



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

**“Evaluación de posibles fármacos contra la infección por
Trichomonas vaginalis”**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:
M. en C. JOSÉ LUIS VIQUE SÁNCHEZ

DIRECTORES DE TESIS:
D. en C. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza
D. en C. Cynthia Ordaz Pichardo



CDMX, a Diciembre, 2017



DIRECTORES DE TESIS

D. en C. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza

D. en C. Cynthia Ordaz Pichardo

COMITÉ TUTORIAL

D. en C. Rossana Arroyo Verástegui

D. en C. Laurence Annie Marchat Marchau

D. en C. Absalom Zamorano Carrillo





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12 horas del día 21 del mes de Noviembre del 2017 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de La ENMyH para examinar la tesis titulada:

Evaluación de posibles fármacos contra la infección por *Trichomonas vaginalis*

Presentada por el alumno:

Vique	Sánchez	José Luis
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
		Con registro:
		A 1 4 0 0 0 1

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

D. en C. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza

D. en C. Cynthia Ordaz Pichardo

D. en C. Rossana Arroyo Verástegui

D. en C. Laurence Annie Marchat Marchau

D. en C. Absalom Zambrano Carrillo



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
 PRESIDENTA DEL COLEGIO DE PROFESORES
 INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
 D. en C. Mónica Ascención De Nolasco Campa
 DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y HOMEOPATIA
 SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

Prohibición de uso de obra

Instituto Politécnico Nacional

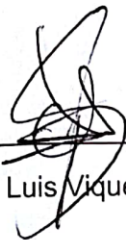
Presente

Bajo protesta de decir verdad el que suscribe José Luis Vique Sánchez, manifiesto ser autor y titular de los derechos morales y patrimoniales de la obra titulada "**Evaluación de posibles fármacos contra la infección por *Trichomonas vaginalis***", en adelante "La tesis" y de la cual se adjunta copia para efecto de **su difusión, con fines académicos por el cual se hace entrega del ejemplar al IPN**, por lo que por medio del presente y con fundamento en el artículo 27 de la Ley Federal de Derecho de Autor, se prohíbe el uso y/o explotación de la "La tesis" en las formas y medios descritos en el fundamento legal citado, en virtud de que cualquier utilización por una persona física o moral distinta del autor puede afectar o violar derechos autorales, industriales, secretos industriales, convenios o contratos de confidencialidad o en general cualquier derecho de propiedad intelectual de terceros distintos al autor de la "La tesis".

En virtud de lo anterior, "El IPN" deberá reconocer en todo momento mi calidad de autor de "La tesis" y limitarse a su uso en la forma arriba señalada.

México CDMX, 8 de Diciembre del 2017

Atentamente



José Luis Vique Sánchez

Contenido

INDICE DE FIGURAS.....	8
INDICE DE TABLAS	9
RESUMEN	10
Abstract	12
1 INTRODUCCION.....	13
1.1 Tricomoniasis.....	13
1.1.1 Epidemiología.....	14
1.1.2 Tratamientos contra la infección por <i>Trichomonas vaginalis</i>	17
1.1.3 Resistencia al Metronidazol	19
1.1.4 <i>Trichomonas vaginalis</i>	19
1.2 Triosa fosfato isomerasa.....	21
1.2.1 La triosa fosfato isomerasa de <i>T. vaginalis</i>	23
2 ANTECEDENTES	25
3 JUSTIFICACION.....	28
4 OBJETIVO GENERAL.....	29
4.1 Objetivos Específicos	29
5 MATERIALES Y METODOS	30
5.1 Determinación de la relación estequiométrica entre los compuestos A4 y D4 con la TvTIM1 aislada y en complejo con cada uno de los compuestos	30
5.2 Cultivos de <i>T. vaginalis</i>	31
5.3 Efecto tricomonocida de A4 y D4 en varios aislados de <i>T. vaginalis</i> y cálculo de CI_{50}	31
5.4 Cinética del efecto tricomonocida	32
5.5 Efecto terapéutico de la combinación (A4 + D4) en cultivos de <i>T. vaginalis</i>	32
5.6 Efecto sinérgico de A4 y D4 en cultivos in vitro de <i>T. vaginalis</i>	32
5.7 Pruebas de Toxicidad.....	34
5.8 Genotoxicidad in vitro: Prueba de Ames.....	34
5.9 Genotoxicidad in vivo: Ensayo de Micronúcleos.....	35
5.10 Evaluación de la citotoxicidad del DMSO	36
5.11 Otros estudios de toxicidad	36
5.11.1 Citotoxicidad de A4, D4 y (A4 + D4) en células HeLa (Ensayo de MTT)	36
5.11.2 Cultivo de células HeLa	36
5.11.3 Dosis letal 50 (DL_{50})	37

5.12 Propuesta de derivados químicos de A4 y D4 para mejorar la interacción con TvTIM por docking	37
6 RESULTADOS.....	39
6.1 Relación estequiométrica de A4 y D4 con la Triosa fosfato isomerasa de <i>Trichomonas vaginalis</i>	39
6.2 Efecto tricomonocida de A4 y D4 sobre 51 aislados de <i>T. vaginalis</i> y Calculo de CI_{50}	40
6.3 Cinética del efecto tricomonocida de A4 y D4	42
6.4 Efecto tricomonocida de la combinación (A4 + D4) sobre 51 aislados de <i>T. vaginalis</i>	43
6.5 Cinética del efecto tricomonocida de la combinación (A4 + D4)	44
6.6 Efecto sinérgico entre A4 y D4	45
6.7 Genotoxicidad in vitro: Prueba de Ames	47
6.8 Genotoxicidad in vivo: Ensayo de Micronúcleos.....	50
6.9 Otros estudios.....	51
6.9.1 Ensayo de MTT y CI_{50} en células HeLa	51
6.9.2 Determinación de Dosis Letal al 50% del compuesto A4 en modelo murino (DL_{50})	53
6.9.3 Determinación de Dosis Letal al 50% del compuesto D4 en modelo murino (DL_{50}).....	54
6.10 Obtención de derivados químicos de A4 y D4 para mejorar la interacción con TvTIM.....	54
7 DISCUSIÓN	56
8 CONCLUSIONES.....	61
9 PERSPECTIVAS	62
10 BIBLIOGRAFIA.....	63
ANEXOS	69
Anexo I) Solicitud y examen de forma de 3 patentes.	69
Compuesto A4, solicitud de patente MX/a/2016/013111 y hoja de satisfecida el examen de forma para A469	
Compuesto D4, solicitud de patente MX/a/2016/0131109 y hoja de satisfecida el examen de forma para D4	
.....	71
Combinación (A4 + D4), solicitud de patente MX/a/2016/013108 y hoja de satisfecida el examen de forma para la combinación (A4 + D4)	73
Anexo II) Artículo publicado como coautor, Jimenez-Sandoval P, Vique-Sanchez JL, Hidalgo ML, Velazquez-Juarez G, Diaz-Quezada C, Arroyo-Navarro LF, Moran GM, Fattori J, Jessica Iaz-Salazar A, Rudiño-Pinera E, Sotelo-Mundo R, Figueira ACM, Lara-Gonzalez S, Benítez-Cardoza CG, Briebe LG. A competent catalytic active site is necessary for substrate induced dimer assembly in triosephosphate isomerase. <i>Biochim Biophys Acta</i> . 2017 Nov;1865(11 Pt A):1423-1432. doi: 10.1016/j.bbapap.2017.07.014. Epub 2017 Aug 9. PubMed PMID: 28803140.....	75
Anexo III) Artículo enviado como autor, Vique-Sanchez JL, Caro-Gomez LA, Briebe LG and Benitez-Cardoza CG. Novel strategies to fight tricomoniasis. Unstable isoform of the moonlighting protein	

triosephosphate isomerase as drug target. Submit to Journal of Computer-Aided Molecular Design. November 9th 2017	76
Anexo IV) Borrador 2do artículo, autor Vique-Sanchez JL	77
Anexo V) Borrador 3er artículo, autor Vique-Sanchez JL. In preparation	112
Anexo VI) Protocolo OCD 423	129
Anexo VII) 51 aislados de T. vaginalis:	130

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tasa de incidencia de tricomoniasis por entidad federativa

Figura 2. Reacción catalizada por la triosa fosfato isomerasa.

Figura 3. Estructura del dímero de la triosa fosfato isomerasa y el sitio catalítico

Figura 4. A) Cultivo de 50,000 parásitos con 4 % DMSO a las 24 h se encuentran viables y con movilidad. B) Cultivo de 50,000 parásitos con 200-400 μ M de "A4" (1-4 % DMSO) a las 24 h no es viable el cultivo, nula movilidad de parásitos y pedaceria en el medio

Figura 5. Generación y evaluación de derivaciones

Figura 6. Espectros de masas (MALDI-TOF) de: a) TvTIM1 aislada, b) Complejo TvTIM1-A4, c) Complejo TvTIM1-D4

Figura 7. Promedio del porcentaje de viabilidad de cultivos de *T. vaginalis* en presencia de concentraciones variables de A) A4 y B) D4. Las barras representan una desviación estándar

Figura 8. Promedio de la evolución en el tiempo del efecto tricomonocida de A4, D4 y metronidazol en cultivos de 20,000 de los 51 aislados de parásitos de *T. vaginalis*

Figura 9. Promedio de la evolución en el tiempo del efecto tricomonocida de la combinación (A4 + D4) y metronidazol en cultivos de 20,000 parásitos de 51 aislados

Figura 10. Promedio del porcentaje de viabilidad de cultivos de 20,000 parásitos de 51 aislados de *T. vaginalis* a las 24 h en presencia de distintas concentraciones de la combinación (A4 + D4) (relación 1:3)

Figura 11. Prueba de Ames para los compuestos A4 y D4. La línea roja indica el número máximo de colonias para considerar que no hay efecto mutagénico

Figura 12. Prueba de Ames para la combinación (A4 + D4). La línea roja indica el número máximo de colonias para considerar que no hay efecto mutagénico

Figura 13. Prueba de micronúcleos

Figura 14. Porcentaje de citotoxicidad

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Casos por entidad federativa de enfermedades de transmisión sexual hasta la semana 38 del 2017

Tabla 2. Esquemas de tratamiento utilizados actualmente para combatir la infección por *Trichomonas vaginalis*

Tabla 3. Valores del Índice de Combinación (IC)

Tabla 4. Masas teóricas y determinadas experimentalmente (MALDI-TOF) de A4, D4, TvTIM1, TvTIM1-A4 y TvTIM1-D4 y relaciones estequiométricas de TvTIM1-A4 y TvTIM1-D4

Tabla 5. Concentraciones requeridas para efecto tricomonocida al 50% (CI₅₀) y al 100 % (CI₁₀₀) de cultivos de 20,000 parásitos de *T. vaginalis* a las 24 h

Tabla 6. Concentraciones evaluadas de A4 y D4 para determinar el posible efecto sinérgico en su acción tricomonocida

Tabla 7. Concentraciones requeridas para efecto tricomonocida al 50% (CI₅₀) de cultivos de 20,000 parásitos de *T. vaginalis* a las 24 h. de la combinación (A4+D4)

Tabla 8. índice de combinación de (A4 + D4) para distintos porcentajes de efecto tricomonocida.

Tabla 9. A4, peso de ratones CD-1

Tabla 10. D4, peso de ratones CD-1

RESUMEN

Trichomonas vaginalis es el agente causal de la tricomoniasis, una infección vaginal en la mujer y urogenital en el hombre. Esta infección comprende una gran variedad de síntomas que van desde un estado casi asintomático, hasta inflamación e irritación severa del tejido vaginal, acompañado de prurito y flujo amarillo-verdoso maloliente en la mujer y flujo proveniente de la uretra, así como necesidad de orinar con frecuencia, a menudo con dolor y ardor en el hombre.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó en 2012 más de 276 millones de casos a nivel mundial y en México se calcula que hay alrededor de 200 000 nuevos casos cada año. Esta cifra es aún más alarmante si se considera que al menos el 50 % de los casos son asintomáticos y por lo tanto no son detectados y no son tratados, favoreciendo así la diseminación de la infección. La tricomoniasis es una infección crónica no mortal, pero con serias consecuencias tales como partos prematuros, infecciones respiratorias en el recién nacido y complicaciones de otras enfermedades en adultos inmuno-comprometidos. De igual modo, se ha reportado que la infección por *T. vaginalis* puede aumentar la predisposición de los individuos a la infección por los virus de inmunodeficiencia humana y de papiloma humano por la erosión que se produce en el epitelio.

El tratamiento de la tricomoniasis ha consistido principalmente en el suministro de derivados de nitroimidazoles, sin embargo, se ha observado ineficacia terapéutica en 5 a 20 % de los casos. Por lo que es necesario proponer nuevos esquemas terapéuticos contra esta enfermedad. En esta investigación, se describen dos nuevas moléculas tricomonocidas capaces de modificar el crecimiento y viabilidad de cultivos de *Trichomonas vaginalis*: Se comprobó su eficacia terapéutica en cultivos *in vitro* de aislados de *T. vaginalis*; se analizó la posible interacción de los fármacos potenciales con la proteína blanco; se determinó además que no presentan efectos genotóxicos *in vitro* e *in vivo* y que por lo tanto pudieran ser utilizados para el tratamiento contra la tricomoniasis. También, se analizó la combinación de ambas moléculas, como una nueva formulación tricomonocida. Así mismo, se propusieron derivados químicos que podrían potenciar el efecto tricomonocida.

Con los resultados aquí obtenidos se solicitaron el registro de tres patentes nacionales y vía PCT. En la escritura de esta tesis, ya nos han otorgado el examen aprobatorio de forma de las tres patentes. Al menos tres empresas farmacéuticas nacionales y transnacionales han

manifestado su interés en la adquisición de la tecnología, para continuar las etapas de desarrollo de nuevos fármacos.

Abstract

Trichomonas vaginalis is the causal agent of trichomoniasis, a vaginal infection in women and urogenital in man. This infection comprises a variety of symptoms ranging from an almost asymptomatic condition, to inflammation and severe irritation of the vaginal tissue, accompanied by pruritus and yellowish-greenish malodorous flow in women and flow from the urethra, as well as urination with frequency, often with pain and burning in men.

The World Health Organization (WHO) reported in 2012 more than 2376 million cases worldwide and in Mexico it is estimated that around 200 000 of new cases appear each year. This is even more alarming if at least 50 % of the cases are considered asymptomatic and therefore they are neither detected nor treated, thus favoring the spread of infection. Trichomoniasis is a chronic non-fatal infection, but with profound consequences such as premature births, respiratory infections in the newborn and complications of other diseases in immuno-compromised adults. Similarly, it has been reported that infection by *T. vaginalis* may increase the predisposition of individuals to infection by human immunodeficiency virus and human papilloma by erosion that occurs in epithelium.

The treatment of trichomoniasis has mainly consisted of the provision of nitroimidazole derivatives; however, therapeutic ineffectiveness has been observed in 5 to 20% of cases. Therefore, it is necessary to propose new therapeutic schemes against this disease. In this work, we describe two new trichomonocidal molecules capable of altering the growth and viability of *Trichomonas vaginalis* cultures: Their therapeutic efficacy was verified by *in vitro* cultures of *T. vaginalis* isolates; the possible interaction of the potential drugs with the target protein was analyzed; it was also determined that they do not present mutagenic, cytotoxic nor genotoxic effects and therefore can be used as a therapeutic treatment against trichomoniasis. Also, the combination of both molecules was analyzed as a new trichomonocide formulation. Furthermore, chemical derivatives were proposed that could enhance the trichomonocide effect.

The results of this project resulted in the application of three national patents and via PCT. At the time of writing this document, the Notice of Allowability and the favorable comments of the reviewers of the substantive examination were received. At least three national and transnational pharmaceutical companies have expressed their interest in acquiring the technology to continue the stages of development of new drugs.

1 INTRODUCCION

1.1 Tricomoniasis

La tricomoniasis es una enfermedad de transmisión sexual (ETS) muy común causada por la infección transmitida por el parásito protozooario llamado *Trichomonas vaginalis* [1] [2] [3]. La tricomoniasis se puede propagar de una persona infectada que transmite el parásito a otra persona que no tenga la infección durante relaciones sexuales. En las mujeres, el área del cuerpo infectada con más frecuencia es la parte baja del aparato genital (la vulva, la vagina o la uretra) y en los hombres la parte interna del pene (uretra) [4] [5] [6] [7]. Durante las relaciones sexuales, el parásito por lo general se transmite del pene a la vagina o de la vagina al pene, pero también se puede transmitir de una vagina a otra. No es frecuente que el parásito infecte otras partes del cuerpo, como las manos, la boca o el ano. Las personas infectadas con o sin síntomas pueden transmitir la infección a otras personas [8] [9] [10] [11].

Aproximadamente el 50% de las personas infectadas no presentan signos ni síntomas. Cuando la tricomoniasis causa síntomas, éstos pueden variar entre irritación leve e inflamación grave. Algunas personas presentan los síntomas durante los 5 a 28 días después de haberse infectado, pero otras los presentan mucho más tarde (2 a 4 meses) [4] [7]. A continuación, se enlistan algunos de los principales síntomas tanto en mujeres como en hombres ocasionados por la infección por *Trichomonas vaginalis*:

- Síntomas en mujeres

-Flujo espeso y a menudo con mal olor

-Manchas de sangre en el flujo

-Picazón en el área genital

-Necesidad de orinar con frecuencia, a menudo con dolor y ardor

- Síntomas en Hombres

-Flujo proveniente de la uretra

-Necesidad de orinar con frecuencia, a menudo con dolor y ardor

Tener tricomoniasis puede provocar molestias al tener relaciones sexuales y si no se trata, la infección puede durar meses y hasta años. La infección por tricomoniasis puede aumentar el riesgo de partos prematuros en las mujeres y de contraer o propagar otras infecciones de transmisión sexual. Por ejemplo, puede causar inflamación genital que hace más fácil infectarse con el virus del VIH o Virus de papiloma[5] [7].

1.1.1 Epidemiología

La OMS ha reportado que aproximadamente 276 millones de personas se infectan anualmente en el mundo. En EUA se infectan cada año un estimado de 16 millones de personas por año y de ellos un 50 % de casos son asintomáticos [12].

En México, en el año 2011 la tricomoniasis urogenital ocupó el doceavo lugar entre las "Veinte principales causas de enfermedades transmisibles" [13] [14], con 113 843 casos notificados, equivalentes a 104.23 casos/100 000 habitantes. Las mujeres fueron más afectadas que los hombres en una proporción de 36:1, y el grupo de edad con mayor número de casos correspondió al de 25 - 44 años. En cuanto a incidencia, se registraron las cifras mayores en los Estados de Puebla, Tlaxcala, Veracruz, seguidos de Zacatecas, Oaxaca y Durango [14]. Este dato puede no corresponder a la realidad porque la enfermedad no es de reporte epidemiológico obligatorio; además del alto porcentaje de subdiagnóstico, debido a la falta de sintomatología en al menos 50% de los casos.

A continuación, se presentan los casos por entidad federativa de enfermedades de transmisión sexual hasta la semana epidemiológica 39 del 2017 (Tabla 1) (SINAVE/DGE) y la tasa de incidencia nacional de *Trichomonas vaginalis* (Figura 1) (SUIVE/DGE/SSA 2011).

Tabla 1. Casos por entidad federativa de enfermedades de transmisión sexual hasta la semana 38 del 2017.

ENTIDAD FEDERATIVA	Linfogranuloma Venéreo por Clamidias CIE-10ª REV. A55				Chancro Blando CIE-10ª REV. A57				Tricomoniasis Urogenital CIE-10ª REV. A59.0			
	2017			2016	2017			2016	2017			2016
	Sem.	Acum.		Acum.	Sem.	Acum.		Acum.	Sem.	Acum.		Acum.
		M	F			M	F			M	F	
Aguascalientes	-	-	-	-	-	2	-	2	4	1	124	191
Baja California	-	10	7	11	-	5	7	22	21	26	448	475
Baja California Sur	-	-	-	1	-	10	6	2	4	8	90	92
Campeche	-	-	-	-	-	4	1	4	1	7	148	275
Coahuila	-	1	2	-	-	2	2	1	11	9	476	610
Colima	-	1	1	4	-	2	6	6	5	7	243	160
Chiapas	-	23	55	3	1	6	12	21	110	107	2 332	2 412
Chihuahua	-	2	2	6	-	14	9	10	20	92	721	687
Ciudad de México	-	-	-	-	2	4	5	1	6	20	302	385
Durango	-	-	-	-	-	-	-	2	23	2	586	694
Guanajuato	1	1	1	1	-	4	7	5	44	36	1 372	1 411
Guerrero	-	5	2	13	1	10	7	15	28	32	968	1 556
Hidalgo	-	7	1	1	-	4	1	5	21	25	719	835
Jalisco	1	4	2	3	1	10	3	11	10	31	703	911
México	-	5	1	13	1	11	8	20	72	74	2 694	2 928
Michoacán	-	-	1	6	2	5	5	3	73	59	1 950	2 061
Morelos	-	1	-	1	-	3	4	9	12	44	715	880
Nayarit	1	1	2	6	-	4	2	7	7	33	428	350
Nuevo León	-	7	3	4	2	93	5	28	36	77	1 182	1 094
Oaxaca	-	6	6	8	1	9	10	20	58	61	1 750	2 171
Puebla	-	4	1	3	-	10	6	20	113	249	3 990	3 800
Querétaro	-	-	-	-	-	2	4	8	1	1	38	71
Quintana Roo	-	1	2	-	-	7	1	11	14	126	434	530
San Luis Potosí	-	6	1	4	-	14	16	21	27	19	896	1 100
Sinaloa	-	3	3	2	-	20	12	9	15	88	809	634
Sonora	2	7	36	33	1	5	12	18	7	122	392	482
Tabasco	-	2	-	6	-	1	8	14	28	40	784	790
Tamaulipas	-	10	7	10	-	12	22	10	65	167	1 978	1 440
Tlaxcala	-	1	1	2	1	7	1	12	18	31	722	947
Veracruz	-	2	3	6	-	13	3	16	160	146	5 512	5 492
Yucatán	-	-	1	-	-	1	1	2	4	17	175	257
Zacatecas	-	7	1	9	-	16	2	9	23	55	1 003	958
TOTAL	5	117	142	156	13	310	188	344	1 041	1 812	34 684	36 679

FUENTE: SINAVE/DGE/Salud 2017. Información preliminar, incluye casos probables.

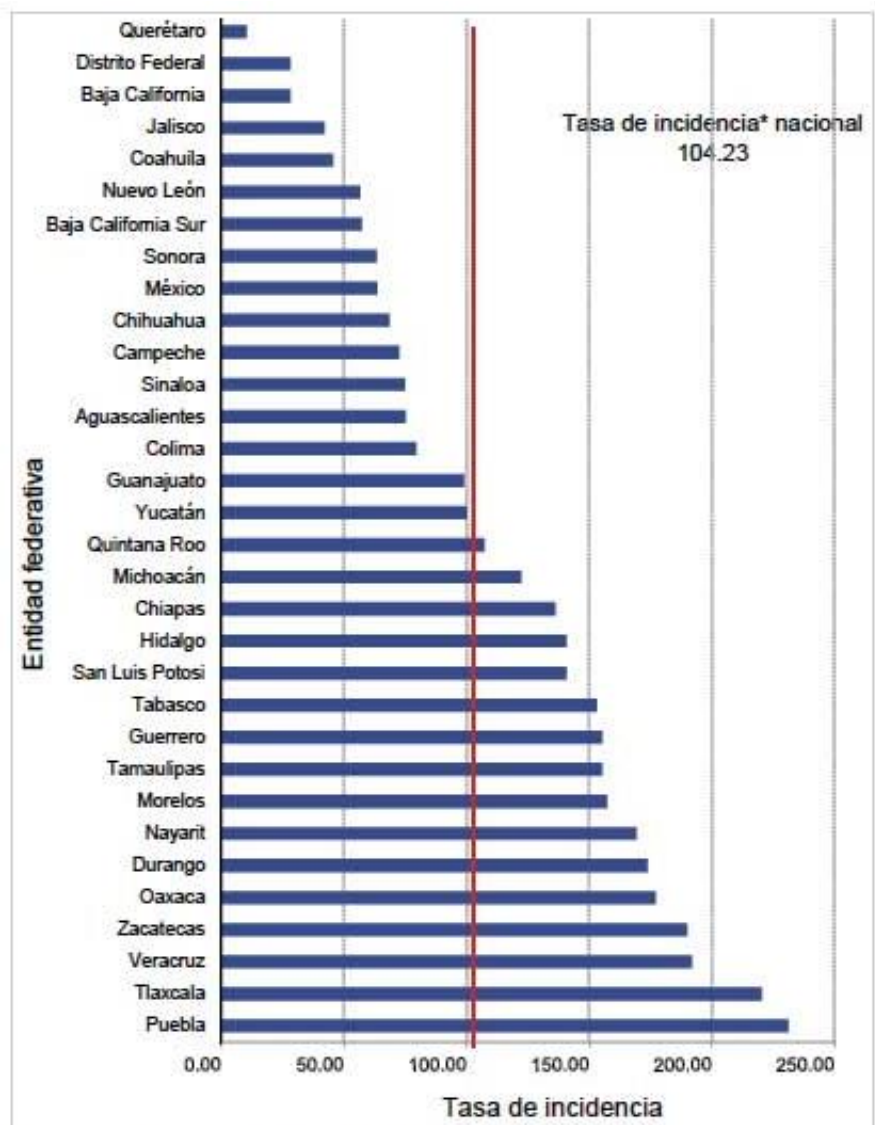


Figura 1. Tasa de incidencia de tricomoniasis por entidad federativa. (SUIVE/DGE/SSA 2011)

1.1.2 Tratamientos contra la infección por *Trichomonas vaginalis*

El fármaco que más se ha utilizado es el Metronidazol, (1-(β-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol) descubierto en la década de los 50's [15] [16]. Este fármaco y sus derivados han demostrado ser útiles en la mayoría de los casos de tratamiento de tricomoniasis. Sin embargo, se ha encontrado que el tratamiento no es eficaz entre un 5 al 20 % de los casos [16]. La resistencia al Metronidazol es un problema que va en aumento, ya que los fármacos más comunes para su tratamiento son derivados de 5-nitroimidazoles con el mismo mecanismo de acción. Se ha reportado la dosis promedio de susceptibilidad y a Metronidazol para 10,000 parásitos es de 28-32 μM con un límite hasta 300 μM en cultivo a 24 h. Los aislados que requieren concentraciones mayores a 300 μM se consideran resistentes a este medicamento [17].

El Metronidazol es un tricomonocida de acción directa. El mecanismo de acción de los nitroimidazoles se refleja en una toxicidad selectiva para los microorganismos anaeróbicos o microaerófilos y para células anóxicas e hipóxicas [15] [16].

Para explicar el mismo se puede dividir en 3 fases:

1. Penetración del fármaco por difusión pasiva a través de la pared celular del protozoo que puede aumentar por el nivel de reducción intracelular.
2. Reducción del grupo nitro a un intermediario transitorio tóxico. El grupo nitro actúa como aceptor de electrones provenientes de proteínas para el transporte de electrones como las ferredoxinas en el caso de *T. vaginalis*, desviándola de su ruta normal productora de energía.
3. Acción sobre el ADN del parásito. Inhiben la síntesis y degradan el ADN, siendo mayor cuanto más contenido de A+T tiene el ADN, pues las roturas se producen entre estos residuos, sobre todo en la timina, y liberan una mezcla de timina y timidina fosfato. *T. vaginalis* tiene un contenido de A+T mayor del 70%, por eso la mínima concentración letal (CLM) está alrededor de 1 μg/ml [16] [17].

Además, metronidazol presenta varios efectos colaterales como cefalea, náuseas, sequedad de la mucosa oral y sabor metálico. Ocasionalmente se presentan vómitos, diarrea, malestar abdominal, glositis, estomatitis, entre otros. También se han observado efectos neurotóxicos por el Metronidazol. Tiene además un efecto similar al Disulfiram (rash cutáneo, taquicardia,

respiración entrecortada, náuseas y vómitos) por lo que está contraindicado el consumo de alcohol [18]. Es muy importante recordarle al paciente que no ingiera alcohol desde el comienzo del tratamiento hasta después de 48 h de haberlo finalizarlo, porque se puede presentar el bloqueo de la aldehído-deshidrogenasa, que transforma el acetaldehído en acetato para metabolizar el alcohol; provoca entonces una acumulación de acetaldehído que produce vasodilatación brusca con enrojecimiento facial intenso, palpitaciones, sudoración, visión borrosa, náuseas, taquicardia, dificultad respiratoria y debilidad generalizada [18].

El Metronidazol es carcinogénico en roedores después de dosis altas y prolongadas (500 mg/kg en ratones), también es mutagénico para bacterias. Más aún, la actividad mutagénica está asociada con el mecanismo de acción y con varios de sus metabolitos, los que se encuentran en la orina de pacientes tratados con dosis terapéuticas. Este medicamento atraviesa la placenta y también se detecta en leche materna a concentraciones equivalentes a las del suero (30 µg/mL) [18]. De ahí la preocupación de su uso generalizado en mujeres con *T. vaginalis* y particularmente está contraindicado en embarazadas, principalmente en el primer trimestre.

Tabla 2. Esquemas de tratamiento utilizados actualmente para combatir la infección por <i>Trichomonas vaginalis</i>		
OPCIONES DE TRATAMIENTO		
Medicamento	Dosis	Duración del tratamiento
Ornidazol(5-nitroimidazoles)	500 mg	5 días
Tinidazol(5-nitroimidazoles)	500 mg	5 días
Secnidazol(5-nitroimidazoles)	500 mg	2 días
Policresuleno	0.09 mg Tópico	3 días
Hemezol(5-nitroimidazoles)	500 mg	7 días
Clindamicina	40 mg Tópico	7 días
Nistatina	500 mg Tópico	7-10 días
Cotrimoxazol	100 mg	7 días

Furazolidona	100 mg Tópico	7 días
Paromomicina	250 mg Tópico	14 días
Sales de Zinc	Tópico	
Carmidazol	2g	1 día
Nimorazol	1g	3 días

Actualmente existen otras opciones terapéuticas (con diferentes grados de eficacia terapéutica) en pacientes cuando hay resistencia o efectos secundarios al metronidazol [9] [10] [18] (Tabla 2).

1.1.3 Resistencia al Metronidazol

Existen algunos estudios para determinar la resistencia a metronidazol en pacientes, en ellos concluyen que entre un 5 al 20 % de los aislados de pacientes son resistentes al metronidazol dependiendo del país donde se estudie [8][9].

Otros estudios de aislados de pacientes de *T. vaginalis* resistentes, han mostrado cuáles son los mecanismos de esta resistencia que dependen de uno o más de los factores como actividad reducida de la enzima piruvato ferredoxin oxidoreductasa (PFO), ferredoxina con un potencial redox alterado, cantidad reducida de ferredoxina intracelular, o conformación alterada del hidrogenosoma, entre otros mecanismos [19] [20] [21].

En *T. vaginalis* sensibles, 2/3 del piruvato se oxida en el hidrogenosoma a acetato y 1/3 en el citosol a lactato y a etanol en menor cantidad. En parásitos resistentes disminuye la oxidación en el hidrogenosoma y el 97 % del piruvato es oxidado a lactato en el citosol, esto significa que la acción de estos compuestos es inhibida. Por otro lado, en las cepas resistentes las cantidades intracelulares están decrecidas en un 50% y el nivel de transcripción del gen de ferredoxina está reducido en un 40%-65% comparado con las cepas sensibles [19]. Además, en parásitos altamente resistentes al Metronidazol se ha demostrado que no existe la enzima piruvato ferredoxin oxidoreductasa (PFO) [21].

1.1.4 *Trichomonas vaginalis*

Trichomonas vaginalis es un parásito protozoario anaeróbico, flagelado y el agente causal de la tricomoniasis. Este organismo presenta una sola etapa morfológica, un trofozoíto, y no puede

enquistarse. El trofozoíto de *T. vaginalis* es ovalado y flagelado y mide $9 \times 7 \mu\text{m}$. Cinco flagelos surgen cerca del citostoma; cuatro de ellos se extienden inmediatamente fuera de la célula, mientras que el quinto flagelo se enrolla hacia atrás a lo largo de la superficie del organismo. Además, un axostilo se proyecta frente al paquete de cuatro flagelos. El axostilo se puede utilizar para adherirse a las superficies y también puede causar el daño tisular visto en las infecciones por tricomoniasis. [22]. *Trichomonas vaginalis* carece de mitocondrias y, por lo tanto, no lleva cabo la fosforilación oxidativa. *T. vaginalis* obtiene nutrientes por transporte a través de la membrana celular y por fagocitosis. El organismo puede mantener los requerimientos de energía mediante la glucólisis para transformar glucosa a glicerol y succinato en el citoplasma, seguido de conversión adicional de piruvato y malato a hidrógeno y acetato en un orgánulo llamado hidrogenosoma [23]. Una de las características distintivas de *Trichomonas vaginalis* son los factores de adherencia que permiten la colonización del epitelio cervicovaginal en las mujeres. La adherencia de este organismo es específica de las células epiteliales vaginales (VEC). Unas variedades de factores de virulencia median este proceso, algunos de los cuales son los microtúbulos, microfilamentos, adhesinas y cisteína proteinasas. Se han descrito varias adhesinas como AP65, AP51, AP33 y AP23 que median la interacción del parásito con las moléculas receptoras de los VEC [24]. Las cisteína proteinasas pueden ser otro factor de virulencia porque no solo estas proteínas de 30 kDa se unen a las superficies de las células del huésped sino que también pueden degradar las proteínas de la matriz extracelular como la hemoglobina, la fibronectina o el colágeno IV [25].

Cabe mencionar, que se ha observado que los aislados de *T. vaginalis* pueden presentar diversidad genética. Esto se ha comprobado mediante evaluaciones de marcadores genéticos específicos y se ha podido establecer que en el mundo existen dos tipos de poblaciones de parásitos. Los parásitos tipo 1 albergan más frecuentemente (70 %) el virus de *T vaginalis* (TVV; un virus dsRNA implicado en la patogénesis del parásito) que los parásitos de tipo 2 (30 %). Los parásitos tipo 2 pueden ser más resistentes a metronidazol [26] [27] [28]. Ambos tipos ocurren en todo el mundo con frecuencia comparable, aunque presumiblemente el tipo 1 es el más antiguo [27].

A finales de 2007, se publicó la base de datos “TrichDB.org” que contiene todos los datos del proyecto de la secuencia de *T. vaginalis*, varias bibliotecas de “Expressed sequenced tags,(

EST) y herramientas para la extracción y visualización de datos. TrichDB es parte del proyecto de base de datos de genómica funcional EupathDB financiado por NIH / NIAID [29].

El genoma de *T. vaginalis* tiene aproximadamente 160 megabases de tamaño [30]. Dos tercios de la secuencia de *T. vaginalis* consisten en elementos repetitivos y transponibles, lo que refleja una expansión masiva evolutivamente reciente del genoma. El número total de genes codificadores de proteínas predichos es ~ 98,000, que incluye ~ 38,000 genes 'repetidos'. Aproximadamente 26,000 de los genes que codifican a proteínas se clasificaron como "respaldados por evidencia", mientras que el resto no tiene una función conocida [31].

Las enzimas metabólicas son un ejemplo de proteínas cuyos genes presentan una alta multiplicidad y dentro de ellas la triosa fosfato isomerasa (TIM). Esta enzima se eligió para el blanco de diseño de fármacos contra *Trichomonas vaginalis*.

1.2 Triosa fosfato isomerasa

Las enzimas glucolíticas se han utilizado como blancos para el diseño de fármacos contra diversas infecciones como las tripanosomiasis, amebiasis, malaria y la tuberculosis [32] [33]. En esta investigación se eligió como blanco terapéutico a una enzima clave de la glucólisis: La triosa fosfato isomerasa (TIM) [32] [33].

La TIM es una enzima dimérica que participa en la glucólisis y en la gluconeogénesis [32] [34]. La enzima es necesaria para todas las especies y está presente en todos los tejidos [35]. La TIM cataliza la isomerización reversible entre el gliceraldehído-3-fosfato (G3P) y la dihidroxiacetona fosfato (DHAP), a través de un intermediario cis-enediol (Figura 2).

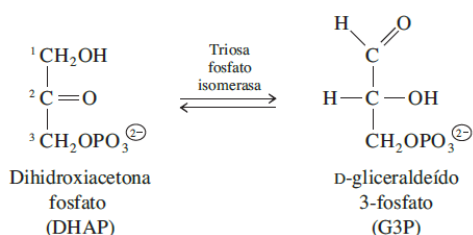


Figura 2. Reacción catalizada por la triosa fosfato isomerasa. Isomerización reversible entre la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) y el gliceraldehído-3-fosfato (G3P)

Se ha demostrado que la deficiencia de esta enzima en el ser humano incrementa los niveles de fosfato de dihidroxiacetona, asimismo causa anemia crónica y debilitamiento neuromuscular. Además, debido a su importancia en la ruta glucolítica, se considera como un blanco atractivo en el diseño de fármacos contra parásitos que tienen la habilidad de vivir en la sangre de los mamíferos alimentándose de la glucosa contenida en ella. Algunos de los ejemplos son los parásitos causantes de la tripanosomiasis (enfermedad del sueño) y la malaria [35] [36] [37], entre otras enfermedades. Estos padecimientos son muy comunes en las zonas tropicales; especialmente la tripanosomiasis que se presenta con frecuencia en el sureste de nuestro país, hasta el momento esta enfermedad es incurable y mortal.

La TIM ha sido ampliamente estudiada. Sus propiedades catalíticas se conocen en detalle y está bien caracterizada. Estructuralmente, la TIM es un homodímero de aproximadamente 53.3 kDa con alrededor de 250 residuos en cada una de las subunidades [38] [39], no requiere ningún ión metálico o cofactor para realizar su función biológica. Las subunidades se asocian a través de interacciones no covalentes. Ambos monómeros tienen un sitio activo completo, localizado cerca de la interfase entre las subunidades, pero sólo la especie dimérica presenta actividad biológica, lo que podría indicar que los residuos de una subunidad son cruciales para mantener la integridad o la estabilidad del sitio activo de la otra subunidad. Los monómeros adoptan un plegamiento de barril (α/β), donde las hebras β forman una hoja β paralela circular que constituye la parte interna del barril, rodeado a su vez por 8 hélices α [34] [38].

Tres aminoácidos son particularmente importantes en el sitio catalítico: La lisina 13, la histidina 95 y el ácido glutámico 165. El ácido glutámico 165 actúa como un nucleófilo catalítico que atrae el protón del sustrato iniciando la isomerización (Figura 3). Otros elementos estructurales importantes son los lazos 3 y 6. El lazo 6 está constituido por los residuos 166 al 176 y forman una especie de tapa que se abre y cierra sobre el sitio activo con el objeto de mantener un entorno hidrofóbico para el sustrato. Otra característica estructural importante es el lazo 3, formado por los residuos 71 al 78, que contribuye a la mayoría de las interacciones no covalentes que mantienen unidos a los monómeros [38].

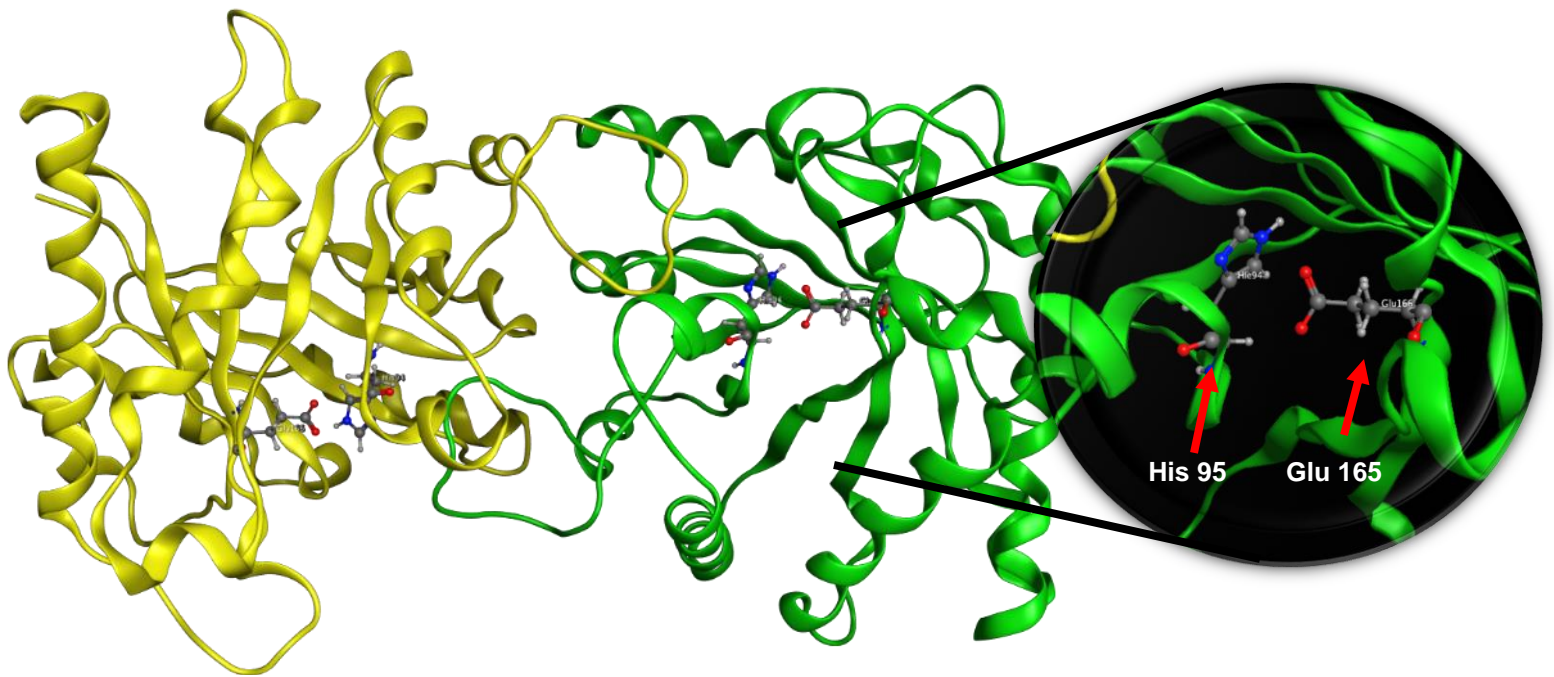


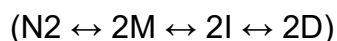
Figura 3. Estructura del dímero de la triosa fosfato isomerasa de *Trichomonas vaginalis* (archivo PDB 3QSR). Se resalta el el sitio catalítico.

1.2.1 La triosa fosfato isomerasa de *T. vaginalis*

En el genoma de *T. vaginalis*, se han identificado dos genes funcionales que codifican para la triosa fosfato isomerasa: *tvtim1* y *tvtim2*. Cada gen está en un locus diferente y muestran sitios de iniciación de la transcripción distintos [40]. Cada gen está regulado diferencialmente por la concentración de glucosa dentro del cultivo; mientras que *tvtim1* se sobreexpresa bajo condiciones de glucosa restringida, *tvtim2* se sobreexpresa bajo condiciones ricas en glucosa. Las secuencias de nucleótidos de los dos genes *tvtim* son idénticas en un 97,6%, y sus productos (TvTIM1 y TvTIM2) comparten el 98,4% de identidad. Las diferencias de aminoácidos se encuentran en cuatro de 254 residuos (GLu/Gln 18, Ile/Val 24, Ile/Val 45 y Pro/Ala 239 para TvTIM1 y TvTIM2, respectivamente). Las estructuras cristalinas de TvTIM1 y TvTIM2 revelaron dos homodímeros casi idénticos [41] y el análisis enzimático demostró parámetros cinéticos comparables [41].

A pesar de la secuencia y las similitudes de estructura, ambas proteínas muestran diferencias significativas en la estabilidad [41]. Las reacciones de desnaturalización de ambas isoformas se han descrito como procesos de tres pasos reversibles, en los cuales, los dímeros de TvTIM nativos (N2) primeramente se disocian para formar monómeros parcialmente desplegados (M), que su vez experimentan mayores cambios conformacionales para formar otra especie monomérica más extendida (I) y que a su vez a mayor concentración de agente desnaturalizante

conlleva a la formación del estado desplegado monomérico (D), de acuerdo al siguiente esquema:



El cambio de energía libre de Gibbs asociado al primer paso en cada reacción de desplegamiento, es decir la disociación de los dímeros, fue de $48.8 \pm 3 \text{ kJ mol}^{-1}$ para TvTIM1 [42], mientras que el valor para TvTIM2 fue $15.5 \pm 2.5 \text{ kJ mol}^{-1}$. Esto significa que TvTIM2 es tres veces más disociable que TvTIM1 [42]. Pero también el monómero TvTIM1 es más estable que la subunidad TvTIM2. Mientras que los cambios de energía libre de Gibbs para la segunda y tercera reacciones de desplegamiento para TvTIM1 se han calculado en $84 \pm 5.5 \text{ kJmol}^{-1}$ y $23.3 \pm 2 \text{ kJmol}^{-1}$, respectivamente, los mismos valores para TvTIM2 son $53.8 \pm 3 \text{ kJmol}^{-1}$ y $6.7 \pm 0.8 \text{ kJmol}^{-1}$. El cambio de energía libre de Gibbs para toda la reacción se calculó como $263.4 (\pm 18)$ y $136.5 (\pm 10.5) \text{ kJmol}^{-1}$ para TvTIM1 y TvTIM2, respectivamente [42].

También se analizó la localización celular de ambas enzimas. Lo comúnmente esperado es encontrar a la triosa fosfato isomerasa en el citoplasma de las células, por ser una enzima glucolítica. Sin embargo, a través de ensayos de inmunolocalización se encontró a TvTIM en la superficie celular de *T. vaginalis*; lo cual, además de inusual, fue un indicio de una posible función diferente a la actividad glucolítica (canónica) de TvTIM en la superficie celular de *T. vaginalis*. Recientemente, se determinó que TvTIM se une a las proteínas de la matriz extracelular laminina y fibronectina, identificándose así un nuevo factor de virulencia del parásito [43]. Estas características de localización extracelular y función de unión a proteínas de matriz extracelular del epitelio vaginal humano de al menos una de las isoformas de triosa fosfato isomerasa representan una estrategia para el tratamiento de la tricomoniasis con mecanismo de acción distinto a los fármacos hasta el momento conocidos con acción tricomonocida.

2 ANTECEDENTES

Este trabajo de tesis parte de los resultados de mi tesis de maestría, que tenía el objetivo de disminuir la actividad glucolítica de la enzima TvTIM por medio de un compuesto químico con características farmacológicas, como se ha mencionado, las enzimas glucolíticas son utilizadas como blancos terapéuticos para el diseño de fármacos contra diversos agentes patógenos causantes de enfermedades [32] [33]. En esta investigación se eligió como blanco terapéutico a una enzima clave de la glucólisis: La triosa fosfato isomerasa (TIM) [32] [33].

En el trabajo de maestría, se realizó un tamizaje virtual de alto rendimiento para seleccionar compuestos químicos que interactúan con al menos una isoforma de TvTIM. Los compuestos con el mayor potencial de interacción se adquirieron y evaluaron mediante ensayos *in vitro*.

Para la selección de estos compuestos primeramente se eligió como diana terapéutica a la triosa fosfato isomerasa de *Trichomonas vaginalis* (TvTIM). Considerando tanto la ubicación celular como la función de esta proteína, recientemente descritas en la superficie celular del parásito, esta proteína podría considerarse como un blanco novedoso y atractivo para el diseño de fármacos contra *Trichomonas vaginalis*, con mecanismo de acción terapéutica diferente a lo planteado hasta el momento en fármacos antiparasitarios (tricomonicidas).

Para realizar el tamizaje virtual, se utilizó el Software MOE [44] y las coordenadas de las estructuras cristalográficas de TvTIM1, TvTIM2 (archivos PDB: 3QST y 3QSR respectivamente) y para fines comparativos, se analizó también la posible interacción de los potenciales fármacos con la triosa fosfato isomerasa de humano (HsTIM, archivo PDB: 2JK2). En un primer paso, a los archivos de coordenadas cristalográficas se les realizó minimización de energía, adición de cargas eléctricas e hidrógenos polares. Usando el campo de fuerzas CHARMM27 [45]. Se calcularon sitios potenciales de unión que fueran diferenciales entre las isoformas de la proteína blanco de *Trichomonas vaginalis* y su ortóloga en seres humanos, también utilizando el software MOE que toma en cuenta cavidades y aminoácidos hidrofóbicos que faciliten una probable interacción con el ligando [46] [47]. Los sitios de unión identificados son idénticos en ambas isoformas de TvTIM. El sitio I incluye residuos de aminoácidos del sitio activo (Lys11, His94 y Glu166), así como Asn13, Ser95, Glu96, Asp99, Pro167, Ile168, Ala170, Ile171, Lys175-Thr179, Tyr209-Lys214, Asn216 y Asn217, todos ellos ubicados en bucles, hebras β y helices α . En

cuanto al sitio II, está compuesto por Met1, Thr3, Asn9, Glu37, Trp89, Lys121, Trp158-Val162, Asn203-Arg206, todos ellos ubicados principalmente en hebras- β .

Posteriormente, se realizó una simulación de la interacción molecular de alrededor de 950,000 compuestos en los dos sitios potenciales de unión (sitio I y sitio II) localizados en la superficie de las proteínas TvTIM1 y TvTIM2.

Los compuestos, que de acuerdo al cálculo de la energía de interacción ligando-proteína mostraron alto potencial de unión con las isoformas de la triosa fosfato isomerasa de *Trichomonas vaginalis* y baja probabilidad de interacción con la triosa fosfato isomerasa de los seres humanos, fueron seleccionados y adquiridos comercialmente 41 compuestos para evaluar sus efectos *in vitro*. Se evaluó el efecto de los compuestos con mayor potencial tricomonocida en la actividad enzimática de la diana terapéutica y en cultivos *in vitro* de los parásitos. Los resultados permitieron identificar a las moléculas A4 y D4, como dos moléculas capaces de inhibir el metabolismo central y/o el proceso de patogenicidad de *T. vaginalis* (Figura 4). Se demostró que estos compuestos disminuyen la viabilidad y la replicación de aislados de *Trichomonas vaginalis* de pacientes.

Se determinaron las concentraciones que presentan el efecto tricomonocida para los compuestos A4 y D4 (40 – 150 μM) similares al del control positivo (metronidazol, 40 μM), con potencial para poder desarrollar un fármaco tricomonocida.

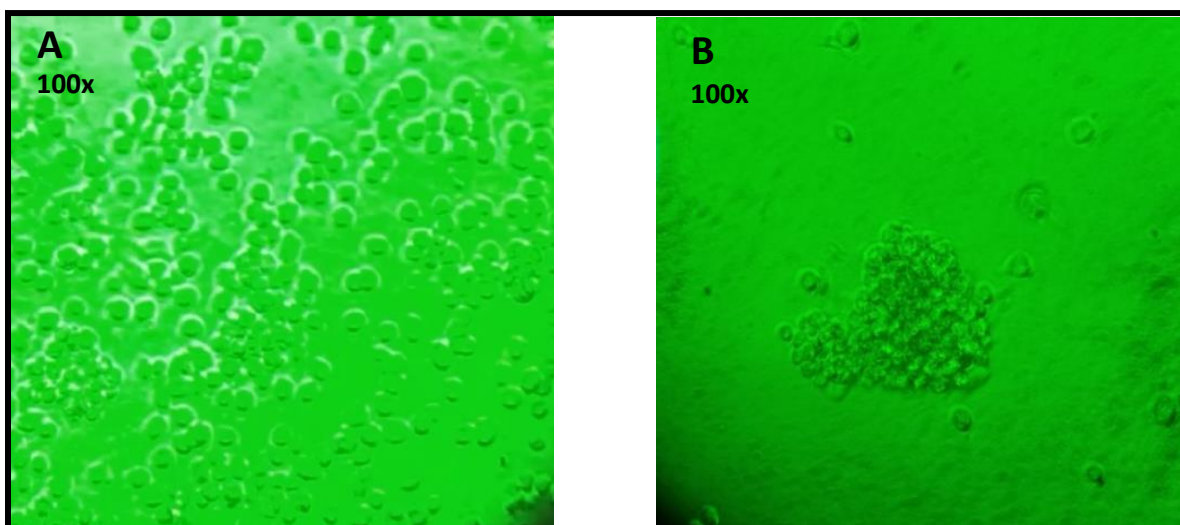


Figura 4. A) Cultivo de 50,000 parásitos con 4 % DMSO a las 24 h se encuentran viables y con movilidad. B) Cultivo de 50,000 parásitos con 200-400 μM de "A4" (1-4 % DMSO) a las 24 h no es viable el cultivo, nula movilidad de parásitos y pedaceria en el medio.

Estas pruebas se realizaron en el Laboratorio 11 de la Dra. Rossana Arroyo (Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, CINVESTAV-IPN). Se utilizaron dos aislados de parásito, identificados como CNCD-147 y CNCD-188, provenientes de pacientes infectadas (estos dos aislados de parásitos difieren entre sí en su patogenicidad, secreción de proteínas, tamaño y movilidad) [48].

La información química de los compuestos seleccionados con el efecto tricomonocida por ensayos *in silico* e *in vitro* son:

	Formula condensada	Peso Molecular (Da)	LogP
A4	$C_{29} H_{23} N O_7$	498	4.58
D4	$C_{17} H_{15} N_5 O_6 S_2$	449	0.97

Por lo que en este trabajo se analizaron A4 y D4 desde varios puntos de vista, como la interacción de dichos fármacos con la enzima blanco, su efecto terapéutico en mayor número de aislados, su toxicidad aguda en modelo murino, genotoxicidad *in vitro* e *in vivo*. Además, se evaluó el posible efecto sinérgico de la interacción entre A4 y D4.

3 JUSTIFICACION

La tricomoniasis causada por *Trichomonas vaginalis* es la infección de transmisión sexual (ITS) no viral más común en todo el mundo [1]. Según la Organización Mundial de la Salud, la incidencia anual es de más de 230 millones de casos en todo el mundo [4]. Esta afirmación es alarmante si consideramos que al menos el 50 % de los casos son asintomáticos [2] [3], por lo que no se detectan ni se tratan, promoviendo así la propagación de la infección.

El tratamiento comúnmente utilizado para la tricomoniasis, desde principios de los 60`s, es la provisión de nitroimidazoles (metronidazol y derivados del imidazol) [15]. Sin embargo, en algunos pacientes (5-20 %) se observa un fracaso del tratamiento [9] [11] [12]. En tales casos la infección no se resuelve y las alternativas terapéuticas en el mercado no son 100% efectivas, destacando la necesidad de desarrollar nuevas estrategias terapéuticas contra esta ITS.

En nuestro grupo de trabajo, previamente se identificaron dos compuestos con alto potencial para ser usados como fármacos contra esta enfermedad, a los cuales se les denominó como A4 y D4 [49].

4 OBJETIVO GENERAL

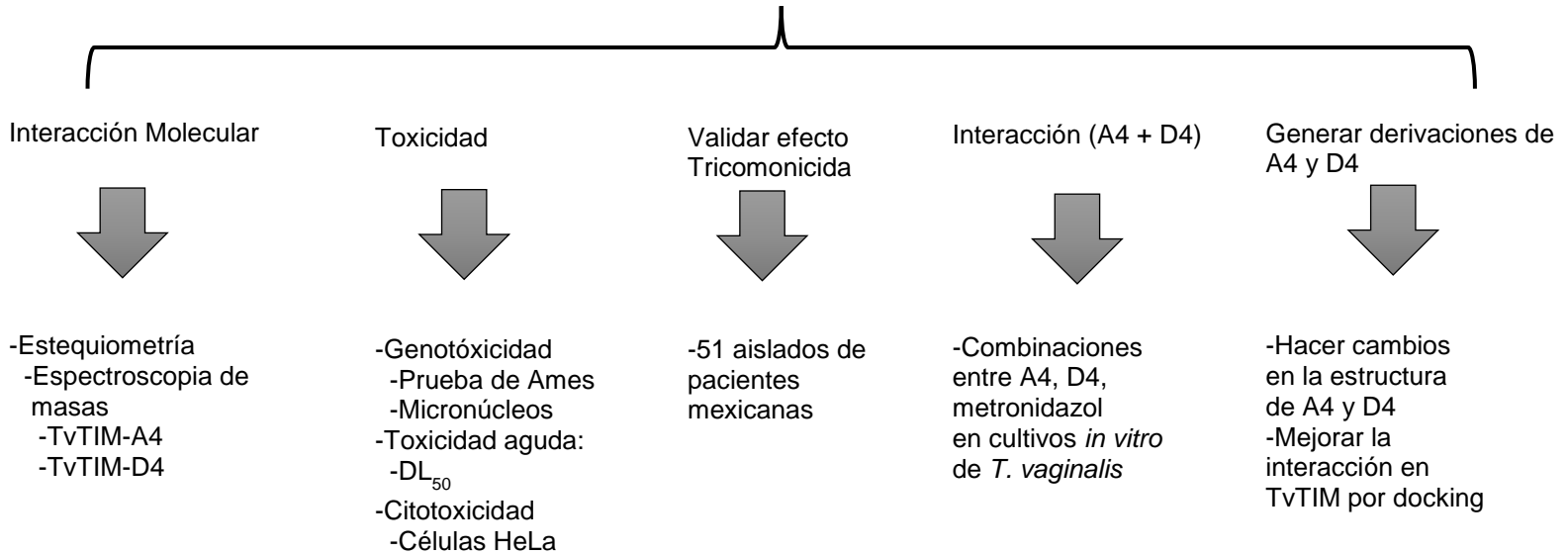
Evaluar los compuestos tricomonicidas A4 y D4

4.1 Objetivos Específicos

- Describir a nivel atómico la interacción molecular de A4, D4 y TvTIM
- Validar el efecto terapéutico de A4, D4 y la combinación A4+D4 sobre varios aislados de *T. vaginalis*.
- Determinar la toxicidad de los fármacos potenciales A4, D4 y A4+D4 (genotoxicidad *in vitro* e *in vivo* y DL₅₀).
- Proponer derivados químicos de A4 y D4 que podrían mejorar su efecto terapéutico.

5 MATERIALES Y METODOS

Estrategia experimental Evaluación de los compuestos A4 y D4



5.1 Determinación de la relación estequiométrica entre los compuestos A4 y D4 con la TvTIM1 aislada y en complejo con cada uno de los compuestos

La relación estequiométrica entre los compuestos A4 y D4 se determinó por la diferencia de masas la isoforma de TvTIM1 aislada y en complejo con cada uno de los compuestos A4 y D4 (por separado). Para ello, una solución de TvTIM1 a una concentración de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se incubó, durante 2 h, con 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de A4 o D4 (ambos disueltos en DMSO al 1 %) y para el control negativo, únicamente con DMSO (vehículo al 1 %). Posteriormente, se obtuvieron los espectros de masas (ms) de la proteína, utilizando un espectrómetro de masas MALDI-TOF / TOF (UltrafleXtreme Bruker Daltonics) equipado con láser Nd en modo reflecto. Los iones monoisotópicos $[\text{MH}^+]$ se midieron en el intervalo de 700-4500 m / z con una tolerancia de 50 ppm. Los espectros de iones de fragmentos se obtuvieron en modo Lift. La exactitud de las mediciones de los picos de masa de iones de fragmentos fue de 1 Da. Para analizar espectros de masas, se utilizó el software FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics). Todos los procedimientos para la preparación de las muestras de proteínas analizadas para espectrometría de masas siguieron un protocolo descrito por Ronci [50] [51].

5.2 Cultivos de *T. vaginalis*

Para hacer crecer un cultivo, se sembró el inóculo de *T. vaginalis* en 5 mL de medio TYM [40] y 10 % de suero de caballo en condiciones estériles. Se incubó a 37 °C por 24 h y se determinó la viabilidad, en esta primera incubación, se observaron parásitos muertos y una viabilidad del 60-70 %. Para una segunda siembra, se inoculó 1 mL del cultivo en 5 mL de medio y 10 % de suero de caballo por 24 h, obteniendo una viabilidad aproximada del 90 % con aproximadamente 1×10^6 parásitos en el medio. Este cultivo se utilizó como inóculo para realizar las pruebas de inhibición [52]. Bajo estas condiciones *T. vaginalis* se replicó cada 8 h a 37 °C.

5.3 Efecto tricomonocida de A4 y D4 en varios aislados de *T. vaginalis* y cálculo de CI_{50}

Se realizaron pruebas de inhibición de cultivos de *T. vaginalis* de aislados de 51 pacientes de diferentes hospitales, incluyendo del Centro Nacional de Clínicas de Displasia del Hospital General de México, Hospital Juárez de México, Clínicas del Estado de Jalisco, entre otras. Estos aislados, si bien no están ampliamente caracterizados, presentan diferentes características de patogenicidad como son su movilidad, tamaño, formación de grupos, etc. [40].

Se utilizaron placas de 96 pozos de 300 μ L de capacidad cada uno, donde se sembraron 5,000, 10,000, 50,000 y 100,000 parásitos para evaluar ya sea con el compuesto A4 o D4, en concentraciones desde 10 μ M hasta 400 μ M. En el caso de la combinación (A4 + D4; 1:3) se utilizaron concentraciones totales entre 10 μ M hasta 200 μ M (la relación molar entre los compuestos para la combinación A4:D4 se determinó experimentalmente como se describe más adelante en sección 2.5). En todos los casos, se incubaron las placas a 37 °C por 24 h y 48 h. A los controles negativos se les agregó DMSO, en concentraciones desde 0.5 hasta 2 % v/v. Todas las pruebas se realizaron por triplicado. Esta metodología es similar a la reportada en la literatura para evaluar la resistencia de *T. vaginalis* al metronidazol [52] [53]. Estos aislados no han sido tipificados, es decir, al momento se desconocen si pertenecen al tipo 1 o tipo 2. El conteo de tricomonas se realizó en el hematocímetro, se multiplica por el factor 10^4 para determinar la cantidad de parásitos en 1 mL. Se determinó el porcentaje de viabilidad con tinción con azul de tripano y se colocó la muestra en el hematocímetro, el porcentaje de viabilidad es inverso al porcentaje de células teñidas [54]. La concentración inhibitoria 50 %

(CI₅₀; viabilidad del cultivo al 50 % a las 24 h) se calculó con el apoyo del software Graph Pad Prism.

5.4 Cinética del efecto tricomonocida

Se incubaron las tricomonas en placas de 96 pozos a 37 ° C con 20,000 parásitos por cada 200 µL y concentraciones de A4 y D4, entre 50 - 200 y de la combinación de (A4 + D4) entre 20 - 100 µM, evaluando la viabilidad del cultivo cada 0.5, 1, 3, 6, 12, 24, o 48 h. Las placas fueron examinadas con un microscopio de contraste de fases invertido (Nikon; distribuido por Ehrenreich Photo-Optical Industries, Garden City, N.Y.). Se registraron las concentraciones más bajas de A4, D4 y de la combinación (A4 + D4) que inhibieron completamente la movilidad de los parásitos de *Trichomonas vaginalis* [52] [53] para cada aislado en cada período de tiempo. Realizando en todos los casos las pruebas por triplicado.

5.5 Efecto terapéutico de la combinación (A4 + D4) en cultivos de *T. vaginalis*

Se utilizaron placas de 96 pozos de 300 µL de capacidad cada pozo, donde se sembraron 5,000, 10,000, 50,000 y 100,000 parásitos para evaluar la combinación de (A4 + D4), en concentraciones desde 10 - 400 µM, en diferentes relaciones molares 1:2, 2:1, 1:3, 3:1, 1:4 y 4:1, incubando la placa a 37 °C por 24 h. Los controles contenían únicamente DMSO desde 0.5 - 2 % v/v, cabe mencionar que se determinó que la relación molar 1:3 de A4+D4, es la que presenta mejor efecto tricomonocida; por lo que esta relación molar fue la que se siguió utilizando en los demás experimentos.

5.6 Efecto sinérgico de A4 y D4 en cultivos *in vitro* de *T. vaginalis*

Para evaluar la existencia de un posible efecto sinérgico, aditivo o antagónico entre los compuestos A4 y D4 y con el objetivo de reducir la dosis necesaria de cada compuesto en monoterapia y, por ello, minimizar su toxicidad, se utilizó la metodología de Chou-Talalay [60] y el software OriginPro 8. El protocolo de Chou-Talalay se basa en la determinación del índice de combinación (IC) que se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$IC = \frac{(D)_{A4}}{(Dx)_{A4}} + \frac{(D)_{D4}}{(Dx)_{D4}}$$

Donde $(D)_{A4}$ y $(D)_{D4}$ corresponden a las concentraciones de los compuestos A4 y D4, usados en forma combinada para obtener un porcentaje de efecto terapéutico sobre un sistema, en este caso sería el efecto tricomonida. $(Dx)_{A4}$ y $(Dx)_{D4}$ corresponde a las concentraciones de cada compuesto usado individualmente para obtener el mismo efecto. Si la suma de estas dos fracciones es igual a 1, indica un efecto aditivo. Si el valor de IC es menor que 1, indica que el efecto es sinérgico, y si el valor de IC es mayor que 1, indica un efecto antagónico. El efecto sinérgico puede definirse como: leve (IC: 0,85- 0,90), moderado (IC: 0,7-0,85), sinergismo (CI: 0,3-0,7), fuerte (CI: 0,1-0,3) o muy fuerte (CI<0,1) (Tabla 3) . Los valores $(D)_1$ y $(D)_2$ y $(Dx)_1$ y $(Dx)_2$ se obtienen a partir de las curvas dosis-efecto tanto de los fármacos individuales y de la combinación respectivamente.

Tabla 3. Valores del Índice de Combinación (IC)

INDICE DE COMBINACION	SINERGISMO / ANTAGONISMO
0-1 - 0-3	Sinergismo fuerte
0.3 - 0.7	Sinergismo
0.7 - 0.85	Sinergismo moderado
0.85 - 0.9	Sinergismo ligero
0.9 - 1.1	Aditividad
1.1 - 1.2	Antagonismo ligero
1.2 - 1.45	Antagonismo moderado
1.45 - 3.3	Antagonismo fuerte
3.3 - 10	Antagonismo muy fuerte

5.7 Pruebas de Toxicidad

Una vez que se demostró el efecto tricomonocida se realizaron pruebas de toxicidad de los compuestos A4 y D4 de la siguiente manera:

5.8 Genotoxicidad *in vitro*: Prueba de Ames.

Las pruebas de mutagénesis son ensayos biológicos utilizados para evaluar el potencial mutagénico de compuestos químicos [55]. Esta prueba consiste en el uso de cepas de la bacteria *Salmonella typhimurium* alteradas genéticamente con mutaciones en los genes implicados en la síntesis de histidina. A causa de dichas mutaciones, estas bacterias requieren de un suministro externo de histidina para su crecimiento. El ensayo evalúa la capacidad del compuesto ensayado para provocar una alteración genética en las bacterias que permita el retorno al crecimiento en un soporte libre de histidina (crecimiento de colonias revertantes). Es decir, el potencial mutagénico del compuesto ensayado es directamente proporcional al número de colonias revertantes observadas. Se realizó la Prueba de Ames en cepas de *Salmonella typhimurium* auxótrofas a histidina: TA98 (hisD3502), que puede detectar mutaciones de desplazamiento de marco de lectura, TA100 (hisG46), que puede detectar mutaciones de sustitución de pares de bases y TA102 (hisG428), que puede detectar el daño al ADN inducido por especies reactivas de oxígeno.

Se evaluó la mutagenicidad de A4, D4 y (A4 + D4) en cepas mencionadas, con o sin homogeneizado de hígado de ratas (mezcla S9) inducidas con Aroclor 1254, como se ha descrito por Maron y Ames (9). Se utilizaron cinco concentraciones de A4 (11, 22, 50, 100 y 200 µg / placa); D4 (11, 22, 50, 100 y 200 µg / placa) y (A4 + D4; relación 1:3) (11, 22, 50, 100 y 200 µg / placa), en la presencia o ausencia de 500 µl de la mezcla S9. Los compuestos A4 y D4 o bien la combinación (A4 + D4) se disolvieron en DMSO a las concentraciones indicadas y se mezclaron con 100 µl de cultivo de bacterias ($1-2 \times 10^9$ CFU ml⁻¹) en 2 ml de agar suave que se añadió posteriormente al agar mínimo de las placas de Vogel Bonner con 0.5 mM histidina / biotina (9). Las placas se incubaron durante 48 h a 37 °C y las colonias revertantes formadas fueron contadas. Para obtener un resultado positivo mutágeno con la Prueba de Ames, la sustancia de ensayo debe inducir el doble de revertantes del que se obtienen por reversión espontánea. Los controles positivos usados en esta Prueba fueron Ácido Picrolónico (PA) a 50

μg / placa, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NMNG) a $\mu\text{10 g}$ / placa, Mitomicina C (Mit C) AT10 ng / placa, 2-Aminoantreceno (2AA) a 10 μg / placa y Ciclofosfamida (CP) a 500 μg / placa.

5.9 Genotoxicidad *in vivo*: Ensayo de Micronúcleos

El ensayo de micronúcleos se realiza en la medula ósea de roedores y que permite evaluar la capacidad de un compuesto para inducir alteraciones cromosómicas. En la fase mitótica anafásica, en la que se separan las dos cromátides hermanas, se forman micronúcleos a partir de material genético que queda rezagado. El material cromosómico, que no llega ninguno de los polos anafásicos debido a alguna alteración cromosómica o algún mal funcionamiento del aparato mitótico es identificado por este ensayo [56]. Para este ensayo se utilizaron ratones machos CD1 (25 ± 5 g). Los ratones fueron mantenidos de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana de Regulaciones para la Producción, Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (NOM-062-ZOO-1999) y el protocolo aprobado por el Comité de Ética de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía de México (Registro No. ENMH-CB-010 a 2011). Los ratones recibieron una dosis de 1 g/kg, se mantuvieron en una sala de animales a 25 ± 2 °C y en ciclos de luz-oscuridad de 12 h: 12 h. Los ratones fueron alimentados ad libitum con una dieta estándar (Purina, Cuautitlan, México) y agua.

Los compuestos A4 y D4 se disolvieron en DMSO con ajuste de la concentración (2000 o 300 mg / kg) a un volumen de administración de 0.1 ml por ratón, por vía intragástrica (v.i.g.); antes de la administración, los animales se mantuvieron en ayunas durante 8 h. Se observaron los animales 2 h después del tratamiento y después de 48 h, se tomaron las muestras de sangre para la determinación de micronúcleos. Cada grupo se evaluó por triplicado y se utilizó como control del vehículo DMSO (0.1 ml / ratón) y como control positivo, ciclofosfamida (50 mg / kg por vía intraperitoneal [57]).

La presencia de reticulocitos micronucleados (RET-MN) y de micronúcleos en la población de eritrocitos maduros normocromático (ERI-MN) en muestras de sangre periférica analizados, se marcaron con anticuerpo conjugado con FITC dirigido contra un antígeno de superficie celular (CD71 receptor de la transferrina). Se detectaron células micronucleadas basado en la

fluorescencia producida después de la tinción con yoduro de propidio y se cuantificaron utilizando un citómetro de flujo FACSAria™ (BD Biosciences, San Jose, CA).

5.10 Evaluación de la citotoxicidad del DMSO

Para evaluar si el vehículo (DMSO) tiene un efecto citotóxico en cultivos de *T. vaginalis* y células HeLa, los cultivos de ambos tipos de células se llevaron a cabo en presencia de DMSO de 0.5 - 2 % v/v que corresponden a los porcentajes equivalentes usando concentraciones de 10 - 400 µM de los compuestos.

5.11 Otros estudios de toxicidad

5.11.1 Citotoxicidad de A4, D4 y (A4 + D4) en células HeLa (Ensayo de MTT)

La citotoxicidad de los compuestos se determinó con un ensayo MTT descrito por Mosmann [58]. Este ensayo se basa en la reducción de MTT amarillo (3- (4,5-dimethylthiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio; de color amarillo) a formazán por la actividad de la enzima succinato deshidrogenasa mitocondrial en células vivas. Para cuantificar la formación de formazán (insoluble en agua), debe disolverse en DMSO y medir su concentración por absorbancia a 570 nm (A570 nm). Se considera que la viabilidad celular es directamente proporcional a la actividad de la succinato deshidrogenasa mitocondrial [59].

5.11.2 Cultivo de células HeLa

Cultivos de células HeLa fueron sembrados en placas de 96 pozos (8000 células / pozo), las células HeLa fueron tratadas durante 24 h y 48 h con diferentes concentraciones de A4, D4, (A4 + D4) y cisplatino (control positivo) de 10 – 400 µM por pozo y 1 % de DMSO como control negativo. Después de la incubación de 24 o 48 h, el medio fue retirado de los pozos y se reemplazó con medio que contenía MTT (1 mg / ml), y se incubaron las células durante 4 h adicionales a 37 °C. Después de la incubación y la eliminación del medio con MTT, los cristales de formazán se disolvieron en DMSO y se leyeron las placas en un lector de microplacas a 570

nm (ELx808, Bio-Tek, Winooski, VT, EE.UU.). Todos los tratamientos se realizaron tres veces por triplicado. El % de citotoxicidad se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ Citotoxicidad} = \left(1 - \frac{\text{Absorbancia de células tratadas}}{\text{Absorbancia de células sin tratar}} \right) * 100$$

Los valores de concentración que causaron una inhibición del crecimiento celular del 50 % (Concentración inhibitoria $_{50}$) fueron calculados a partir de la relación dosis-efecto de cada línea celular por regresión no lineal con software Prism 5.0 (GraphPad, La Jolla, CA, EE.UU.).

5.11.3 Dosis letal 50 (DL $_{50}$)

Este experimento se realizó de acuerdo con el método OCDE TG 423 (Anexo VI). Brevemente consistió en: A grupos de tres animales machos se les administró una dosis única por v.i.g. a partir de 2,000 mg / kg en ratones machos de la cepa CD1 (25 - 30 g), en caso de muerte de dos o más animales, se procedió a disminuir las dosis a 300 mg / kg (protocolo TG 423). Se observó el estado general de salud de los animales después de 1, 2, 4 y 6 h y una vez al día durante 14 días. Los animales fueron observados después del tratamiento de los signos de toxicidad o la muerte. Al final del período de observación se sacrificaron los animales en una cámara de CO $_2$. Posteriormente, los órganos (pulmón, riñón, corazón, estómago, intestinos, bazo e hígado) se retiraron y se hicieron observaciones macroscópicas en busca de lesiones patológicas. El valor de la DL $_{50}$ se determinó de acuerdo con el Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación (GHS) y de acuerdo con lo descrito en OCDE TG 423.

5.12 Propuesta de derivados químicos de A4 y D4 para mejorar la interacción con TvTIM por docking

Se utilizó la función MedChem de transformaciones de MOE [21], que permite encontrar nuevas estructuras químicas mediante la aplicación de un conjunto de reglas de transformación a los ligandos existentes. Existen dos tipos de transformaciones: Aquellas que preservan propiedades químicas (por ejemplo, moléculas con el mismo número de átomos o electrones de valencia) y las que modifican propiedades (como sustitución u homologación de anillos). Las

transformaciones típicas pueden intercambiar grupos funcionales, mientras se preserva el resto del compuesto. Este procedimiento puede ser aplicado iterativamente, dando por resultado cambios acumulativos de las estructuras originales. En la generación y evaluación de derivados químicos, se toma el cuidado de preservar la geometría de los sustituyentes siempre que sea posible. Los derivados propuestos se evalúan en función de una serie de criterios como propiedades moleculares, reglas de Lipinski, posibilidad de síntesis química, interacción con la molécula blanco (proteína) o la interacción en los sitios de unión. En la Figura 5 se describe el proceso.

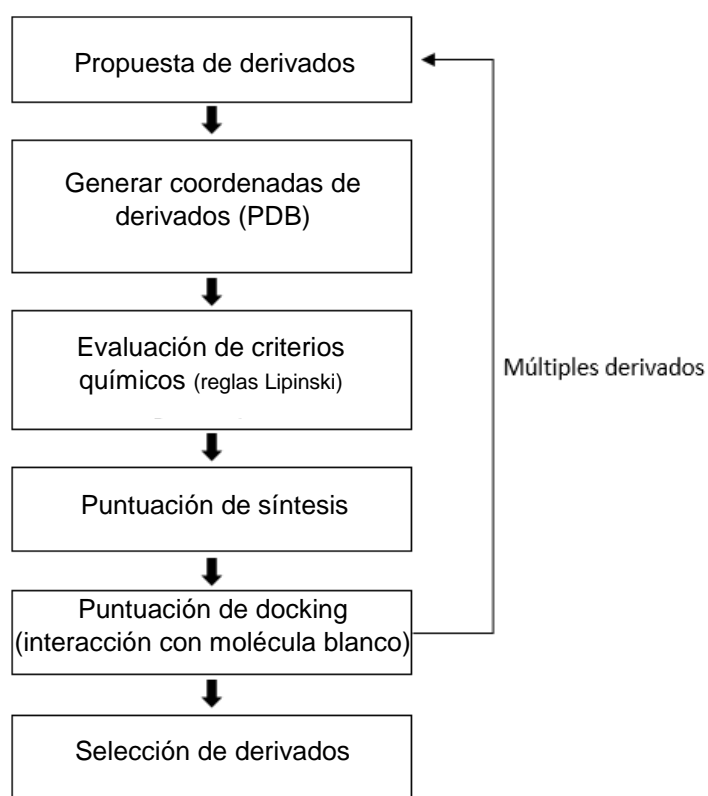


Figura 5. Esquema general de la generación y evaluación de derivados químicos usando el programa MOE.

6 RESULTADOS

6.1 Relación estequiométrica de A4 y D4 con la Triosa fosfato isomerasa de *Trichomonas vaginalis*

Las masas moleculares de TvTIM1 aislada y luego en complejo con A4 o con D4 (TvTIM-A4 y TvTIM-D4) se determinaron por MALDI-TOF/TOF (del inglés: *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time of flight*; o *desorción/ionización asistida por láser en matriz*). El espectro de masas de TvTIM1 se muestra en Figura 6, el cálculo de la masa para TvTIM1 aislada fue de 27,889 Da (Figura 6a). La masa del complejo TvTIM-A4 (10 μ M de A4) fue de 28,238 Da (Figura 6b). Dado que la masa teórica de A4 es 498 Da, este pico está muy cerca de un complejo esperado con una relación 1:1 de TvTIM-A4. No se observaron picos a la masa molecular correspondiente a las proporciones 2:1 o 1:2 de TvTIM1-A4. También se obtuvieron resultados similares con la adición de 10 μ M de D4, dando lugar a la formación de picos correspondientes a una masa molecular de 28.857 Da (Figura 6c). La masa teórica de D4 es 449 Da, este pico está muy cerca de un complejo esperado con una relación 1:2 de TvTIM1-D4. No se observaron picos a la masa molecular correspondiente a relaciones 1:1 o 2:1 de TvTIM-D4 (Tabla 4). De acuerdo a los antecedentes, los sitios de interacción de los compuestos en TvTIM1 y TvTIM2, son idénticos y no involucran a los cuatro aminoácidos que son diferentes entre TvTIM1 y TvTIM2, por lo que es de esperarse que la relación estequiométrica con ambas isoformas de TvTIM de A4 y D4 sean indistintas.

Tabla 4. Masas teóricas y determinadas experimentalmente (MALDI-TOF) de A4, D4, TvTIM1, TvTIM1-A4 y TvTIM1-D4 y relaciones estequiométricas de TvTIM1-A4 y TvTIM1-D4.

Especie	Masa Teórica (Da)	Masa determinada por MALDI-TOF (Da)	Relación estequiométrica (monómero de TvTIM:ligando)
TvTIM1	27472	27,889	--
A4	498	--	--
D4	449	--	--
TvTIM1-A4		28,238	1:1
TvTIM1-D4		28,857	1:2

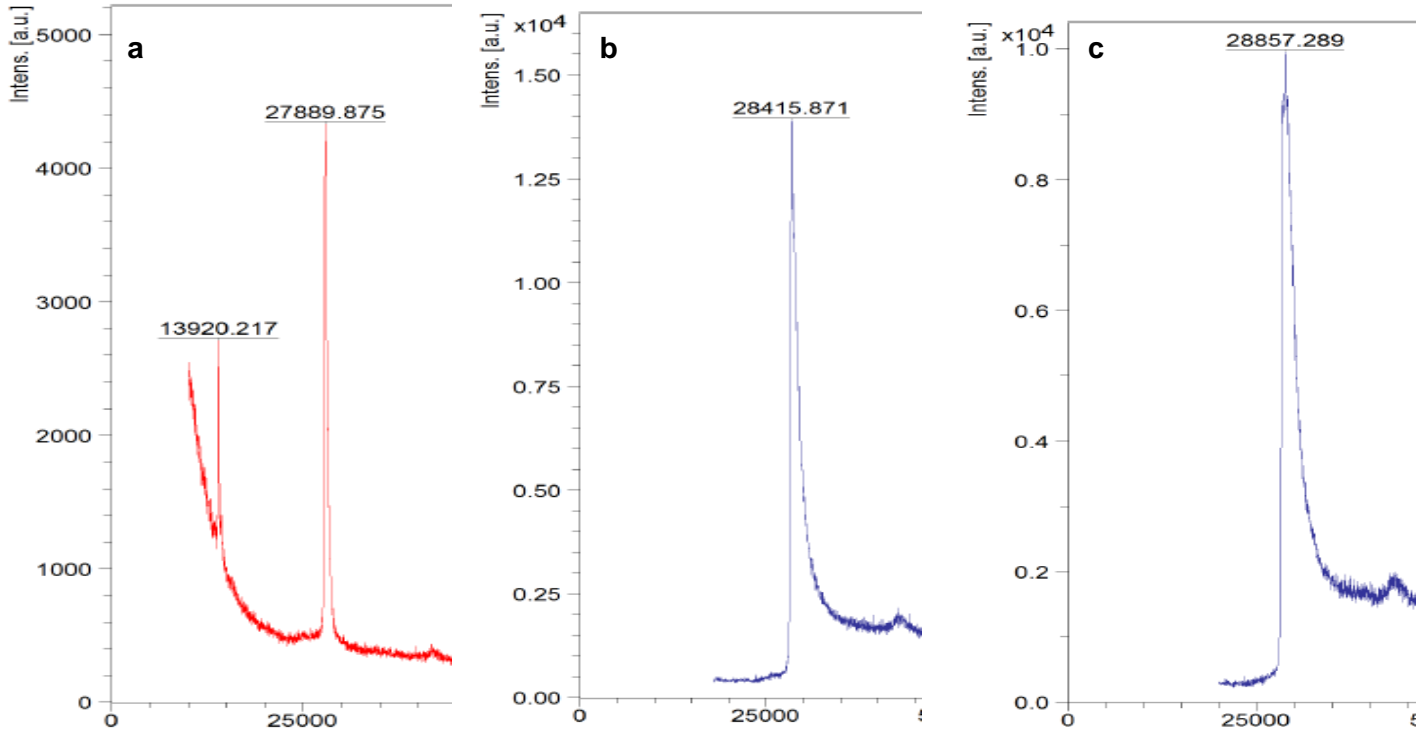


Figura 6. Espectros de masas (MALDI-TOF) de: a) TvTIM1 aislada, b) Complejo TvTIM1-A4, c) Complejo TvTIM1-D4

6.2 Efecto tricomonocida de A4 y D4 sobre 51 aislados de *T. vaginalis* y Calculo de CI_{50}

Los ensayos de inhibición de cultivos de *T. vaginalis* de 51 aislados de pacientes se realizaron en el Laboratorio 11, en el Departamento de Infectómica de CINVESTAV. Los aislados evaluados se describen en el Anexo VII.

Se utilizaron cultivos de aproximadamente 10,000 y 20,000 parásitos para cada compuesto (A4, D4 y metronidazol), realizando ensayos por triplicado, a concentraciones variables de cada compuesto 1 – 500 μ M, incubando a 37 °C durante 24 y 48 h.

Se observó que, para concentraciones mayores de 50 μ M para A4 y de 150 μ M de D4 a las 24 h la replicación de los 51 aislados de parásitos disminuyó, alcanzando un promedio de menos de una replicación cada 24 h (el control de metronidazol obtenido fue de 2 replicaciones en 24 h). Además, los parásitos pierden su movilidad, formando pequeños grupos y mostraron tendencia a perder adherencia a la pared del pozo. Todos los aislados se observaron en un

microscopio de luz inversa a un aumento de 100x. A las 24 h en la comprobación de la integridad de la membrana sólo el 20% de los parásitos se tiñeron con el azul de tripano (para determinar ruptura de la membrana). Después de 48 h, el número de parásitos observados disminuyó. Además, se observaron restos de tricomonas en el medio, así como el 90 % de los parásitos teñidos con azul de tripano, lo que indica la pérdida de viabilidad de los parásitos. Los resultados fueron muy similares en los 51 aislados de pacientes analizados.

De este modo, se confirma que los compuestos A4 y D4 tienen un efecto tricomonocida y por lo tanto un gran potencial para ser utilizado como fármacos contra *T. vaginalis*.

En la Figura 7 se muestran los resultados de los promedios de los porcentajes de viabilidad de cultivos (51 aislados) de 20, 000 parásitos incubados con concentraciones variables de A4 y D4 (1- 500 μ M) para determinar la concentración necesaria de cada compuesto para lograr una inhibición del cultivo del 50 % (CI_{50}), o bien al 100 %, es decir CI_{100}

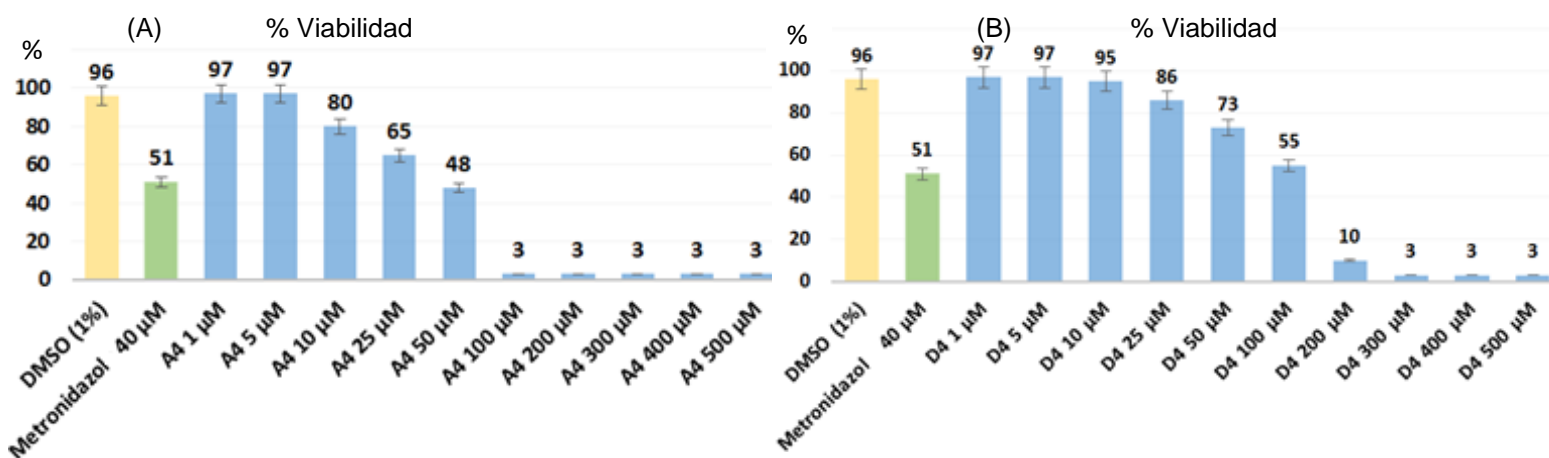


Figura 7. Promedio del porcentaje de viabilidad de cultivos de *T. vaginalis* en presencia de concentraciones variables de A) A4 y B) D4. Las barras representan una desviación estándar.

Los datos fueron analizados en el software Graph Pad Prism y se determinaron los valores de CI_{50} , que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Concentraciones requeridas para efecto tricomonocida al 50% (CI₅₀) y al 100 % (CI₁₀₀) de cultivos de 20,000 parásitos de *T. vaginalis* a las 24 h* Los datos de CI₅₀ y CI₁₀₀ reportados [52] [53]

Compuesto	CI₅₀ (μM)	CI₁₀₀ (μM)
A4	47 ± 2.8	100 ± 5
D4	153 ± 12.03	230 ± 18
Metronidazol	40*	90*

6.3 Cinética del efecto tricomonocida de A4 y D4

Para describir la evolución en el tiempo del efecto tricomonocida de A4 y D4, se evaluó la viabilidad de cultivos *in vitro* de los 51 aislados de *T. vaginalis*, analizando la replicación, la movilidad y la integridad de la membrana. Los cultivos se analizaron en distintos tiempos después de la adición de cada compuesto A4 y D4. Se evaluaron varias concentraciones de cada compuesto. En la Figura 8 se presentan los datos correspondientes a las concentraciones CI₁₀₀, determinadas previamente (Tabla 5, por cada 20,000 parásitos). Se observó que el porcentaje de viabilidad de los cultivos se abate completamente (hasta cero) después de 3 h de incubación para A4 y de D4. Por el contrario, para el metronidazol se observa la misma disminución de la viabilidad después de 4 a 6 h con 90 μM por 20,000 parásitos.

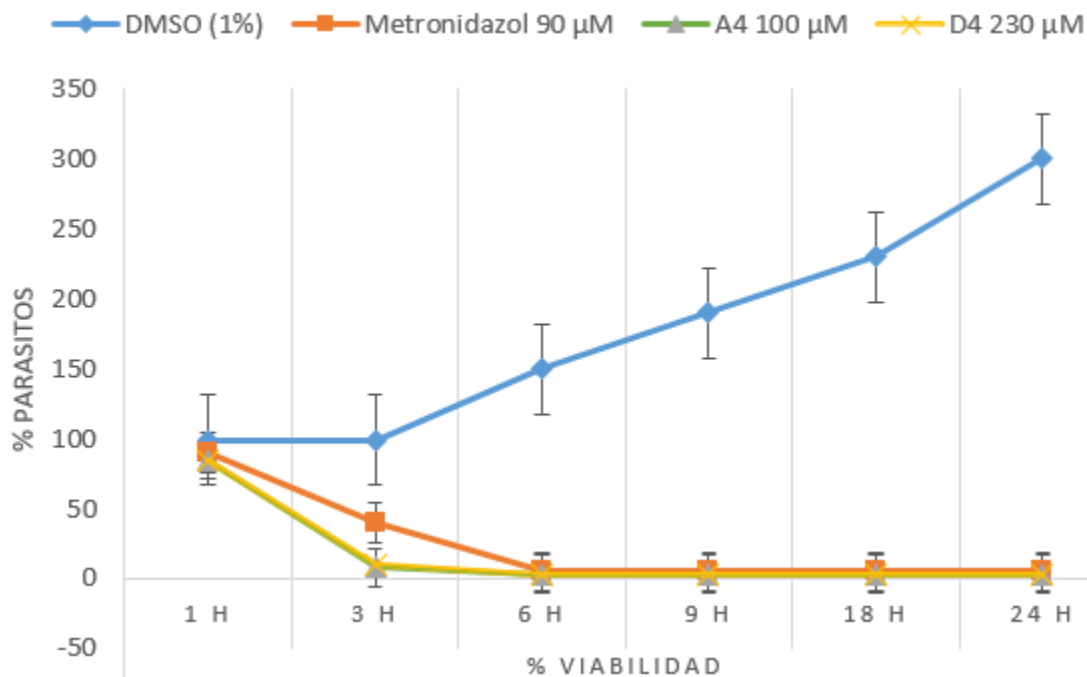


Figura 8. Promedio de la evolución en el tiempo del efecto tricomonocida de A4, D4 y metronidazol en cultivos de 20,000 de los 51 aislados de parásitos de *T. vaginalis*. El control negativo corresponde al vehículo (DMSO 1 %).

Las barras indican una desviación estándar.

6.4 Efecto tricomonocida de la combinación (A4 + D4) sobre 51 aislados de *T. vaginalis*

Para conocer si existe modificación del efecto tricomonocida cuando se administran conjuntamente A4 y D4 en los aislados de *T. vaginalis*; se incubaron cultivos de los 51 aislados, evaluando la viabilidad de los mismos después de la adición de distintas combinaciones (A4+D4). Se utilizaron diferentes relaciones molares 1:2, 2:1, 1:3, 3:1, 1:4 y 4:1 de A4 y D4, respectivamente. Las concentraciones totales (de los compuestos en combinación) que se evaluaron fueron entre 10 - 400 μM por cada 10,000 y 20,000 parásitos. Se determinó que la relación 1:3 de A4 y D4 fue la que presentó mejor efecto tricomonocida. Específicamente, se aprecia un efecto en la viabilidad de los parásitos comparable al observado en condiciones de CI100 de A4 y D4 en forma individual, cuando se usa la combinación (A4 + D4) en una concentración total de 100 μM (A4 25 μM + D4 75 μM). Por lo que, los experimentos posteriores de la combinación (A4+D4) se realizaron usando la relación 1:3 y la concentración 100 μM (A4 25 μM + D4 75 μM) como punto de referencia para otras determinaciones.

6.5 Cinética del efecto tricomonocida de la combinación (A4 + D4)

En la Figura 9 se muestra la cinética del efecto tricomonocida utilizando una concentración total de 100 μM , que inhibe a los 51 aislados completamente (20,000 parásitos, después de 24 h).

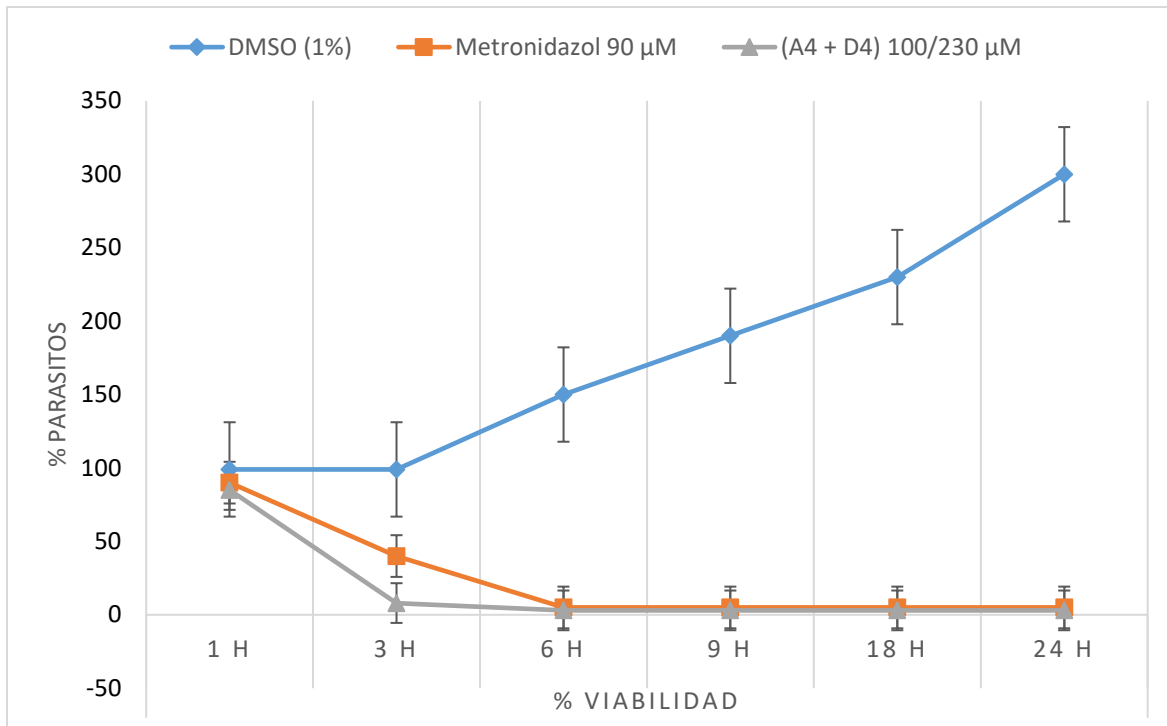


Figura 9. Promedio de la evolución en el tiempo del efecto tricomonocida de la combinación (A4 + D4) y metronidazol en cultivos de 20,000 parásitos de 51 aislados. Para fines comparativos se muestran el vehículo y (DMSO 1 %) y metronidazol ($\text{CI}_{100} = 90 \mu\text{M}$) como controles negativo y positivo respectivamente. Las barras indican una desviación estándar

Se observó que la viabilidad de los 51 aislados (20,000 parásitos) disminuye al 100 % después de 3 h de incubación para la combinación (A4 + D4) (100 μM). La replicación disminuye, ya que se presenta un promedio de 1.1 replicaciones por 24 h (promedio de los 51 aislados); mientras que para el control negativo se observan en promedio 3 replicaciones cada 24 h. Los parásitos pierden la movilidad, se aprecia la formación de pequeños grupos y se pierde la tendencia a poblar la periferia o adhesión a la pared del pozo. Además, en las pruebas de la integridad de membrana, realizadas después de 24 h, 5 % de los parásitos se tiñeron con azul de tripano (que indica la ruptura de la membrana), a las 48 h el 95 % de la población de parásitos fueron

de color azul y aquellos que no se tiñeron, disminuyeron su movilidad, por lo tanto, la muerte de los parásitos y pérdida de la viabilidad del cultivo. Para el caso del metronidazol, se observó la misma disminución de la viabilidad después de 4 a 6 h de incubación y los resultados a las 24 y 48 h son similares, como sucede con la combinación (A4 + D4). Además, determinamos que los 51 aislados que utilizamos fueron sensibles al metronidazol a 90 μM .

6.6 Efecto sinérgico entre A4 y D4

Para evaluar el posible efecto sinérgico, se utilizó el protocolo de Chou y Talalay [60] que establece, evaluar el efecto terapéutico de distintas concentraciones de la combinación de fármacos. De acuerdo al protocolo la concentración de referencia inicial de cada compuesto corresponde al valor de CI_{50} de cada compuesto individual, en este caso: 47 μM para A4 y 153 μM para D4. Estas concentraciones de referencia inicial se consideran el valor 1X. Así de acuerdo con el protocolo [60], se evaluó el efecto terapéutico usando distintas concentraciones totales de la combinación. Así, se utilizaron las proporciones correspondientes a 0.06X, 0.12X, 0.25X, 0.5X, 1X, y 2X de la combinación, como se detalla en la Tabla 6.

Tabla 6. Concentraciones evaluadas de A4 y D4 para determinar el posible efecto sinérgico en su acción tricomonocida. *Los valores de la columna correspondientes a 1X, se consideran la referencia inicial y se definen a partir del valor CI_{50} para cada compuesto A4 y D4.

Proporción	0.06X	0.12 X	0.25X	0.5X	1X*	2X
Compuesto	Concentración (μM)					
A4	2.9	5.9	11.75	23.5	47	94
D4	9.5	19.1	38.25	76.5	153	306
Concentración total (Suma)	12.5	25	50	100	200	400

Se evaluó la disminución del porcentaje de viabilidad de cultivos de 20,000 parásitos de los 51 aislados de *T. vaginalis* para cada una de las concentraciones (Figura 10).

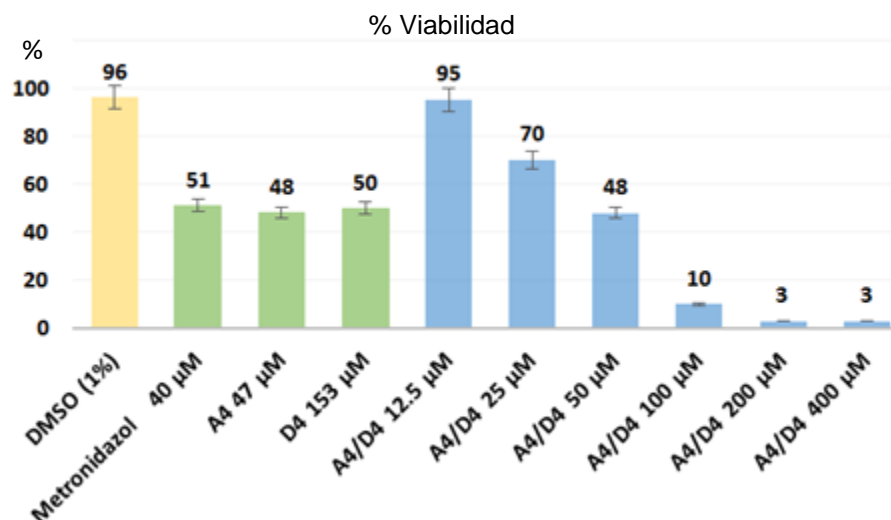


Figura 10. Promedio del porcentaje de viabilidad de cultivos de 20,000 parásitos de 51 aislados de *T. vaginalis* a las 24 h en presencia de distintas concentraciones de la combinación (A4 + D4) (relación 1:3). Para fines comparativos se presentan datos del porcentaje de viabilidad del control negativo (vehículo, DMSO 1%, el control positivo (metronidazol) y de los compuestos A4 y D4 de manera individual. En este caso, tanto el metronidazol como A4 y D4 se utilizaron en concentraciones correspondientes a sus CI_{50} (reportada en la bibliografía para el metronidazol [52]). Las barras indican una desviación estándar.

Con el promedio de los datos de los 51 aislados y usando el software Graph Pad Prism se determinó la viabilidad del 50 % del cultivo a las 24 h (CI_{50}) de (A4 + D4), en una relación 1:3 respectivamente, la cual fue de $48 \pm 2.6 \mu M$ (12 μM A4 + 36 μM D4), Tabla 7.

Tabla 7. Concentraciones requeridas para efecto tricomonocida al 50% (CI_{50}) de cultivos de 20,000 parásitos de *T. vaginalis* a las 24 h. de la combinación (A4+D4)

Compuesto	CI_{50} (μM)
(A4 + D4)	$48 \pm 2.6 = A4 (12 \mu M) + D4 (36 \mu M)$
Metronidazol	40

El valor de CI_{50} de la combinación es de $48 \pm 2.6 \mu M$, que corresponde a una concentración de 12 μM para A4 y de 36 μM para D4. Esto representa una disminución de aproximadamente

el 75 % de las concentraciones requeridas de cada compuesto para obtener el mismo efecto tricomonocida.

Para confirmar el efecto sinérgico se calculó el índice de combinación para varios porcentajes de efecto tricomonocida (IC), utilizando la ecuación de la sección 2.6 de materiales y métodos [60] (Tabla 8). Los valores de las concentraciones para sustituir en la ecuación se obtuvieron a partir de las curvas dosis-efecto de los compuestos individuales y de la formulación combinada (A4+D4).

Tabla 8. Índice de combinación de (A4 + D4) para distintos porcentajes de efecto tricomonocida. *Índice de combinación al 50, 75 y 90 %. **La clasificación se realiza con base a la clasificación de Chou -Talaly [50].

Porcentaje de efecto tricomonocida	Índice de combinación*	Efecto de (A4 + D4)**
90 %	0.530	Sinergismo
75 %	0.565	Sinergismo
50 %	0.630	Sinergismo

Estos resultados indican que la combinación (A4 + D4) presentan un efecto sinérgico. Este dato es muy favorable, ya que generalmente, para cualquier tratamiento farmacológico se prefiere usar dosis menores para lograr el mismo efecto terapéutico, ya que se pueden disminuir costos y posibles efectos secundarios que pudieran provocar.

6.7 Genotoxicidad *in vitro*: Prueba de Ames

A4 y D4 no muestran efectos mutagénicos en cualquiera de las tres cepas analizadas (TA98, TA100 y TA102) a 11, 22, 50 y 100 µg/placa, en comparación con todos los controles positivos empleados (PA, NMNG, Mit C, 2AA, y CP) con o sin mezcla S9. El promedio de las colonias revertantes de los controles positivos fueron al menos dos veces más altas que el promedio de las colonias revertantes del control negativo, A4 y D4 a diferentes concentraciones no muestran duplicar el número de revertantes basales, por lo cual los dos compuestos no son aparentemente mutagénicos (Figura 11).

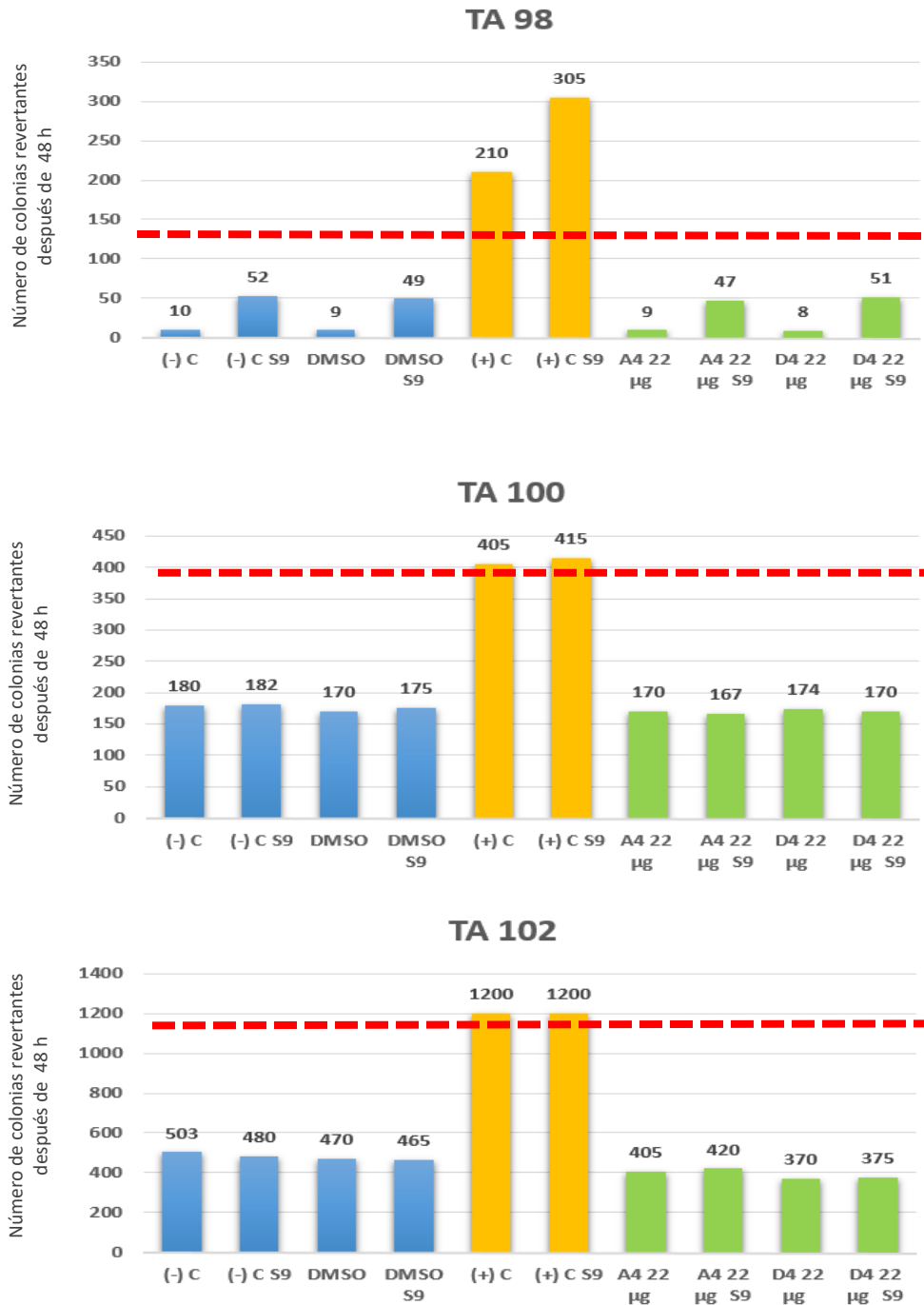


Figura 11. Prueba de Ames para los compuestos A4 y D4. La línea roja indica el número máximo de colonias para considerar que no hay efecto mutagénico. Se puede observar que el número de colonias revertantes para cada compuesto, está por debajo del máximo para considerar potencial mutagénico. Se muestran también controles negativos y positivos para cada una de las cepas de *Salmonella typhimurium*.

La combinación (A4 + D4) también fue evaluada con la Prueba de Ames. Esta composición no es mutagénica, se muestran los resultados en la Figura 12.

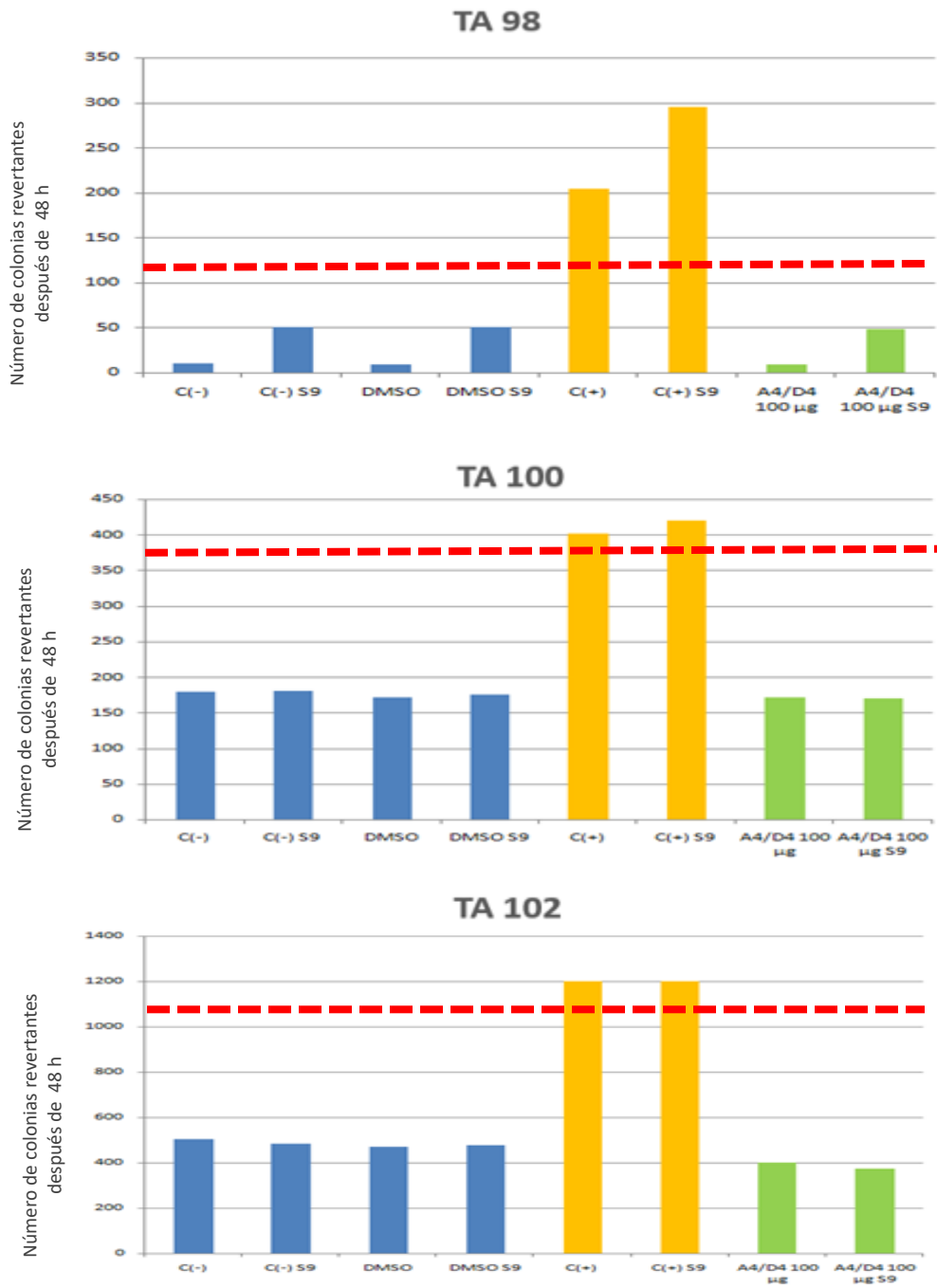


Figura 12. Prueba de Ames para la combinación (A4 + D4). La línea roja indica el número máximo de colonias para considerar que no hay efecto mutagénico. Se puede observar que el número de colonias revertantes para (A4 + D4), en las condiciones evaluadas, está por debajo del límite de potencial mutagénico. Se muestran también controles negativos y positivos.

La combinación de (A4 + D4) no presentó efecto mutagénico en ninguna de las tres cepas utilizadas de *Salmonella typhimurium* (TA98, TA100 y TA102) a 11, 22, 50 y 100 µg/placa, en comparación con los controles positivos empleados (PA, NMNG, Mit C, 2AA, y CP) con o sin mezcla S9. Todas las mutaciones de los controles positivos fueron mayores que la reversión espontánea de control con DMSO (Figura 14). Los resultados obtenidos para A4 y D4 demuestran que a estas dosis no son mutagénicos.

6.8 Genotoxicidad *in vivo*: Ensayo de Micronúcleos

Para evaluar la actividad genotóxica de A4 y D4 en un modelo *in vivo*, se midió el potencial de estos compuestos para inducir la formación de reticulocitos micronucleados (MN-RET) y eritrocitos normocromáticos micronucleados (MN-NCE) [61]. En la Figura 13, donde se observa que sólo los ratones tratados con el control positivo (ciclofosfamida) tenían aumentos estadísticamente significativos, tanto en el número de MN-RET como en MN-NCE a las 48 h con respecto a los ratones tratados con el vehículo (DMSO). Por lo general, es posible observar efectos mutagénicos iniciales de agentes inductores de micronúcleos a las 24 h; la cantidad más alta de micronúcleos se observó a las 48 h. Esto se observó con nuestro control positivo, pero no con A4 ni con D4. Todos los grupos tratados con A4 y D4 tenían un número similar de MN-RET como en MN-NCE al inicio (0 h) y después del tratamiento (24 y 48 h), y no se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados con A4 o con D4 o con respecto a la de control negativo. Estos resultados sugieren que ni A4 ni D4 muestran potencial genotóxico.

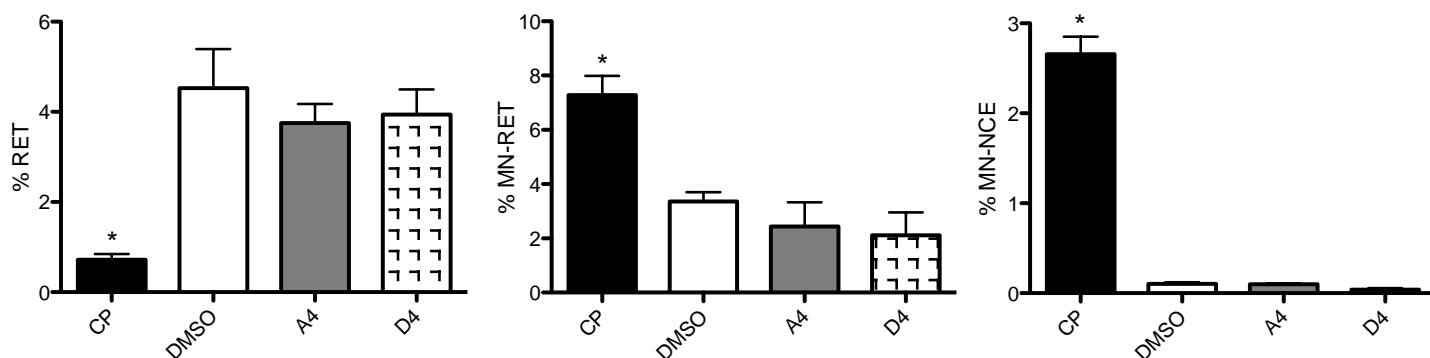


Figura 13. Prueba de micronúcleos. Porcentaje de reticulocitos (% RET), porcentaje de reticulocitos micronucleados (porcentaje de MN-RET) y porcentaje de eritrocitos normocromáticos micronucleados (MN-NCE%) después de 48 h de tratamiento.

CP (ciclofosfamida 1 g/kg); DMSO (dimetilsulfóxido, 1 %); A4 (compuesto A4 1 g/kg concentración); D4 (compuesto D4 1 g/kg).

* $P \leq 0.05$ diferencia estadísticamente significativa en comparación con el control negativo (DMSO). Análisis de varianza (ANOVA) seguido de la prueba post hoc de Dunnett

6.9 Otros estudios

6.9.1 Ensayo de MTT y CI_{50} en células HeLa

Se evaluaron los compuestos A4 y D4 por separado; así como la combinación (A4 + D4) hasta 400 μ M en los cultivos *in vitro* de células HeLa y no se observó daño citotóxico, las células HeLa formaron la monocapa característica de este tipo de células, demostrando la viabilidad del cultivo a las 24 y 48 h, con resultados similares al control negativo con DMSO (Figura 14).

De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo de MTT se demostró que A4 (Figura 14a), D4 (Figura 14b) y la combinación (A4 + D4) (Figura 14c) no afectan la viabilidad de las células HeLa, por lo que no fue posible determinar un valor CI_{50} , aunque dicho valor debe ser mayor a 400 μ M.

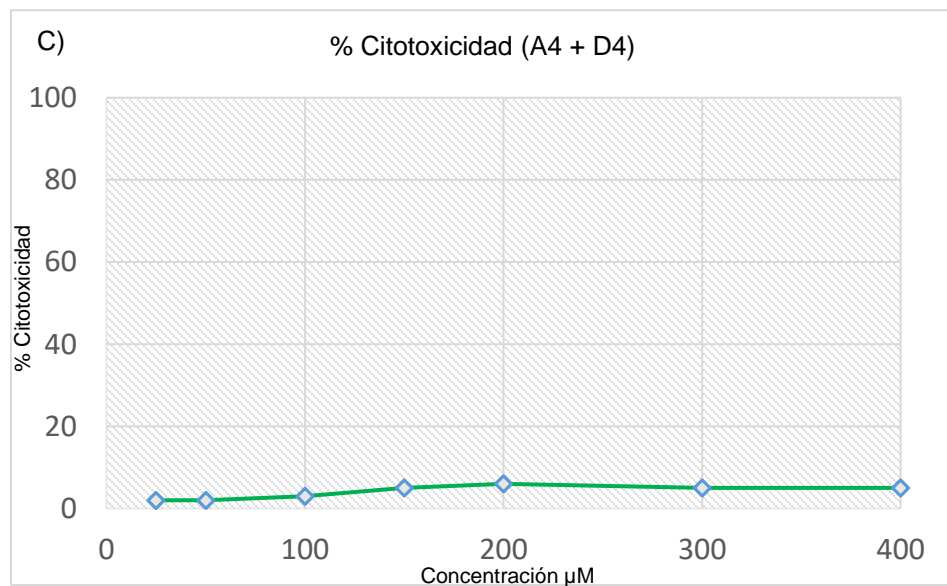
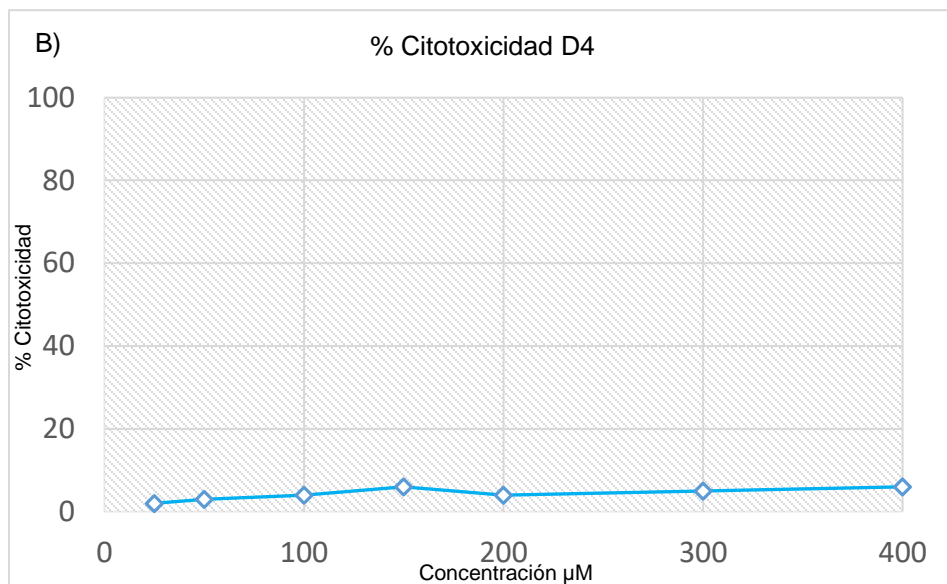
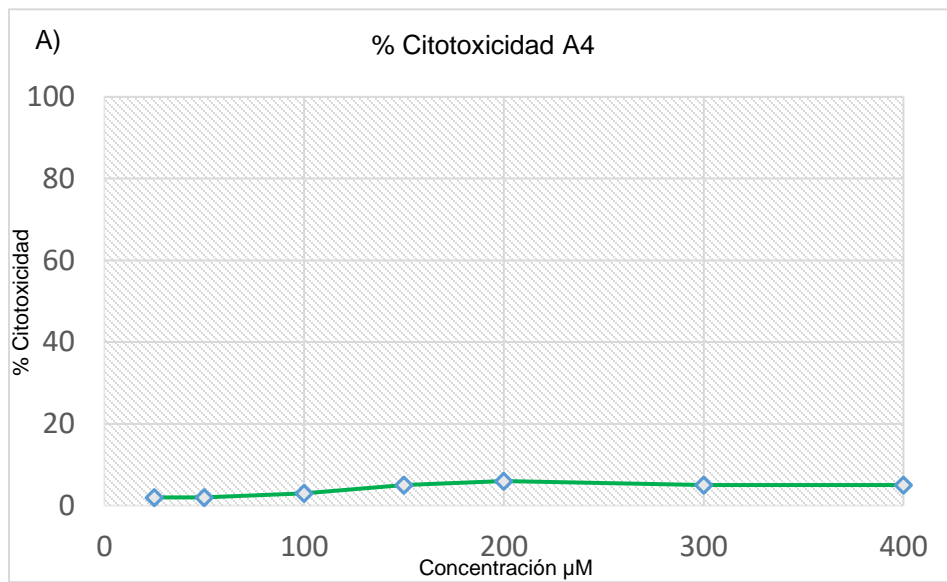


Figura 14. Porcentaje de citotoxicidad. Resultados de células HeLa, incubadas por 48 h de 0 - 400 μM con:

A) A4, B) D4 y C) La combinación (A4 + D4)

6.9.2 Determinación de Dosis Letal al 50% del compuesto A4 en modelo murino (DL₅₀)

La administración de A4 a una dosis de 2000 mg/kg no mostró signos de toxicidad durante las primeras 24 h de tratamiento, sin embargo, uno de los animales murió en el segundo día de administración y dos ratones murieron después de cuatro días. Todos los animales mostraron piloerección y alteraciones en la actividad motora durante las 12 h anteriores a su muerte. Cuando se observaron macroscópicamente los órganos, se encontró que mostraron una reducción en el tamaño del bazo y la mayoría de estos una consistencia gelatinosa.

De acuerdo con el diagrama del procedimiento 1D TG 423 la dosis del compuesto A4 se redujo a 300 mg/kg. A esta dosis no se encontraron signos o síntomas de toxicidad (tales como piloerección, irritación de mucosas o alteraciones en la actividad motora) o muertes en los grupos tratados durante 14 días después de la administración del compuesto. Los pesos de los ratones tratados no mostraron cambios estadísticamente significativos en comparación con los animales sanos durante el período de tratamiento (Tabla 9). Los órganos (pulmones, riñones, corazón, estómago, intestinos, bazo e hígado) no mostraron ninguna lesión morfológica aparente.

Tabla 9. A4, peso de ratones CD-1 (g).

	Día 1		Día 14		Peso ganado al día 14	
	Control	A4	Control	A4	Control	A4
Peso	22.3 ± 1.8	19.3 ± 0.9	35.7 ± 1.5	30.1 ± 0.7	13.3 ± 0.3	11.3 ± 0.3

Los valores se expresan como promedio ± Error Estándar de 3 animales por grupo. Análisis de Varianza de una vía (ANOVA) seguida de una prueba pos hoc de Bonferroni. Se utilizó el software GraphPad Prism 5.0 para realizar el análisis estadístico. Control: Animales administrados con DMSO (100 µl).

La DL₅₀ de A4 compuesto es mayor que 500 mg/kg y menos de 2000 mg/kg por v.i.g. en ratones macho cepa CD-1, mediante el procedimiento TG 423 y por tanto, está en la **categoría 4** de la Globally Harmonized System (GHS).

6.9.3 Determinación de Dosis Letal al 50% del compuesto D4 en modelo murino (DL₅₀)

La administración de D4 a una dosis de 2000 mg/kg no presentó signos o síntomas de toxicidad (tales como piloerección, irritación de la mucosa o alteraciones en la actividad motora) o muertes dentro de los 14 días después de la administración del compuesto D4. Los pesos de los ratones tratados no mostraron cambios estadísticamente significativos en comparación con los animales sanos durante el período de tratamiento (Tabla 10). Los órganos (pulmones, riñones, corazón, estómago, intestinos, bazo e hígado) no mostraron ninguna lesión morfológica aparente.

Tabla 10. D4, peso de ratones CD-1 (g)

	Día 1		Día 14		Peso ganado al día 14	
	Control	D4	Control	D4	Control	D4
Peso	22.3 ± 1.8	21.3 ± 1.9	35.7 ± 1.5	35.7 ± 2.3	13.3 ± 0.3	14.3 ± 0.7

Los valores se expresan como promedio ± Error Estándar de 3 animales por grupo. Análisis de Varianza de una vía (ANOVA) seguida de una prueba pos hoc de Bonferroni. Se utilizó el software GraphPad Prism 5.0 para realizar el análisis estadístico. Control: Animales administrados con DMSO (100 µl).

La DL₅₀ de D4 es mayor que 2000 mg/kg por v.i.g. en ratones macho CD-1 mediante el procedimiento TG 423 y, por lo tanto, está en la **categoría 5** de la GHS (> 2000-5000 mg/kg).

Con los resultados anteriores, se demostró la seguridad del uso de los compuestos A4 y D4 en esta prueba.

6.10 Obtención de derivados químicos de A4 y D4 para mejorar la interacción con TvTIM

A partir de los resultados del Docking, se determinó que A4 interacciona con Lys11, Lys59, Ala72, His94, Glu96, Lys121 y Lys204, así como para D4 los aminoácidos que son importantes en la interacción son Lys11 y Ser95 de TvTIM. Por lo tanto, para la propuesta de derivados utilizando el software MOE se propusieron 4150 derivados químicos de A4 y 1670 derivados químicos para D4. Posteriormente se realizó un Docking dirigido a los sitios potenciales de interacción que están cerca de los aminoácidos anteriormente mencionados, generando hasta 30 conformaciones de cada derivado y al realizar una selección con base al segundo Docking,

realizamos una clasificación de los derivados que probablemente tendrían una mejor interacción en los mismos sitios potenciales de A4 y D4.

Estos derivados propuestos, cumplen reglas de síntesis y características de moléculas con potencial farmacológica y tienen alta probabilidad de interactuar con los mismos residuos de aminoácidos.

Se seleccionaron seis derivados para A4 y D4, que mostraron la mejor probabilidad de interacción. Estas derivaciones en las estructuras de A4 y D4 pueden ser:

A4:

- Sustitución de grupo carbonilo por grupo hidroxilo
- Adición de grupo etanolamina
- Adición de grupo metinoalmina
- Sustitución de un grupo hidroxilo por un grupo metilo
- Sustitución de dos grupos hidroxilo por dos grupos metilos
- Eliminación de grupo carbonilo e hidroxilo e introducción de grupo éter

D4:

1. Sustitución de dos o tres o cuatro átomos de hidrógeno por el mismo número de grupos metilo
2. Sustitución de grupo nitro por metilo
3. En la molécula que tiene cuatro grupos metilo, se sustituye un grupo nitro por fluor
4. En la molécula que tiene dos grupos metilo, se sustituye un grupo nitro por cloro
5. En la molécula que tiene dos grupos metilo, se elimina el radical nitro

Con estos resultados, se propone que se pueden sintetizar al menos 12 compuestos (seis de A4 y seis de D4) que puedan mejorar el efecto tricomonocida, por lo que se sugiere su síntesis y evaluación en trabajos futuros.

7 DISCUSIÓN

La tricomoniasis es responsable hasta del 30% de las infecciones de transmisión sexual no virales. La mayor frecuencia es en mujeres de 16 a 35 años. Puede ser asintomática, lo que facilita su transmisión. El agente etiológico es el protozoo *Trichomonas vaginalis*, transmitido por contacto sexual. El tratamiento actual se basa en los fármacos de la familia de los nitroimidazoles, que se dividen en dos grupos: Los 2-nitroimidazoles, que incluyen el misonidazol y el benznidazol, y los 5 nitroimidazoles, que incluyen: Metronidazol, tinidazol, ornidazol, secnidazol, carnidazol, nimorazol y satranidazol [62]. Sin embargo, existen pacientes (del 5 al 20 %) que no muestran mejorías de la infección y otros presentan efectos secundarios con los tratamientos actuales contra la tricomoniasis, por lo que, es necesario el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas que tengan un mecanismo de acción diferente, ya que, con el paso de los años, cualquier organismo puede crear resistencia.

En esta investigación se utilizó un blanco terapéutico distinto al de los tratamientos convencionales. La enzima triosa fosfato isomerasa es indispensable en el metabolismo del carbono del parásito, es decir, necesaria para la producción de ATP. En una etapa inicial del desarrollo de este proyecto, se consideró que, si con algún compuesto pudiera afectar la actividad enzimática de la triosa fosfato isomerasa de los parásitos y por lo tanto su metabolismo, dicho compuesto podría ser un candidato como nuevo fármaco contra esta enfermedad. Sin embargo, gracias a la caracterización exhaustiva del blanco terapéutico, fue posible determinar que la triosa fosfato isomerasa de *T. vaginalis* (TvTIM) tiene varias características que la hacen una diana terapéutica aún más atractiva de lo que originalmente se había pensado. Una de esas características es que TvTIM está codificada en *T. vaginalis* por dos genes independientes, con regulación de la transcripción distintivo [40] [41]. Por otro lado, por ensayos de inmunolocalización se detectó al menos una isoforma de TvTIM se localiza sobre la superficie del parásito. Hasta el momento, solo se ha reportado la presencia de TVTIM extracelular [43], pero no en ningún mamífero. La localización extracelular de TvTIM está asociada a una nueva función de estas proteínas, interactuando con proteínas de matriz extracelular (laminina y fibronectina). Esta función no-canónica de TvTIM, representa además un nuevo factor de virulencia del parásito [43].

Estos hallazgos sobre TvTIM incrementan el potencial de uso de un fármaco dirigido contra TvTIM. Por ejemplo, la localización extracelular del blanco farmacológico, implica que no es necesario el ingreso del medicamento (metronidazol u otro nuevo) al interior de la célula de *T. vaginalis*, ya que puede ejercer su mecanismo de acción sobre la diana terapéutica en el exterior de la célula. En trabajos anteriores, se habían reportado varios compuestos capaces de interactuar e inhibir la actividad enzimática de la triosa fosfato isomerasa de varios parásitos[63] [64] [65] [66]. Sin embargo, su efecto antiparasitario, es limitado, debido al bajo o nulo ingreso de los compuestos al interior de las células de los parásitos.

En el caso de los compuestos descritos en esta investigación: A4 y D4 y la combinación (A4 + D4), es posible proponer como vía de administración el uso tópico-local, dado que la cavidad vaginal es el principal sitio de infección de este parásito. Se propone el uso de un vehículo en forma de ovulo que se pueda disolver y llevar a cabo la liberación de nuestro fármaco. También es posible el uso de algún gel, crema o pomada. Esto representa muchas ventajas, con respecto a una aplicación sistémica, o administración por vía oral; ya que se reducen las dosis terapéuticas y los posibles efectos secundarios. También, desde el punto de vista de regulación de medicamentos, y de su evaluación, las pruebas clínicas, propondrían iniciar con una evaluación de la aplicación local-vaginal (intravaginal) tanto para evaluar el toxicológico en mujeres sanas y posteriormente el efecto terapéutico en pacientes con infección por *T. vaginalis* (hombres y mujeres). Este tipo de protocolos en pruebas clínicas, representan menos riesgos y por lo tanto, requiere menos costos, comparado con medicamentos de uso sistémico [67].

Respecto al mecanismo de acción de A4 y D4, proponemos tres posibles opciones:

- A) A4 o D4 ingresan a la célula e interactúan con la TvTIM intracelular y por lo tanto, altera la actividad enzimática de esta, provocando la incapacidad de completar la vía glucolítica y como consecuencia disminuyen la posibilidad de generar ATP. De los resultados del docking, se sabe al menos que D4 interacciona con los aminoácidos (Lys11 y Ser95) cerca del sitio activo y esto provocaría una alteración en su función enzimática.
- B) A4 o D4 interaccionan con la TvTIM que se encuentra en la superficie externa de la membrana y con ello altera la función moonlight de TvTIM (interacción con laminina y fibronectina), probablemente con el proceso de patogenicidad interaccionando con laminina y fibronectina.

- C) Una tercera opción, en el que A4 o D4 interaccionan con la TvTIM que se encuentra en la superficie externa de la membrana, que esto genera un cambio en la membrana, que su vez facilita el ingreso de alguno de los compuestos A4 o D4 al espacio intracelular y así poder interactuar con la TvTIM que actúa en la vía de la glucólisis y de esta manera impedir también la reacción catalítica y como consecuencia la interrupción de la glucólisis y por lo tanto de la síntesis de ATP. Esto representaría un efecto más letal para el parásito.

De estas tres opciones para el mecanismo de acción, dos de ellas señalan que A4 o D4 estaría interaccionando con la TIM que está en la superficie del parásito. Esto tiene varias ventajas, una muy importante es que A4 o D4 no tienen que atravesar la membrana para llevar a cabo su función o interacción, para ello se ha reportado, que cuando una molécula atraviesa membrana, puede sufrir algunas modificaciones en su estructura o simplemente, no puede atravesar membrana, y, por lo tanto, no llevar a cabo su interacción con su blanco [64] [65] [66]. Cabe mencionar que, en este momento, no es posible descartar que A4 y D4 puedan interaccionar también con otras moléculas de la superficie celular, además de la triosa fosfato isomerasa.

Con esta investigación, se confirmó la eficacia terapéutica de A4 y de D4, ellos muestran un efecto tricomonocida en 51 aislados de pacientes mexicanas con infección por *T. vaginalis*, en estudios anteriores en nuestro grupo de trabajo se había demostrado el efecto tricomonocida solo en dos aislados de pacientes (CNCD-147 y CNCD-188). Se realizaron ensayos de viabilidad de *T. vaginalis* de aislados colectados en distintos centros de salud, de distintas entidades federativas del país. Si bien estos aislados no están caracterizados totalmente, una inspección al microscopio nos permitió definir que los aislados son diferentes en su tamaño, movilidad, agrupación y adherencia. Estas características fenotípicas en *T. vaginalis*, se han asociado a diferentes grados de patogenicidad y a la expresión de diversos genes, incluyendo proteasas y adhesinas [40] [43] [48]. Es posible también, que dichos cambios fenotípicos puedan estar asociados con cambios en la resistencia a fármacos, por lo que encontrar que A4 y D4 tengan efecto tricomonocida similar sobre los 51 aislados representa un hallazgo relevante en la definición de A4 y D4 como alternativas terapéuticas efectivas contra *T. vaginalis*. Mediante curvas de concentraciones de los compuestos y tiempos de exposición fue posible

determinar las dosis de cada compuesto para alcanzar el 50 % (CI_{50}) o el 100 % (CI_{100}) de efecto tricomonocida en cultivos de 20,000 parásitos a las 24 h, siendo estos valores de: $CI_{50,A4} = 47 \pm 2.8 \mu M$, $CI_{50,D4} = 153 \pm 12.03 \mu M$; $CI_{100,A4} = 100 \pm 5 \mu M$; $CI_{100,D4} = 230 \pm 18 \mu M$. Para fines comparativos, el metronidazol presenta $CI_{50, \text{Metronidazol}} = 40$ [52]. Por lo que, las concentraciones para lograr efecto tricomonocida en 20,000 parásitos de A4 y D4, son de los mismos ordenes de magnitud con respecto a metronidazol. Sin embargo A4 y D4, presentan la ventaja de que podrían usarse (como ya se mencionó) A4 y D4 podrían ser usados de manera tópica intravaginal).

A4 y D4 mostraron un potencial como fármaco tricomonocida, cuando son usados en concentraciones aceptables en las pruebas iniciales del desarrollo de fármacos [68] [69]. En el desarrollo de fármacos se busca disminuir las concentraciones, dado que se podrían tener efectos secundarios o tóxicos por la utilización de cualquier molécula o fármaco. Por lo tanto, con la intención de disminuir las dosis de A4 o de D4 para conseguir el mismo efecto tricomonocida, se realizaron ensayos de viabilidad de los 51 aislados de parásitos usando diferentes combinaciones de A4, D4 y metronidazol. Se determinó que el metronidazol no mejora el efecto tricomonocida de A4 o D4 o de la combinación (A4 + D4), por lo que el uso combinado de metronidazol con A4 y D4 fue descartado como alternativa terapéutica. Se probaron diferentes relaciones molares (proporciones de concentraciones) de la combinación (A4 + D4). Se encontró que una relación molar 1:3 de A4 y D4 respectivamente mostraron un efecto sinérgico, que nos permite disminuir cerca del 75 % de las concentraciones que se requieren cuando se utilizan de manera individual. Así que, con esto, solo utilizamos el 25 % de cada uno cuando los combinamos para tener el mismo efecto tricomonocida. El efecto sinérgico de la combinación de (A4 + D4) se comprobó mediante técnicas de evaluación de la interacción de compuestos farmacológicos, De este modo se calcularon los índices de combinación (IC) para efectos tricomonocidas del 50, 75 y 90 %. En todos los casos, el valor del IC entre 0.53 y 0.63, que demuestra un efecto sinérgico para A4 y D4.

Respecto a las pruebas de toxicidad, se determinó que A4 y D4, así como la combinación (A4 + D4) no mostró una toxicidad que indique que deba interrumpirse la evaluación de estos fármacos en la etapa preclínica y clínica. Los resultados de los ensayos de citotoxicidad,

mutagenicidad, genotoxicidad, así como las DL₅₀, permite, hasta este momento que A4 y D4 tienen una alta probabilidad de ser seguros para el uso en seres humanos.

Los resultados en esta investigación representan un avance importante en el desarrollo de nuevos fármacos contra la infección por *Trichomonas vaginalis*. Se proponen dos moléculas con características químicas farmacológicas A4 y D4 y combinación de (A4 + D4). Estos tienen hasta el momento diferencias y ventajas importantes con respecto de metronidazol, la más importante; un mecanismo de acción diferente, selectivo contra la triosa fosfato isomerasa de *T. vaginalis*. Estos compuestos tienen un potencial de uso principalmente contra pacientes que no presenten mejoría en la infección por *T. vaginalis* con los tratamientos convencionales (metronidazol o derivados), o bien para aquellos que presenten muchos efectos secundarios ó particularmente sensibles al nitroimidazoles. Hasta el momento, los ensayos de toxicidad de A4, D4 y la combinación (A4 + D4) indican que los compuestos son seguros, lo cual representa otra ventaja competitiva con respecto del metronidazol que tiene efectos secundarios o genotóxicos bien conocidos.

8 CONCLUSIONES

En este trabajo se analizaron distintos aspectos de dos nuevos posibles fármacos tricomonocidas: A4 y D4 y la combinación (A4 + D4).

Se determinó que:

- El efecto tricomonocida de A4 y D4 ha sido validado en un amplio número de aislados (51) de pacientes infectados, con diferentes características fenotípicas y morfológicas.
- A4 y D4 no mostraron efectos genotóxicos *in vitro* e *in vivo*. En células HeLa no son citotóxicos y los valores de DL₅₀ son 10 y 100 veces mayores que las dosis terapéuticas para D4 y A4, respectivamente.
- Tres propuestas del mecanismo de acción son:
 - A4 y D4 están interaccionando con la TvTIM intracelular y altera la actividad enzimática de ésta, provocando la falta de capacidad de generar ATPs
 - A4 y D4 están interaccionando con la TvTIM que se encuentra en la superficie externa de la membrana y que altera la otra función que pudiera estar llevando a cabo esta TIM, probablemente con el proceso de patogenicidad interaccionando con laminina y fibronectina
 - A4 y D4 están interaccionando con la TIM que se encuentra en la superficie externa de la membrana y que esto facilita que pueda entrar A4 o D4 al espacio intracelular y así poder interactuar con la TIM que actúa en la vía de la glucólisis y de esta manera bloquear esta vía y por lo tanto no generar ATPs
- Se observó un efecto sinérgico de A4 y D4 (A4 + D4) en formulaciones combinadas. Este resultado es importante porque las dosis terapéuticas pueden reducirse hasta el 25 % de D4 y A4 de las dosis originales. El metronidazol no mejora el efecto terapéutico de A4 y D4, esto probablemente a que sus mecanismos de acción son muy diferentes.
- La combinación (A4 + D4) tiene una alta probabilidad de ser segura en los seres humanos, ya que no mostró efectos genotóxicos.
- Se proponen posibles derivados químicos de cada uno, A4 y D4, que probablemente podrían mejorar la interacción con TvTIM y por lo tanto la eficacia terapéutica.

9 PERSPECTIVAS

- Completar fase preclínica (Evaluación de toxicidad en otros modelos no murinos)
- Evaluar el efecto terapéutico en aislados de pacientes de otros países
- Estudiar la farmacocinética y farmacodinamia de A4 y D4
- Determinar un vehículo para la administración de los potenciales fármacos
- Buscar la síntesis de los compuestos A4 y D4 en algún laboratorio mexicano
- Evaluar el efecto tricomonocida de los derivados propuestos para A4 y D4
- Demostrar el efecto tricomonocida con aislados de *T. Vaginalis* resistentes a metronidazol

10 BIBLIOGRAFIA

- [1] M. W. Lehker and J. F. Alderete, "Biology of trichomonosis," *Curr. Opin. Infect. Dis.*, vol. 13, no. 1, pp. 37–45, Feb. 2000.
- [2] R. P. Hirt and J. Sherrard, "Trichomonas vaginalis origins, molecular pathobiology and clinical considerations," *Curr. Opin. Infect. Dis.*, vol. 28, no. 1, pp. 72–79, Feb. 2015.
- [3] G. Kusdian and S. B. Gould, "The biology of Trichomonas vaginalis in the light of urogenital tract infection," *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 198, no. 2, pp. 92–99, Dec. 2014.
- [4] "OMS-tricomonoasis." [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/es/>.
- [5] S. Mhlongo *et al.*, "Etiology and STI/HIV Coinfections Among Patients With Urethral and Vaginal Discharge Syndromes in South Africa," *Sex. Transm. Dis.*, vol. 37, no. 9, pp. 566–570, Sep. 2010.
- [6] R. D. Catterall, "Trichomonal infections of the genital tract.," *Med. Clin. North Am.*, vol. 56, no. 5, pp. 1203–9, Sep. 1972.
- [7] D. W. Cameron and N. S. Padian, "Sexual transmission of HIV and the epidemiology of other sexually transmitted diseases.," *AIDS*, vol. 4 Suppl 1, pp. S99-103, 1990.
- [8] M. Bradic *et al.*, "Genetic Indicators of Drug Resistance in the Highly Repetitive Genome of Trichomonas vaginalis," *Genome Biol. Evol.*, vol. 9, no. 6, pp. 1658–1672, Jun. 2017.
- [9] P. Nyirjesy, J. D. Sobel, M. V Weitz, D. J. Leaman, and S. P. Gelone, "Difficult-to-treat trichomoniasis: results with paromomycin cream.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 26, no. 4, pp. 986–8, Apr. 1998.
- [10] K. A. Workowski, G. A. Bolan, and Centers for Disease Control and Prevention, "Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015.," *MMWR. Recomm. reports Morb. Mortal. Wkly. report. Recomm. reports*, vol. 64, no. RR-03, pp. 1–137, Jun. 2015.
- [11] J. G. Lossick, "Epidemiology of Urogenital Trichomoniasis," in *Trichomonads Parasitic in Humans*, New York, NY: Springer New York, 1990, pp. 311–323.
- [12] S. Sutcliffe, C. Neace, N. S. Magnuson, R. Reeves, and J. F. Alderete, "Trichomonosis, a Common Curable STI, and Prostate Carcinogenesis—A Proposed Molecular Mechanism," *PLoS Pathog.*, vol. 8, no. 8, p. e1002801, Aug. 2012.
- [13] "SINAVE epidemiología Trocomoniasisen Mexico." [Online]. Available: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/261953/sem39.pdf>.
- [14] "Información Epidemiológica de Morbilidad 2011." [Online]. Available: gob.mx/suive/dge.
- [15] I. Robert J. Borgman, Mundelein, "INTRAVAGINAL TREATMENT OF WAGINAL INFECTIONS WITH BUFFERED METRONIDAZOLE COMPOSITIONS," US005536743A.
- [16] F. Vázquez, M. José García, F. Pérez, and V. Palacio, "Trichomonas vaginalis: tratamiento y resistencia a nitroimidazoles," *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 19, pp. 114–124, 2001.
- [17] L. Rojas R., I. Sario R., C. Sarría P., and J. Fraga N., "Comportamiento 'in vivo' de aislamientos de Trichomonas vaginalis, utilizando ratones NMRI como modelo experimental," *Rev. chil. infectol.*, vol. 21, no. 3, pp. 179–185, 2004.

- [18] L. S. Goodman, J. G. Hardman, L. E. Limbird, and A. G. Gilman, *Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*, 10th ed. / . New York : McGraw-Hill, Medical Pub. Division, 2001.
- [19] D. Rasoloson, E. Tomková, R. Cammack, J. Kulda, and J. Tachezy, "Metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis* display increased susceptibility to oxygen.," *Parasitology*, vol. 123, no. Pt 1, pp. 45–56, Jul. 2001.
- [20] S. M. Townson, P. F. L. Boreham, P. Upcroft, and J. A. Upcroft, "Resistance to the nitroheterocyclic drugs," *Acta Trop.*, vol. 56, no. 2–3, pp. 173–194, Mar. 1994.
- [21] N. Yarlett, N. C. Yarlett, and D. Lloyd, "Ferredoxin-dependent reduction of nitroimidazole derivatives in drug-resistant and susceptible strains of *Trichomonas vaginalis*.,," *Biochem. Pharmacol.*, vol. 35, no. 10, pp. 1703–8, May 1986.
- [22] C. R. · K. J. Ryan, *Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases*. McGraw-Hill Medical, 2003.
- [23] P. Upcroft and J. A. Upcroft, "Drug Targets and Mechanisms of Resistance in the Anaerobic Protozoa," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 14, no. 1, pp. 150–164, Jan. 2001.
- [24] R. Arroyo, J. Engbring, and J. F. Alderete, "Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*," *Mol. Microbiol.*, vol. 6, no. 7, pp. 853–862, Apr. 1992.
- [25] M. R. Mendoza-Lopez *et al.*, "CP30, a Cysteine Proteinase Involved in *Trichomonas vaginalis* Cytoadherence," *Infect. Immun.*, vol. 68, no. 9, pp. 4907–4912, Sep. 2000.
- [26] M. D. Conrad *et al.*, "Extensive Genetic Diversity, Unique Population Structure and Evidence of Genetic Exchange in the Sexually Transmitted Parasite *Trichomonas vaginalis*," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 6, no. 3, p. e1573, Mar. 2012.
- [27] D. Leitsch, "Recent Advances in the *Trichomonas vaginalis* Field," *F1000Research*, Feb. 2016.
- [28] M. D. Conrad, P. Kissinger, N. Schmidt, D. H. Martin, and J. M. Carlton, "Genetic diversity of *Trichomonas vaginalis* reinfection in HIV-positive women," *Sex. Transm. Infect.*, vol. 89, no. 6, pp. 473–478, Sep. 2013.
- [29] C. Aurrecochea *et al.*, "GiardiaDB and TrichDB: integrated genomic resources for the eukaryotic protist pathogens *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*," *Nucleic Acids Res.*, vol. 37, no. Database, pp. D526–D530, Jan. 2009.
- [30] J. M. Carlton *et al.*, "Draft Genome Sequence of the Sexually Transmitted Pathogen *Trichomonas vaginalis*," *Science (80-.)*, vol. 315, no. 5809, pp. 207–212, Jan. 2007.
- [31] M. W. Lehker and J. F. Alderete, "Resolution of Six Chromosomes of *Trichomonas vaginalis* and Conservation of Size and Number among Isolates," *J. Parasitol.*, vol. 85, no. 5, p. 976, Oct. 1999.
- [32] A. Gómez-Puyou, E. Saavedra-Lira, I. Becker, R. A. Zubillaga, A. Rojo-Domínguez, and R. Perez-Montfort, "Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action — studies with triosephosphate isomerase," *Chem. Biol.*, vol. 2, no. 12, pp. 847–855, Dec. 1995.
- [33] V. Olivares-Illana *et al.*, "Structural Differences in Triosephosphate Isomerase from Different Species and Discovery of a Multitrypanosomatid Inhibitor †," *Biochemistry*, vol. 45, no. 8, pp. 2556–2560, Feb. 2006.
- [34] T. K. Harris, R. N. Cole, F. I. Comer, and A. S. Mildvan, "Proton Transfer in the Mechanism of

- Triosephosphate Isomerase †," *Biochemistry*, vol. 37, no. 47, pp. 16828–16838, Nov. 1998.
- [35] G. Garza-Ramos, M. Tuena de Gomez-Puyou, A. Gomez-Puyou, K. U. Yüksel, and R. W. Gracy, "Deamidation of triosephosphate isomerase in reverse micelles: effects of water on catalysis and molecular wear and tear.," *Biochemistry*, vol. 33, no. 22, pp. 6960–5, Jun. 1994.
- [36] P. Ostoa-Saloma *et al.*, "Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*," *Eur. J. Biochem.*, vol. 244, no. 3, pp. 700–5, Mar. 1997.
- [37] A. Téllez-Valencia *et al.*, "Inactivation of Triosephosphate Isomerase from *Trypanosoma cruzi* by an Agent that Perturbs its Dimer Interface," *J. Mol. Biol.*, vol. 341, no. 5, pp. 1355–1365, Aug. 2004.
- [38] E. Lolis and G. A. Petsko, "Crystallographic analysis of the complex between triosephosphate isomerase and 2-phosphoglycolate at 2.5-Å resolution: implications for catalysis.," *Biochemistry*, vol. 29, no. 28, pp. 6619–25, Jul. 1990.
- [39] R. C. Davenport, P. A. Bash, B. A. Seaton, M. Karplus, G. A. Petsko, and D. Ringe, "Structure of the triosephosphate isomerase-phosphoglycolohydroxamate complex: an analogue of the intermediate on the reaction pathway.," *Biochemistry*, vol. 30, no. 24, pp. 5821–6, Jun. 1991.
- [40] E. E. FIGUEROA-ANGULO *et al.*, "Cellular and biochemical characterization of two closely related triosephosphate isomerases from *Trichomonas vaginalis*," *Parasitology*, vol. 139, no. 13, pp. 1729–1738, Nov. 2012.
- [41] S. Lara-González *et al.*, "Structural and thermodynamic folding characterization of triosephosphate isomerases from *Trichomonas vaginalis* reveals the role of destabilizing mutations following gene duplication," *Proteins Struct. Funct. Bioinforma.*, vol. 82, no. 1, pp. 22–33, Jan. 2014.
- [42] P. Jimenez-Sandoval *et al.*, "A competent catalytic active site is necessary for substrate induced dimer assembly in triosephosphate isomerase," *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*, vol. 1865, no. 11, pp. 1423–1432, 2017.
- [43] J. F. T. Miranda-Ozuna *et al.*, "The Glycolytic Enzyme Triosephosphate Isomerase of *Trichomonas vaginalis* Is a Surface-Associated Protein Induced by Glucose That Functions as a Laminin- and Fibronectin-Binding Protein," *Infect. Immun.*, vol. 84, no. 10, pp. 2878–2894, Oct. 2016.
- [44] A. Wadood, M. Ghufuran, S. F. Hassan, H. Khan, S. S. Azam, and U. Rashid, "In silico identification of promiscuous scaffolds as potential inhibitors of 1-deoxy-d-xylulose 5-phosphate reductoisomerase for treatment of *Falciparum malaria*," *Pharm. Biol.*, vol. 55, no. 1, pp. 19–32, 2017.
- [45] B. R. Brooks *et al.*, "CHARMM: The biomolecular simulation program," *J. Comput. Chem.*, vol. 30, no. 10, pp. 1545–1614, Jul. 2009.
- [46] P. Mach and P. Koehl, "Geometric measures of large biomolecules: Surface, volume, and pockets," *J. Comput. Chem.*, vol. 32, no. 14, pp. 3023–3038, Nov. 2011.
- [47] S. Soga, H. Shirai, M. Kobori, and N. Hirayama, "Use of Amino Acid Composition to Predict Ligand-Binding Sites," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 47, no. 2, pp. 400–406, Mar. 2007.
- [48] R. Hernández-Gutiérrez, J. Ortega-López, F. Cruz-Talonia, G. Gómez-Gutierrez, and y R. Arroyo-Verástegui, "Presencia de proteinasas en las secreciones vaginales y de anticuerpos anti-proteínas de

- Trichomonas vaginalis en el suero de pacientes con Trichomonosis Activa," *PARASITOLOGÍA*, 2003.
- [49] "cofepris-etapa preclinica y clinica." [Online]. Available: <http://www.cofepris.gob.mx/AS/Documents/RegistroSanitarioMedicamentos/ESTRUCTURA DE EXPEDIENTES/11 ESTUDIOS PRE Y CLINICOS.pdf>.
- [50] M. Ronci *et al.*, "Protein unlocking procedures of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: Application to MALDI-TOF Imaging MS investigations," *Proteomics*, vol. 8, no. 18, pp. 3702–3714, Sep. 2008.
- [51] J. Albrethsen, "Reproducibility in Protein Profiling by MALDI-TOF Mass Spectrometry," *Clin. Chem.*, vol. 53, no. 5, pp. 852–858, Mar. 2007.
- [52] I. Idalia Sariego Ramos and I. J. F. N. Lázara Rojas Rivero, "Estudio de la susceptibilidad al metronidazol en aislamientos cubanos de Trichomonas vaginalis," *Rev. Cuba. Obstet. y Ginecol.*, p. 37(2):271-276, 2011.
- [53] J. N. Krieger, C. S. Dickins, and M. F. Rein, "Use of a time-kill technique for susceptibility testing of Trichomonas vaginalis," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 27, no. 3, pp. 332–336, 1985.
- [54] S. Mansilla Barrado, "Análisis de la expresión génica y de los mecanismos de muerte celular inducidos por la bisantraciclina WP631 en células tumorales humanas," 2005.
- [55] D. M. Maron and B. N. Ames, "Revised methods for the Salmonella mutagenicity test.," *Mutat. Res.*, vol. 113, no. 3–4, pp. 173–215, May 1983.
- [56] W. Schmid, "The micronucleus test.," *Mutat. Res.*, vol. 31, no. 1, pp. 9–15, Feb. 1975.
- [57] S. Díaz Barriga Arceo, E. Madrigal-Bujaidar, E. Calderón Montellano, L. Ramírez Herrera, and B. D. Díaz García, "Genotoxic effects produced by capsaicin in mouse during subchronic treatment.," *Mutat. Res.*, vol. 345, no. 3–4, pp. 105–9, Dec. 1995.
- [58] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.," *J. Immunol. Methods*, vol. 65, no. 1–2, pp. 55–63, Dec. 1983.
- [59] A. H. Cory, T. C. Owen, J. A. Bartrop, and J. G. Cory, "Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture.," *Cancer Commun.*, vol. 3, no. 7, pp. 207–12, Jul. 1991.
- [60] T.-C. Chou, "Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method," *Cancer Res.*, vol. 70, no. 2, pp. 440–446, Jan. 2010.
- [61] M. Fenech, "The in vitro micronucleus technique.," *Mutat. Res.*, vol. 455, no. 1–2, pp. 81–95, Nov. 2000.
- [62] I. S. Diéguez, "Tricomoniasis: una visión amplia," *IATREIA*, vol. Vol 27(2):, 2014.
- [63] V. Sanabria-Ayala, I. Belmont, and L. Abraham, "Triosephosphate isomerase of Taenia solium (TTPI): phage display and antibodies as tools for finding target regions to inhibit catalytic activity," *Parasitol. Res.*, vol. 114, no. 1, pp. 55–64, Jan. 2015.
- [64] M. Couto *et al.*, "3-H-[1,2]Dithiole as a New Anti-Trypanosoma cruzi Chemotype: Biological and Mechanism of Action Studies," *Molecules*, vol. 20, no. 8, pp. 14595–14610, Aug. 2015.
- [65] G. Álvarez *et al.*, "Development of bis-thiazoles as inhibitors of triosephosphate isomerase from Trypanosoma cruzi. Identification of new non-mutagenic agents that are active in vivo," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 100, pp. 246–256, Jul. 2015.

- [66] S.-A. Víctor, M.-F. Yolanda, Z.-C. Araceli, J. Lucía, and L. Abraham, "Characterization of a monoclonal antibody that specifically inhibits triosephosphate isomerase activity of *Taenia solium*," *Exp. Parasitol.*, vol. 134, no. 4, pp. 495–503, Aug. 2013.
- [67] Cofepris, "GUÍA PARA EL SOMETIMIENTO PARA PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN EN SERES HUMANOS," 2016.
- [68] L. Kluwe, "Assessing Specificity of Anticancer Drugs In Vitro," *J. Vis. Exp.*, no. 109, Mar. 2016.
- [69] G. Riva *et al.*, "In vitro anticancer drug test: A new method emerges from the model of glioma stem cells," *Toxicol. Reports*, vol. 1, pp. 188–199, 2014.
- [70] T. A. Halgren, "Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94," *J. Comput. Chem.*, vol. 17, no. 5–6, pp. 490–519, Apr. 1996.
- [71] P. R. Gerber and K. Müller, "MAB, a generally applicable molecular force field for structure modelling in medicinal chemistry.," *J. Comput. Aided. Mol. Des.*, vol. 9, no. 3, pp. 251–68, Jun. 1995.
- [72] C. A. Del Carpio, Y. Takahashi, and S. Sasaki, "A new approach to the automatic identification of candidates for ligand receptor sites in proteins: (I). Search for pocket regions.," *J. Mol. Graph.*, vol. 11, no. 1, pp. 23–9, 42, Mar. 1993.
- [73] A. Miranker and M. Karplus, "Functionality maps of binding sites: A multiple copy simultaneous search method," *Proteins Struct. Funct. Genet.*, vol. 11, no. 1, pp. 29–34, Sep. 1991.
- [74] "Corporation, ChemBridge." [Online]. Available: http://www.chembridge.com/screening_libraries/.
- [75] S. Thangapandian, S. John, Y. Lee, S. Kim, and K. W. Lee, "Dynamic Structure-Based Pharmacophore Model Development: A New and Effective Addition in the Histone Deacetylase 8 (HDAC8) Inhibitor Discovery," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, no. 12, pp. 9440–9462, Dec. 2011.
- [76] A. Wadood, M. Ghufraan, S. F. Hassan, H. Khan, S. S. Azam, and U. Rashid, "In silico identification of promiscuous scaffolds as potential inhibitors of 1-deoxy- d -xylulose 5-phosphate reductoisomerase for treatment of *Falciparum malaria*," *Pharm. Biol.*, vol. 55, no. 1, pp. 19–32, Jan. 2017.
- [77] C. A. Lipinski, F. Lombardo, B. W. Dominy, and P. J. Feeney, "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 46, no. 1–3, pp. 3–26, Mar. 2001.
- [78] I. Muegge, "Selection criteria for drug-like compounds.," *Med. Res. Rev.*, vol. 23, no. 3, pp. 302–21, May 2003.
- [79] A. M. Clark and P. Labute, "2D Depiction of Protein–Ligand Complexes," *J. Chem. Inf. Model.*, vol. 47, no. 5, pp. 1933–1944, Sep. 2007.
- [80] G. Alvarez *et al.*, "New chemotypes as *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase inhibitors: a deeper insight into the mechanism of inhibition," *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.*, vol. 29, no. 2, pp. 198–204, Apr. 2014.
- [81] M. de N. C. Soeiro and S. L. de Castro, "Screening of Potential anti-*Trypanosoma cruzi* Candidates: In Vitro and In Vivo Studies," *Open Med. Chem. J.*, vol. 5, pp. 21–30, Mar. 2011.
- [82] G. Álvarez *et al.*, "Massive screening yields novel and selective *Trypanosoma cruzi* triosephosphate


isomerase dimer-interface-irreversible inhibitors with anti-trypanosomal activity," *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 45, no. 12, pp. 5767–5772, Dec. 2010.

- [83] A. Téllez-Valencia *et al.*, "Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 295, no. 4, pp. 958–963, Jul. 2002.


ANEXOS

Anexo I) Solicitud y examen de forma de 3 patentes.

Compuesto A4, solicitud de patente MX/a/2016/013111 y hoja de satisfecida el examen de forma para A4




Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial



INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
Dirección Divisiva de Patentes

<input checked="" type="checkbox"/> Solicitud de Patente <input type="checkbox"/> Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad <input type="checkbox"/> Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifico cual: <input type="checkbox"/> Modelo Industrial <input type="checkbox"/> Dibujo Industrial	Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regulatorias del IMPI Sala Folio de entrada Fecha y hora de recepción
--	---

Solicitud Expediente: **MX/a/2016/013111**
 Fecha: **6/OCT/2016** Hora: **12:46:45**
 Folio: **MX/E/2016/071345** 102822



Antes de llenar la forma lee las consideraciones generales al usuario

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)	
<input type="checkbox"/> Solicitante es el inventor	<input checked="" type="checkbox"/> El solicitante es el apoderado
1) Nombre (s): Solicitante 1: Instituto Politécnico Nacional, Solicitante 2: Centre de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., Solicitante 3: Universidad Autónoma Metropolitana	
2) Nacionalidad (es): Solicitante 1: Mexicana, Solicitante 2: Mexicana, Solicitante 3: Mexicana	
3) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: Solicitante 1: Edificio de la Dirección General, Avenida Luis Enrique Erro S/N, Unidad Profesional "Adolfo López Mateos", Zacatenco, C.P. 07738, Solicitante 2: Av. Instituto Politécnico Nacional, 2508, San Pedro Zacatenco, 07360, Solicitante 3: Prolongación Carriel de Miramontes, 3855, Ex Hacienda San Juan de Dios, 014367	
Población, Estado y País: Solicitante 1: Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México, Solicitante 2: Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México, Solicitante 3: Tlalpán, Ciudad de México, México	
4) Teléfono (clave):	5) Fax (clave):

II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)	
6) Nombre (s): Inventor 1: Claudia Guadalupe Benítez González, Inventor 2: José Luis Viquez Sánchez, Inventor 3: Rosaura Arroyo Verástegui, Inventor 4: Jaime Ortega López, Inventor 5: Luis Gabriel Bribea de Castro, Inventor 6: Arturo Rojas Domínguez, Inventor 7: Ponciano García Oullérrez	
7) Nacionalidad (es): Inventor 1: Mexicana, Inventor 2: Mexicana, Inventor 3: Mexicana, Inventor 4: Mexicana, Inventor 5: Mexicana, Inventor 6: Mexicana, Inventor 7: Mexicana	
8) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: Inventor 1: Calle B Hic XII, 17, Educación, 01406, Inventor 2: Sur 67-A, 3115, Viaducto Piedad, 08200, Inventor 3: Av. Instituto Politécnico Nacional, 2508, San Pedro Zacatenco, 07360, Inventor 4: Av. Instituto Politécnico Nacional, 2508, San Pedro Zacatenco, 07360, Inventor 5: km 5.6 del Itinerario Norte, Carretera Inguapto-León, 38500, Inventor 6: Sur 68A, 241-S, Benjón, 09450, Inventor 7: Tapalcatlán, MSF 138, Adolfo Ruiz Cortés, 04630	
Población, Estado y País: Inventor 1: Coyoacán, Ciudad de México, México, Inventor 2: Itascaico, Ciudad de México, México, Inventor 3: Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México, Inventor 4: Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México, Inventor 5: Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México, Inventor 6: Itzapalapa, Ciudad de México, México, Inventor 7: Coyoacán, Ciudad de México, México	
9) Teléfono (clave):	10) Fax (clave):

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)	
11) Nombre (s): Luis Antonio Carrillo Sánchez	12) R.G.P.: DEAJ-13847
13) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: Instituto Politécnico Nacional, 2508 Edificio Administrativo, 3er. piso, Subdirección de Vinculación Tecnológica, San Pedro Zacatenco, 07360	
Población, Estado y País: Gustavo A. Madero, Ciudad de México	
14) Teléfono (clave): 57473800 ext. 1731 y 1734	15) Fax (clave): 57473907
16) Personas Autorizadas para dar y recibir notificaciones: Davíd Terribio Sepúlveda, Marcela González Riquelme	

17) Denominación o Título de la invención: Uso de moléculas tricomónicas	
18) Fecha de divulgación previa	19) Clasificación internacional: uso exclusivo del IMPI
20) División de la solicitud	
21) Fecha de presentación	
22) Prioridad Reclamada:	

Lista de verificación (uso interno)																											
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><th>Nº. Hojas</th><th>Comprobando</th></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> 1</td><td>Comprobante de pago de la tarifa</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> 24</td><td>Descripción y reivindicación (es) de la invención</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> 5</td><td>Dibujo (s) en su caso</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> 1</td><td>Resumen de la descripción de la invención</td></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> 2</td><td>Documento que acredite la personalidad del apoderado</td></tr> </table>	Nº. Hojas	Comprobando	<input checked="" type="checkbox"/> 1	Comprobante de pago de la tarifa	<input checked="" type="checkbox"/> 24	Descripción y reivindicación (es) de la invención	<input checked="" type="checkbox"/> 5	Dibujo (s) en su caso	<input checked="" type="checkbox"/> 1	Resumen de la descripción de la invención	<input checked="" type="checkbox"/> 2	Documento que acredite la personalidad del apoderado	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><th>Nº. Hojas</th><th>Comprobando</th></tr> <tr><td><input checked="" type="checkbox"/> 5</td><td>Documento de cesión de derechos</td></tr> <tr><td></td><td>Constancia de depósito de material biológico</td></tr> <tr><td></td><td>Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa</td></tr> <tr><td></td><td>Documento (s) de prioridad</td></tr> <tr><td></td><td>Traducción</td></tr> <tr><td>38</td><td>TOTAL DE HOJAS</td></tr> </table>	Nº. Hojas	Comprobando	<input checked="" type="checkbox"/> 5	Documento de cesión de derechos		Constancia de depósito de material biológico		Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa		Documento (s) de prioridad		Traducción	38	TOTAL DE HOJAS
Nº. Hojas	Comprobando																										
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Comprobante de pago de la tarifa																										
<input checked="" type="checkbox"/> 24	Descripción y reivindicación (es) de la invención																										
<input checked="" type="checkbox"/> 5	Dibujo (s) en su caso																										
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Resumen de la descripción de la invención																										
<input checked="" type="checkbox"/> 2	Documento que acredite la personalidad del apoderado																										
Nº. Hojas	Comprobando																										
<input checked="" type="checkbox"/> 5	Documento de cesión de derechos																										
	Constancia de depósito de material biológico																										
	Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa																										
	Documento (s) de prioridad																										
	Traducción																										
38	TOTAL DE HOJAS																										

Observaciones:
 Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.

LUIS ANTONIO CARRILLO SÁNCHEZ
 Nombre y firma del solicitante o su apoderado

Ciudad de México, a 05 de octubre de 2016
 Lugar y fecha

Página 1 de 2

BMPI-00-000



Certificado de acuse
de recibo registro:
MX/2017/014348

DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE PROCESAMIENTO ADMINISTRATIVO DE
PATENTES
COORDINACION DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FORMA
Expediente de Patente de Invención Normal **MX/a/2016/013111**

Asunto: Resultado del Examen de Forma.

Ciudad de México, a 29 de marzo de 2017

Luis Antonio CARREÑO SÁNCHEZ
Apoderado de
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL I. P. N.
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Instituto Politécnico Nacional, 2508 Edificio Administrativo,
3er. piso, Subdirección de Vinculación Tecnológica
San Pedro Zacatenco
07360, GUSTAVO A. MADERO, Ciudad de México, México

No. de Folio: **26447**

RECIBI ORIGINAL

Nombre:

Fecha: **19/05/2017**

Firma:

REF: Se da acuse de recibo a su escrito presentado: 24/02/2017.

Se tiene por satisfecho el examen de forma señalado por la Ley de la Propiedad Industrial y su Reglamento.

Cabe señalar que de conformidad con los artículos 52 de la Ley de la Propiedad Industrial; 39 y 40 del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial vigentes, una vez concluido el examen de forma y, después del vencimiento del plazo de 18 meses, contado a partir de la fecha de presentación de la solicitud de patente, o en su caso, de prioridad reconocida, toda solicitud de patente será publicada en la Gaceta, conteniendo los datos bibliográficos comprendidos en la solicitud presentada, el resumen de la invención y, en su caso, el dibujo más ilustrativo de la misma o la fórmula química que mejor la caracterice.

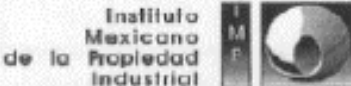
No obstante, la Ley de la Propiedad Industrial y su Reglamento también prevén que, a petición del solicitante mediante escrito, la solicitud de patente podrá ser publicada de manera anticipada, siempre que la misma haya aprobado el examen de forma y el solicitante entere al Instituto el pago de la tarifa correspondiente (artículo 1d).

Así, una vez publicada la solicitud, de conformidad al artículo 52 BIS de la Ley de la Propiedad Industrial, cualquier persona podrá dentro de un plazo de seis meses posteriores a aquella, presentar ante el Instituto, información concerniente a los requisitos de patentabilidad y sus excepciones (artículos 16 y 19 de la Ley de la Propiedad Industrial), por lo que el Instituto dará inicio al examen de fondo hasta haber transcurrido los plazos especificados.

El suscrito firma el presente oficio con fundamento en los artículos 6º fracciones III y XI y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 2º, 3º fracción V, inciso a), sub inciso i), segundo guión, 4º, 5º y 12º



Compuesto D4, solicitud de patente MX/a/2016/0131109 y hoja de satisfecida el examen de forma para D4



Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial



INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
Dirección Divisiva de Patentes

Solicitud de Patente
Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad

Solicitud de Registro de Diseño Industrial, esbozo que cubra:
 Modelo Industrial Dibujo Industrial

Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI

Señala

Fecha de entrada:

Fecha y hora de recepción:

Solicitud: **MX/a/2016/0131109**

Fecha: 06/OCT/2016 Hora: 12:45:00

Folio: **MX/E/2016/071343** 485758



001-2011-011943

I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)

El solicitante es el inventor El solicitante es el apoderado(a)

1) Nombre (s): **Solicitante 1: Instituto Politécnico Nacional, Solicitante 2: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I.P.N., Solicitante 3: Universidad Autónoma Metropolitana**

2) Nacionalidad (es): **Solicitante 1: Mexicana, Solicitante 2: Mexicana, Solicitante 3: Mexicana**

3) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: **Solicitante 1: Edificio de la Dirección General, Avenida Luis Enrique Erro S/N, Unidad Profesional "Adolfo López Mateos", Zacatenas, C.P. 07738, Solicitante 2: Av. Instituto Politécnico Nacional, 2608, San Pedro Zacatenas, 07360, Solicitante 3: Prolegación Canal de Miramontes, 3855, Estación San Juan de Dios, 04387**

Población, Estado y País: **Solicitante 1: Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México, Solicitante 2: Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México, Solicitante 3: Tlalpan, Ciudad de México, México**

4) Teléfono (clave): 5) Fax (clave):

II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)

6) Nombre (s): **Inventor 1: José Luis Yique Sánchez, Inventor 2: Claudia Guadalupe Benítez Cardona, Inventor 3: Rossana Arroyo Veristegui, Inventor 4: Jaime Ortega López, Inventor 5: Luis Gabriel Briceño de Castro, Inventor 6: Arturo Rojas Domínguez, Inventor 7: Paolaine García Gutiérrez**

7) Nacionalidad (es): **Inventor 1: Mexicana, Inventor 2: Mexicana, Inventor 3: Mexicana, Inventor 4: Mexicana, Inventor 5: Mexicana, Inventor 6: Mexicana, Inventor 7: Mexicana**

8) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: **Inventor 1: Bar 47-A, 3195, Viaducto Piedad, 08200, Inventor 2: Calle B No 3E, 17, Educación, 04400, Inventor 3: Av. Instituto Politécnico Nacional, 2608, San Pedro Zacatenas, 07360, Inventor 4: Av. Instituto Politécnico Nacional, 2608, San Pedro Zacatenas, 07360, Inventor 5: los 9.6 del Iluminante Norte, Carretera Irapuato-León, 36000, Inventor 6: Sur 65A, 241-6, Bejucal, 09460, Inventor 7: Tepiccatlán, M35 L36, Adolfo Ruiz Cortines, 04533**

Población, Estado y País: **Inventor 1: Iztacalco, Ciudad de México, México, Inventor 2: Coyoacán, Ciudad de México, México, Inventor 3: Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México, Inventor 4: Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México, Inventor 5: Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México, Inventor 6: Izajopoltepec, Ciudad de México, México, Inventor 7: Coyoacán, Ciudad de México, México**

9) Teléfono (clave): 10) Fax (clave):

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)

11) Nombre (s): **Luis Antonio Carrasco Sánchez** 12) R O P: **DDAJ-13947**

13) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: **Instituto Politécnico Nacional, 2608 Edificio Administrativo, 3er. piso, Subdelegación de Vinculación Tecnológica, San Pedro Zacatenas, 07360**

Población, Estado y País: **Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México** 14) Teléfono (clave): **57473600 ext. 9731 y 9734** 15) Fax (clave): **67473607**

16) Personas Autorizadas para dar y recibir notificaciones: **David Terroba Espinosa, Mercedes González Riquelme**

17) Designación o Título de la Invención: **Uso de nuevas moléculas trifluorocarbónicas**

18) Fecha de divulgación previa: **00/00/0000** uso exclusivo del IMPI

19) Fecha de presentación: **00/00/0000**

20) Divisiva de la solicitud: 21) Fecha de presentación

22) Prioridad Reclamada: Fecha de presentación No. de serie

País		Fecha de presentación			No. de serie
Día	Mes	Año	Día	Mes	

Lista de verificación (uso interno)

No. Hojas		No. Hojas	
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Comprobante de pago de la tarifa	<input checked="" type="checkbox"/> 5	Documento de constancia de derechos
<input checked="" type="checkbox"/> 2	Descripción y reivindicación (SI) de la invención		Constancia de depósito de material genético
<input checked="" type="checkbox"/> 4	Dibujo (s) en su caso		Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Resumen de la descripción de la invención		Documento (s) de prioridad
<input checked="" type="checkbox"/> 2	Documento que acredite la personalidad del apoderado		Traducción
		36	TOTAL DE HOJAS

Observaciones: **Dejo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos asentados en esta solicitud son ciertos.**

LUIS ANTONIO CARRASCO SÁNCHEZ Ciudad de México, a 06 de octubre de 2016
 Nombre y firma del solicitante o su apoderado Lugar y fecha

Página 1 de 2

IMPI-00-000



Certificado de acuse
de recibo registro:
MX/2017/014352

DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE PROCESAMIENTO ADMINISTRATIVO DE
PATENTES
COORDINACION DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FORMA
Expediente de Patente de Invención Normal **MX/a/2016/013109**

Asunto: Resultado del Examen de Forma.

Ciudad de México, a 29 de marzo de 2017

Luis Antonio CARREÑO SÁNCHEZ
Apoderado de
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL I. P. N.
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Instituto Politécnico Nacional, 2508 Edificio Administrativo,
3er. piso, Subdirección de Vinculación Tecnológica
San Pedro Zacatenco
07360, GUSTAVO A. MADERO, Ciudad de México, México

No. de Folio: **26458**

RECIBI ORIGINAL

Nombre:

Fecha: **19/05/2017**

Firma:

REF: Se da acuse de recibo a su escrito presentado: 24/02/2017.

Se tiene por satisfecho el examen de forma señalado por la Ley de la Propiedad Industrial y su Reglamento.

Cabe señalar que de conformidad con los artículos 52 de la Ley de la Propiedad Industrial; 39 y 40 del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial vigentes, una vez concluido el examen de forma y, después del vencimiento del plazo de 18 meses, contado a partir de la fecha de presentación de la solicitud de patente, o en su caso, de prioridad reconocida, toda solicitud de patente será publicada en la Gaceta, conteniendo los datos bibliográficos comprendidos en la solicitud presentada, el resumen de la invención y, en su caso, el dibujo más ilustrativo de la misma o la fórmula química que mejor la caracterice.

No obstante, la Ley de la Propiedad Industrial y su Reglamento también prevén que, a petición del solicitante mediante escrito, la solicitud de patente podrá ser publicada de manera anticipada, siempre que la misma haya aprobado el examen de forma y el solicitante entere al Instituto el pago de la tarifa correspondiente (artículo 1d).

Así, una vez publicada la solicitud, de conformidad al artículo 52 BIS de la Ley de la Propiedad Industrial, cualquier persona podrá dentro de un plazo de seis meses posteriores a aquella, presentar ante el Instituto, información concerniente a los requisitos de patentabilidad y sus excepciones (artículos 16 y 19 de la Ley de la Propiedad Industrial), por lo que el Instituto dará inicio al examen de fondo hasta haber transcurrido los plazos especificados.

El suscrito firma el presente oficio con fundamento en los artículos 6º fracciones III y XI y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996, 26/12/1997, 17/05/1999, 26/01/2004, 16/06/2005, 25/01/2006, 06/05/2009, 06/01/2010, 18/06/2010, 28/06/2010, 27/01/2012 y 09/04/2012); artículos 1º, 2º, 3º fracción V, inciso a), sub inciso i), segundo guión, 4º, 5º y 12º




MX2017020458

Combinación (A4 + D4), solicitud de patente MX/a/2016/013108 y hoja de satisfecida el examen de forma para la combinación (A4 + D4)



Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial



INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL
Dirección Divisoria de Patentes

Solicitud de Patente
 Solicitud de Registro de Modelo de Utilidad
 Solicitud de Registro de Diseño Industrial, especifique cuál:
 Modelo Industrial Dibujo Industrial


Antes de firmar la forma lea las consideraciones generales al inventor

Uso exclusivo Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Oficinas Regionales del IMPI
Solo

Fecha de entrada

Fecha y hora de recepción

Solicitud: **MX/a/2016/013108**
 Expediente: **6/OCT/2016** Hora: **12:44:58**
 Folio: **MX/E/2016/01341** 644/335



I DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)	
El solicitante es el inventor <input type="checkbox"/>	El solicitante es el apoderado <input checked="" type="checkbox"/>
1) Nombre (s): Solicitante 1: Instituto Politécnico Nacional, Solicitante 2: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del I. P. N., Solicitante 3: Universidad Autónoma Metropolitana	
2) Nacionalidad (es): Solicitante 1: Mexicana, Solicitante 2: Mexicana, Solicitante 3: Mexicana	
3) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: Solicitante 1: Edificio de la Dirección General, Avenida Luis Enrique Erro S/N, Unidad Profesional "Antonio López Mateos", Zacatenango, C.P. 07750, Solicitante 2: Av. Instituto Politécnico Nacional, 2506, San Pedro Zacatenango, 07360, Solicitante 3: Protagón de Miramonte, 2895, Ex Hacienda San Juan de Dios, 01435	
Población, Estado y País: Solicitante 1: Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México, Solicitante 2: Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México, Solicitante 3: Tlalpán, Ciudad de México, México	
4) Teléfono (clave):	5) Fax (clave):

II DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR(ES)	
6) Nombre (s): Inventor 1: Claudia Guadalupe Benítez Cardoza, Inventor 2: José Luis Vique Sánchez, Inventor 3: Cynthia Cruz Ricardo, Inventor 4: Rosaura Arroyo Venegas, Inventor 5: Jelina Ortega López, Inventor 6: Luis Gabriel Bebe de Castro, Inventor 7: Arturo Rojo Domínguez, Inventor 8: Prudencio García Gutiérrez	
7) Nacionalidad (as): Inventor 1: Mexicana, Inventor 2: Mexicana, Inventor 3: Mexicana, Inventor 4: Mexicana, Inventor 5: Mexicana, Inventor 6: Mexicana, Inventor 7: Mexicana, Inventor 8: Mexicana	
8) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: Inventor 1: Calle D Mex VII, 47, Educación, 14406, Inventor 2: Sur 67-A, 5111, Viaducto Piedra, 18206, Inventor 3: Av. Instituto Politécnico Nacional, 2506, San Pedro Zacatenango, 07360, Inventor 4: Av. Instituto Politécnico Nacional, 2506, San Pedro Zacatenango, 07360, Inventor 5: Av. Instituto Politécnico Nacional, 2506, San Pedro Zacatenango, 07360, Inventor 6: km 9.6 del Troncalito Norte, Carretera Imputo-León, 16690, Inventor 7: Sur 48A, 241-6, Benjida, 16690, Inventor 8: Tepic, Jalisco, 46600, Inventor 9: Adolfo Ruiz Cortines, 04630	
Población, Estado y País: Inventor 1: Coyoacán, Ciudad de México, México, Inventor 2: Iztacalco, Ciudad de México, México, Inventor 3: Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México, Inventor 4: Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México, Inventor 5: Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México, Inventor 6: Gustavo A. Madero, Ciudad de México, México, Inventor 7: Tlalpán, Ciudad de México, México, Inventor 8: Coyoacán, Ciudad de México, México	
9) Teléfono (clave):	10) Fax (clave):

III DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)	
11) Nombre (s): Luis Antonio Garro Sánchez	12) R.C.P.: DDAJ-13947
13) Domicilio, calle, número, colonia y código postal: Instituto Politécnico Nacional, 2506 Edificio Administrativo, 3er. piso, Subdirección de Vinculación Tecnológica, San Pedro Zacatenango, 07360	
Población, Estado y País: Gustavo A. Madero, Ciudad de México	
14) Teléfono (clave):	15) Fax (clave):
16) Persona Autorizada para dar y recibir notificaciones: Darío Faribé Espinoza, Mariana González Figueroa	

17) Denominación o Título de la Invencción:	
Nueva composición para el tratamiento de la tricomoniasis	
18) Fecha de obligación previa:	19) Clasificación Internacional:
Día Mes Año	Código
20) Divisoria de la solicitud:	21) Fecha de presentación:
Número	Día Mes Año
22) Prioridad Reclamada:	23) Fecha de presentación:
País	Día Mes Año
	No. de serie

Lista de verificación (uso interno)			
No. Hoja	Descripción	No. Hojas	Descripción
<input checked="" type="checkbox"/> 1	Comprobante de pago de la tarifa	<input checked="" type="checkbox"/> 6	Documento de cesión de derechos
<input checked="" type="checkbox"/> 26	Descripción y reivindicación (es) de la invención		Constancia de depósito de material bibliográfico
<input checked="" type="checkbox"/> 4	Dibujo (s) en su caso		Documento (s) comprobatorio(s) de divulgación previa
<input checked="" type="checkbox"/> 4	Resumen de la descripción de la invención		Documento (s) de prioridad
<input checked="" type="checkbox"/> 2	Documento que acredite la personalidad del apoderado		Inclusión
		48	TOTAL DE HOJAS

Observaciones:

Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos aparecidos en esta solicitud son ciertos.

LUIS ANTONIO GARRO SANCHEZ

Nombre y firma del solicitante o su apoderado

Ciudad de México, a 08 de octubre de 2016

Lugar y fecha



Certificado de acuse
de recibo registro:
MX/2017/014343

DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE PROCESAMIENTO ADMINISTRATIVO DE
PATENTES
COORDINACION DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FORMA
Expediente de Patente de Invención Normal **MX/a/2016/013108**

Asunto: Resultado del Examen de Forma.

Ciudad de México, a 29 de marzo de 2017

Luis Antonio CARREÑO SÁNCHEZ
Apoderado de
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL I. P. N.
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
Instituto Politécnico Nacional, 2508 Edificio Administrativo,
3er. piso, Subdirección de Vinculación Tecnológica
San Pedro Zacatenco
07360, GUSTAVO A. MADERO, Ciudad de México, México

No. de Folio: **26460**

RECIBI ORIGINAL

Nombre:

Fecha: *19/05/2017*

Firma:

REF: Se da acuse de recibo a su escrito presentado: 24/02/2017.

Se tiene por satisfecho el examen de forma señalado por la Ley de la Propiedad Industrial y su Reglamento.

Cabe señalar que de conformidad con los artículos 52 de la Ley de la Propiedad Industrial; 39 y 40 del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial vigentes, una vez concluido el examen de forma y, después del vencimiento del plazo de 18 meses, contado a partir de la fecha de presentación de la solicitud de patente, o en su caso, de prioridad reconocida, toda solicitud de patente será publicada en la Gaceta, conteniendo los datos bibliográficos comprendidos en la solicitud presentada, el resumen de la invención y, en su caso, el dibujo más ilustrativo de la misma o la fórmula química que mejor la caracterice.

No obstante, la Ley de la Propiedad Industrial y su Reglamento también prevén que, a petición del solicitante mediante escrito, la solicitud de patente podrá ser publicada de manera anticipada, siempre que la misma haya aprobado el examen de forma y el solicitante entere al Instituto el pago de la tarifa correspondiente (artículo 1d).

Así, una vez publicada la solicitud, de conformidad al artículo 52 BIS de la Ley de la Propiedad Industrial, cualquier persona podrá dentro de un plazo de seis meses posteriores a aquella, presentar ante el Instituto, información concerniente a los requisitos de patentabilidad y sus excepciones (artículos 16 y 19 de la Ley de la Propiedad Industrial), por lo que el Instituto dará inicio al examen de fondo hasta haber transcurrido los plazos especificados.

El suscrito firma el presente oficio con fundamento en los artículos 6º fracciones III y XI y 7º bis 2 de la Ley de la Propiedad Industrial (Diario Oficial de la Federación 27/06/1991, reformada el 02/08/1994, 25/10/1996,



MX/2017/26460

Anexo II) Artículo publicado como coautor, Jimenez-Sandoval P, **Vique-Sanchez JL**, Hidalgo ML, Velazquez-Juarez G, Diaz-Quezada C, Arroyo-Navarro LF, Moran GM, Fattori J, Jessica Iaz-Salazar A, Rudiño-Pinera E, Sotelo-Mundo R, Figueira ACM, Lara-Gonzalez S, Benítez-Cardoza CG, Brieba LG. A competent catalytic active site is necessary for substrate induced dimer assembly in triosephosphate isomerase. *Biochim Biophys Acta*. 2017 Nov;1865(11 Pt A):1423-1432. doi: 10.1016/j.bbapap.2017.07.014. Epub 2017 Aug 9. PubMed PMID: 28803140



Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Proteins and Proteomics

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bbapap



A competent catalytic active site is necessary for substrate induced dimer assembly in triosephosphate isomerase



Pedro Jimenez-Sandoval^a, Jose Luis Vique-Sanchez^b, Marisol López Hidalgo^b, Gilberto Velazquez-Juarez^c, Corina Diaz-Quezada^a, Luis Fernando Arroyo-Navarro^a, Gabriela Montero Moran^a, Juliana Fattori^d, A. Jessica Diaz-Salazar^e, Enrique Rudiño-Pinera^f, Rogério Sotelo-Mundo^g, Ana Carolina Migliorini Figueira^d, Samuel Lara-Gonzalez^h, Claudia G. Benítez-Cardoza^b, Luis G. Brieba^{a,*}

^a Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Apartado Postal 629, Irapuato, CP 36821 Guanajuato, Mexico

^b Laboratorio de Investigación Bioquímica, Programa Institucional en Biomedicina Molecular ENMYH-IPN, Guillermo Masías Helguera No. 239, La Escalera Ticomán, 07320 DF, Mexico

^c Universidad de Guadalajara, Centro Universitario de Ciencias Exactas e Ingenierías, Departamento de Química, Blvd. Marcelino García Barragán, Ciudad Universitaria, 44430 Guadalajara, Mexico

^d Laboratório Nacional de Biociências—LNBio/Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais—CNPq, Rua Giuseppe Máximo Scalfaro, No. 10.000—Guaçu, Caixa Postal 6192, CEP 13083-970, Campinas-SP, Brazil

^e Laboratorio de Biofísica Química, Departamento de Físicoquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México 04510, México

^f Instituto de Biotecnología, UNAM, Av. Universidad 2001, Chantitla, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico

^g Laboratorio de Estructura Biomolecular, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD), Carretera a Ejido La Victoria Km 0.6, Apartado Postal 1735, Hermosillo, Sonora 83304, Mexico

^h IPECYT, División de Biología Molecular, Camino a la Presa San José 2055, CP 78216 San Luis Potosí, San Luis Potosí, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords

Dimer assembly
Triosephosphate isomerase
Trichomonas
X-ray crystallography

ABSTRACT

The protozoan parasite *Trichomonas vaginalis* contains two nearly identical triosephosphate isomerases (TvTIMs) that dissociate into stable monomers and dimerize upon substrate binding. Herein, we compare the role of the "ball and socket" and loop 3 interactions in substrate assisted dimer assembly in both TvTIMs. We found that point mutants at the "ball" are only 39 and 29-fold less catalytically active than their corresponding wild-type counterparts, whereas Aloop 3 deletions are 1502 and 9400-fold less active. Point and deletion mutants dissociate into stable monomers. However, point mutants assemble as catalytic competent dimers upon binding of the transition state substrate analog PGH, whereas loop 3 deletions remain monomeric. A comparison between crystal structures of point and loop 3 deletion monomeric mutants illustrates that the catalytic residues in point mutants and wild-type TvTIMs are maintained in the same orientation, whereas the catalytic residues in deletion mutants show an increase in thermal mobility and present structural disorder that may hamper their catalytic role. The high enzymatic activity present in monomeric point mutants correlates with the formation of dimeric TvTIMs upon substrate binding. In contrast, the low activity and lack of dimer assembly in deletion mutants suggests a role of loop 3 in promoting the formation of the active site as well as dimer assembly. Our results suggest that in TvTIMs the active site is assembled during dimerization and that the integrity of loop 3 and ball and socket residues is crucial to stabilize the dimer.

1. Introduction

Proteins assemble as oligomers to promote cooperativity, increase thermal stability or to prevent protein degradation [1,2]. In most species, triosephosphate isomerase (TIM) is a homodimer, with the exception of archaea in which this enzyme assembles into a tetramer [3-6]. Because of the

reduced catalytic activity of monomeric TIMs and the high stability of their dimers, this enzyme is referred as an obligated dimer [7-10]. TIMs assemble as (β - α)₂ barrels with limited amino acid sequence identity between its members [7,11-13]. Although this limited sequence identity, crystal structures of more than 40 dimeric TIMs are superimposable, indicating the high conservation of the structural elements present in this enzyme.

* Corresponding author.

E-mail address: luis.brieba@ciinvestav.mx (L.G. Brieba).

Anexo III) Artículo enviado como autor, **Vique-Sanchez JL**, Caro-Gomez LA, Brieba LG and Benitez-Crdoza CG. Novel strategies to fight trichomoniasis. Unstable isoform of the moonlighting protein triosephosphate isomerase as drug target. Submit to Journal of Computer-Aided Molecular Design. November 9th 2017

Journal of Computer-Aided Molecular Design

Novel strategies to fight trichomoniasis. Unstable isoform of the moonlighting protein triosephosphate isomerase as drug target.

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	JCAM-D-17-00308	
Full Title:	Novel strategies to fight trichomoniasis. Unstable isoform of the moonlighting protein triosephosphate isomerase as drug target.	
Article Type:	Original Research Article	
Keywords:	Trichomonas vaginalis; moonlighting protein; drug resistance; drug development; sexual transmitted diseases; docking.	
Corresponding Author:	Claudia Guadalupe Benitez-Cardoza, Ph.D. Instituto Politecnico Nacional Ciudad de Mexico, MEXICO	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	Instituto Politecnico Nacional	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	José Luis Vique-Sánchez	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	José Luis Vique-Sánchez	
	Luis Alberto Caro-Gomez	
	Luis Gabriel Brieba	
	Claudia Guadalupe Benitez-Cardoza, Ph.D.	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	SIP-IPN México (20170416)	Dr. Claudia Guadalupe Benitez-Cardoza
	FINNOVA-CONACyT	Dr. Claudia Guadalupe Benitez-Cardoza
	COFAA-IPN	Dr. Claudia Guadalupe Benitez-Cardoza
Abstract:	<p>Trichomonas vaginalis is a parasitic protozoan responsible for the non-viral, most prevalent- sexually transmitted disease, affecting millions of individuals worldwide. The main treatment against this disease is metronidazole and some other nitroimidazole derivatives. However, five to twenty % of clinical cases of trichomoniasis are caused by parasites resistant to these drugs. Here we present an innovative strategy to fight trichomoniasis, using the glycolytic enzyme triose phosphate isomerase (TvTIM) as drug target. This enzyme has recently been described as a moonlighting protein within Trichomonas vaginalis, acting as a laminin and fibronectin binding protein on the surface of the parasite. In the Trichomonas vaginalis genome two genes encode for two isoforms of TvTIM, known as TvTIM1 and TvTIM2, they differ by the character of four out of 254 aminoacid residues. In this study, we used high throughput virtual screening to search molecules which specifically bind to TvTIM isoforms. The effects on the conformation and enzymatic activity of both isoforms TvTIM of the 34 compounds with the best scores were evaluated. We found three compounds that specifically bind, modify the conformation and inhibit TvTIM2 only; even though the sequence of both isoforms is almost identical. The selectivity of these compounds towards TvTIM2 is explained by the lowest conformational stability of this isoform. These results represent important advances for the development of novel therapeutic strategies against trichomoniasis.</p>	

Anexo IV) Borrador 2do artículo, autor Vique-Sanchez JL.

New compounds against Trichomoniasis

Vique-Sanchez JL, Brieba LG, Arroyo-Verastegui R, Dominguez-Rojo A, Ordaz-Pichardo C and Benitez-Cardoza CG

This document will be submitted when technology transfer process has been completed.

Abstract

Trichomonas vaginalis is the causal agent of trichomoniasis, a vaginal infection in women and urogenital in man. This infection comprises a variety of symptoms ranging from an almost asymptomatic condition, to inflammation and severe irritation of the vaginal tissue, accompanied by pruritus and yellowish-greenish malodorous flow in women and flow from the urethra, as well as urination with frequency, often with pain and burning in men [1] [2] [3].

The World Health Organization (WHO) reported in 2012 more than 2376 million cases worldwide and in Mexico it is estimated that around 200 000 of new cases appear each year [4]. This is even more alarming if at least 50 % of the cases are considered asymptomatic and therefore they are neither detected nor treated, thus favoring the spread of infection [5]. Trichomoniasis is a chronic non-fatal infection, but with profound consequences such as premature births, respiratory infections in the newborn and complications of other diseases in immunocompromised adults [6]. Similarly, it has been reported that infection by *T. vaginalis* may increase the predisposition of individuals to infection by human immunodeficiency virus and human papilloma by erosion that occurs in epithelium [5] [7].

The treatment of trichomoniasis has mainly consisted of the provision of nitroimidazole derivatives; however, therapeutic ineffectiveness has been observed in 5 to 20% of cases [8] [9] [4]. Therefore, it is necessary to propose new therapeutic schemes against this disease. In this work, we describe two new trichomonocidal molecules capable of altering the growth and viability of *Trichomonas vaginalis* cultures: Their therapeutic efficacy was verified by *in vitro* cultures of *T. vaginalis* isolates; the possible interaction of the potential drugs with the target protein was analyzed; it was also determined that they do not present mutagenic, cytotoxic nor genotoxic effects and therefore can be used as a therapeutic treatment against trichomoniasis. Also, the

combination of both molecules was analyzed as a new trichomonicide formulation. Furthermore, chemical derivatives were proposed that could enhance the trichomonicide effect.

The results of this project resulted in the application of three national patents and via PCT. At the time of writing this document, the Notice of Allowability and the favorable comments of the reviewers of the substantive examination were received. At least three national and transnational pharmaceutical companies have expressed their interest in acquiring the technology to continue the stages of development of new drugs.

Introduction

Trichomoniasis is a very common sexually transmitted disease (STD) caused by the infection transmitted by the protozoan parasite called *Trichomonas vaginalis*. Trichomoniasis can spread from an infected person who transmits the parasite to another person who does not have the infection during sex. In women, the most frequently infected area of the body is the lower part of the genital tract (the vulva, the vagina or the urethra) and in men the inner part of the penis (urethra). During sexual intercourse, the parasite is usually transmitted from the penis to the vagina or from the vagina to the penis, but it can also be transmitted from one vagina to another. It is not often that the parasite infects other parts of the body, such as the hands, mouth or anus. People infected with or without symptoms can spread the infection to others [10] [11].

Approximately 50% of infected people have no signs or symptoms. When trichomoniasis causes symptoms, they can range from mild irritation to severe inflammation. Some people present symptoms during the 5 to 28 days after becoming infected, but others present them much later (2 to 4 months) [7] [4]. Here are some of the main symptoms in both women and men caused by infection with *Trichomonas vaginalis*:

Symptoms in women:

- Drush thick and often with bad smell
- blood stains in the flow
- Picking in the genital area
- Need to urinate frequently, often with pain and burning

Symptoms in Men:

- flow coming from the urethra
- Need to urinate frequently, often with pain and burning

Having trichomoniasis can cause discomfort when having sex and if it is not treated, the infection can last for months and even years. Trichomoniasis infection can increase the risk of premature births in women and contracting or spreading other sexually transmitted infections. For example, it can cause genital inflammation that makes it easier to become infected with the HIV virus or papilloma virus [5] [7].

The WHO has reported that approximately 276 million people are infected annually in the world. In the US, an estimated 16 million people per year are infected every year and 50% of them are asymptomatic [12].

In Mexico, in 2011, urogenital trichomoniasis occupied the twelfth place among the "Twenty leading causes of communicable diseases" [13] [14], with 113 843 reported cases, equivalent to 104.23 cases / 100 000 inhabitants. Women were more affected than men in a ratio of 36: 1, and the age group with the highest number of cases corresponded to that of 25-44 years. In terms of incidence, the highest figures were recorded in the States of Puebla, Tlaxcala, Veracruz, followed by Zacatecas, Oaxaca and Durango [14]. This data may not correspond to reality because the disease is not a mandatory epidemiological report; in addition to the high percentage of sub-diagnosis, due to the lack of symptoms in at least 50% of the cases.

Below, the cases by federal entity of sexually transmitted diseases are presented up to the epidemiological week 39 of 2017 (SINAVE / DGE) and the national incidence rate of *Trichomonas vaginalis* (SUIVE / DGE / SSA 2011).

The drug that has been used the most is Metronidazole, (1- (β -hydroxyethyl) -2-methyl-5-nitroimidazole) discovered in the 1950s [15] [16]. This drug and its derivatives have proven to be useful in most cases of trichomoniasis treatment. However, it has been found that treatment is not effective between 5 to 20% of cases [16]. Resistance to Metronidazole is a problem that is increasing, since the most common drugs for its treatment are derivatives of 5-nitroimidazoles

with the same mechanism of action. The average dose of susceptibility has been reported and Metronidazole for 10,000 parasites is 28-32 μM with a limit up to 300 μM in culture at 24 hrs. Isolates that require concentrations greater than 300 μM are considered resistant to this drug [17].

For the selection of these compounds, the triose phosphate isomerase of *Trichomonas vaginalis* (TvTIM) was chosen as the therapeutic target. Considering both the cellular location and the function of this protein, recently described in the cell surface of the parasite, this protein could be considered as a novel and attractive target for the design of drugs against *Trichomonas vaginalis*, with a mechanism of therapeutic action different from what was proposed until the moment in tricomonicides and parasitic drugs (references).

In this work we found two compounds that were selected by high throughput virtual screening. They were tested against both isoforms of TvTIM. The tricomonicide effect of these compounds was evaluated in 51 isolates from patients infected by *Trichomonas vaginalis*. We also evaluated the toxicity, and synergic effect between these compounds. The molecules presented in this manuscript show high potential to become new drugs against trichomoniasis.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Determination of the stoichiometric ratio between the compounds A4 and D4 with the TvTIM1 isolated and in complex with each of the compounds.

The stoichiometric ratio between the compounds A4 and D4 was determined by the mass difference the isoform of TvTIM1 isolated and in complex with each of the compounds A4 and D4 (separately). For this, a solution of TvTIM1 at a concentration of 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ was incubated, for 2 h, with 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of A4 or D4 (both dissolved in 1% DMSO) and for the negative control, only with DMSO (vehicle, at 1%). Then, the mass spectra (ms) of the protein were obtained, using a MALDI-TOF / TOF mass spectrometer (UltrafleXtreme Bruker Daltonics) equipped with Nd laser in reflecto mode. The monoisotopic ions $[\text{MH}^+]$ were measured in the range of 700-4500 m/z with a tolerance of 50 ppm. The ion spectra of fragments were obtained in Lift mode. The accuracy of measurements of the ion mass peaks of fragments was 1 Da. To analyze mass spectra, FlexAnalysis 3.3 software (Bruker Daltonics) was used. All procedures for the

preparation of protein samples analyzed for mass spectrometry followed a protocol described by Ronci [18] [19].

2.2 Cultures of *T. vaginalis*.

To grow a culture, the inoculum (*T. vaginalis* sample) thawed to 5 mL of TYM medium [40] and 10% horse serum under sterile conditions was seeded. It is incubated at 37 ° C for 24 h and the viability is determined, in this first incubation, dead parasites can be observed and a viability of 60-70%. For a second sowing, 1 mL is inoculated in 5 mL of medium and 10% of horse serum for 24 h, obtaining an approximate viability of 90% with approximately 1×10^6 parasites in the medium. This culture was used as inoculum to perform the inhibition tests [20]. Under these conditions *T. vaginalis* replicates every 8 h at 37 ° C.

2.3 Tricomonicidal effect of A4 and D4 in several *T. vaginalis* isolates and IC₅₀ calculation.

T. vaginalis culture inhibition tests were performed on isolates of 51 patients from different hospitals, including: from the National Center of Displasia Clinics of the General Hospital of Mexico, Hospital Juárez de México, clinics of the state of Jalisco, among others. These isolates, although not widely characterized, have different characteristics of pathogenicity, such as mobility, size, group formation, etc. [21] For all the isolates, the following protocol was followed: 96-well plates of 300 µL each were used, where 5,000 were planted. 10,000, 50,000 and 100,000 parasites to be tested with either compound A4 or D4, in concentrations of 10 µM and up to 400 µM, In the case of the combination (A4 + D4; 1: 3) total concentrations between 10 µM and up to 200 µM (the molar ratio between the compounds for the A4: D4 combination was determined experimentally as described below in section 2.5). In all cases, the plates were incubated at 37 ° C for 24 h and 48 h. DMSO was added to the negative controls, in concentrations from 0.5 to 2% v / v. All tests were performed in triplicate. This methodology is similar to that reported in the literature to evaluate the resistance of *T. vaginalis* to metronidazole [22] [23]. These isolates have not been typified, that is, at the moment it is unknown whether they belong to type 1 or type 2. The trichomonas count is performed in the hematocimeter, multiplied by the factor 104 to determine the number of parasites in 1 mL. To determine the

percentage of viability, trypan blue staining was performed and the sample was placed in the hemacytometer, the percentage of viability is inverse to the percentage of stained cells [54]. The 50 % inhibitory concentration (IC₅₀, 50% culture viability at 24 h) was calculated by the Graph Pad Prism software.

These experiments were carried out in the Laboratory of Dr. Rossana Arroyo Verastegui of the Department of Infectomics and Molecular Pathogenesis at CINVESTAV.

2.4 Kinetics of the tricomonicidal effect.

The samples were incubated in 96-well plates at 37 ° C with 20,000 parasites per 200 µL and concentrations of A4, between 50 µM and up to 200 µM and of D4 50 µM and up to 200 µM of the combination of (A4 + D4) between 20 µM and up to 100 µM, evaluating the viability of the culture every 0.5, 1, 3, 6, 12, 24, or 48 h. The plates were examined with an inverted phase contrast microscope (Nikon, distributed by Ehrenreich Photo-Optical Industries, Garden City, N.Y.). The lowest concentrations of A4, D4 and of the combination (A4 + D4) were recorded, which completely inhibited the mobility of the *Trichomonas vaginalis* parasites [22] [23] for each isolate in each period of time. Performing tests in triplicate in all cases.

2.5 Therapeutic effect of the combination (A4 + D4) in *T. vaginalis* cultures.

96 well plates of 300 µL capacity were used in each well, where 5,000 were planted. 10,000, 50,000 and 100,000 parasites to test the combination of (A4 + D4), in concentrations from 10 µM and up to 400 µM, in different molar ratios 1: 2, 2: 1, 1: 3, 3: 1, 1: 4 and 4: 1, incubating the plate at 37 ° C for 24 h. The controls contained only DMSO from 0.5 to 2% v / v, all tests were performed in triplicate. As described in the results section, it was determined that the 1: 3 molar ratio of A4 + D4 is the one with the best tricomonicidal effect; therefore, this molar ratio was the one used in the other experiments (trichomonic effect section 3.2, trichomonic effect kinetics 3.3 and synergistic effect 3.4.)

2.6 Synergistic effect of A4 and D4 in in vitro cultures of *T. vaginalis*.

To evaluate the existence of a possible synergistic, additive or antagonistic effect between compounds A4 and D4 and with the aim of reducing the necessary dose of each compound in monotherapy and, therefore, minimizing its toxicity, the Chou-Talalay methodology was used and the OriginPro 8 software. The Chou-Talalay protocol is based on the determination of the combination index (IC) that is calculated according to the following equation:

$$IC = \frac{(D)_{A4}}{(Dx)_{A4}} + \frac{(D)_{D4}}{(Dx)_{D4}}$$

Where $(D)_{A4}$ and $(D)_{D4}$ correspond to the concentrations of compounds A4 and D4, used in combination to obtain a percentage of therapeutic effect on a system, in this case it would be the tricomonicidal effect. $(Dx)_{A4}$ and $(Dx)_{D4}$ corresponds to the concentrations of each compound used individually to obtain the same effect. If the sum of these two fractions is equal to 1, it indicates an additive effect. If the IC value is less than 1, it indicates that the effect is synergistic, and if the IC value is greater than 1, it indicates an antagonistic effect. The synergistic effect can be defined as: mild (CI: 0.85-0.90), moderate (CI: 0.7-0.85), synergism (CI: 0.3-0.7), strong (CI: 0.1-0.3) or very strong (CI <0.1). The values $(D)_{-1}$ and $(D)_{-2}$ and $[(Dx)]_{-1}$ and $[(Dx)]_{-2}$ are obtained from the dose-effect curves of both the individual drugs and the combination respectively.

2.7 Toxicity Tests.

One part of this project corresponds to carry out different types of toxicity tests of the preclinical phase of drug development to demonstrate the safety of the use of A4, D4 and (A4 + D4).

2.8 Mutagenic potential: Ames test.

Mutagenesis tests are biological assays used to evaluate the mutagenic potential of chemical compounds [24]. This test consists of the use of *Salmonella typhimurium* bacteria strains genetically altered with mutations in the genes involved in histidine synthesis. Because of these

mutations, these bacteria require an external supply of histidine for their growth. The test evaluates the ability of the compound tested to cause a genetic alteration in the bacteria that allows the return to growth on a histidine-free support (growth of revertant colonies). That is, the mutagenic potential of the compound tested is directly proportional to the number of revertant colonies observed. The Ames test was performed on strains of *Salmonella typhimurium* auxotrophs to histidine: TA100 (hisG46), which can detect substitution mutations of base pairs; TA98 (hisD3502), which can detect reading frame shift mutations and TA102 (hisG428), which can detect DNA damage induced by reactive oxygen species. The mutagenicity of A4, D4 and (A4 + D4) was evaluated in strains mentioned, with or without liver homogenate of rats (mixture S9) induced with Aroclor 1254, as described by Maron and Ames (9). Five concentrations of A4 (11, 22, 50, 100 and 200 µg / plate) were used; D4 (11, 22, 50, 100 and 200 µg / plate) and (A4 + D4, ratio 1: 3) (11, 22, 50, 100 and 200 µg / plate, in total concentrations), in the presence or absence of 500 µL of the S9 mixture. Compounds A4 and D4 or the combination (A4 + D4) were dissolved in DMSO at the indicated concentrations and mixed with 100 µl of bacterial culture ($1-2 \times 10^9$ CFU ml⁻¹) in 2 ml of molten agar containing it was subsequently added to the minimum agar of the Vogel Bonner plates with 0.5 mM histidine / biotin (9). The plates were incubated for 48 hours at 37 ° C and the formed revertant colonies were counted. To obtain a positive result from the Ames test, the test substance must induce twice as many revertants as those obtained by spontaneous reversion. The positive controls used in this test were picrolonic acid (PA) at 50 µg / plate, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NMNG) at 10 µg / plate, mitomycin C (Mit C) at 10 ng / plate, 2-Aminoanthracene (2AA) at 10 µg / plate, and cyclophosphamide (CP) at 500 µg / plate.

2.9 Genotoxicity: Micronucleus test.

The micronucleus test is an in vivo test that is performed in the bone marrow of rodents and that allows to evaluate the ability of a compound to induce chromosomal alterations. In the anaphase mitotic phase, in which the two sister chromatids separate, micronuclei are formed from genetic material that is left behind. Chromosomal material, which does not reach any of the anaphase poles due to some chromosomal alteration or some malfunction of the mitotic apparatus is identified by this assay [24]. For this test, male CD1 mice (25-30 g) were used. The mice were

maintained in accordance with the official Mexican regulation for the production, care and use of laboratory animals (NOM-062-ZOO-1999) and the protocol approved by the Ethics Committee of the National School of Medicine and Homeopathy of Mexico (Registration No. ENMH-CB-010 to 2011). The mice received a dose of 1 g / kg, were kept in an animal room at 25 ± 2 °C, $50 \pm 5\%$ humidity, and by virtue of a light-dark cycle of 12 h: 12 h. The mice were fed a standard diet (Purina, Cuautitlan, Mexico) and water. Compounds A4 and D4 were dissolved in DMSO with concentration adjustment (2000 or 300 mg / kg) at a volume of administration of 0.1 ml per mouse, intragastric (v. E.g.); before administration, the animals were fasted for 8 h. The animals were observed 2 h after the treatment, and after 48 h, the blood samples were taken for the determination of micronuclei. Each group was evaluated in triplicate and used as vehicle control DMSO (0.1 ml / mouse) and as a positive control, cyclophosphamide (50 mg / kg intraperitoneally [26]). The presence of micronucleated reticulocytes (RET-MN) and Micronuclei in the population of mature normochromatic erythrocytes (ERI-MN) in peripheral blood samples analyzed, were labeled with antibody conjugated with FITC directed against a cell surface antigen (CD71 transferrin receptor). Micronucleated cells were detected based on fluorescence produced after propidium iodide staining and quantified using a FACSAria™ flow cytometer flow (BD Biosciences, San Jose, CA).

2.10 Evaluation of DMSO cytotoxicity.

To assess whether the vehicle (DMSO) has a cytotoxic effect in cultures of *T. vaginalis* and HeLa cells, cultures of both cell types were carried out in the presence of DMSO from 0.5% to 2% v / v corresponding to s equivalent percentages using concentrations of 10 μ M to 400 μ M of the compounds.

2.11 Cytotoxicity of A4, D4 and (A4 + D4) in HeLa cells (MTT assay).

Cytotoxicity was determined with a standard MTT assay as described by Mosmann [27]. This test is based on the reduction of yellow MTT (3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium, yellow color) to formazan by the activity of the enzyme mitochondrial succinate dehydrogenase in living cells. To quantify the formation of formazan (insoluble in

water), it must be dissolved in DMSO, and its concentration measured by absorbance at 570 nm (A₅₇₀ nm). It is considered that cell viability is directly proportional to mitochondrial succinate dehydrogenase activity [59]. In vitro cultures of HeLa cells (8000 cells / well) that were seeded in 96-well plates were treated for 24 h and 48 h with different concentrations of A4, D4, (A4 + D4) and cisplatin (positive control) of 10 - 400 µM per well and 1% of DMSO as negative control. After incubation for 24 or 48 h, the medium was aspirated from the wells and replaced with medium containing MTT (1 mg / ml), and the cells were incubated for an additional 4 h at 37 ° C. After incubation and removal of the medium with MTT, the formazan crystals were dissolved with DMSO and the plates were read on a microplate reader (ELx808, Bio-Tek, Winooski, VT, USA) at 570 nm. All treatments were performed at least three times in triplicate. The control values were obtained and used to calculate the percent viability according to the formula: The concentration values that caused 50% cell growth inhibition (50 inhibitory concentration) were calculated from the dose-effect relationship of each cell line by non-linear regression with Prism 5.0 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA)

2.12 Lethal dose 50 (LD50).

This experiment was carried out according to the OECD method TG 423 (annex 1). Groups of 3 male animals were administered a single dose per v.i.g. from 2,000 mg / kg in male mice of strain CD1 (25-30 g), in case of death of 2 or more animals, the doses were reduced to 300 mg / kg (protocol TG 423). The general state of health of the animals was observed after 1, 2, 4 and 6 hours and once a day for 14 days. The animals were observed after treatment of signs of toxicity or death. At the end of the period of observation the animals were sacrificed in a CO₂ chamber. Subsequently, the organs (lung, kidney, heart, stomach, intestines, spleen and liver) were removed and macroscopic observations were made in search of pathological lesions. The value of the LD50 was determined in accordance with the Globally Harmonized Classification System (GHS) and as described in the literature (OECD TG 423).

RESULTS

3.1 Stoichiometric ratio of A4 and D4 with the Triose phosphate isomerase of *Trichomonas vaginalis*.

The molecular masses of TvTIM1 isolated and then in complex with A4 or with D4 (TvTIM-A4 and TvTIM-D4) were determined by MALDI-TOF / TOF (from: Matrix-Assisted Laser Desorption / Ionization- Time of flight; / laser-assisted ionization on matrix). The mass spectrum of TvTIM1 is shown in Figure 1, the calculation of the mass for isolated TvTIM1 was 27,889 Da. The mass of the TvTIM-A4 complex (10 μ M of A4) was 28.238 Da (Figure 1b). Since the theoretical mass of A4 is 498 Da, this peak is very close to an expected complex with a 1: 1 ratio of TvTIM-A4. No peaks were observed at the molecular mass corresponding to the 2: 1 or 1: 2 ratios of TvTIM1-A4. Similar results were also obtained with the addition of 10 μ M of D4, resulting in the formation of peaks corresponding to a molecular mass of 28857 Da (Figure 1c). The theoretical mass of D4 is 449 Da, this peak is very close to an expected complex with a 1: 2 ratio of TvTIM1-D4. No peaks were observed at the molecular mass corresponding to 1: 1 or 2: 1 ratios of TvTIM-D4 (Table 1). According to the background (section 1.8), the interaction sites of the compounds in TvTIM1 and TvTIM2 are identical and do not involve the four amino acids that are different between TvTIM1 and TvTIM2, so it is expected that the stoichiometric ratio with both isoforms of TvTIM of A4 and D4 are indistinct.

3.2 Trichomonocidal effect of A4 and D4 on 51 isolates of *T. vaginalis* and IC₅₀ calculation.

The *T. vaginalis* culture inhibition assays of 51 patient isolates were performed in the laboratory of Dr. Rossana Arroyo Verastegui, in the Department of Infectomic of CINVESTAV.

Cultures of approximately 10,000 and 20,000 parasites were used for each compound (A4, D4 and metronidazole), performing assays in triplicate, at variable concentrations of each compound 1-500 μ M, incubating at 37 ° C for 24-48 h.

It was observed that, for concentrations higher than 50 μ M for A4 and 150 μ M for D4 at 24 h, the replication of the 51 parasite isolates decreased, reaching an average of less than one replication per 24 h (the control of metronidazole obtained was 2 replications in 24 h). In addition,

the parasites lose their mobility completely, forming small groups and showed a tendency to lose adherence to the wall of the well. All isolates were observed using a reverse light microscope with a 100x lens. At 24 h in the integrity check of the membrane only 20% of the parasites are stained with trypan blue test (to determine membrane rupture). After 48 h the number of parasites observed decreases. In addition, trichomonas remains were observed in the media, as well as 90% of the parasites stained with trypan blue, indicating the loss of viability of the culture. The results were practically the same in the 51 isolates analyzed.

In this way, it is confirmed that compounds A4 and D4 have a tricomonicidal effect and therefore a great potential to be used as drugs against *T. vaginalis*.

Figure 2 shows the results of the averages of the crop viability percentages (51 isolates) of 20,000 parasites incubated with variable concentrations of A4 and D4 (1- 500 μ M) to determine the necessary concentration of each compound for achieve a 50% inhibition of the culture (IC₅₀), or 100%, ie CI₁₀₀.

3.3 Kinetics of the tricomonicidal effect of A4 and D4.

To describe the evolution over time of the tricomonicidal effect of A4 and D4, the viability of in vitro cultures of the 51 *T. vaginalis* isolates was evaluated, analyzing the replication rate, mobility and integrity of the membrane. The cultures were analyzed at different times after the addition of each compound A4 and D4. Several concentrations of each compound were tested. Figure 3 shows the data corresponding to the CI₁₀₀ concentrations, previously determined (Table 5, for every 20,000 parasites). It was observed that the percentage of viability of the cultures is completely reduced (to zero) after 3 h of incubation for A4 and D4. In contrast, for metronidazole the same decrease in viability is observed after 4 to 6 hours with 90 μ M per 20,000 parasites.

3.4 Trichomonacide effect of the combination (A4 + D4) on 51 *T. vaginalis* isolates.

To know if there is any modification of the tricomonic effect when A4 and D4 are administered together in the *T. vaginalis* isolates; cultures of the 51 isolates were incubated, evaluating the viability of the same after the addition of different combinations (A4 + D4). Different molar ratios 1: 2, 2: 1, 1: 3, 3: 1, 1: 4 and 4: 1 of A4 and D4 were used, respectively. The total concentrations

(of the compounds in combination) that were tested were between 10-400 μM per 10,000 and 20,000 parasites. It was determined that the 1: 3 ratio of A4 and D4 was the one with the best tricomonocidal effect. Specifically, an effect of eradication of parasite viability comparable to that observed in conditions of CI_{100} of A4 and D4 in individual form, when using the combination (A4 + D4) in a total concentration of 100 μM (A4 25 μM + D4 75 μM). Therefore, the subsequent experiments of the combination (A4 + D4) were carried out using the ratio 1: 3 and the concentration 100 μM (A4 25 μM + D4 75 μM) as starting point or reference for other determinations.

3.5 Kinetics of the tricomonocide effect of the combination (A4 + D4).

Figure 4 shows the kinetics of the tricomonocide effect using a total concentration of 100 μM , which inhibits the 51 isolates completely (20,000 parasites, after 24 h).

We have observed that the viability of the 51 isolates (20,000 parasites) decreases to 100% after 3 h of incubation for the combination (A4 + D4) (100 μM). It was observed that the replication decreases, since an average of 1.1 replications are presented per 24 hours (average of the 51 isolates); while for the negative control, an average of 3 replications are observed every 24 hours. The parasites totally lose mobility, the formation of small groups is appreciated and the tendency to populate the periphery or adhesion to the wall of the well is lost. In addition, in the membrane integrity tests, performed after 24 h, 5% of the parasites are stained with the "trypan blue" test (which indicates the rupture of the membrane), at 48 h 95% of the population of parasites presents the stain in the test of "trypan blue" and those that do not stain, have lost mobility, therefore, the death of parasites and loss of the viability of the crop. In the case of metronidazole (90 μM , which corresponds to the CI_{100} of metronidazole) the same decrease in viability is observed after 4 to 6 hours and the results at 24 and 48 h as in the combination (A4 + D4). In addition, we determined that the 51 isolates we used were sensitive to metronidazole.

3.6 Synergistic effect between A4 and D4.

To evaluate the possible synergistic effect, the protocol of Chou and Talalay was used [60] which establishes, to evaluate the therapeutic effect of different concentrations of the combination of drugs. According to the protocol, the initial reference concentration of each compound corresponds to the IC₅₀ value of each individual compound (in this case: 47 µM for A4 and 153 µM for D4). These initial reference concentrations are considered the 1X value. Thus according to the protocol [60], the therapeutic effect was evaluated using different total concentrations of the combination (without altering the molar ratio). Thus, the proportions corresponding to: 0.06X, 0.12X, 0.25X, 0.5X, 1X, and 2X of the combination were used, as detailed in Table 3.

The decrease in the viability percentage of cultures of 20,000 parasites of the 51 *T. vaginalis* isolates was evaluated for each of the concentrations (Figure 5).

With the average of the data of the 51 isolates and using the Graph Pad Prism software, the viability of 50% of the culture at 24 h (IC₅₀) of (A4 + D4), in a 1: 3 ratio, respectively, was determined: 48 ± 2.6 µM (12 µM A4 + 36 µM D4) Table 4.

The IC₅₀ value of the combination is 48 ± 2.6 µM, which corresponds to a concentration of 12 µM for A4 and 36 µM for D4. This represents a decrease of approximately 75% of the required concentrations of each compound to obtain the same tricomonicidal effect.

To confirm the synergistic effect, the combination index was calculated for various percentages of tricomonicidal effect (CI), using the equation in section 2.6 of materials and methods [60] (Table 5). The values of the concentrations to substitute in the equation were obtained from the dose-effect curves of the individual compounds and the combined formulation (A4 + D4).

These results indicate that the combination (A4 + D4) have a synergistic effect. This data is very favorable, since generally, for any pharmacological treatment it is preferred to use lower doses to achieve the same therapeutic effect since costs and possible side effects can be reduced.

3.7 Mutagenic potential: Ames tests.

A4 and D4 have no mutagenic effects in any of the three strains used (TA98, TA100 and TA102) at 11, 22, 50 and 100 µg / plate, in comparison with all the positive controls used (PA, NMNG, Mit C, 2AA, and CP) with or without S9 mixture. The average of the revertant colonies of the mutation tests of the positive controls were at least 2 times higher than the average of the revertant colonies of the negative control, A4 and D4 at different concentrations. (DMSO; Figure 6). Our results indicate that these doses of A4 and D4 have no mutagenic effects.

The combination (A4 + D4) was also evaluated by the Ames test. This composition is not mutagenic, the results are shown in Figure 7.

The combination of (A4 + D4) showed no mutagenic effect in any of the three strains used (TA98, TA100 and TA102) at 11, 22, 50 and 100 µg / plate, in comparison with all the positive controls used (PA, NMNG , Mit C, 2AA, and CP) with or without S9 mixture. All mutation rates of the positive controls were several times higher than the spontaneous control reversal (DMSO, Figure 14). Our results indicate that these doses of (A4 + D4) are not mutagenic.

3.8 Genotoxicity: Micronucleus test.

To evaluate the genotoxic activity of A4 and D4 in an in vivo model, the potential of these compounds was measured to induce the formation of micronucleated reticulocytes (MN-RET) and micronucleated normochromatic erythrocytes (MN-NCE), according to previously published criteria. [61] In Figure 8, which shows that only mice treated with the positive control (cyclophosphamide) had statistically significant increases in both the number of MN-RET and MN-NCE at 48 h compared to mice treated with the vehicle (DMSO). In general, it is possible to observe initial mutagenic effects of micronucleus inducers at 24 h; the highest amount of micronuclei was observed at 48 h. This was observed with our positive control, but not with A4 or with D4. All the groups treated with A4 and D4 had a similar number of MN-RET as in MN-NCE at baseline (0 h) and after treatment (24 and 48 h), and no significant differences were

observed between the groups treated with A4 or with D4 or with respect to the negative control. These results suggest that neither A4 nor D4 have genotoxic potential.

3.9 Test of MTT and IC₅₀ in HeLa cells.

Compounds A4 and D4 were tested separately; as well as the combination (A4 + D4) up to 400 µM in the in vitro cultures of HeLa cells and no cytotoxic damage was observed, the HeLa cells were able to form the characteristic monolayer of this type of cells, demonstrating the viability of the culture to the 24 and 48 h, with similar results to the negative control with DMSO (Figure 9).

According to the MTT assay, it is concluded that A4 (Figure 8a), D4 (Figure 8b) and the combination (A4 + D4) (Figure 8c) do not affect the viability of the HeLa cell culture. It was not possible to determine an IC₅₀ value, although said value must be greater than 400 µM.

3.10 Determination of 50% Lethal Dose in murine models (LD₅₀).

A4

The administration of A4 at a dose of 2000 mg / kg showed no signs of toxicity during the first 24 h of treatment, however, one of the animals died on the second day of administration and two mice died after four days. All the animals showed piloerection and alterations in motor activity during the 12 hours prior to their death. When a macroscopic observation of the organs was made it was found that they showed a reduction in the size of the spleen and a gelatinous consistency.

According to the diagram of procedure 1D TG 423 the dose of compound A4 was reduced to 300 mg / kg. At this dose no signs or symptoms of toxicity (such as piloerection, mucosal irritation or alterations in motor activity) or deaths in the treated groups were found during 14 days after administration of the compound. The weights of the treated mice showed no statistically significant changes compared to the healthy animals during the treatment period (Table 9). The organs (lungs, kidneys, heart, stomach, intestines, spleen and liver) show no morphological lesion.

The LD₅₀ of A4 compound is greater than 500 mg / kg and less than 2000 mg / kg per v.i.g. in male mice strain CD-1, by the TG 423 procedure and, therefore, is in category 4 of the Globally Harmonized System (GHS).

D4

The administration of D4 at a dose of 2000 mg / kg did not present signs or symptoms of toxicity (such as piloerection, mucosal irritation or alterations in motor activity) or deaths within 14 days after administration of compound D4. The weights of the treated mice showed no statistically significant changes compared to the healthy animals during the treatment period (Table 10). The organs (lungs, kidneys, heart, stomach, intestines, spleen and liver) show no morphological lesion.

The LD₅₀ of D4 is greater than 2000 mg / kg per v.i.g. in male CD -1 mice by the TG 423 procedure and, therefore, is in category 5 of the GHS (> 2000-5000 mg / kg).

With the above results, the safety of the use of the compounds A4 and D4, and the combination (A4 + D4) was demonstrated.

4 DISCUSSION

Trichomoniasis is responsible for up to 30% of non-viral sexually transmitted infections. The highest frequency is in women from 16 to 35 years old. It can be asymptomatic, which facilitates its transmission. The etiological agent is the protozoan *Trichomonas vaginalis*, transmitted by sexual contact. The current treatment is based on drugs of the family of nitroimidazoles, which are divided into two groups: the 2-nitroimidazoles, which include misonidazole and benznidazole, and the 5 nitroimidazoles, which include: metronidazole, tinidazole, ornidazole, secnidazole, carnidazole, nimorazole and satranidazole [28]. However, there are patients (from 5 to 20%) who do not show improvement of the infection and others have secondary effects with the current treatments against trichomoniasis, therefore, it is necessary to develop new therapeutic options that have a mechanism of action different, since, over the years, any organism can create resistance.

In this work, a therapeutic target different from that of conventional treatments was used. The enzyme triose phosphate isomerase is indispensable in the metabolism of the parasite carbon, that is, necessary for the production of ATP. In an initial stage of the development of this project, it was considered that if with any compound it could affect the enzymatic activity of the parasite's triose phosphate isomerase and therefore its metabolism, this compound could be a candidate as a new drug against this disease. However, thanks to the exhaustive characterization of the therapeutic target, it was possible to determine that the triose phosphate isomerase of *T. vaginalis* (TvTIM) has several characteristics that make it a therapeutic target even more attractive than originally thought. One such feature is that TvTIM is encoded in *T. vaginalis* by two independent genes, with distinctive transcriptional regulation [21]. On the other hand, by immunolocalization tests, at least one TvTIM isoform was detected on the surface of the parasite. So far, only the presence of extracellular TvTIM has been reported [29], but not in any mammal. The extracellular localization of TvTIM is associated with a new function of these proteins, interacting with extracellular matrix proteins (laminin and fibronectin). This non-canonical function of TvTIM represents a new virulence factor of the parasite [29].

These findings on TvTIM increase the potential for the use of a drug directed against TvTIM. For example, the extracellular localization of the pharmacological target implies that the penetration of the drug into the cell of *T. vaginalis* is not necessary, since it can exert its mechanism of action on the therapeutic target outside the cell. In previous studies, several compounds capable of interacting and inhibiting the enzymatic activity of the triose phosphate isomerase of several parasites had been reported [29] [30] [31] [32]. However, its antiparasitic effect is limited, due to the low or no penetration of the compounds into the cells of the parasites.

In the case of the compounds described in this thesis: A4 and D4 and the formulation (A4 + D4), it is possible to propose local topical use as the administration route, since the vaginal cavity is the main site of infection of this parasite. It is proposed the use of a vehicle in the form of an ovule that can be dissolved and carry out the release of our drug. It is also possible to use some gel, cream or ointment. This represents many advantages, with respect to a systemic application, or oral administration; since the therapeutic doses and the possible side effects are reduced. Also, from the point of view of drug regulation, and its evaluation, clinical trials, would propose to start with an evaluation of local-vaginal application (intravaginal) both to evaluate the

toxicology in healthy patients and subsequently the therapeutic effect in patients with *T. vaginalis* infection. This type of protocols in clinical trials, represents less risk and therefore, requires less costs, compared with medications for systemic use [67].

Regarding the mechanism of action of A4 and D4, we propose three possible options:

A) A4 or D4 penetrate the cell and interact with intracellular TvTIM and alter its enzymatic activity, causing the inability to complete the glycolytic pathway and as a consequence decrease the possibility of generating ATP. From the results of the docking, it is known that at least D4 interacts with the amino acids (Lys11 and Ser95) close to the active site and this would cause an alteration in its enzymatic function.

B) A4 or D4 interact with the TvTIM that is on the outer surface of the membrane and thereby alters the moonlight function of TvTIM (interaction with laminin and fibronectin), probably with the process of pathogenicity interacting with laminin and fibronectin. At the time of writing this document, tests are carried out to determine whether A4 or D4 inhibits TvTIM moonlight functions [29] at Dr. Rossana Arroyo Verastegui's Laboratory.

C) A third option, in which A4 or D4 interact with the TvTIM found on the outer surface of the membrane, which generates a change in the membrane, which in turn facilitates the penetration of some of the compounds A4 or D4 into the intracellular space and thus be able to interact with the TvTIM that it acts in the path of glycolysis and in this way also prevents the catalytic reaction, and as a consequence the interruption of glycolysis and therefore of the synthesis of ATP. This would represent a more lethal effect for the parasite. Of these three options for the mechanism of action, two of them indicate that A4 or D4 would be interacting with the TIM that is on the surface of the parasite. This has several advantages, a very important one is that A4 or D4 do not have to cross the membrane to carry out its function or interaction, it has been reported that when a molecule passes through a membrane, it can undergo some modifications in its structure or simply not it can cross membrane, and, therefore, not carry out its interaction with its target [30] [31] [32]. It should be mentioned that, at this moment, it is not possible to discard that A4 and D4 can also interact with other molecules of the cell surface, in addition to the triose phosphate isomerase. Thanks to this thesis work, the therapeutic efficacy of A4 and D4 was

confirmed. It was proved that A4 and D4 have a tricomonocida effect in 51 isolates from Mexican patients with *T. vaginalis* infection. This verification was necessary, because in previous works (Master's Thesis) the tricomonic effect had been tested only in two patient isolates (CNCD-147 and CNCD-188). Fertility tests were carried out on *in vitro* cultures of *T. vaginalis* from isolates collected in different health centers, from different states of the country. Although these isolates are not fully characterized, an inspection under the microscope allowed us to define that the isolates are different in their size, mobility, grouping and adhesion. These phenotypic characteristics in *T. vaginalis* have been associated with different degrees of pathogenicity and the expression of several genes, including proteases and [21] adhesins [21] [29]. It is also possible that such phenotypic changes may be associated with changes in drug resistance, so finding that A4 and D4 have a similar tricomonicidal effect on the 51 isolates represents a relevant finding in the definition of A4 and D4 as effective therapeutic alternatives. against *T. vaginalis*. By means of dose-effect curves it was possible to measure the doses of each compound to reach 50 % (IC₅₀) or 100 % (IC₁₀₀) of tricomonicidal effect in cultures of 20,000 parasites at 24 h, these values being: IC₅₀, A4 = 47 ± 2.8 µM, IC₅₀, D4 = 153 ± 12.03 µM; CI₁₀₀, A4 = 100 ± 5 µM; CI₁₀₀, D4 = 230 ± 18 µM. For comparative purposes, metronidazole presents IC₅₀, Metronidazole = 40 µM [20]. Therefore, the concentrations to achieve tricomonocida effect in 20,000 parasites of A4 and D4, are of the same orders of magnitude with respect to metronidazole. However, A4 and D4 have the advantage that they could be used (as already mentioned) A4 and D4 could be used topically intravaginally). A4 and D4 have a potential as a tricomonocide drug, when they are used in acceptable concentrations in the tests initial drug development [33] [34]. In the development of drugs, the aim is to reduce concentrations or improve them, since side effects or toxic effects could be caused by the use of any molecule or drug. Therefore, with the intention of decreasing the doses of A4 or D4 to achieve the same tricomonicidal effect, viability assays of the 51 parasite isolates were performed using different combinations of A4, D4 and metronidazole. It was observed that in any case the combination of A4 or D4 or both compounds with metronidazole improves the tricomonocide effect. Therefore, the combined use of metronidazole with A4 and D4 was ruled out as a therapeutic alternative. Different molar ratios (proportions of concentrations) of the combination were tested (A4 + D4). It was found that a 1: 3 molar ratio of A4 and D4 respectively has a synergistic effect, which allows us to decrease close to 75 % of the concentrations that are required when used

individually. So, with this, we only use 25 % of each one when we combine them to have the same tricomonic effect. The synergistic effect of the combination of (A4 + D4) was checked by standard techniques for the evaluation of the interaction of pharmacological compounds. In this way, the combination indices (CI) were calculated for 50, 75 and 90 % of tricomonicide effect. In all cases, the CI value between 0.53 and 0.63, which shows a synergistic effect for A4 and D4. Regarding the toxicity tests, it was determined that A4 and D4, as well as the combined formulation of (A4 + D4) do not have a toxicity that indicates that the evaluation of these drugs in the preclinical and clinical stage should be stopped. The results of the tests of cytotoxicity, mutagenicity, genotoxicity, as well as the LD₅₀, allow, until now that A4 and D4 have a high probability of being safe for use in humans. The results of this thesis represent an important advance in the development of new drugs against the infection by *Trichomonas vaginalis*. Two molecules with pharmacological chemical characteristics A4 and D4 and the combined formulation of (A4 + D4) are proposed. These have until now important differences and advantages with respect to metronidazole, the most important; a different mechanism of action, selective against the triose phosphate isomerase of *T. vaginalis*. These compounds have a potential use mainly against patients who do not show improvement in *T. vaginalis* infection with conventional treatments (metronidazole or derivatives), or for those who have many side effects or particularly sensitive to nitroimidazoles. So far, the toxicity tests of A4, D4 and the combination (A4 + D4) indicate that the compounds are safe, which represents another competitive advantage over metronidazole that has well-known side effects or mutagenic effects.

5 CONCLUDNG REMARKS

In this work different aspects of two new possible tricomonicidal drugs were analyzed: A4 and D4 and the combined formulation (A4 + D4). It was determined that:

- The tricomonicidal effect of A4 and D4 has been validated in a large number of isolates (51) of infected patients, with different phenotypic and morphological characteristics.
- A4 and D4 did not show mutagenic or genotoxic effects. They are not cytotoxic and the LD₅₀ values are 10 and 100 times higher than the therapeutic doses for D4 and A4, respectively.

- Three proposals for the mechanism of action:
 - o A4 and D4 are interacting with the intracellular TvTIM and altering the enzymatic activity of this, causing the lack of ability to generate ATPs
 - o A4 and D4 are interacting with the TvTIM that is on the outer surface of the membrane and that alters the other function that could be carrying out this TIM, probably with the pathogenicity process interacting with laminin and fibronectin
 - o A4 and D4 are interacting with the TIM that is on the outer surface of the membrane and this makes it easier for A4 or D4 to enter the intracellular space and thus be able to interact with the TIM that acts in the path of glycolysis and of this handle blocking this pathway and therefore not generating ATPs.
- A synergistic effect of A4 and D4 (A4 + D4) was observed in combined formulations. This result is important because the therapeutic doses can be reduced up to 25 % of D4 and A4 of the original doses. Metronidazole does not improve the therapeutic effect of A4 and D4, probably because its mechanisms of action are very different.
- The A4 + D4 combination has a high probability of being safe inside the human body, since it did not show mutagenic or cytotoxic effects.
- Possible chemical derivatives of each one, A4 and D4, that could probably improve the interaction with TvTIM and therefore the therapeutic efficacy.

Tables

Table 1. Theoretical and experimentally determined masses (MALDI-TOF) of A4, D4, TvTIM1, TvTIM1-A4 and TvTIM1-D4 and stoichiometric ratios of TvTIM1-A4 and TvTIM1-D4.

Species	Theoretical mass (Da)	Mass determined by MALDI-TOF (Da)	Stoichiometric ratio (TvTIM monomer: ligand)
TvTIM1	27472	27,889	--
A4	498	--	--
D4	449	--	--
TvTIM1-A4		28,238	1:1
TvTIM1-D4		28,857	1:2

Table 2. Concentrations required for 50% tricomocidal effect (IC₅₀) and 100% (CI₁₀₀) of cultures of 20,000 *T. vaginalis* parasites at 24 h. *Data reported at (20).

Compound	CI₅₀ (μM)	CI₁₀₀ (μM)
A4	47 ± 2.8	100 ± 5
D4	153 ± 12.03	230 ± 18
Metronidazole	40*	90*

Table 3. Evaluated concentrations of A4 and D4 to determine the possible synergic effect in their tricomonicidal action. * The values of the column corresponding to 1X, are considered the initial reference and are defined from the IC50 value for each compound A4 and D4.

Rate	0.06X	0.12 X	0.25X	0.5X	1X*	2X
Compound	Concentración (µM)					
A4	2.9	5.9	11.75	23.5	47	94
D4	9.5	19.1	38.25	76.5	153	306
Total concentration	12.5	25	50	100	200	400

Table 4. Concentrations required for 50% tricomonicidal effect (IC50) of cultures of 20,000 parasites of T. vaginalis at 24 h. of the combination (A4 + D4)

Compound	CI ₅₀ (µM)
(A4 + D4)	48 ± 2.6 = A4 (12 µM) + D4 (36 µM)
Metronidazole	40

Table 5. Combination index of (A4 + D4) for different percentages of trichomonicide effect. * Combination index at 50, 75 and 90%. ** The classification is based on the classification of Chou -Talaly [50].

% Trichomonicide effect	Combination index*	Effect (A4 + D4)**
90	0.530	Sinergy
75	0.565	Sinergy
50	0.630	Sinergy

Table 6. Weight of CD-1 mice (g).

	Day1		Day 14		Weight gained to day 14	
	Control	A4	Control	A4	Control	A4
Weight	22.3 ± 1.8	19.3 ± 0.9	35.7 ± 1.5	30.1 ± 0.7	13.3 ± 0.3	11.3 ± 0.3

The values are expressed as mean ± Standard Error of 3 animals per group. One-way variance analysis (ANOVA) followed by a Bonferroni post hoc test. The GraphPad Prism 5.0 software was used to perform the statistical analysis. Control: Animals administered with DMSO (100 µl).

Table 7. Weight of CD-1 mice (g).

	Day1		Day 14		Weight gained to day 14	
	Control	D4	Control	D4	Control	D4
Peso	22.3 ± 1.8	21.3 ± 1.9	35.7 ± 1.5	35.7 ± 2.3	13.3 ± 0.3	14.3 ± 0.7

The values are expressed as mean ± Standard Error of 3 animals per group. One-way variance analysis (ANOVA) followed by a Bonferroni post hoc test. The GraphPad Prism 5.0 software was used to perform the statistical analysis. Control: Animals administered with DMSO (100 µl).

Figure legends

Figure 1. Mass spectra (MALDI-TOF) of: a) isolated TvTIM1, b) TvTIM1-A4 complex, c) TvTIM1-D4 complex

Figure 2. Average percentage of viability of *T. vaginalis* cultures in the presence of variable concentrations of a) A4 and b) D4. The error bars represent a standard deviation.

Figure 3. Average evolution over time of the tricomonicidal effect of A4, D4 and metronidazole in cultures of 20,000 of the 51 isolates of *T. vaginalis* parasites. The bars indicate a standard deviation. The negative control corresponds to the vehicle (DMSO 1%)

Figure 4. Average evolution over time of the tricomonicidal effect of the combination (A4 + D4) and metronidazole in cultures of 20,000 parasites of 51 isolates. For comparative purposes, the vehicle y (DMSO 1%) and metronidazole ($CI_{100} = 90 \mu\text{M}$) are shown as negative and positive controls respectively. The bars indicate a standard deviation

Figure 5. Average viability percentage of cultures of 20,000 parasites of 51 *T. vaginalis* isolates at 24 h. in the presence of different concentrations of the combination (A4 + D4) (ratio 1: 3). For comparative purposes, data on the viability percentage of the negative control (vehicle, DMSO 1%, positive control (metronidazole) and individual compounds A4 and D4 are presented. In this case, both metronidazole and A4 and D4 were used. in concentrations corresponding to their IC_{50} (reported in the literature for metronidazole [52].) Error bars represent one standard deviation.

Figure 6. Results of the Ames test for compounds A4 and D4. The red line indicates the maximum number of colonies to consider that there is no mutagenic effect. It can be seen that the number of revertant colonies for each compound is below the maximum to consider mutagenic potential. Negative and positive controls are also shown.

Figure 7. Results of the Ames test for the combination (A4 + D4). The red line indicates the maximum number of colonies to consider that there is no mutagenic effect. It can be seen that the number of revertant colonies for (A4

+ D4), under the conditions evaluated, is below the limit of mutagenic potential. Negative and positive controls are also shown.

Figure 8. Micronucleus test. Percentage of reticulocytes (% RET), percentage of micronucleated reticulocytes (percentage of MN-RET) and percentage of micronucleated normochromatic erythrocytes (MN-NCE%) after 48 hours of treatment. CP (cyclophosphamide 1 g / kg); DMSO (dimethylsulfoxide, 1%); A4 (compound A4 1 g / kg concentration); D4 (compound D4 1 g / kg). * $P \leq 0.05$ difference statistically significant compared to the negative control (DMSO). Analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's post hoc test

Figure 9. Percentage of cytotoxicity. Results of HeLa cells, incubated for 48 h with: a) A4, b) D4 and c) the combination (A4 + D4)

Figure 1

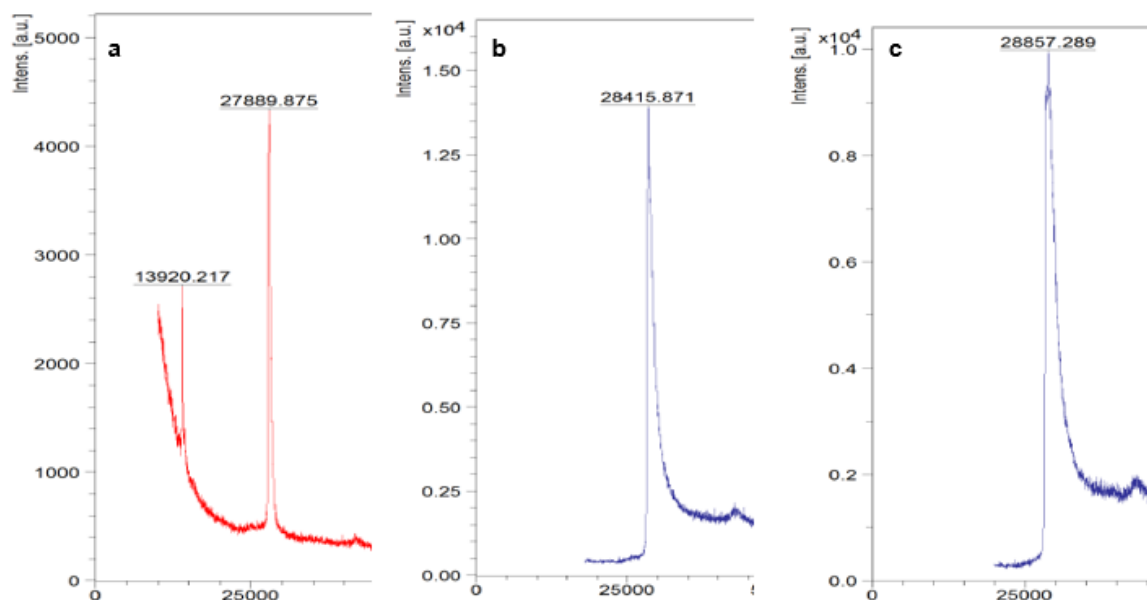


Figure 2

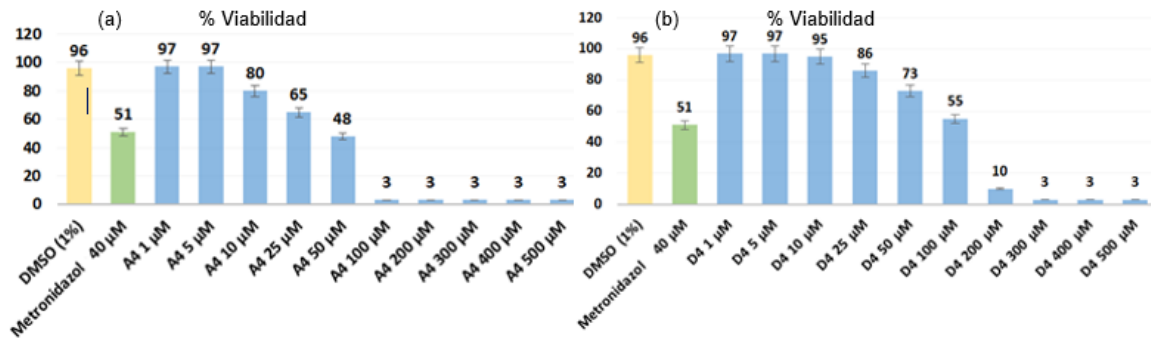


Figure 3

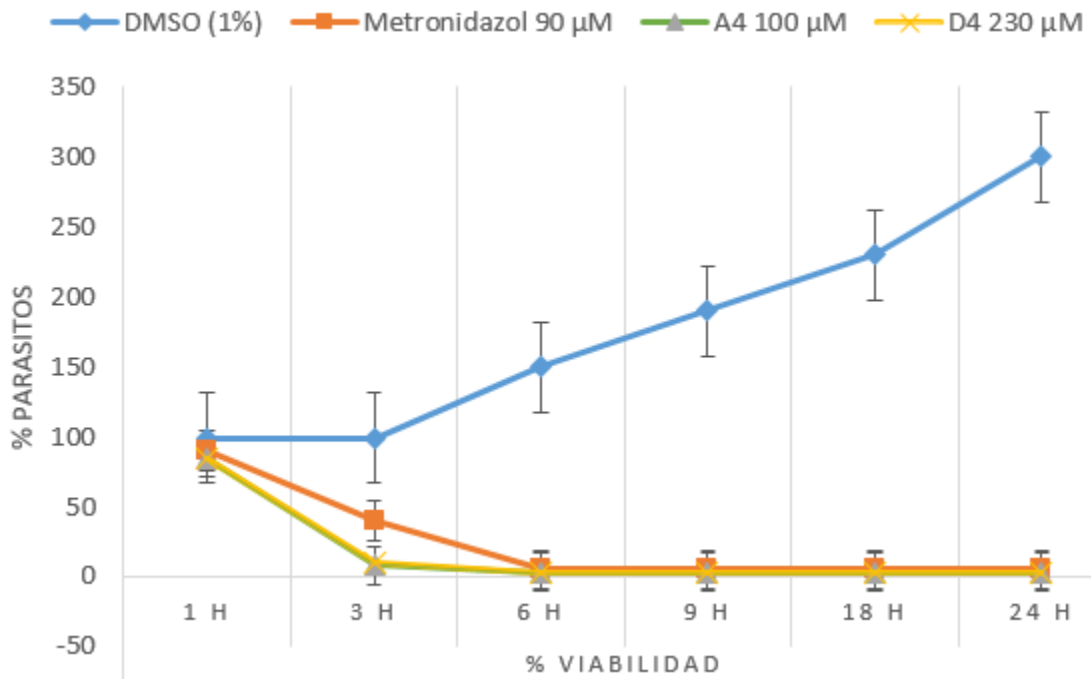


Figure 4

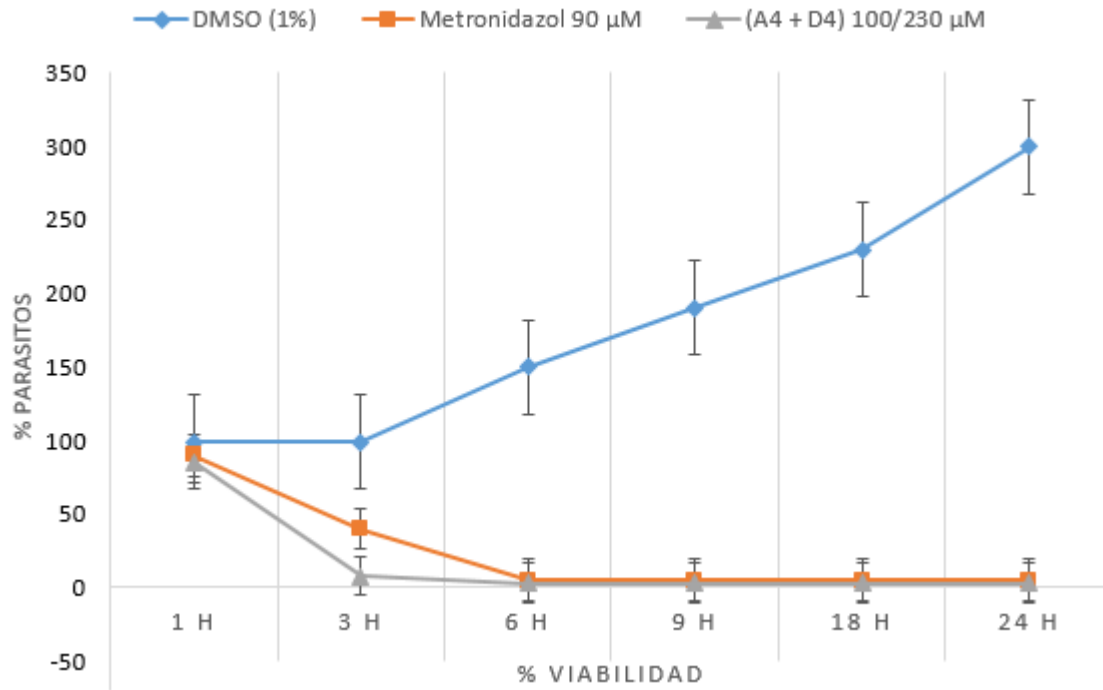


Figure 5

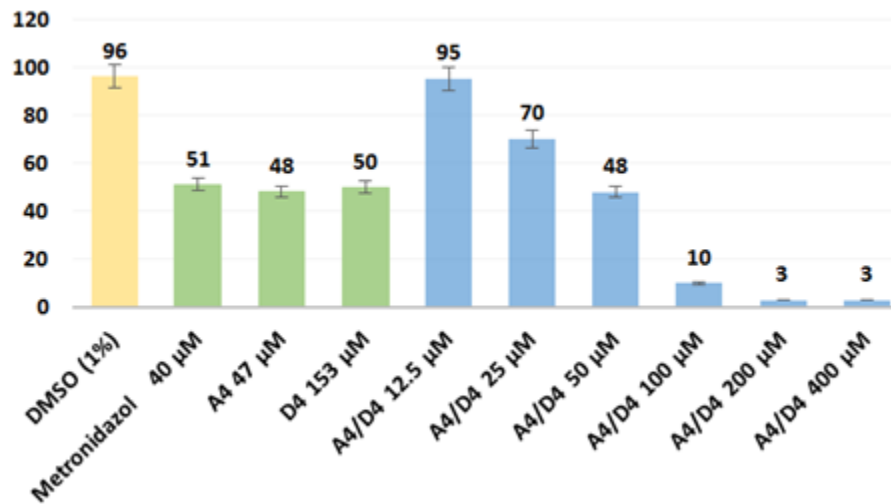


Figure 6

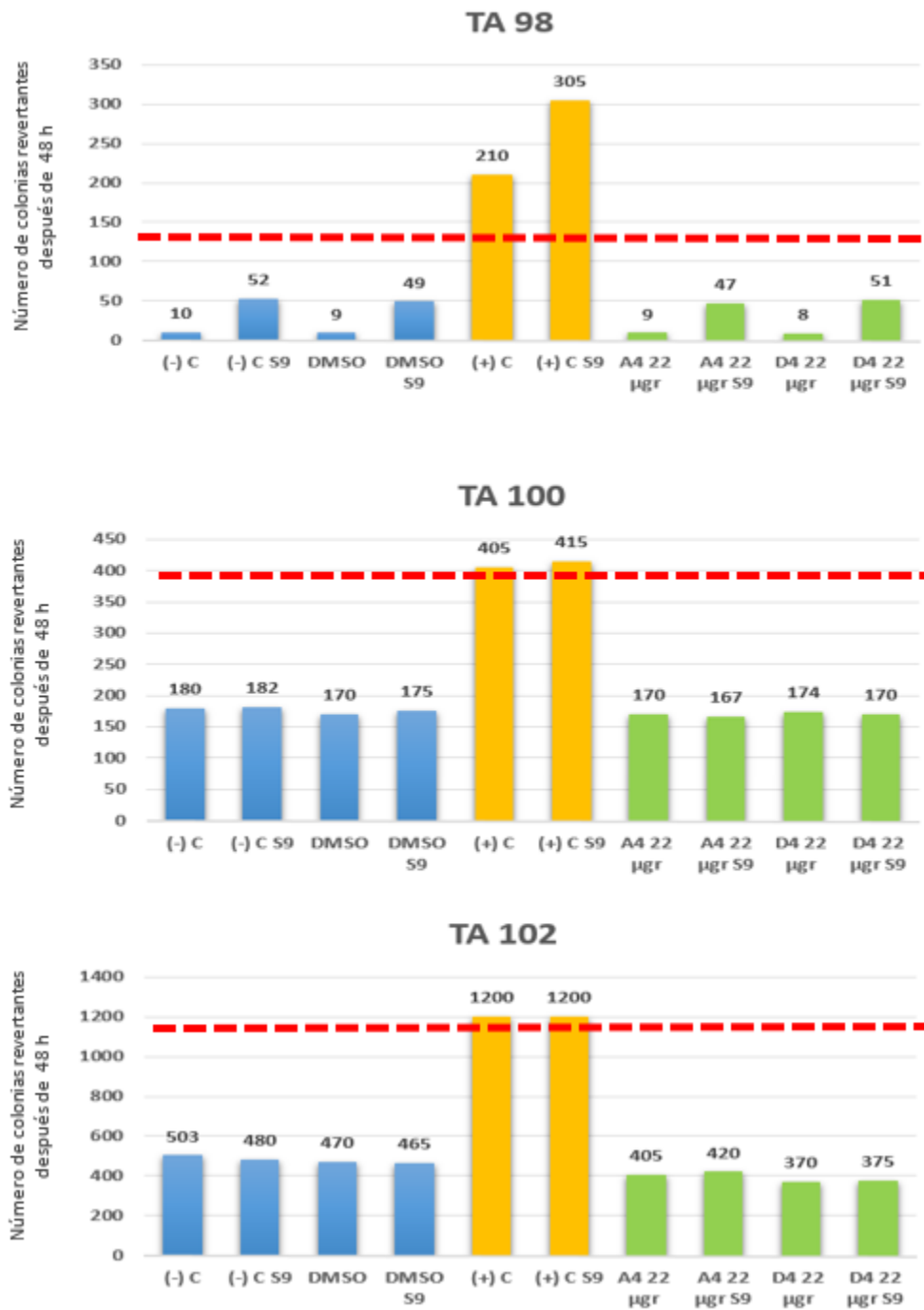


Figure 7

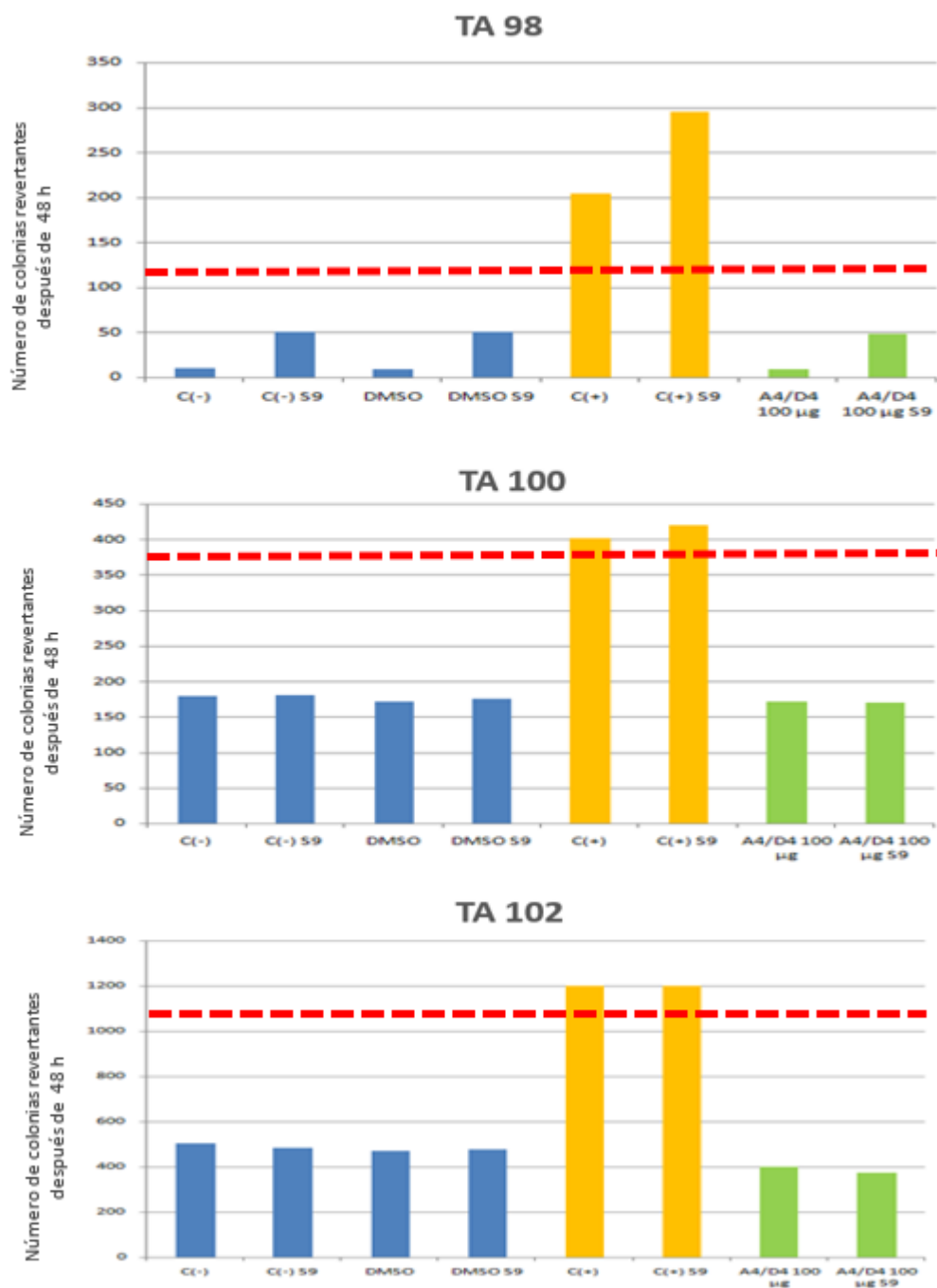


Figure 8

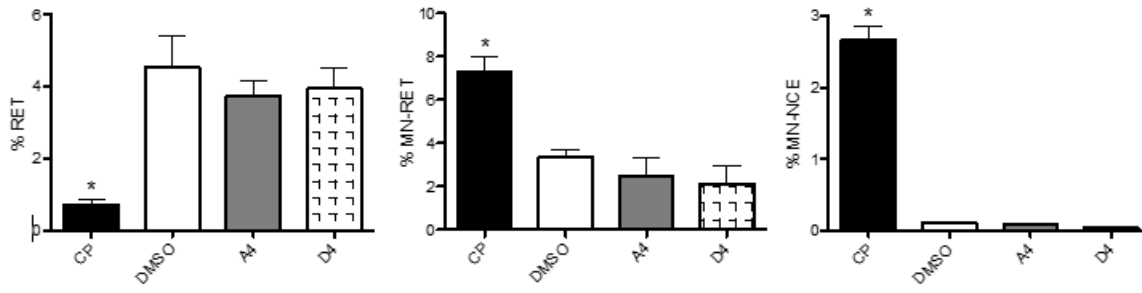
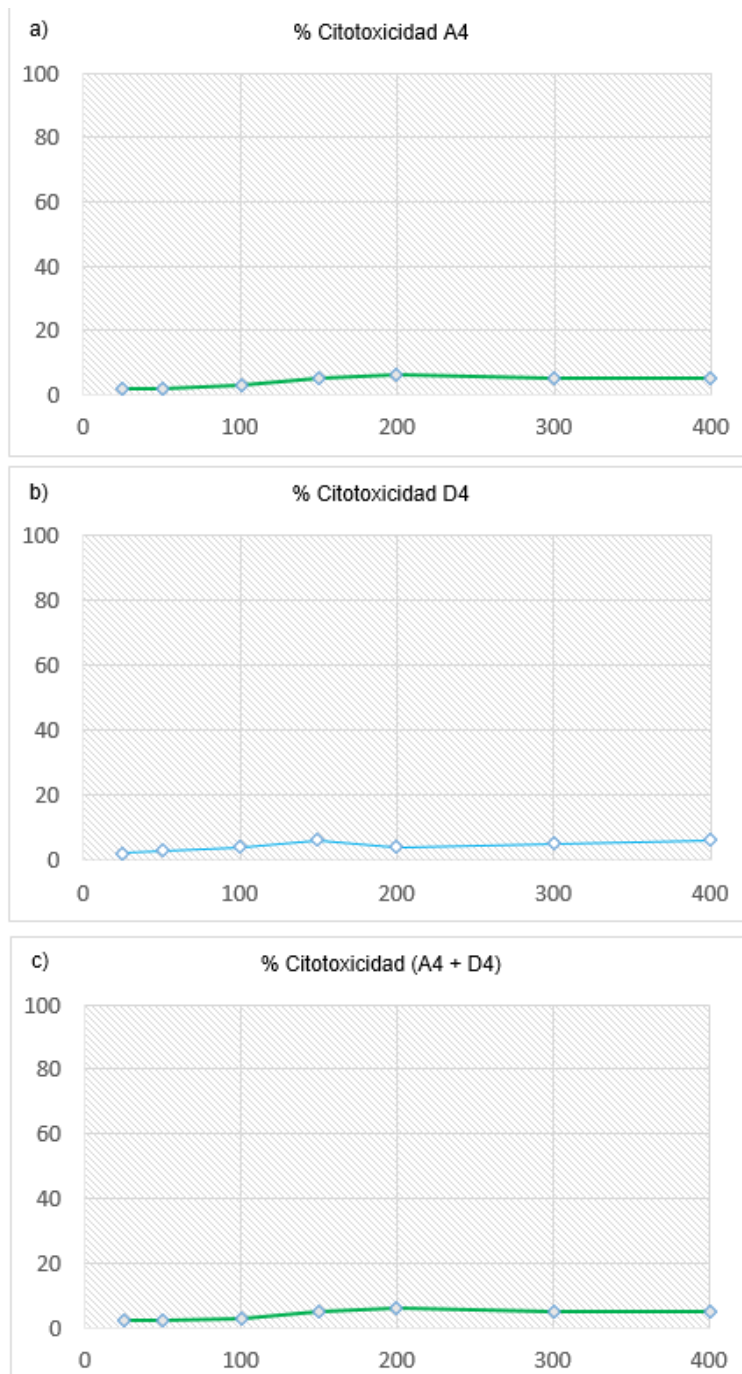


Figure 9



References

- [1] M. W. Leherker and J. F. Alderete, "Biology of trichomonosis," *Curr. Opin. Infect. Dis.*, vol. 13, no. 1, pp. 37–45, Feb. 2000.
- [2] R. P. Hirt and J. Sherrard, "Trichomonas vaginalis origins, molecular pathobiology and clinical considerations," *Curr. Opin. Infect. Dis.*, vol. 28, no. 1, pp. 72–79, Feb. 2015.
- [3] G. Kusdian and S. B. Gould, "The biology of Trichomonas vaginalis in the light of urogenital tract infection," *Mol. Biochem. Parasitol.*, vol. 198, no. 2, pp. 92–99, Dec. 2014.
- [4] "OMS-tricomonoasis." [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs110/es/>.
- [5] S. Mhlongo *et al.*, "Etiology and STI/HIV Coinfections Among Patients With Urethral and Vaginal Discharge Syndromes in South Africa," *Sex. Transm. Dis.*, vol. 37, no. 9, pp. 566–570, Sep. 2010.
- [6] R. D. Catterall, "Trichomonal infections of the genital tract.," *Med. Clin. North Am.*, vol. 56, no. 5, pp. 1203–9, Sep. 1972.
- [7] D. W. Cameron and N. S. Padian, "Sexual transmission of HIV and the epidemiology of other sexually transmitted diseases.," *AIDS*, vol. 4 Suppl 1, pp. S99-103, 1990.
- [8] M. Bradic *et al.*, "Genetic Indicators of Drug Resistance in the Highly Repetitive Genome of Trichomonas vaginalis," *Genome Biol. Evol.*, vol. 9, no. 6, pp. 1658–1672, Jun. 2017.
- [9] P. Nyirjesy, J. D. Sobel, M. V Weitz, D. J. Leaman, and S. P. Gelone, "Difficult-to-treat trichomoniasis: results with paromomycin cream.," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 26, no. 4, pp. 986–8, Apr. 1998.
- [10] K. A. Workowski, G. A. Bolan, and Centers for Disease Control and Prevention, "Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2015.," *MMWR. Recomm. reports Morb. Mortal. Wkly. report. Recomm. reports*, vol. 64, no. RR-03, pp. 1–137, Jun. 2015.
- [11] J. G. Lossick, "Epidemiology of Urogenital Trichomoniasis," in *Trichomonads Parasitic in Humans*, New York, NY: Springer New York, 1990, pp. 311–323.
- [12] S. Sutcliffe, C. Neace, N. S. Magnuson, R. Reeves, and J. F. Alderete, "Trichomonosis, a Common Curable STI, and Prostate Carcinogenesis—A Proposed Molecular Mechanism," *PLoS Pathog.*, vol. 8, no. 8, p. e1002801, Aug. 2012.
- [13] "SINAVE epidemiologia Trocomoniasisen Mexico." [Online]. Available: <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/261953/sem39.pdf>.
- [14] "Información Epidemiológica de Morbilidad 2011." [Online]. Available: gob.mx/suive/dge.
- [15] I. Robert J. Borgman, Mundelein, "INTRAVAGINAL TREATMENT OF WAGINAL INFECTIONS WITH BUFFERED METRONIDAZOLE COMPOSITIONS," US005536743A.
- [16] F. Vázquez, M. José García, F. Pérez, and V. Palacio, "Trichomonas vaginalis: tratamiento y resistencia a nitroimidazoles," *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, vol. 19, pp. 114–124, 2001.
- [17] L. Rojas R., I. Sariago R., C. Sarría P., and J. Fraga N., "Comportamiento 'in vivo' de aislamientos de Trichomonas vaginalis, utilizando ratones NMRI como modelo experimental," *Rev. chil. infectol.*, vol. 21,

no. 3, pp. 179–185, 2004.

- [18] M. Ronci *et al.*, “Protein unlocking procedures of formalin-fixed paraffin-embedded tissues: Application to MALDI-TOF Imaging MS investigations,” *Proteomics*, vol. 8, no. 18, pp. 3702–3714, Sep. 2008.
- [19] J. Albrethsen, “Reproducibility in Protein Profiling by MALDI-TOF Mass Spectrometry,” *Clin. Chem.*, vol. 53, no. 5, pp. 852–858, Mar. 2007.
- [20] I. Idalia Sariego Ramos and I. J. F. N. Lázara Rojas Rivero, “Estudio de la susceptibilidad al metronidazol en aislamientos cubanos de *Trichomonas vaginalis*,” *Rev. Cuba. Obstet. y Ginecol.*, p. 37(2):271-276, 2011.
- [21] E. E. FIGUEROA-ANGULO *et al.*, “Cellular and biochemical characterization of two closely related triosephosphate isomerases from *Trichomonas vaginalis*,” *Parasitology*, vol. 139, no. 13, pp. 1729–1738, Nov. 2012.
- [22] J. N. Krieger, C. S. Dickins, and M. F. Rein, “Use of a time-kill technique for susceptibility testing of *Trichomonas vaginalis*,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 27, no. 3, pp. 332–336, 1985.
- [23] S. Mansilla Barrado, “Análisis de la expresión génica y de los mecanismos de muerte celular inducidos por la bisantraciclina WP631 en células tumorales humanas,” 2005.
- [24] D. M. Maron and B. N. Ames, “Revised methods for the Salmonella mutagenicity test.,” *Mutat. Res.*, vol. 113, no. 3–4, pp. 173–215, May 1983.
- [25] W. Schmid, “The micronucleus test.,” *Mutat. Res.*, vol. 31, no. 1, pp. 9–15, Feb. 1975
- [26] S. Díaz Barriga Arceo, E. Madrigal-Bujaidar, E. Calderón Montellano, L. Ramírez Herrera, and B. D. Díaz García, “Genotoxic effects produced by capsaicin in mouse during subchronic treatment.,” *Mutat. Res.*, vol. 345, no. 3–4, pp. 105–9, Dec. 1995.
- [27] T. Mosmann, “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.,” *J. Immunol. Methods*, vol. 65, no. 1–2, pp. 55–63, Dec. 1983.
- [28] I. S. Diéguez, “Tricomoniasis: una visión amplia,” *IATREIA*, vol. Vol 27(2):, 2014.
- [29] J. F. T. Miranda-Ozuna *et al.*, “The Glycolytic Enzyme Triosephosphate Isomerase of *Trichomonas vaginalis* Is a Surface-Associated Protein Induced by Glucose That Functions as a Laminin- and Fibronectin-Binding Protein,” *Infect. Immun.*, vol. 84, no. 10, pp. 2878–2894, Oct. 2016.
- [30] V. Sanabria-Ayala, I. Belmont, and L. Abraham, “Triosephosphate isomerase of *Taenia solium* (TTPi): phage display and antibodies as tools for finding target regions to inhibit catalytic activity,” *Parasitol. Res.*, vol. 114, no. 1, pp. 55–64, Jan. 2015.
- [31] M. Couto *et al.*, “3-H-[1,2]Dithiole as a New Anti-Trypanosoma cruzi Chemotype: Biological and Mechanism of Action Studies,” *Molecules*, vol. 20, no. 8, pp. 14595–14610, Aug. 2015.
- [32] G. Álvarez *et al.*, “Development of bis-thiazoles as inhibitors of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. Identification of new non-mutagenic agents that are active in vivo,” *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 100, pp. 246–256, Jul. 2015.
- [32] S.-A. Víctor, M.-F. Yolanda, Z.-C. Araceli, J. Lucía, and L. Abraham, “Characterization of a monoclonal antibody that specifically inhibits triosephosphate isomerase activity of *Taenia solium*,” *Exp. Parasitol.*, vol.

134, no. 4, pp. 495–503, Aug. 2013.

[33] L. Kluwe, “Assessing Specificity of Anticancer Drugs In Vitro,” *J. Vis. Exp.*, no. 109, Mar. 2016.

[34] G. Riva *et al.*, “In vitro anticancer drug test: A new method emerges from the model of glioma stem cells,” *Toxicol. Reports*, vol. 1, pp. 188–199, 2014.

To be submitted to BBA Proteins and Proteomics

Selective Inhibition of triosephosphate isomerase from different organisms by non-conserved amino acids

Vigue-Sánchez J.L.*, Caro-Gómez L.A.* , Romero-Romero S.+ , Fernandez-Velasco D.A.+ and Benítez-Cardoza C.G.*

Abstract

Triosephosphate isomerase (TIM) is an enzyme that catalyzes the reversible interconversion of the triosephosphate isomers dihydroxyacetone phosphate and D-glyceraldehyde 3-phosphate. The structure of TIM is more conserved than its sequence, as it has been observed for most proteins. The variation of the sequences of TIM ranges from 38 to 54 % among species; whereas the scaffold is almost identical in all known structures.

TIM has been proposed as a therapeutic target for drugs against a variety of pathogenic organisms. Here we used sequences and structural information to search for specific inhibitors of TIM from different biological species by means of molecular docking. We found eight compounds that selectively inhibit the enzymatic activity of at least the TIM of one species, and in some cases two or more, but not all of them. This indicates that inhibitors interact with non-conserved regions of TIM. This information is highly relevant in rational drug design.

The enzymes tested were: DrTIM: *Deinococcus radiodurans*, NpTIM: *Nostoc punctiforme*, ScTIM: *Streptomyces coelicolor*, CpTIM: *Clostridium perfringens*, MmTIM: *Moritella marina*, TtTIM: *Thermus thermophiles*, BtTIM: *Burkholderia thailandensis*, BmTIM: *Brucella melitensis* and TvTIM: *Trichomonas vaginalis*.

Materials and methods

***In silico* experiments.**

Preparation of receptor protein and definition of potential binding sites.

The X-ray structures of TvTIM, DrTIM, ScTIM, BtTIM, TtTIM, NpTIM and CpTIM were got from the Protein Data Bank (PDB codes 3QSR, 4Y90, 4Y9A, 4G1K, 1YYA, NpTIMxxx and 4Y8F, respectively) and were used as protein targets for docking procedures. The protonation and energy minimization of each PDB file was performed using Molecular Operating Environment (MOE) software with the default parameters, the Force Field used was CHARM27 [70] [45] [71]. Potential binding sites were determined using Site Finder implemented in MOE [72] [73] [47].

To determine NpTIM PDB

Molecular docking.

We used nine compounds (7129416, 9091792, 7123892, 5786003, 7958718, 7154972, 5728433, 9094779, 7178993) from the Express-pack Collection Stock of the small molecule screening library Chembridge [74] than previously we determined. We had used a High-throughput virtual molecular docking [75] [76] by means of the software MOE. It is worth to mention that compounds at Chembridge database fulfill druggable properties of Lipinski's 'Rules [77] [78]. The compounds were specifically docked on the binding sites determined by the Site finder of each protein. The calculated interactions between compounds with highest scores and each protein were visualized with Ligand interactions implemented in MOE.

Calculations of the binding affinity energy (ΔG).

The binding affinity of each complex (Ligand-protein) was calculated, from the ratio non-bonded interaction energies / Volume integral contained solvent scheme [79] also using MOE. The non-bonded interaction energies between the ligand and protein molecule involve Coulomb electrostatic interactions, Van der Waals, and implied solvent interaction energies. The protein atoms remained rigid, while the ligand atoms were released to move.

Two criteria were considered to select the top poses; binding affinity energy and frequency. Since each compound was tested in 30 different conformations and two binding sites.

***In vitro* experiments.**

We tested 41 potential ligands for TvTIM, they were purchased from Chembridge [74]. Purity reported by the manufacturer was greater than 95% checked by LC/MS. Stock solutions (10 mM) of each compound were prepared in DMSO, with similar aliquots of the pure solvent in blank experiments.

Expression and purification of TvTIM1, DrTIM, ScTIM, BtTIM, TtTIM, NpTIM and CpTIM.

TvTIM, DrTIM, ScTIM, BtTIM, TtTIM, NpTIM and CpTIM were obtained as described previously [40] xx. Proteins samples were extensively dialyzed against 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 100 mM NaCl (Tris Buffer) or 100 mM triethanolamine pH 7.4, 100 mM NaCl (TEA buffer), and stored at 4°C for no more than two weeks. All experiments were performed in one of this buffers as stated.

TIM enzymatic activity and inhibition assays.

Enzymatic activity was determined following the conversion of glyceraldehyde 3-phosphate (GAP) into dihydroxyacetone phosphate. The decrease in absorbance at 340 nm due to oxidation of NADH in a coupled enzyme assay was followed in UV-VIS Scinco S-3100. The reaction mixture (1 mL, pH 7.4) contained 100 mM triethanolamine, 10 mM EDTA, 0.2 mM NADH, 1 mM GAP, and 0.9 units of α -glycerol phosphate dehydrogenase. The reaction was initiated by addition of 5 ng/ml up to 50 ng/ml of the corresponding TIM. The average specific activity of TvTIM1 DrTIM, ScTIM, BtTIM, TtTIM, NpTIM and CpTIM with 1 mM GAP as substrate was considered to calculate 100 % of activity. All assays were done in independent triplicates, and the average error for each measurement did not exceed 10 %. To test the effect of 41 potential ligands on the enzymatic activity of TvTIM, DrTIM, ScTIM, BtTIM, TtTIM, NpTIM and CpTIM, each protein was preincubated for 2 h at 25°C with the potential ligands, at concentrations between 50 and 200 μ M in 1% DMSO [80] [32] [81] [82] [83] [42] before activity assays.

Results

Conclusions

Table 1. Chemical structure of Chembridge compounds identified by virtual screening (Docking).

Table 2. Main residues of TIMs that are interacting with compounds.

Figure Legends

Figure 1. Sequence alignment of TIM's from different organisms

Figure 2. a) Percentage of Identity and b) RMSD among TIM from different species

Figure 3. Superimposed of ribbon structures of triosephosphate isomerase (TIM) from five different organisms.

Figure 4. a) Result of TIM enzymatic activity inhibition after 2 h of incubation with nine compounds and b) Molecular docking of C4 with TvTIM (Glu37, Lys121, Arg206).

Figure 5. Docking's results. We show the main interactions between compounds and TIMs

Table 1. Chemical structure of Chembridge compounds identified by virtual screening (Docking)

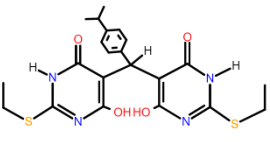
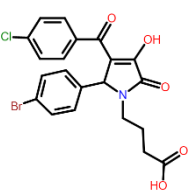
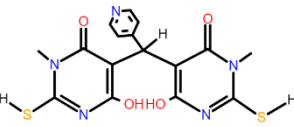
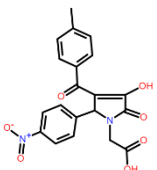
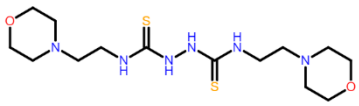
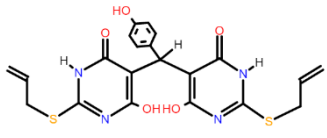
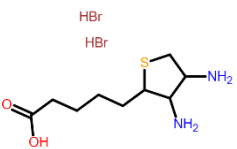
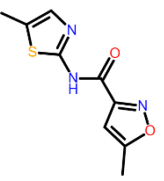
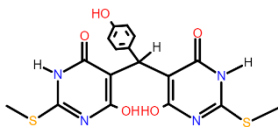
Identification	Structure	Molecular Mass	Log P
A5	$C_{22} H_{26} N_4 O_4 S_2$ 	475	4.16
B2	$C_9 H_9 N_3 O_2 S$ 	223	1.2
B3	$C_{16} H_{15} N_5 O_4 S_2$ 	405	- .027
B4	$C_{20} H_{16} N_2 O_7$ 	396	3.44
C4	$C_{14} H_{28} N_6 O_2 S_2$ 	377	0.18
C7	$C_{21} H_{20} N_4 O_5 S_2$ 	473	2.55
D1	$C_9 H_{18} N_2 O_2 S \cdot 2 Br H$ 	380	0.62
D7	$C_9 H_9 N_3 O_2 S$ 	223	1.2
D8	$C_{17} H_{16} N_4 O_5 S_2$ 	420	1.01

Figure 1

```

              10          20          30          40          50          60
A2EGX9  ---MRTFFVGGNWKANPKTVEEAekliEMlNGAKVEGN--VEVVVAAPFI FLPTLQOKLR  55
Q9RJP5  ---MQTL LALNWKMNKTPTEARSWAEElTTKYAPAEG-VDLAVLAPALDL SALAANLPA  55
Q5SJR1  ---MRRVLVAGNWKMHKTPSEARVWFaELKRLLPPLQ--SEAAVLPAFPIL PVAKEVLA  54
Q9Z520  -MTTRTPLMAGNWKMNlNHLEAIaHVQKlAFALADKDYDAVEVAVLAPFTDLRSVQTLVD  59
Q8XKU1  GSHMRTPI IAGNWKMHYTI DEAVKLVEELKPLVKDAK---CEVVVCPTFVCLDAVKKAVE  57
B2JA20  ---MRKIV IAGNWKMFKTQaETQeFLQGF LPHLEETPQ-GREVI LCPPFTDLSVLSKTLH  56
Q2SZN7  MSKQRlKRVI GNWKMHGRlSGNQALLTEVAQGAQAVHD-NVAIGVCVPPFPYLAQAQAQLQ  59
          :   ***                :   ::

              70          80          90          100         110         120
A2EGX9  KD---WKVSAENVFTKPNGaFTGEVTVPMIKSFGIEWTI LGHSERRD ILKEDDEFLAAKA  112
Q9RJP5  G---IAFGGQDVSAHESGaYTGEI SAAMLKDAGASCVVVGHsERREYHDESdAXVAAKA  111
Q5SJR1  ET--QVGyGAQDVSAHKEGaYTGEVSARMLSDLGCRYAI VGHsERRRYHGETDALVAEKA  112
Q9Z520  GDKLKIKYGAQDI SAHDGGaYTGEI SGPMLAKLKCTYVAVGHsERRQYHAETDEIVNAKV  119
Q8XKU1  GT--NIKVGaQNMHFEEKGaFTGEI APRMLEAMNIDYVI IGHsERREYfNETDETCNKKV  115
B2JA20  GS--LIQLGAQNIHWEEFGaYTGEI SGPMLTESGVRFVI VGHsERRQYfGETDATVNLRL  114
Q2SZN7  GG--RVSWGSGQDVSAHEQGaYTGEVAAGMVAEFGAAYAI VGHsERRAYHGESNETVAAKA  117
          . . . . . : ** : ** : : * : . : * : * * * * * * : : :

              130         140         150         160         170         180
A2EGX9  KFALENGMKI IYCCGEHLsEREAGKASEFVSAQIEKMI PAI PAGKWDDVV IAYEP IWAIG  172
Q9RJP5  RQAQANGLLP IVCVGENLDVRErGEHVpQTLAQLRGSLEGGV---ADVvvAYEPVVAIG  167
Q5SJR1  KRLLEEGI TP ILCVGEPLeVREKGEAVPYTLRQLRGSLEGGVEPPGPEALV IAYEPVVAIG  172
Q9Z520  KAAYKHGLTP ILCVGEELDVREAGNHVEHTLAQVEGGLKDLAAEQAESVV IAYEPVVAIG  179
Q8XKU1  KAAFAHNLTP ILCcGETLEQRENGTTNDV IKAQITADLEGLTKEQAEKVV IAYEP IWAIG  175
B2JA20  RTAQRFG LTP ILCVGETKQORDAGETESLIALQLD---KGLVD IDQNNLV IAYEP IWAIG  171
Q2SZN7  RRALAAG LTP IVCVGETLAEREAGTTEQVVGAQLDAVLAVLSPDEAAR I VVAYEPVVAIG  177
          :   . : * * * * * : * : * : * : : : * : * * * * * : * * * * *

              190         200         210         220         230         240
A2EGX9  TGKVASTQDAQEMCKV IRDI LAAKVGAD IANKVR ILYGGSVKPNNCNELAACPDVDGFLV  232
Q9RJP5  TGKTATADDAEELAAA IRGALREQYg-ARAEGIRVLYGGSVKPENIAEICGKPNVNGALV  226
Q5SJR1  TGKNATPEDAEAMHQAI RKA LSERYGEAFASRVRI LYGGSVNPKNFADLLSMPNVDGGLV  232
Q9Z520  TGKVCGADDAQEVCAA IRGKLAELYSQELADKVRI QYGGSVKSGNVAEIMAKPDIDGALV  239
Q8XKU1  TGKTATSDQANET IAAIRAMVAEMFGQEVADKVRI QYGGSVKPNTIAEQMAKSDIDGALV  235
B2JA20  TGETCEAVEANRI IGLIRSQLSN-----PNVSI QYGGSVKPNNIDEIMAQPEIDGVLV  224
Q2SZN7  TGKSATAEQAAQVHAF LRGR LAAKG---AGHVSLLYGGSVKADNAAE LFGQPDIDGGLI  233
          ** : . . : * : : * : : : * * * * * : . . : . . : : * * :

              250         260
A2EGX9  GGASLEPG-FINIVNSNVHsk  252
Q9RJP5  GGASLKVPDVLGMLDALR---  244
Q5SJR1  GGASLELESFLALLRIAG---  250
Q9Z520  GGASLDSDEFVKIVRFRDQ--  258
Q8XKU1  GGASLVAADFAQIVNY-----  251
B2JA20  GGASLEPESFARIVNFHLV--  243
Q2SZN7  GGASLKSGDFLAI CRAAK---  251
          ***** . :

```

Figure 2

	1	2	3	4	5	6	7
1:TIM_Nostoc ...		41.2	41.8	36.0	44.1	39.7	46.6
2:1YYA.A	42.4		39.1	42.3	45.6	53.8	42.2
3:1AW1.A	44.0	40.0		40.1	39.8	40.1	43.4
4:4G1K.A	40.3	46.0	42.6		43.3	45.7	41.0
5:4Y9A.A	47.3	47.6	40.6	41.5		50.2	54.2
6:4Y90.A	40.3	53.2	38.7	41.5	47.5		41.4
7:4Y8F.A	48.1	42.4	42.6	37.9	52.1	42.1	

Figure 3

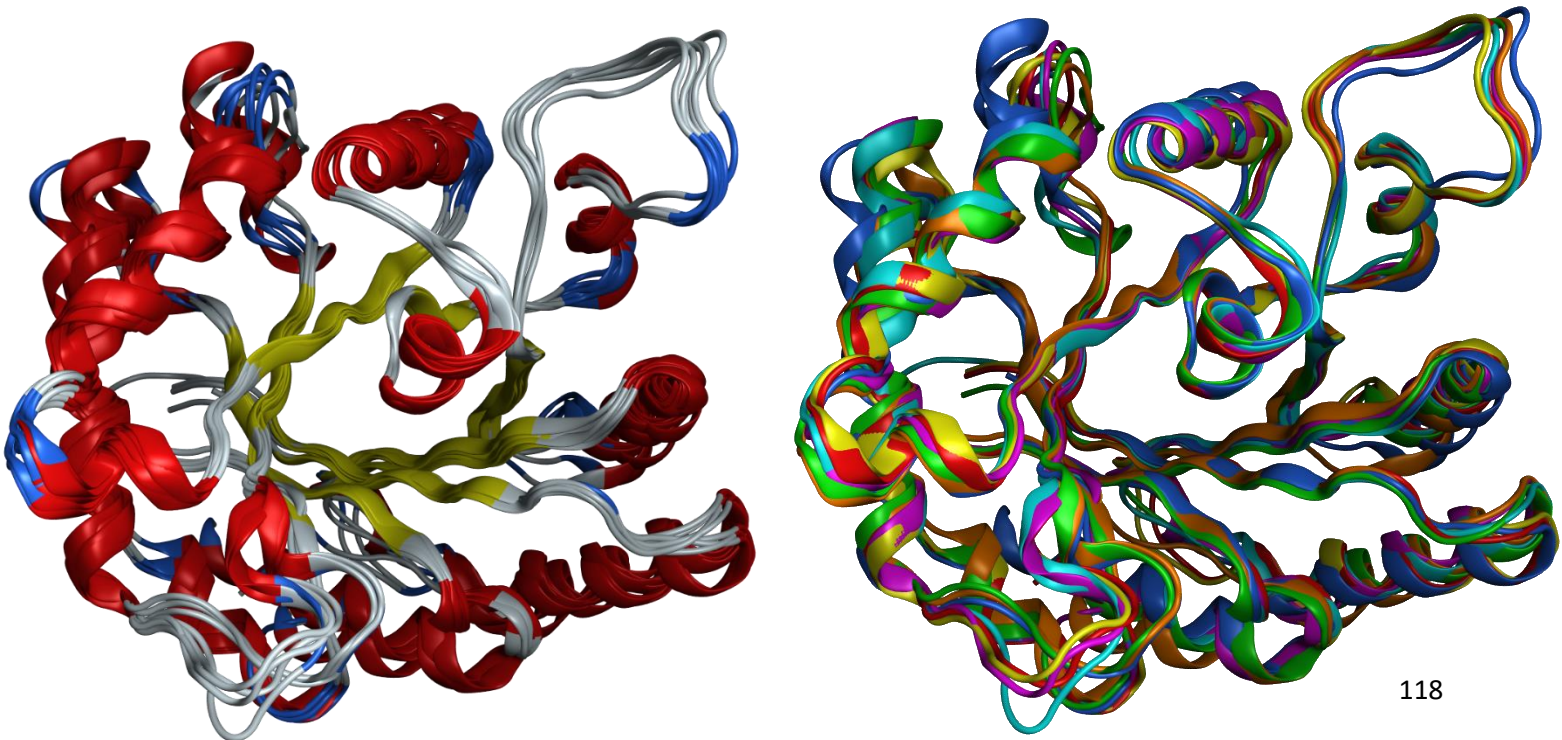


Figure 4

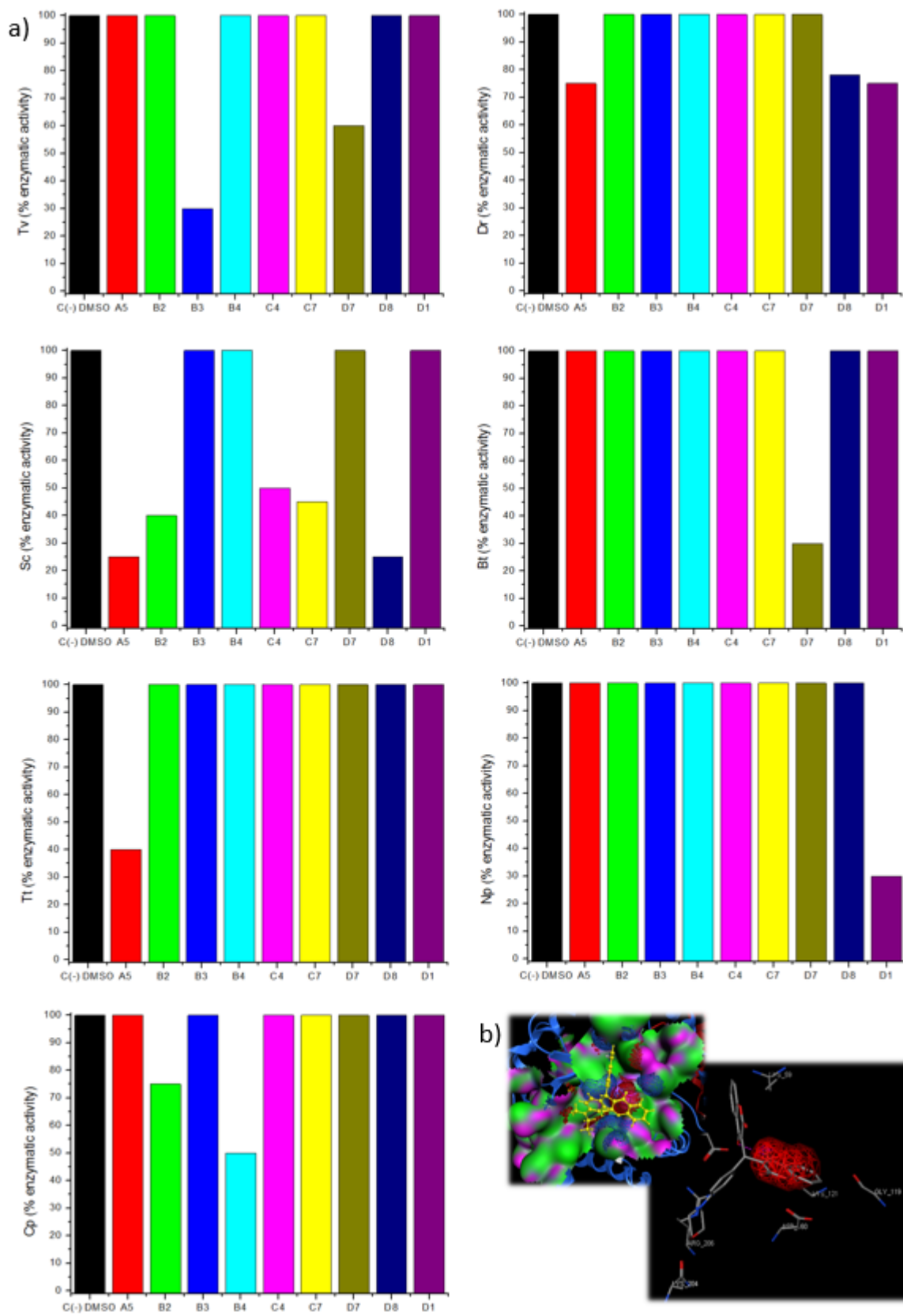
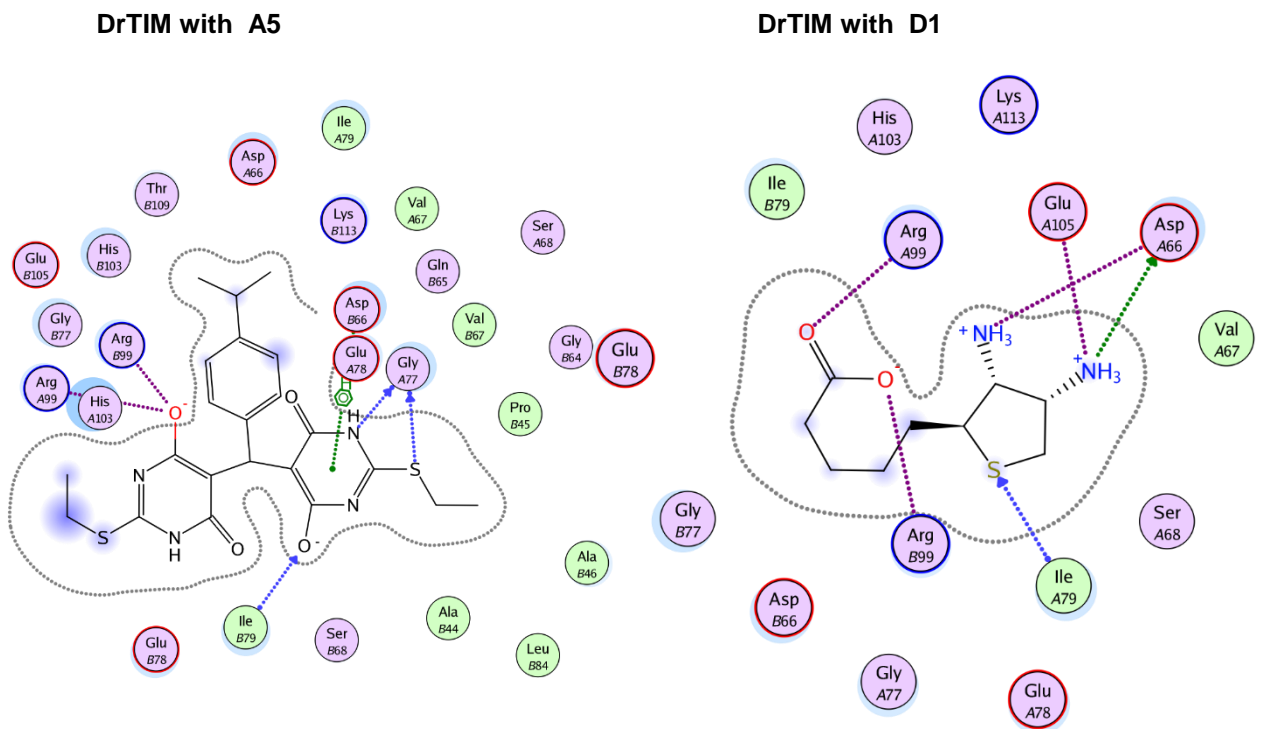
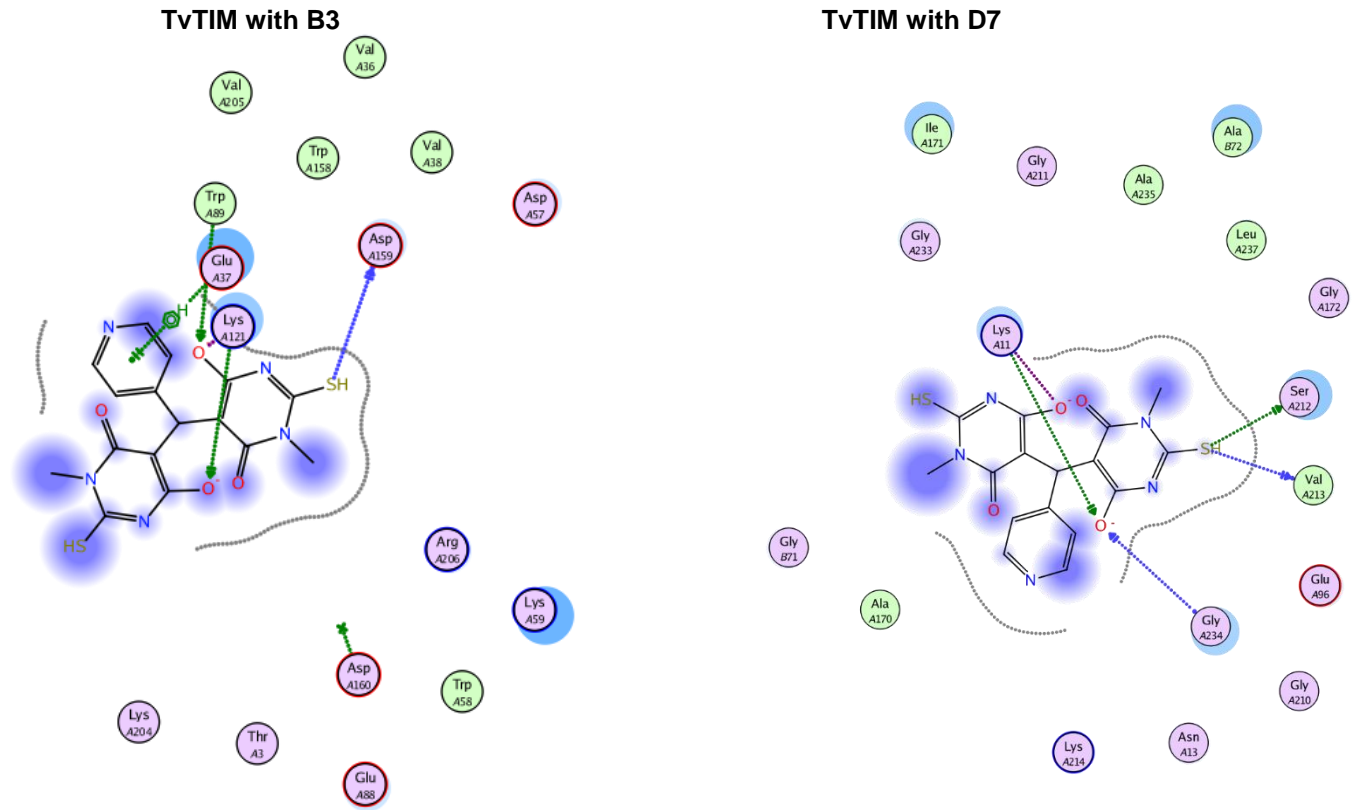
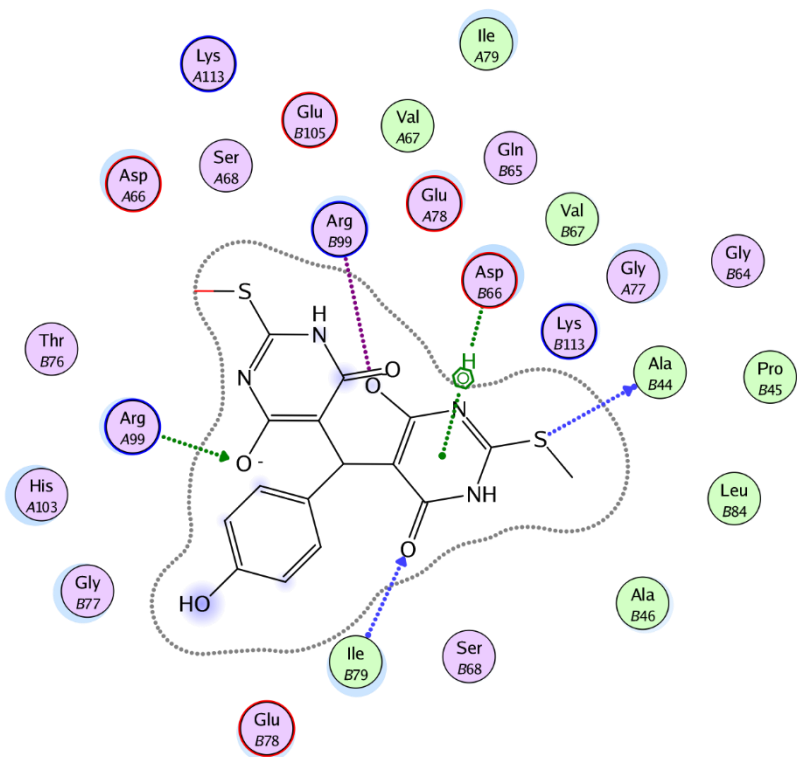


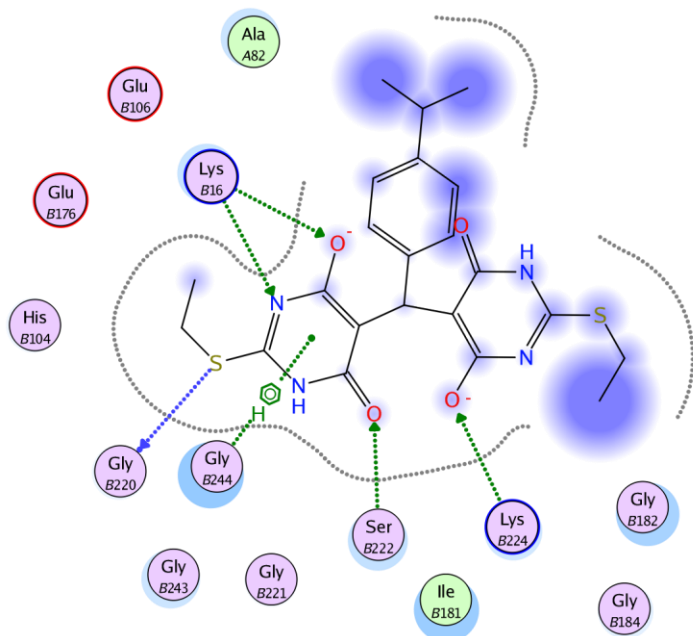
Figure 5



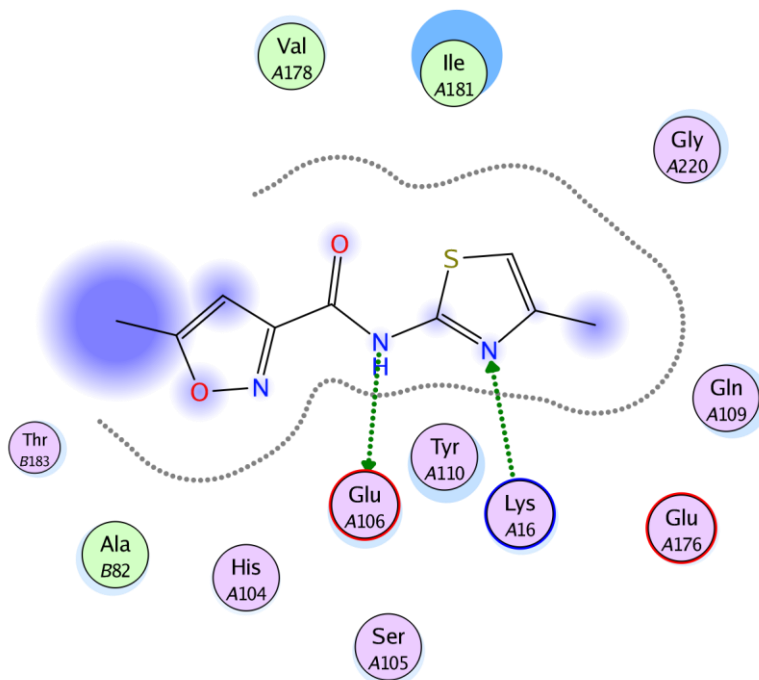
DrTIM with D8



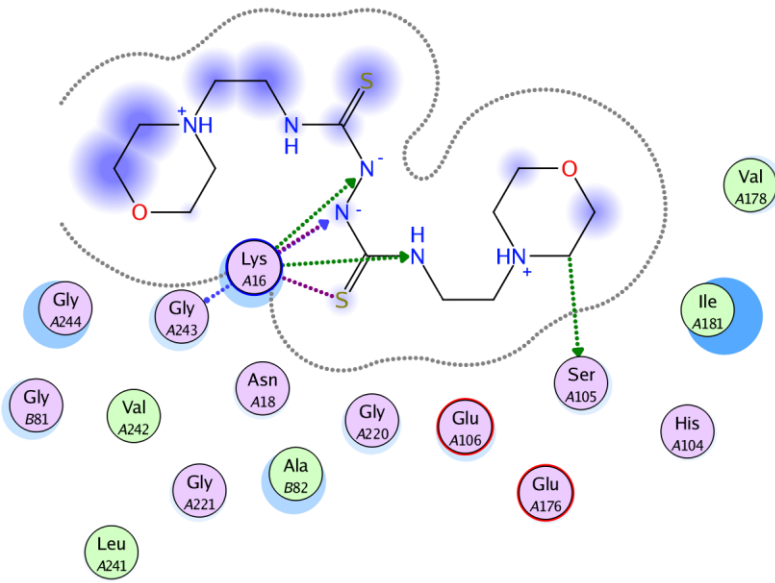
ScTIM with A5



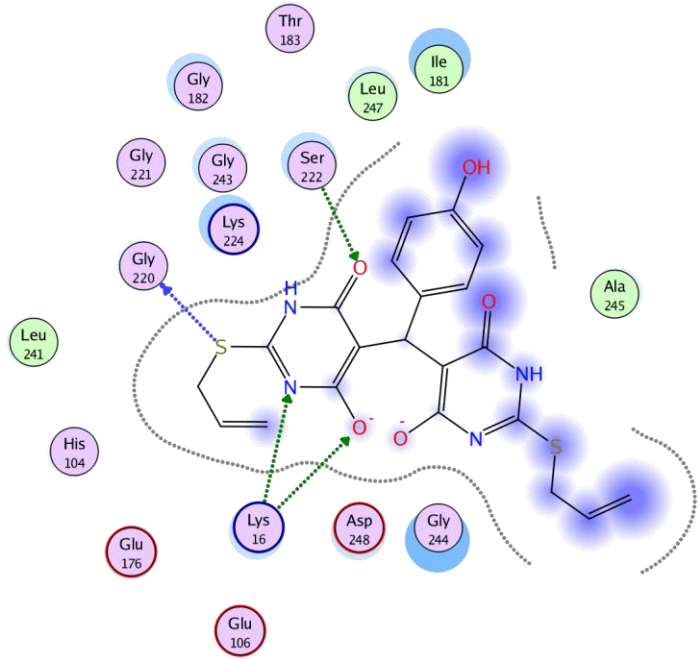
ScTIM with B2



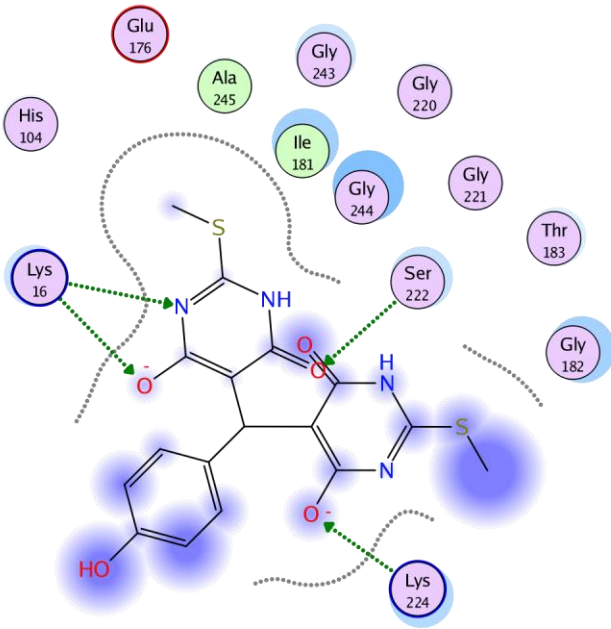
ScTIM with C4



ScTIM with C7

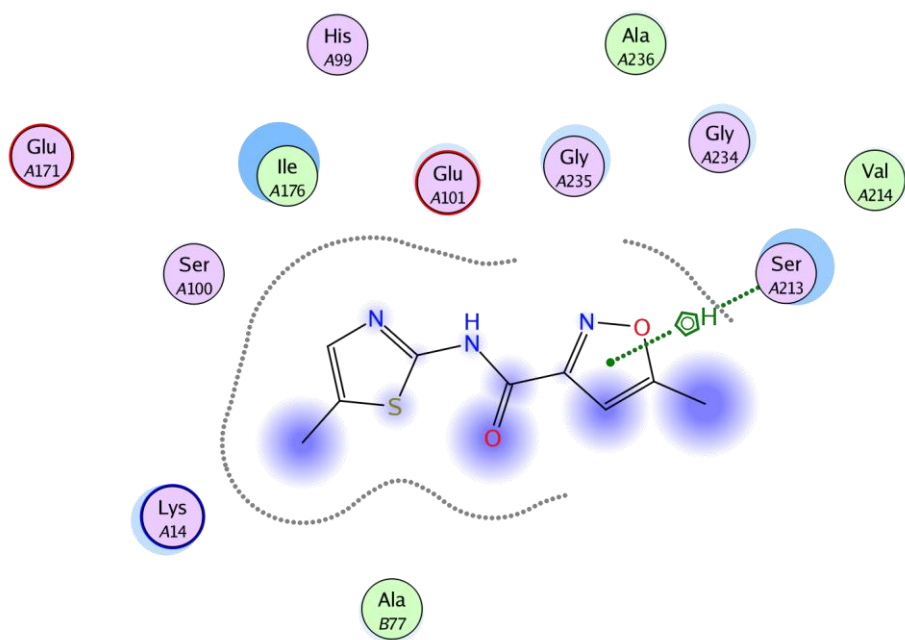


ScTIM with D8

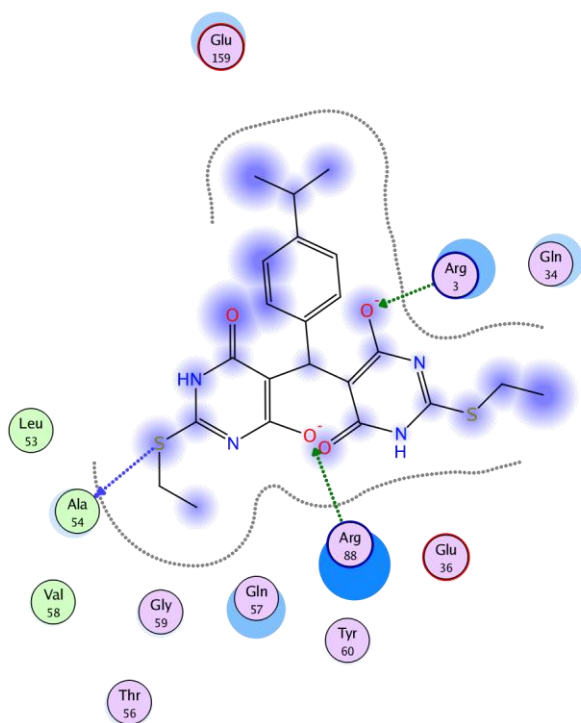


XX

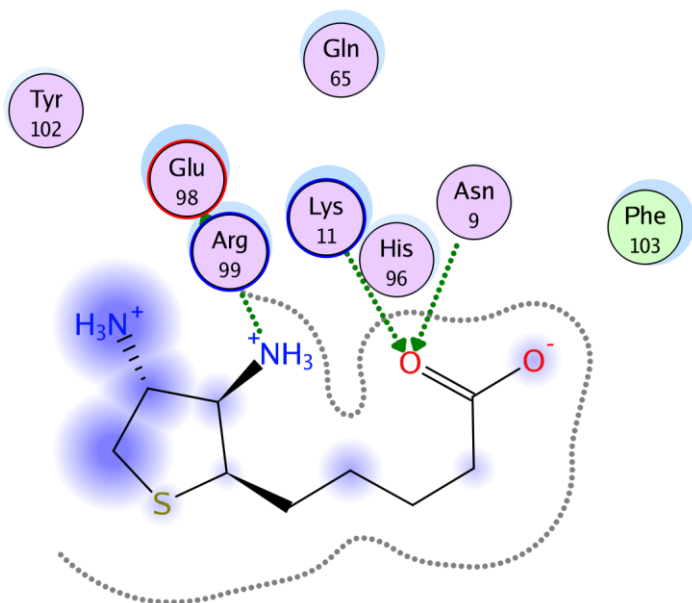
BtTIM with D7



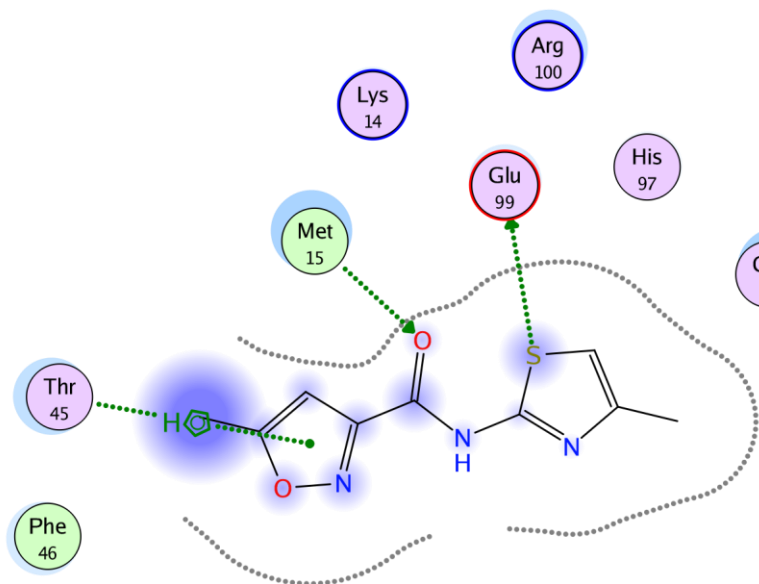
TtTIM with A5



NpTIM with D1



CpTIM with B2



CpTIM with B4

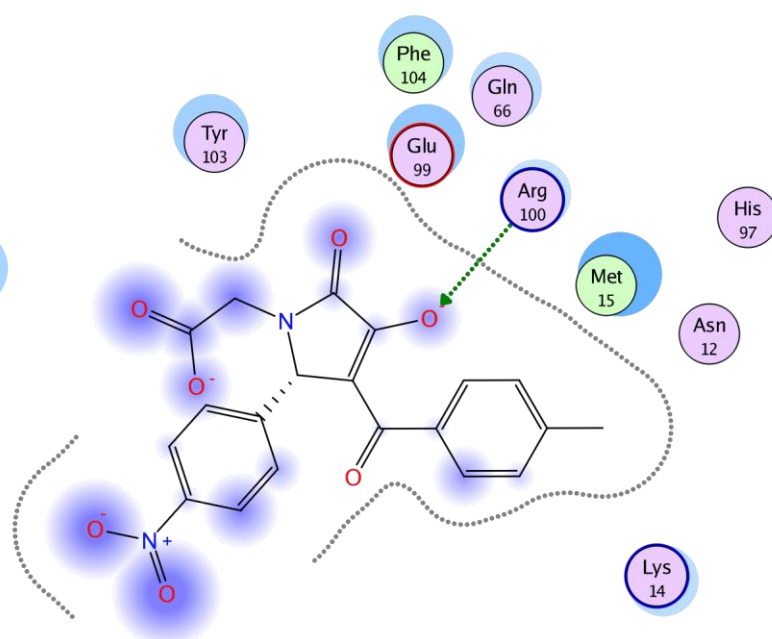


Table 2. Main residues of TIMs that are interacting with compounds.

	A5	B2	B3	B4	C4	C7	D1	D7	D8
TvTIM (3qsr)			50 % Asp159, Trp89, Lys121, Glu37					40 % Lys11, Ser212, Val213, Gly234	
DrTIM (4y90)	25 % Gly77, Ile79, Arg99						27 % Asp66, Ile79, Arg99, Glu105		23 % Ala44, Ile79, Asp66, Arg99
ScTIM (4y9a)	70 % Lys16, Gly220, Ser222, Lys224, Gly244	60 % Lys16, Glu106				55 % Lys16, Gly220, Ser222			70 % Lys16, Ser222, Lys226
BtTIM (4gk1)								70 % Ser213	
TtTIM (1yya)	60 % Arg3, Ala54, Arg88								
CpTIM (4y8f)		25 % Met15		50 % Lys14, Met15, Arg100					
NpTIM (Determined)							70 % Asn9, Lys11, Glu98		

Ligand Atom number	Receptor Atom residue (Chain)	Interaction	Distance (Angstroms)	E (kcal mol ⁻¹)
TvTIM-B3				
S 12	O ASP 159	H-donor	3.21	-4.4
O 14	NE1 TRP 89	H-acceptor	3.63	-0.7
O 40	NZ LYS 121	H-acceptor	2.88	-4.4
O 14	NZ LYS 121	ionic	3.08	-4.0
O 40	NZ LYS 121	ionic	2.88	-5.3
6-ring	CG N GLU 37	pi-H	4.06	-1.1
TvTIM-D7				
S 38	OG SER 212	H-donor	2.77	-1.1
S 38	O VAL 213	H-donor	3.67	-1.0
O 40	NZ LYS 11	H-acceptor	3.01	-7.2
O 40	N GLY 234	H-acceptor	3.23	-0.7
O 14	NZ LYS 11	ionic	2.87	-5.4
O 40	NZ LYS 11	ionic	3.01	-4.4
DrTIM-A5				
S 8	O GLY 77	H-donor	3.69	-0.7
N 10	O GLY 77	H-donor	1.90	738.1
O 17	N ILE 79	H-acceptor	2.64	-3.6
O 48	NH2 ARG 99	ionic	3.94	-0.6
O 48	NE ARG 99	ionic	3.83	-0.9
O 48	NH1 ARG 99	ionic	3.55	-1.7
O 48	NH2 ARG 99	ionic	1.69	-23.2
DrTIM-D1				
N 30	OD2 ASP 66	H-donor	2.16	191.1
S 10	N ILE 79	H-acceptor	4.01	-0.7
O 24	NH1 ARG 99	ionic	3.82	-0.9
O 24	NH2 ARG 99	ionic	3.91	-0.7
O 25	NE ARG 99	ionic	4.01	-0.5
O 25	NH1 ARG 99	ionic	3.31	-2.7
O 25	NH2 ARG 99	ionic	2.40	-10.0
N 26	OD2 ASP 66	ionic	3.52	-1.8
N 30	OD1 ASP 66	ionic	3.52	-1.8
N 30	OD2 ASP 66	ionic	2.16	-13.5
N 30	OE2 GLU 105	ionic	3.93	-0.7
DrTIM-D8				
S 38	O ALA 44	H-donor	4.23	-0.8
O 14	NH1 ARG 99	H-acceptor	2.08	153.4
O 31	N ILE 79	H-acceptor	3.04	-1.3
O 14	NH1 ARG 99	ionic	2.08	-14.7
O 14	NH2 ARG 99	ionic	2.86	-5.5
O 37	NH1 ARG 99	ionic	3.25	-3.0
O 37	NH2 ARG 99	ionic	3.70	-1.2

6-ring	CB ASP 66	pi-H	3.65	-0.6
		ScTIM-A5		
S 49	O GLY 220	H-donor	3.53	-0.3
O 17	NZ LYS 224	H-acceptor	3.88	-1.1
O 42	OG SER 222	H-acceptor	2.96	-2.6
N 46	NZ LYS 16	H-acceptor	3.15	-9.8
O 48	NZ LYS 16	H-acceptor	3.63	-3.9
O 17	NZ LYS 224	ionic	3.88	-0.7
O 48	NZ LYS 16	ionic	3.63	-1.5
6-ring	N GLY 244	pi-H	4.00	-1.9
		ScTIM-B2		
N13	OE2 GLU 106	H-donor	3.05	-1.6
N16	NZ LYS 16	H-acceptor	3.24	-1.6
		ScTIM-C7		
S 9	O GLY 220	H-donor	3.26	-0.3
O 14	OG SER 222	H-acceptor	2.70	-1.6
N 17	NZ LYS 16	H-acceptor	3.33	-10.8
O 18	NZ LYS 16	H-acceptor	3.59	-7.9
O 18	NZ LYS 16	ionic	3.59	-1.6
		ScTIM-D8		
O 14	NZ LYS 224	H-acceptor	3.60	-7.7
O 31	OG SER 222	H-acceptor	2.51	1.4
N 35	NZ LYS 16	H-acceptor	3.25	-13.2
O 37	NZ LYS 16	H-acceptor	3.85	-3.1
O 14	NZ LYS 224	ionic	3.60	-1.5
O 37	NZ LYS 16	ionic	3.85	-0.8
		BtTIM-D7		
5-ring	OG SER 213	pi-H	3.85	-4.4
		TtTIM-A5		
S 8	O ALA 54	H-donor	3.73	-0.6
O 17	NH1 ARG 88	H-acceptor	2.92	-1.6
O 48	NH1 ARG 3	H-acceptor	2.85	-0.9
O 17	NH1 ARG 88	ionic	2.92	-5.0
O 17	NH2 ARG 88	ionic	3.19	-3.3
O 48	NH1 ARG 3	ionic	2.85	-5.6
		CpTIM-B2		
N 9	SD MET 15	H-donor	3.48	0.0
N 13	SD MET 15	H-donor	3.87	-1.6
		CpTIM-B4		
O 42	SD MET 15	H-donor	3.73	-1.4
O 36	CA LYS 14	H-acceptor	3.38	-0.6

O 41	NH1 ARG 100	H-acceptor	3.04	-2.6
O 41	NH1 ARG 100	ionic	3.04	-4.2
		NpTIM-D1		
N 26	OE1 GLU 98	H-donor	2.91	-16.6
O 24	ND2 ASN 9	H-acceptor	2.89	-1.9
O 24	NZ LYS 11	H-acceptor	2.93	-11.4
O 24	NZ LYS 11	ionic	2.93	-5.0
N 26	OE1 GLU 98	ionic	2.91	-5.1

References

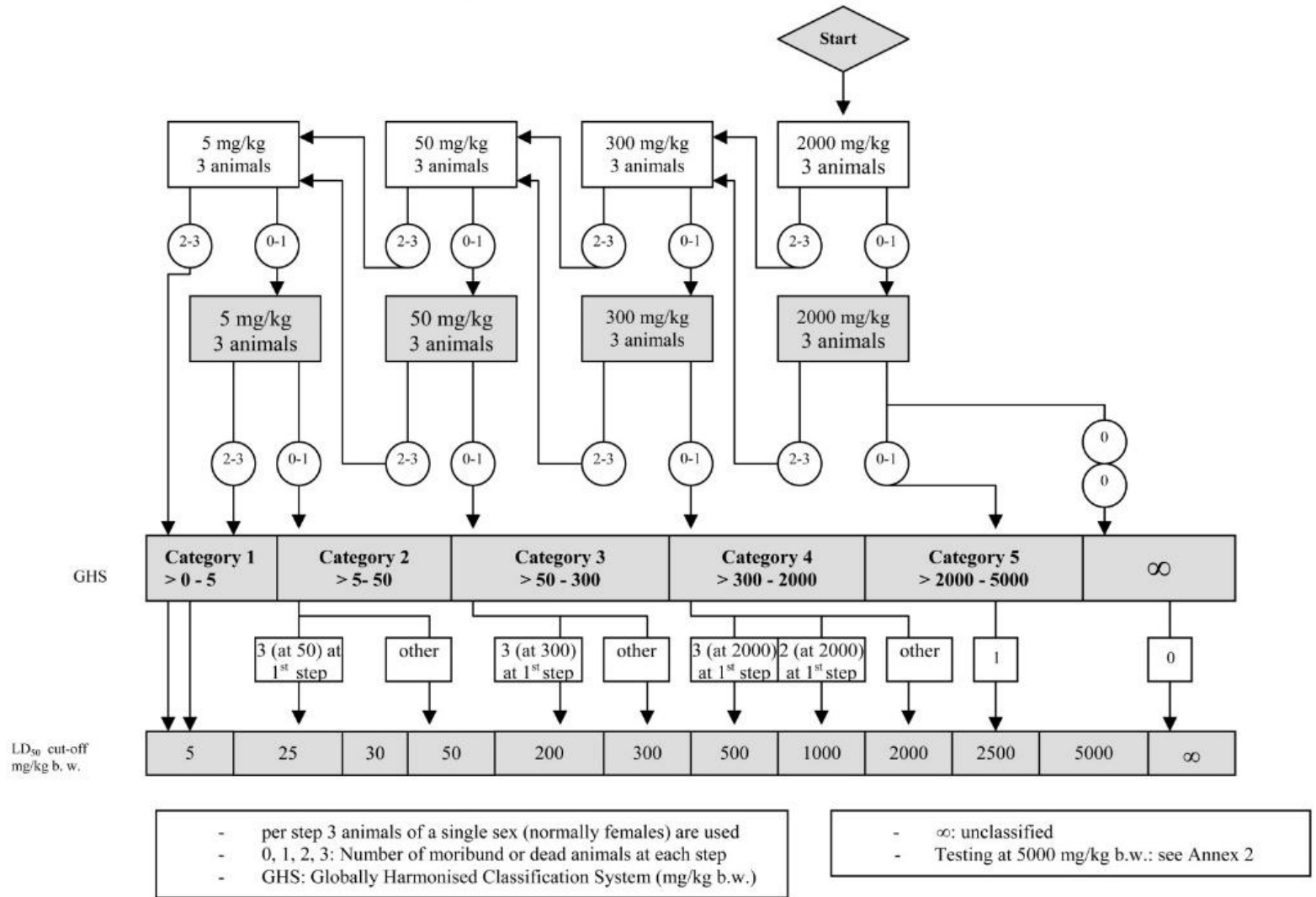
-Jeremy R. Knowles, W. John Albery, *Perfection in enzyme catalysis: the energetics of triosephosphate isomerase*. Acc. Chem. Res., 1977, 10 (4), pp 105–111

-Gómez-Puyou *et al.*, *Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action--studies with triosephosphate isomerase*. Chem Biol. 1995 Dec;2(12):847-55

-Garza-Ramos *et al.*, *Species-specific inhibition of homologous enzymes by modification of nonconserved amino acids residues. The cysteine residues of triosephosphate isomerase*. Eur J Biochem. 1996 Oct 1;241(1):114-20

-Téllez-Valencia *et al.*, *Highly specific inactivation of triosephosphate isomerase from Trypanosoma cruzi*. Biochem Biophys Res Commun. 2002 Jul 26;295(4):958-63

TEST PROCEDURE WITH A STARTING DOSE OF 2000 MG/KG BODY WEIGHT



Anexo VII) 51 aislados de *T. vaginalis*:

Los 51 aislados evaluados fueron aislados de pacientes de clínicas u hospitales en México. Posteriormente fue axenizado el parásito, donde se podía observar al microscopio características diferentes entre los aislados. las claves de los aislados que los identifica en el Laboratorio 11 de la Dra Rossana Arroyo son CNCD77, CNCD89, CNCD112, CNCD125, CNCD147, CNCD188, CNCD190, CNCD280, CNCD281, CNCD285, CNCD315, CNCD423, HGMM1040, HGMM1041, HJN01, HJM79, LT03, LO16, HPGJ386, HPGJ423, HGMMN01, CNCD217, HGMM031, CNCD224, HGMM33, L01, HGM114, HJM030508, HGM486, T1, HGMM488, HGMM179, HGMM159, HGMM139, HGMM135, HJM2809305, HGMM153, HGMM145, HGMM144, HGMM135, HGMM106, HUM(AMALIA), HGMM488, HGMM74, HGMM164, HGMM162, HGMM159 y HGMM135.

Número de aislados	Origen
21	HGMM
17	CNCD
3	HJM
2	HPGJ
1	LT03
1	HJN01
1	HGMMN01
1	T1
1	L01
1	LO16
1	HUM (Amalia)
1	HGM114