostró un valor de IC₅₀ de 26.1 μM, similar al del Bzn y un IS superior a 7.7 (**Tabla 10**).

Tabla 10. Evaluación tripanocida *in vitro* de los compuestos candidatos (concentración 0.46 a 100 μM) en epimastigotes de la cepa NINOA.

ID	<i>Trypanosoma cruzi</i>	J774.2	° SI
	^a IC ₅₀ (μM ± DS) NINOA	^b CC ₅₀ (μM ± SD)	NINOA
C7	26.1 ± 1.4	> 200	> 7.7
C9	61.6 ± 2.0	119.6 ± 6.8	1.9
C14	> 200	> 200	--
C19	**		
C21	48.9 ± 3.0	89.0 ± 5.96	1.8
Glic	> 200	> 200	--
Glim	70.2 ± 3.2	14.2 ± 2.3	0.2
Ace	6.5 ± 2.1	> 200	> 30.7
Tol	8.5 ± 1.4	> 200	> 23.5
Fármacos de referencia			
Aaz	5.5 ± 1.7	12.6 ± 4.7	2.3
Nfx	7.1 ± 0.1	164.2 ± 0.3	23.2
Bzn	30.3 ± 0.03	133.9 ± 0.06	4.4

En cuanto a la evaluación biológica *in vitro* sobre epimastigotes de la cepa A1, Glic y Glim fueron los compuestos con mejor de IC₅₀, mostrando valores de 10.7 y 37.6 μM superando a la Aaz (15.2) y Nfx (39.1). Además, Glic mostró un valor superior de IS (>18.7) a los tres fármacos control (**Tabla 11**).

Tabla 11. Evaluación tripanocida *in vitro* de los compuestos candidatos (concentración 0.46 a 100 μM) en epimastigotes de la cepa A1.

ID	<i>Trypanosoma cruzi</i> ^aIC₅₀ (μM ± DS) A1	J774.2 ^bCC₅₀ (μM ± DS)	^cIS A1
C7	> 200	> 200	--
C9	78.9 ± 0.5	119.6 ± 6.8	1.51
C14	> 200	> 200	--
C19	**		
C21	> 200	89.0 ± 5.96	> 0.445
Glic	10.7 ± 1.5	> 200	> 18.7
Glim	37.6 ± 1.5	14.2 ± 2.3	0.38
Ace	52.9 ± 2.7	> 200	> 3.8
Tol	> 200	> 200	--
Fármacos de referencia			
Aaz	15.2 ± 2.8	12.6 ± 4.7	2.3
Nfx	39.1 ± 0.07	164.2 ± 0.3	23.2
Bzn	19.3 ± 0.08	133.9 ± 0.06	4.4

^aIC₅₀: Concentración media máxima inhibitoria. ^bCC₅₀: Concentración media máxima de citotoxicidad. ^c IS: índice de selectividad (CC₅₀/IC₅₀). **Comercialmente no disponible.

8. DISCUSIÓN

Inicialmente, cinco MSC's fueron obtenidas de inhibidores de la α -ACTc para llevar a cabo el cribado virtual basado en ligando. La característica más predominante entre las MSC's fue un anillo benceno o tiazol unido a un grupo sulfonamida, clave característica de los inhibidores clásicos de AC. Posteriormente, la estructura tridimensional de la α -ACTc fue generada debido a que no existe una estructura mediante métodos experimentales, sin embargo, todos los modelos mostraron un puntaje de MolProbity entre 2.52 y 3.51, con excepción del modelo de AlphaFold que obtuvo un bajo puntaje de 1.66. Este parámetro es importante debido a que refiere al puntaje de calidad asignado que refleja la resolución cristalográfica, así como la calidad con la que se esperaría. El puntaje ideal es lo más bajo posible.

Por otro lado, el gráfico de Ramachandran es la representación que muestra las posibles conformaciones de aminoácidos en términos de ángulos de torsión phi (Φ) and psi (Ψ). Es usado para entender la estructura proteica, así como ilustrar las regiones permitidas (favorables) y no permitidas (desfavorables) de la conformación de los aminoácidos. El parámetro aceptable es $> 98\%$. Ninguno de los modelos tuvo parámetros aceptables en el gráfico de Ramachandran, sin embargo, el modelo obtenido de AlphaFold obtuvo el mayor porcentaje con un 92.92%.

Por su parte, los resultados del Global QMEANDisCo muestran que solo la proteína generada en Raptor X tuvo un criterio aceptable con un valor de 0.6 ± 0.05 . Este parámetro evalúa la calidad de la estructura proteica, es calculado considerando varios parámetros incluyendo; la similitud estructural de otras proteínas conocidas, la calidad de los datos experimentales y la coherencia interna de la estructura (Studer et al., 2020). Generalmente, una estructura con un valor superior a 0.7 es considerada con alta calidad, mientras que un valor menor a 0.5 indica baja calidad.

De acuerdo con Llanos et al., es importante resaltar que a pesar de la existencia de numerosas estructuras cristalizadas mediante métodos experimentales de ACs en el PDB, no hay una secuencia base con una similitud superior al 40% para la α -ACTc. Por

consecuencia, generar un modelo tridimensional por homología que cumpla los parámetros de calidad ha resultado ser todo un reto (Llanos et al., 2020). A pesar de esta limitación, los modelos generados fueron evaluados con la finalidad de identificar el más adecuado. Entre estos modelos, el obtenido de la plataforma AlphaFold mostró las mejores características, el cual cumple con dos de los parámetros considerados y posee una secuencia adecuada de 638 aminoácidos. Cabe señalar que AlphaFold emplea técnicas de redes neuronales convolucionales (aprendizaje profundo) para predecir con precisión la estructura tridimensional de las proteínas a partir de secuencias primarias de aminoácidos (Jumper et al., 2021).

En los alineamientos reportados por otros autores, se ha observado una alta conservación en los residuos del sitio activo de las isoformas de la familia α , particularmente en la triada catalítica (His) y en los residuos que orientan los ligandos hacia el sitio activo (Glu y Thr). Sin embargo, en el análisis de la secuencia de la α -ACTc el residuo lanzador de protones comúnmente encontrado en la mayoría de las isoformas de esta familia (His64, de acuerdo con la nomenclatura de la isoforma II humana) no fue encontrado, en su lugar, es reemplazado por Asn (N). Este aminoácido es responsable de transferir un protón de la molécula de agua coordinada al medio ambiente, formando una especie nucleófila de hidróxido de zinc de la enzima (Güzel-Akdemir et al., 2013)(Supuran et al., 2020)(Pan, Vermelho, Scozzafava, et al., 2013b). Se hipotetiza que otros residuos de histidina en la región amino terminal de α -ACTc pueden participar en estos procesos (Llanos et al., 2020).

En los estudios de acoplamiento molecular es muy importante validar el procedimiento, por lo tanto, se replicó un análisis del ligando co-cristalizado (TUO: 2-(hidrazinocarbonil)-3-fenyl-1H-indol-5-sulfonamida) co-cristalizado en la isoforma II humana utilizando el software gmina. Un valor de RMSD inferior a 2 Å se considera generalmente fiable para una pose conocida (McNutt et al., 2021). En este estudio se obtuvo un valor de RMSD de 1 Å, por lo tanto, se confirmó la validación del acoplamiento molecular con este software. Otro factor clave para encontrar nuevos ligandos potenciales mediante acoplamiento molecular es conocer el perfil de interacciones de los inhibidores en el sitio activo. En este sentido, el análisis de los inhibidores derivados de sulfonamidas

(controles) mostró que interactuaban con múltiples residuos de aminoácidos en el sitio activo, principalmente H158, H160 y T256, a través de enlaces de hidrógeno e interacciones π -catión. Se predijo que el 40% de los controles interactuaba con el cofactor (Zn^+), una interacción clave en el proceso de inhibición. Con el patrón de interacciones obtenido se pudo determinar los inhibidores potenciales candidatos en el cribado virtual. Es importante también mencionar que se observó un esquema de interacción significativo con residuos de aminoácidos reportados por Guzel-Akdemir y cols., en el 2013, en particular V179, L255, V193, T257 y E117 en este estudio, se analizaron una serie de sulfonamidas heterocíclicas y aromáticas utilizando un modelo proteico tridimensional modelado por homología. Ellos concluyeron que los mejores compuestos interactuaron con estos residuos mediante puentes de hidrogeno y enlaces hidrofóbicos respectivamente. Además, en este trabajo también se encontró una interacción marcada con V155, lo que los autores marcan como algo favorable ya que está ausente en las isoformas I y II humanas (Güzel-Akdemir et al., 2013). Estos datos, así como la energía de unión del fármaco de referencia (Aaz), fueron utilizados para seleccionar los compuestos: **C21, C19, C14, C9 y C7**.

Los compuestos antes mencionados contienen un anillo 1,3,4-tidiazol que ha sido reportado por algunos autores como una estructura presente en agentes antiparasitarios incluyendo; leishmanicidas, antimaláricos y tripanocidas (Vázquez-Jiménez et al., 2022)(Palos et al., 2017)(Tahghighi & Babalouei, 2017). Además, **C7, C19 y C21** tienen una similitud con la estructura del fármaco control Aaz, excepto que en el grupo sulfonamida tienen una sustitución alifática. Reportes previos sugieren que estas extensiones estructurales pueden favorecer la actividad inhibitoria de los compuestos (Vullo et al., 2016). Desafortunadamente, en la búsqueda de disponibilidad comercial, el compuesto **C19** no está disponible. Por su parte, los compuestos **C7, C9, C21 y C19** se investigaron en el NCBI, Google Scholar y Binding DB (*Binding DB*, 2020) para la búsqueda de reportes previos de actividad inhibitoria sobre la anhidrasa carbónica de algún organismo. El análisis no mostró datos de inhibición *in silico* o *in vitro* excepto para los compuestos **C9 y C14**.

El compuesto **C9** es un fármaco autorizado (Benzolamida) perteneciente a un grupo de inhibidores de la anhidrasa carbónica denominados sulfonamidas. Al ser más hidrófilo y menos lipofílico que la acetazolamida, este fármaco se ha considerado una opción viable en enfermedades en las que conviene limitar su absorción en el sistema nervioso tanto central como periférico y otros órganos como los riñones, evitando al mismo tiempo los efectos secundarios de la acetazolamida, en particular cefalea, somnolencia, náuseas y vómitos (Collier et al., 2016). Este fármaco ha sido objeto de estudios enzimáticos en diferentes anhidrasas carbónicas además de la humana, ejemplo de ello son los trabajos de Vullo et al., 2014, donde realizaron ensayos con las isoformas hACI y hACII, así como α -ACTc, AC de *L. donovani chagasi* (ACLdc) y *Plasmodium falciparum* (ACPf), obteniendo valores de K_I de 15, 9, 93, 236 y 1330 nM, respectivamente (Vullo et al., 2015). Los autores consideraron el **C9** como un inhibidor de α -ACTc por su valor de $K_I < 100$ nM, lo que se vio respaldado por los efectos biológicos *in vitro* mostrados en este trabajo sobre epimastigotes de la cepa NINOA con valores de IC_{50} de 61.6 μ M.

Por otra parte, **C14** mostró la mejor afinidad hacia la α -ACTc en este estudio. En los últimos años, **C14** ha sido el enfoque de extensa investigación, incluso forma parte de los compuestos que se utilizaron como controles (**C72**, Tabla A1). Interesantemente Pan y cols., reportaron a **C14** con una actividad inhibitoria media contra la α -ACTc ($K_I = 842$ nM), comparado con otros derivados de sulfonamidas heterocíclicos (Pan, Vermelho, Capaci Rodrigues, et al., 2013). Llanos y cols. por su parte, reportaron datos *in silico* de **C14** mostrando una energía de unión de - 8.52 Kcal/mol, una energía de unión parecida a la obtenida en este trabajo (- 8.31 Kcal/mol) y un valor de K_I de 6.07 nM. Existen otros reportes acerca de los efectos biológicos de **C14** contra otras ACs, por ejemplo: Nishimori y cols., reportó a **C14** con valores de K_I de 24, 45 y 680 nM contra las isoformas IX, XII y XIV de la α -ACh respectivamente, con una alta selectividad hacia las isoformas IX y XII expresada en procesos carcinogénicos (Nishimori et al., 2005)(Angeli et al., 2020). En otro estudio, Del Prete y cols., evaluaron a **C14** contra dos α -ACs (hACI y hACII), así como una γ -AC (*Porphyromonas gingivalis*) y dos β -ACs (*H. pylori* y *P. gingivalis*). Sus resultados mostraron una preferencia significativa hacia la isoforma ACIIIh, con un valor de 63 nM. Sin embargo la actividad inhibitoria de las β -isoformas fueron menos

pronunciadas (973 y 4,765 nM, respectivamente) y en la isoforma γ -AC mostró un valor de K_I de 711 nM (Prete et al., 2014). En otro estudio encontrado contra la β -AC del mosquito *Anopheles gambiae* (ACAg), **C14** tuvo un valor elevado de K_I de 4,360 nM en comparación con el valor de 63 nM mostrado hacia la isoforma hACII (Syrjänen et al., 2015). Adicionalmente Vullo y cols., obtuvieron valores de 5800, 63 y 67.2 contra las isoformas hACI, hACII y α -AC de la gamma proteobacteria *Thiomicrospira crunogena* XCL-2 (*ACTruc*) comparada contra la isoforma hCAI (Vullo et al., 2016). Toda esta información muestra que **C14** exhibe una notable afinidad hacia las isoformas α , los cuales soportan los resultados *in silico* obtenidos en este trabajo. A pesar de los amplios antecedentes sobre la inhibición enzimática del **C14**, como se mencionó anteriormente Pan et al., mencionan una moderada – alta inhibición enzimática sobre la α -ACTc (K_I = 842 nM), este dato pudo ser corroborado en los resultados obtenidos en este estudio sobre las cepas NINOA y A1, ya que la evaluación en epimastigotes reveló valores superiores a 200 μ M en ambas cepas.

C7 y **C21** por su parte, tuvieron actividad frente a NINOA con IC_{50} de 26 y 49 μ M, respectivamente, e índices de selectividad (IS) que oscilaron entre 1.8 y más de 7.7. Cabe destacar que **C7** superó a Bzn, con un IC_{50} de 30.3 μ M (IS = 4.4).

Con respecto a la cepa A1 sólo **C9** dio una actividad moderada con IC_{50} de 78.86 μ M y un IS de 1.51, el resto (**C7** y **C21**) tuvieron valores > 200 μ M. **C7** y **C21** tienen una similitud con la estructura de la Aaz, con excepción a la sustitución alifática orientada hacia el grupo sulfonamida. Reportes anteriores han indicado que dichas ampliaciones pueden influir positivamente en la actividad inhibidora de los compuestos (Vullo et al., 2016), por lo tanto, la actividad inhibitoria que distingue a dichos compuestos de otros del grupo puede atribuirse a esta característica (en el caso de la cepa NINOA).

Debido a que los compuestos **C7**, **C9**, **C21** y **C19** no son fármacos aprobados para el uso en humanos y/o animales, se realizó el análisis de propiedades biofarmacéuticas y farmacocinéticas, las cuales juegan un rol crucial en la predicción de la eficacia y seguridad de los potenciales fármacos. Durante las etapas iniciales del descubrimiento de fármacos, la predicción de estas propiedades puede ayudar a minimizar el riesgo de falla

de la molécula en las fases clínicas posteriores. El coeficiente de partición de n-octanol a agua $\text{Log } P_{o/w}$ es un parámetro bien establecido que se utiliza para evaluar la lipofilicidad de un compuesto. En Swiss ADME, múltiples modelos predictivos son empleados para asegurar una estimación precisa generando valores consenso. El software incorpora cinco modelos predictivos (XLOGP3, WLOGP, MLOGP, SILICOS-IT, y iLOGP), para obtener la media aritmética de los valores predichos por los modelos. Típicamente, los compuestos con valores de $\text{Log } P$ entre 0 a 5 son considerados como compuestos con propiedades lipofílicas favorables (Daina et al., 2017). Notablemente, los compuestos **C7**, **C9**, **C14**, **C19** y **C21** obtuvieron un valor consenso $\text{Log } P$ entre 0.10 a 0.73, indicando excelentes propiedades lipofílicas superando al compuesto control.

Además, se observó que todos los compuestos exhibieron solubilidad en agua, un parámetro crucial en el manejo y formulación de un fármaco efectivo, particularmente en proyectos con enfoque en la administración oral, debido a que puede tener un impacto significativo en la absorción. Para la predicción de solubilidad en agua, Swiss ADME emplea un consenso de métodos tipológicos nombrados ESOL, ALI, y SILICOS-IT. Estos resultados son expresados en $\text{Log } S$ (logaritmo decimal de la solubilidad molar en agua). Adicionalmente, ninguno mostró permeabilidad a través de la barrera hematoencefálica (BBB), esto es altamente favorable considerando que *T. cruzi* y su ciclo de vida gira principalmente en el torrente sanguíneo y el tejido muscular como musculo esquelético, intestino, corazón, esófago, entre otros, más que al sistema nervioso (De Fuentes-Vicente et al., 2019).

Por el contrario la P-gp (glicoproteína P) que es un transportador transmembrana inducido por ATP puede eliminar activamente una gama amplia de compuestos diversos estructuralmente y no relacionados, secuestrando y expulsando eficazmente sustancias del entorno celular (Ambudkar et al., 2003). Es importante señalar que ninguno de los candidatos está asociado con esta glicoproteína, lo que indica la ausencia de mecanismos potenciales de resistencia hacia ellos. De acuerdo con Orr y cols., el mecanismo de los fármacos esta mediado por reacciones de fase I y II en las que los complejos enzimáticos son los responsables de la biotransformación de las moléculas (Ambudkar et al., 2003). Una de las enzimas bien conocidas en este proceso es el Citocromo P450 (CYP450), que

pertenece a una superfamilia que cataliza el metabolismo oxidativo de moléculas estructuralmente diversas, incluyendo fármacos y ácidos grasos. Dentro de esta familia, las isoformas CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 y 3A4/3A5 juegan un rol significativo en el metabolismo de aproximadamente el 80% de los fármacos del mercado. Además, más de la mitad de estos agentes son metabolizados por la subfamilia CYP3A (Ambudkar et al., 2003). Usando Swiss-ADME, fue posible predecir la inhibición de los compuestos candidatos hacia las principales subfamilias de CYP450 mencionadas anteriormente. Los resultados fueron negativos lo que es bastante positivo debido a que cuando estas enzimas son inhibidas, se puede impedir el metabolismo de otros fármacos o sustancias, permitiendo potencialmente la interacción fármaco-fármaco. En términos de accesibilidad sintética, los ligandos candidatos obtuvieron una puntuación inferior a cuatro en una escala del uno al diez, lo que indica su alto potencial para una síntesis sencilla. Los resultados obtenidos en Swiss-ADME fueron comparados con los datos arrojados en el servidor AdmetLab, siendo la mayor parte de ellos similares con excepción de algunas discrepancias en los parámetros de absorción gastrointestinal.

Del cribado virtual del DrugBank, los fármacos candidatos (Tol, Glic, Glim y Aceto) están catalogados como sulfonilureas de primera y segunda generación, que actualmente se usan para el tratamiento de la *Diabetes mellitus*, estimulando las células β pancreáticas (Farwa & Raza, 2022; Drugbank, 2023). En los datos publicados en el DrugBank, estos fármacos están autorizados también para el uso en el área veterinaria. Los resultados de acoplamiento molecular sobre el sitio activo de la enzima (α -ACTc) arrojaron resultados de EU (energía de unión) superiores a la Aaz (-6.94 Kcal/mol). Además, se predijo que Tol y Aceto interactuaron con el cofactor (Zn) y otros residuos de interés como la T256 encargada de orientar al sustrato hacia la catálisis. Por su parte, Glic mostró interacciones con T256 (puentes de hidrogeno) al igual que Glim que interactuó también con H158 (enlaces π -c). Parecido al resto de los compuestos provenientes de ZINC20 y MolPort, estos fármacos mostraron un patrón de interacciones con residuos aminoacídicos descritos por Güzel-Akdemir et al., 2013, particularmente V179, V193, V155, E117, T257 y L255 (Güzel-Akdemir et al., 2013).

Los fármacos candidatos (Glim, Glic, Tol y Ace) del DrugBank se llevaron a evaluación en epimastigotes de dos cepas mexicanas NINOA y A1, así como a evaluación de citotoxicidad sobre macrófago de ratón, línea J774.2. Glic y Glim mostraron datos de inhibición sobresalientes hacia la cepa A1, con valores de IC₅₀ de 10.7 y 37.6 μM con respecto a Nfx y Bzn, que mostraron valores de 19.3 y 39.0 μM respectivamente, e incluso Glic obtuvo un mejor IC₅₀ que la Aaz (15.1 μM). Es importante recalcar que los fármacos que se predijeron con afinidad hacia el cofactor Zinc en la evaluación *in silico* (Tol y Aceto), tuvieron los valores de IC₅₀ más favorables hacia NINOA con valores de 8.5 y 6.5 μM respectivamente, valores ligeramente por encima de Nfx (7.1 μM), Aaz (5.5 μM). Mientras que en los ensayos de citotoxicidad tanto la Tol, Glic y Aceto mostraron valores de IS > 23.5, 18.7 y 30.7 respectivamente, superando a los fármacos de referencia. Como se pudo concluir con los resultados *in vitro*, Glim y Glic resultaron con mayor selectividad hacia A1, mientras que Tol y Aceto hacia NINOA. Con respecto a esto, algunos reportes mencionan que la posible selectividad de los compuestos hacia una cepa por encima de otra puede deberse a que cada cepa muestra propiedades distintas de infectividad (heterogeneidad de las características biológicas), actividad metabólica, expresión enzimática, susceptibilidad a fármacos y la resistencia natural. También, se ha reportado que la diversidad genética del parásito influye en la evolución de la enfermedad, la presentación de síntomas clínicos y respuesta a los tratamientos (Vela et al., 2021).

En el análisis bibliográfico, no se encontraron reportes de reposicionamiento de estos fármacos como inhibidores de la anhidrasa carbónica de ningún organismo, lo cual es un dato positivo para la innovación de este trabajo, sin embargo, hay estudios de fármacos hipoglucémicos propuestos como inhibidores del dihidrofolato reductasa - timidilato sintasa (DHFR-TS, por sus siglas en inglés) de *T. cruzi*, una proteína que cataliza la reducción de folato a tetrahidrofolato y la subsecuente síntesis de timidilato, un precursor esencial en la síntesis de ADN. En ese trabajo, Juárez-Saldívar et al., 2020, propusieron 10 fármacos candidatos (antihipertensivos, inhibidores de tirosina quinasa, incontinencia urinaria, enfermedad de Parkinson, trombocitopenia y anti-diabetes) que mostraron una afinidad superior al fármaco control trimetrexato (-8.5 Kcal/mol) en la evaluación *in silico*. Tres fármacos antidiabéticos (gliclazida, gliburida and gliquidona), fueron

seleccionados para evaluación en un modelo *in vitro* de epimastigote. Los autores concluyeron que la glipizida y gliquidona tuvieron los mejores valores de CI_{50} de 13.4 ± 6 y 12 ± 5 μM respectivamente, superando al benznidazol con 12 ± 2 μM , mientras la gliburida tuvo un CI_{50} de 66 ± 12 μM . Es importante notar que el andamio presente en la Estructura química de estos fármacos N-(ciclohexilcarbamoil)benzenosulfonamida esta además presente en gliburida and acetohexamida, que mostraron la actividad inhibitoria en ambas cepas probadas en este trabajo.

Existen otros estudios similares utilizando herramientas bioinformáticas para evaluar fármacos aprobados en otros blancos farmacológicos de *T. cruzi*, un ejemplo de ello es el realizado por Lara-Ramírez y cols., en el 2017, en este trabajo, los autores propusieron la evaluación *in silico* de cuatro fármacos con propiedades antihistamínicas, antihipertensivas, antiinflamatorias y antibióticas como inhibidores de la *trans*-sialidasa, confirmando este análisis con evaluaciones en tripomastigotes y mostrando valores de CL_{50} en un rango de 4.5 a 25.8 $\mu\text{g/ml}$, con respecto a los fármacos de referencia Nfx y Bzn (CL_{50} de 36.1 a 46.8 $\mu\text{g/ml}$). Los autores concluyeron que de los fármacos evaluados, la Sulfasalazina (antiinflamatorio) mostró los mejores efectos tripanocidas a corto plazo en el análisis *in vivo* sobre la cepa NINOA con un CL_{50} de 19.3 ± 1.2 $\mu\text{g/mL}$ (Lara-Ramirez et al., 2017). En otro estudio realizado el mismo año, Palos y cols., propusieron mediante herramientas bioinformáticas un fármaco antilipémico (clofibrato de etofilina) y tres antibióticos de la familia de las β -lactamas (piperacilina, cefoperazona y flucloxacilina) como inhibidores de la cruzañina, los cuales al ser evaluados mostraron efectos tripanocidas con valores de CL_{50} en un rango de 15.8 a 26.1 $\mu\text{g/mL}$ en comparación con los fármacos control Bzn y Nfx (CL_{50} 33.1 – 46.7 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente) (Palos et al., 2017). Por otro lado, Adasme y cols., propusieron el reposicionamiento del ciprofloxacín (antibiótico), ácido fólico (vitamina) y naproxeno (analgésico) cómo inhibidores de tres blancos diferentes en *T. cruzi* (*trans*-sialidasa, FPPS y *TcDHFR* respectivamente). Estos fármacos tuvieron una actividad inhibitoria sobre las cepas de NINOA e INC5 en rango micromolar (IC_{50} 21.3 – 38.3 μM), debido a esto, se llevó a cabo el ensayo de parasitemia *in vivo*, mostrando un % de inhibición del 57.2, 66.7 y 85.8 para el ácido fólico, ciprofloxacín y naproxeno respectivamente, en comparación

con el Nfx (77.8%) en la cepa NINOA. Por otro lado, sobre la cepa INC5 mostraron una inhibición del 66.7, 43.8 y 42.9% respectivamente ocho horas después de la administración en comparación con Nfx (72.3%) (Adasme et al., 2020). Estos datos, indican que el reposicionamiento de fármacos es una vía potencial para encontrar candidatos potenciales antitrypanosomas.

En los resultados encontrados en este trabajo, se concluye que la variabilidad de los valores de IC_{50} entre las dos cepas puede deberse a varios factores: i) La selectividad de los compuestos hacia una cepa a diferencia de otra podría variar debido a la heterogeneidad de las características biológicas. (ii) Las cepas presentan propiedades distintas relacionadas con la infectividad, la actividad metabólica, la expresión enzimática, la susceptibilidad a los fármacos en las pruebas *in vitro* y la resistencia inherente (Vela et al., 2021). (iii) En algunos reportes se ha mencionado que la polaridad del compuesto y su incapacidad para atravesar las membranas biológicas, podrían dificultar su capacidad para inhibir la enzima del parásito en entornos *in vitro* (Güzel-Akdemir et al., 2013).

Cabe destacar que este estudio representa la primera evaluación de estos compuestos en cepas autóctonas mexicanas y podría servir como guía para el desarrollo de inhibidores de ACs más eficaces para el tratamiento de la tripanosomiasis en animales.

9. CONCLUSIONES

La técnica de modelado por homología permitió obtener la estructura tridimensional de cuatro proteínas de la α -ACTc en diferentes servidores, modelos que fueron funcionales debido a que se pudo ubicar el sitio activo en todos ellos para realizar el acoplamiento dirigido.

Las cinco máximas subestructuras comunes (MSC), calculadas a partir de los compuestos de sulfonamidas controles encontrados en la literatura, permitieron hacer un cribado por similitud y subestructura en las quimiotecas propuestas (ZINC20 y MolPort). Del cribado virtual basado en acoplamiento molecular, se pudieron obtener nueve compuestos con características de afinidad, interacciones importantes en la predicción *in silico* y propiedades biofarmacéuticas y farmacocinéticas, por lo cual fueron considerados para su evaluación *in vitro* (**C7**, **C9**, **C14**, **C21**, **Glic**, **Glim**, **Ace** y **Tol**) en epimastigotes de las cepas NINOA y A1.

Tanto **C7**, **Ace** y **Tol** mostraron los mejores valores de IC_{50} hacia la cepa NINOA (26.1, 6.5 y 8.5 respectivamente), superando a los fármacos control Bzn ($30.3 \pm 0.03 \mu\text{M}$) y Nfx ($7.1 \pm 0.1 \mu\text{M}$), sin embargo, ninguno superó a la Aaz con IC_{50} de 5.5 ± 1.7 . En cuanto al IS, es importante resaltar que estos compuestos superaron a los fármacos controles con valores superiores a 7.7, 30.7 y 23.5 respectivamente. Tanto **Ace** y **Tol** en la predicción *in silico* mostraron interacción directa con el cofactor (Zn^+), además de otros residuos del sitio activo, atributo que podría justificar su destacada propiedad inhibitoria.

Glic y **Glim** por su parte, fueron los compuestos candidatos con mejores valores de IC_{50} hacia la cepa A1 con valores de 10.7 y $37.6 \pm 1.5 \mu\text{M}$ respectivamente, superando a los fármacos control Bzn ($19.3 \pm 0.08 \mu\text{M}$) y Aaz ($15.2 \pm 2.8 \mu\text{M}$). Solo **Glic** obtuvo un IS superior a 18.7.

Este trabajo, da la pauta para proponer compuestos candidatos con potencial inhibitorio hacia dos cepas endémicas de este país, como una opción de tratamiento para la tripanosomiasis en animales.

10. PERSPECTIVA

Bajo el marco trazado por esta investigación, quedan las siguientes líneas para futuros trabajos:

- ✓ Análisis de la inhibición enzimática de los compuestos candidatos.
- ✓ Análisis de los niveles de expresión del gen *ACTc* mediante PCR tiempo real en epimastigotes al ser confrontados con los compuestos propuestos en este trabajo.
- ✓ Dinámica molecular de los candidatos sobre el sitio activo de la enzima *ACTc* a 200 ns.
- ✓ Evaluación en epimastigotes y tripomastigotes de los fármacos utilizados actualmente en el área veterinaria (sulfacloropiridazina y sulfaquinoxalina), así como su evaluación enzimática.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adasme, M. F., Bolz, S. N., Adelman, L., Salentin, S., Haupt, V. J., Moreno-Rodríguez, A., Noguera-Torres, B., Castillo-Campos, V., Yopez-Mulia, L., De Fuentes-Vicente, J. A., Rivera, G., & Schroeder, M. (2020). Repositioned drugs for chagas disease unveiled via structure-based drug repositioning. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(22), 1–22. <https://doi.org/10.3390/ijms21228809>
- Adasme, M. F., Linnemann, K. L., Bolz, S. N., Kaiser, F., Salentin, S., Haupt, V. J., & Schroeder, M. (2021). PLIP 2021: Expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA. *Nucleic Acids Research*, *49*(W1), W530–W534.
- Alafeefy, A. M., Ceruso, M., Al-Jaber, N. A., Parkkila, S., Vermelho, A. B., & Supuran, C. T. (2015). A new class of quinazoline-sulfonamides acting as efficient inhibitors against the α -carbonic anhydrase from *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *30*(4), 581–585. <https://doi.org/10.3109/14756366.2014.956309>
- AlphaFold Protein Structure Database*. (2022). <https://www.alphafold.ebi.ac.uk/>
- Ambudkar, S. V., Kimchi-Sarfaty, C., Sauna, Z. E., & Gottesman, M. M. (2003). P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene*, *22*(47), 7468–7485.
- Andrade, Z. A., & Andrade, S. G. (1980). A patologia da doença de Chagas experimental no cão. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *75*, 77–95.
- Angeli, A., Carta, F., Nocentini, A., Winum, J.-Y., Zalubovskis, R., Akdemir, A., Onnis, V., Eldehna, W. M., Capasso, C., & Simone, G. De. (2020). Carbonic anhydrase inhibitors targeting metabolism and tumor microenvironment. *Metabolites*, *10*(10), 412.
- Arce-Fonseca, M., Carrillo-Sánchez, S. C., Molina-Barrios, R. M., Martínez-Cruz, M., Cedillo-Cobián, J. R., Henao-Díaz, Y. A., & Rodríguez-Morales, O. (2017). Seropositivity for *Trypanosoma cruzi* in domestic dogs from Sonora, Mexico.

Infectious Diseases of Poverty, 6(1), 3–9. <https://doi.org/10.1186/s40249-017-0333-z>

Barr, S. C. (2009). Canine Chagas' Disease (American Trypanosomiasis) in North America. *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice*, 39(6), 1055–1064. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2009.06.004>

Binding DB. (2020). <https://www.bindingdb.org/rwd/bind/index.jsp>

Bonardi, A., Parkkila, S., & Supuran, C. T. (2022). Inhibition studies of the protozoan α -carbonic anhydrase from *Trypanosoma cruzi* with phenols. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 37(1), 2417–2422.

Caldas, I. S., da Matta Guedes, P. M., dos Santos, F. M., de Figueiredo Diniz, L., Martins, T. A. F., da Silva do Nascimento, A. F., Azevedo, M. A., de Lima, W. G., Neto, R. M. N., & Torres, R. M. (2013). Myocardial scars correlate with electrocardiographic changes in chronic *Trypanosoma cruzi* infection for dogs treated with Benznidazole. *Tropical Medicine & International Health*, 18(1), 75–84.

Caldas, I. S., de Jesus Menezes, A. P., de Figueiredo Diniz, L., do Nascimento, Á. F. da S., Novaes, R. D., Caldas, S., & Bahia, M. T. (2019). Parasitaemia and parasitic load are limited targets of the aetiological treatment to control the progression of cardiac fibrosis and chronic cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi*-infected dogs. *Acta Tropica*, 189, 30–38.

Campos, M. C. O., Leon, L. L., Taylor, M. C., & Kelly, J. M. (2014). Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: evidence that distinct mechanisms can act in concert. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 193(1), 17–19.

Capasso, C., & Supuran, C. T. (2015). Bacterial, fungal and protozoan carbonic anhydrases as drug targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 19(12), 1689–1704. <https://doi.org/10.1517/14728222.2015.1067685>

Carvalho, E. B., Ramos, I. P. R., Nascimento, A. F. S., Brasil, G. V., Mello, D. B., Oti, M., Sammeth, M., Bahia, M. T., Campos de Carvalho, A. C., & Carvalho, A. B. (2019). Echocardiographic measurements in a preclinical model of chronic Chagasic

cardiomyopathy in dogs: validation and reproducibility. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 9, 332.

Centers for Disease Control and Prevention. (2022). Web. https://www.cdc.gov/parasites/chagas/gen_info/vectors/index.html

Coimbra, J. R. M., Baptista, S. J., Dinis, T. C. P., Silva, M., Moreira, P. I., Santos, A. E., & Salvador, J. A. R. (2020). Combining virtual screening protocol and in vitro evaluation towards the discovery of BACE1 inhibitors. *Biomolecules*, 10(4), 535.

Collier, D. J., Wolff, C. B., Hedges, A., Nathan, J., Flower, R. J., Milledge, J. S., & Swenson, E. R. (2016). Benzolamide improves oxygenation and reduces acute mountain sickness during a high-altitude trek and has fewer side effects than acetazolamide at sea level. *Pharmacology Research & Perspectives*, 4(3), e00203.

Cunha, E. L. A., da Silva Torchelsen, F. K. V., Cunha, L. M., de Oliveira, M. T., da Silva Fonseca, K., Vieira, P. M. A., Carneiro, C. M., & de Lana, M. (2019). Benznidazole, itraconazole and their combination in the treatment of acute experimental chagas disease in dogs. *Experimental Parasitology*, 204, 107711.

Cunha, E. L. A., Torchelsen, F. K. V. da S., Cunha, L. M., de Oliveira, M. T., Fonseca, K. da S., Vieira, P. M. A., Carneiro, C. M., & de Lana, M. (2019). Benznidazole, itraconazole and their combination in the treatment of acute experimental chagas disease in dogs. *Experimental Parasitology*, 204(May), 107711. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.05.005>

da Matta Guedes, P. M., Veloso, V. M., Tafuri, W. L., da Cunha Galvao, L. M., Carneiro, C. M., de Lana, M., Chiari, E., Soares, K. A., & Bahia, M. T. (2002). The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. *Acta Tropica*, 84(1), 9–17.

Daina, A., Michielin, O., & Zoete, V. (2017). SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Scientific Reports*, 7(October 2016), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep42717>

Daliry, A., Caldas, I. S., de Figueiredo Diniz, L., Torres, R. M., Talvani, A., Bahia, M. T.,

- & de Carvalho, A. C. C. (2014). Anti-adrenergic and muscarinic receptor autoantibodies in a canine model of Chagas disease and their modulation by benznidazole. *International Journal of Cardiology*, *170*(3), e66–e67.
- 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., Rodríguez-López, M. H., & Gutiérrez-Cabrera, A. E. (2019). Trypanosoma cruzi: A review of biological and methodological factors in Mexican strains. *Acta Tropica*, *195*(April), 51–57. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.04.024>
- de Lana, M., & Giunchetti, R. C. (2020). Dogs as a Model for Chemotherapy of Chagas Disease and Leishmaniasis. *Current Pharmaceutical Design*, *27*(14), 1741–1756. <https://doi.org/10.2174/1381612826666201228142703>
- DeLano, W. L. (2002). Pymol: An open-source molecular graphics tool. *CCP4 Newsl. Protein Crystallogr*, *40*(1), 82–92.
- Domínguez-Díaz, L. R., Ochoa, M. E., Soto-Castro, D., Farfán, N., Morales-Chamorro, M., Yépez-Mulia, L., Pérez-Campos, E., Santillan, R., & Moreno-Rodríguez, A. (2021). In vitro, ex vivo and in vivo short-term screening of DHEA nitrate derivatives activity over Trypanosoma cruzi Ninoa and TH strains from Oaxaca State, México. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *48*, 116417.
- Drugbank*. (2023). <https://go.drugbank.com/drugs/DB00158>
- Enriquez, G. F., Cardinal, M. V., Orozco, M. M., Schijman, A. G., & Gürtler, R. E. (2013). Detection of Trypanosoma cruzi infection in naturally infected dogs and cats using serological, parasitological and molecular methods. *Acta Tropica*, *126*(3), 211–217.
- Estrada-Franco, J. G., Bhatia, V., Diaz-Albiter, H., Ochoa-Garcia, L., Barbabosa, A., Vazquez-Chagoyan, J. C., Martinez-Perez, M. A., Guzman-Bracho, C., & Garg, N. (2006). Human Trypanosoma cruzi infection and seropositivity in dogs, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, *12*(4), 624–630. <https://doi.org/10.3201/eid1204.050450>
- Eswar, N., Eramian, D., Webb, B., Shen, M.-Y., & Sali, A. (2008). Protein structure

modeling with MODELLER. *Structural Proteomics: High-Throughput Methods*, 145–159.

Farwa, U., & Raza, M. A. (2022). Heterocyclic compounds as a magic bullet for diabetes mellitus: a review. *RSC Advances*, 12(35), 22951–22973. <https://doi.org/10.1039/d2ra02697j>

Filigheddu, M. T., Górgolas, M., & Ramos, J. M. (2017). Enfermedad de Chagas de transmisión oral. *Medicina Clínica*, 148(3), 125–131.

Gomes, C., Almeida, A. B., Rosa, A. C., Araujo, P. F., & Teixeira, A. R. L. (2019). American trypanosomiasis and Chagas disease: Sexual transmission. *International Journal of Infectious Diseases*, 81, 81–84.

Gouy, M., Guindon, S., & Gascuel, O. (2010). SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular Biology and Evolution*, 27(2), 221–224.

Guarner, J. (2019). Chagas disease as example of a reemerging parasite. *Seminars in Diagnostic Pathology*, 36(3), 164–169. <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2019.04.008>

Güzel-Akdemir, Ö., Akdemir, A., Pan, P., Vermelho, A. B., Parkkila, S., Scozzafava, A., Capasso, C., & Supuran, C. T. (2013). A class of sulfonamides with strong inhibitory action against the α -carbonic anhydrase from trypanosoma cruzi. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(14), 5773–5781. <https://doi.org/10.1021/jm400418p>

Herrera-Mayorga, V., Lara-Ramírez, E. E., Chacón-Vargas, K. F., Aguirre-Alvarado, C., Rodríguez-Páez, L., Alcántara-Farfán, V., Cordero-Martínez, J., Noguera-Torres, B., Reyes-Espinosa, F., Bocanegra-García, V., & Rivera, G. (2019). Structure-based virtual screening and in vitro evaluation of new trypanosoma cruzi cruzain inhibitors. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijms20071742>

Irwin, J. J., Tang, K. G., Young, J., Dandarchuluun, C., Wong, B. R., Khurelbaatar, M., Moroz, Y. S., Mayfield, J., & Sayle, R. A. (2020). ZINC20—a free ultralarge-scale chemical database for ligand discovery. *Journal of Chemical Information and*

Modeling, 60(12), 6065–6073.

Jimenez-coello, M., Ortega-pacheco, A., Guzman-marin, E., Guiris-andrade, D. M., Martinez-figueroa, L., & Acosta-viana, K. Y. (2010). Stray Dogs as Reservoirs of the Zoonotic Agents. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10(2), 135–141.

Jimenez-Coello, M., Poot-Cob, M., Ortega-Pacheco, A., Guzman-Marin, E., Ramos-Ligonio, A., Sauri-Arceo, C. H., & Acosta-Viana, K. Y. (2008). American trypanosomiasis in dogs from an urban and rural area of Yucatan, Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8(6), 755–761. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0224>

Juárez-Saldivar, A., Schroeder, M., Salentin, S., Joachim Haupt, V., Saavedra, E., Vázquez, C., Reyes-Espinosa, F., Herrera-Mayorga, V., Villalobos-Rocha, J. C., García-Pérez, C. A., Campillo, N. E., & Rivera, G. (2020). Computational drug repositioning for chagas disease using protein-ligand interaction profiling. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(12), 1–16. <https://doi.org/10.3390/ijms21124270>

Jumper, J., Evans, R., Pritzel, A., Green, T., Figurnov, M., Ronneberger, O., Tunyasuvunakool, K., Bates, R., Žídek, A., Potapenko, A., Bridgland, A., Meyer, C., Kohl, S. A. A., Ballard, A. J., Cowie, A., Romera-Paredes, B., Nikolov, S., Jain, R., Adler, J., ... Hassabis, D. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 596(7873), 583–589. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>

Kim, D. E., Chivian, D., & Baker, D. (2004). Protein structure prediction and analysis using the Robetta server. *Nucleic Acids Research*, 32(suppl_2), W526–W531.

Krissinel, E., & Henrick, K. (2005). Multiple alignment of protein structures in three dimensions. *International Symposium on Computational Life Science*, 67–78.

Krungskrai, J., & Supuran, C. (2008). The Alpha-Carbonic Anhydrase from the Malaria Parasite and its Inhibition. *Current Pharmaceutical Design*, 14(7), 631–640. <https://doi.org/10.2174/138161208783877901>

Lara-Ramirez, E. E., López-Cedillo, J. C., Noguera-Torres, B., Kashif, M., Garcia-Perez,

- C., Bocanegra-Garcia, V., Agusti, R., Uhrig, M. L., & Rivera, G. (2017). An in vitro and in vivo evaluation of new potential trans-sialidase inhibitors of *Trypanosoma cruzi* predicted by a computational drug repositioning method. *European Journal of Medicinal Chemistry*, *132*, 249–261. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.03.063>
- Llanos, M. A., Sbaraglini, M. L., Villalba, M. L., Ruiz, M. D., Carrillo, C., Alba Soto, C., Talevi, A., Angeli, A., Parkkila, S., & Supuran, C. T. (2020). A structure-based approach towards the identification of novel antichagasic compounds: *Trypanosoma cruzi* carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *35*(1), 21–30.
- Lomelino, C. L., Andring, J. T., & McKenna, R. (2018). Crystallography and Its Impact on Carbonic Anhydrase Research. *International Journal of Medicinal Chemistry*, *2018*, 1–21. <https://doi.org/10.1155/2018/9419521>
- López, R., Pedro, A., Martínez^a, I., Martínez-ibarra, A., & Arce-fonseca, M. (2014). *R E V I S T A A R G E N T I N A D E Seroprevalence and major antigens recognized by sera.*
- Mansoldo, F. R. P., Carta, F., Angeli, A., Cardoso, V. da S., Supuran, C. T., & Vermelho, A. B. (2020). Chagas Disease: Perspectives on the Past and Present and Challenges in Drug Discovery. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *25*(22), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules25225483>
- McNutt, A. T., Francoeur, P., Aggarwal, R., Masuda, T., Meli, R., Ragoza, M., Sunseri, J., & Koes, D. R. (2021). GNINA 1.0: molecular docking with deep learning. *Journal of Cheminformatics*, *13*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s13321-021-00522-2>
- Mejia, A. M., Hall, B. S., Taylor, M. C., Gómez-Palacio, A., Wilkinson, S. R., Triana-Chávez, O., & Kelly, J. M. (2012). Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *The Journal of Infectious Diseases*, *206*(2), 220–228.
- MolPort*. (2022). <https://www.molport.com/shop/index>
- Nishimori, I., Vullo, D., Innocenti, A., Scozzafava, A., Mastrolorenzo, A., & Supuran, C.

- T. (2005). Carbonic anhydrase inhibitors: Inhibition of the transmembrane isozyme XIV with sulfonamides. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *15*(17), 3828–3833. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2005.06.055>
- Nocentini, A., Cadoni, R., Dumy, P., Supuran, C. T., & Winum, J. Y. (2018). Carbonic anhydrases from *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani* chagasi are inhibited by benzoxaboroles. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *33*(1), 286–289. <https://doi.org/10.1080/14756366.2017.1414808>
- Nocentini, A., Vullo, D., Bartolucci, G., & Supuran, C. T. (2016). N-Nitrosulfonamides: a new chemotype for carbonic anhydrase inhibition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, *24*(16), 3612–3617.
- O’Boyle, N. M., Banck, M., James, C. A., Morley, C., Vandermeersch, T., & Hutchison, G. R. (2011). Open Babel: An open chemical toolbox. *Journal of Cheminformatics*, *3*(1), 1–14.
- Ozensoy Guler, O., Capasso, C., & Supuran, C. T. (2016). A magnificent enzyme superfamily: carbonic anhydrases, their purification and characterization. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *31*(5), 689–694. <https://doi.org/10.3109/14756366.2015.1059333>
- paho. (n.d.). Retrieved August 11, 2023, from https://ais.paho.org/hip/viz/cha_cd_vectorborndiseases.asp
- Palos, I., Lara-Ramirez, E. E., Lopez-Cedillo, J. C., Garcia-Perez, C., Kashif, M., Bocanegra-Garcia, V., Noguera-Torres, B., & Rivera, G. (2017). Repositioning FDA drugs as potential cruzain inhibitors from *Trypanosoma cruzi*: Virtual screening, in vitro and in vivo studies. *Molecules*, *22*(6). <https://doi.org/10.3390/molecules22061015>
- Pan, P., Vermelho, A. B., Capaci Rodrigues, G., Scozzafava, A., Tolvanen, M. E. E., Parkkila, S., Capasso, C., & Supuran, C. T. (2013). Cloning, characterization, and sulfonamide and thiol inhibition studies of an α -carbonic anhydrase from *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Journal of Medicinal*

Chemistry, 56(4), 1761–1771.

Pan, P., Vermelho, A. B., Scozzafava, A., Parkkila, S., Capasso, C., & Supuran, C. T. (2013a). Anion inhibition studies of the α -carbonic anhydrase from the protozoan pathogen *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21(15), 4472–4476. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.05.058>

Pan, P., Vermelho, A. B., Scozzafava, A., Parkkila, S., Capasso, C., & Supuran, C. T. (2013b). Anion inhibition studies of the α -carbonic anhydrase from the protozoan pathogen *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 21(15), 4472–4476. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.05.058>

Peña-Callejas, G., González, J., Jiménez-Cortés, J. G., De Fuentes-Vicente, J. A., Salazar-Schettino, P. M., Bucio-Torres, M. I., Cabrera-Bravo, M., & Flores-Villegas, A. L. (2022). Chagas disease: biology and transmission of *Trypanosoma cruzi*. *TIP Revista Especializada En Ciencias Químico-Biológicas*, 25(June), 1–19. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2022>

Prete, S. Del, Vullo, D., Osman, S. M., Scozzafava, A., Alothman, Z., Capasso, C., & Supuran, C. T. (2014). Sulfonamide inhibition study of the carbonic anhydrases from the bacterial pathogen *Porphyromonas gingivalis*: The β -class (PgiCA β) versus the γ -class (PgiCA) enzymes. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 22(17), 4537–4543. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.07.048>

Protein Data Bank. (2022). <https://www.rcsb.org/>

Raptor X: Protein Structure and Function Prediction. (2021). <http://raptorx.uchicago.edu/>

RDKit. (2022). <https://www.rdkit.org/>

Reungprapavut, S., Krungkrai, S. R., & Krungkrai, J. (2004). Plasmodium falciparum carbonic anhydrase is a possible target for malaria chemotherapy. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 19(3), 249–256. <https://doi.org/10.1080/14756360410001689577>

- Rodrigues, G. C., Feijó, D. F., Bozza, M. T., Pan, P., Vullo, D., Parkkila, S., Supuran, C. T., Capasso, C., Aguiar, A. P., & Vermelho, A. B. (2014). Design, synthesis, and evaluation of hydroxamic acid derivatives as promising agents for the management of Chagas disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, *57*(2), 298–308. <https://doi.org/10.1021/jm400902y>
- Rojo-Medina, J., Ruiz-Matus, C., Salazar-Schettino, P. M., & González-Roldán, J. F. (2018). Enfermedad de Chagas en México. *Gaceta Medica de Mexico*, *154*(5), 605–612. <https://doi.org/10.24875/GMM.18004515>
- Ruiz Aguilar, M. E. (2013). “SEROPREVALENCIA Y FACTORES DE RIESGO ASOCIADOS A *Trypanosoma cruzi* EN PERROS DE COMUNIDADES RURALES DEL MUNICIPIO DE LA ANTIGUA, VERACRUZ, MÉXICO.”
- Salomon, C. J. (2012). First century of chagas’ disease: An overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, *101*(3), 888–894.
- Santos, F. M., Lima, W. G., Gravel, A. S., Martins, T. A. F., Talvani, A., Torres, R. M., & Bahia, M. T. (2012). Cardiomyopathy prognosis after benznidazole treatment in chronic canine Chagas’ disease. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, *67*(8), 1987–1995.
- Santos, F. M., Mazzeti, A. L., Caldas, S., Goncalves, K. R., Lima, W. G., Torres, R. M., & Bahia, M. T. (2016). Chagas cardiomyopathy: The potential effect of benznidazole treatment on diastolic dysfunction and cardiac damage in dogs chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, *161*, 44–54.
- Secretaria de Salud. *Manual enfermedad de Chagas*. (2019). <https://www.gob.mx/salud/>
- Singh, B., Varikuti, S., Halsey, G., Volpedo, G., Hamza, O. M., & Satoskar, A. R. (2019). Host-directed therapies for parasitic diseases. *Future Medicinal Chemistry*, *11*(16), 1999–2018. <https://doi.org/10.4155/fmc-2018-0439>
- Studer, G., Rempfer, C., Waterhouse, A. M., Gumienny, R., Haas, J., & Schwede, T. (2020). QMEANDisCo-distance constraints applied on model quality estimation.

Bioinformatics (Oxford, England), 36(6), 1765–1771.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz828>

Supuran, C. T. (2010). Carbonic anhydrase inhibitors. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 20(12), 3467–3474. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.05.009>

Supuran, C. T. (2016a). How many carbonic anhydrase inhibition mechanisms exist? *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 31(3), 345–360.

Supuran, C. T. (2016b). Inhibition of carbonic anhydrase from *Trypanosoma cruzi* for the management of Chagas disease: an underexplored therapeutic opportunity. *Future Medicinal Chemistry*, 71(10), 643. <https://doi.org/10.2307/j.ctvnwc0d0.18>

Supuran, C. T. (2016c). Inhibition of carbonic anhydrase from *Trypanosoma cruzi* for the management of Chagas disease: an underexplored therapeutic opportunity. *Future Medicinal Chemistry*, 8(3), 311–324.

Supuran, C. T. (2016d). Inhibition of carbonic anhydrase from *Trypanosoma cruzi* for the management of Chagas disease: An underexplored therapeutic opportunity. *Future Medicinal Chemistry*, 8(3), 311–324. <https://doi.org/10.4155/fmc.15.185>

Supuran, C. T., Llanos, M. A., Sbaraglini, M. L., Villalba, M. L., Ruiz, M. D., Carrillo, C., Alba Soto, C., Talevi, A., Angeli, A., Parkkila, S., & Supuran, C. T. (2020). *Inhibition of carbonic anhydrase from Trypanosoma cruzi for the management of Chagas disease: an underexplored therapeutic opportunity*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*; Taylor & Francis. <https://www.alphafold.ebi.ac.uk/>

Syrjänen, L., Kuuslahti, M., Tolvanen, M., Vullo, D., Parkkila, S., & Supuran, C. T. (2015). The β -carbonic anhydrase from the malaria mosquito *Anopheles gambiae* is highly inhibited by sulfonamides. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 23(10), 2303–2309. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2015.03.081>

Tahghighi, A., & Babalouei, F. (2017). Thiadiazoles: The appropriate pharmacological scaffolds with leishmanicidal and antimalarial activities: A review. *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*, 20(6), 613.

- Teixeira, D. E., Benchimol, M., Crepaldi, P. H., & de Souza, W. (2012). Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of *Trypanosoma cruzi*, the Causative Agent of Chagas Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(8), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001749>
- The Center of Food Security and Public Health. (2009). <https://www.cfsph.iastate.edu/es/enfermedades/factsheets/>
- Toso, A., Vial, F., & Galanti, N. (2011). Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. *Revista Médica de Chile*, 139(2), 258–266.
- Vázquez-Jiménez, L. K., Juárez-Saldivar, A., Gómez-Escobedo, R., Delgado-Maldonado, T., Méndez-Álvarez, D., Palos, I., Bandyopadhyay, D., Gaona-Lopez, C., Ortiz-Pérez, E., Noguera-Torres, B., Ramírez-Moreno, E., & Rivera, G. (2022). Ligand-Based Virtual Screening and Molecular Docking of Benzimidazoles as Potential Inhibitors of Triosephosphate Isomerase Identified New Trypanocidal Agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(17). <https://doi.org/10.3390/ijms231710047>
- Vázquez-Jiménez, L. K., Moreno-Herrera, A., Juárez-Saldivar, A., González-González, A., Ortiz-Pérez, E., Paz-González, A. D., Palos, I., Ramírez-Moreno, E., & Rivera, G. (2021). Recent Advances in the Development of Triose Phosphate Isomerase Inhibitors as Antiprotozoal Agents. *Current Medicinal Chemistry*, 29(14), 2504–2529. <https://doi.org/10.2174/0929867328666210913090928>
- Vázquez-Jiménez, L. K., Paz-González, A. D., Juárez-Saldivar, A., Uhrig, M. L., Agusti, R., Reyes-Arellano, A., Noguera-Torres, B., & Rivera, G. (2020). Structure-Based Virtual Screening of New Benzoic Acid Derivatives as *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase Inhibitors. *Medicinal Chemistry*, 17(7), 724–731. <https://doi.org/10.2174/1573406416666200506084611>
- Vázquez, K., Paulino, M., O Salas, C., J Zarate-Ramos, J., Vera, B., & Rivera, G. (2017). Trypanothione reductase: A target for the development of anti-*Trypanosoma cruzi* drugs. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*, 17(11), 939–946.

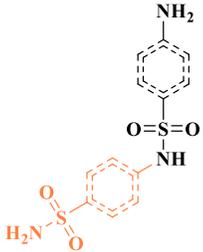
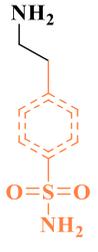
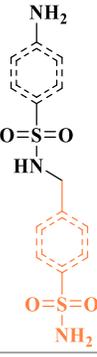
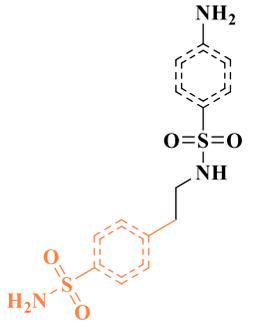
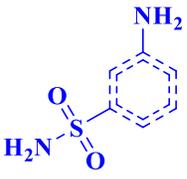
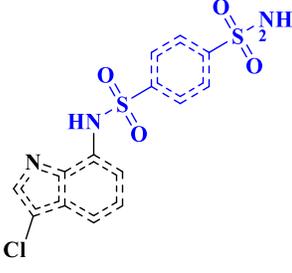
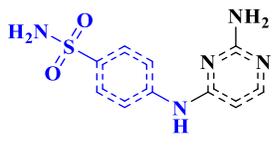
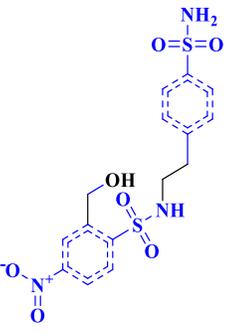
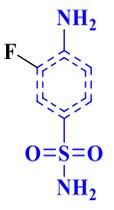
- Vela, A., Coral-Almeida, M., Sereno, D., Costales, J. A., Barnabé, C., & Brenière, S. F. (2021). In vitro susceptibility of trypanosoma cruzi discrete typing units (Dtus) to benznidazole: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *15*(3), 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009269>
- Vermelho, A. B., Rodrigues, G. C., & Supuran, C. T. (2020). Why hasn't there been more progress in new Chagas disease drug discovery? *Expert Opinion on Drug Discovery*, *15*(2), 145–158. <https://doi.org/10.1080/17460441.2020.1681394>
- Vullo, D., Bhatt, A., Mahon, B. P., McKenna, R., & Supuran, C. T. (2016). Sulfonamide inhibition studies of the α -carbonic anhydrase from the gammaproteobacterium *Thiomicrospira crunogena* XCL-2, TcrUCA. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, *26*(2), 401–405. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.11.104>
- Vullo, D., Del Prete, S., Fisher, G. M., Andrews, K. T., Poulsen, S. A., Capasso, C., & Supuran, C. T. (2015). Sulfonamide inhibition studies of the η -class carbonic anhydrase from the malaria pathogen *Plasmodium falciparum*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, *23*(3), 526–531. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.12.009>
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, *46*(W1), W296–W303. <https://doi.org/10.1093/nar/gky427>
- WHO, 2021. (n.d.). 2021. Retrieved February 17, 2021, from <http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>
- Wilkinson, S. R., Taylor, M. C., Horn, D., Kelly, J. M., & Cheeseman, I. (2008). A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(13), 5022–5027.
- Winum, J. Y., & Supuran, C. T. (2015). Recent advances in the discovery of zinc-binding motifs for the development of carbonic anhydrase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, *30*(2), 321–324. <https://doi.org/10.3109/14756366.2014.913587>

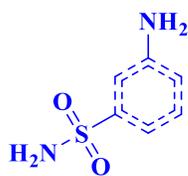
Zao, C.-L., Yang, Y.-C., Tomanek, L., Cooke, A., Berger, R., Chien, L.-C., & Madigan, R. (2019). PCR monitoring of parasitemia during drug treatment for canine Chagas disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 31(5), 742–746.

ANEXOS

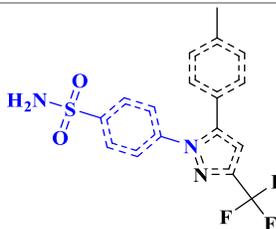
Tabla A1. Categorización de los 32 compuestos documentados en la literatura basado en su estructura química, así como la identificación de la Máxima Subestructura Común (MSC) seleccionadas para el cribado virtual.

Abreviaciones: EU – Energía de Unión (kcal/mol), Ki – Constante de Inhibición (nM).

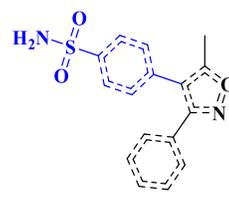
Grupo / MSC								
<p>1</p> 	 <p>C64 Ds: -10.01 Ki = 6.44</p>	 <p>C85 Ds: -8.16 Ki = 4.14</p>	 <p>C78 Ds: -8.51 Ki = 5.03</p>	 <p>C86 Ds: -8.01 Ki = 4.13</p>				
	 <p>C81 Ds: -8.14 Ki = 4.35</p>	 <p>C61 Ds: -10.11 Ki = 6.61</p>	 <p>C60 Ds: -11.65 Ki = 6.72</p>					
	<p>2</p> 				 <p>C42 Ds: -11.22 Ki = 7.07</p>	 <p>C70 Ds: -8.79 Ki = 6.09</p>	 <p>C55 Ds: -10.66 Ki = 6.87</p>	 <p>C76 Ds: -8.0 Ki = 5.09</p>



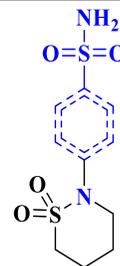
C80
Ds: -8.22
Ki = 4.59



C48
Ds: -10.03
Ki = 7.04

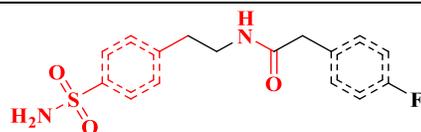


C41
Ds: -10.16
Ki = 7.08

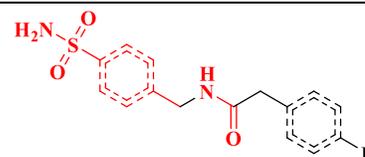


C37
Ds: -9.08
Ki = 7.14

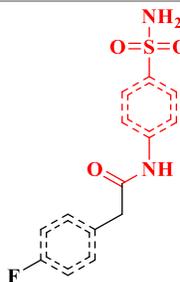
3



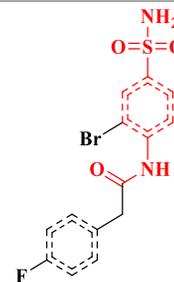
C25
Ds: -10.36
Ki = 8.04



C08
Ds: -10.32
Ki = 8.43

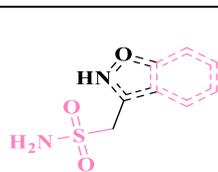
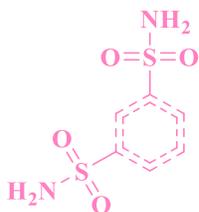


C21
Ds: -9.35
Ki = 8.07

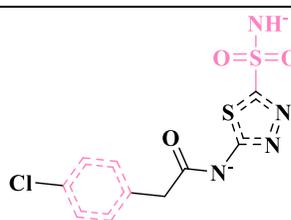


C23
Ds: -9.49
Ki = 8.05

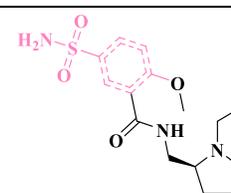
4



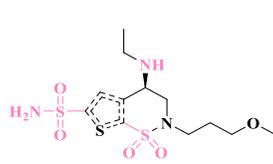
C73
Ds: -9.89
Ki = 6.06



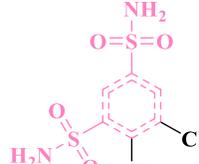
C03
Ds: -13.41
Ki = 9.02



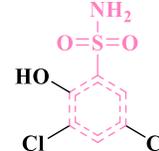
C45
Ds: -10.26
Ki = 7.06



C44
Ds: -8.82



C54
Ds: -9.18

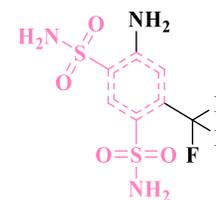
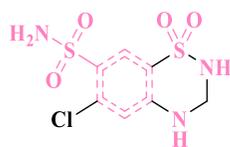


C79
Ds: -8.53

Ki = 7.06

Ki = 6.89

Ki = 5.03



C56

Ds: -9.19

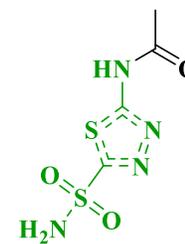
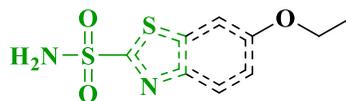
Ki = 6.87

C72

Ds: -8.52

Ki = 6.07

5



C39

Ds: -7.8

Ki = 7.13

C46

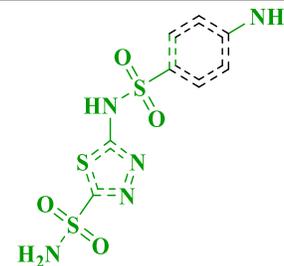
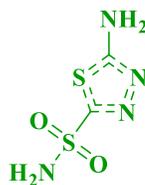
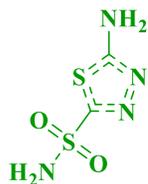
Ds: -8.94

Ki = 7.05

C34

Ds: -9.41

Ki = 7.21



C67

Ds: -8.77

Ki = 6.27

C47

Ds: -10.47

Ki = 7.05

Tabla A2. Fármacos probados que tuvieron EU (Kcal/mol) superior al fármaco control y que interactuaron con al menos un residuo de interés.

#	ID DrugBank	Nombre / Uso actual	EU (Kcal/mol)	Interacciones α -TcCA
1	DB00222	Glimepirida / control glicémico	-8.89059	HI. W57, E117, V179, V227, L255, T256 , T257, F266; HB. T257; Ñc-c. H158
2	DB11395	Deracoxib / antiinflamatorio no esteroideo	-8.78784	HI. T120, V179, L255; HB. E117, R124, S156, H158 , T257, P258
3	DB00214	Torasemida / diurético	-8.3576	HI. V179, L255, T256 , F266; HB. E117, T120, T257; Ñc-s. H158
4	DB05015	Belinostat / inhibidor de la histona deacetilasa (HDAC)	-8.06812	HI. T120, V179, L191, L255, T257; HB. E117, R124, S156, H158 , T256 , T257
5	DB00774	Hydroflumethiazide / diurético	-7.99744	HI. V179; HB. E117, H158 , H160 , T256 , T257; Met. Zn ; Ñc-c. H158
6	DB06268	Sitaxentan / hipertensión arterial pulmonar (HAP)	-7.95306	HI. L255; HB. R124, S156, T256 ; Ñc-s. H158
7	DB00310	Chlorthalidone / diurético	-7.89634	HI. V179; HB. E117, H158 , H160 , T256 , T257; Met. Zn ; Ñc-c. H158
8	DB08881	Vemurafenib / inhibidor de kinasa	-7.80617	HI. V179, V193, F266; HB. R124, S156, T256 , T257
9	DB00414	Acetohexamida / agente hipoglucémico	-7.75513	HI. P55, W57, E117, V193, L255, F266; HB. T256 , P258; Met. Zn
10	DB14033	Acetil sulfisoxazol / antibacterial	-7.73766	HI. V179, V193, L255; HB. R124, S156, T256 , T257; Ñc-c. H158
11	DB08942	Isoxicam / antiinflamatorio no esteroideo	-7.68557	HI. V193, L255, F266; HB. T256 , T257, P258
12	DB00278	Argatroban / inhibidor directo de trombina	-7.678	HI. V155, V179, L191, L255; HB. N119, T120, T257; SB. E117, H158
13	DB00482	Celecoxib / antiinflamatorio no esteroideo	-7.65757	HI. T120, V155, V179, L255; HB. E117, T120, H158 , T256 ; HalB. T256
14	DB11461	Sulfaclorpiridazina / antimicrobiano usado para infecciones en el tracto urinario y en la medicina veterinaria	-7.59793	HI. L255; HB. R124, S156, T256 , T257; Ñc-c. H158
15	DB00263	Sulfisoxazol / antibiótico	-7.50449	HI. V179, V193, L255; HB. S122, R124, S156, T256 , T257
16	DB00999	Hidroclorotiazida / diurético	-7.44746	HI. V179; HB. E117, H158 , H160 , T256 , T257; Met. Zn ; Ñc-c. H158
17	DB00695	Furosemida / diurético	-7.43053	HI. V193, T257; HB. E117, T257; SB. H158 , H160
18	DB13532	Ciclopentiazida / diurético	-7.41642	HI. V179, V193, L255, T256 , T257, F266; HB. W57, E117, H158 , T257
19	DB06729	Sulfaphenazole / antibacterial	-7.41281	HI. V179, V193, L255, T257; HB. H158 , P258; Ñc-s. H158

20	DB09289	Tianeptina / antidepresivo	-7.41022	HI. W57, T120, V179, V193, L255, T257; HB. S254, T256 , T257; SB. H177
21	DB14973	Abrocitinib / inhibidor de quinasa	-7.40931	HI. T120, V193, L255, F266; HB. E117, R124, S156, H158 , H160 , T256 , T257; Met. Zn
22	DB13284	Meticran / diurético	-7.39256	HI. V179, V193, L255; HB. T120, T257; Met. Zn ; Ñ-c. H158
23	DB00808	Indapemide / diurético	-7.36577	HI. V179, L191, V193, L255; HB. R124, S156, T256 , T257; Ñ-s. H158
24	DB00580	Valdecoxib / inhibidor de COX-2	-7.36238	HI. V155, V179, L255, T257; HB. E117; Ñ-s. H158
25	DB13773	Sulfamethoxypyridazine / antibiótico	-7.31968	HI. L255; HB. R124, S156, T256 , T257
26	DB00436	Bendroflumetiazida / diurético	-7.3034	HB. H158 , H160 , T256 , T257; Met. Zn ; Ñ-c. H158
27	DB15861	Butiazida / diurético	-7.30084	HI. V179, T256 , F266; HB. S122, R124, S156, T257
28	DB01120	Gliclazida / antihiperглиcémico oral	-7.26964	HI. V155, V179, V193, L255; HB. S122, T256
29	DB11739	Vonoprazan / antiácido	-7.25423	HI. V179; HB. H158 , T257
30	DB01015	Sulfametoxazol / antibiótico	-7.22332	HI. V193, L255; HB. R124, S156, T256 , T257
31	DB00554	Piroxicam / antiinflamatorio no esteroide	-7.19356	HI. V179, V193, L255; HB. T257; Ñ-c. H158
32	DB11462	Sulfametoxipiridazina / antimicrobiano bacteriostático en medicina veterinaria	-7.155	HI. V193, V264, F266; HB. S122, R124, S156, T256 , T257
33	DB11464	Sulfaquinoxalina / aprobado en medicina veterinaria para el tratamiento de la coccidiosis	-7.15374	HI. V179, V193, L255; HB. R124, S156, T257; Ñ-s. H158
34	DB00880	Clorotiazida / diurético	-7.13221	HI. V179; HB. E117, H158 , H160 , T256 , T257; Met. Zn ; Ñ-c. H158
35	DB06150	Sulfadimetoxina / antibiótico	-7.12105	HB. R124, S156, T256 , T257; Ñ-c. H158
36	DB01298	Sulfacitina / antibiótico	-7.08479	HI. V193, F266; HB. R124, S156, H158 , T256 , T257
37	DB08439	Parecoxib / inhibidor COX-2	-7.07132	HI. V155, V179, L255, T257; HB. E117; Ñ-c. H158
38	DB01325	Quinetazona / diurético	-7.0671	HI. V179; HB. E117, H158 , H160 , T256 , T257; Met. Zn ; Ñ-c. H158
39	DB00814	Meloxicam / antiinflamatorio no esteroideo	-7.05906	HI. V179, V193, L255; HB. T257; Ñ-c. H158
40	DB08912	Dabrafenib / inhibidor de quinasa	-7.03978	HI. T120, H177 , V179, V193, L255, T256 , V264, F266; HB. P258; SB. E117; Ñ-c. H158 .
41	DB00606	Ciclotiazida / diurético	-7.03976	HI. V179, V193, L255, T256 , F266; HB. E117, T256 , T257
42	DB01021	Triclormetiazida / diurético	-7.03239	HI. V179; HB. E117, H158 , H160 , T256 , T257; Met. Zn ; Ñ-c. H158

43	DB13165	Ripasudil / inhibidor de quinasa	-6.99768	HI. T120, V179, L255, T257; HB. H158, T256 ; SB. E117; ĩc. H158
44	DB09215	Droxicam / antiinflamatorio no esteroideo	-6.94451	HI. W57, T120, V179, V193, T257, F266; HB. H160, T256, T257
45	DB00819	Acetazolamida /Epilepsia y glaucoma	-6.94269	HI. V193; HB. H158, H160, T256, T257 ; ĩc. H158
46	DB01124	Tolbutamida / antihiperglicemico	-6.91087	HI. V155, V179, V193, L255, T256, F266 ; HB. T257; Met. Zn

HI: Enlaces hidrof3bicos; HB: Puentes de hidrogeno; Met: enlace met3lico; SB: Puentes salinos; π -c: enlace pi-cati3n; π -s; pi-apilamiento.

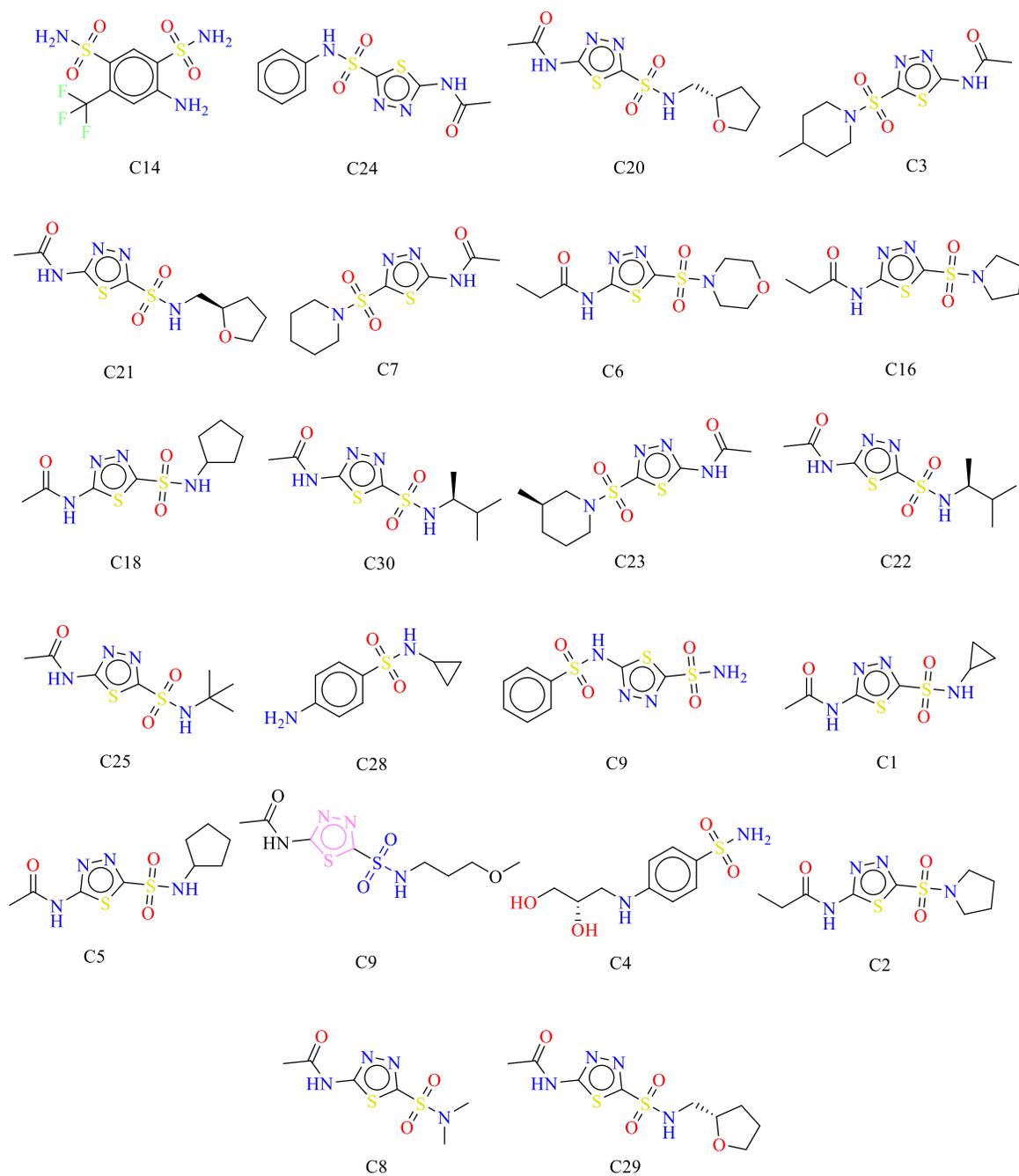


Figura A1. Veintidós compuestos que muestran valores $\Delta\Delta > 0$. C14, ZINC000001676919 / Molport-001-771-708; C24, ZINC000036182755; C20, ZINC000036182553; C3, MolPort-008-869-413; C21, ZINC000036182557 / Molport-021-779-039; C7, MolPort-021-779-681; C6, MolPort-021-779-442; C16, ZINC000006817895; C18, ZINC000036182532; C30, ZINC000225234308; C23, ZINC000036182740; C22, ZINC000225234308; C25, MolPort-008-869-448; C28, ZINC000000875177; C19, Molport-008-869-416; C1, MolPort-008-869-405; C5, ZINC000036182532; C9, ZINC000036182755 / Molport-044-723-476; C4, ZINC000000397696; C2, ZINC000006817895; C8, MolPort-030-084-025; C29, ZINC000036182553.