



UNIVERSIDAD AUTONOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

“Diseño molecular y perfil ADME/tox *in silico* de análogos del nimorazol con potencial efecto antiprotozoario.”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADO EN FARMACIA

P R E S E N T A:

JOSE MARTIN SANCHEZ AVILA

DIRECTOR DE TESIS: Dr. JUAN GABRIEL NAVARRETE VAZQUEZ

ASESORA TÉCNICA: L.F. LEILANI ABRIL PASTOR SALGADO



CUERNAVACA MORELOS 2021



Fecha: 27 de octubre de 2020
Asunto: VOTOS APROBATORIOS
Medio de Notificación: Electrónica
Folio: FF/D/SD/JLF/0143/2020

**DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES
U.A.E.M
PRESENTE**

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo de tesis “Diseño molecular y perfil ADME/tox *in silico* de análogos del nimorazol con potencial efecto antiprotozoario” presentada por el pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia. **C. José Martín Sánchez Ávila, (20161013276)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

Jurado

Firma

Dr. Jaime Escalante García

Dra. Blanca Iris Colín Lozano

M en C. Martha Hernández Labra

M en F. Carlos Martínez Conde

Dra. Angélica Flores Flores



**ATENTAMENTE
“POR UNA HUMANIDAD CULTA”**

**M.P.D. Reyna América Serrano López
Secretaria de Docencia**

Cp Archivo
Cp. Bdm

Av. Universidad 1001 Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.
C.P. 62210 Tel. 777 329 7000 Ext. 3365

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

REYNA AMERICA SERRANO LOPEZ | Fecha: 2021-10-27 13:15:21 | Firmante
SPKXWCX/gzs7y26ovUfRoaPU6Ux5Wpa4r2yg2dZz6A7sFG49ta/r0KpH5Y3ra0Y6ms9ROwA/QN/dQ62NPgIFxmlP/65vraqof6p++pCsPvxQQIXonBIZCPHG3Vrα98i73wv7Cug/
ClxXJq3yAZ8mbqMrhovVoFzcCbIS9HWIGUFgnTFZi55baYJ198KsLiwgMLb8hXe0RqJiBYVTCwM+Ab2mI1flvZM7P18IMGXam0xWlzt5P57lzQmDMHXIgnjk+rFrEYwIKxjYWL7
Jv7442hHITM8FzO5WVrifiIKnbxxJKNIM7gbu14tlnRE4hr/qZRmRmKs4OX1S2A==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



L62tmSIKZ

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/3rGMjQTYpE4wdbV1Hd6UafE2r/yg0Bq>



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

ANGELICA FLORES FLORES | Fecha: 2021-11-03 08:40:44 | Firmante

Mnk2mZLx8Nm0RdbUyhN0wDYTuaqIUUVFqaiKUN0XC05NdwJnKhaGhsagtBNpkARZSSkfp6a+QM9k15obEJ9V8SqnteE+dT0D9H7qB27Eum1F1NP7W/ihemmhVwmjSvIOmfvbkyG0jgJr7uQ71TIC+s4oQnMuHoJPlzjdT9AITJN/gvfkpWUFR5ax/NhITNFCBQ2Hy1b44zPfvBv7yAew#2+5JtEdrP2NHoy02hNC6rwgSuIgbChNwmBDE3GCsYsCsFDGykJR051v6dcAGzjGyILTH5YTHJKLCwiUBFTHMjodT1yAdo3ryQVY9TuAprXEsFxmT7+6Uoiw==

CARLOS MARTINEZ CONDE | Fecha: 2021-11-03 08:52:44 | Firmante

UF GjuUmpcvtz7J8dO8F6Q1NQreUy8ownpD3ZAXHaR/BA1pD5NwwSKd2zgRBGHhYgbw9qyaBk1eG5zBRZLAZBmPzP8qOzfvnJQMhO3fOCPaN3shiQLvD6GZsj/quF/Sz2f6W0I08e3F7cFmfYVwxkbyTsz8uhVf6QB5uYqJpn0E5yRWADBR2CAyIsIUfVfQIWDtiZlywfaOLn8XivDaFBhywpXsv7j8RjT9YzDJGy9tzCilJfPKF0+QjAtztMILMZSLGEMiuJHxpK3lXaI0Sp4InWwMVLJLqYbqekSZAKNm1sYI+K58YN5H2Zwk6ThBkW8uE311YP4W5SKw4Q==

JAIME ESCALANTE GARCIA | Fecha: 2021-11-03 10:11:49 | Firmante

pwfV4CGLex7xU8353FRuKlgjokeS+Ni7VIsWBMc05tj3mDMMelHgbLHzzSA+qTnTA/AsUd7BU8cHjJMkX0THdqRVO/MmytGNBYnANT90xRWWhAD96EJ2HdZdWR3wIFVptfme+R04fGsa5ZV/CrT40RQhIDXas0I08AQbWPBFefGH+Zz6Y7VLzBnFzGogYBIRBTI3SelfsedogTqX2NJYrMZ3qzNrwP4K4ku0nMd522v0JEUPIUtaHvXR4X2BQYS/YqdwminytbnMl fFOI7ZlkzleaV4BFWLIE7n3RpoqNF8pLHzbfDBBPVNL3OsWpEkegu4aFLAUj0TJDIz15R7Q==

BLANCA IRIS COLÍN LOZANO | Fecha: 2021-11-03 14:54:59 | Firmante

xTVvBxoN2C2BL89aTNEENhc2B2FhaM3dySmdJIBc9s9hdyAvRgZm1D51WCxXwZl7IGRrHLkvdvlzJ83EptseE6oQSGleHSedd9LUzhPQ75QyzzKOHWWKj7AG5Ed2NADDschQALaEnf8RdgmUxkTx4ilZznNjCzPC0h8E3mZfcNdL3SibdI79R1Axm/V8OXOJyekISsowf15X77QspI+eSommroi7imosaxNrh6QAIJ31+57mMEWuKqZwoCCRCFqDge1vB1fLqj/BWwM0k4e9QYwx+D2gFM4W9m0BIPeYUcvkV7YpTE163wGXASaLs8DEutbKvKqBAXA==

MARTHA HERNANDEZ LABRA | Fecha: 2021-11-03 18:31:02 | Firmante

FtwGLaw0YFnykfpU5FqC6QT5skK28S4vFsFyk4qKyD2OLrJaCAPo9t2kev+oFomwT9su24354nKSYMGhACLHP/UwbJzaVWLc10Se3gz7SaYptGUL3WBBjvY1nkeMFYB8m3U3h5s9lSvC SuDYHCaSI2YSE16VFOEQ6jflRrow0EicGcAWzuuu8VQRJRdc2Ejx5zWlIfBcmIowGNpFRZPNDNpMNZmISaebQ8BK5Uw5gJSD+EBYP+J771tiP8UEJfLl24D2svDfXd7HNpIM0re6SYbbjKMueLr5vkTuiWNxnUN7cFbUW4zpnk+7k44EJZx7eCi8K4VEHwA==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



W62qT8GPQ

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/qLSGo2SBXB0S0VmlTgt3mFh9pOqzzJR>



AGRADECIMIENTOS

A **CONACyT** por el apoyo otorgado para el proyecto de investigación 2015, número **253814**

Al financiamiento interno otorgado por **la Facultad de Farmacia** de la **Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM)** para la realización de este proyecto.

A la **L.F Leilani Abril Pastor Salgado** Gonzáles por su apoyo, aportación y asesoría técnica.

Al comité revisor: **Dr. Jaime Escalante García, Dra. Blanca Iris Colín Lozano, M en C. Martha Hernández Labra, M en F. Carlos Martínez Conde y Dra. Angélica Flores Flores** por sus observaciones, aporte y el tiempo invertido en el proceso de revisión de esta investigación.

Un agradecimiento especial al **Dr. Gabriel Navarrete Vázquez**, por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme la confianza para formar parte del equipo de trabajo del L5. Por sus enseñanzas y consejos que ayudaron a ser un mejor estudiante y contribuyen a ser un profesional mejor, muchas gracias.



DEDICATORIAS

*A todas aquellas personas con las que
compartí un momento de mi vida.*

En especial a mis padres, los amo.

ÍNDICE DE CONTENIDO

I. ABREVIATURAS	8
II. ÍNDICE DE FIGURAS.....	9
III. ÍNDICE DE TABLAS	10
IV.ÍNDICE DE ESQUEMAS	10
1. INTRODUCCIÓN.....	12
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1 PARÁSITOS.....	13
2.2 ECTOPARÁSITOS.....	13
2.3 HELMINTOS	15
2.4 PROTOZOOS	16
2.5 ENFERMEDADES TROPICALES DESATENDIDAS; PARASITOSIS.....	17
2.5.1 GIARDIASIS	18
2.5.1.1 MORFOLOGÍA.....	19
2.5.1.2 CICLO DE VIDA.....	21
2.5.1.3 EPIDEMIOLOGIA	22
2.5.2 TRICOMONIASIS.....	23
2.5.2.1 MORFOLOGÍA.....	24
2.5.2.2 CICLO DE VIDA Y PATOGENIA.....	25
2.5.2.3 EPIDEMIOLOGIA	27
2.6 DIAGNÓSTICO	28
2.7 TRATAMIENTO.....	29
2.7.1 GRUPOS NITROHETEROCICLOS EN FÁRMACOS ANTIPARASITARIOS.....	31
2.8 ENZIMA PIRUVATO FERREDOXINA OXIDORREDUCTASA (PFOR).....	33
3. JUSTIFICACIÓN.....	36
4. HIPÓTESIS	37
5. OBJETIVOS.....	37
5.1 OBJETIVO GENERAL	37
5.2 OBJETIVOS PARTICULARES	37
6. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO MOLECULAR	38
7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....	41
7.1 PARTE COMPUTACIONAL: EVALUACIÓN IN SILICO	42
7.1.1 PASS: PREDICCIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	42
7.1.2 MOLINSPIRATION: PREDICCIÓN DE PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS.....	42
7.1.3 admetSAR: PREDICCIÓN DE PROPIEDADES ADME/Tox.	43
7.1.4 SwissADME: PREDICCIÓN DE PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS ..	44



7.1.5	OSIRIS: PREDICCIÓN EFECTOS TÓXICOS Y PROPIEDADES CUASI-FÁRMACO.....	45
7.1.6	ACD/ToxSuite: PREDICCIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA.	45
7.1.7	ACOPLAMIENTO MOLECULAR (DOCKING MOLECULAR).....	46
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
8.1	PARTE IN SILICO	50
8.1.1	PASS: PREDICCIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.....	50
8.1.2	admetSAR: PREDICCIÓN DE LAS PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS.....	51
8.1.3	OSIRIS: PREDICCIÓN TOXICOLÓGICA Y PROPIEDADES CUASI-FÁRMACO.....	53
8.1.4	ACD/Toxsuite: PREDICCIÓN DE LA TOXICIDAD.....	54
8.1.5	swissADME: PREDICCIÓN DE PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS.....	57
8.1.6	ACOPLAMIENTO MOLECULAR (MOLECULAR DOCKING).....	59
8.1.6.1	VALIDACIÓN DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR SOBRE PFOR, CON AUTODOCK VINA.....	60
8.1.6.2	VALIDACIÓN DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR SOBRE PFOR, CON AUTODOCK4.....	62
8.1.6.3	ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE LA SERIE DE COMPUESTOS MSA 1-6 CON AUTODOCK VINA.....	64
8.1.6.4	ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE LA SERIE DE COMPUESTOS MSA 1-6 CON AUTODOCK 4.....	70
8.1.6.5	CONSENSO DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE AMBAS GENERACIONES DE AUTODOCK: AUTODOCK VINA Y AUTODOCK 4.....	75
8.1.7	ANÁLISIS DE CONSENSO FARMACOLÓGICO.....	77
8.2	PARTE QUÍMICA	80
8.2.1	RETROSÍNTESIS	80
8.2.2	SÍNTESIS QUÍMICA.....	82
8.2.2.1	SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS FINALES MSA-1 Y MSA-4	82
8.2.2.2	SÍNTESIS DEL PRECURSOR MSA 7	82
8.2.2.3	SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS FINALES MSA 2-3 Y MSA 5-6	83
9.	CONCLUSIONES	84
10.	PERSPECTIVAS.....	85
	REFERENCIAS	86



I. ABREVIATURAS

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ARN – Ácido ribonucleico

DE₅₀ - Dosis efectiva media

DL₅₀ – Dosis efectiva media

ETD - Enfermedades tropicales desatendidas

FA - Flagelos anteriores

FC - Flagelos caudales

FDA - Por sus siglas en inglés: Food and Drug Administration

FPL - Flagelos posterior laterales

FV - Flagelos ventrales

hERG - *Human ether-a-go-go-related gen*

ITS - Infecciones de transmisión sexual

K_i - Constante de inhibición o afinidad

LE - Eficiencia del ligando

log P – Coeficiente de partición

NAAT – Prueba de amplificación de ácidos nucleicos

N(R)₃ - Amina terciaria

OMS - Organización Mundial de la Salud

Pa - Probabilidades de actividad

PAINS – En inglés: *Pan Assay Interference Compounds*

PCR - Reacción en cadena de polimerasa

PFOR - Piruvato ferredoxina oxidoreductasa

Pi – Probabilidades de ser inactivo

PM – Peso molecular

SAR - Relación estructura-actividad

TEA - Trietilamina

TPSA - Área polar superficial

ΔG - Energía libre de unión

II. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Morfología de <i>Giardia duodenalis</i> . A) Presentación de trofozoíto de cara dorsal; . anteriores (FA), ventrales (FV), posterior/laterales (FPL), y caudales (FC). B) Presentación . de la forma quística.....	20
Figura 2 Ciclo de vida de <i>Giardia lamblia</i>	22
Figura 3 Especies de tricomonas infectivas en el ser humano:1) <i>T. vaginalis</i> , 2) <i>T. tenax</i> y . 3) <i>T. hominis</i>	23
Figura 4 Morfología de <i>T. vaginalis</i>	25
Figura 5 Ciclo de vida de <i>T. vaginalis</i>	26
Figura 6 Fármacos nitroheterocíclicos con propiedades antiparasitaria y antimicrobiana	32
Figura 7 Mecanismo de acción de nitroimidazoles en <i>T. vaginalis</i>	34
Figura 8 Mecanismo de reducción del grupo nitro.	35
Figura 9 Ventana de inicio de PASS online.	42
Figura 10 Interfaz del portal en línea de molinspiration.	43
Figura 11 Página de inicio de admetSAR	44
Figura 12 Interfaz de inicio de la página web SwissADME	44
Figura 13 Interfaz del sitio web para la adquisición de OSIRIS.	45
Figura 14 Interfaz del software ACD/ToxSuite	46
Figura 15 Interfaz del programa computacional AutodockTools.....	47
Figura 16 Interfaz del programa MOE	48
Figura 17 Interfaz del programa PyMOL de uso auxiliar para la visualización molecular.	48
Figura 18 Interfaz del programa BIOVIA Discovery Studio, como visualizador molecular.....	49
Figura 19 Diversas modos de unión de metronidazol sobre PFOR. obtenidas con el . programa AutoDock vina.	60
Figura 20 A) Visualización en 3D de metronidazol en el sitio catalítico obtenido de . AutoDock vina. B) Mapa de interacción 2D de metronidazol con PFOR.	61
Figura 21 Diversas modos de unión de metronidazol sobre PFOR. obtenidas con el . servidor AutoDock 4.	62
Figura 22 A) Visualización en 3D de metronidazol en el sitio catalítico obtenido de . AutoDock vina. B) Mapa de interacción 2D de metronidazol con PFOR.	63
Figura 23 A) Diagrama en 3D y B) Mapa en 2D de las interacciones moleculares entre . MSA 1 y PFOR.....	64
Figura 24 A) Diagrama en 3D y B) Mapa en 2D de las interacciones moleculares entre . MSA 2 y PFOR.....	65
Figura 25 A) Diagrama en 3D y B) Mapa en 2D de las interacciones moleculares entre . MSA 3 y PFOR.....	66
Figura 26 A) Diagrama en 3D y B) Mapa en 2D de las interacciones moleculares entre . MSA 4 y PFOR.....	67
Figura 27 A) Diagrama en 3D y B) Mapa en 2D de las interacciones moleculares entre . MSA 5 y PFOR.....	68
Figura 28 A) Diagrama en 3D y B) Diagrama en 2D de las interacciones moleculares . entre MSA 6 y PFOR.....	69
Figura 29 A) Diagrama en 3D y B) Mapa en 2D de las interacciones moleculares entre . MSA 1 y PFOR.....	70



Figura 30 A) Diagrama en 3D con AutoDock 4; B) Mapa en 2D de las interacciones . moleculares entre MSA 2 y PFOR.	71
Figura 31 A) Diagrama en 3D con AutoDock 4; B) Mapa en 2D de las interacciones . moleculares entre MSA 3 y PFOR.	71
Figura 32 A) Diagrama en 3D con AutoDock 4; B) Mapa en 2D de las interacciones . moleculares entre MSA 4 y PFOR.	72
Figura 33 A) Diagrama en 3D con AutoDock 4; B) Mapa en 2D de las interacciones . moleculares entre MSA 5 y PFOR.	73
Figura 34 A) Diagrama en 3D con AutoDock 4; B) Diagrama en 2D de las interacciones . moleculares entre MSA 6 y PFOR.	74

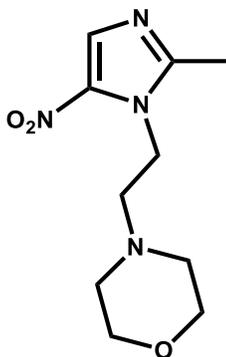
III. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Clasificación de artrópodos	14
Tabla 2 Clasificación de helmintos que afectan la salud humana	15
Tabla 3 Clasificación de protozoos que infectan a humanos.....	16
Tabla 4 Flagelados lumbinales que infectan humanos	17
Tabla 5 Fármacos utilizados en el tratamiento de giardiasis y tricomoniasis.....	30
Tabla 6 Resultados de la evaluación en Molinspiration de los compuestos diseñados.....	40
Tabla 7 Predicción de actividad biológica por PASS para los compuestos MSA 1-6	50
Tabla 8 Propiedades obtenidas de admetSAR para la serie de compuestos MSA 1-6	52
Tabla 9 Propiedades cuasi-fármaco y riesgo de toxicidad de los compuestos MSA 1-6	53
Tabla 10 Resultados obtenidos por ACD/Toxsuite para MSA 1-6	55
Tabla 11 Resultados de MSA 1-6 por ACD/Toxsuite de DL ₅₀ y categoría en OECD	56
Tabla 12 Resultados obtenidos de la plataforma en línea SwissADME para los compuestos . MSA 1-6 y MTZ	58
Tabla 13 Energías de unión resultantes del acoplamiento molecular, constantes de afinidad . calculadas y eficiencia de ligando.....	76
Tabla 14 Análisis de propiedades calculadas para los compuestos MSA 1-6	78

IV. ÍNDICE DE ESQUEMAS

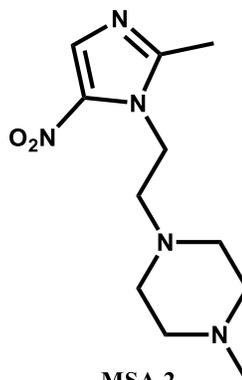
Esquema 1 Consideraciones para el diseño molecular de la serie MSA 1-6	39
Esquema 2 Esquema retrosintético para los compuestos MSA-1 y MSA-4	80
Esquema 3 Esquema de retrosíntesis para la obtención de los compuestos MSA 1-6	81
Esquema 4 Síntesis respectiva para los compuestos MSA-1 y MSA-4	82
Esquema 5 Esquema de síntesis correspondiente para el precursor MSA 7	83
Esquema 6 Síntesis correspondiente para los compuestos MSA 1-6 a partir del compuesto MSA 7	83

V. INDICE DE COMPUESTOS DISEÑADOS



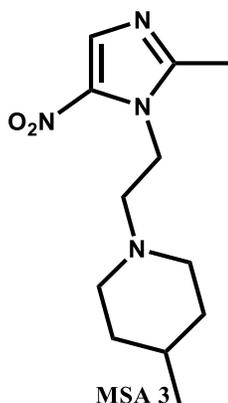
MSA 1

4-(2-(2-metil-5-nitroimidazol)etil)morfolina



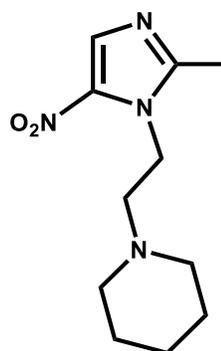
MSA 2

1-metil-4-(2-(2-metil-5-nitroimidazol)etil)piperazina



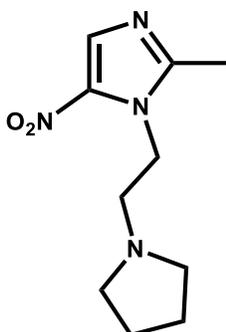
MSA 3

4-metil-1-(2-(2-metil-5-nitroimidazol)etil)piperidina



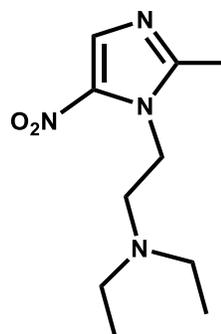
MSA 4

1-(2-(2-metil-5-nitroimidazol)etil)piperidina



MSA 5

2-metil-5-nitro-1-(2-(pirrolidin)etil)imidazol



MSA 6

N,N-dietil-2-(2-metil-5-nitroimidazol)etanamina



1. INTRODUCCIÓN

Un parásito es todo organismo que vive a costa de un organismo hospedero, ya sea en su interior o sobre él y se alimenta a expensas del hospedero durante un periodo de tiempo más o menos largo provocando daños aparentes o inaparentes.¹ Los parásitos son los microbios más complejos. Aunque todos los parásitos se clasifican como eucariotes, algunos son unicelulares y otros son multicelulares. Varían en tamaño, desde pequeños protozoos que van de 4 a 5 μm de diámetro hasta helmintos del género taenias que pueden medir hasta 10 metros de largo y artrópodos (insectos).² Algunos de los parásitos que resultan ser patógenos para el hombre son: protozoos, céstodos y nemátodos.³

Las parasitosis causadas por los protozoos *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*, presentan una elevada prevalencia, un ciclo biológico sencillo y un mismo tratamiento de elección.⁴ Es muy común que las personas alberguen parásitos dentro de su organismo y no lo sepan, convirtiéndose en portadores que generen nuevas infecciones por lo que se recomienda desparasitarse dos veces al año, sin embargo, debido al mal uso que se les ha dado a estos agentes, se ha creado resistencia por parte de los protozoarios a una gran variedad de fármacos utilizados en los tratamientos actuales.⁵ Los fármacos utilizados comprenden una amplia gama de moléculas que pueden atacar a estos parásitos por diversas vías. Entre los que destacan aquellos que comparten en su estructura química anillos nitroheterociclos, los cuales le confieren esta propiedad antiparasitaria.²

Debido a la amplia propagación de estas parasitosis, principalmente por la falta de atención por parte de la comunidad de salud pública, es que afectan a más de mil millones de personas, mayormente en áreas rurales de países con bajos ingresos, perjudicando el desarrollo físico y cognitivo, limitan la productibilidad en el trabajo y contribuyen a la enfermedad y muerte de los infectados generando un ciclo de pobreza y enfermedad a las zonas más afectadas.⁶ Con la intención de contribuir a la solución de esta problemática, es de gran importancia el diseño y evaluación de nuevos compuestos antiprotozoarios que puedan tener efectos que promuevan la eliminación de estos organismos parasitarios.

2. ANTECEDENTES

2.1 PARÁSITOS

Como ya se mencionó, los parásitos son organismos que viven a costa de otro, denominado huésped u hospedero, en donde pueden pasar una parte o toda su existencia en el interior de otro ser vivo dependiendo nutricionalmente del huésped⁷ sin aportar ningún tipo de beneficios, por lo que puede provocar lesiones, daños importantes o incluso la muerte. Esta relación ecológica entre dos organismos donde uno de ellos vive a expensas del otro, es denominada como parasitosis.⁸ Según sea su modo de infectar, estos se pueden clasificar en:

- **Parásitos facultativos:** De forma libre, se adaptan a un determinado huésped.
- **Parásitos obligados:** Dependen necesariamente del huésped.
- **Endoparásitos:** Colonizan el interior del huésped.
- **Ectoparásitos:** Habitan en la superficie del huésped.
- **Parásitos patógenos:** Causan enfermedades en el huésped.

Por otro lado, dentro de la clasificación de parásitos que pueden provocar enfermedades en los seres humanos hay tres clases importantes: ectoparásitos, helmintos y protozoos.³

2.2 ECTOPARÁSITOS

Los ectoparásitos son organismos multicelulares complejos, comúnmente denominados como aquellos parásitos vertebrados pertenecientes al filo *arthropoda*, que se encuentran por fuera del cuerpo de su hospedador. Si bien algunas especies habitan por debajo del tegumento, nunca se localizan en cavidades corporales.⁹ Estos pueden clasificarse en cuatro categorías principales como se observa en la **Tabla 1**.

Tabla 1 Clasificación de artrópodos.¹

Categoría	Tipo de organismos	Características
<i>Myriapoda</i>	Consiste en formas terrestres como ciempiés.	De importancia médica Debido a sus garras venenosas, que producen una "mordedura" dolorosa. ¹
<i>Crustacea</i>	Incluyen organismos acuáticos como cangrejos, cangrejos de río, camarones y copépodos.	Varios están involucrados como huéspedes intermediarios en los ciclos de vida de varios helmintos intestinales o sanguíneos y tisulares. ¹
<i>Chelicerata</i>	Organismos terrestres como ácaros, garrapatas, arañas y escorpiones.	De importancia médica Cuatro pares de patas, sirven como vectores de enfermedades microbianas o como animales venenosos que muerden o pican. ¹
<i>Insectae</i>	Organismos acuáticas y terrestres como mosquitos, moscas, pulgas, piojos, insectos, avispa y hormigas.	De importancia médica Cuentan con alas, antenas y tres pares de patas. sirven como vectores de enfermedades microbianas o como animales venenosos que pican. ¹

La alternancia entre fases de vida libre y parasitaria que presentan muchos artrópodos en su ciclo de vida les facilita su participación en diferentes eslabones de la cadena epidemiológica ya sea directamente en la causa de procesos patológicos invasivos o superficiales (infestación) o indirectamente como huéspedes intermediarios y vectores de muchos agentes infecciosos, incluidos protozoos y parásitos helmínticos. Además, el envenenamiento por picaduras o mordeduras de artrópodos puede provocar reacciones adversas en los seres humanos que van desde reacciones locales alérgicas e hipersensibilidad hasta un shock anafiláctico severo y la muerte.¹



2.3 HELMINTOS

La palabra helmintos se deriva del griego *helmins* (“gusano parásito”), son animales invertebrados de cuerpo alargado con simetría bilateral, algunos miden pocos centímetros mientras que otros pueden llegar a medir varios metros de largo. Los helmintos pueden incluir diversos grupos: platelmintos, nematodos y anélidos; entre éstos, los parásitos más importantes que afectan la salud humana y animal son los platelmintos y los nematodos (**Tabla 2**).¹⁰

Tabla 2 Clasificación de helmintos que afectan la salud humana.¹

<i>Phylum</i>	Característica	Organismo
Platyhelminthes (platelmintos)	Gusanos planos	<i>Fasciolopsis buski</i> (Trematoda), <i>Taenia solium</i> (Cestoda)
Nematoda (nematodos)	Gusanos cilíndricos	<i>Trichinella spiralis</i> , <i>Trichuris trichiura</i> , <i>Ancylostoma duodenale</i> , <i>Necator americanus</i> , <i>Ascaris lumbricoides</i> , <i>Dracunculus medinensis</i> , <i>Enterobius vermicularis</i> .

Los platelmintos son organismos hermafroditas, tienen simetría bilateral, aplanados dorsoventralmente y sin cavidad corporal. Cuentan con un sistema muscular complejo, sin embargo, no tiene aparato circulatorio ni respiratorio. En este *phylum* se incluyen los trematodos y cestodos (**Tabla 2**).¹¹ Por otra parte, los nematodos son el filo más numeroso de los helmintos (más de 12 mil especies), presentan un cuerpo cilíndrico con un sistema digestivo completo. No tienen sistema circulatorio ni respiratorio y muchos tienen dimorfismo sexual, siendo los machos más pequeños que las hembras.¹¹

Los helmintos son parásitos que durante su ciclo de vida tienen uno o varios hospederos intermediarios y definitivos que parasitan a las personas viviendo dentro del cuerpo y provocando infecciones verdaderas, por el contrario, los parásitos de otros géneros que habitan sólo en las superficies mucocutáneas de las personas se consideran infestaciones en lugar de infecciones.¹²



2.4 PROTOZOOS

Los protozoos son organismos unicelulares simples, que no forman órganos o tejidos, ni presentan desarrollo embrionario.¹³ Su tamaño varía de 2 a 100 μm pudiendo ser solitarios o coloniales teniendo la capacidad de multiplicarse dentro del cuerpo humano, lo cual contribuye a su supervivencia, permitiendo que se desarrollen infecciones graves a partir de tan solo un organismo. Un mecanismo importante que favorece el crecimiento ilimitado es la evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador, y sea por variación antigénica o por la supervivencia dentro de las células del hospedador. Su alimento es base de nutrientes que toman del huésped y la manera en que estos sobreviven fuera del huésped es por medio de la formación de un quiste, este no es activo y por lo general es la manera en la que se transmite de un huésped a otro.^{3,12}

Los protozoos infecciosos para los seres humanos pueden clasificarse en cuatro grupos según su modo de movimiento: amebas, flagelados, ciliados y apicomplexa (Tabla 3).

Tabla 3 Clasificación de protozoos que infectan a humanos. ¹

Clasificación	Organismo	Phylum
Sarcodinos, o amebas	<i>Acanthamoeba spp, Balamuthia mandrillaris, Entamoeba histolytica</i>	Amoebozoa
Mastigóforos, o flagelados	<i>Giardia lamblia, Chilomastix mesnili</i>	Metamonada
	<i>Dientamoeba fragilis, Trichomonas vaginalis</i>	Parabasalia
	<i>Naegleria fowleri</i>	Percolozoa
	<i>Leishmania spp, Trypanosoma cruzi</i>	Euglenozoa
Cilióforos, o ciliados	<i>Balantidium coli</i>	Ciliophora
Esporozoos (inmóvil en etapa adulta)	<i>Cryptosporidium hominis, Cyclospora cayetanensis, Cystoisospora belli, Toxoplasma gondii, Babesia microti, Plasmodium falciparum</i>	Apicomplexa



Los protozoarios flagelados se encuentran ampliamente diseminados en la naturaleza, se multiplican por fisión binaria y se desplazan por medio de organelos citoplásmicos de locomoción. Los flagelados luminales pueden encontrarse en boca, vagina o intestino en la mayor parte de los vertebrados y es común que un hospedador porte más de una especie. Los seres humanos pueden actuar como hospedadores y como reservorio para ocho especies (**Tabla 4**), pero sólo dos causan enfermedad; *Giardia lamblia* coloniza el tubo digestivo y *Trichomonas vaginalis* coloniza la vagina y el aparato genital.²

Tabla 4 Flagelados luminales que infectan humanos²

Flagelado	Patógeno para humano	Sitio
<i>Giardia lamblia</i>	+	Intestino
<i>Dietamoeba fragilis</i>	-	Intestino
<i>Chilomastix mesnili</i>	-	Intestino
<i>Enteromonas haminis</i>	-	Intestino
<i>Retortamonas intestinalis</i>	-	Intestino
<i>Trichomonas hominis</i>	-	Intestino
<i>Trichomonas tenax</i>	-	Boca
<i>Trichomonas vaginalis</i>	+	Vagina

2.5 ENFERMEDADES TROPICALES DESATENDIDAS; PARASITOSIS.

Las enfermedades parasitarias se consideran con frecuencia "tropicales", debido a que proliferan en entornos empobrecidos, especialmente en el ambiente caluroso y húmedo de los climas tropicales, por lo que la frecuencia relativamente baja de infecciones parasitarias en sociedades industrializadas, de climas templados, con estrictas medidas sanitarias, ha ocasionado la percepción errónea de que el conocimiento de la parasitología tiene poca relevancia para el equipo de salud que practican en dichas áreas.^{2,6}



Las enfermedades tropicales desatendidas (ETD) sufrieron la falta de atención por parte de la comunidad de salud pública, afectan a más de mil millones de personas (un sexto de la población mundial), mayormente en áreas rurales de países con bajos ingresos, en los tugurios urbanos y en las zonas de conflicto. Estas enfermedades cobran un precio muy alto en las poblaciones endémicas, que incluye retraso del crecimiento en niños, deterioro de habilidades cognitivas y, por ende, la baja eficiencia al no poder ir a la escuela o al trabajo y la grave carga económica que implica para países enteros, es evidente que el conocimiento por parte del equipo de salud sobre las enfermedades parasitarias es esencial.³

Gran parte de las ETD son enfermedades parasitarias transmitidas por algún tipo de vector, mientras que otras se propagan por el agua contaminada y el suelo infestado por quistes de protozoarios o por huevos de helminto. El ciclo de transmisión se mantiene por efecto de la contaminación ambiental, y esta se ve favorecida a su vez por las malas condiciones de vida y de higiene.⁶

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), casi dos terceras partes de la población mundial está infectada con algún tipo de parásito intestinal, entre ellas destaca *Giardia lamblia*; infección que tiene la tasa más alta entre todas las clases.¹⁴ Por otro lado, *T. vaginalis* es el agente no viral más frecuente como causa de infecciones de transmisión sexual, provocando vaginitis, cervicitis y uretritis que constituyen algunas de las enfermedades de transmisión sexual más conocidas.¹⁵

2.5.1 GIARDIASIS

Anthon Van Leeuwenhoek, en 1681, observó y describió por primera vez a los protozoarios clasificados dentro del género *Giardia* presentes en el lumen intestinal de mamíferos, reptiles, aves y anfibios. El protista *Giardia*, es un protozooario flagelado que tiene dos núcleos (**figura 1**) y vive en ambientes con poco o sin oxígeno, denominado como un organismo anaeróbico.¹⁶



El género *Giardia* consta de seis especies que infectan diferentes huéspedes, de los cuales solo *Giardia lamblia* puede infectar a los humanos y otros mamíferos.¹⁷ Dentro de la especie *G. lamblia*, se han encontrado ocho genotipos (A-H) las cuales se han identificado con base en estudios con técnicas moleculares, que se distinguen por su morfología y la ultraestructura de los trofozoítos, de estos, sólo A y B infectan a humanos, mientras que los otros seis ensamblados (C-H) son hospederos específicos infectantes hacia otros animales.^{17,18}

G. lamblia (también conocida como *Giardia intestinalis* y *Giardia duodenalis*), tiene una distribución cosmopolita, siendo el agente causal de la infección denominada giardiasis, es predominante en los niños e inmunosuprimidos, caracterizada por la producción de cuadros diarreicos agudos y crónicos de intensidad variable siendo considerada como la mayor causa de la afección denominada como “Diarrea del viajero”, la cual es un trastorno del tracto digestivo, puede complicarse originando un síndrome de malabsorción intestinal, el comienzo de la enfermedad es repentino, con diarrea acuosa maloliente, calambres abdominales, flatulencia y esteatorrea. Rara vez hay sangre y pus en las muestras de heces, lo que concuerda con la ausencia de destrucción tisular, sin embargo, en el adulto inmunocompetente suele ser asintomática (observado en aproximadamente el 50% de los individuos infectados).^{1,19}

2.5.1.1 MORFOLOGÍA

Durante su ciclo de vida el parásito presenta dos fases: Quiste (el cual es la fase infectiva) y trofozoíto (causante de las manifestaciones clínicas). El trofozoíto tiene una apariencia piriforme, mide de 9-21 μm de longitud, 5-15 μm de ancho y 2-4 μm de grosor, presenta simetría bilateral.¹⁷ El microorganismo tiene una cara dorsal convexa y una cara ventral plana ocupada por el disco suctor o disco ventral único en *Giardia spp*; el cual se encuentra conformado por tubulina, giardina actina y miosina que facilitan la adhesión.¹⁶ Un citoesqueleto que está conformado principalmente por filamentos de actina, microtúbulos (α y β tubulina) y proteínas conocidas como giardinas. La motilidad está relacionada con sus cuatro pares de flagelos, los cuales



2.5.1.2 CICLO DE VIDA

El ciclo biológico comienza con la entrada de los quistes tras la ingesta. En el duodeno se produce el desenquistamiento a trofozoito, mediada por el pH ácido del estómago (pH= 1.3-2.7), las enzimas pancreáticas y una cistein-proteasa derivada del parásito para originar un trofozoito tetranucleado (esquizoito), el cual se divide por fisión binaria para dar lugar a dos trofozoitos binucleados.^{1,16}

Giardia lamblia vive en forma de trofozoito en la luz del intestino delgado (principalmente en el duodeno y primera porción del yeyuno) adherido a las microvellosidades del epitelio por medio de los discos suctor donde proliferan en un entorno alcalino (pH= 6.8-7.2) y absorben los nutrientes del tubo digestivo hasta que el contenido intestinal inicia el proceso de deshidratación, momento en el que comienza el proceso de enquistamiento en el íleon, favorecido por el medio alcalino que proporciona la secreción biliar.¹⁹ En el colon descendente, si el tiempo de tránsito lo permite, los flagelos se retraen hacia las vainas citoplásmicas, adquiere una morfología ovalada, se rodea de una pared quística lisa de color café y se elimina. Los quistes expulsados junto a las heces ya son infectantes. Cuando dichos quistes son ingeridos por un nuevo hospedador, llegan al duodeno, donde se disuelve la pared quística, cerrando así su ciclo vital (**Figura 2**).⁴

Existen tres formas fundamentales de transmisión: a través del agua, la comida y la transmisión feco-oral entre individuos infectados. El agua es la principal fuente de transmisión, ya que los quistes de *Giardia* son resistentes al agua fría, siendo una causa frecuente de diarrea entre excursionistas que beben agua no tratada adecuadamente. La transmisión por alimentos se da sobre todo en viajeros al consumir comida cruda o poco cocinada, y la transmisión interpersonal es la responsable de la elevada prevalencia de esta parasitosis en niños que acuden a guarderías, en residencias de ancianos, por la incontinencia fecal y en hombres homosexuales o heterosexuales que practican sexo anal sin protección.^{1,11}

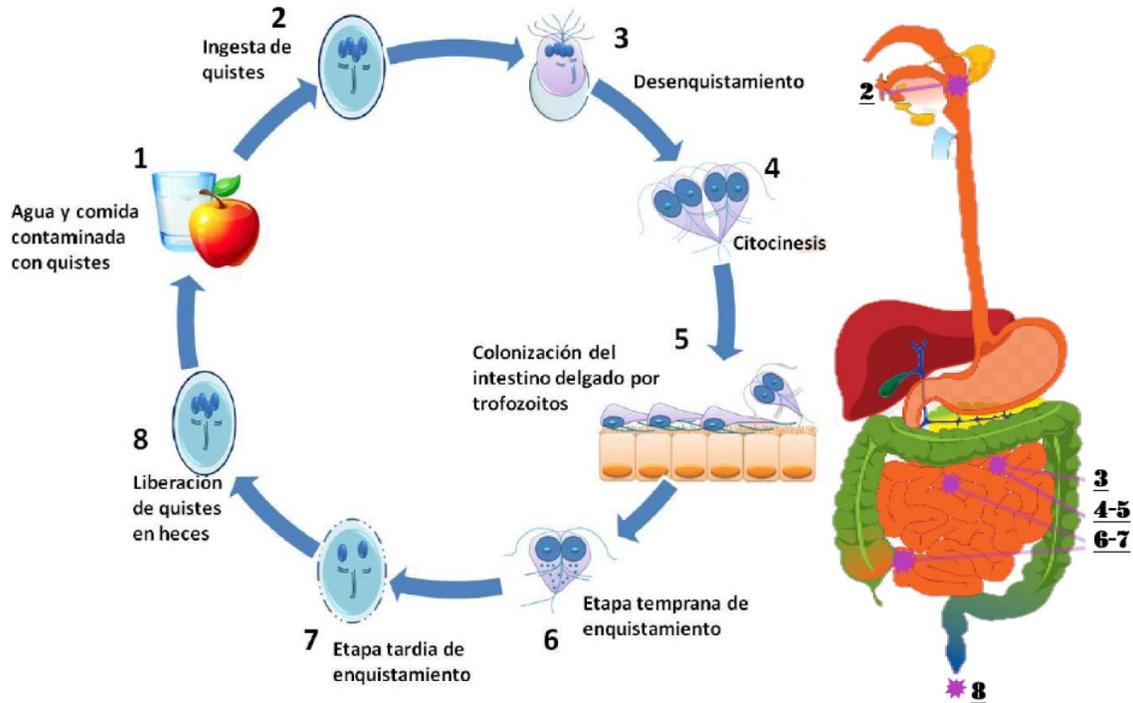


Figura 2 Ciclo de vida de *Giardia lamblia*.¹⁷

2.5.1.3 EPIDEMIOLOGIA

G. lamblia es un parásito intestinal que infecta a un amplio rango de hospederos vertebrados y tiene una distribución cosmopolita. Se estima que hay alrededor de 280 millones de casos de giardiasis al año, reportados igualmente en ciudades desarrolladas y en vías de desarrollo.¹⁴ En países desarrollados se estima una prevalencia del 2-7 % y en países en vías de desarrollo hasta del 20-30%.⁸ En 2004 la giardiasis se incluyó en la iniciativa de la OMS como una enfermedad desatendida.¹⁸ La epidemiología de la giardiasis es compleja debido a las diferencias que se presentan entre las poblaciones parasitarias incluidas dentro de la especie *G. lamblia*. En México durante el año 2019, la giardiasis tuvo una alta prevalencia en niños de 1 a 9 años, asociada a malnutrición, anemia y alteraciones en el desarrollo. La enfermedad se registró durante todo el año con el mayor número de casos en mayo y octubre, dando un estimado de 11306 casos nuevos de giardiasis. Actualmente la giardiasis, es un problema de salud pública en nuestro país.²¹

2.5.2 TRICOMONIASIS

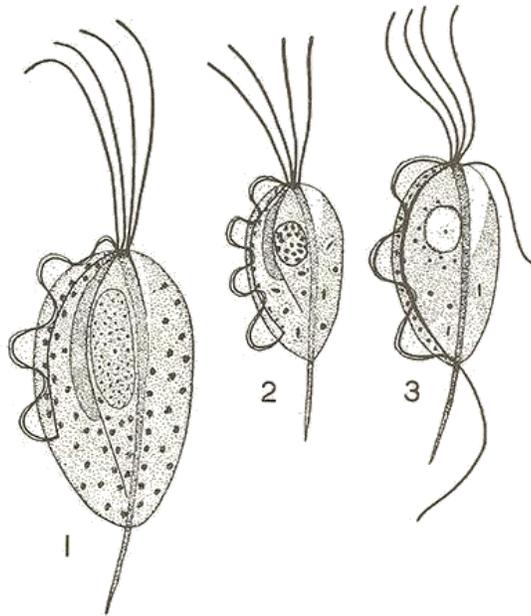


Figura 3 Especies de tricomonas infectivas en el ser humano: 1) *T. vaginalis*, 2) *T. tenax* y 3) *T. hominis*.²²

Esta enfermedad es debida a una infección del aparato genitourinario y digestivo del hombre y una gran variedad de animales por protozoos flagelados del género *Trichomonas* que ataca principalmente el aparato urogenital, sin embargo, tres especies de *Trichomonas* pueden estar presentes en el ser humano: *T. tenax*; parásito comensal propio de la cavidad bucal, *T. hominis*; característica del tubo digestivo, sin ser claramente patógenas y *T. vaginalis*, siendo la más grande y patógena de las tres especies (**Figura 3**).^{8,11}

En 1836, Alfred Donné describió el parásito que hoy se conoce como *Trichomonas vaginalis* como “animalículos” presentes en secreciones genitourinarias humanas. El nombre proviene de su similitud con los escarabajos de la especie *Trichodes*. En 1938 se la designó como *Trichomonas vaginalis*, debido a la demostración de que la vagina humana es su hábitat normal.²³

La tricomoniasis resulta asintomática en al menos un 50% de las mujeres y un 70-80% de los hombres, sin embargo, la tricomoniasis sintomática se manifiesta por una secreción vaginal o uretral, dolor pelviano, disuria (micción dolorosa) y picor en los



genitales. Dicha infección tiene resultados crónicos no mortales, pero de consecuencias graves, en mujeres embarazadas, afecta la fertilidad, provoca partos prematuros y nacimiento de infantes de bajo peso y con posible retraso mental; hace más susceptible a la infección por VIH y predispone al cáncer cérvicouterino y de próstata. Aunque los hombres son portadores del parásito, rara vez presentan síntomas de la infección, aunque puede haber una uretritis.^{24,25}

2.5.2.1 MORFOLOGÍA

El protozoo del género *trichomonas* es un parásito microscópico móvil, donde su forma de trofozoíto es la forma usual e infectante del parásito. No se han descrito formas quísticas; sin embargo, en situaciones desfavorables, *T. vaginalis* puede interiorizar sus flagelos y adoptar una configuración de pseudoquiste.²³

El trofozoíto de *T. vaginalis*, patógeno para el ser humano, consta de una forma piriforme, mide de 7 μm de diámetro y 10-23 μm (con una media de 13 μm) de largo.⁸ Su motilidad está conformada por cinco flagelos, cuatro anteriores libres que nacen en el blefaroplasto, encima del núcleo y el sobrante adherido al borde de su superficie que corre sobre el borde externo de la membrana ondulante (**Figura 4**), sobre la base de esta membrana se encuentra una estructura estriada conocida como costa, la cual le brinda resistencia a la estructura del parásito.^{2,11} En su citoplasma están presentes el aparato de Golgi, retículo endoplásmico, vacuolas y granulos de glucógeno, carece de mitocondrias, sin embargo, en su lugar se encuentran hidrogenosomas productores de energía y encargados de producir el hidrógeno molecular mediante la fermentación de carbohidratos, además un núcleo situado en el tercio anterior del parásito, que alberga seis cromosomas.²³ A diferencia de las otras especies, *T. vaginalis* contiene gránulos de glucógeno y estructuras similares a los lisosomas en una célula animal.⁸

Este parásito es pleomórfico; en secreciones vaginales o uretrales o cultivos *in vitro* se puede observar como ovoide o piriforme, por el contrario, tras la adherencia a las células del epitelio genital tiende a adoptar una morfología ameboide.¹ Los parásitos

encontrados en pacientes sintomáticos adoptan una forma más redonda, son más pequeños y sus flagelos son desiguales.¹²

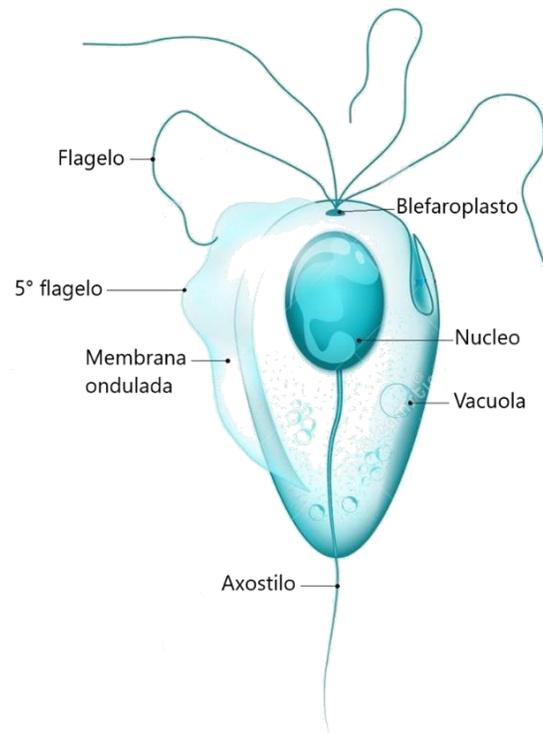


Figura 4 Morfología de *T. vaginalis*

2.5.2.2 CICLO DE VIDA Y PATOGENIA

Trichomonas tiene un ciclo de vida simple (**Figura 5**) y solo se encuentra en forma de trofozoito, que se transmite de persona a persona principalmente por contacto sexual,²⁵ sin embargo, a pesar de carecer de una forma quística, puede sobrevivir fuera del hospedador humano por una o dos horas en superficies húmedas, en orina, semen y agua, es variable hasta por 24 horas,² por lo que existe transmisión directa a través de fómites; objetos inanimados que pueden servir como vectores, tales como toallas, piscinas temperadas, material quirúrgico mal desinfectado, etc.¹¹

Una vez que el parásito invade la mucosa genital, tiene preferencia por localizarse, en el caso de la mujer, en las glándulas de Bartholino y parauretrales y en sus secreciones, además de la vagina y el cérvix. En el hombre coloniza principalmente el

surco balano-prepucial, las glándulas prepuciales, la uretra prostática y vesículas seminales.^{1,23}

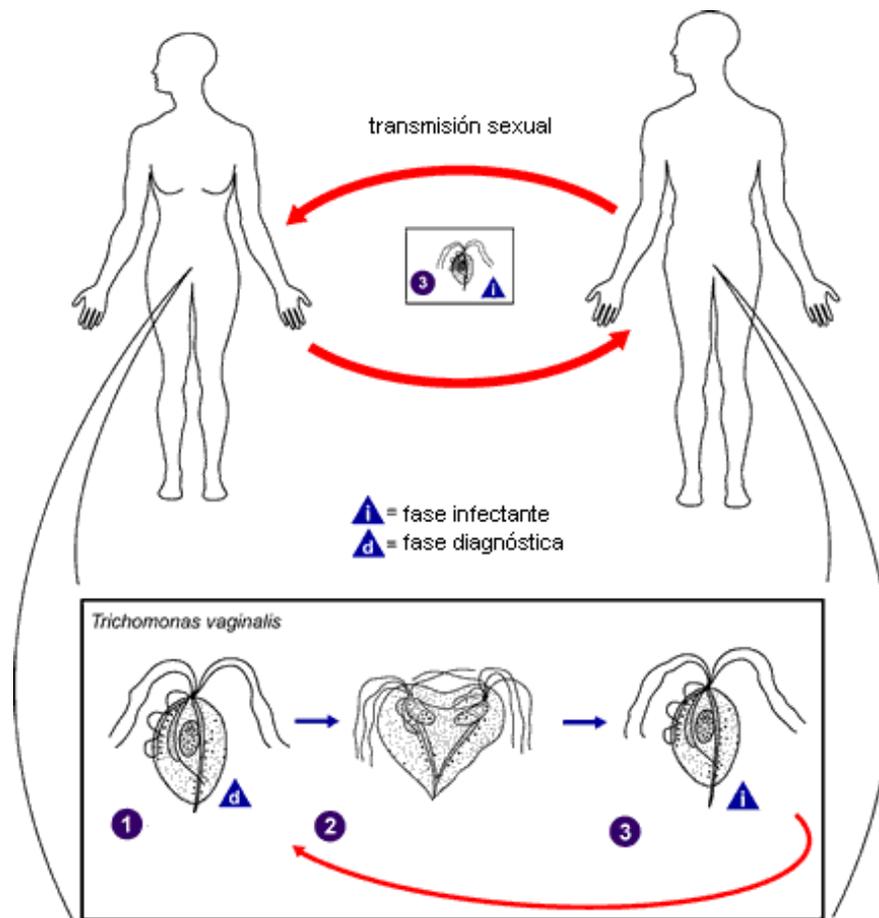


Figura 5 Ciclo de vida de *T. vaginalis*.²²

El primer evento patogénico de la tricomoniasis es la adhesión del protozoo a la mucosa genital, tras lo cual ocasiona lesiones por varios mecanismos:

- Producción de citoquinas que lesionan el epitelio genital, fagocita las células de epitelio vaginal, neutrófilos y eritrocitos, nutriéndose del colesterol de la membrana y el hierro de la hemoglobina de estos últimos.^{8,23}
- Alteración de la microbiota de la vagina de tal forma que disminuye la concentración de *Lactobacillus vaginalis*.¹²
- Consumo de arginina que es utilizada por el protozoo para la obtención de energía. En este proceso se generan grandes cantidades de putrescina, responsable de la elevación del pH y del olor fétido que presenta el flujo vaginal.^{23,25}



El pH alcalino es ideal para que *T. vaginalis* produzca la infección. Durante la excitación y el acto sexual, la mujer secreta fluidos que aumentan el pH vaginal normalmente ácido, además, el semen que es alcalino favorece la transmisión del parásito.²³

Durante el parto, las mujeres infectadas pueden transmitir el parásito verticalmente al recién nacido, produciéndole una infección genitourinaria o una neumonía neonatal. En individuos que practican el sexo oral ha habido informes del parásito en las vías respiratorias bajas, produciendo neumonía.²⁵

2.5.2.3 EPIDEMIOLOGIA

Las ITS tienen efectos profundos en la salud sexual y reproductiva en todo el mundo. La tricomoniasis es la ITS curable más frecuente a nivel mundial.²⁶ Se estima que entre 120 – 180 millones de mujeres sufren la infección anualmente en el mundo; 25% de las mujeres con vida sexual activa sufren infección en algún momento durante su vida y del 30 a 70% de los varones se encuentran parasitados, al menos en forma transitoria.² En las ITS son frecuentes las coinfecciones. En la tricomoniasis, las coinfecciones más frecuentes ocurren con *Neisseria gonorrhoeae* en un 20-50% y con *Gardnerella vaginalis*. Por el contrario, la coinfección con hongos es baja posiblemente debido al diferente pH vaginal en que se desarrollan ambas infecciones, pH ligeramente alcalino para *T. vaginalis* y pH ligeramente ácido para los hongos.¹¹

En México durante el año 2019, la tricomoniasis tuvo una alta prevalencia en personas de 25 a 44 años, asociada a vida sexual activa y sin protección. La enfermedad se registró durante todo el año manteniendo cifras elevadas de nuevos casos durante todo el año, dando un estimado de 39375 casos de tricomoniasis.²⁷



2.6 DIAGNÓSTICO

El examen coproparasitario, el cual utiliza un frotis directo de heces, es muy utilizado para el diagnóstico de los protozoarios intestinales, tiene entre sus características, la sencillez y rapidez para llevarlo a cabo, además de lo económico que resulta realizarlo.²⁸ Para el diagnóstico de giardiasis, se establece al encontrar quistes en heces formadas o trofozoítos en evacuaciones diarreicas, secreciones duodenales o muestras de biopsia de yeyuno.⁵ Un ejemplo de este es la concentración y purificación de quistes mediante la técnica de Faust; el cual consiste, de manera general, en lavar varias veces los quistes por centrifugación con agua destilada. La axenización (formación por una única especie) se consigue manteniendo los quistes 5 min en solución de hipoclorito sódico al 3.5% y después lavando varias veces con agua destilada.¹¹ En pacientes con síntomas agudos, por lo común puede demostrarse la presencia del parásito al examinar de una a tres muestras de heces procesadas con técnicas apropiadas de concentración y tinción.² Por otro lado, el uso de inmunoensayos fecales, son más sensibles y específicos, estos utilizan anticuerpos monoclonales específicos frente a *Giardia lamblia* que detectan todas las formas del ciclo vital del parásito.^{11,29}

Por otro lado, la visualización microscópica de las secreciones vaginales o uretrales en fresco continúa siendo el método más común para el diagnóstico de *T. vaginalis*, debido a su bajo coste y simplicidad.⁴ El dato característico es la presencia de formas móviles, con movimiento errático y giratorio, y un aumento de leucocitos polimorfonucleares. La limitación de esta técnica es su baja sensibilidad (60-70 %) que puede disminuir al 20 % si se retrasa la visualización microscópica más allá de 10 minutos tras la recolección de la muestra. La tinción directa con anticuerpos inmunofluorescentes resulta ser más sensible (70 a 90%).^{1,12}



2.7 TRATAMIENTO

El enfoque global para la prevención y el tratamiento de las enfermedades parasitarias debe incluir varias estrategias, incluida la mejora de la higiene y el saneamiento, el control del vector de la enfermedad y la administración profiláctica y terapéutica de medicamentos seguros y eficaces de actividad quimioterapéutica.³⁰

El tratamiento para estas parasitosis consiste en la administración de alguno de los agentes observados en la **Tabla 5**, los cuales pueden administrarse en forma individual o combinada según sea la gravedad de la parasitosis.^{1,2,12}

En la infección causada por *G. lamblia*, los agentes de elección comúnmente utilizados son a base de nitroheterociclos como metronidazol y nitazoxanida. Las tasas de curación con metronidazol son casi siempre >90%, sin embargo, en los últimos años se han reportado resistencia por parte del parásito a este, por lo que el uso de nitazoxanida ha sido de preferencia ante pacientes que han presentado resistencia a metronidazol.^{1,12} Por otro lado, fármacos de segunda línea como el tinidazol, quinacrina y albendazol han presentado ser igual o más efectivos que el metronidazol a dosis recomendadas, sin mencionar que el albendazol, cuenta con menos efectos adversos.¹² La mayoría de los agentes giardisidas presentan toxicidad al ser administrados en mujeres embarazadas, por lo que la administración de paromomicina, es una alternativa ante embarazadas sintomáticas.¹²

Debido a que la giardiasis invade principalmente a niños, una de sus limitaciones es la formulación farmacéutica, en donde se sugiere la administración de albendazol y metronidazol a pacientes que pueden ingerir tabletas y la furazolidona a pacientes pediátricos por su presentación en suspensión.^{2,11}

Por otro lado, el agente de elección para tratar esta ITS causada por *T. vaginalis* es el metronidazol el cual ha reportado ser extremadamente eficaz a dosis recomendadas con tasas de curación de más de 95%,³¹ usualmente en la mujer se debe agregar a la terapia oral un óvulo.^{2,11} Si bien, se han presentado casos de resistencia a el mismo, puede requerir un nuevo tratamiento con dosis más altas o la utilización de nuevos agentes como el tinidazol.¹



Para evitar una reinfección por cualquiera de las parasitosis antes mencionadas, es necesario tomar en cuenta que el tratamiento debe consolidarse no solo al paciente, sino que en caso de ser pareja debe tomarse de manera simultánea, aunque no haya síntomas en alguno de los dos, así mismo, a familiares con los que compartan una misma vivienda.³³ En caso de reinfecciones, deben contemplarse los siguientes aspectos:^{1,2}

- Mala manipulación de alimentos.
- Empleo de agua no potable.
- Educación sanitaria insuficiente de la población.
- Resistencia parasitaria al fármaco.
- Deficiente respuesta inmune del hospedero.

2.7.1 GRUPOS NITROHETEROCICLOS EN FÁRMACOS ANTIPARASITARIOS

Como se ha mencionado anteriormente, el grupo nitro (**-NO₂**) se encuentra presente en una gran variedad de medicamentos antiparasitarios, no obstante, este grupo también ha tenido participación en una gran variedad de fármacos con actividad antineoplásica, antihipertensiva, antiinflamatoria y antibiótica, así como también en agentes fungicidas, tranquilizantes, insecticidas y herbicidas, considerado como un grupo funcional único y versátil en la química farmacéutica y agroquímica.^{8,34}

Los primeros compuestos nitroheterocíclicos utilizados en quimioterapia fueron los nitrofuranos, los cuales se han utilizado para tratar varios tipos de infecciones bacterianas durante más de 50 años.³⁴ A partir de ellos y sus buenos resultados como antibacterianos y antiparasitarios, surgen los agentes nitroazolicos, donde se muestran algunos de ellos en la **Figura 6**, estos son aromáticos, comúnmente de 5 miembros, en el que un par de electrones solitarios del nitrógeno(nitroimidazol), oxígeno (furano) o azufre (tiazol) están deslocalizados en el anillo, el grupo nitro de estos profármacos es necesario que esté presente en la posición 5 para poder llevar a cabo su actividad de citotoxicidad como agente antiparasitario.^{35,36}

Uno de los agentes nitroheterocíclicos con actividad antiparasitaria más representativo es el metronidazol (**vi. Figura 6**), utilizado para el tratamiento de la uretritis y vaginitis

causada por *Trichomonas vaginalis*, además de estar indicado contra *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* y algunas infecciones bacterianas anaerobias.^{1,37}

Los efectos adversos más importantes presentes en estos compuestos nitroheterocíclicos, son las molestias gastrointestinales y el sabor metálico,¹² en su mayoría se ha de evitar el consumo de alcohol durante los tratamientos con estos agentes, debido a que el fármaco inhibe la enzima aldehído-deshidrogenasa. La ingesta de alcohol durante los tratamientos da lugar a vómito, cefalea y dolor gastrointestinal por acumulación de acetaldehído (efecto antabus-disulfiram).³³

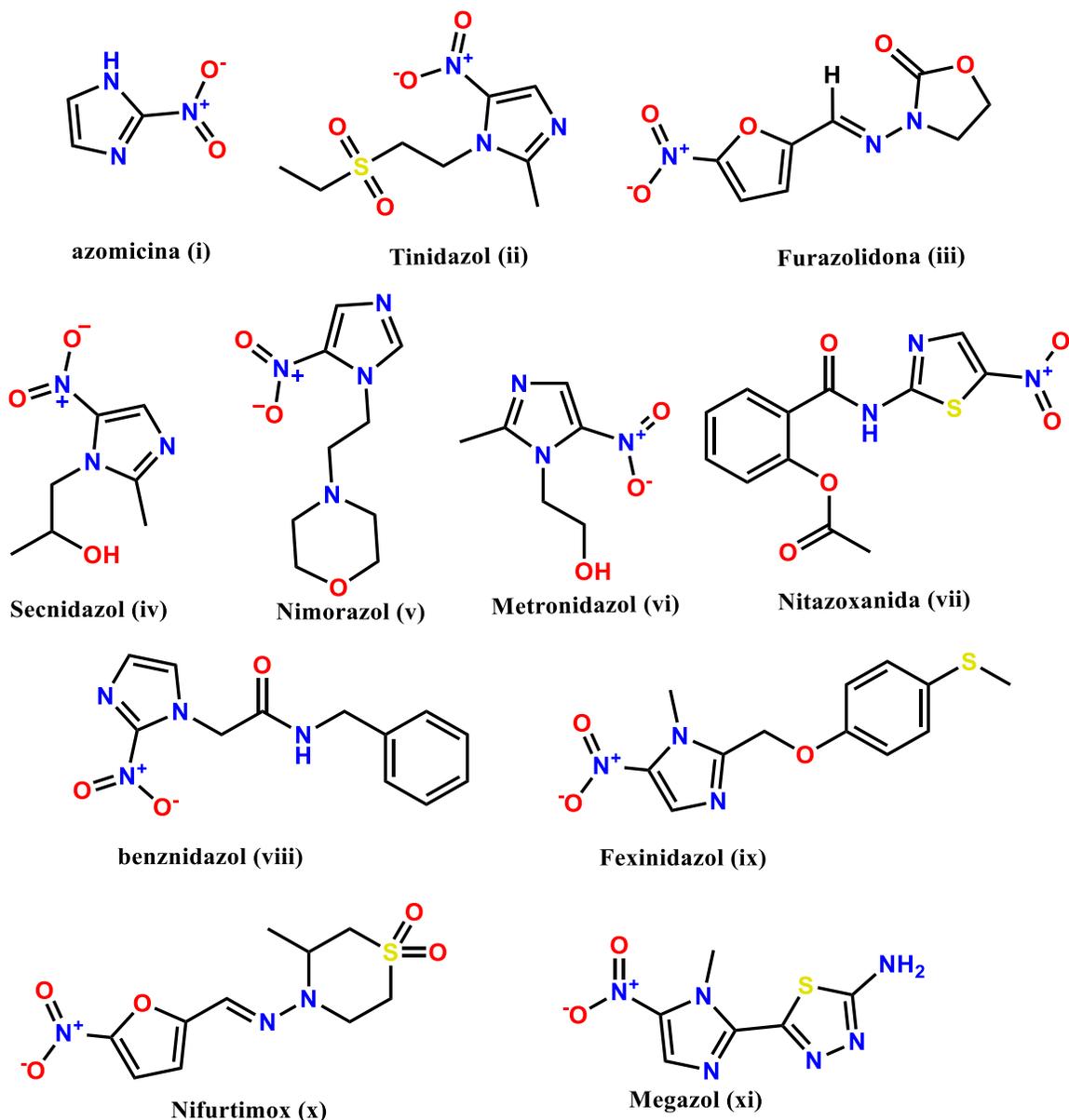


Figura 6 Fármacos nitroheterocíclicos con propiedades antiparasitaria y antimicrobiana.³⁸



En general, los medicamentos que contienen grupos nitro han sido ampliamente asociados con la mutagenicidad y la genotoxicidad, las principales causas de esta toxicidad son la formación de radicales de nitro-anión, derivados nitrosos y el metabolito intermediario hidroxilamina.^{34,38} Sin embargo, es posible reducir esta toxicidad utilizando la estrategia de latencia, en la obtención de profármacos, estos tienen la capacidad de sufrir reducción una vez que se difunden al interior del trofozoito del parásito, donde pueden servir como profármacos debido a su bioactivación por reducción enzimática, generando especies reactivas y finalmente induciendo efectos biológicos.³⁸

2.8 ENZIMA PIRUVATO FERREDOXINAOXIDORREDUCTASA (PFOR)

La descarboxilación oxidativa del piruvato es una reacción fundamental de los organismos vivos en general. Los parásitos anteriormente mencionados tienen la característica de ser organismos anaerobios o aerotolerantes (pueden desarrollarse en presencia de oxígeno pero no lo utilizan para la obtención de energía), es decir que carecen de mitocondria, por lo que en lugar de llevar a cabo una descarboxilación por medio de respiración celular como en los organismos aerobios utilizando la enzima piruvato deshidrogenasa en lugar de mitocondria, estos microorganismos descomponen la molécula del piruvato en el citosol. La producción de energía en *G. lambia* surge a través de glucólisis anaeróbica en el mitosoma, mientras que en *T. vaginalis* lo hace dentro del hidrogenosoma.³⁹

La enzima piruvato ferredoxinaoxidoreductasa (PFOR) es de gran importancia para el parásito, ya que el mismo carece de piruvato deshidrogenasa o piruvato descarboxilasa. Esta metalo-enzima que contiene tres núcleos de hierro-azufre [4Fe-4S] se encarga de descarboxilar oxidativamente al piruvato a acetil-CoA. Los electrones son transferidos a una ferredoxina, la cual luego deberá reducir otros sustratos.⁴⁰

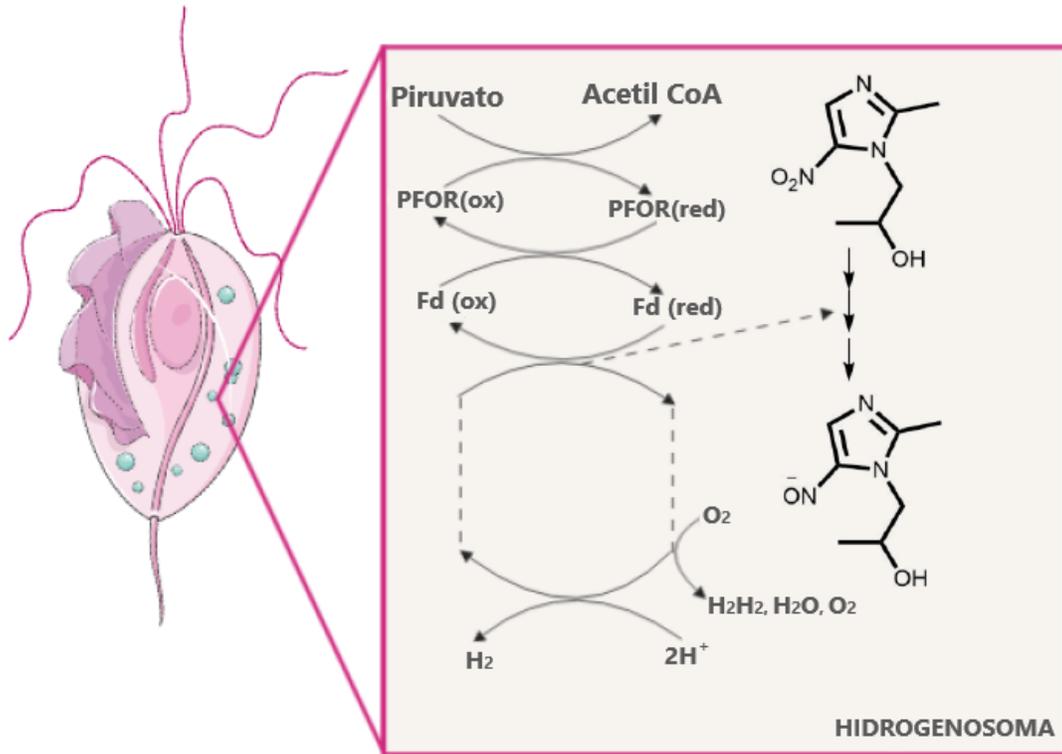


Figura 7 Mecanismo de acción de nitroimidazoles en *T. vaginalis*.⁸

Por otra parte, un fármaco nitroheterocíclico para ser activo farmacológicamente, debe llegar al citoplasma del parásito y ser reducido (por PFOR) en su grupo nitro originando nitrorradicales (**Figura 7**) quienes tienen las propiedades tóxicas. Esta reducción se lleva a cabo en tres pasos, donando dos electrones en cada paso a la vez que libera especies reactivas de oxígeno (ERO) tal como se muestra en la **Figura 8**. Estos nitrorradicales, productos de la reacción de reducción, se unen a macromoléculas de proteínas, ARN y ADN (perdiendo su estructura doble hélice) causando estrés oxidativo e interrumpiendo su duplicación, que da como resultado la muerte del trofozoíto.^{40,41}

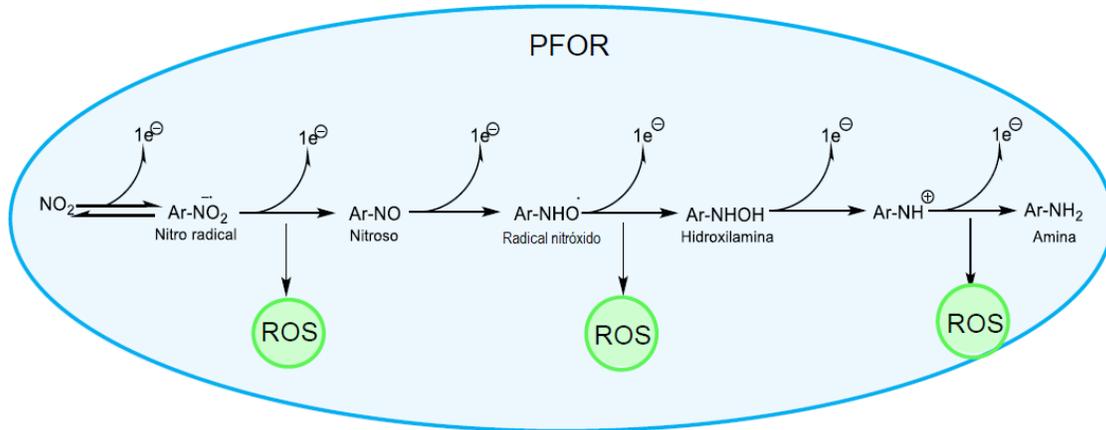


Figura 8 Mecanismo de reducción del grupo nitro.

Este camino de activación sucede solo en un ambiente anaerobio, por ejemplo, dentro de las células de los llamados amitocondriados (carentes de mitocondria), por otro lado, en un ambiente aerobio, como ser el caso de las células humanas, el nitroradical es inmediatamente re-oxidado dando origen a un ciclo fútil. Este proceso genera estrés oxidativo, pero no ocasiona un daño mayor a la célula aerobia, siendo así compuestos seguros para su uso como fármacos en humanos.⁴⁰ Sin embargo, las formas quísticas del parásito apenas se ven afectadas por estos agentes debido, casi con seguridad, a la escasa penetración del fármaco a través de la pared celular del quiste.³⁷

El desarrollo de resistencia del parásito hacia estos agentes cada vez ha sido más frecuente, se ha demostrado en estudios *in vitro*; y se debe a la disminución de la actividad de óxidoreductora de la ferredoxina.³⁹



3. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones por protozoarios tienen prevalencia a nivel mundial, reportándose casos principalmente de parasitosis de tipo intestinal, las cuales provocan un número no despreciable de niños infestados en nuestro país, donde se estima, que 7 de cada 10 niños se encuentran infectados. Las parasitosis intestinales, comúnmente ocasionadas por giardiasis o amebeasis, son el problema de salud más persistente en el mundo. No obstante, la tricomoniasis, es la infección no viral más frecuente como causa de ITS causando efectos profundos en la salud sexual y reproductiva en todo el mundo donde se calcula que más de 200 millones de personas al año sufren esta infección, de acuerdo con la OMS en México en el 2019 se registraron cerca de 40 mil casos en todo el año.

Estas parasitosis ocurren en mayor prevalencia en países en vías de desarrollo, donde la población afectada no cuenta con recursos tanto económicos como higiénicos para controlar o erradicar estas parasitosis. Al no representar un buen mercado para las farmacéuticas, estas no se enfocan en el desarrollo de fármacos más eficaces para estas infecciones denominadas como “enfermedades desatendidas”. Esto y el mal seguimiento terapéutico han provocado una resistencia por parte de los parásitos hacia los fármacos que son de primera elección, provocando una limitación en la terapéutica actual. Tomando en cuenta lo anterior, en este proyecto se pretende diseñar moléculas novedosas, para la contribución del desarrollo de moléculas bioactivas más eficaces y poder aportar con ellas alternativas terapéuticas. Con base en las propiedades químico-farmacéuticas del nimorazol, nos hemos centrado en el diseño de agentes con posible actividad antiprotozoaria tomando en cuenta la estructura química de este, donde se pretende aumentar la potencia de la nueva entidad química y disminuir su toxicidad.



4. Hipótesis

La serie de compuestos diseñados **MSA 1-6** presentarán *in silico* propiedades farmacodinámicas y ADME/tox adecuadas para el tratamiento de infecciones provocadas por los protozoarios *G. lambia* y *T. vaginalis*.

5. Objetivos

5.1 OBJETIVO GENERAL

- Diseñar los compuestos **MSA 1-6** y realizar predicciones *in silico* del comportamiento farmacocinético, toxicológico y el modo de unión que pueden presentar en la proteína piruvato ferredoxinaoxidoreductasa (PFOR) del parásito.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar 6 compuestos análogos de nimorazol (**MSA 1-6**).
- Predecir *in silico* la posible actividad antiprotozoaria de los compuestos diseñados, así como sus características farmacocinéticas (ADME) y toxicológicas, utilizando diversos programas quimiinformáticos.
- Realizar estudios de acoplamiento molecular para determinar el posible modo de unión en el blanco terapéutico PFOR.
- Determinar mediante un análisis de consenso farmacológico el compuesto con las mejores propiedades farmacocinéticas, farmacodinámicas y baja toxicidad para seleccionar al mejor hit computacional seguro para su futura evaluación biológica.
- Proponer una ruta de síntesis química de los compuestos diseñados para su obtención.

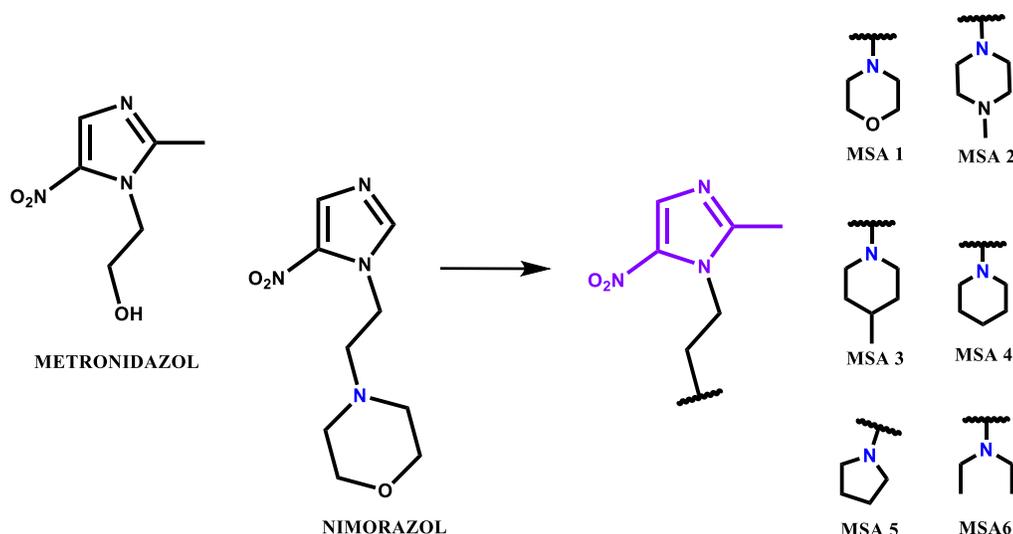


6. CONSIDERACIONES PARA EL DISEÑO MOLECULAR

Los compuestos nitroheterocíclicos son profármacos que requieren bio-reducción del grupo nitro para la actividad antiprotozoaria;³⁸ sin embargo, los objetivos exactos de las especies bio-reductoras (metabolitos activos) son desconocidos. Se cree que las especies bio-reductoras, que son altamente reactivas, dañan varios objetivos intracelulares, lo que lleva a la muerte celular.³⁷ Este mecanismo de muerte no es selectivo y no discrimina entre células eucariotas y procariotas. Por lo tanto, la selectividad demostrada de la clase de nitroimidazol debe provenir de un proceso selectivo de activación del fármaco.⁴¹ La resistencia que se ha presentado, por parte del parásito, ante fármacos de primera elección como es el metronidazol y su baja solubilidad del mismo, han provocado limitaciones en la terapia con este fármaco por lo que se buscan nuevas opciones farmacológicas que puedan contribuir a alternativas terapéuticas.

Los estudios experimentales con nimorazol, perteneciente a la familia de los 5-nitroimidazoles, han mostrado altas concentraciones sanguíneas y tisulares después de la administración oral, propiedad ligada a una buena absorción que ayuda a alcanzar una actividad terapéutica a una menor dosis, evitando así altas concentraciones que podrían causar algún tipo de toxicidad.⁴² Dicha propiedad de absorción, se le atribuye a la amina terciaria $[N(R)_3]$ presente en el anillo de morfolina (V. **Figura 5**). Los valores de pK_a de las aminas se encuentran en el intervalo de 6 a 8, por lo que están parcialmente ionizadas a un pH sanguíneo de 7.4, pueden equilibrarse fácilmente entre sus formas ionizadas y no ionizadas con un buen equilibrio de solubilidad en agua y grasas. Pueden atravesar la membrana celular en forma no ionizada, mientras que la forma ionizada proporciona buena solubilidad en agua y permite buenas interacciones de unión con los sitios de unión de su objetivo,⁴³ por lo que se usa como modelo para crear análogos a base de este para novedosos fármacos que cumplan con una buena biodisponibilidad y cuenten con potencial efecto antiprotozoario.

En el **Esquema 1** se presenta la hibridación de estas dos moléculas que se utilizarán para el diseño molecular de la serie **MSA 1-6**.



Esquema 1 Consideraciones para el diseño molecular de la serie **MSA 1-6**

Para el diseño racional de moléculas bioactivas como potenciales candidatos a fármacos, se analizaron diversos parámetros con la finalidad de aumentar la probabilidad de éxito. Para ello, el postulado de Lipinski o también conocido como la regla de las 5's, son aplicadas en moléculas que permean por un sistema celular mediante difusión pasiva, las cuales establecen que habrá problemas de permeabilidad, absorción y biodisponibilidad cuando no se cumplan algunos de estos postulados;⁴⁴

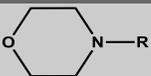
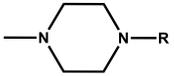
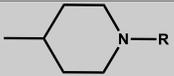
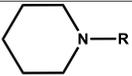
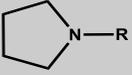
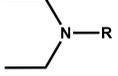
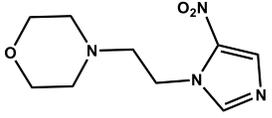
- Un número de donadores de puentes de hidrógeno menor a 5
- Un número de aceptores de puentes de hidrógeno menor a 10
- Un peso molecular menor a 500 g/mol
- Un valor de lipofilia (log P) menor a 5

Hay que recordar que, un puente de hidrógeno se forma a través de una diferencia de cargas electrostáticas entre un átomo electronegativo (N, O, F) y un hidrógeno unido a otro átomo electronegativo.

Para la determinación de estos postulados se utilizó el programa en línea Molinspiration Cheminformatics (Consulta en línea <http://molinspiration.com/>).

Los compuestos diseñados no deben presentar más de 2 violaciones a estos postulados para aumentar la probabilidad en la ausencia de problemas con la permeabilidad. Los resultados obtenidos en este programa para los compuestos **MSA 1-6** diseñados se plasman en la **Tabla 6**, donde se observa que ninguno de los compuestos diseñados (**MSA 1-6**) infringe con alguno de los postulados de Lipinski, por lo que se espera que estos compuestos cumplan con resultados positivos en cuanto permeabilidad, absorción y biodisponibilidad.

Tabla 6 Resultados de la evaluación en Molinspiration de los compuestos diseñados.

Compuestos	cLogP	Peso Molecular (g/mol)	n O,N	n OH,NH	No. De violaciones a las reglas	
MSA-1		0.04	240.26	7	0	0
MSA-2		1.34	252.32	6	0	0
MSA-3		0.09	253.31	7	0	0
MSA-4		1.10	238.29	6	0	0
MSA-5		0.60	224.26	6	0	0
MSA-6		0.95	226.28	6	0	0
MTZ	HO—R	-0.47	171.16	6	1	0
NIM		-0.05	226.24	7	0	0
Valores de referencia	<5	<500	<10	<5	<2	
Donadores de puente de oxígeno: n OH y NH						
Aceptores de puente de hidrógeno: n O y N						



7. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

La metodología empleada para este proyecto de investigación de tesis se dividió en dos partes:

Parte computacional: *in silico*

Se realizó con la ayuda de diversos programas quimio-informáticos que llevan a cabo cálculos y predicción posible de propiedades farmacológicas (Acoplamiento molecular, PASS), farmacocinéticas (admetSAR, molinspiration), toxicológicas (ACD/Toxsuite, admetSAR) y cuasi fármacos (OSIRIS). Estos análisis se realizaron en el Laboratorio 5 de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (FF-UAEM) bajo la dirección del Dr. Gabriel Navarrete Vázquez.

Parte química

El diseño molecular, así como una posible ruta sintética para su futura síntesis y análisis retrosintético de los compuestos **MSA 1-6** y el precursor **MSA 7** se llevaron a cabo en el Laboratorio 5 de Química Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (FF-UAEM) bajo la dirección del Dr. Gabriel Navarrete Vázquez.

7.1 PARTE COMPUTACIONAL: EVALUACIÓN *IN SILICO*

7.1.1 PASS: PREDICCIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Es un recurso quimio-informático diseñado para obtener una predicción de actividad biológica con base en la estructura química de compuestos orgánicos, la fórmula de la estructura a analizar es comparada con una base de datos de moléculas que tiene más de 4000 tipos de actividades biológicas con alta precisión (95%), la predicción está basada en la relación estructura-actividad (SAR) de compuestos ya reportados en la literatura.⁴⁵

Los resultados obtenidos se muestran en un listado organizado de mayor a menor en función de que un compuesto presente una Pa (probabilidad de actividad) y Pi (probabilidad de ser inactivo). Su consulta es de manera gratuita a través de la página en línea (**figura 9**) <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/predict.php>.

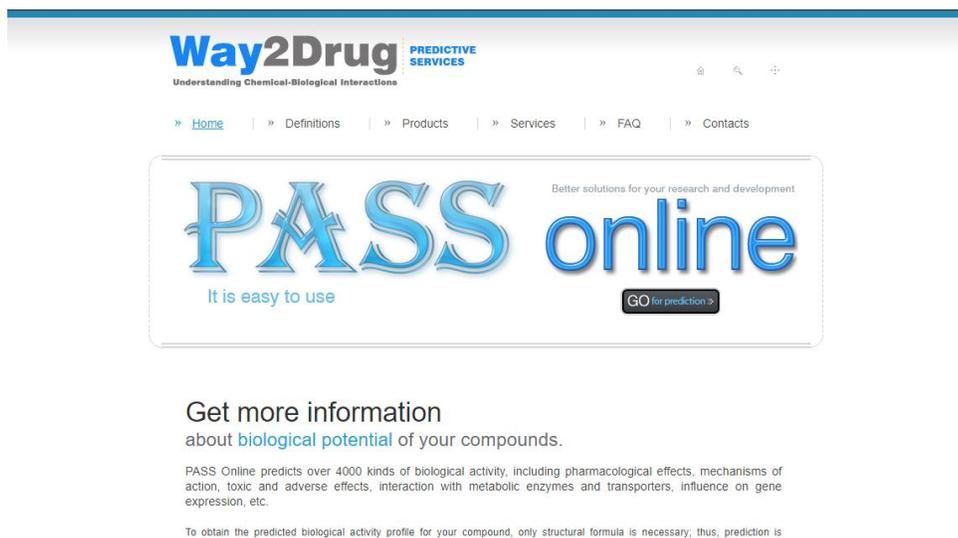
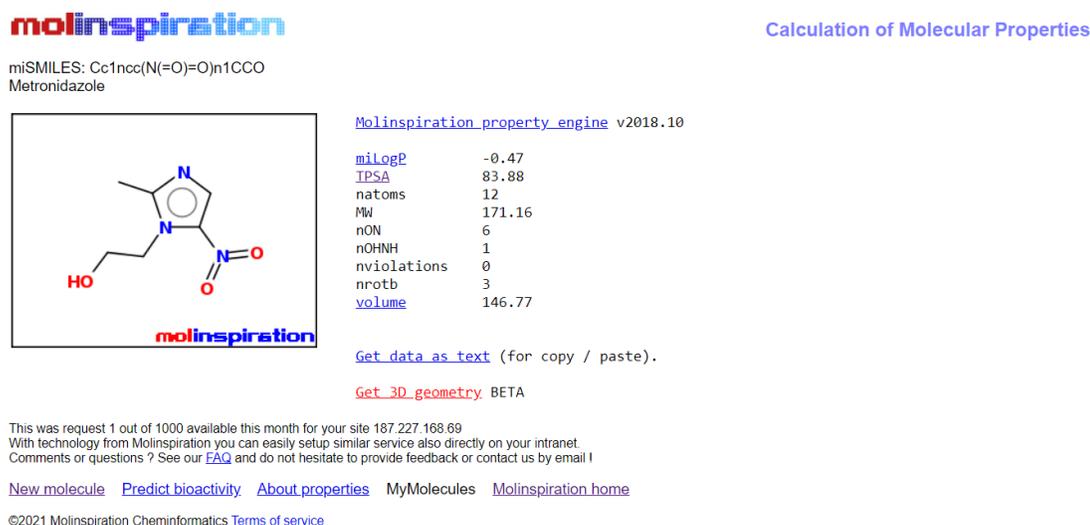


Figura 9 Ventana de inicio de PASS online.

7.1.2 MOLINSPIRATION: PREDICCIÓN DE PROPIEDADES FÍSICOQUÍMICAS.

La importancia de un buen perfil farmacocinético a la hora de diseñar alguna molécula candidata a fármaco es de gran importancia. Molinspiration es un portal en línea al cual se puede acceder de forma gratuita (<https://molinspiration.com>) donde podemos

recaudar información fisicoquímica de la molécula en cuestión como: Log P, TPSA (área polar superficial), peso molecular, número de aceptores y donadores de puentes de hidrógeno, número de enlaces rotables, entre otros, los cuales están ampliamente ligados a los postulados de Lipinski y Veber.⁴⁶



molinspiration

miSMILES: Cc1ncc(N(=O)=O)n1CCO
Metronidazole

[Molinspiration_property_engine](#) v2018.10

miLogP	-0.47
TPSA	83.88
natoms	12
MW	171.16
nON	6
nOHNH	1
nviolations	0
nrotb	3
volume	146.77

[Get_data_as_text](#) (for copy / paste).

[Get_3D_geometry](#) BETA

This was request 1 out of 1000 available this month for your site 187.227.168.69
With technology from Molinspiration you can easily setup similar service also directly on your intranet.
Comments or questions? See our [FAQ](#) and do not hesitate to provide feedback or contact us by email!

[New molecule](#) [Predict bioactivity](#) [About properties](#) [MyMolecules](#) [Molinspiration home](#)

©2021 Molinspiration Cheminformatics [Terms of service](#)

Figura 10 Interfaz del portal en línea de molinspiration.

7.1.3 admetSAR: PREDICCIÓN DE PROPIEDADES ADME/Tox.

Conocer las propiedades farmacocinéticas de un compuesto bioactivo es de suma importancia, ya que para que este ejerza su efecto depende de procesos como absorción, distribución, metabolismo, excreción y conocer parámetros toxicológicos que esté presente.

Para lo anterior se emplea una plataforma en línea que se puede consultar de forma gratuita (<http://lmmd.ecust.edu.cn/admetSar2>) (**Figura 11**), esta arroja una serie de predicciones de propiedades ADMET de los compuestos a analizar por medio de una relación estructura-actividad (SAR) utilizando una gran variedad de moléculas químicas de la literatura publicada para un mayor análisis que ayuda al descubrimiento y desarrollo de moléculas bioactivas como potenciales candidatos a fármacos.⁴⁷

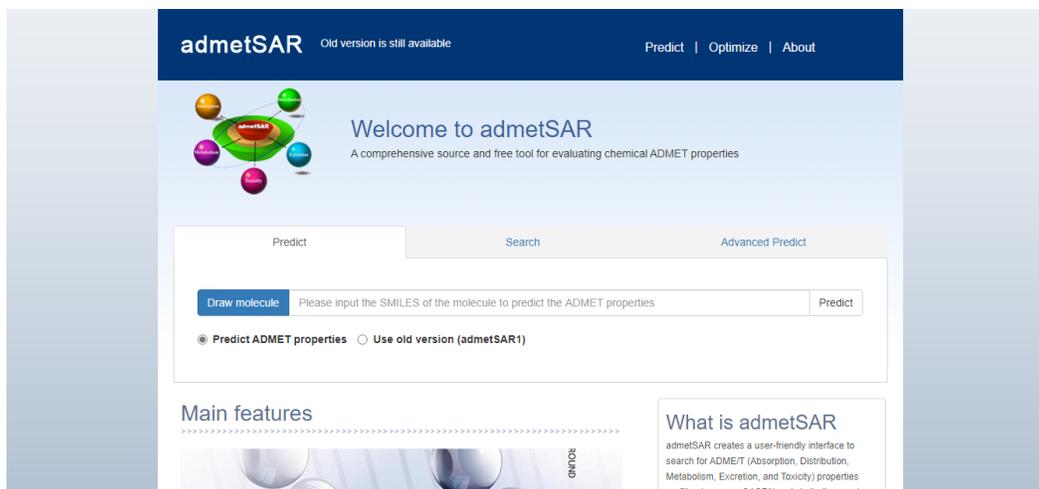


Figura 11 Página de inicio de admetsAR.

7.1.4 SwissADME: PREDICCIÓN DE PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS

Se puede ingresar al servidor SwissADME de forma web gratuita a través del portal de Swiss institute of bioinformatics en la página: <http://www.swissadme.ch/>. (Figura 12) SwissADME brinda información sobre la biodisponibilidad de la molécula en cuestión, así como propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas. Este servidor también brinda información como la presencia de PAINS (*pan assay interference compounds*) y alertas toxicológicas evaluando la química farmacéutica ⁴⁸

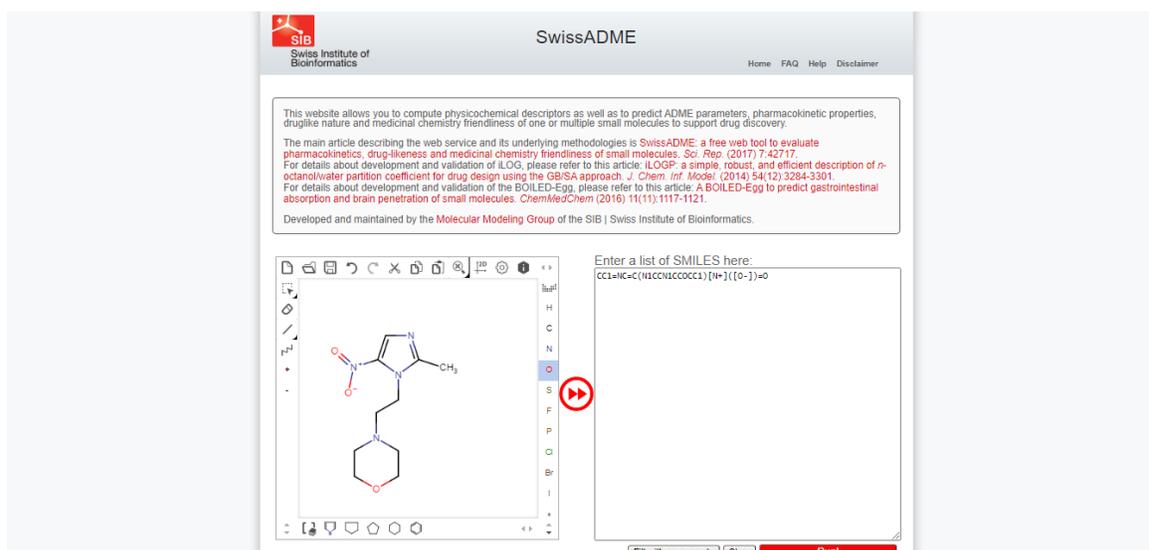
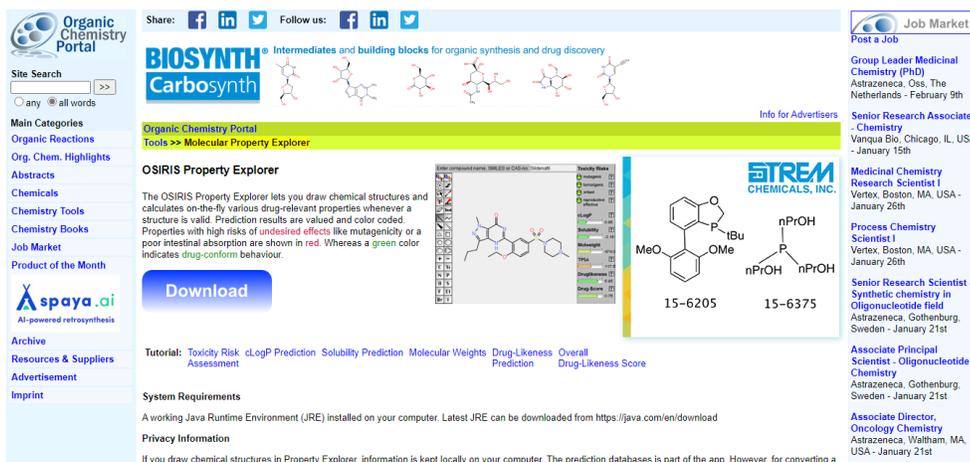


Figura 12 Interfaz de inicio de la página web SwissADME.

7.1.5 OSIRIS: PREDICCIÓN DE EFECTOS TOXICOS Y PROPIEDADES CUASI-FÁRMACO.

El programa quimio-informático OSIRIS es de libre descarga en el sitio web de *Organic Chemistry Portal*: <https://www.organic-chemistry.org/prog/peo/> (Figura 13). Su accesible uso nos permite calcular propiedades farmacocinéticas, que tienen un gran realce en propiedades de absorción tales como: solubilidad en medio acuoso, ClogP y TPSA. Así como también calcula valores toxicológicos como mutagenicidad, tumorigenicidad e irritabilidad, además de asignar un puntaje *drug-score*; el cual indica el potencial de la molécula de ser utilizada como fármaco, tomando en cuenta todos los parámetros anteriormente mencionados, entre más cercano sea a 1 este puntaje, mejor perfil presenta. ⁴⁹



The screenshot shows the Organic Chemistry Portal website. At the top, there is a search bar and social media links. The main content area features the 'OSIRIS Property Explorer' tool. A chemical structure is displayed with a color-coded property prediction table. The table includes columns for 'Property Name' and 'Value'. The predicted values for the two structures shown are 15-6205 and 15-6375. The interface also includes a 'Download' button and a 'Job Market' section on the right side.

Figura 13 Interfaz del sitio web para la adquisición de OSIRIS.

7.1.6 ACD/ToxSuite: PREDICCIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA.

Este software requiere licencia para su uso y permite la predicción cuantitativa de parámetros de evaluación básica de toxicidad aguda, basándose en una amplia base de datos, analizando la molécula por fragmentos estableciendo modelos de relación estructura-actividad cuantitativa (QSAR; por sus siglas en inglés: *Quantitative Structure-Activity Relationships*), obteniendo como resultado valores numéricos para pruebas como; bloqueo de canales hERG, inhibición de alguna de las isoformas de CYP3A4, genotoxicidad, toxicidad aguda, toxicidad acuática, efectos sobre la salud

(irritación y alteración del sistema endocrino). ACD/ToxSuite evalúa también la DL_{50} (dosis letal media) por diferentes vías de administración en rata y ratón. El conjunto de propiedades que posee el programa, ayuda a tener un mejor criterio de toxicidad de las moléculas al momento de diseñar compuestos con fines terapéuticos.⁵⁰

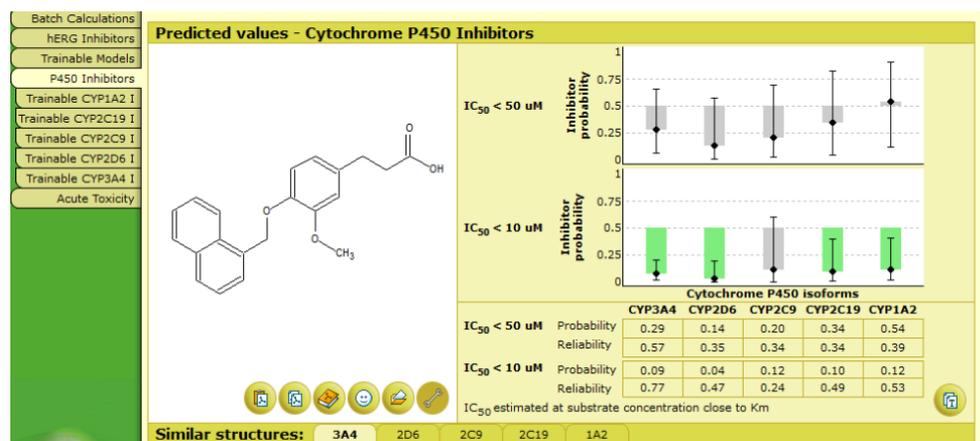


Figura 14 Interfaz del software ACD/ToxSuite

7.1.7 ACOPLAMIENTO MOLECULAR (DOCKING MOLECULAR)

En el proceso de diseño y descubrimiento de nuevos fármacos, el acoplamiento molecular automatizado (Molecular Docking) es una herramienta computacional muy útil, ya que te permite superponer la estructura tridimensional de un compuesto bioactivo sobre la diana terapéutica propuesta (acoplamiento ligando-proteína), con la finalidad de predecir la conformación más estable de unión de la molécula deseada con la proteína sobre la que se espere ejercerá su actividad biológica. No obstante, también te permite predecir el acoplamiento entre dos macromoléculas (acoplamiento proteína-proteína).⁵¹

Para llevar a cabo el estudio de acoplamiento molecular de este proyecto, se hizo uso de programas computacionales como Autodock y MOE (por sus siglas en inglés *Molecular Operating Environment*), así como también el uso de programas que facilitan la visualización molecular como PyMOL y Discovery Studio.

AutoDock (Figura 15) es un programa computacional de herramientas automatizadas de libre acceso (el cual se puede descargar de manera gratuita en la página [Downloads — MGLTools \(scripps.edu\)](#)), el cual te permite configurar, efectuar y analizar estudios de acoplamiento molecular. El programa ayuda a predecir como moléculas pequeñas, como sustratos o candidatos a fármacos, pueden llegar a interactuar con la diana terapéutica propuesta cuya estructura 3D es conocida. La distribución actual de AutoDock consta de dos generaciones de software: AutoDock 4 y AutoDock Vina.⁵² AutoDock Tools (**Figura 15**). Es una interfaz gráfica que ayuda a realizar el acoplamiento molecular configurando tipo de enlaces giratorios, análisis de datos, entre otras.

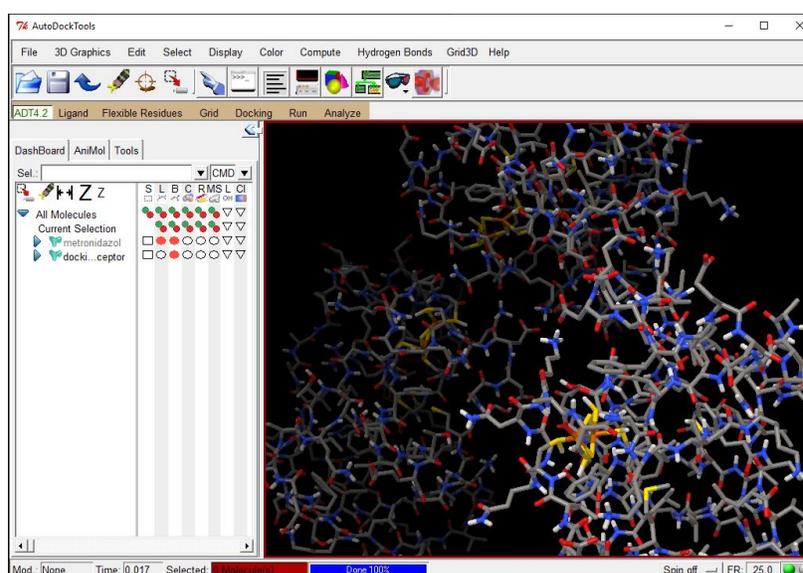


Figura 15 Interfaz del programa computacional AutodockTools

Molecular Opening Environment MOE (Figura 16) es un programa computacional que asiste el desarrollo de compuestos diseñados con potencial acción terapéutica. Su uso se limita al uso de licencia comercial la cual se puede obtener del sitio web: [Chemical Computing Group \(CCG\) | Request MOE Download Code \(chemcomp.com\)](#). Su utilidad para llevar a cabo diversos tipos de modelado tanto de moléculas pequeñas como macromoléculas es gracias al conjunto de herramientas con el que cuenta⁵³:

- Visualización molecular de las interacciones proteína-ligando en diagramas 2D y 3D
- Análisis y desarrollo de nuevas QSAR, así como algunas propiedades fisicoquímicas en pequeñas moléculas.



Figura 16 Interfaz del programa MOE

PyMOL (Figura 17) es un software con la finalidad de apoyo a la visualización molecular de moléculas pequeñas y macromoléculas, así como las interacciones entre estas (interacciones proteína-ligando). Su acceso es libre bajo el registro en su página web: [PyMOL | www.pymol.org](http://www.pymol.org)

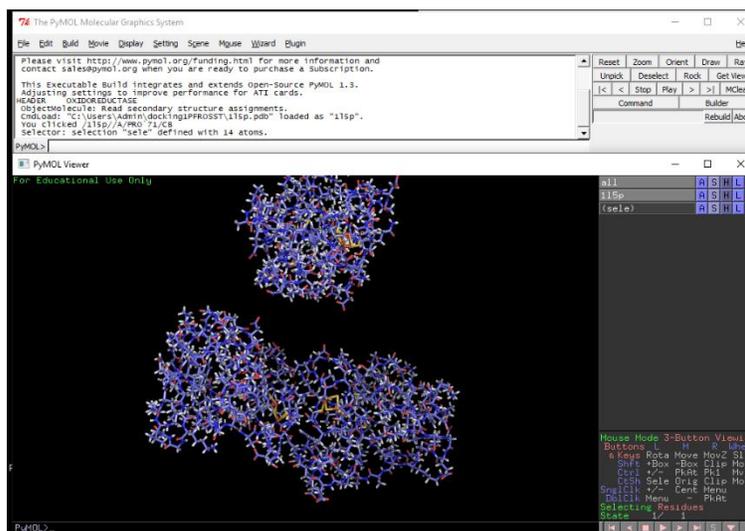


Figura 17 Interfaz del programa PyMOL de uso auxiliar para la visualización molecular.

BIOVIA Discovery Studio es utilizado para el modelado molecular, proporcionando diagramas en 2D y 3D sobre las interacciones ligando-proteína. Su acceso se puede obtener de manera gratuita de su sitio web: [3D Design & Engineering Software - Dassault Systèmes® \(3ds.com\)](http://3D Design & Engineering Software - Dassault Systèmes® (3ds.com)).

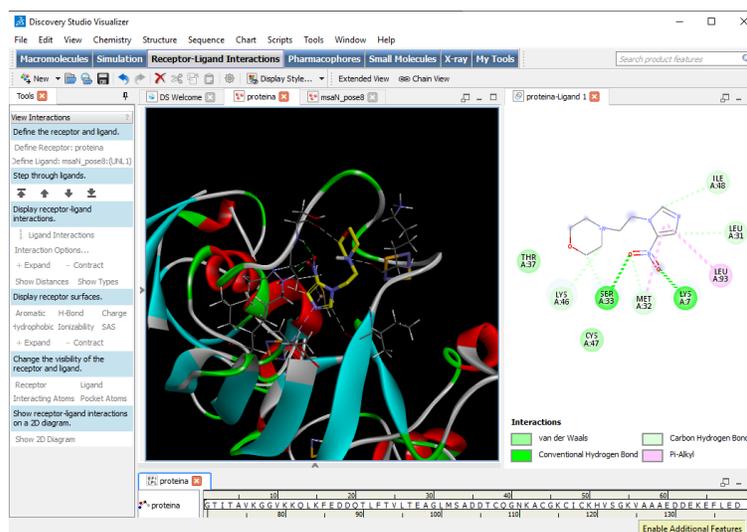


Figura 18 Interfaz del programa BIOVIA Discovery Studio, como visualizador molecular.

Este tipo de herramientas en conjunto, predice si la estructura de un ligando mantiene una interacción estable con el sitio diana y que por consiguiente esta sea biológicamente activa, esto les permite agilizar procesos en animales que podrían llevar largos tiempos y que generan costos extras.⁵⁴

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 PARTE *IN SILICO*

8.1.1 PASS: PREDICCIÓN DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA.

En la **Tabla 7** se observan los resultados correspondientes a los compuestos finales **MSA 1-6** así como también del Metronidazol y Nimorazol (fármacos propuestos como control). Cabe destacar que las probabilidades de actividad (P_a) arrojadas por este servidor están basadas en estudios QSAR de moléculas que existen en la base de datos del servidor PASS, por lo que estas probabilidades ayudan a plantear una hipótesis de la actividad que podrían tener en ensayos biológicos, por lo tanto, si los compuestos diseñados presentan buena actividad, estaremos hablando de nuevas entidades químicas con la actividad biológica propuesta.

Tabla 7 Predicción de actividad biológica por PASS para los compuestos **MSA 1-6**.

Compuesto	Antiprotozoario		Antiparasitario		Tricomonicida		Giardicida	
	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i	P_a	P_i
MSA-1	84.50%	0.20%	40.10%	3.10%	74.30%	0.20%	--	--
MSA-2	84.60%	0.30%	50.40%	1.50%	93.10%	0.10%	--	--
MSA-3	83.60%	0.30%	46.90%	1.90%	70.10%	0.20%	--	--
MSA-4	84.50%	0.30%	40.10%	3.10%	74.30%	0.20%	--	--
MSA-5	85%	0.30%	41.50%	2.80%	76.70%	0.20%	--	--
MSA-6	86.60%	0.20%	63.20%	0.80%	95.20%	0.10%	--	--
Metronidazol	85.0%	0.30%	51.6%	1.40%	96.8%	0.10%	--	--
Nimorazol	73.1%	0.40%	20.8%	9.4%	52.7%	0.30%	--	--

Los compuestos **MSA 1-6** presentaron probabilidades buenas de actuar como antiprotozoarios y tricomonocidas; destacando los compuestos **MSA 2** y **MSA 6** que obtuvieron probabilidades de actividad (P_a) similares a las del metronidazol de actuar como tricomonocida, como antiparasitarios en general obtuvieron probabilidades medias, destacando al compuesto **MSA 2** con probabilidades similares al metronidazol y a **MSA 6** con probabilidades superiores al mencionado. Por último, los fármacos de



referencia, así como la serie de compuestos obtuvieron probabilidades nulas de actuar como giardicidas, para el caso de la serie de compuestos diseñados, esto se puede deber al diseño novedoso de estas moléculas, por lo que no se encuentran reportadas en la base de datos de este servidor, sin embargo, por las consideraciones del diseño tomadas en cuenta, puede tener la actividad giardicida. Ninguno de los compuestos diseñados mostro probabilidad de inactividad (P_i) por encima de 3.2%.

8.1.2 admetSAR: PREDICCIÓN DE LAS PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS.

En la siguiente **Tabla 8**, en la cual se muestran los resultados obtenidos a través del servidor en línea admetSAR para la serie de compuestos **MSA 1-6**, se puede observar en los resultados de absorción; la serie de compuestos **MSA 1-6** presentan altas probabilidades de una buena absorción intestinal humana, así como de permear la barrera hematoencefalica, lo que les podría brindar una buena capacidad de poder llegar a nivel de sistema nervioso central, donde se han reportado parasitosis de importancia médica (neurocisticercosis, amibiasis, etc.), en las cuales, el único tratamiento farmacológico es el uso de altas dosis de estos agentes antiparasitarios que tienen como consecuencia el aumento de efectos adversos tóxicos. Los compuestos presentan resultados de buenos a moderados en cuanto a biodisponibilidad oral humana por lo que se prevé que su administración por vía oral sea una opción viable. Por otra parte, los compuestos obtuvieron resultados medios a altos de no inhibir y no ser sustrato de la glicoproteína-P, la cual es una bomba de eflujo relacionada con la resistencia a fármacos. Los compuestos presentaron resultados de probabilidad media de ser sustrato y buenos de no ser inhibidores de la isoforma más abundante de citocromo P450 en humanos, encargada del metabolismo de fármacos, por lo que se prevé que no habrá problema en interacciones fármaco-fármaco o fármaco-nutriente.

Por último, los parámetros toxicológicos, obtuvieron valores altos de no ser carcinogénicos y no tóxicos basado en la prueba de AMES; relacionada con genotoxicidad.

Además, presentan resultados moderados en cuanto a la toxicidad en abejas, las cuales juegan un rol en el ecosistema muy importante en el proceso de polinización.

Tabla 8 Propiedades obtenidas de admetSAR para la serie de compuestos **MSA 1-6**

	Criterio	MSA-1	MSA-2	MSA-3	MSA-4	MSA-5	MSA-6	MTZ
Absorción								
Absorción intestinal humana	AIH+	98.67%	98.91%	98.60%	98.70%	98.70%	98.91%	98.84%
Biodisponibilidad oral humana	HOB+	80.00%	64.29%	68.57%	71.43%	71.43%	78.57%	85.71%
Barrera hematoencefalica	BHE+	98.79%	98.69%	98.81%	98.94%	99.00%	98.69%	100.00%
Substrato glicoproteína-P	No sustrato	85.25%	77.94%	62.77%	78.91%	79.76%	80.22%	92.27%
Inhibidor glicoproteína-P	No inhibidor	96.88%	93.84%	93.23%	96.37%	96.93%	97.58%	97.12%
Metabolismo								
Substrato CYP450 3A4	Sustrato	54.97%	50.68%	53.40%	53.76%	54.86%	55.12%	63.20%
Inhibidor CYP450 3A4	No inhibidor	96.52%	95.62%	89.72%	93.14%	92.91%	93.49%	92.42%
Toxicidad								
Carcinogenicidad	No carcinógeno	95.71%	91.43%	97.14%	92.86%	92.86%	91.43%	91.43%
Toxicidad de AMES (Mutagenesis)	AMES no toxicos	92.00%	96.00%	91.00%	94.00%	94.00%	95.00%	100.00%
Toxicidad en abejas	No toxico	78.00%	75.87%	76.10%	79.59%	76.73%	67.25%	70.33%

8.1.3 OSIRIS: PREDICCIÓN TOXICOLÓGICA Y PROPIEDADES CUASI-FÁRMACO.

Por medio de este servidor se obtiene más información en cuanto a riesgos toxicológicos, así como propiedades relacionadas a su solubilidad y un puntaje (Drug-like y Drug-score) que permite determinar si la molécula de interés posee las características necesarias para calificar como un producto farmacéutico exitoso. Los resultados de probabilidad para la serie de compuestos **MSA 1-6** se muestran en la **Tabla 9**, en donde se utilizó como moléculas control a metronidazol y nimorazol.

Tabla 9 Propiedades cuasi-fármaco y riesgo de toxicidad de los compuestos **MSA 1-6**

Parámetro	MSA 1	MSA 2	MSA 3	MSA 4	MSA 5	MSA 6	MTZ	NIM
Ensayos de riesgo toxicológico								
Mutágeno	●	●	●	●	●	●	●	●
Tumorigeno	●	●	●	●	●	●	●	●
Irritante	●	●	●	●	●	●	●	●
Reproductivo	●	●	●	●	●	●	●	●
Parámetros fisicoquímicos								
logP	-1.79	-2.61	-0.38	-0.63	-0.97	-1.14	-1.05	-2.03
Solubilidad	0.1	0.6	-0.95	-0.79	-0.52	-0.44	-0.21	-0.27
PM g/mol	240.26	238.29	224.26	226.28	253.31	252.32	171.15	226.24
TPSA	76.11	70.12	66.88	66.88	66.88	66.88	83.87	76.11
Parámetros farmacológicos								
Drug-like	0.95	5.85	3.49	0.15	1.53	4.3	0.97	-2.29
Drug-Score	0.84	0.97	0.95	0.75	0.71	0.58	0.51	0.32
<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> Alto riesgo Sin riesgo </div>								

Como se puede observar la serie de compuestos no presentaron alertas de alto riesgo de acuerdo con la escala de semáforo de comportarse como mutágeno, tumorigeno, irritante o presentar riesgo en la reproducción, a excepción de los compuestos **MSA 5** y **MSA 6**, los cuales presentaron alertas medianas y altas respectivamente, de actuar como irritantes. De acuerdo a los valores de LogP obtenidos se estima que los



compuestos presentaran perfil hidrofílico, por lo que se puede apreciar también, buenos parámetros de solubilidad mejores que los fármacos de referencia, a excepción del compuesto **MSA 1** y **MSA 2**, no obstante, el compuesto **MSA 3** resalta por sus buenos resultados ya que se estima que valores óptimos de LogP van de un rango de entre -0.4 a 5.5 y valores de solubilidad alrededor de -4 es el promedio para la mayoría de los fármacos en la actualidad. Los valores del área polar superficial (TPSA), los cuales se estima que entre 60-90 Å² le confieren mayor probabilidad de atravesar barrera hematoencefálica (BHE), por lo que se estima que la serie de compuestos, al estar dentro del parámetro, puedan permear la BHE.

Adicionalmente OSIRIS realiza un análisis de tipo *drug-likeness* o cuasifármaco, analizando las moléculas de acuerdo con diversos postulados para el diseño racional de compuestos bioactivos, entre los cuales se puede destacar: Postulado de Lipinski, Regla de similitud a compuestos líderes (Lead Like Rule) y Regla de la Química Farmacéutica Racional (CMC Like Rules, en inglés).⁵⁵ En este análisis, los compuestos presentaron valores buenos presentándolos en un color verde, salvo el compuesto **MSA 4** que obtuvo un puntaje discreto (amarillo). Por último, en cuanto al Drug-score, el cual toma en cuenta los valores antes descritos, todos presentan valores de discretos a buenos, mayores a las moléculas control. Pese a que algunos compuestos presentaron alertas de color amarillo, estos se siguen considerando seguro.

8.1.4 ACD/Toxsuite: PREDICCIÓN DE LA TOXICIDAD.

En la **Tabla 10** se presentan los resultados de la serie de compuestos en porcentaje de inhibición a algunas de las isoformas de CYP 450, las cuales están involucradas en el metabolismo de fármacos, además de estar relacionadas con diversos efectos tóxicos y en diversas interacciones fármaco-fármaco o fármaco-alimento, así mismo, también la probabilidad de bloqueo a canales hERG (*human ether-a-go-go-related gen*) los cuales pertenecen a la familia de canales de K⁺ y son ampliamente expresados en tejido cardíaco. Este tipo de canales está involucrado en la repolarización de la membrana de las células cardíacas y su bloqueo está ampliamente relacionado con efectos cardiotóxicos, causando taquicardias o incluso la muerte.⁵⁶

Tabla 10 Resultados obtenidos por ACD/Toxsuite para **MSA 1-6**

Compuesto	Probabilidad de inhibición de isoformas de CYP 450 (IC ₅₀ 10 μM)					Probabilidad de bloqueo de canales hERG (IC ₅₀ 10 μM)
	3A4	2D6	2C9	2C19	1A2	
MSA-1	1%	4%	2%	1%	2%	20%
MSA-2	1%	12%	3%	2%	2%	29%
MSA-3	0%	17%	1%	0%	1%	30%
MSA-4	1%	10%	3%	2%	2%	32%
MSA-5	1%	8%	2%	1%	2%	18%
MSA-6	48%	8%	2%	1%	2%	21%
Metronidazol	1%	3%	5%	3%	4%	2%
Nimorazol	1%	4%	2%	2%	3%	21%
Ketoconazol	93%	2%	14%	13%	0.0%	96%
Clorfenamina	6%	33%	6%	9%	6%	79%

Como se puede observar, la serie de compuestos **MSA 1-6** resultaron con una probabilidad baja de inhibir alguna isoforma de CYP450, a excepción del compuesto **MSA-6** el cual obtuvo valores medios (48%) de inhibir la isoforma 3A4, la cual es la isoforma más común en los seres humanos, sin embargo, se han reportado fármacos comercialmente disponibles como el Ketoconazol (antifúngico) el cual presenta probabilidades altas de inhibición de la isoforma CYP 3A4 del 93%, por lo que comparado con este, los valores para el compuesto **MSA 6** aún se encuentran en valores aceptables.

Por otra parte, los compuestos presentaron una probabilidad del bloqueo de canales hERG que van del 18% al 32%, probabilidad relativamente baja en comparación a los fármacos ketoconazol (antifúngico) y clorfenamina (antihistamínico), los cuales obtuvieron una probabilidad del 96% y 79% respectivamente, fármacos que se siguen utilizando en la terapéutica actual, por lo que se puede prever que los compuestos no presentaran problema en el bloqueo de estos canales.

En la **tabla 11** se presentan los resultados de DL₅₀ (Dosis a la cual el 50% de los individuos sometidos a este ensayo muere) de los compuestos **MSA 1-6** obtenidos computacionalmente por el programa con base a distintas pruebas SAR en una administración por vía parenteral y oral en rata y ratón, así como su clasificación de acuerdo con los criterios de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (por sus siglas en inglés OECD).

Los resultados observados presentan una DL₅₀ alta en ambas vías de administración por lo que se puede estimar un buen índice terapéutico, ya que al presentar altas concentraciones de DL₅₀ se prevé una ventana terapéutica mayor que favorecería en situaciones donde se requiera aumentar una dosis, por otro lado, los compuestos diseñados están dentro de la categoría 4 (toxicidad moderada), categoría donde se catalogan la mayoría de los fármacos comercialmente disponibles (categoría OECD 4-5) descartando la posibilidad de que estos compuestos generen efectos tóxicos a dosis terapéuticas.

Tabla 11 Resultados de **MSA 1-6** por ACD/Toxsuite de DL₅₀ y categoría en OECD

Compuesto	Especie y vía de administración				Categoría OECD
	DL ₅₀ mg/kg				
	Rata		Ratón		
	IP	PO	IP	PO	
MSA-1	1200	1900	690	1500	4
MSA-2	930	2000	520	1200	4
MSA-3	570	1100	480	1000	4
MSA-4	1000	1900	570	1300	4
MSA-5	1200	1800	660	1400	4
MSA-6	960	1700	540	1300	4
Metronidazol	2200	2600	800	1600	4-5
Nimorazol	1400	1900	750	1500	4

Categoría OCDE 1: DL₅₀ ≤ 5mg/kg (Altamente tóxico),

Categoría OCDE 2: 5mg/kg < DL₅₀ ≤ 50mg/kg (Muy tóxico),

Categoría OCDE 3: 50mg/kg < DL₅₀ ≤ 300mg/kg (Tóxico),

Categoría OCDE 4: 300mg/kg < DL₅₀ ≤ 2000mg/kg (Toxicidad moderada),

Categoría OCDE 5: 2000mg/kg < DL₅₀ ≤ 5000mg/kg (Sin peligro)



8.1.5 swissADME: PREDICCIÓN DE PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS.

En la **Tabla 12** se pueden observar los resultados obtenidos por el servidor swissADME para cada uno de los compuestos diseñados, tomando en cuenta propiedades fisicoquímicas y farmacocinéticas, solubilidad, entre otras, donde se considera un puntaje Drug-likeness (cuasi-fármaco) como uno de los más importantes, debido a que toma en cuenta diversas propiedades (LogP, TPSA, PM y número de aceptores y donadores de puentes de hidrógeno)⁵⁵ para generar una calificación, ayudando a determinar si el compuesto posee las propiedades adecuadas para ser propuesto como candidato a fármaco y el detector de PAINS (Pan Assay Interference Compounds) los cuales son compuestos que aparentan tener actividad biológica, produciendo señales falsas positivas en los ensayos.⁴³

Dentro de los resultados observados en la **Tabla 12**, se destaca la solubilidad en agua, la cual es hasta 4 veces mejor para los compuestos **MSA 1 y 2**, mientras que para el compuesto **MSA 5** está es 8 veces mejor y para los compuestos **MSA 3, 4 y 6** la solubilidad presentó valores mayores a 15 veces mejor que el metronidazol.

Por otra parte, los compuestos cumplen con los postulados de Lipinski además de cumplir con valores de TPSA menores a 140 Å² por lo que se puede predecir que tendrán buena absorción intestinal de acuerdo con el postulado de Veber (Suma de número de átomos donadores y aceptores de puentes de hidrógeno <12, área polar superficial <140 y número de enlaces rotables <10). Además, se destaca el puntaje de biodisponibilidad que se le da a cada compuesto teniendo estos un puntaje igual al del metronidazol.

Esto correlaciona con los datos obtenidos de los programas antes mencionados reafirmando que los compuestos tendrán las propiedades adecuadas para administrarse por vía oral y se absorberán adecuadamente, además de presentar propiedades adecuadas en cuanto a su toxicidad, sin embargo, estos resultados no son concluyentes ya que estos programas solo presentan resultados probables, para corroborar dichos resultados se necesita la obtención de resultados mediante pruebas *in vivo* e *in vitro*.

Tabla 12 Resultados obtenidos de la plataforma en línea SwissADME para los compuestos **MSA 1-6** y **MTZ**

Compuesto	MSA 1	MSA 2	MSA 3	MSA 4	MSA 5	MSA 6	MTZ
Propiedades fisicoquímicas							
PM (g/mol)	240.26	253.30	252.31	238.29	224.26	226.28	171.15
Enlaces rotables	4	4	4	4	4	6	3
H-aceptores	5	5	4	4	4	4	4
H-donadores	0	0	0	0	0	0	1
Refractividad molar	67.09	77.63	75.62	70.82	66.01	64.21	43.25
TPSA (Å ²)	76.11	70.12	66.88	66.88	66.88	66.88	83.87
Lipófila							
Log P _{o/w}	0.13	0.07	1.27	0.99	0.72	0.89	-0.32
Hidrofilia							
Solubilidad en agua (mg/mL)	15.9	17.5	3.38	4.55	8.14	2.75	66.9
Farmacocinética							
Absorción GI	Alta	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
CYP1A2	No						
CYP2C19	No	No	Si	Si	No	No	No
CYP2C9	No						
CYP2D6	No						
CYP3A4	No						
Cuasi-fármaco (drug-likeness)							
Lipinski							
Veber							
Puntaje de biodisponibilidad	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55	0.55
Química farmacéutica							
PAINS	0	0	0	0	0	0	0
Alerta toxicidad	Grupo nitro						
<p>Verde: Valores que son ideales; Amarillo: Valores que presenten una sola alerta; Rojo: Valores que presenten dos o más alertas.</p>							



8.1.6 ACOPLAMIENTO MOLECULAR (MOLECULAR DOCKING)

El acoplamiento molecular, es una técnica computacional utilizada para la predicción de la conformación y orientación de una molécula pequeña dentro de una zona delimitada en una proteína de estructura 3D previamente determinada experimentalmente, ya sea por métodos cristalográficos, RMN o modelados por homología.⁵⁷

La diana molecular elegida para este estudio fue la enzima piruvato ferredoxina oxidorreductasa (PFOR) basándose en la relación conocida entre los parásitos y los compuestos antiparasitarios de tipo nitroheterocíclicos. La estructura cristalina de la enzima PFOR fue analizada y descargada de la base de datos de Protein Data Bank (sitio web: <http://www.rcsb.org/pdb>) bajo el código (PDB ID) 1L5P, cuya estructura tiene una resolución de 2.2 Å, se estima que esta debe ser menor a 3 Å. Para este estudio se tomaron en cuenta todos los compuestos diseñados, mismos que fueron contruidos con ayuda de Marvin Sketch; programa computacional que sirve de apoyo como constructor molecular⁵⁸, tanto ligandos como proteína fueron salvados en formato PDB para su mayor accesibilidad en los diversos software utilizados. Una vez salvadas las estructuras, se hizo uso del entorno operativo molecular de MOE en su versión 2019.01, como intermediario para realizar los cálculos correspondientes para llevar a cabo el docking. La proteína se preparó tal como lo reporta Navarrete, et al⁵⁹ eliminando todos los átomos de hidrógeno junto a las moléculas de agua y las cargas se ajustaron con el campo de fuerza PFROSST. Este campo de fuerza utiliza parámetros AMBER para la descripción de proteínas y MMFF94 para moléculas orgánicas pequeñas^{59,60}, los ligandos contruidos 3D, fueron minimizados utilizando el mismo campo de fuerza mencionado anteriormente.

Con la finalidad de que el método sea reproducible y garantizar la veracidad de los resultados, se hizo el procedimiento de validación. Debido a que la estructura cristalina de PFOR utilizada no cuenta con un ligando co-cristalizado en su sitio catalítico, se tomó en cuenta el sitio de unión reportado por Weksberg, et al⁶¹, una cavidad superficial que expone uno de los átomos de azufre que contiene naturalmente, donde es más probable que el ligando sea capaz de unirse a la proteína, con el grupo

nitroheterociclo del ligando apuntando hacia dicha cavidad. Dentro de este pocket destacan los aminoácidos Met-32, Thr-37 y Lys-46, los cuales brindan interacciones de interés para la selectividad de reducir los grupos nitroheterociclos en lugar de otras moléculas que contribuirían a la respiración celular del parásito.⁶¹ Utilizando la estructura del metronidazol como ligando de referencia, se realizó la validación del modelo con un docking dirigido de 25 repeticiones por triplicado utilizando ambas generaciones de software de AutoDock; AutoDock Vina y AutoDock 4, con ayuda de la interfaz gráfica AutoDockTools, utilizando un tamaño de grid de 50x50x50 puntos, tomando como centro de este, la triada catalítica de aminoácidos mencionada anteriormente.

8.1.6.1 VALIDACIÓN DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR SOBRE PFOR, CON AUTODOCK VINA.

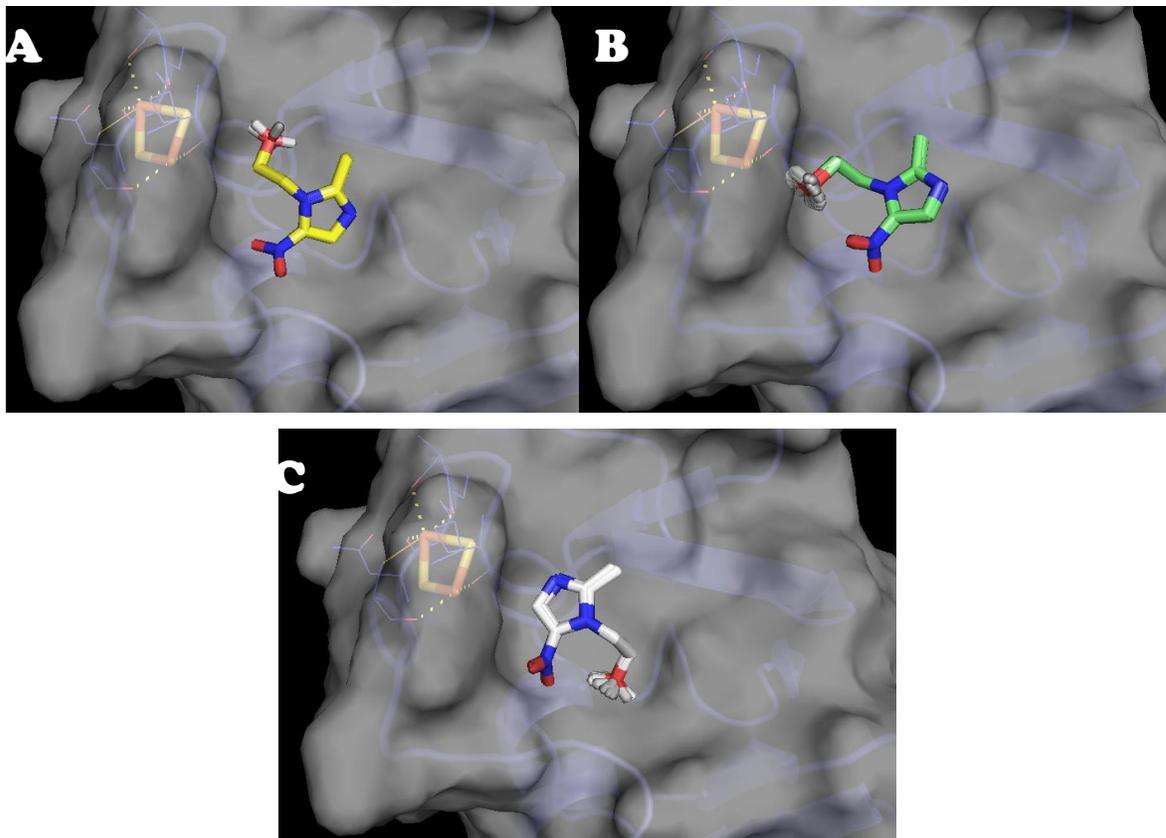


Figura 19 Diversos modos de unión de metronidazol sobre PFOR. obtenidas con el programa AutoDock vina.

Los resultados obtenidos por el programa Autodock vina (**Figura 19**) arrojó diversas conformaciones posibles de unión hacia PFOR; en la conformación **A** se presenta un 6.66% del total de las conformaciones, mientras que la conformación **B** obtuvo un 33.33% de las conformaciones, por último, se obtuvieron un 60% de las poses de la forma esperada (**C**), esta es con el grupo nitroimidazol apuntando hacia el núcleo hierro-azufre (amarillo) con un RMSD menor a 2 (promedio de 0.47). A continuación, se muestran los mapas de interacciones 2D y 3D, por los programas Discovery Studio y PyMOL respectivamente, de una de las poses que obtuvo la orientación preferible.

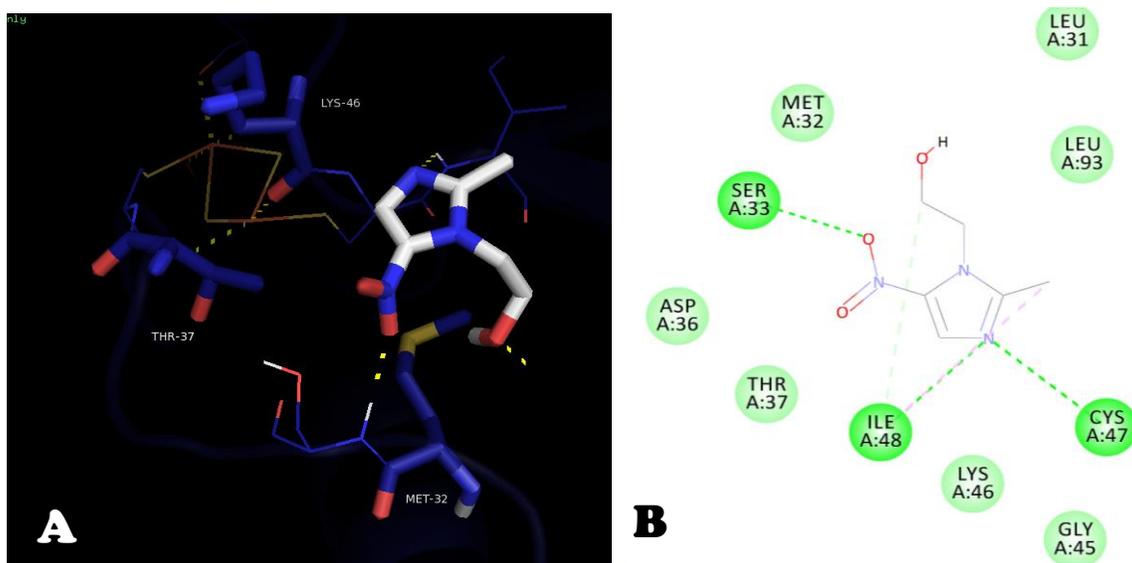


Figura 20 A) Visualización en 3D de metronidazol en el sitio catalítico obtenido de AutoDock vina. **B)** Mapa de interacción 2D de metronidazol con PFOR.

En la figura anterior (**Figura 20**) se observan las visualizaciones 3D (**A**) utilizando el programa PyMOL donde se aprecia la pose representativa de dicho grupo con mayor repetitividad y orientación preferible, apuntando hacia el núcleo hierro-azufre, así mismo, la posición de los aminoácidos de interés. Por otro lado, se aprecia el mapa de interacciones 2D (**B**) en el que se puede observar sus interacciones con ayuda del programa Discovery Studio. Se aprecian interacciones de tipo puente de hidrógeno que mantiene con algunos residuos de aminoácidos como Ser-33, Cys-47 e Ile-48, así mismo, interacciones por fuerza de Van Der Waals con aminoácidos de interés; Met-32, Thr-37 y Lys-46. Dicha conformación presentó una energía libre de unión (ΔG) de -3.9 kcal/mol.

8.1.6.2 VALIDACIÓN DEL ACOPLAMIENTO MOLECULAR SOBRE PFOR, CON AUTODOCK4.

Por otra parte, el servidor AutoDock 4 dio como resultado cuatro grupos de conformaciones posibles en las que metronidazol podría unirse a PFOR.

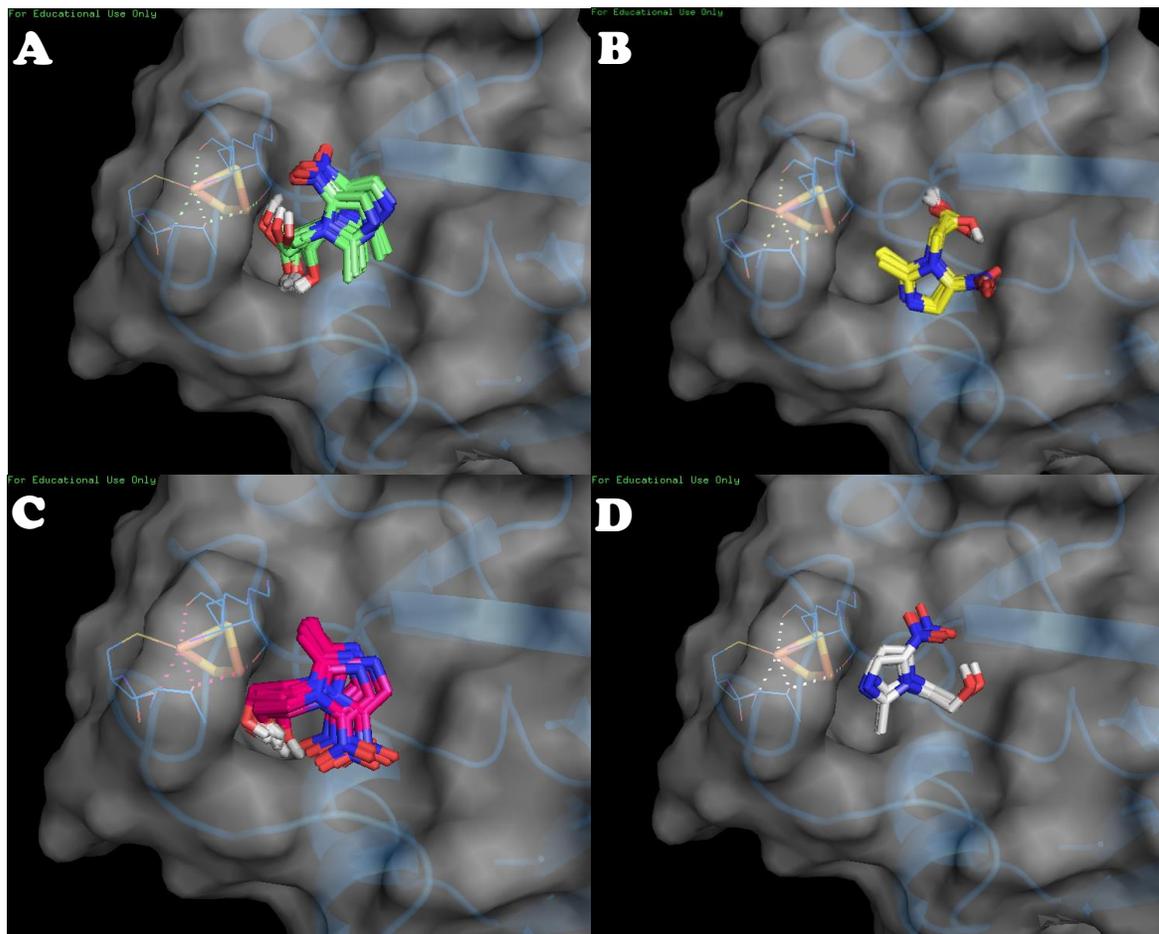


Figura 21 Diversos modos de unión de metronidazol sobre PFOR. obtenidas con el servidor AutoDock 4.

Los posibles modos de unión observados en la **Figura 21**, demuestran el total de las conformaciones obtenidas por Autodock 4, de las cuales el 46.66% del total de poses obtenidas se muestran en **A**, siendo esta la que presentó mayor repetitividad, mientras que, en **B**, se aprecia el 25.33% de las poses y un 16% en **C**, pose similar a la de **A** diferenciadas en un giro del anillo nitroimidazol. Por último, la pose observada en **D**

muestra un 12% del total de las poses, pese que fue la que menor repetitividad que obtuvo, esta presenta dicha conformación “correcta”, con el anillo nitroimidazol apuntando hacia el núcleo de hierro-azufre, por ello es que se eligió a esta pose como idónea, además de mantener interacción con residuos de aminoácidos de interés; Met-32, Thr-37 y Cys-46.

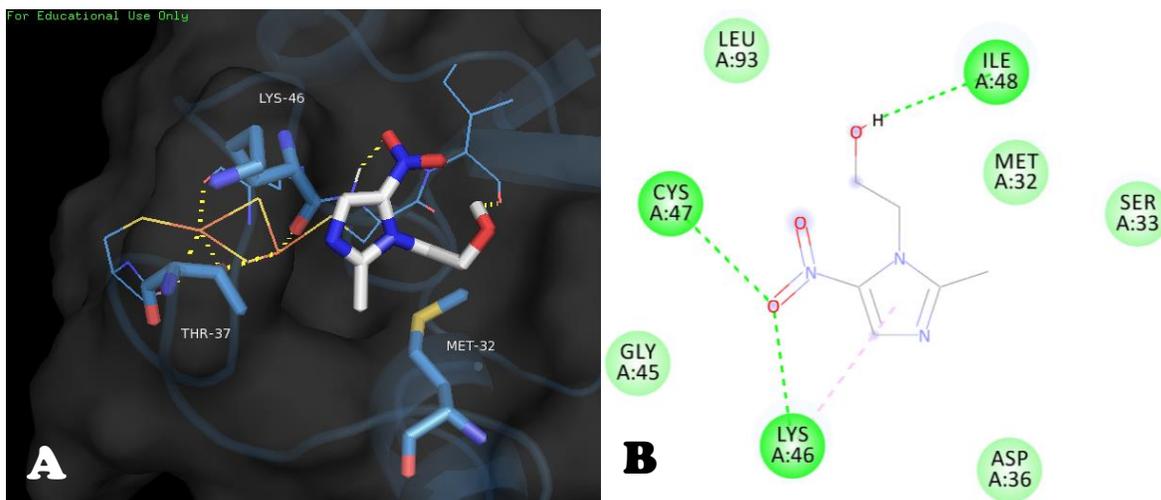


Figura 22 A) Visualización en 3D de metronidazol en el sitio catalítico obtenido de AutoDock vina. **B)** Mapa de interacción 2D de metronidazol con PFOR.

Se eligió a la pose con mejor ΔG (-3.15 kcal/mol) como pose representativa del grupo **D** para mostrar el modo de unión, tal como se observa en la **Figura 22**. Se aprecia el mapa de interacciones en 3D destacando algunas de las interacciones que nos permite visualizar el programa, así como se destacan los aminoácidos de interés; Met-32, Thr-37 y Lys-46. Por otro lado, se aprecia el mapa de interacciones en 2D, el cual nos permite visualizar de manera más comprensible las interacciones ligando-receptor, observando interacciones tipo puentes de hidrógeno y π - sp^3 con residuos de aminoácidos como Lys-46, Cys-47 e Ile-48.

Una vez realizado el proceso de validación, se llevó a cabo el acoplamiento molecular de los compuestos **MSA 1-6** en el mismo sitio catalítico para observar su posible modo de unión. Se realizaron 25 repeticiones por triplicado de forma similar al método de validación. Una vez finalizado el acoplamiento molecular de la serie de compuestos

MSA 1-6, mediante un análisis visual, se eligió para cada uno de ellos la mejor pose, tomando en cuenta las interacciones que mantuviera con la triada catalítica y orientación preferente del grupo nitroimidazol, orientado hacia el núcleo hierro-azufre, así como la mejor ΔG , por lo que, debido a los numerosos acoplamiento moleculares resultantes, solo se presentan los diagramas 3D y 2D del compuesto con mejores parámetros antes mencionados.

8.1.6.3 ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE LA SERIE DE COMPUESTOS MSA 1-6 CON AUTODOCK VINA.

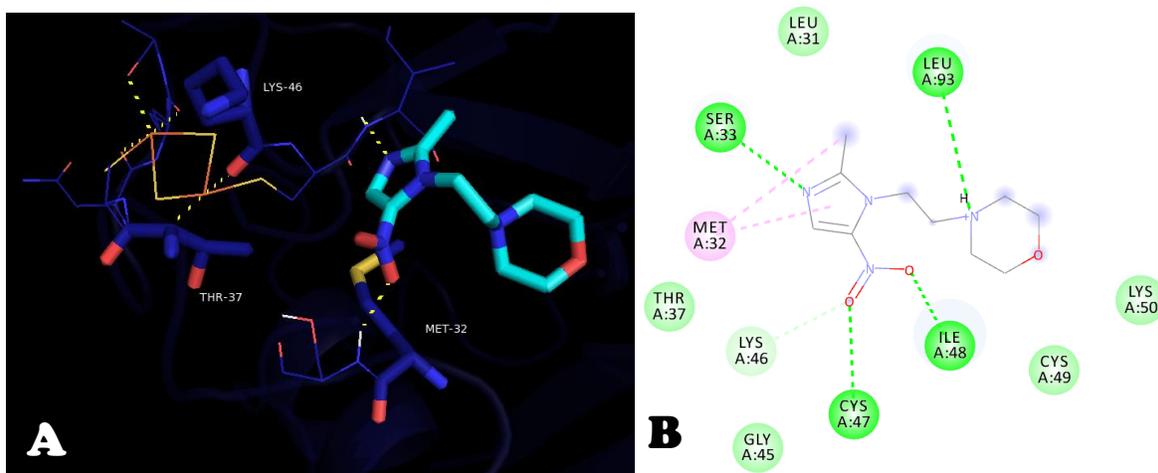


Figura 23 A) Diagrama en 3D y B) Mapa en 2D de las interacciones moleculares entre **MSA 1** y PFOR.

En la **Figura 23** se observa la conformación representativa de entre todos los resultados obtenidos del ligando **MSA 1**. Dicha conformación se eligió de entre tres grupos de conformaciones posibles que se obtuvieron como resultado, estos grupos presentaron un porcentaje de repetitividad similar entre ellos (33.33%) siendo el parámetro de ΔG el que se priorizó para dicha selección, ya que esta fue mejor que el resto (-5.0 kcal/mol). Como se muestra en el diagrama 3D, la conformación mantiene una orientación hacia el núcleo hierro-azufre, siendo la orientación “correcta” esperada. En el diagrama 2D, se muestran interacciones tipo puentes de hidrógeno

con residuos como Ser-33, Lys-46, Cys-47, Ile-48 y Leu-93, este último formado con la amina terciaria del grupo auxóforo del ligando, además de interacciones tipo hidrofóbicas y π -puente de hidrógeno entre Met-32 y el anillo de imidazol.

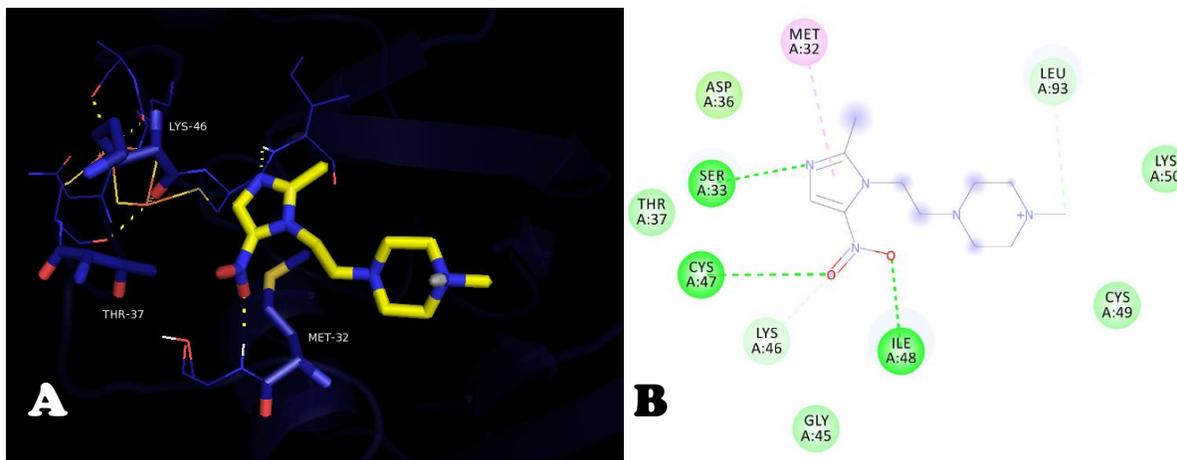


Figura 24 A) Diagrama en 3D y B) Mapa en 2D de las interacciones moleculares entre **MSA 2** y PFOR.

El compuesto **MSA 2**, dio como resultado 3 grupos de conformaciones posibles de unión hacia PFOR, de las cuales se seleccionó la que obtuvo mayor repetitividad (53.33%) así como valores de ΔG más aceptables (-4.8 kcal/mol). En el diagrama 3D de la **Figura 24**, se observó el modo de unión de la conformación seleccionada, siendo esta con la orientación descrita anteriormente y señalada como la “correcta”, así como algunas interacciones polares que nos permite visualizar el programa. El mapa de interacciones 2D, muestra interacciones que mantiene con residuos de importancia como Met-32, Thr-37 y Lys-46, interacciones tipo π -puente de hidrógeno, puente de hidrógeno y fuerzas de Van Del Waals respectivamente, además de interacciones extra (puentes de hidrógeno) con residuos de aminoácidos como Ser-33, Cys-47, Ile-48 y Leu-93, dichas interacciones podrían aumentar su afinidad hacia la enzima.

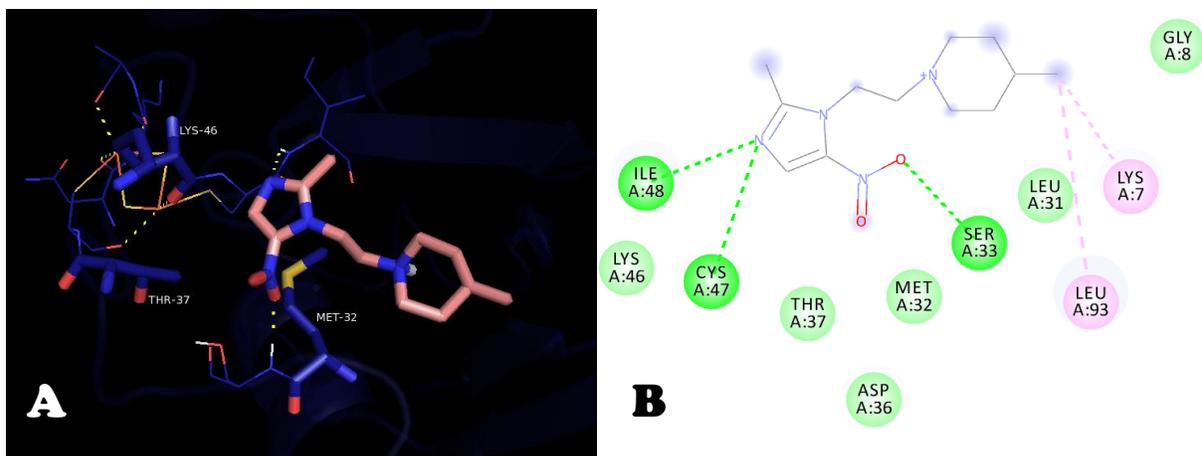


Figura 25 A) Diagrama en 3D y B) Mapa en 2D de las interacciones moleculares entre **MSA 3** y PFOR.

La molécula **MSA 3**, presentó solo dos conformaciones posibles de unión. La conformación seleccionada fue la que obtuvo mayor repetitividad (66.66%), además de presentar mejores valores de ΔG (-5.4 kcal/mol). La conformación representativa de este grupo se aprecia en la **Figura 25**, la cual presenta una orientación “correcta”. El mapa de interacciones 3D, muestra dicha orientación hacia el núcleo hierro-azufre, y algunas interacciones polares que nos permite visualizar el programa, además, se aprecian los residuos de aminoácidos de interés; Met-32, Thr-37 y Lys-46. El diagrama de interacciones 2D, nos mostró algunas interacciones de tipo puentes de hidrógeno que mantiene con residuos de Ser-33, Cys-47 e Ile-48 en el heterociclo, además de interacciones hidrofóbicas con residuos de Lys-7 y Leu-93 en el grupo auxóforo de la molécula. Entre algunas interacciones que mantiene por fuerzas de Van Der Waals, se encuentran residuos de interés antes mencionados.

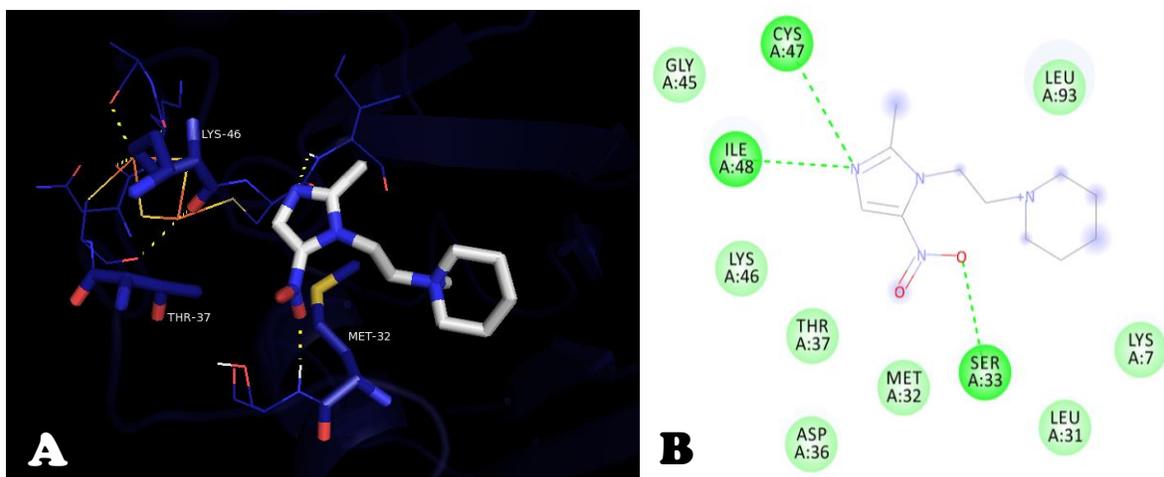


Figura 26 A) Diagrama en 3D y B) Mapa en 2D de las interacciones moleculares entre **MSA 4** y PFOR.

En la **Figura 26** se puede apreciar la conformación idónea del compuesto **MSA 4**. Esta conformación presentó un porcentaje de repetitividad del 45.33% siendo la que mayor repetitividad obtuvo de entre 3 grupos de conformaciones posibles resultantes. Dicha conformación representativa mantiene una orientación hacia el núcleo hierro-azufre mostrada en el diagrama 3D, la cual se estima que sea la forma adecuada en que estas moléculas nitroheterocíclicas, se unan a PFOR. Por otro lado, el diagrama de interacciones 2D, nos permitió visualizar interacciones tipo Van Der Waals que mantiene con residuos de aminoácidos de interés; Met-32, Thr-37, Lys-46, así como interacciones extra de tipo puentes de hidrógeno con residuos de aminoácido; Ser-33, Cys-47 e Ile48. La conformación descrita, presentó un valor de ΔG igual a -5.1 kcal/mol.

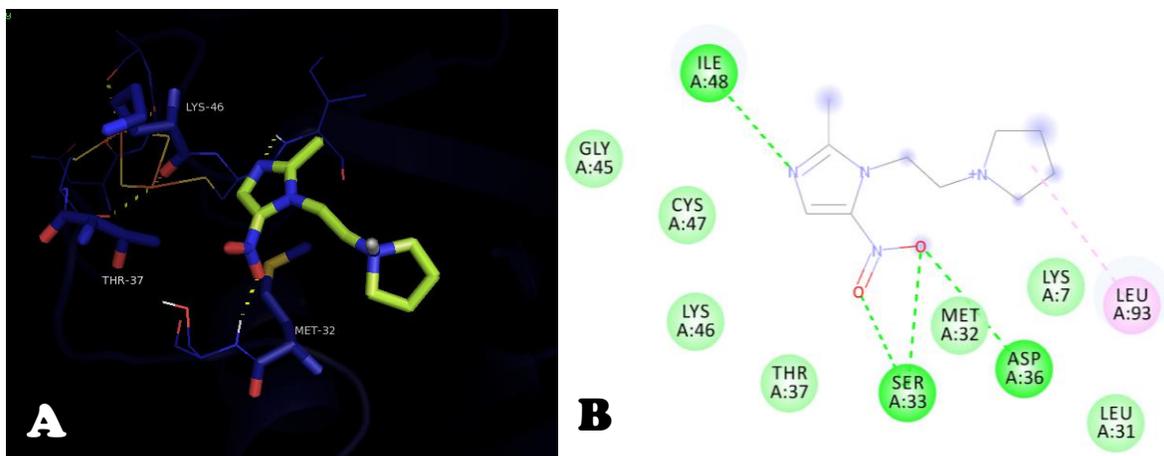


Figura 27 A) Diagrama en 3D y B) Mapa en 2D de las interacciones moleculares entre **MSA 5** y PFOR.

La conformación idónea del compuesto **MSA 5**, se muestra en la **Figura 27**, la cual obtuvo un porcentaje de repetitividad del 66.66% y un ΔG igual a -4.8 kcal/mol, además de mantener interacciones con residuos de aminoácidos de interés y una orientación descrita como preferente, con el grupo nitroimidazol apuntando hacia el núcleo hierro-azufre. En el diagrama de interacciones 3D, se observa la orientación ya descrita, así como los aminoácidos de interés para el reconocimiento de estas moléculas nitroheterocíclicas. El diagrama de interacciones 2D, mostró interacciones de tipo puentes de hidrógeno entre el nitroheterociclo y residuos de Ser-33, Asp-36 e Ile48, así como una interacción hidrofóbica entre el anillo de pirrolidina y Leu93, además de mantener interacciones por fuerza de Van Der Waals con residuos de interés; Met-32, Thr-37 y Lys-46.

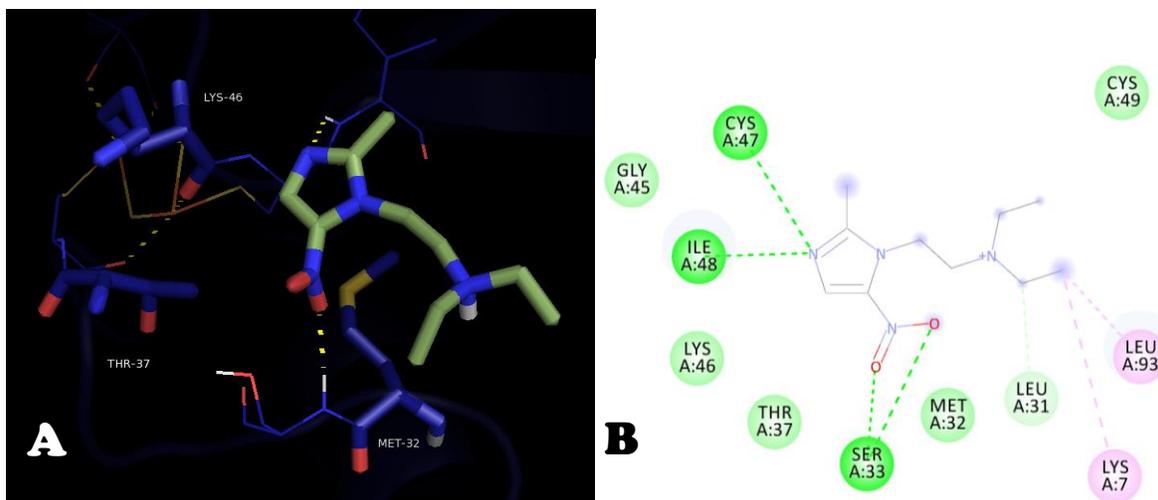


Figura 28 A) Diagrama en 3D y B) Diagrama en 2D de las interacciones moleculares entre **MSA 6** y PFOR.

Por último, el compuesto **MSA 6**, el último de la serie de compuestos diseñados obtuvo dos grupos de conformaciones posibles de unión hacia PFOR, de las cuales, la observada en la **Figura 28**, presentó mayor porcentaje de repetitividad del 66.66%, un ΔG iguala a -4.5 kcal/mol y una orientación preferente hacia el núcleo hierro-azufre, además de mantener interacciones con residuos de aminoácidos de interés, por ello elegida como idónea. El mapa de interacciones 3D, mostró la orientación descrita resultante, así como un par de interacciones polares que nos permite observar el programa. El mapa de interacciones 2D, muestra interacción por fuerzas de Van Der Waals que mantiene con residuos de interés; Met-32, Thr-37 y Lys-46, además de interacciones extra de tipo puentes de hidrógeno con Leu-33, Ser-33, Cys-47 e Ile-48 e hidrofóbicas con Lys-7 y Leu-93.

Cabe destacar, que todos los compuestos de la serie **MSA 1-6**, presentaron un ΔG superior a la obtenida del ligando metronidazol, el cual presentó un ΔG de -3.9 kcal/mol, siendo el ligando **MSA 3**, el que obtuvo mejor resultado de la serie con un valor de $\Delta G = -5.4$ kcal/mol, seguido del compuesto **MSA 4** de un $\Delta G = -5.1$ kcal/mol además de mantener las interacciones necesarias con los residuos de aminoácidos necesarios para desencadenar la actividad biológica.

8.1.6.4 ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE LA SERIE DE COMPUESTOS MSA 1-6 CON AUTODOCK 4.

Los resultados obtenidos por el servidor AutoDock 4 para la serie de compuestos diseñados **MSA 1-6**, se visualizan en las siguientes **Figuras 29-34**, presentando los mapas de interacciones 2D y 3D calculados por los programas Discovery Studio y PyMOL respectivamente.

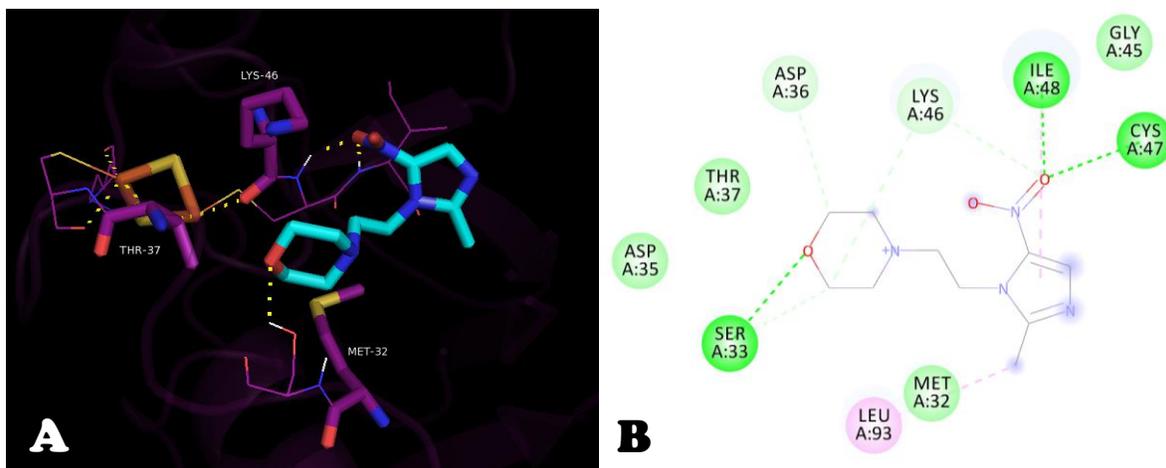


Figura 29 A) Diagrama en 3D y B) Mapa en 2D de las interacciones moleculares entre **MSA 1** y PFOR.

El compuesto **MSA 1** obtuvo como resultado cuatro conformaciones posibles de unirse a la enzima PFOR, sin embargo, ninguna de estas presentó la conformación preferente, anteriormente ya descrita, por lo que la pose que cumplió los parámetros de selectividad restantes, mejor energía de afinidad e interacciones con triada catalítica, sería la idónea, se representó en la **Figura 29**. Dicha conformación presentó una repetitividad del 49.33%, además de mostrar un mejor ΔG (-4.86 kcal/mol) en comparación a las demás. De manera más comprensible, el diagrama en 2D, nos muestra las interacciones tipo puentes de hidrógeno con el anillo de morfolina e interacciones tipo puentes de hidrógeno, hidrofóbicas y π - sp^3 con el anillo de nitroimidazol, además de mantener interacciones con residuos de aminoácidos de interés; Met-32 y Thr-37 por fuerzas de Van Der Waals y Lys-46 por puente de hidrógeno.

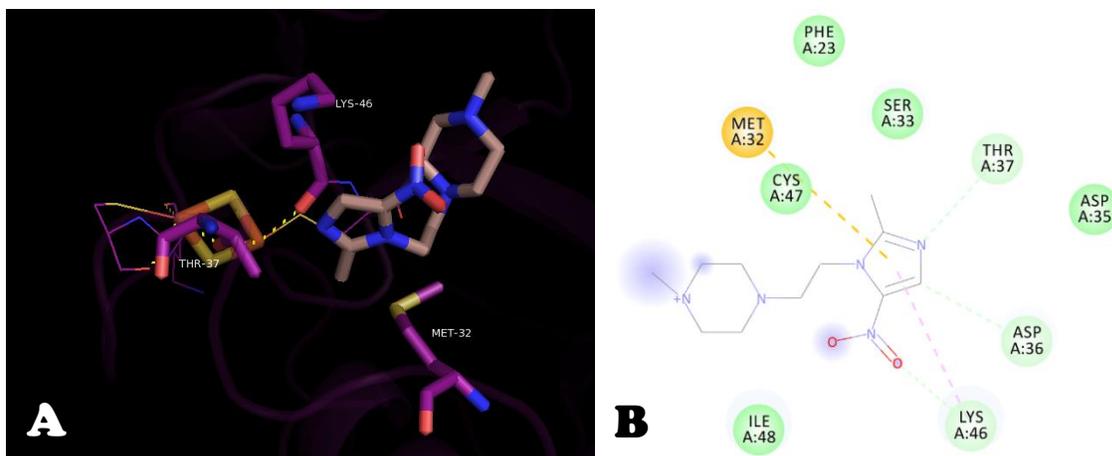


Figura 30 A) Diagrama en 3D con AutoDock 4; B) Mapa en 2D de las interacciones moleculares entre **MSA 2** y PFOR.

El compuesto **MSA 2**, presentó seis grupos de conformaciones posibles en el sitio catalítico de la enzima PFOR, de entre las cuales, similar al método de validación, la pose con menor repetitividad entre estos (2.66%) presentó la única conformación con orientación preferente, pese que mostró una energía de unión inferior a la de los demás grupos (ΔG igual a -3.52 kcal/mol), esta tuvo interacciones tipo π -puente de hidrógeno, puente de hidrógeno y π -sp³ con residuos de aminoácidos de importancia; Met-32, Thr-37 y Lys-46 respectivamente, dichas interacciones con el anillo nitroimidazol, además de interacciones extra con Asp-36.

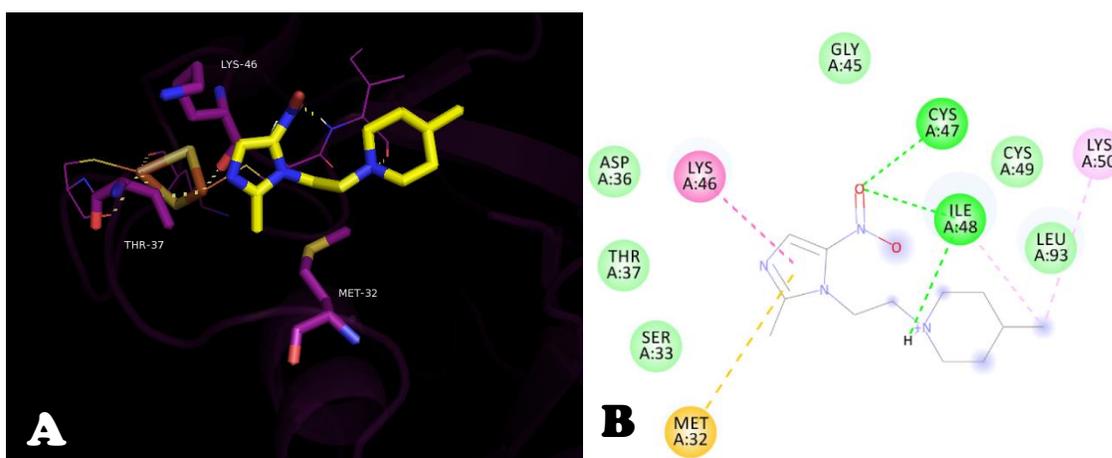


Figura 31 A) Diagrama en 3D con AutoDock 4; B) Mapa en 2D de las interacciones moleculares entre **MSA 3** y PFOR.

De manera similar al compuesto **MSA 2**, se eligió al compuesto con menor repetitividad (6.6%) como idóneo, debido a su orientación preferente hacia el núcleo hierro-azufre, sin embargo, a comparación del compuesto anterior, este presentó un $\Delta G = -5.51$ kcal/mol, energía libre de unión mejor a la de los demás grupos de conformaciones. En el diagrama en 3D se aprecian algunas interacciones polares que nos permite observar el programa, por otro lado, de manera más comprensible, el diagrama en 2D nos permite visualizar las interacciones que este mantiene similares con residuos de interés como Met-32 y Lys-46 con el anillo nitroimidazol, además de interacciones extra con Cys-47, Ile-48 y Lys-50, interacciones que podrían ayudar a la afinidad hacia esta enzima.

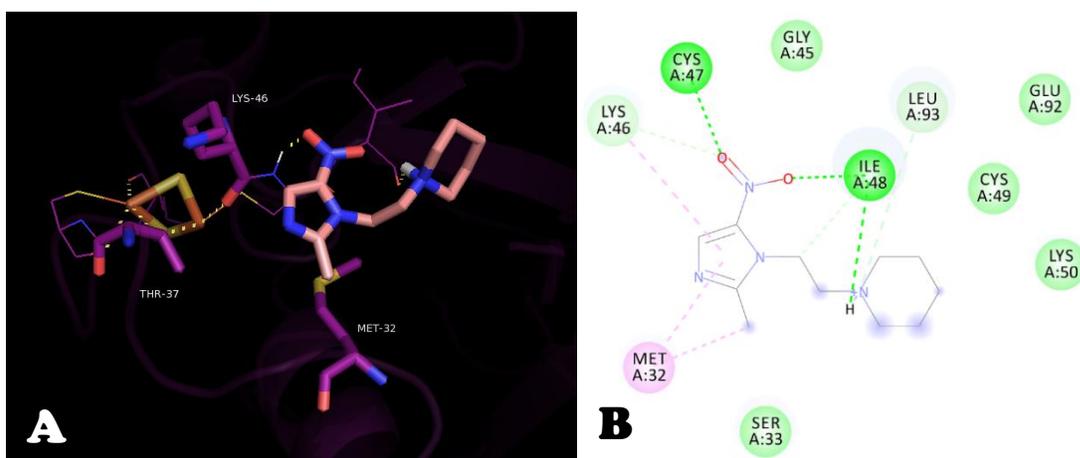


Figura 32 A) Diagrama en 3D con AutoDock 4; B) Mapa en 2D de las interacciones moleculares entre **MSA 4** y PFOR.

El compuesto **MSA 4**, presentó una serie de conformaciones variada de unión hacia PFOR, de las cuales solo el 9.33% presentaron una orientación preferente, tal como se muestra en el mapa de interacciones 3D de la **Figura 32**, observándose un par de interacciones polares y destacando aminoácidos de interés. El mapa en 2D, muestra de manera más comprensible, las interacciones que mantiene al igual que compuestos anteriores con residuos de aminoácidos de importancia como Met-32 y Lys-46, además de interacciones extra por puentes de hidrógeno con residuos como Cys-47, Ile-48 y Leu-93. Este conjunto de interacciones dio como resultado una energía libre de unión igual a -5.03 kcal/mol.

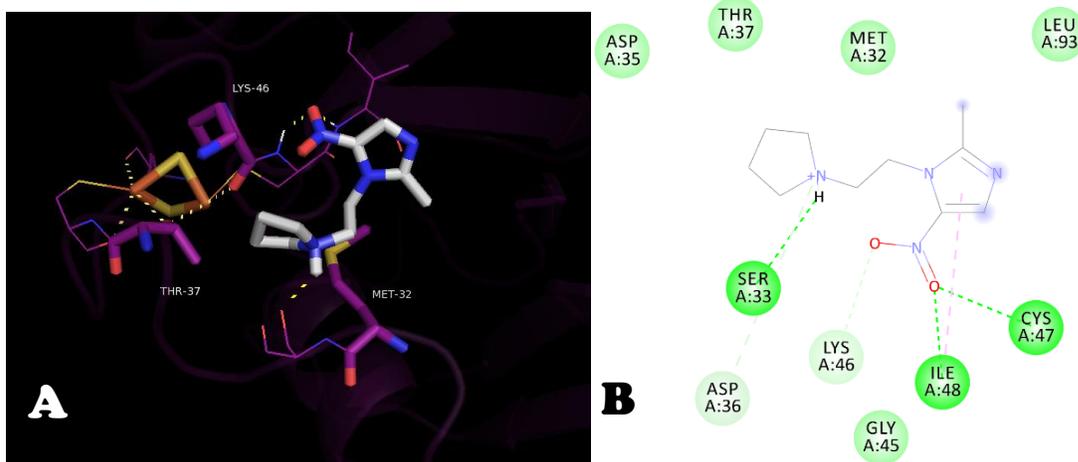


Figura 33 A) Diagrama en 3D con AutoDock 4; B) Mapa en 2D de las interacciones moleculares entre **MSA 5** y PFOR.

De manera similar a el compuesto **MSA 1**, el compuesto **MSA 5** presentó diversas conformaciones posibles de unión, de las cuales, ninguna mostró dicha conformación preferible antes descrita, por lo que se tomó como pose idónea, aquella que mantuviera interacciones con residuos de aminoácidos de interés, así como la que presentara un mejor ΔG y una mayor repetitividad. En la **Figura 33**, se observa la pose idónea del compuesto **MSA 5**, la cual mantuvo un porcentaje de repetitividad de 46.66% y un $\Delta G = -5.63$ kcal/mol, además, como se observa en el diagrama 2D, mantiene interacciones con residuos de interés, así como interacciones extra con Ser-33, Cys-47 e Ile-48.

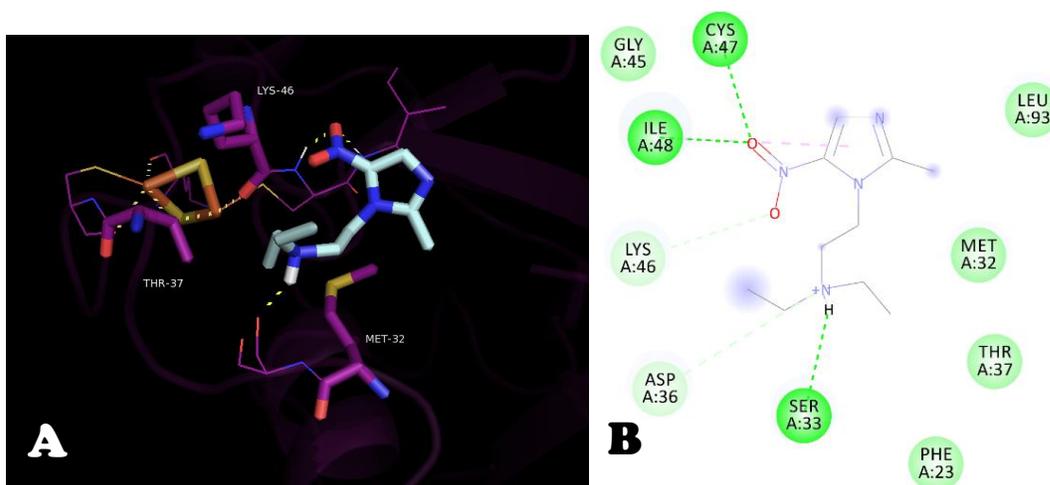


Figura 34 A) Diagrama en 3D con AutoDock 4; B) Diagrama en 2D de las interacciones moleculares entre **MSA 6** y PFOR.

El compuesto **MSA 6**, de manera similar a compuestos anteriores, entre un número de conformaciones obtenidas, ninguna presentó una conformación preferible, por lo que se tomó como idónea la pose con mejor ΔG , así como una mayor repetitividad e interacciones con residuos de interés. La conformación idónea observada en el mapa de interacciones 3D de la **Figura 34**, mostró un mayor porcentaje de repetitividad con un 32% y un ΔG igual a -4.72 kcal/mol. Como se observa en el diagrama 2D, mantiene interacciones tipo puentes de hidrógeno con Lys-46 y por fuerzas de Van Der Waals con Met-32 y Thr-37. Además de interacciones extra de tipo puentes de hidrógeno con Ser-33, Cys-47 e Ile-48.

Cabe mencionar que los valores resultantes de energías libre de unión, pese que fueron muy variables entre sí, todos presentaron valores superiores a los del ligando de referencia; metronidazol, el cual mostró un $\Delta G = -3.15$, siendo el compuesto **MSA 5** el ligando que presentó mayor ΔG de la serie con valor de $\Delta G = -5.63$ kcal/mol, seguido del compuesto **MSA 3** con un $\Delta G = -5.51$ kcal/mol.

8.1.6.5 CONSENSO DE ACOPLAMIENTO MOLECULAR DE AMBAS GENERACIONES DE AUTODOCK: AUTODOCK VINA Y AUTODOCK 4

Debido a las interacciones presentadas por los compuestos con aminoácidos responsables de la activación en PFOR, se puede predecir que los compuestos **MSA 1-6** presentarán actividad antiparasitaria en un organismo vivo, por lo que se requieren pruebas *in vitro* para la confirmación de estos resultados.

Sin embargo, se hace hincapié en que los estudios de modelado molecular informados en este proyecto están destinados a hipotetizar las interacciones ligando-proteína ya que para conocer la conformación correcta del ligando sobre PFOR se necesita determinar la estructura del complejo de dicha proteína (mediante cristalografía de rayos X, espectroscopia de RMN o microscopía electrónica) junto a un ligando (fármaco) co-cristalizado unido en su sitio catalítico o en un sitio alostérico.

Una vez concluido el docking y arrojado todos los datos anteriormente descritos, se tomó en cuenta la eficiencia del ligando (LE por sus siglas en inglés: Ligand Efficacy) el cual permite calcular como es que el número total de átomos pesados (todo átomo diferente al hidrógeno) contribuye a la energía de unión del compuesto con su respectivo receptor, por lo que calcular este parámetro nos brindaría una idea de cómo la “obesidad” molecular afecta en la actividad biológica de los compuestos.⁶² En la actualidad se ha observado que diversos candidatos a fármacos presentes en pruebas pre-clínicas y clínicas, que cumplan con los postulados de Lipinski y posean una potencia en el bajo orden micromolar, poseen un valor de LE= 0.29, mientras que aquellos que mantienen un peso molecular menor a 300Da, este valor asciende a los 0.36, por lo que se considera un valor ideal de LE, un valor entre el rango 0.29-0.36.⁵¹

De manera general, la ecuación para el cálculo de la LE se define como:⁶²

$$LE = -\frac{\Delta G}{HA}$$

Donde:

ΔG = Energía libre de unión (Docking)

HA= Número total de átomos pesados

Otro de los parámetros que es posible calcular a partir de los resultados obtenidos por el acoplamiento molecular, es la constante de inhibición o afinidad (K_i), según sea el caso. En la **Tabla 14** se muestra el resumen de los datos obtenidos para cada uno de los compuestos después del estudio de acoplamiento molecular realizado con ambas generaciones de software de AutoDock.

En la misma se aprecia el consenso tomando en cuenta solo los valores obtenidos del Docking, si bien, obtuvieron un ΔG mejor, antes mencionado, que el de los ligandos de referencia, al tomar en cuenta los parámetros de LE se puede apreciar que solo la mitad de los compuestos diseñados (**MSA 3-5**) están dentro del parámetro aceptable, tomando en cuenta ambos resultados de los software de AutoDock, así mismo, estos fueron los que obtuvieron mejores valores de K_i en rangos micromolar, destacando al compuesto **MSA 3** que presentó mejores valores comparados a los demás.

Tabla 13 Energías de unión resultantes del acoplamiento molecular, constantes de afinidad calculadas y eficiencia de ligando.

Compuesto		ΔG (-kcal/mol)	LE	K_i [μM]
MSA 1	AutoDock Vina	-5.0	-0.29	209.72
	Autodock 4	-4.86	-0.28	265.85
MSA 2	AutoDock Vina	-4.8	-0.26	294.29
	Autodock 4	-3.52	-0.19	2572.97
MSA 3	AutoDock Vina	-5.4	-0.30	106.51
	Autodock 4	-5.51	-0.30	88.40
MSA 4	AutoDock Vina	-5.1	-0.30	177.04
	Autodock 4	-5.3	-0.31	126.16
MSA 5	AutoDock Vina	-4.8	-0.30	294.29
	Autodock 4	-5.63	-0.35	72.14
MSA 6	AutoDock Vina	-4.5	-0.28	489.19
	Autodock 4	-4.72	-0.29	337.00
Metronidazol	AutoDock Vina	-3.9	-0.24	1351.69
	Autodock 4	-3.15	-0.19	4815.40



8.1.7 ANÁLISIS DE CONSENSO FARMACOLÓGICO.

El análisis del consenso farmacológico se llevó a cabo con la finalidad de encontrar al compuesto de la serie con mejores puntuaciones en una colección de propiedades farmacológicas (toxicológicas, farmacodinámicas y farmacocinéticas), el cual será más probable de ejercer su actividad como agente quimioterapéutico en un ensayo biológico que un compuesto que solo tiene puntuación alta en una sola predicción farmacológica.

En la **Tabla 15** se presenta el resumen de estos resultados obtenidos, basados en los valores predictivos obtenidos mediante los programas quimicoinformáticos anteriormente descritos y analizados, para cada uno de los compuestos. Para obtener resultados más entendibles, se utilizó un código de colores para identificar las alertas estructurales de cada compuesto:

- **Verde:** Valores que son ideales.
- **Amarillo:** Valores que presenten una sola alerta.
- **Rojo:** Valores que presenten dos o más alertas.

Como se observa en la siguiente tabla, la serie de compuestos mantiene valores óptimos en cuanto a propiedades fisicoquímicas, presentando valores de pK_a (correspondiente a la amina terciaria del grupo auxóforo) similares entre sí, cumplen con los postulados de Lipinski y obteniendo buenos valores de permeabilidad, sin embargo, para un diseño racional de moléculas bioactivas-candidatos a fármacos, se considera un valor ideal de Log P aquel que se encuentra entre un rango de -0.04 a 5.6⁶³, siendo solo los compuestos **MSA 1** y **MSA 3** los que se encuentran dentro de este parámetro, así mismo, el compuesto **MSA 3** destaca nuevamente por los mejores valores de solubilidad en agua junto con **MSA 6**.

Las propiedades farmacodinámicas obtuvieron resultados satisfactorios, antes mencionados, por el servidor web PASS online, en donde el compuesto **MSA 2** resaltó por sus buenas probabilidades de actividad. Sin embargo, el análisis de consenso realizado con los valores obtenidos a partir del acoplamiento molecular reconoce al compuesto **MSA 3** con valores óptimos para efectuar dicha actividad biológica.

Tabla 14 Análisis de propiedades calculadas para los compuestos **MSA 1-6**

Compuesto	MSA 1	MSA 2	MSA 3	MSA 4	MSA 5	MSA 6	MNZ
Propiedades fisicoquímicas y biofarmacéuticas							
pKa	7.11±0.1	7.67±0.3	9.08±0.4	9.05±0.2	9.80±0.2	9.8±0.2	14.44±0.1
Log P	0.13	0.07	1.27	0.99	0.72	0.89	-0.32
Sol. agua (mg/ml)	15.9	17.5	3.38	4.55	8.14	2.75	66.9
Lipinski							
Permeabilidad							
Propiedades farmacodinámicas							
PASS							
AutoDock vina (kcal/mol)	-5.0	-4.8	-5.4	-5.1	-4.8	-4.5	-3.9
AutoDock 4 (kcal/mol)	-4.86	-3.52	-5.51	-5.3	-5.63	-4.72	-3.15
Propiedades farmacocinéticas							
Abs. Intes.							
BHE (+)							
Inhi. CYP 450							
Inhi. Pgp							
Propiedades toxicológicas							
AMES							
hERG							
Verde: Valores que son ideales; Amarillo: Valores que presenten una sola alerta; Rojo: Valores que presenten dos o más alertas.							

Así mismo, las propiedades farmacocinéticas que presentaron los compuestos fueron aceptables para todos los compuestos, salvo a una violación del compuesto **MSA 6**, presentada por ACD/toxsuite al tener una probabilidad media de inhibir una de las isoformas de CYP 450. Sin embargo, las colecciones de estos resultados nos indican que los compuestos tendrán una buena probabilidad de absorción intestinal y atravesar barrera hematoencefálica, así como de no actuar como inhibidores de glicoproteína-P, por lo que se pretende que esta no interfiera en la biodisponibilidad de las moléculas.

Por último, se tomó en cuenta el apartado de toxicología el cual solo presenta una alerta el compuesto **MSA 4**, como probable bloqueador de canales hERG.

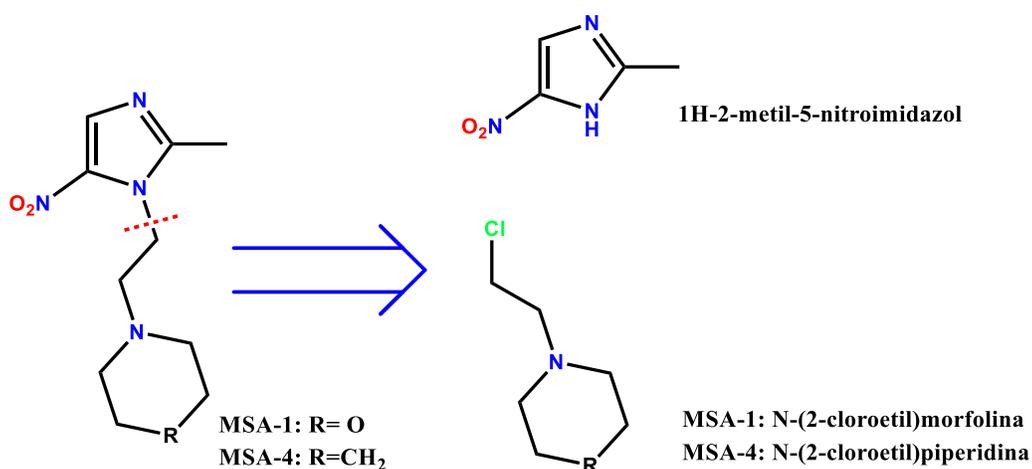


Con base en el análisis del conjunto de resultados obtenidos, se propone como prioritarios de serie al compuesto **MSA 3**, debido a que es el compuesto con números menores de alertas toxicológicas, mejores predicciones en cuanto a sus propiedades farmacocinéticas, además de ser el compuesto con mejores energías de unión presentaron en el acoplamiento molecular (**Tabla 14**). Por lo antes mencionado, se espera que el compuesto **MSA 3** presente un efecto biológico como antiparasitario, por lo que es seleccionado como prioritario a ser sintetizado y posteriormente evaluado en pruebas *in vitro*.

8.2 PARTE QUÍMICA

8.2.1 RETROSÍNTESIS

Elias James Corey (Premio Nobel de Química del año 1990) desarrolló, en ese entonces, un nuevo paradigma de la Síntesis Orgánica, que bautizó como retrosíntesis. Estableció las reglas que permiten analizar una molécula mediante la ruptura imaginaria de determinados enlaces. De esta forma se obtienen elementos más pequeños que llamó “sintones” y a los que ha de corresponder un equivalente sintético. La operación se repite hasta llegar a compuestos de partida asequibles comercialmente, los cuales, al unirlos mediante las reacciones adecuadas, dan lugar a la síntesis planificada.⁶⁴ Tomando en cuenta las consideraciones de los aspectos descritos en el diseño molecular, la obtención de los compuestos **MSA 1-6** parte de dos rutas retrosintéticas (**Esquemas 2-3**).

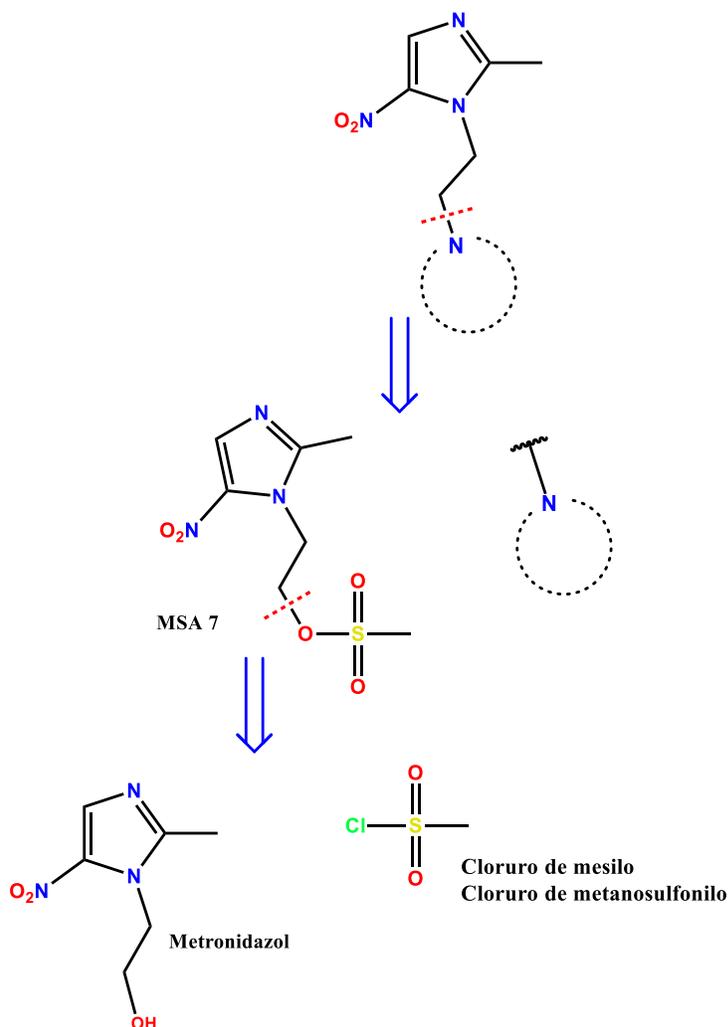


Esquema 2 Esquema retrosintético para los compuestos **MSA-1** y **MSA-4**

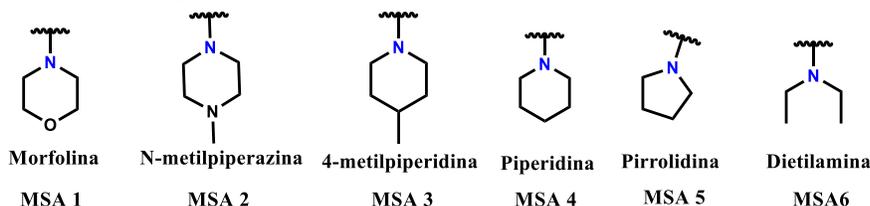
La primera propuesta de análisis retrosintético, parte de la estructura de los compuestos finales **MSA 1** y **MSA 4**, realizando una desconexión entre la amina de anillo nitroimidazol y el etilo correspondiente a la amina terciaria, obteniendo 2 compuestos bases (**Esquema 2**) el 1H-2-metil-5-nitroimidazol y el correspondiente N-(2-cloroetil)azina, según sea el caso, para realizar la síntesis de los compuestos finales.

Por otra parte, el segundo análisis retrosintético para la obtención de los compuestos restantes se puede observar en el **Esquema 3**, parte de la desconexión entre la amina

terciaria y el etilo unido al anillo nitroimidazólico, obteniendo dos compuestos resultantes, el precursor **MSA-7** y la correspondiente amina secundaria a utilizar. Posteriormente se le realiza una desconexión al precursor **MSA-7** entre el etilo y el correspondiente grupo saliente (mesilato) para generar como materias primas al metronidazol y al cloruro de metano-sulfonilo. Cabe destacar que dicha ruta, puede ser viable para toda la serie de compuestos **MSA 1-6**.



En donde N puede ser:



Esquema 3 Esquema de retrosíntesis para la obtención de los compuestos **MSA 1-6**.

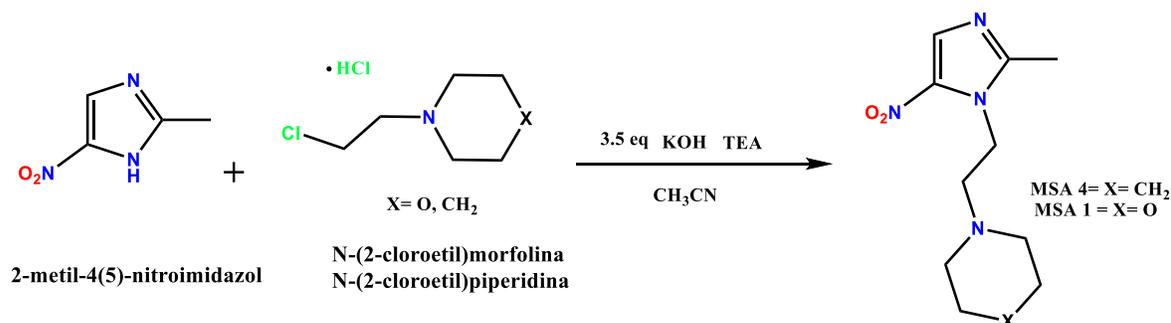
8.2.2 SÍNTESIS QUÍMICA

8.2.2.1 ESTRATEGIA DE SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS FINALES MSA-1 Y MSA-4

Para la síntesis de los compuestos **MSA 1** y **MSA 4** (proceso descrito en el **Esquema 4**) se efectuará una sustitución nucleofílica unimolecular, en la cual se hará reaccionar el 2-metil-4(5)-nitroimidazol con hidróxido de potasio (KOH) para la obtención del anión, utilizando acetonitrilo como disolvente a temperatura ambiente. Posteriormente se agregará la correspondiente mostaza nitrogenada para el ataque nucleofílico en conjunto con trietilamina (TEA) la cual servirá para neutralizar el ácido clorhídrico, todo esto aumentando la temperatura a 67°C con agitación constante. Para así obtener como producto final los compuestos:

MSA 1: 4-(2-(2-metil-5-nitroimidazol)etil)morfolina

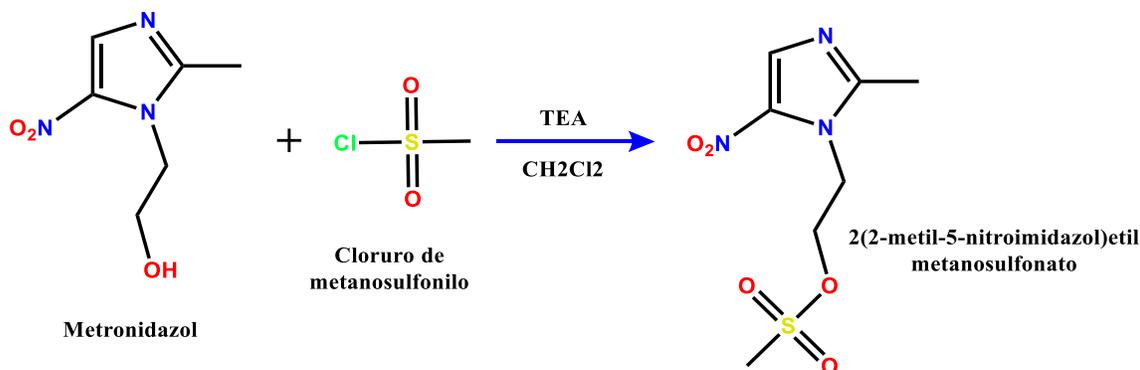
MSA 4: N-(2-(2-metil-5-nitroimidazol)etil)piperidina



Esquema 4 Síntesis respectiva para los compuestos **MSA-1** y **MSA-4**

8.2.2.2 ESTRATEGIA DE SÍNTESIS DEL PRECURSOR MSA 7

Para la síntesis del precursor **MSA 7** se realizará una mesilación haciendo reaccionar el metronidazol con trietilamina y el correspondiente cloruro de metano sulfonilo utilizando como disolvente diclorometano seco. Todo reaccionando a temperatura ambiente y con agitación constante para la obtención del precursor **MSA 7** (2(2-metil-5-nitroimidazol) etilmetanosulfonato) (**Esquema 5**).



Esquema 5 Esquema de síntesis correspondiente para el precursor **MSA 7**.

8.2.2.3 ESTRATEGIA DE SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS FINALES MSA 2-3 Y MSA 5-6

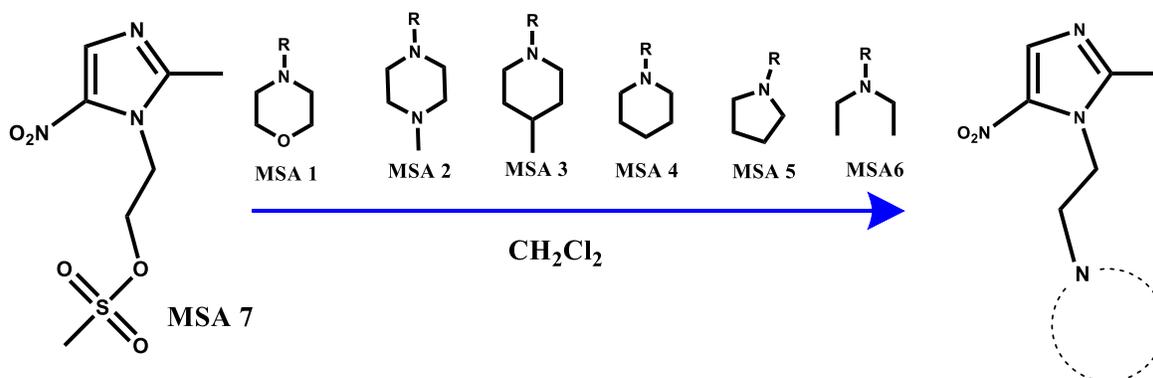
Para la obtención de los compuestos **MSA 2-3** y **MSA 5-6** se seguirá la síntesis plasmada en el **Esquema 5**, a partir del precursor **MSA 7** se hará reaccionar con la correspondiente amina secundaria (morfolina, 4-metilpiperazina, 4-metilpiperidina, piperidina, morfolina, etilamina), utilizando diclorometano como disolvente a temperatura ambiente y con una agitación constante para obtener los compuestos finales:

MSA-2: 1-metil-1-(2-(2-metil-5-nitroimidazol) etil)piperazina

MSA-3: 4-metil-1-(2-(2-metil-5-nitroimidazol)etil)piperidina

MSA-5: 2-metil-5-nitro-1-(2-(pirrolidin)etil)imidazol

MSA-6: *N,N*-dietil-2-(2-metil-5-nitroimidazol)etanamina.



Esquema 6 Síntesis correspondiente para los compuestos **MSA 1-6** a partir del compuesto **MSA 7**.



9. CONCLUSIONES

- Se diseñaron 6 compuestos análogos del nimorazol (**MSA 1-6**), los cuales presentaron buenas propiedades ADME/Tox y farmacodinámicas mediante los estudios *in silico*, por lo que se espera que la serie de compuesto presenten dicha actividad quimioterapéutica por vía oral y sean más solubles que el metronidazol.
- En los estudios de acoplamiento molecular se obtuvieron energías de unión sobre la proteína PFOR, presentando interacciones de tipo puentes de hidrógeno y fuerzas de Van Der Waals además de mantener interacciones de importancia farmacofórica en el sitio catalítico de la diana de interés mediante un análisis de acoplamiento molecular refinado por lo que se puede predecir que los mismos presentarán actividad antiprotozoaria, por lo que se requieren pruebas *in vitro* para la confirmación de estos resultados.
- Mediante el análisis de consenso farmacológico, el cual nos permitió agrupar los cálculos *in silico*, se pudo seleccionar al compuesto **MSA 3** como líder computacional debido a que presentó las mejores propiedades ADME/tox y farmacodinámicas de la serie.
- Los compuestos **MSA 1-6**, destacando a **MSA 3**, son candidatos, debido al análisis de consenso farmacológico, a su obtención mediante la ruta de síntesis química y posteriormente a evaluación antiparasitaria mediante ensayos *in vitro*. Esto con la finalidad de corroborar y dar mayor credibilidad a los resultados obtenidos en este proyecto, aportando así, moléculas bioactivas novedosas como opción terapéutica para el tratamiento de las enfermedades desatendidas.



10. PERSPECTIVAS

- Sintetizar y caracterizar mediante técnicas espectroscópicas y espectrométricas, la serie compuestos diseñados **MSA 1-6**.
- Realizar estudios *in vitro* del compuesto **MSA 3** para evaluar su actividad biológica como tricomonocida y giardicida.
- Realizar estudios de toxicidad aguda para la determinación de dosis letal media (DL_{50}) y determinar la dosis efectiva media (DE_{50}) del compuesto **MSA 3**, con la finalidad de obtener el índice terapéutico y poder compararlo con los resultados obtenidos de manera *in silico*.

REFERENCIAS

- (1) Murray, P. R.; Rosenthal, K. S.; Pfaller, M. A. *Medical Microbiology, Eighth Edition*; 2016.
- (2) Kenneth J., R. *Sherris. Microbiología Médica. Sexta Edición.*; 2017.
- (3) Acerca de los parásitos <https://www.cdc.gov/parasites/es/about.html>. Fecha de consulta: 10-agosto-2020
- (4) Cordero Bernabé, R.; Oliver Galera, E.; Martínez López-Tello, M. A.; Alamillo Sanz, A. Amebiasis, Giardiasis y Tricomoniasis. *Med.* **2014**, *11*, 3181–3193.
- (5) Ryan, U.; Hijjawi, N.; Feng, Y.; Xiao, L. Giardia: An under-Reported Foodborne Parasite. *Int. J. Parasitol.* **2019**, *49* (1), 1–11.
- (6) OMS | Enfermedades Tropicales Desatendidas. *WHO*. Disponible en sitio web: <https://www.who.int/topic>. Fecha de consulta: 22-septiembre-2020
- (7) Ocampo Fernández, N. Generalidades de Los Parásitos. *SUV* **2014**, *1*, 1–5.
- (8) Hernández Martínez, N. A. Síntesis de Uretanos Derivados Del Secnidazol y Su Acción Antiprotozoaria. Tesis de Licenciatura, Facultad de Farmacia, UAEM, **2019**.
- (9) Lareschi, M. Artrópodos Ectoparásitos. In *Macroparásitos. Diversidad y biología*; **2017**; p 167.
- (10) Laclette, J. P.; Bobes, R.; Carrero, J. C. La Era Posgenómica En El Estudio de Los Helmintos. *Ciencia* **2017**, *68* (1), 62–65.
- (11) Apt Baruch, W. L. *PARASITOLOGIA HUMANA*; 2013; Vol. 53.
- (12) Kasper, D.; Fauci, A.; Hauser, S.; Longo, D.; Loscalzo, J.; Larry, J. *Harrison Principios de Medicina Interna 20a Edición*; **2018**; Vol. 2.
- (13) Luna pabello, V. M. *Atlas de Ciliados y Otros Microorganismos Frecuentes En Sistemas de Tratamiento Aerobio de Aguas Residuales.*; **2006**.
- (14) Cruz, U. F.; Escobar, L. G. F.; Cerón, N. O.; Reyes, I. I. T.; Blancas, R. Y. T.; López, N. B.; Osti, Z. A. T.; Ledezma, J. C. R. Enfermedades Parasitarias Dependientes de Los Estilos de Vida. *J. Negat. No Posit. Results* **2018**, *3* (6), 398–411.
- (15) Uribarren Berrueta, T. Trichomoniasis http://microypara.facmed.unam.mx/?page_id=1564. Fecha de consulta 9-septiembre2020.
- (16) Hernández Núñez, E. Diseño, Síntesis y Evaluación Antiparasitaria de Nitroheterocíclicos Bioisósteros Del Benznidazol y Nitazoxanida. Tesis de Doctorado, Facultad de Farmacia, UAEM. **2009**, 31–33.

- (17) López Romero, G. C. Caracterización Inmunoquímica y Molecular de Antígenos Inmunodominantes de Giardia Lamblia En Un Modelo Murino de Giardiasis. *Cent. Investig. en Aliment. y Desarro. A.C.* **2016**, 1 (18–20).
- (18) Quezada, R.; Pierres, G. O. Giardiosis. *Ciencia* **2017**, 68 (1), 34–37.
- (19) Cabrera Licon, A.; Argüello García, R.; Ortega Pierres, M. G. Giardiasis : Generalidades. *Acad. Nac. Med. Mex.* **2018**.
- (20) Matadamas-Martínez, F.; Iglesias-Osores, S. A. Inmunofluorescencia Del Citoesqueleto de Giardia Lamblia. *Rev. Exp. en Med. del Hosp. Reg. Lambayeque* **2018**, 4, 1–2.
- (21) Dirección General de Epidemiología. Anuario de Morbilidad 1984 - 2019 https://epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/incidencia_enfermedad.html
Fecha de consulta: 12-septiembre -2020
- (22) Centers for Disease Control and Prevention. Tricomoniasis. *CDC* **2016**, 1, 2–4.
- (23) Santos Diéguez, I. Tricomoniasis: Una Visión Amplia. **2014**, 27 (2), 198–205.
- (24) Tricomoniasis. Disponible en internet: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=14868:sti-trichomoniasis&Itemid=3670&lang=es Fecha de consulta: 17-septiembre-2020
- (25) Arroyo, R. Tricomonosis. *ciencia* **2017**, 68 (1), 58–61.
- (26) Centers for Disease Control and Prevention. *Tricomoniasis: Hoja Informativa de Los CDC*; **2017**.
- (27) Epidemiología, D. G. de. Boletín Epidemiológico Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica Sistema Único de Información. *Secr. Salud* **2019**, 36, 25–30.
- (28) Cando Brito, V. M. Evaluación Del Conocimiento Sobre Medidas Preventivas Para Evitar La Infección Por Parásitos Intestinales En Niños Que Asisten a La Escuela Leonidas García Durante El Periodo Abril- Mayo, 2016. Tesis de Maestria, Facultad de Ciencias Medicas, UARA., Ambato-Ecuador, 2016.
- (29) OPERON, S. A. *Stick Giardia/Simple Giardia; Test Inmuncromatográfico En Un Solo Paso Para La Detección de Antígenos de Giardia En Heces.*; **2018**.
- (30) Organización Panamericana de la Salud; Organización Mundial de la Salud. *Plan de Acción Para La Eliminación de Las Enfermedades Infecciosas Desatendidas y Las Medidas Posteriores a La Eliminación 2016-2022*; Washington, D.C, **2016**.
- (31) Organización Mundial de la Salud. Infecciones de transmisión sexual. Disponible en internet: [https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-\(stis\)](https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/sexually-transmitted-infections-(stis)) Fecha de consulta: 17-septiembre-2020.
- (32) General, C. de S. *Cuadro Básico y Catálogo de Medicamentos*; **2017**.
- (33) Rocha Garduño, A. G. Síntesis de Carbamatos Derivados de Metronidazol y Su

Efecto Contra Giardiasis Intestinalis. Tesis de Licenciatura, Facultad de Farmacia, UAEM., **2018**.

- (34) Bosquesi, P. L.; Almeida, A. E.; Blau, L. Menegon, R. .; Santos, J. L.; Chung, M. C. Toxicidade de Fármacos Nitrofuránicos. *Rev. Ciências Farm. Básicas e Apl.* **2008**, 29, 231–238.
- (35) Dingsdag, S. A.; Hunter, N. Metronidazole: An Update on Metabolism, Structure-Cytotoxicity and Resistance Mechanisms. *J. Antimicrob. Chemother.* **2018**, 73 (2), 265–279.
- (36) Vives, E. A.; Ventriglia, M. V; Medvedovsky, D.; Rothlin, R. *Nitroimidazoles Y Nitrofuranos*; **2004**.
- (37) Martín Jiménez, D. Mecanismos de Acción de Antiparasitarios (I); Antiprotozoarios. *Fac. Farm. Univ. Complut.* **2019**, No. I, 5–8.
- (38) Nepali, K.; Lee, H. Y.; Liou, J. P. Nitro-Group-Containing Drugs. *J. Med. Chem.* **2019**, 62 (6), 2851–2893.
- (39) Bodek, D. F.; Blum, S. E. C. Ferredoxins. *Educ. Quim.* **2013**, 24 (4), 426–430..
- (40) Cabeza Sebastián, M. Estudio de Nuevos Actores En El Metabolismo Antioxidante de Protozoos Patógenos. Tesis de Doctorado, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, UNL., 2015.
- (41) Carter, E. R.; Nabarro, L. E.; Hedley, L.; Chiodini, P. L. Nitroimidazole-Refractory Giardiasis: A Growing Problem Requiring Rational Solutions. *Clin. Microbiol. Infect.* **2018**, 24 (1), 37–42.
- (42) Botero R., D. Guías Para El Tratamiento de Las Parasitos Intestinales Frecuentes En Colombia. *Biomédica* **1983**, 3 (4), 130.
- (43) Li, J. J. *Medicinal Chemistry for Practitioners*; **2020**.
- (44) Galván Ciprés, D. Y. Síntesis y Evaluación in Vivo de Tiazolidindionas Obtenidas de Isovainillina Como Ligandos Virtuales de PTP-1B y PPAR. Tesis de Licenciatura, Facultad de Farmacia, UAEM., **2017**.
- (45) Filimonov, D. A.; Lagunin, A. A.; Glorizova, T. A.; Rudik, A. V.; Druzhilovskii, D. S.; Pogodin, P. V.; Poroikov, V. V. Prediction of the Biological Activity Spectra of Organic Compounds Using the Pass Online Web Resource. *Chem. Heterocycl. Compd.* **2014**, 50 (3), 444–457.
- (46) Molinspiration Cheminformatics. Disponible en internet: <https://molinspiration.com/> Fecha de consulta: 17-octubre -2020.
- (47) Yang, H.; Sun, L.; Wang, Z.; Li, W.; Liu, G.; Tang, Y. *User Guide for AdmetSAR 2.0*; **2005**.
- (48) Daina, A.; Michielin, O.; Zoete, V. SwissADME: A Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Drug-Likeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecules. *Sci. Rep.* **2017**, 7 (October 2016), 1–13.

<https://doi.org/10.1038/srep42717>.

- (49) Sander, T.; Freyss, J.; Von Korff, M.; Rufener, C. DataWarrior: An Open-Source Program for Chemistry Aware Data Visualization and Analysis. *J. Chem. Inf. Model.* **2015**, *55* (2), 460–473..
- (50) Fuat Gatnik, M.; Worth, A. P. Review of Software Tools for Toxicity Prediction. *JRC Sci. Tech. Reports* **2010**, 1–22.
- (51) Miranda Martínez, J. Síntesis de Derivados Del Ácido Ferúlico Afines in Silico a Múltiples Dianas Terapéuticas Relacionadas En El Abordaje Experimental de La DM 2. Tesis de Licenciatura, Facultad de Farmacia, UAEM., **2018**.
- (52) Morris, G. M.; Huey, R.; Olson, A. J. *Using AutoDock for Ligand-Receptor Docking*; **2008**.
- (53) Chemical Computing Group ULC. Molecular Operating Environment (MOE), 2019.01.
- (54) Gupta, M.; Sharma, R.; Kumar, A. Docking Techniques in Pharmacology: How Much Promising? *Comput. Biol. Chem.* **2018**, *76*, 210–217.
- (55) Kerns, E.; Di, L. Drug-Like Properties: Concept, Structure Design and Methods, From ADME to Toxicity Optimization. *Acad. Press.* **2008**, *1*, 6–16.
- (56) Barros, F.; Domínguez, P.; Machín, A.; De La Peña, P. HERG : Un Canal de Potasio Implicado En El Ritmo Cardíaco y Mucho Más. *Spanish Ion Channel Initiat.* **2012**, 1–9.
- (57) Fan, J.; Fu, A.; Zhang, L. Progress in Molecular Docking. **2019**, *7* (2), 83–89.
- (58) Hernández-Santos, W. J.; Mendoza-Ambrosio, F. N.; Barrera-Figueroa, B. E.; Peña-Castro, J. M. *Visualización de Biomoléculas Con Herramientas Computacionales.*; **2016**.
- (59) Rocha-Garduño, G.; Hernández-Martínez, N. A.; Colín-Lozano, B.; Estrada-Soto, S.; Hernández-Núñez, E.; Prieto-Martínez, F. D.; Medina-Franco, J. L.; Chale-Dzul, J. B.; Moo-Puc, R.; Navarrete-Vázquez, G. Metronidazole and Secnidazole Carbamates: Synthesis, Antiprotozoal Activity, and Molecular Dynamics Studies. *Molecules* **2020**, *25* (4), 1–15.
- (60) Best, R. B. Atomistic and Coarse-Grained Force Fields for Proteins, Small Molecules, and Nucleic Acids. Chapter 1. *Check Updat.* **2019**, *2022*, 3–16.
- (61) Crossnoe, C. R.; Germanas, J. P.; LeMagueres, P.; Mustata, G.; Krause, K. L. The Crystal Structure of Trichomonas Vaginalis Ferredoxin Provides Insight into Metronidazole Activation. *J. Mol. Biol.* **2002**, *318* (2), 503–518.
- (62) Cheminform, K. J.; Kenny, P. W. The Nature of Ligand Efficiency. *J. Cheminform.* **2019**, 1–18.
- (63) Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy, B. W.; Feeney, P. J. Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug



Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *46*, 3–26.

- (64) María Ramos González, A.; M. Ramos González Madrid, A. Síntesis Orgánica: El Arte de Crear Moléculas. *CEU* **2016**, *1*, 1–31.