

Evaluación *in vitro* del efecto de nuevas Tiazolidinonas sobre la invasión y crecimiento del parásito *Toxoplasma gondii*

Diego Alejandro Molina Lara.

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Universidad del Quindío.

Marzo 2020

Evaluación *in vitro* del efecto de nuevas Tiazolidinonas sobre la invasión y crecimiento del parásito *Toxoplasma gondii*

Diego Alejandro Molina Lara.

Director del trabajo: Jorge Enrique Gómez Marín

Comité Tutorial:

Dr. Edwar Cortés

Dr. Nelson Arenas

Tesis de Doctorado presentada como requisito parcial para optar al título de Doctor en Ciencias Biomédicas”,

Doctorado en Ciencias Biomédicas

Universidad del Quindío.

Marzo 2020

**DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

Registro Calificado según Resolución Número 10544 del Ministerio de Educación Nacional de Colombia (MEN) de Julio 14 20 de 2015.

			
SNIES: 54197	SNIES: 54197	SNIES: 54197	SNIES: 54197

"Sin la publicación, la ciencia está muerta"

Gerard Piel, 1915-2004, ex-editor de *Scientific American*, quien contribuyó a la reinvención de la revista y a la redefinición de la era moderna del periodismo científico, citado por Robert A. Day en "How to write and publish a scientific paper", 1998, p. 8.

UNIVERSIDAD DEL QUINDÍO
FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS DOCTORAL

FECHA: ABRIL 29 DE 2020
ESTUDIANTE: DIEGO ALEJANDRO MOLINA
DIRECTOR DEL TRABAJO: Doctor JORGE ENRIQUE GÓMEZ MARÍN

TITULO DEL TRABAJO:

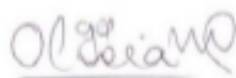
**"EVALUACIÓN IN VITRO DEL EFECTO DE NUEVAS TIAZOLIDINONAS SOBRE LA
INVASIÓN Y CRECIMIENTO DEL PARÁSITO TOXOPLASMA GONDII "**

EVALUACIÓN DE LA SUSTENTACIÓN:

APLAZADO _____ APROBADO X _____
MERITORIO _____ LAUREADO _____

Jurado 1:
Doctora
GINA MARCELA GALLEGO, PhD.
Postdoctoral Fellow
Universidad de Wisconsin

Jurado 2
Doctor
JUAN CARLOS SEPULVEDA, PhD.
Universidad Tecnológica de Pereira
Pereira



Jurado 3:
Doctor
LEONARDO PADILLA, PhD.
Universidad del Quindío
Armenia

Coordinadora del Doctorado:
Doctora
OLGA ALICIA NIETO CÁRDENAS PhD
Universidad del Quindío
Armenia

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS
Registro Calificado según Resolución Número 10544 del Ministerio de Educación Nacional de Colombia (MEN) de Julio 14 20 de 2015

1. Resumen

El tratamiento convencional para la toxoplasmosis es una mezcla entre pirimetamina y sulfadiazina, pero esta quimioterapia presenta efectos secundarios severos. Algunos hallazgos recientes sobre la actividad biológica de las 4 tiazolidinonas y la necesidad de medicamentos que controlen la infección por *Toxoplasma gondii* en humanos, nos llevó a diseñar y sintetizar nuevos derivados 5 ariliden 4-tiazolidinona y 2 hidrazono-4-tiazolidinonas. En este trabajo, realizamos inicialmente un análisis bioinformático de acoplamientos moleculares de las moléculas tiazolidinonas reportadas con altos índices terapéuticos con sitios activos de las proteínas quinasa ROP18 y la calmodulina de *T. gondii*. Luego, se evaluó el efecto en el crecimiento de *Toxoplasma gondii in vitro* de 26 nuevos compuestos derivados de 4-tiazolidinona. Para identificar las tasas de crecimiento de los taquizoitos de *T. gondii* en cultivo de células HFF fibroblastos de prepucio humano (*Human foreskin fibroblast*) se utilizaron dos técnicas. Una técnica fluorimétrica en la que se usaron parásitos verde fluorescentes cepa RH y parásitos ME49 rojo cereza fluorescente. La otra técnica colorimétrica, en el cual los parásitos β -Gal de la cepa RH (virulenta) que expresan constitutivamente beta-galactosidasa, y mediante la adición de un substrato como X-Gal, producen una coloración azul y su lectura espectrofotométrica está entre 420 y 615 nm. Los derivados h, 1B, 2B, 3B mostraron inhibición de la proliferación al mismo nivel de la pirimetamina. Estos compuestos contra *T. gondii* representan valores de IC50: h (0.396 a 0.461 μ M), 1B (0.468 a 0.952 μ M), 2B (0.204 a 0.349 μ M), 3B (0.661 a 1.015 μ M) y dosis media de toxicidad (TD50): h (8 μ M) 1B (60 μ M), 2B (206 μ M), 3B (125 μ M). Estos compuestos ameritan una evaluación *in vivo*. Este trabajo permitió identificar nuevos compuestos combinando técnicas de bioinformática y evaluación *in vitro*

Abstract

Conventional treatment for toxoplasmosis is a mix of pyrimethamine and sulfadiazine but this chemotherapy has severe side effects. Recent findings on the biological activity of the 4 thiazolidinones and taking into account the lack of effective medications used in the treatment of toxoplasmosis, in addition to the numerous side effects of pyrimethamine, led us to design and to synthesize new 5-arylidene 4-thiazolidinone and 2-hydrazone-4-thiazolidinone derivatives. In present work we first performed a bioinformatic analysis of molecular docking between thiazolidinones and protein kinase ROP18 and calmodulin of *Toxoplasma gondii*. Then, we evaluate the *in vitro* growth effect in *T. gondii* of 26 new compounds derived from 4-thiazolidinone was evaluated. To identify the growth rates of *T. gondii* tachyzoites in culture of HFF cells (Human Foreskin Fibroblasts), two techniques were used. A Fluorimetric technique in which RH strain fluorescent green parasites and ME49 fluorescent cherry red parasites were used. The other colorimetric technique, in which the β -Gal parasites of the RH (virulent) strain constitutively expressing beta-galactosidase, and by the addition of a substrate such as X-Gal, produce a blue coloration and its spectrophotometric reading is between 420 and 615 nm. Derivatives h, 1B, 2B, 3B showed proliferation inhibition at the same level of pyrimethamine. These compounds against *T. gondii* represent IC₅₀ values: h (0.396 to 0.461 μ M), 1B (0.468 to 0.952 μ M), 2B (0.204 to 0.349 μ M), 3B (0.661 to 1.015 μ M) and average dose of toxicity (TD₅₀) : h (8 μ M) 1B (60 μ M), 2B (206 μ M), 3B (125 μ M). These compounds merit an *in vivo* evaluation. This work was able to combine bioinformatic and *in vitro* assays to identify new compounds with anti-*Toxoplasma* activity.

Lista de figuras

- Figura 1 Esquema metodológico (Figura realizada por Diego Molina) 8
- Figura 2.. Núcleos de las series A, B y C con sus respectivos grupos sustituyentes de los derivados de tiazolidinona probados in vitro con altos índices terapéuticos 9
- Figure 3. Las modificaciones estructurales realizadas en el núcleo de tiazolidinona como alternativa para la búsqueda de nuevos fármacos con posible actividad anti-Toxoplasma. En el centro de la figura, el núcleo de tiazolidinona se muestra en rojo con su respectiva numeración y su conservación a su alrededor en todos los estudios en los que informan actividad de derivados de tiazolidinona contra *T. gondii*. Además, la estructura del resto hidrazona conservada en la posición 2 del anillo heterocíclico de tiazolidinona se resalta en azul. 26
- Figure 4. Alineamientos estructurales entre los modelos y sus plantillas. a. modelo PDI de *T. gondii* (azul) alineado con PDI humano (rojo) con código PDB 3F8U. b. Modelo β de subunidad pequeña RNR2 de *T. gondii* (azul) alineado con la subunidad β de *Plasmodium vivax* RNR2 (rojo) con código PDB 2O1Z. Estructura cristalina c. TgROP18 (azul) con código PDB 4JRN; las regiones faltantes modeladas se muestran en rojo. d. Estructura cristalina TgCDPK1 (azul) con código PDB 3SX9; las pequeñas regiones faltantes modeladas se muestran en rojo. Los cuadrados verdes muestran sitios activos evaluados en cada proteína objetivo 31
- Figure 5. Interacciones 2D de los mejores ligandos acoplados en el sitio de unión de las proteínas estudiadas. a. complejo de ligando de TgPDI y 30C que muestra energía libre de unión de - 8,7 kcal / mol. b. La subunidad 2 de TgRNR complejo con 34A presentó un valor de - 7.7 kcal / mol para la energía libre de unión. c. TgROP18 complejado con 30C, que muestra una energía libre de unión de - 8,9 kcal / mol. d. Complejo TgCDPK1 con 30C, que muestra una energía libre de unión de - 10.0 kcal / mol 35
- Figura 6. RMSD en función del tiempo de simulación. En los paneles (a) y (b), los gráficos de la RMSD se calcularon con los carbonos α de la proteína después de alinearlos a la estructura inicial con el algoritmo de Kabsch. En los paneles (c) y (d), los gráficos del RMSD se calcularon con todos los átomos pesados del ligando correspondiente, alineando previamente las estructuras a la conformación inicial con el Kabsch ponderado en masa. Cada gráfico corresponde a uno de los cuatro MD realizados con cada sistema. Los gráficos correspondientes al complejo TgROP18 / ATP están coloreadas en tonos naranjas, paneles (a) y (c), y las correspondientes a TgROP / 30C están coloreadas en tonos azules, paneles (b) y (d). La línea roja a 100 ns indica el tiempo utilizado para el comienzo del análisis, donde los sistemas se consideran equilibrados. 37
- Figura 7. Análisis de frecuencias de contacto en las ejecuciones MD de TgROP18 / ATP y TgROP18 / 30C. En el panel a, vista esquemática del sitio de unión. Las subestructuras de la proteína se muestran en diferentes colores. En el panel b, frecuencia de contacto entre el ligando y los residuos con contactos más fuertes. Cada cuadrado representa la frecuencia de contacto del residuo en una corrida de MD. La frecuencia de contacto de los residuos ha sido coloreada de rojo (0%) a verde (100%), como se muestra en la paleta de color. Los contactos de TgROP18 / ATP se muestran a la izquierda; los de TgROP18 / 30C a la derecha. Los contactos han sido separados por la subestructura a la que pertenecen 40
- Figura 8. Residuos que contribuyen a la energía libre de unión de los ligandos. En el panel a, TgROP18 / ATP. Los iones Mg^{+2} se muestran como esferas negras. En el panel b, TgROP18 / ATP. En ambos paneles, solo se muestra que los átomos de hidrógeno polar resaltan sus interacciones. 42
- Figure 9. Las proyecciones de todas las corridas de MD se muestran en el análisis de componentes principales PC. En el panel a, proyección sobre el primer y segundo modo PC. En el panel b, proyección sobre el 3° y 4° modo PC. Los puntos correspondientes al complejo con ATP están coloreados en tonos naranjas, mientras que los correspondientes a 30C están coloreados en tonos

- azules. En el panel c, la gráfica de los valores propios y la acumulación de fluctuación frente al índice del modo PC. Solo se muestran 20 modos de PC del 1053 obtenido 45
- Figure 10. Análisis de dominio dinámico para comparar TgROP18 / ATP con MD1 / MD4 de TgROP18 / 30C. En el panel (a), dominios identificados por el servidor DynDom (azul, amarillo y rojo) y regiones de plegado (verde). En los paneles (b), (c) y (d), vistas paralelas a los ejes de tornillo que modelan la diferencia entre conformaciones. Las flechas negras de rotación indican el movimiento calculado del tornillo. 48
- Figura 11. Cambios estructurales en la proteína TgROP18 causados por la acción del ligando 30C en uno de los dos estados posibles. Estructuras representativas de los complejos ATP-TgROP18 (a) y TgROP18 / 30C (b) después de las simulaciones MD; el bucle G se muestra en amarillo, la región desordenada se muestra en verde, los residuos de la tríada catalítica se muestran en azul cian, el bucle A se muestra en rojo y el hélix-C se muestra en azul. Las regiones en gris son esquemáticas. c Sitio activo de la proteína modelo TgROP18, delimitado por bolsillo de adenina (AP), bolsillo de ribosa (RP) y región de fosfatos de unión (BPR). De izquierda a derecha, el sitio activo se describe con el AP hidrofóbico que interactúa con grupos sustituyentes hidrofóbicos, y RP que podría interactuar con grupos donantes de electrones, y describe el BPR con un perfil hidrofílico y tiende a formar enlaces H con átomos aceptores. d Cambio sobre la superficie electrostática del sitio activo de TgROP18 causado por el ligando 30C después de la simulación MD. 58
- Figura 12. Grupo de moléculas diseñadas derivados 5 ariliden 4-tiazolidinona y 2 hidrazono-4-tiazolidinonas. 60
- Figura 13. Derivados tiazolidinona a) 5- (ARILIDEN) -2- (3,3-DIMETIL-2-OXOBUTILIDEN) -4-TIAZOLIDINONA y b) 2-HIDRAZONO-4-TIAZOLIDINONAS 61
- Figura 14. A. Una vez confluentes, las células HFF se trataron con una concentración de compuesto de 10 μM durante 24 h. Esto fue seguido por un ensayo Alamar Blue con resazurina 0,5 mM a 37 °C con 5% de CO₂ durante 4 h. Los resultados en el gráfico de barras son el promedio \pm desviación estándar del porcentaje de viabilidad por triplicado de un experimento representativo. Se hicieron tres replicas del experimento cada uno por triplicado. B. grafica datos a 5 μM no se observa efecto en la viabilidad celular 63
- Figure 15 . A medida que se aumenta la concentración se reduce la viabilidad de las células HFF. El ensayo de citotoxicidad nos permite aproximarnos a la toxicidad media TD50, 64
- Figura 16. Efecto directo sobre el parásito. Los taquizoitos RH-GFP de *T. gondii* aislados, se trataron con compuestos a 10 μM y 5 μM durante 24 h 37 °C con 5% de CO₂. Los resultados en el gráfico de barras son el promedio \pm desviación estándar del porcentaje de viabilidad por triplicado de un experimento representativo. Se hicieron tres réplicas del mismo experimento con los cuales se obtuvieron resultados similares. 65
- Figura 17. Efecto sobre la proliferación intracelular del parásito. Las placas con los compuestos se infectaron con un inóculo de aproximadamente 10.000 parásitos por pozo. Se observa disminución de la proliferación del parásito. 66
- Figura 18. a) Moléculas (a, h, l) del grupo 5- (ariliden) -2- (3,3-dimetil-2-oxobutiliden) -4-tiazolidinona y (1B, 2B, 3B) del grupo 2-hidrazono-4-tiazolidinona reducen más del 50% de la proliferación del parásito, pero el grupo de ariliden se evaluó a 5 μM porque mostraron toxicidad a 10 μM . b) moléculas que redujeron significativamente la proliferación del parásito 68
- Figure 19.1 Los resultados en el gráfico de barras son el porcentaje de crecimiento de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos independientes cada uno por triplicado 70
- Figure 20. Pretratamiento de células huésped y resultados de exposición extracelular a taquizoitos. (a) Las células HFF se pretrataron con compuestos a 10 μM (molécula h a 5 μM) y se dejaron incubar a 37 °C durante 24 h. Luego se lavaron las células y se infectaron con 40.000 taquizoitos de cereza ME49. (b) Los taquizoitos de cereza ME49 aislados se pretrataron con compuestos a 10 μM durante 4 h a temperatura ambiente, luego se usaron 40.000 parásitos para infectar HFF. Se tomaron lecturas de

fluorescencia 5 días después de la infección para ambos experimentos. Se calculó la dosis tóxica media (TD 50): Dosis del fármaco con la cual se presenta el 50 % de la viabilidad de célula hospedera h (8 μ M), 1B (60 μ M), 2B (206 μ M), 3B (125 μ M). El IC50 es la concentración de un compuesto necesaria para reducir in vitro el crecimiento poblacional de organismos en un 50 por ciento. h (0,39 μ M), 1B (0,46 μ M), 2B (0,20 μ M), 3B (0,66 μ M). Cuanto menor sea un índice terapéutico (IT) más riesgo presenta la administración de dicho medicamento. Mayor toxicidad de la molécula. Por el contrario, un IT elevado nos indica que el medicamento es menos tóxico para las células HFF. El índice terapéutico como medida de eficacia es calculada por TD50/IC50. El IT fue: h de 20, 1B de 128, 2B de 1.000, 3B de 188. La concentración inhibitoria media máxima es una medida de la potencia de una sustancia para inhibir una función biológica o bioquímica específica, se graficó las unidades de fluorescencia para la cepa cereza-ME49 se hizo la transformación y normalización de los datos para hallar el IC50 (ANEXO). 72

Figure 21. Los resultados para el acoplamiento molecular de 2B en el sitio activo de la proteína TgROP18 y el sitio activo de la proteína TgCDPK1, lo cual sugiere que de ocurrir dichas interacciones la más favorable sería la interacción con el sitio activo de la proteína TgCDPK1, esto puede estar relacionado ya que el compuesto 2B estaría presentando una mayor cantidad de puentes de hidrogeno dentro del sitio activo de TgCDPK1, además al ser un sitio más compacto, gracias a la presencia de su dominio calmodulina, posiblemente haría que la cantidad de interacciones aumente. 78

Lista de tablas

Tabla 1. Resultados de simulaciones de acoplamiento molecular para los derivados del núcleo de tiazolidinona seleccionados.	34
Tabla 2. Resumen de los mejores compuestos acoplados en los sitios activos de las proteínas estudiadas de T.gondii	55

Lista de abreviaturas

TD50: Dosis toxica

TI: Índice terapéutico

IC50: Concentración de inhibición del 50 % de la viabilidad

RON: Proteínas del cuello de las roptrias

ROP: Proteínas de las roptrias

PVM: Vacuola parasitófora

RMSD: Desviación de la Raíz cuadrada media

IL-12: Interleukina 12

TgRNR2: Ribo nucleótido reductase

TgPDI: Proteína Disulfuro Isomerase

TgROP18: Proteína del orgánulo roptria 18

TgCDPK1: Calmodulina quinasa

DMSO: Dimetil Sulfóxido

HFF: Human Foreskin Fibroblast

ATP: Adenosín Trifosfato

MD: Dinámica Molecular

MM-GBSA: Área de superficie de Born generalizada por mecánica molecular

PC: Análisis componentes principales

Contenido

1. Resumen	iv
Lista de figuras	vi
Lista de tablas	ix
Lista de abreviaturas	x
2. Introducción	1
2.1 <i>Toxoplasma</i> y Toxoplasmosis.....	3
3. Objetivos.....	6
4. Métodos.....	7
4.1 Fase de análisis <i>in silico</i>	9
4.1.1.1 Selección y preparación de los ligandos.....	9
4.1.1.2 Selección y modelado de proteínas de <i>T. gondii</i>	10
4.1.1.3 Acoplamiento molecular	12
4.2 Fase experimental	14
4.2.1 Síntesis de derivados tiazolidinon.....	14
4.2.2 Mantenimiento líneas celulares.	14
Fibroblastos de prepucio humano (HFF):	14
Parásitos	14
4.2.3 Viabilidad celular HFF por ensayo de azul Alamar.....	15
4.2.4 Viabilidad de los taquizoitos <i>T. gondii</i> RH GFP Ensayo de viabilidad 24h (efecto directo sobre la viabilidad del parásito).....	16
4.2.5 Infección células HFF con taquizoitos de <i>T. gondii</i> RH GFP y ensayo de proliferación a las 48 horas. 17	
4.2.6 Uso de <i>Toxoplasma gondii</i> que expresa beta-Galactosidasa para la evaluación colorimétrica.....	18
4.2.7 Efecto sobre la proliferación de <i>T. gondii</i> ME49 cereza ensayo de 5 días.	19
4.2.8 Ensayo de pretratamiento de la célula hospedera y pretratamiento de los taquizoitos .	19
5 Resultados.....	20
5.1 Resultados fase <i>in silico</i>	20
5.1.1 Evaluación estructural de la farmacología: Una perspectiva sobre el desarrollo del núcleo de tiazolidinona como una nueva estrategia terapéutica para la toxoplasmosis	20
5.1.2 Proteínas blancos de los derivados de tiazolidinona en <i>T. gondii</i> . Enfoque <i>In silico</i> para el diseño racional y el desarrollo de drogas contra <i>Toxoplasma gondii</i>	27
5.1.2.1 Descripción estructural de los blancos receptores.	29
5.1.2.2 Acoplamiento molecular	32

5.1.2.3	Simulaciones de dinámica molecular.....	36
5.1.2.4	Análisis de frecuencia de contacto.....	38
5.1.2.5	Mecánica molecular: superficie de Born generalizada	41
5.1.2.6	Análisis de componentes principales	43
5.1.2.7	Análisis dinámicos de dominios	46
5.1.2.8	Análisis de correlación de cadena peptídicas	49
5.2	Discusión fase <i>in silico</i>	51
5.2.1	Evaluación estructural de la farmacología	51
5.2.2	Preparación de modelos de posibles blancos farmacológicos de tiazolidinonas en <i>T. gondii</i> . 52	
5.2.3	Descripción del efecto del derivado 30C en el sitio activo de la proteína TgROP18	53
5.3	Resultados Fase experimental.....	61
5.3.1	Síntesis de derivados tiazolidinona.....	61
5.3.2	Evaluación de la viabilidad de las células HFF expuestas a los derivados tiazolidinonas por ensayo de azul Alamar.	62
5.3.3	Viabilidad de los taquizoitos <i>T. gondii</i> RH GFP Ensayo de viabilidad 24h.	65
5.3.4	Ensayo de proliferación intracelular a 48 horas.	66
5.3.5	Uso de <i>Toxoplasma gondii</i> que expresa beta-galactosidasa para la evaluación colorimétrica.....	67
5.3.6	Efecto sobre la proliferación en la cepa de <i>T. gondii</i> RH cereza, ensayo de 5 días.	69
5.3.7	Efecto sobre la proliferación del parásito <i>T. gondii</i> ME49 cereza ensayo de 5 días.	71
5.3.8	Pretratamiento de la célula huésped y resultados de exposición extracelular a taquizoitos.	72
5.4	Discusión fase experimental	74
6	Conclusiones	79
7	Perspectivas	80
8	Anexos	85
9	Bibliografía	109

2. Introducción

Hasta la fecha, la mezcla de pirimetamina y sulfadiazina con corticosteroides continúa siendo el estándar en el tratamiento de la toxoplasmosis humana (Jasper et al, 2013). Esta terapia tiene como efecto secundario toxicidad hematológica, la cual se minimiza con leucovorina, sin embargo puede presentar además efectos secundarios graves como reacciones alérgicas o teratogenicidad y se ha reportado el desarrollo de resistencia por parte del parásito. Los informes de la literatura muestran que, en la encefalitis causada por *Toxoplasma*, el 62% de los pacientes presentaron toxicidad y efectos secundarios graves (Porter y Sande, 1992) lo que conlleva a la interrupción de la mezcla pirimetamina-sulfadiazina en pacientes (Dannemann et al, 2017; Katlama et al 1996). Cuando los casos de alergia a las sulfamidas aparecen, se puede aplicar un reemplazo con clindamicina pero la eficacia es menor y la toxicidad es similar (Katlama et al., 1996). Como alternativa, se utiliza el trimetoprim-sulfametoxazol pero que también produce reacciones alérgicas severas (5). La pirimetamina pertenece al grupo de las amino-pirimidinas y la sulfadiazina pertenece al grupo de las sulfonamidas, para ambas moléculas se ha descrito su farmacodinamia y se sabe que actúan en los sitios activos de las proteínas asociadas con la síntesis de ácidos nucleicos. Por esta razón, este tratamiento se complementa con ácido folínico (leucovorina). La idea de este tratamiento es reducir la proliferación del parásito teniendo en cuenta que el parásito se divide más rápido que la célula huésped además que el parásito *T. gondii* no puede sintetizar ácidos nucleicos desde el ácido folínico exógeno, pero el humano sí.

Para la toxoplasmosis ocular, por ejemplo, el régimen quimioterapéutico más frecuente consiste en pirimetamina-sulfadiazina más corticosteroides; este enfoque clásico puede tener algunos riesgos que dependen de la susceptibilidad del paciente a toxicidad de medicamentos o reacciones alérgicas. Otra de las opciones de terapia alternativas se basan en el uso de atovacuna o azitromicina en combinación con

pirimetamina o sulfadiazina pero respaldada por menos datos clínicos y tasas similares de intolerancia al paciente (5). En general, la evidencia apoya la idea de que el régimen farmacológico real utilizado para tratar la toxoplasmosis podría mejorarse y el hecho de que la toxicidad es el principal problema reportado fortalece la idea de que es factible explorar nuevas alternativas farmacéuticas que mejorarían el cuidado de los pacientes. Por lo tanto, existe la necesidad de encontrar nuevos agentes anti-*Toxoplasma* con mejor actividad inhibitoria y baja toxicidad celular, y surge la pregunta ¿Cómo mejorar la especificidad del tratamiento contra el parásito?. Para esto se debe tener en cuenta dos aspectos importantes: la evaluación estructural de farmacología además de la identificación de blancos farmacéuticos, por ejemplo, proteínas únicas del parásito.

En cuanto a la evaluación farmacológica: el núcleo estructural de tiazolidinona se ha mostrado como un compuesto prometedor, similar a un fármaco contra *T. gondii* debido a sus efectos biológicos *in vitro* demostrados y la información experimental reportada por varios autores muestran altos valores de índice terapéutico (TI). Las modificaciones dentro del núcleo tiazolidinona afectan en gran medida las propiedades fisicoquímicas de la molécula, como por ejemplo su solubilidad y la permeabilidad a membranas. Por esta razón, la diversidad estructural es muy importante. La estructura de la fracción hidrazona conservada en la posición 2 del anillo heterocíclico de tiazolidinona podría ser una modificación candidata para mejorar el efecto del núcleo de tiazolidinona ya que los compuestos que presentaron este grupo mostraron una alta efectividad contra la invasión de la célula huésped y la replicación del parásito y baja citotoxicidad; alcanzando concentraciones efectivas en la escala micromolar. También, el núcleo de 1,3-tiazol disustituido en 2,5 podría ser un requisito farmacológico importante.(6,7) La posición de N-3 en las 4-tiazolidinonas es importante como donante de electrones. Identificamos modificaciones estructurales realizadas en el núcleo de tiazolidinona como una alternativa para la búsqueda de nuevos fármacos con posible actividad anti-*Toxoplasma*, por lo que se realizó una revisión cronológica de las modificaciones que se han llevado a cabo en el núcleo estructural tiazolidinona con el fin de mejorar la especificidad del tratamiento por el parásito (Rocha-Roa et al, 2018). En este

trabajo, realizamos inicialmente un análisis bioinformática compuesta de acoplamientos moleculares de las moléculas tiazolidinonas reportadas con altos índices terapéuticos con sitios activos de la proteínas quinasa ROP18 y la calmodulina de *Toxoplasma gondii* (9) y se diseñaron y sintetizaron dos grupos de moléculas a) 5- (ARILIDEN) -2- (3,3-DIMETIL-2 -OXOBUTILIDEN) -4-TIAZOLIDINONA y b) 2-HIDRAZONO-4-TIAZOLIDINONAS. Además, utilizamos sistemas de ensayo fluorimétrico *in vitro* y colorimétrico para filtrar moléculas con efecto anti-*T. gondii*.

2.1 *Toxoplasma* y Toxoplasmosis

Toxoplasma gondii es un parásito protozoario intracelular obligado que pertenece al filo Apicomplexa, tiene la capacidad de infectar animales homeotermos en todo el mundo. Otros Apicomplexos médicamente importantes tal como *Cryptosporidium*, *Babesia* y *Plasmodium* comparten similitudes biológicas que los hacen susceptibles a los medicamentos antifolatos, es decir, pirimetamina y sulfonamidas (5). Se estima que aproximadamente un tercio de la población mundial está infectada de forma latente con *T. gondii*. La seroprevalencia de la infección con *T. gondii* es influenciado por hábitos culturales, higiénicos y nutricionales, y por condiciones climáticas y ambientales (10) con tasas de prevalencia en diferentes regiones del mundo que van desde 7,5 a 80% (11). *Toxoplasma gondii* presenta un ciclo de vida complejo con una variedad de hospederos intermedios. El parásito entra al ser humano principalmente por cuatro vías de infección: (i) por consumo de carne cruda o poco cocida que contiene quistes viables, (ii) comer alimentos o agua potable contaminada con ooquistes, (iii) transmisión de taquizoitos al feto a través de la placenta y (iv) trasplante de órganos (11) o transfusión de sangre (Alvarado-esquivel et al.,2018.). Cuando es adquirido por vía oral, es debido a que en el ambiente se encuentran los quistes en forma de bradizoítos, esporozoitos y ooquistes que invaden las células intestinales, a partir de entonces, son diferenciados a taquizoitos que es la forma diseminada de los parásitos que viaja a través de la sangre o el sistema linfático a diferentes regiones anatómicas para inducir una infección aguda o crónica (Wohlfert et al, 2017). La invasión de la célula huésped

es un evento importante en el cual tres orgánulos del parásito están principalmente involucrados: micronemas, roptrias (compuesto por dos subestructuras diferentes: cuello de la roptria y bulbo de la roptria) y gránulos densos. Proteínas secretadas por estos tres organelos son cruciales en la unión de la célula huésped, adhesión, penetración, y en la formación de la vacuola parasitófora. Primero las proteínas de los micronemas (MIC) están involucradas en la unión a receptores de membrana del huésped. Segundo las proteínas del cuello de las roptrias (RON) son lanzadas para formar la unión móvil (*moving junction*), esta estructura es importante para la conformación de la membrana de la vacuola parasitófora (PVM) usando la membrana del huésped pero sin proteínas. Luego, se liberan proteínas del bulbo de roptrias (ROP) dentro de las vacuolas a la cara citosólica de PVM. Finalmente, las proteínas granulares (GRA) se liberan en el PVM. (Lalibertø et al, 2008). Hay informes que muestran la importancia de proteínas como ROP18, ROP5, ROP16 y GRA15 que se encuentran involucradas en la modulación inmune dependiendo del tipo de cepa, así las cepas tipo I muestran la activación prolongada de STAT3 / 6 que lleva a una producción reducida de IL-12 lo cual evita la eliminación de los parásitos. Esta modulación de la respuesta inmune por parte del parásito está relacionado con alta virulencia de esta cepa tipo I. La no activación sostenida de STAT3 / 6, los altos niveles de IL-12 y la eliminación mejorada de parásitos está relacionado con virulencia intermedia en cepas de tipo II y la activación prolongada de STAT3 / 6, la producción reducida de IL-12 mejora la eliminación de parásitos relacionada con baja virulencia en cepas tipo III (Hunter et al , 2012)

La infección por *T. gondii* trae complicaciones clínicas tales como enfermedades oculares, neurológicas y sistémicas principalmente en pacientes inmunocomprometidos y aquellos infectados congénitamente. La toxoplasmosis ocular es una de las causas más comunes de uveítis posterior en 20 a 60% de los casos y, en algunos países, es una de las causas más importantes de discapacidad visual (Gómez-Marín et al., 2012, Pfaff et al, 2014). Las complicaciones neurológicas son características de un síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y son una de las causas de lesiones masivas del SNC en el SIDA. La toxoplasmosis cerebral también se asocia con una alta mortalidad y morbilidad en

pacientes inmunocomprometidos (18). En la toxoplasmosis congénita, la infección se adquiere durante el embarazo y puede tener efectos devastadores en el feto y en algunos casos lleva a una infección ocular crónica que puede reactivarse dependiendo de diferentes factores (19).

3. Objetivos

Objetivo general

Identificar nuevos compuestos químicos líderes para el tratamiento de la toxoplasmosis a partir de un núcleo de tiazolidinona, utilizando la combinación de métodos *in silico* y técnicas *in vitro*

Objetivos específicos

- ✓ Evaluar el efecto de las nuevas tiazolidinonas en la invasión y el crecimiento intracelular (proliferación) del parásito *Toxoplasma gondii* en un modelo *in vitro*
- ✓ Evaluar el efecto citotóxico de las tiazolidinonas en el cultivo de células HFF.

4. Métodos

En la primera fase se realizó una búsqueda bibliográfica con el fin de comprender las modificaciones estructurales realizadas en el núcleo tiazolidinona con el fin de mejorar la especificidad por el parásito y reducir la toxicidad. También, se realizó una aproximación *in silico* de la interacción del núcleo tiazolidinona en el sitio activo de diferentes proteínas del parásito importantes para la virulencia de este. Elegimos proteínas que juegan un papel importante en la supervivencia y la virulencia de *T. gondii*. Los blancos elegidos fueron: la subunidad pequeña de la reductasa de nucleótidos (TgRNR2), la proteína disulfuro isomerasa (TgPDI)(Müller., 2008), la proteína quinasa ROP18 (TgROP18) y la proteína quinasa 1 dependiente de calcio (TgCDPK1).(Parker et al., 2012) Estos blancos se seleccionaron porque se encontraban experimentos reportados donde asociaban al núcleo tiazolidinona con estas proteínas. Para evaluar la interacción proteína-ligando, realizamos simulaciones de acoplamiento molecular con los ligandos reportados por (22) y (23) Finalmente, elegimos un posible blanco prometedor para caracterizarlo aún más por interacciones proteína-ligando mediante simulaciones de dinámica molecular (MD). Después de la aproximación teórica y computacional se realizó la síntesis y caracterización de las moléculas propuestas como mejores ligandos para una proteína quinasa única del parásito y luego se realizó la evaluación *in vitro* de las moléculas por técnicas fluorimétricas y colorimétricas (**Figura 1**).



Moléculas diseñadas por quimioinformática

Sintetizar y caracterizar estructura

Viabilidad celular HFF por ensayo azul Alamar.

T. gondii GFP tachyzoites 24h Ensayo de viabilidad.

T. gondii GFP tachyzoites 48h ensayo de proliferación.

Uso de *Toxoplasma gondii* que expresa beta-galactosidasa para la evaluación colorimétrica.

Efecto sobre la cepa *T. gondii* ME49 ensayo de proliferación de 5 días.

Ensayo de pretratamiento de células huésped y parásitos extracelulares.

11

Figura 1. Esquema metodológico (Figura realizada por Diego Molina)

4.1 Fase de análisis *in silico*

4.1.1 Evaluación estructural de la farmacología

4.1.1.1 Selección y preparación de los ligandos.

Se utilizaron 15 compuestos derivados del núcleo tiazolidinona (**Figura 2**), reportados con altos índices terapéuticos para el estudio de acoplamiento molecular con proteínas de *Toxoplasma gondii*. Diez de ellos fueron tomados de las series A y B de un trabajo previo (22) y otros cinco (serie C) siguiendo los compuestos propuestos por Carradori et al. (23). Elegimos los compuestos que se reportaron con índices terapéuticos más altos (TI), definiendo TI = dosis citotóxica media (TD50) / concentración inhibitoria media (IC50). Entre mayor el número de índice terapéutico, mayor la especificidad del tratamiento al parásito y menor toxicidad. Como segundo criterio, priorizamos moléculas con valores bajos de IC50 y bajos de IC90 efecto sobre el parásito (Tabla 1). La estructura de los derivados de tiazolidinona fue obtenido por minimización de energía usando Gaussian 09 software (M. J. Frisch, et al , Gaussian 09 , Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009) en el conjunto básico B3LYP / 6-31G * (d, p) y método DFT.

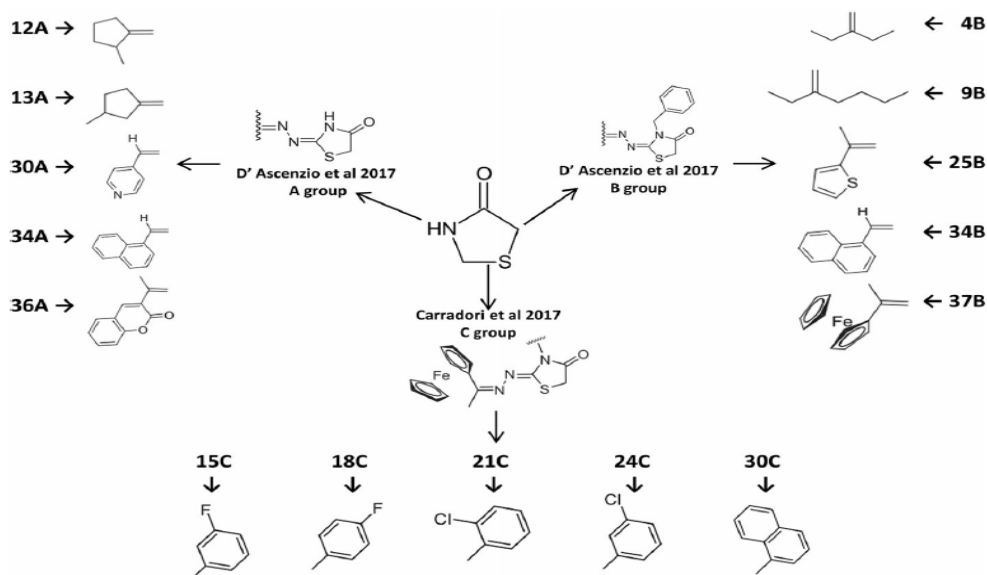


Figura 2. Núcleos de las series A, B y C con sus respectivos grupos sustituyentes de los derivados de tiazolidinona probados *in vitro* con altos índices terapéuticos

4.1.1.2 Selección y modelado de proteínas de *T. gondii*

Se seleccionó TgPDI porque tiene un análogo estrechamente relacionado que es susceptible a los tiazolidas (25). Este trabajo previo mostró que los tiazolidas interfieren con las proteínas disulfuro Isomerasa de *Neospora caninum* (NcPDI). La interacción fue probada por cromatografía de afinidad de extractos de taquizoitos *N. caninum* con nitazoxanida, que es un miembro prototipo de las tiazolidinas aceptadas por la Administración de Alimentos y Medicamentos de Estados Unidos (*Food and Drug Administration*, FDA). *N. caninum* es un parásito filogenéticamente relacionado con *T. gondii*, lo cual llevó a que los autores concluyeran que posiblemente estaría relacionado con las proteínas PDI de otros microorganismos susceptible a tiazolidas (25). Estas características hacen de TgPDI un blanco interesante a considerar. La secuencia de TgPDI se obtuvo de ToxoDB (26), código TGME49_211680. La plantilla utilizada para la homología. el modelado fue la cadena A del PDI humano, con código PDB 3F8U (27) .

Se eligió TgRNR2 porque es inhibida por moléculas relacionadas estructuralmente con el núcleo de tiazolidinona (28). En este trabajo previo, Montazeri y colaboradores en el 2017 describieron que los compuestos hidroxurea y tiosemicarbazonas inhiben la pequeña subunidad de ribonucleótido reductasa (RNR2) de *T. gondii*. Debido a esta inhibición, los compuestos que inhiben TgRNR2 interfieren con la síntesis de ADN y presentan actividad anti-*T. gondii*. Dado que estas moléculas están estrechamente relacionadas a tiosemicarbazidas y tiazolidinonas, puede ser posible que las moléculas que contienen el núcleo tiazolidinona tengan una farmacodinámica similar (28), es decir, interactuando con el centro de hierro di-nuclear de la subunidad RNR2 (29), y por lo tanto, incluimos TgRNR2 para el análisis. La secuencia de TgRNR2 se obtuvo de ToxoDB, código TGGT1_207060. La plantilla utilizada para el modelo de homología fue el RNR2 de *Plasmodium vivax*, con código PDB 2O1Z (cadena A).

Se sabe que las moléculas que contienen el andamio de tiazolidinona inhiben las proteínas quinasas. La literatura indica que las tiazolidinonas inhiben las proteínas quinasas que son relevantes para la supervivencia de células malignas; como

fosfoinositida 3-quinasa (PI3K), quinasa activada por mitógeno (MEK), pim quinasa 1 (Pim-1) y 5'-adenosina proteína quinasa activada por monofosfato (AMPK)(21)(30). Esto abre la posibilidad de encontrar interacciones entre derivados de tiazolidinona y proteínas quinasas de *T. gondii*. El dominio de quinasa de TgROP18 se seleccionó porque esta proteína es esencial para *T. gondii*. Proteínas del orgánulo de Roptria, conocidas como proteínas ROP, tal como TgROP18, son quinasas únicas de los organismos apicomplexa. Se inyectan en la célula huésped en el momento preciso de la internalización y manipulan la respuesta inmune de la célula hospedera. Estos roles hacen que TgROP18 sea un factor clave para modular la virulencia de *T. gondii* (31), TgROP18 contiene un dominio serina / treonina quinasa. La proteína TgROP18 fue encontrada en el Protein Data Bank con el código PDB 4JRN(31). Sin embargo, su cristalización faltan regiones (Gln211 a Ala217, Ala440 a Ile441, Phe453 a Thr456 y Glu549 a Glu554). Para completar la estructura, modelamos los residuos restantes usando el cristal como plantilla.

Se eligió TgCDPK1 porque es otra proteína quinasa crucial para *T. gondii*. Esta proteína es parte de una familia importante de proteínas similares a las quinasas, involucradas en vías controladas por el calcio. Además, está relacionado a la movilidad del parásito, por lo tanto, a la adhesión / invasión a la célula huésped. Estas proteínas se encuentran en parásitos protozoarios, plantas y ciliados, pero no en animales u hongos (32). Estas proteínas serina / treonina quinasa han sido implicadas en funciones específicas y en el desarrollo de distintas etapas en el complejo ciclo de vida en los parásitos apicomplexa (33). Por las razones anteriores, TgCDPK1 es un blanco interesante para explorar. La estructura cristalina de esta proteína puede ser encontrada en el Protein Data Bank, con el código PDB 3SX9 (34). Sin embargo, en su estructura faltan pequeñas regiones (Glu314 a Val318 y Met390 a Gln393). Con el fin de completar la estructura, modelamos los residuos restantes usando la estructura cristalina como plantilla.

Los modelos se hicieron con el servidor web SWISS-Model (Guex et al , 2003). La inspección y visualización de los modelos construidos, la alineación estructural entre cada modelo y su plantilla correspondiente, y el cálculo la desviación cuadrática

media (RMSD) a través del programa UCSF Chimera 1.12 (Pettersen et al, 2004); el gráfico de Ramachandran se generó con el servidor web ProFunc (Laskowski, 2005) .

4.1.1.3 Acoplamiento molecular

Los ligandos y las proteínas receptoras se prepararon con el Software AutoDock Tools v1.5.6 (Morris et al, 2010). El sitio y el tamaño de la caja de búsqueda se estableció para abarcar cada residuo involucrado en el sitio catalítico de cada receptor. Las simulaciones moleculares de acoplamiento se realizaron utilizando el Paquete AutoDock Vina v1.1.2 (Oleg Trott et al , 2011). Se estableció el parámetro de la exhaustividad a 20. Luego, para validar los resultados y mejorar el cribado, realizamos una re-puntuación con las funciones de puntuación DSX-score y X-Score. Las posturas re-puntuadas fueron las mejores obtenidas de Autodock Vina para cada derivado de tiazolidinona. Las interacciones del complejo receptor-ligando (Van der Waals, contactos hidrofóbicos y enlaces de hidrógeno) fueron visualizadas con el software BIOVIA Discovery Studio Visualizador v16.1.0.15350 (Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio 2016, v16.1.0.15350. San Diego) Dassault Systèmes; 2018. <http://www.3dsbiovia.com/about/citationsreferences/>. Las poses acopladas eran visualizadas usando UCSF Chimera v1.12. (36).

4.1.1.4 Simulaciones de dinámica molecular.

El resultado de los procedimientos anteriores nos llevó a realizar simulaciones de dinámica molecular (MD) de dos sistemas: TgROP18 unido a ATP (el sustrato) y TgROP18 unido al ligando 30C (molécula con alto IT). La estructura completa de TgROP18 se utilizó como coordenadas iniciales de la proteína. Las coordenadas iniciales de 30C fueron tomadas de la pose acoplada con la mejor puntuación. Las coordenadas de ATP y Mg^{+2} se generaron a partir de las moléculas co-cristalizadas AMP-PNP y Mg^{+2} durante la cristalización de TgROP18 (40). Los sistemas fueron solvatados en una caja de agua de $97 \times 88 \times 93 \text{ \AA}^3$. Las moléculas de agua fueron reemplazadas aleatoriamente por Na^+ y Cl^- para neutralizar los sistemas y alcanzar la concentración de sal de 0.15 M. Utilizamos el campo de fuerza Amber ff14SB

para el modelo de proteínas y TIP3P para las moléculas de agua. Se obtuvieron los parámetros y cargas del campo de fuerza ATP del Grupo Bryce (41). Los parámetros de campo de fuerza de 30C se generaron con MCPB.py (P. Li & Merz, 2015). Los cálculos orbitales moleculares necesarios para el procedimiento se realizaron con Gaussian 09 (Frisch M et al., 2015) utilizando el B3LYP / 6-31G * conjunto básico. Los sistemas fueron minimizados con 5.000 descensos más pronunciados, pasos seguidos por 5.000 pasos de gradiente conjugado. Las restricciones armónicas fueron aplicadas a proteínas y ligandos con átomos pesados, estableciendo una fuerza constante de 10 kcal / mol / Å². Luego, los sistemas se calentaron linealmente de 0 a 310 K a presión constante en 250 ps. La temperatura fue controlada con un termostato Langevin, con una frecuencia de colisión de 1 ps⁻¹. El paso de tiempo se estableció en 1 fs. La presión se estableció en 1 bar y se controló cambiando los límites de la caja isotrópicamente a través de un termostato Berendsen, con un tiempo de relajación de presión de 1 ps. Se utilizó PME para calcular las interacciones electrostáticas de largo alcance con un valor de corte eléctrico de 10 Å. Luego, en la etapa de equilibrado, se llevaron a cabo cinco simulaciones de 200 ps para eliminar las restricciones gradualmente. Las constantes de fuerza utilizadas para restringir átomos pesados de los complejos fueron 5.0, 2.5, 1.0, 0.4 y 0.1 kcal/mol/Å², respectivamente. Finalmente, para la etapa de producción, aumentamos el intervalo de tiempo a 2 fs mientras se restringieron las longitudes de enlace que involucran átomos de hidrógeno con el algoritmo SHAKE. En esta etapa, las configuraciones del sistema se guardaron cada 20 ps. Para cada sistema, realizamos tres MD equivalentes de 300 ns con diferentes semillas para el termostato, las cuales fueron números al azar. Además, validamos dos conformaciones muestreadas en las MD (uno de MD1 de *TgROP18/30C* y otro de MD3 de *TgROP18/ATP*). Para este caso, seleccionamos una configuración representativa de cada MD y se repitió la etapa el equilibrio/producción. Al final, tenemos cuatro MD de cada sistema. Todas las simulaciones MD se realizaron con el programa AMBER16 (Case D., 2016). El análisis de las trayectorias se realizó con Ambertools18. Las figuras fueron creadas con el programa Gnuplot e Inkscape VMD v3.2 (Humphrey Wet al,1996).

4.2 Fase experimental

4.2.1 Síntesis de derivados tiazolidinona a) 5- (ARILIDEN) -2- (3,3-DIMETIL-2-OXOBUTILIDEN) -4-TIAZOLIDINONA y **b)** 2-HIDRAZONO-4-TIAZOLIDINONAS. Se describen en la sección de material suplementario.

- Todas las reacciones fueron monitoreadas por TLC realizada en placas de gel de sílice 60 F254
- La descripción estructural es un complemento de técnicas: **FT-IR** Thermo Scientific Nicolet 380. Los espectros de masas se realizaron en un cromatógrafo de gases acoplado en masa (Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra).
- Los puntos de fusión se determinaron en un fusiómetro digital electrotérmico IA-9100 (ELECTROTHERMAL).
- Los análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en un Bruker Avance 400 usando DMSO-d₆ como disolvente. Los desplazamientos químicos se expresan como partes por millón (ppm). Las constantes de acoplamiento J se presentan en Herz (Hz).

4.2.2 Mantenimiento líneas celulares.

Fibroblastos de prepucio humano (HFF): fibroblastos de prepucio humano (HFF) se obtuvieron de ATCC. Los HFF se mantuvieron en medio DMEM suplementados con FBS al 10% (*Fetal Bovine Serum-Gibco*, EE. UU.), 1X de glutaMAX 100X, 1 mM de piruvato de sodio 100 mM y 50 µL de penicilina (10,000 Unidades / mL) y estreptomycin (10,000 µg / mL) por ml a 37 °C con 5% de CO₂ y todas las cepas utilizadas de *T. gondii* (RHβ1, GFP, cereza ME49) se mantuvieron en medios DMEM suplementados con suero bovino al 10% inactivado por calor (GE Healthcare Life Sciences).

Parásitos: Para identificar las tasas de crecimiento de los taquizoitos de *Toxoplasma gondii* en cultivo celular HFF (fibroblastos de prepucio de humanos), se utilizaron tres líneas de parásitos diferentes, *T. gondii* GFP-RH, RHβ1-Beta-Gal y

ME49 cereza. Estas cepas de parásitos se pasaron en monocapas confluentes de fibroblastos de prepucio humano (HFF). RH-GFP (proteína fluorescente verde) que no requiere factores externos y es estable en un amplio espectro de condiciones (46). Para un efecto directo sobre el parásito y la proliferación en la que se usaron los parásitos *T. gondii* GFP de la cepa RH (virulenta) con la capacidad de emitir fluorescencia al recibir excitación a 395 a 475 nm, de modo que se puede generar una fluorescencia verde que puede ser observado en un microscopio de fluorescencia. Los parásitos RH β 1 es la cepa RH que porta el gen *Escherichia coli* lacZ (β -galactosidasa) bajo el control del promotor SAG1 (47). Los parásitos de *T. gondii* β -Gal de la cepa RH (virulenta) que están genéticamente modificados que expresan constitutivamente Beta-Galactosidasa, luego se agrega el sustrato X-Gal, produciendo una coloración azul que puede cuantificarse mediante lectura espectrofotométrica a una longitud de onda de 615 nm. Los parásitos ME49 cereza fluorescente se cuantificó mediante el análisis de Incucyte sin necesidad de extraer las células de la incubadora o perturbar los cultivos. El equipo hace una adquisición y análisis automáticamente de imágenes de fluorescencia y contraste de fase a lo largo del tiempo.

4.2.3 Viabilidad celular HFF por ensayo de azul Alamar.

Los fibroblastos de prepucio humano (HFF, fibroblastos de piel de prepucio normal humano, código ATCC No: SCRC-1041) de la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland. La línea celular HFF-1 se cultivó como monocapa y se mantuvo en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 100 U / mL de penicilina y 100 μ g / ml de estreptomycin en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37 °C en cajas T-25 y se subcultivaron dos veces por semana. La línea celular se sembró con aproximadamente 20,000 células por pocillo y se dejó crecer hasta confluencia. Una vez confluentes, las células se trataron con concentración de compuesto a 10 μ M durante 24 h. Esto fue seguido por un ensayo Alamar Blue con resazurina 0,5 mM a 37 °C con 5% de CO₂ durante 4 h. Todas las concentraciones se realizaron por triplicado. Luego se tomó una lectura fluorescente con un lector de placa BioTek Synergy HT a 530/25 de

excitación y 590/25 de emisión. La viabilidad de la célula huésped se determinó comparando los tratamientos con la condición sin ningún tratamiento como el 100% de viabilidad. Un cambio de color de azul a rosa indica las células son metabólicamente activas. Un cambio de color en el pozo de control de crecimiento a rosa indica un crecimiento celular adecuado y ningún cambio de color en el pozo de control estéril indica ausencia de contaminantes.

4.2.4 Viabilidad de los taquizoitos *T. gondii* RH GFP Ensayo de viabilidad 24h (efecto directo sobre la viabilidad del parásito).

Los parásitos de la cepa RH GFP se cultivaron en fibroblastos de prepucio humano (HFF). Los parásitos a utilizar en el ensayo se prepararon como sigue. Los cultivos que habían lisado completamente una monocapa HFF se tomó sobrenadante en un tubo de centrífuga y se centrifugaron a 500 g x 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar los restos de células huésped y los agregados de parásitos. Los sobrenadantes se pasaron a otro tubo de centrífuga y se centrifugó a 1.800 g x 10 minutos a temperatura ambiente y se recolectó el precipitado. Los parásitos resultantes se resuspendieron, contaron y diluyeron en medio. Los taquizoitos de *T. gondii* (5×10^5) se trataron durante 24 h directamente con las nuevas tiazolidinonas y la pirimetamina 10 uM. Los parásitos que florecían de color verde se consideraron viables debido a que la proteína verde fluorescente está unida a una proteína de citoesqueleto. El porcentaje de células viables se calculó utilizando la siguiente fórmula (Fluorescencia de la muestra con tratamiento URF * 100) / fluorescencia del control sin tratamiento URF = (muestra Fluoresce * 100) / BLK) unidades de fluorescencia de la unidad URF. Los parásitos en placas de 96 pocillos se estudiaron directamente mediante microscopía de fluorescencia utilizando una cubeta fluorescente estándar EVOS Light Cube GFP. Excitación 470/22 Emisión: 526/60 TECNOLOGÍAS DE VIDA INVITROGENADAS con un objetivo 10X en el sistema de imágenes en color EVOS FL. Las imágenes fueron grabadas y ajustadas para contraste con ImageJ. La fluorescencia de los pocillos con parásitos tratados se comparó con el control sin tratamiento. (48) (Mahsa Ansari 2019). Para todas las metodologías, los compuestos se disolvieron en DMSO (Fischer Scientific). La

concentración de DMSO no superó el 1% en todos los ensayos para prevenir la citotoxicidad. Cabe resaltar que se hizo una alianza con el College of Science, Harbin Institute of Technology, Shenzhen, China, con el fin de realizar los primeros pasos en el diseño de una máquina de detección de parásitos intracelulares. Para esto se realizó una máquina de aprendizaje por transferencia para la detección de taquizoitos de *Toxoplasma*. El conocimiento de los parasitólogos es que el parásito *Toxoplasma* generalmente tiene forma de plátano o media luna. En base a esto, creamos conexiones entre objetos asociados microscópicos y macroscópicos incorporando el algoritmo de agrupación difusa C-means en la red de adversarios generativos del ciclo (Cycle GAN). Nuestro enfoque logra una alta precisión y efectividad en 400 y 1,000 imágenes microscópicas de *Toxoplasma*. (49). Los resultados fueron publicados en mSystems. 2020 Jan-Feb; 5(1): e00445-19.(Published online 2020 Jan 28. doi: 10.1128/mSystems.00445-19).

4.2.5 Infección células HFF con taquizoitos de *T. gondii* RH GFP y ensayo de proliferación a las 48 horas.

Las células HFF se sembraron en placas de 96 pozos a aproximadamente 20,000 células por pozo y se dejaron crecer hasta confluencia. Los sobrenadantes de cultivos de parásitos que habían lisado completamente una monocapa HFF se recogieron en un tubo de centrifuga y se llevaron a centrifugación a 500 g durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar los restos de células huésped y los agregados de parásitos. Los sobrenadantes se pasaron a otro tubo de centrifuga y el precipitado se recogieron después de centrifugar a 1.800 g durante 10 minutos a temperatura ambiente. Los parásitos resultantes se resuspendieron, contaron y diluyeron en medios a una concentración de 2×10^6 parásitos por mL, y se añadieron 5 μ l de esta suspensión a los pozos apropiados de las placas de microtitulación, que ya contenían los compuestos a ensayar, para dar un inóculo de aproximadamente 10,000 parásitos por pozo. Para GFP, la fluorescencia se cuantificó por microscopía de fluorescencia usando un fluorescente estándar EVOS Light Cube GFP. Excitación 470/22 Emisión: 526/60 (Thermo Fischer Scientific, Estados Unidos) con un objetivo 10X en el sistema de imágenes en color EVOS FL. Las imágenes fueron

grabadas y ajustadas para contraste con ImageJ. La fluorescencia del pozo con parásitos tratados se comparó con el control sin tratamiento. Las placas se incubaron luego a 37 ° C con 5% de CO₂ durante 48 h.

4.2.6 Uso de *Toxoplasma gondii* que expresa beta-Galactosidasa para la evaluación colorimétrica.

Utilizamos el ensayo de microtitulación para la evaluación de nuevas tiazolidinonas con una cepa de *Toxoplasma gondii* que expresa beta-galactosidasa bacteriana. Los parásitos fueron amablemente donados por John Boothroyd (Universidad de Stanford, Estados Unidos). Este ensayo proporciona una alternativa no radiactiva de alto rendimiento para la identificación de compuestos anti-*T. gondii*. Se utilizó un inóculo de aproximadamente 10.000 parásitos por pozo, en pozos que ya contenían los compuestos, en comparación con el control sin tratamiento. Las placas fueron incubadas a 37 °C con 5% de CO₂ durante 96 h. después de este tiempo, se añadieron 2 µl de X-Gal 30 mg por mL (Sigma-USA), para dar una concentración final de 100 µM de X-gal. Las placas se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 h adicionales y luego se leyeron a 420 y 615 nm en un lector de placa de microtitulación Bio-tek. Se debe tener en cuenta que:

- previo al ensayo, se estandarizó el número adecuado de parásitos para realizar los experimentos, ya que este número permitía encontrar diferencias en las lecturas y la coloración producidas por el sustrato X-Gal. Por lo tanto, para cada experimento se usaron 10,000 parásitos por pocillo en placas de 96 pozos, para realizar los experimentos de crecimiento celular HFF después de agregar moléculas de tiazolidinona.
- para la técnica colorimétrica como X-Gal, debemos tener en cuenta que las moléculas pueden producir color cuando se diluyen en DMSO y se mezclan con los medios DMEM. Luego, los valores de absorbancia producidos se restaron con el color de control de cada molécula (medios y moléculas).

4.2.7 Efecto sobre la proliferación de *T. gondii* ME49 cereza ensayo de 5 días.

Las células HFF se sembraron en placas de 24 pozos y se dejaron crecer hasta una monocapa confluyente. Una vez se alcanzó la confluencia, se agregaron 40.000 taquizoitos cereza ME49 a cada pozo y las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h para permitir la infección. Los medios se reemplazaron y los compuestos disueltos en DMSO (Fischer Scientific) se agregaron a una concentración de 10 y 5 µM de acuerdo con los resultados de citotoxicidad de HFF. La concentración de DMSO no superó el 1% en todos los ensayos para prevenir la citotoxicidad. Todas las concentraciones se realizaron por duplicado y se usó pirimetamina 10 µM como control positivo de inhibición de la proliferación. Luego se tomó una lectura fluorescente con un lector de placa IncuCyte S3 a 530/25 de excitación y 590/25 de emisión durante 5 días.

4.2.8 Ensayo de pretratamiento de la célula hospedera y pretratamiento de los taquizoitos

Las células HFF se cultivaron en placas de 24 pozos hasta la confluencia. Se añadieron 10 µM de compuesto respectivo a los pozos (realizado por triplicado). Después de 24 h de exposición compuesta, las células se lavaron dos veces con medio. Luego se infectaron las células con 40.000 taquizoitos de cereza ME49 / pozo y se cuantificó el crecimiento del parásito por fluorescencia durante 5 días después de la infección en el Incucyte S3. Para evaluar el efecto de la exposición del compuesto a los taquizoitos libres, se agregaron 10 µM del compuesto respectivo a los taquizoitos de cereza ME49 aislados del cultivo y se resuspendieron en medio a 4×10^6 taquizoitos / mL. La exposición al compuesto duró 4 horas a 37 °C. Después del tratamiento, los taquizoitos se centrifugaron y se lavaron dos veces. Luego se infectaron HFF confluentes en placas de 24 pocillos con 40000 taquizoitos tratados por pocillo. El crecimiento de taquizoitos se cuantificó por fluorescencia a los 5 días después de la infección en el Incucyte S3.

5 Resultados

En este trabajo, realizamos inicialmente un análisis bioinformático compuesto de acoplamientos moleculares de las moléculas tiazolidinonas reportadas con altos índices terapéuticos con sitios activos de la proteínas quinasa ROP18 y calmodulina de *Toxoplasma gondii* (Molina et al., 2018). se diseñaron y sintetizaron dos grupos de moléculas a) 5- (ARILIDEN) -2- (3,3-DIMETIL-2 -OXOBUTILIDEN) -4-TIAZOLIDINONA y b) 2-HIDRAZONO-4-TIAZOLIDINONAS. Además, utilizamos sistemas de ensayo fluorimétrico y colorimétrico *in vitro* para filtrar moléculas con efecto anti-T. gondii.

5.1 Resultados fase *in silico*

5.1.1 Evaluación estructural de la farmacología: Una perspectiva sobre el desarrollo del núcleo de tiazolidinona como una nueva estrategia terapéutica para la toxoplasmosis

La evaluación estructural de la farmacología consiste en comprender las modificaciones que se han hecho de manera racional en un núcleo estructural con la finalidad de mejorar la especificidad del tratamiento por el parásito. Debido a que las tiazolidinonas tienen índices terapéuticos altos en ensayos *in vitro* en *T.gondii*, aparecen como una buena alternativa contra toxoplasmosis. Una de las formas para obtener el núcleo tiazolidinona surge después de la combinación de dos precursores de los cuales se conocen importantes actividades biológicas, hidroxiiurea y tiosemicarbazona (Tenório et al, 2005). La hidroxiiurea tiene un fuerte efecto sobre la eliminación intracelular de protozoos como *T. gondii*, *T. cruzi* y *L. amazonensis* (50). Por otro lado, se ha informado que las tiosemicarbazonas son inhibidores potenciales de la enzima ribonucleótido reductasa, responsable de la síntesis desoxirribonucleótidos (51). La actividad de las tiosemicarbazonas se ha relacionado con la capacidad de quelar átomos de metal que son importantes para la supervivencia del parásito; esta característica también se comparte con el grupo arilhidrazona, resto que se ha utilizado para la mejora de la actividad biológica de la tiazolidinonas (52). Desde otro punto de vista, se podría pensar que el hecho de reunir núcleos estructurales con actividades biológicas importantes es uno de los

factores que le dan a las tiazolidinonas un amplio espectro de actividad farmacológica; Por esta razón, los derivados del núcleo de tiazolidinona se ha convertido en objeto de estudio debido a sus numerosas actividades biológicas, convertirse en un andamio promisorio con potencial farmacéutico y con efectos antitoxoplasma (30).

El primer estudio en vincular los compuestos de tiazolidinona con la actividad anti-toxoplasma fue reportada por (53), quien diseñó una serie de compuestos de tiosemicarbazona sustituidos en el radical arilhidrazona con sustituyentes nitro en el posiciones orto, meta y para. También diseñaron una serie de tiazolidinonas sustituidas en el átomo de nitrógeno de las 3 posiciones con grupos fenilo, metilo, etilo e hidrógeno, Además, los grupos nitrobenceno fueron sustituidos en el resto arilhidrazona que está unido al carbono de la posición 2 (Tenório et al., 2005). La posición 2 fue durante mucho tiempo una de las más estudiadas y prometedoras, para el diseño de medicamentos basados en el heterociclo de tiazolidinona (Hamama, et al 2008). Adicionalmente, hay informes de una sustitución del carbono en la posición 5 por un el grupo de ácido acético en el heterociclo de tiazolidinona. Después de experimentos *in vitro*, se ha demostrado que los derivados de tiazolidinona fueron más eficientes en la eliminación intracelular de *T. gondii* que los derivados de tiosemicarbazona e hidroxiourea (fármacos de referencia), lo que resulta en un porcentaje más bajo de células huésped infectadas; el tratamiento con tiazolidinonas resultó en hasta 4 parásitos intracelulares, mientras que tiosemicarbazonas y el tratamiento con hidroxiourea dio como resultado hasta 72 y 186 parásitos intracelulares, respectivamente (Tenório et al., 2005). En 2008, de Aquino et al. (2008) continuó con el andamio diseñado por Tenório et al. (2005); mantuvieron el grupo fenilo en 3 posiciones, el grupo arilhidrazona en posición 2 y el grupo ácido acético en la posición 5 del heterociclo de tiazolidinona. Al mismo tiempo, evaluaron compuestos resultantes de la adición de grupos fenilo en las posiciones 3 y 4 del núcleo tiosemicarbazona en los anillos aromáticos de los restos de arilhidrazona de tiazolidinonas y tiosemicarbazona; adicionando radicales de atractores de electrones o donadores de electrones también fueron evaluados. Estas modificaciones dieron como resultado derivados de tiazolidinona que tuvieron

una acción efectiva en la multiplicación de parásitos intracelulares, como consecuencia, el número medio de taquizoitos normales disminuyó a las concentraciones menores de 0,1 mM algunos de los derivados dieron como resultado una inhibición del 50% del crecimiento del parásito; esta concentración se representa en un rango de 12.5 a 30 $\mu\text{g} / \text{mL}$. En contraste, la concentración efectiva de sulfadiazina en las condiciones *in vitro* fue de 3 mM. En conclusión, algunas tiazolidinonas reportadas en este trabajo resultaron ser más efectivas que hidroxiurea a una concentración de 0,5 mM (55).

Más datos de una nueva serie de tiazolidinonas y tiosemicarbonas fueron reportados por Carvalho et al. (2010). Mantuvieron el grupo arilhidrazona en las tiosemicarbonas y tiazolidinonas y no retuvieron los aromáticos en la posición 3 del anillo del núcleo de tiazolidinona. El grupo fenilo de la fracción arilhidrazona hicieron adiciones de hidrógeno, cloro y nitro en la posición para. El mejor de los derivados de las moléculas disminuyeron drásticamente el promedio en la cantidad de parásitos intracelulares, efectos que son muy prometedores en comparación con los tratamientos farmacológicos utilizados actualmente. Además, estos autores sugieren algunos efectos morfológicos causado a los parásitos intracelulares, incluido el desarrollo de un proceso de vacuolización en el citoplasma de *T. gondii* lo cual termina alterando el ciclo celular del parásito. Esta es la primera aproximación a los posibles efectos de este tipo de compuestos en *T. gondii* (56).

Por otro lado, compuestos como el benzinidazol, el miconazol, el ketoconazol, el metronidazol y otros, actualmente se usan ampliamente como agentes terapéuticos; Estos tienen en común la presencia de un anillo heterocíclico de imidazol en su estructura, lo que se suma a una extensa lista de estudios de derivados con una potente actividad biológica (Zhang et al., 2014). Por esta razón, Liesen et al. (2010) mezclaron el anillo de imidazol con el núcleo de tiosemicarbazida, tiazolidinona y tiadiazol. Estos nuevos compuestos fueron evaluados en células Vero infectadas con taquizoitos de *T. gondii*, mostrando eliminación de parásitos; los compuestos más activos fueron los derivados de tiosemicarbazida y tiadiazol a una concentración de 0.1 mM, mientras que los derivados de tiazolidinona mostraron

actividad anti-*Toxoplasma* solo a una concentración de 1 mM. Aunque, los compuestos que mostraron actividad en la eliminación de parásitos intracelulares con concentraciones de 1 mM no son los mejores, pueden tomarse como punto de partida para estudios adicionales con el fin de mejorar su actividad y alcanzar concentraciones efectivas en la escala nM. Se puede considerar un *hit* si una molécula es efectiva a 10 μ M y se puede modificar este *hit* para llegar a una molécula con actividad a nivel nM. En este estudio, la mayoría de los compuestos presentaron una alta toxicidad, y todos los compuestos evaluados mostraron cambios drásticos en la morfología del parásito a medida que pasó el tiempo de incubación y también una mejor actividad en comparación con los fármacos estándar sulfadiazina e hidroxiurea a una concentración de 10 mM (58).

En otro trabajo, (59) evaluaron la adición de 4-nitrobenzilideno como un nuevo grupo ubicado en el carbono de la posición 5 del heterociclo de tiazolidinona y retuvo el resto arilhidrazona, en el que se realizaron algunas sustituciones para explorar nuevas alternativas farmacológicas con un prometedor efecto antiproliferativo de *T. gondii* en cultivo *in vitro* resultando en nuevos derivados de tiazolidinona que mostraron eliminación de parásitos en células Vero a una concentración de 0.02-0.7 mM y una dosis letal media (LD50) > 10 mM. Estos derivados fueron más efectivos en comparación con los medicamentos de referencia hidroxiurea y sulfadiazina, que mostraron LD50 a 1 mM y 8 mM, respectivamente. Los autores informan que después del tratamiento farmacológico, los taquizoítos mostraron grandes daños morfológicos antes de la eliminación completa (Aquino et al., 2011). Alternativamente, D'Ascenzio et al. evaluaron una serie diferente en 2014 de dos series de moléculas con un total de 74 nuevos derivados de tiazolidinona. La síntesis consistió en la adición de grupos carbonilo lineales, ramificados, cíclicos y heterocíclicos en el nitrógeno hidrazónico 1 (resto acoplado al núcleo de tiazolidinona en la posición 2). La principal diferencia entre las dos series fue la sustitución de un anillo de bencilo en el nitrógeno en la posición 3 del núcleo de tiazolidinona. Los datos reportados por D'Ascenzio muestran valores de índice terapéutico (TI) para derivados de tiazolidinona contra *T. gondii*; cada compuesto se probó el efecto anti-*Toxoplasma* y la actividad citotóxica en HFF (fibroblastos de

prejuicio humano), lo que dio como resultado compuestos con concentraciones efectivas en la escala micromolar ($\leq 10 \mu\text{M}$), igualando e incluso superando el efecto y los niveles de citotoxicidad del fármaco de control trimetoprima. Además, algunos de estos compuestos pudieron disminuir la unión e invasión de los taquizoitos a las células huésped, lo que sugiere un efecto extracelular con una potente actividad antiparasitaria (D'Ascenzio et al., 2014).

En un esfuerzo por encontrar nuevos compuestos con mejor efecto contra *T. gondii* utilizando herramientas computacionales, Asadollahi y Mani en 2015 realizaron un modelo predictivo de relación cuantitativa-estructura-actividad (QSAR) utilizando 68 de las moléculas informadas por D'Ascenzio et al. (2014). El modelo QSAR obtenido se entrenó con éxito para la predicción de los valores del índice terapéutico para los nuevos derivados de tiazolidinona utilizados contra *T. gondii*. Los autores sugieren que este modelo puede usarse como una herramienta complementaria en la búsqueda de nuevos agentes terapéuticos con actividad anti-*Toxoplasma* (60).

Carradori y col. (2017) sintetizaron y evaluaron una serie de 33 nuevos compuestos derivados, en los que mantuvieron el núcleo de tiazolidinona y solo diferentes grupos sustituyentes variaron en el nitrógeno de lactato del heterociclo y el nitrógeno-1 de la fracción hidrazona. Estos compuestos mostraron mejores efectos en comparación con la sulfadiazina *in vitro* en términos de inhibición del crecimiento, invasión y replicación de *T. gondii*. Carradori et al sugieren que una sustitución con un grupo ferroceno en nitrógeno-1 del resto hidrazona podría ser una modificación candidata para mejorar el efecto del núcleo de tiazolidinona ya que los compuestos que presentaron este grupo mostraron una alta efectividad contra la invasión de la célula huésped y la replicación del parásito, también baja citotoxicidad; alcanzando concentraciones efectivas en la escala micromolar. Algunos compuestos mostraron mejores valores de toxicidad media (TD50) a $\geq 320 \mu\text{M}$, en comparación con TD50 a $281 \mu\text{M}$ del fármaco de referencia sulfadiazina. Los derivados de tiazolidinona alcanzaron valores más bajos de IC50 a $5 \mu\text{M}$, mientras que el fármaco de control sulfadiazina mostró un valor de IC50 de $43 \mu\text{M}$. Además, estos nuevos compuestos tuvieron un efecto prometedor sobre los taquizoitos extracelulares de *T. gondii*

unidos a la célula huésped, así como los compuestos descritos por D'Ascenzio et al. (2014), convirtiéndolos en compuestos alentadores para una terapia alternativa contra el toxoplasma (23). La Figura 3 resume una línea de tiempo de todas las modificaciones reportadas hasta 2017 en el núcleo de tiazolidinona contra *T. gondii*. Finalmente, se ha observado que el núcleo de tiazolidinona tiende a convertirse en un candidato clave para el desarrollo de fármacos con actividad antitoxoplasma. También se observó que la fracción hidrazona se conservó en todos los estudios, lo que sugiere que esta parte también es un posible andamiaje prometedor con actividad antiparasitaria, y estudios recientes sugieren que la presencia de la hidrazona de la fracción en el fármaco potenciaría su actividad biológica (61). Vale la pena mencionar que también hay numerosos estudios en los que se informa el uso del núcleo estructural similar a la tiazolidinona contra *T. gondii*, por ejemplo, el núcleo de tiazol, para el que también se ha utilizado un amplio espectro de actividad biológica, incluido el anti-*Toxoplasma* (Chimenti et al., 2009; Hencken et al., 2010; McFarland et al., 2016)

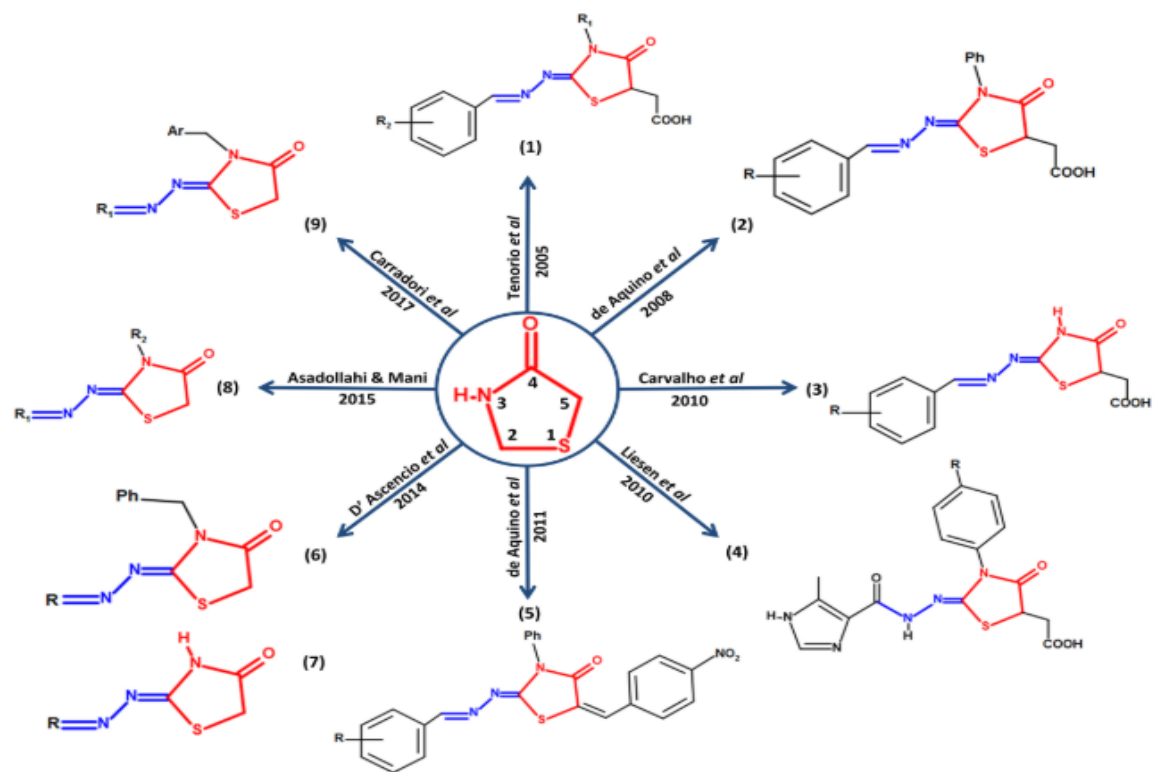


Figura 3. Las modificaciones estructurales realizadas en el núcleo de tiazolidinona como alternativa para la búsqueda de nuevos fármacos con posible actividad anti-Toxoplasma. En el centro de la figura, el núcleo de tiazolidinona se muestra en rojo con su respectiva numeración y su conservación a su alrededor en todos los estudios en los que informan actividad de derivados de tiazolidinona contra *T. gondii*. Además, la estructura del resto hidrazona conservada en la posición 2 del anillo heterocíclico de tiazolidinona se resalta en azul.

5.1.2 Proteínas blancos de los derivados de tiazolidinona en *T. gondii*. Enfoque *In silico* para el diseño racional y el desarrollo de drogas contra *Toxoplasma gondii*.

Un buen punto de partida para describir el modo de unión de las moléculas similares a las drogas es analizar las cristalizaciones de proteínas que presentan derivados del núcleo de tiazolidinona en complejo con proteínas de origen parasitario. Por ejemplo, en los informes cristalográficos de *Plasmodium malariae* con derivados de tiazolidina se incluye la estructura cristalina de una proteasa aspártica (PDB: 2ANL) (62); en *P. falciparum*, 3 proteínas cristalizadas de la familia plasmepsina (PDB: 3QS1, 3FNU y 3QVI) (63–65). Estas proteasas aspárticas se han descrito como importantes para el ciclo de vida del parásito y también como una estrategia para disminuir la supervivencia y la proliferación de *T. gondii* (66) (67). Otro ejemplo es *Leishmania major* con una proteína N-miristoiltransferasa (PDB: 5AG4) (68). La N-miristoiltransferasa y la palmitoiltransferasa, que causan cambios postraduccionales, se han descrito como claves para la invasión, la motilidad, la morfología celular y con un posible papel en la formación de células hijas en *T. gondii* ((69)(70,71);. Sin embargo, debe mencionarse que por medio de la cristalografía de rayos X y la espectroscopía de RMN, no se pudieron identificar los blancos moleculares de los fármacos. Para la identificación de blancos de las tiazolidinonas en parásitos, se han utilizado técnicas como el ensayo de inhibición enzimática con proteínas recombinantes y el ensayo de centelleo por proximidad (72); Este tipo de técnicas son parte de los llamados métodos bioquímicos directos, ya que contemplan la interacción directa entre el fármaco y la proteína purificada. También existen otras metodologías, como la manipulación de la interacción genética, que se basan en la supresión o la expresión mejorada del gen del blanco molecular en la célula, que permiten generar hipótesis del blanco del tratamiento farmacológico. Finalmente, existen enfoques computacionales que son de gran ayuda para obtener una comprensión sólida de las interacciones ligando-receptor. Estas tres alternativas son complementarias entre sí y pueden dar una idea de los posibles blancos farmacológicos de los compuestos de tiazolidinonas contra *T.*

gondii (73). Con respecto a los enfoques computacionales, algunas investigaciones han explorado la posible farmacodinámica de los derivados de tiazolidinona en parásitos intracelulares, por ejemplo, el trabajo de (74) Kumar et al. (2010) y (75) en el que estudiaron proteínas como Lactate deshidrogenasa y Enoyl-ACP reductasa de *P. falciparum*, respectivamente, y Cruzain de *Trypanosoma cruzi* (76) utilizando técnicas de acoplamiento molecular para dilucidar la energía de interacción del ligando- receptor. En *T. gondii*, tales proteínas podrían tener homólogos que valen la pena analizar, como el caso de Cruzain que tiene una proteína funcional, la cisteína proteasa Cathepsin L (77). Vale la pena mencionar que las proteínas discutidas anteriormente o aquellas implicadas en la unión o invasión a la célula huésped, como ROP, RON, MIC o GRA, pueden convertirse en candidatos para nuevos blancos farmacológicos en *T. gondii*, incluso abriendo la posibilidad de un efecto multidireccional y multietapa sobre el parásito, siendo esta una buena aproximación de la posible farmacodinámica y una de las explicaciones de la potente actividad biológica de los compuestos de tiazolidinona en *T. gondii*. Tradicionalmente, los medicamentos se han diseñado y dirigido a interactuar con un solo objetivo (blanco), dándoles especificidad, pero debido a las patologías incurables actuales y la resistencia a los medicamentos, se ha visto claramente que en algunos casos un solo blanco no es un tratamiento efectivo, para superar esto un efecto en múltiples blancos (*multitarget*) dentro del mismo patógeno es una alternativa prometedora para mejorar un efecto farmacológico ((78); (79)).

Hemos realizado experimentos computacionales como primera aproximación de la farmacodinámica de los compuestos tiazolidinona reportados por otros autores en *T. gondii* (D'Ascenzio et al., 2014; Carradori et al., 2017), este estudio sugiere que hay una posible preferencia de estos derivados por proteínas quinasas, como TgCDPK1 y especialmente TgROP18, que se ha descrito como único y crucial para la virulencia del parásito; los compuestos causaron cambios conformacionales drásticos que aumentaron la distancia entre los residuos catalíticos, lo que sugiere una inactivación de la actividad de la quinasa causada por tales cambios, estos análisis se realizaron utilizando acoplamiento molecular y simulaciones de dinámica molecular (9).

5.1.2.1 Descripción estructural de los blancos receptores.

Obtuvimos la estructura de proteínas seleccionadas de *T. gondii* para evaluar su inhibición por tiazolidinonas. Las proteínas TgPDI, TgRNR2, TgROP18 y TgCDPK1 fueron seleccionados por su relevancia en *T. gondii* y porque estudios *in vitro* previos señalan que las quinasas podrían inhibirse por derivados de tiazolidinona. Para obtener las estructuras de TgPDI y TgRNR2 utilizamos modelos de homología; Las estructuras de TgROP18 y TgCDPK1 se obtuvieron del banco de datos de proteínas. El modelo TgPDI presentó una similitud de estructura con la plantilla y las propiedades fisicoquímicas conservadas. La secuencia TgPDI tenía un 38% de identidad con la plantilla (PDI humano) y una puntuación de cobertura de 0,96. El RMSD entre el modelo y la plantilla fue de 0.27 Å, lo que indica que la estructura terciaria fue preservada. El grafico de Ramachandran del modelo mostró que el 88% de los residuos se encontraban en las regiones más favorecidas y 9.9% se colocan en regiones adicionales permitidas. El valor QMEAN es - 3.77. En conjunto, los resultados sugieren un modelo de buena calidad (Figura . 4a). El modelo TgPDI presenta residuos semiconservados, como Ile310 y Ser313 (Leu337 y Tyr340 en la plantilla, respectivamente). Estos residuos fueron altamente conservados en la estructura de x-linker (enlazador-x) de la familia PDI, ubicada entre dominios b' y a'. Además, Phe283 y Phe301 (Phe283 y Phe304 en la plantilla, respectivamente) los residuos dan forma a bolsillo hidrofóbico en el dominio a', donde los residuos del enlazador-x interactúan con ellos. Aunque Val330 (Tyr332 en la plantilla) no es un residuo conservado, tiene propiedades fisicoquímicas semiconservativas. El modelo TgRNR2 conserva al menos ocho residuos relevantes en el sitio catalítico (Figura. 4b). La secuencia TgRNR2 tiene un 65% de identidad con su plantilla (*Plasmodium vivax* RNR2) y cobertura de 0,75. El RMSD entre el modelo y la plantilla fue de 0.11 Å, lo que indica la estructura terciaria no fue alterada. El grafico de Ramachandran mostró que más del 90% de los residuos estaban localizados en las regiones más favorecidas y ninguna en regiones no permitidas. El valor QMEAN es - 2.08. Estos datos sugieren un modelo de buena calidad. Se observó que muchos residuos rodean el centro de hierro di-nuclear de RNR2. Sus residuos conservados son:

Glu172, His175, Ser176, Glu234, Phe238, Glu268, His271 y Tyr179. Los residuos son ubicados en las hélices α B, α C, α E y α F. La estructura de TgROP18 tiene varios residuos de quinasas conservados (Figura. 4c). Los residuos catalíticos de las quinasas. (conocido como "la tríada catalítica") están presentes: Lys281, Asp409 y Asp427. Encontramos residuos ubicados en el *loop* rico en glicina. Rich Loop (G-loop) que juega un papel importante para mantener ATP (el sustrato) en el sitio activo: Gly259, Gly261, Gly262, Phe263 y Val266. Hay conservados residuos del bucle A, Phe428 y Gly429 que juegan un papel importante en el mecanismo regulador que induce un cambio conformacional que activa la proteína para su posterior transferencia del γ -fosfato al sustrato. Lys411 y Asn414 se encuentran en el bucle catalítico. Ala359 se encuentra en la región bisagra, que interactúa con el anillo de adenina. Met356, conocido como portero, cubre un bolsillo hidrofóbico posterior a la ubicación del ATP. Finalmente, Glu300 es un residuo clave que interviene en la formación del puente de sal junto con Lys281, lo que permite movimiento aliento (respiración) de abrir y cerrar los dos lóbulos para dejar entrar y salir el sustrato ATP y habilitar la transferencia de fosfato. El sitio activo de la quinasa TgCDPK1 presenta la tríada catalítica: Lys80, Asp174 y Asp195 (Figura. 4d). Adicionalmente, el residuo de gatekeeper (portero) de TgCDPK1 es una glicina (Gly128). En general, residuos de porteros en quinasas humanas suelen tener mayores volúmenes; esta diferencia ha sido explotado para el diseño selectivo de drogas contra parásitos apicomplexa como *T. gondii* y *N. caninum* (32). El diagrama de Ramachandran para la proteína TgCDPK1 se obtuvo para tener una referencia de una representación de estructura cristalina, que muestra el 94,7% de los residuos ubicados en las regiones más favorecidas.

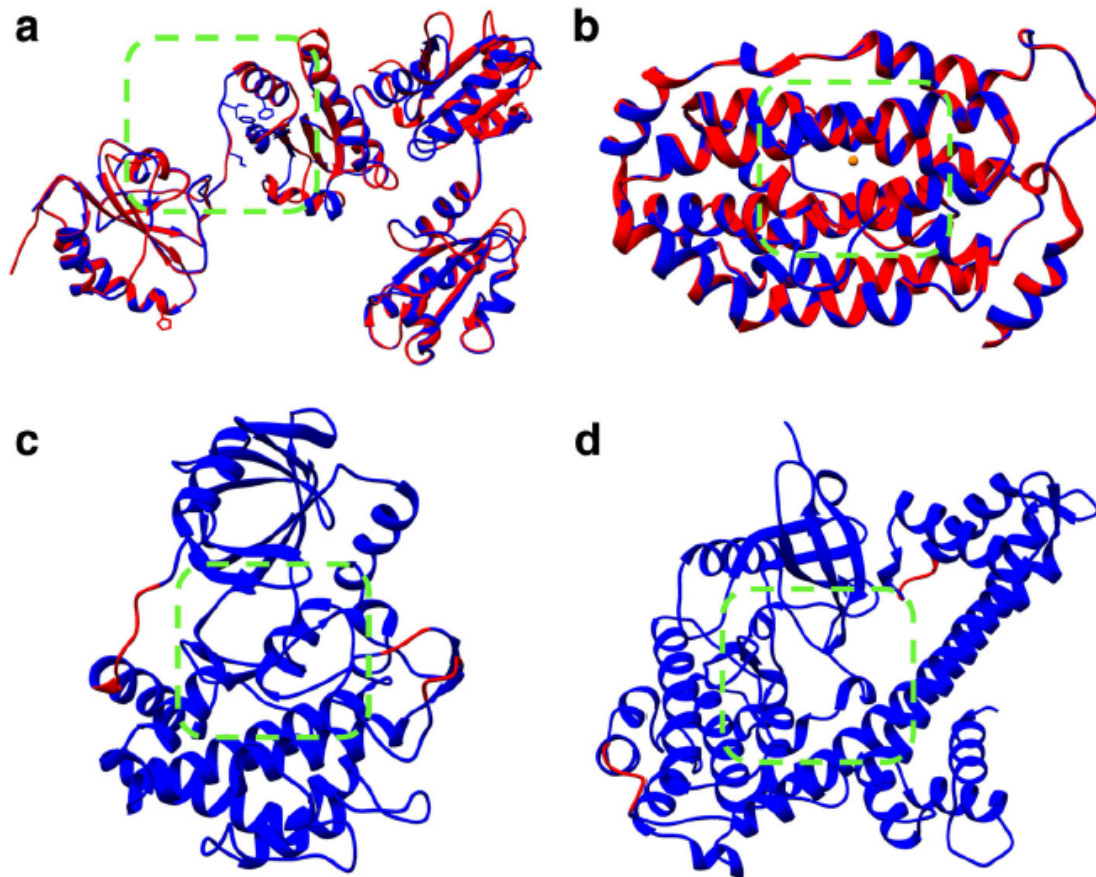


Figura 4. Alineamientos estructurales entre los modelos y sus plantillas. a. modelo PDI de *T. gondii* (azul) alineado con PDI humano (rojo) con código PDB 3F8U. b. Modelo β de subunidad pequeña RNR2 de *T. gondii* (azul) alineado con la subunidad β de *Plasmodium vivax* RNR2 (rojo) con código PDB 2O1Z. Estructura cristalina c. TgROP18 (azul) con código PDB 4JRN; las regiones faltantes modeladas se muestran en rojo. d. Estructura cristalina TgCDPK1 (azul) con código PDB 3SX9; las pequeñas regiones faltantes modeladas se muestran en rojo. Los cuadrados verdes muestran sitios activos evaluados en cada proteína objetivo

5.1.2.2 Acoplamiento molecular

Los derivados de tiazolidinona se acoplaron a las proteínas con Autodock Vina (Tabla 1). Los resultados del acoplamiento molecular sugieren que el derivado 30C presenta la mejor afinidad de unión en tres de los cuatro modelos de proteínas evaluados (TgROP18, TgCDPK1 y TgPDI), y se encuentra entre los cinco mejores derivados evaluados en el sitio activo del modelo TgRNR2. Además, Los resultados de las pruebas de re-puntuación realizadas con DSX-score y X-Score presentan una tendencia similar a los resultados entregados por AutoDock Vina, lo que sugiere que 30C es uno de los mejores ligandos en los sitios activos de las proteínas evaluadas. Por lo tanto, la molécula 30C fue elegida como la tiazolidinona modelo para evaluar interacciones proteína-ligando. En el modelo TgPDI, el derivado 30C interactúa con los residuos a lo largo de la estructura del enlazador-x y una hélice α del dominio a' (Figura. 5a). Se forma un enlace H único entre Arg312 y el oxígeno del carbonilo en el anillo de tiazolidinona; Asp311, Leu314 y Lys333 hacen interacciones π -ion / π - π con el segundo anillo aromático N-3 sustituido; y los residuos Phe335, Glu336, Ile340, Thr390, Pro391, Leu392, Glu393 y Glu394 interactúan por las fuerzas de Van der Waals con el grupo ferroceno.

En el modelo TgRNR2, el compuesto con la puntuación más baja es 34A, que muestra los enlaces H y las interacciones π -anión para residuos importantes y conservados que rodean el centro di-nuclear de hierro (Figura. 5b). Asp141 y Ala138 estabilizan el 34A a través de enlaces H dirigidos a la amina en el anillo de tiazolidinona; Glu146 y Glu268 muestran anión π interacciones con el resto naftaleno de 34A; Tyr179, Phe137, Ala139, Asn147, Glu172, His175, Ser176, Val233, y Phe238 interactúa a través de las fuerzas de Van der Waals con resto de naftaleno y núcleo de tiazolidinona del derivado 34A. Es interesante comparar la pose de 34A y 30C. En el caso del derivado 30C, las interacciones hidrofóbicas y las de Van der Waals entre el resto naftaleno y los residuos Glu146, Glu172 y Asn147 están conservados mientras que los aminoácidos como Asp141, Ala138, Ala139 y Ser176 interactúan con el resto ferroceno en lugar de núcleo de tiazolidinona.

En el modelo TgRNR2, el compuesto con la puntuación más baja es 34A, que muestra los enlaces H y las interacciones π -anión para residuos importantes y conservados que rodean el centro di-nuclear de hierro (Figura. 5b). Asp141 y Ala138 estabilizan el 34A a través de enlaces H dirigidos a la amina en el anillo de tiazolidinona; Glu146 y Glu268 muestran anión π interacciones con el resto naftaleno de 34A; Tyr179, En el sitio activo de TgROP18, 30C interactúa con residuos que estabilizan el ATP (Fig. 5c). Lys281 y Asp427 presenta interacciones iónicas con el sustituyente naftaleno; Lys411 forma un enlace H con el átomo de azufre en el núcleo de tiazolidinona; Gly259, Ser260, Gly261, Gly262, Phe263, Ala264, Val266, Phe283, Glu300, Asp362, Ala413, Asn414, Leu416, Gly429 y Thr430 presentan las interacciones de Van der Waals con el ferroceno, restos de naftaleno y tiazolidinona.

En el sitio activo de TgCDPK1, 30C interactúa con los residuos Leu57, Val130, Tyr131, Leu181, Ala78, Glu128 y otros con su resto de naftaleno, a través de interacciones hidrófobas. Además, interactúa con Gly60, Lys80 y Glu178 a través de su núcleo de tiazolidinona que presenta interacciones fuertes como enlace H. Por último, 30C interactúa con Lys338, Gly58, Glu135, Gly134 y Lys59 con su resto ferroceno que presenta principalmente interacciones de Van der Waals (Fig. 5d).

La tendencia general de las puntuaciones sugiere que los blancos con mayor afinidad con las tiazolidinonas son, en orden descendente: TgCDPK1, TgROP18, TgPDI y TgRNR2. El blanco elegido para una evaluación adicional fue TgROP18 debido a los bajos puntajes de unión y su importancia en la patogénesis de *T. gondii*. Elegimos la proteína TgROP18 porque es un factor clave de virulencia para *T. gondii* (80). Esta proteína controla la proliferación intracelular del parásito (El Hajj et al., 2007, Hermanns, 2016), manipula la inmunidad y la célula del huésped apoptosis y se había estudiado en nuestro grupo de investigación en trabajos anteriores (Sánchez, 2014, Torres et al., 2014, Arenas et al., 2015). En total, el complejo seleccionado para evaluación adicional con dinámica molecular de TgROP18 / 30C.

Table 1 Results of molecular docking simulations for the selected thiazolidinone core derivatives

Derivative	ΔG -TgPDI (kcal/mol)	ΔG -TgRNR2 (kcal/mol)	ΔG -TgROP18 (kcal/mol)	ΔG -TgCDPK1 (kcal/mol)	TI	IC ₅₀ (μ M)	IC ₉₀ (μ M)
12A	-5.8	-6.1	-6.1	-6.6	39	0.9	2
13A	-5.9	-6.3	-6.1	-6.8	23	24	154
30A	-5.9	-5.7	-6.0	-6.7	28	20	129
34A	-6.6	-7.7	-8.2	-9.1	144	3.9	31
36A	-8.0	-6.7	-8.5	-8.7	70	8	49
4B	-6.6	-6.2	-6.6	-7.3	16	36	243
9B	-6.2	-5.2	-6.3	-7.5	37	15	121
25B	-7.0	-5.5	-6.9	-8.2	15	37	84
34B	-7.9	-7.5	-8.3	-9.2	15	38	79
37B	-7.8	-6.0	-8.1	-7.8	66	8.5	21
15C	-8.2	-6.3	-8.1	-8.3	40	8	57
18C	-8.1	-6.0	-8.2	-8.5	53	6	16
21C	-7.8	-6.2	-8.0	-8.0	36	9	24
24C	-7.9	-5.9	-8.4	-8.2	40	8	17
30C	-8.7	-6.3	-8.9	-10.0	64	5	17

Values of TI, IC₅₀ and IC₉₀ were taken from D'Ascenzio et al. [12] and Carradori et al. [13]

Tabla 1. Resultados de simulaciones de acoplamiento molecular para los derivados del núcleo de tiazolidinona seleccionados.

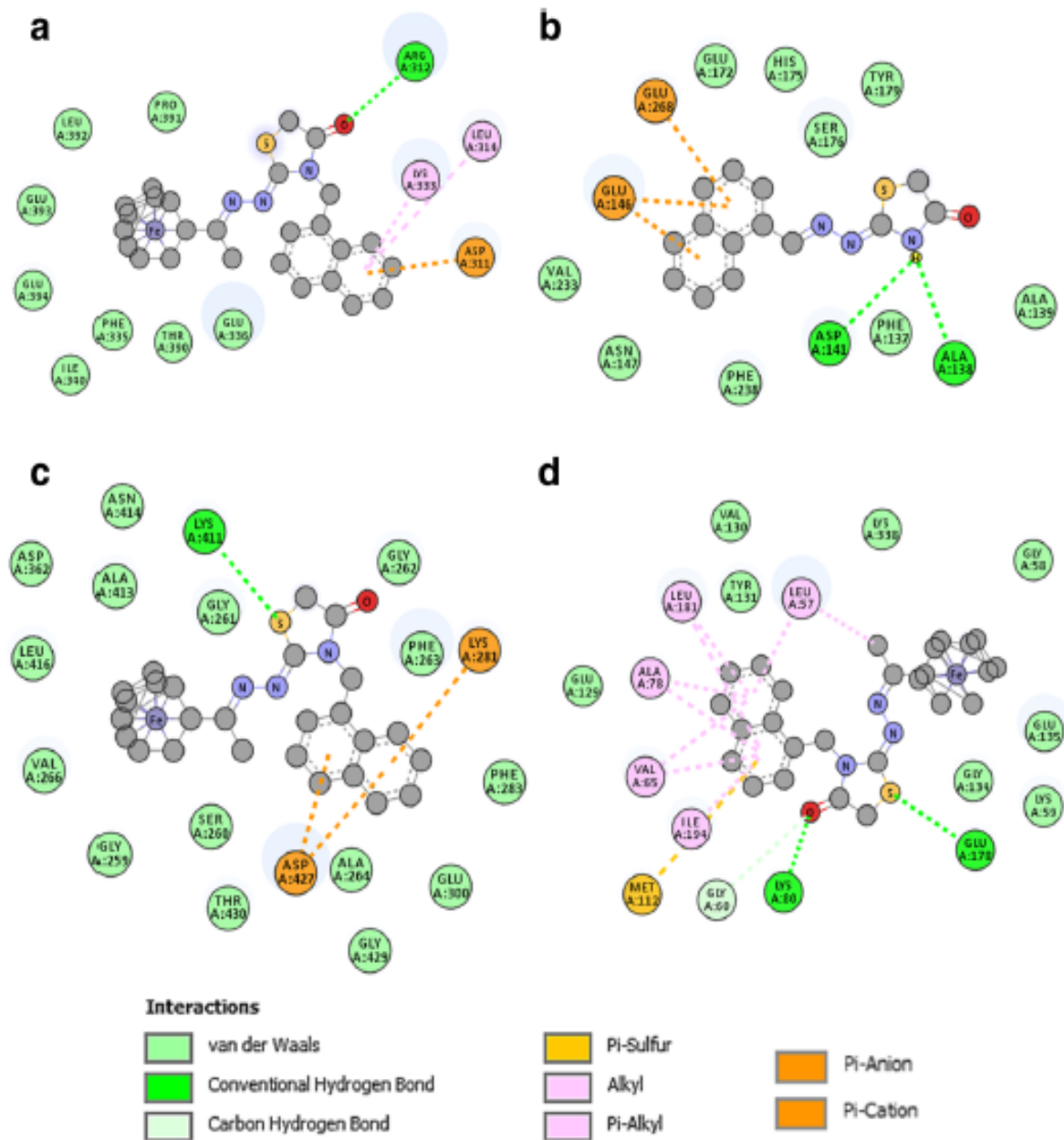


Figura 5. Interacciones 2D de los mejores ligandos acoplados en el sitio de unión de las proteínas estudiadas. a. complejo de ligando de TgPDI y 30C que muestra energía libre de unión de - 8,7 kcal / mol. b. La subunidad 2 de TgRNR complejo con 34A presentó un valor de - 7.7 kcal / mol para la energía libre de unión. c. TgROP18 complejo con 30C, que muestra una energía libre de unión de - 8,9 kcal / mol. d. Complejo TgCDPK1 con 30C, que muestra una energía libre de unión de - 10.0 kcal / mol.

5.1.2.3 Simulaciones de dinámica molecular.

Realizamos simulaciones MD del complejo TgROP18 / ATP y TgROP18 / 30C para caracterizar sus interacciones. El sistema TgROP18 / ATP se utilizó como referencia de la interacción biológica natural de la proteína. Se simularon cuatro réplicas de cada complejo. En las MD de TgROP18 / ATP; ATP mantiene la conformación de AMP-PNP encontrado en la estructura cristalina. En las MD de TgROP18 / 30C; 30C entierra el resto naftaleno y el andamio tiazolidinona, mejorando el contacto con la proteína y llegando a diversas estructuras estables. Una de las conformaciones finales del complejo TgROP18 / 30C es compacto y el sustrato tiene baja exposición al solvente; en el otro TgROP18 está abierto y 30C es más expuesto al solvente. En todas las ejecuciones de MD, los sistemas presentaron considerables tiempos de relajación antes de llegar a la estructura final. En cada corrida de MD, comparamos la trayectoria con la estructura inicial a través de RMSD de dos maneras: usando la columna vertebral de la proteína (Fig. 6a y b) y utilizando los átomos pesados del ligando (Fig. 6c y d). Todas las curvas RMSD alcanzan una meseta después de 100 ns. Por lo tanto, decidimos usar el último 200 ns de todos los MD en los análisis. Debería mencionarse que MD1 del complejo TgROP18 / 30C presenta un claro cambio en el gráfico de ligando RMSD a 167 ns. Este salto corresponde a una rotación de un ángulo diédrico único, que gira el grupo ferroceno y deja la interacción sin cambios.

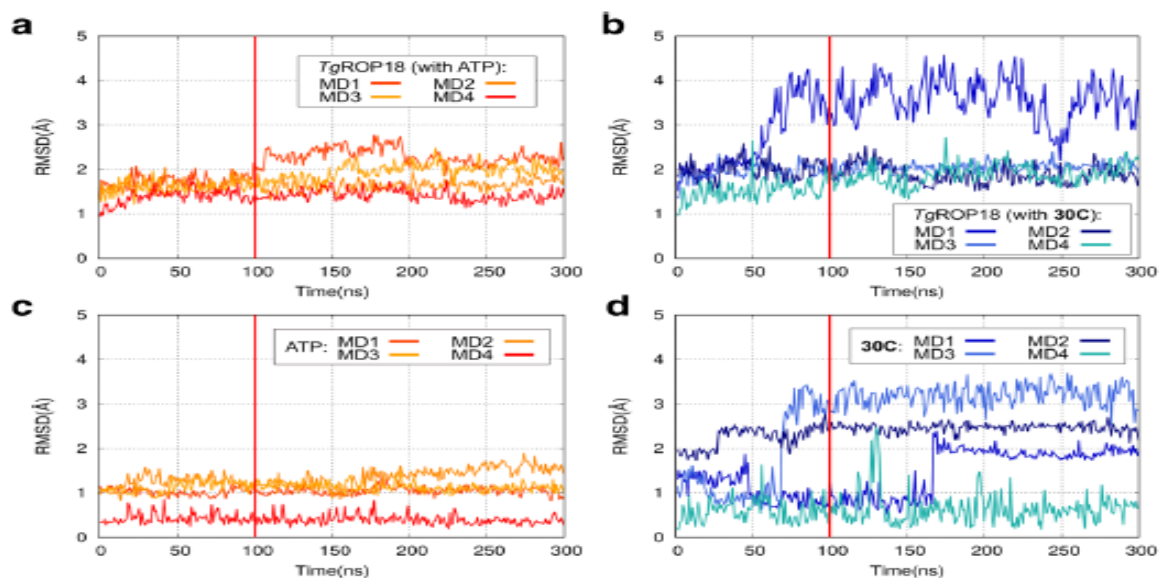


Figura 6. RMSD en función del tiempo de simulación. En los paneles (a) y (b), los gráficos de la RMSD se calcularon con los carbonos α de la proteína después de alinearlos a la estructura inicial con el algoritmo de Kabsch. En los paneles (c) y (d), los gráficos del RMSD se calcularon con todos los átomos pesados del ligando correspondiente, alineando previamente las estructuras a la conformación inicial con el Kabsch ponderado en masa. Cada gráfico corresponde a uno de los cuatro MD realizados con cada sistema. Los gráficos correspondientes al complejo TgROP18 / ATP están coloreadas en tonos naranjas, paneles (a) y (c), y las correspondientes a TgROP / 30C están coloreadas en tonos azules, paneles (b) y (d). La línea roja a 100 ns indica el tiempo utilizado para el comienzo del análisis, donde los sistemas se consideran equilibrados.

5.1.2.4 Análisis de frecuencia de contacto

Calculamos la frecuencia de contacto de cada residuo con el ligando, ATP o 30C. Se consideró que un contacto existe cuando un átomo de un residuo estaba más cerca de 2.5 Å a cualquier átomo del ligando. los residuos se agruparon según su localización espacial: el enlazador-desordenado (residuos 211–218), G-loop (residuos 258–266), lámina β 3- β 5 (residuos 276–284 y 353–358), región de la bisagra (residuos 359–365), residuo portero (Met323) y bucle catalítico (residuos 411–416). Esta clasificación sigue las especificaciones de la estructura cristalina y se representa en la Fig. 7a. Los contactos más importantes con ATP y 30C se muestran en la Fig. 7b, mostrados por grupo y separados por ejecución MD. Los residuos que entran en contacto con ATP interactúan con diferentes restos de ATP. Los residuos que entran en contacto con la porción de adenina son: Leu258 y Val266 (G-loop); Met356 y Met357 (hoja β 3- β 5); Ala359 (bisagra región); y Leu416 (bucle catalítico). Además, residuos que interactúan con el resto ribosa son: Gly259 (G-loop); Asp362 (región de bisagra); y en algunos MD Ala413 (bucle catalítico), Gln216 y Ala217 (enlazador desordenado). Por último, la porción de trifosfato interactúa con: Gly261 y Gly262 (enlazador desordenado); Lys281 (hoja β 3- β 5); y con menos frecuencia con Asn414 y Lys411 (bucle catalítico). Por otro lado, con respecto a 30C (Fig. 7b), los residuos que contactan con la porción de tiazolidinona son: Ser260, Gly261 y Ala264 (G-loop); y Lys281 (hoja β 3- β 5), que interactúa con el grupo carbonilo del armazón de tiazolidinona y el grupo carboxilo de Glu300. Además, los residuos que interactúan con el resto naftaleno son: Val266 (enlazador desordenado); Met356 (hoja β 3- β 5); Met323 (portero); Ala359 (región de bisagra); y Leu416 (bucle catalítico). Por último, la porción de ferroceno interactúa con: Leu258 y Gly259 (G-loop); Ala361 (región de bisagra); y cuatro residuos Gln214, Gln216 (conector desordenado) y Asp362, Lys365 (región bisagra) que eventualmente se acercan y forman enlaces H entre sí. Como se puede observar, estas interacciones difieren de las obtenidas con el acoplamiento molecular. Esto se debe a que los restos han cambiado su ubicación desde la postura inicial,

maximizando sus interacciones y minimizando la exposición al disolvente de los restos hidrófobos.

Observamos que, en general, los contactos de ATP o 30C no cambian a lo largo de las ejecuciones de MD. Con este objetivo, dividimos cada simulación en cuatro partes de 50 ns y repetimos el análisis de contacto de forma independiente en cada parte de 50 ns. mostramos los residuos que tenían más del 50% de contacto en al menos una de las 50 ns porciones de los MD. En general, las frecuencias de contacto se conservan y no muestran tendencia con el tiempo de simulación. Sin embargo, hay algunas excepciones que deben mencionarse. En el sistema TgROP18 / ATP, hay cambios en los residuos: Gln216 y Ala217 (enlazador desordenado); Gly262 (G-loop); Lys281 (hoja $\beta 3$ - $\beta 5$); Met323 (portero); Lys411 y Asn414 (bucle catalítico). En el sistema TgROP18 / 30C, hay cambios en: Gln214 (enlazador desordenado) y Ala361 (región de bisagra). Además, algunos contactos presentan variaciones a lo largo de los MD sin una tendencia; por lo tanto, indicando interacciones más lábiles.

Las frecuencias de contacto pueden variar entre ejecuciones de MD del mismo complejo. Algunos contactos son fuertes y existen con alta frecuencia en tres o cuatro MD de un complejo; otros contactos son más débiles y presentan alta frecuencia en solo uno o dos MD. En el caso de TgROP18 / ATP, los contactos fuertes son Leu258, Gly259, Met356, Met357 y Ala359; mientras que los contactos moderados son Gln216, Ala217, Gly261, Gly262, Val266, Asp362, Lys411, Ala413, Asn414 y Leu416. En el caso de TgROP18 / 30C, los contactos fuertes son Leu258, Val266, Lys281, Ala359 y Leu416 mientras que los contactos moderados son Gln214, Gln216, Leu218, Gly259, Ser260, Gly261, Ala264, Met323, Met356, Ala361, Asp362, Lys365 y Ala413. Algunos contactos son exclusivos de cierto ligando; otros son comunes a ambos. Los residuos que entran en contacto exclusivamente con ATP son: Ala217 (enlazador desordenado); Gly262 (G-loop); y Lys411 y Asn414 (bucle catalítico). Los residuos que entran en contacto con 30C son: Gln214 y Leu218 (enlazador desordenado); Ala264 (G-loop); y Ala361 y Lys365 (región bisagra). Por otro lado, los residuos que presentan contacto con ambos

residuos son: Gln216 (enlazador desordenado); Leu258, Gly259 y Val266 (G-loop); Lys281 y Met356 (hoja β 3- β 5); Met323 (portero); Ala359 y Asp362 (región de bisagra); y Ala413 y Leu416 (bucle catalítico). Estos contactos indican que el sitio de unión general está conservado, pero presenta algunas diferencias. En general, 30C está más enterrado permitiendo interacciones más fuertes el G-loop (Ala264 y Val266) y el enlazador desordenado (Leu218). Además, esto permite la interacción entre Gln214 y Lys365 que rodean el resto ferroceno 30C cuando se unen. Por el contrario, 30C no puede formar interacciones con residuos polares del bucle catalítico (Lys411 y Asn414).

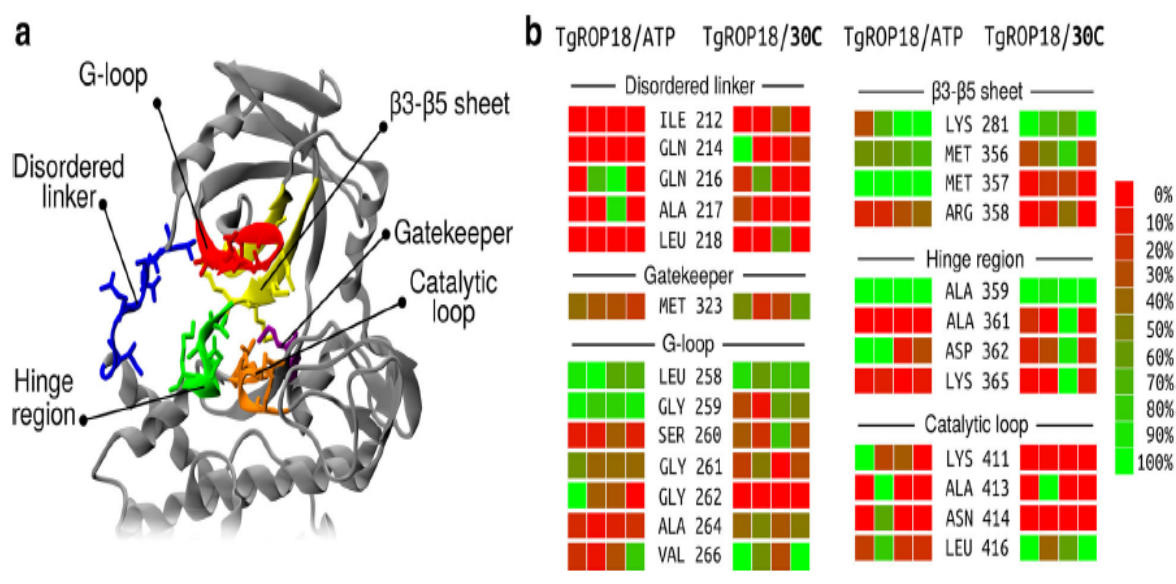


Figura 7. Análisis de frecuencias de contacto en las ejecuciones MD de TgROP18 / ATP y TgROP18 / 30C. En el panel a, vista esquemática del sitio de unión. Las subestructuras de la proteína se muestran en diferentes colores. En el panel b, frecuencia de contacto entre el ligando y los residuos con contactos más fuertes. Cada cuadrado representa la frecuencia de contacto del residuo en una corrida de MD. La frecuencia de contacto de los residuos ha sido coloreada de rojo (0%) a verde (100%), como se muestra en la paleta de color. Los contactos de TgROP18 / ATP se muestran a la izquierda; los de TgROP18 / 30C a la derecha. Los contactos han sido separados por la subestructura a la que pertenecen

5.1.2.5 Mecánica molecular: superficie de Born generalizada

Los resultados sugieren que 30C podría unirse a TgROP18 actuando como un inhibidor competitivo de ATP. La energía libre de unión de los ligandos se estimó a través del área de superficie de Born generalizada por mecánica molecular (MM-GBSA), utilizando el enfoque de MD único sin cálculo de entropía.

Obtuvimos una energía de unión promedio de -11.5 ± 10.3 kcal / mol para ATP y -29.0 ± 4.4 kcal / mol para 30C. El valor obtenido para 30C sugiere que puede unirse a TgROP18. Este valor se comparó con los obtenidos por Lyne et al. (86). Utilizaron MM-GBSA para evaluar la unión de ligandos a cuatro quinasas, lo que produjo ajustes lineales de los datos experimentales predichos. A partir de las curvas informadas, calculamos el valor de pIC50 que corresponde a -29.0 kcal / mol (complejo TgROP18 / 30C). Los valores obtenidos varían de 4.5 a 8.1. Estos valores, incluso si presentan una gran variación, están de acuerdo con los reportados por Carradori et al, 2017. Quienes estudiaron la capacidad del ligando 30C para inhibir los taquizoitos *in vitro* de *T. gondii* e informaron un pIC50 de 5.3 (IC50 de 5 μ M) Por otro lado, la comparación de los valores de MM-GBSA obtenidos aquí sugiere que 30C podría ser un inhibidor competitivo de ATP. Sin embargo, incluso si los resultados respaldan esta idea, no son concluyentes debido a dos razones. Primero, porque el método MM-GBSA es sensible al modelo de carga de ligando (87) y empleamos diferentes modelos de carga para ATP y 30C (conjuntos RHF / 6-31 + G * y B3LYP / 6-31G *, respectivamente). Segundo, porque la precisión del método hace la diferencia en valores no significativos (88).

Los residuos que contribuyen a la energía libre de unión se obtuvieron con descomposición de energía libre por residuo (89). La Figura 8 muestra estructuras esquemáticas de los sitios de unión de ATP y 30C. Los residuos más importantes para ATP son: Leu258, Ser260, Gly261 y Val266. (G-loop); Lys281 y Met357 (hoja β 3- β 5); Ala359 (región bisagra); Lys411 y Leu416 (bucle catalítico); y Asp427. Las contribuciones en la unión de ATP se deben principalmente a interacciones electrostáticas. Los residuos más relevantes para el ligando 30C son: Leu258, Gly259, Ala264, Arg265 y Val266 (bucle G); Met356 (hoja β 3- β 5); Ala359 y Ala361

(región de bisagra); y Leu416 (catalítico lazo). Su contribución se debe principalmente a interacciones de Van der Waals y solvatación no polar. El residuo Lys281 (lámina β 3- β 5) dificulta la unión de 30C, debido a energía de solvatación polar como era de esperar, los residuos que contribuyen a la energía libre vinculante también habían sido encontrados por el análisis de contacto. Sin embargo, el residuo Asp427, importante para la estabilización de ATP a través de la interacción indirecta con $Mg + 2$, no se encontró en el análisis anterior debido al umbral de distancia.

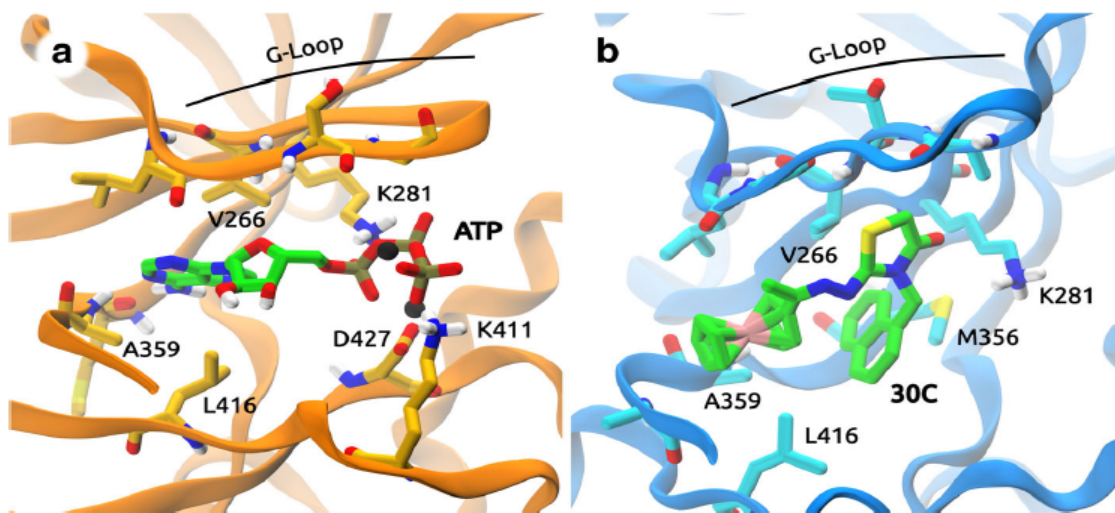


Figura 8. Residuos que contribuyen a la energía libre de unión de los ligandos. En el panel a, TgROP18 / ATP. Los iones $Mg + 2$ se muestran como esferas negras. En el panel b, TgROP18 / ATP. En ambos paneles, solo se muestra que los átomos de hidrógeno polar resaltan sus interacciones.

Figura 8. Residuos que contribuyen a la energía libre de unión de los ligandos. En el panel **a**, TgROP18 / ATP. Los iones $Mg + 2$ se muestran como esferas negras. En el panel **b**, TgROP18 / ATP. En ambos paneles, solo se muestra que los átomos de hidrógeno polar resaltan sus interacciones.

5.1.2.6 Análisis de componentes principales

Para caracterizar las diferencias estructurales entre TgROP18 / ATP y TgROP18 / 30C, realizamos el método de análisis de componentes principales (PCA). Las ocho corridas MD fueron concatenadas y alineadas (90). La matriz de covarianza se calculó a partir de las posiciones de los carbonos α de la enzima, omitiendo los primeros y últimos cinco residuos para evitar el ruido de las regiones finales. Esto dejó 351 átomos en el análisis y un espacio de coordenadas de dimensión 1053. El análisis de las fluctuaciones cuadradas acumuladas en los modos PC indicó que estos modos contienen el 75.7% de las fluctuaciones totales del sistema (Fig. 9c). Además, Los valores propios de los modos decaen rápidamente. Estos datos indican que cuatro vectores propios son suficientes para explicar la varianza de las muestras. Las trayectorias se proyectaron en los primeros cuatro modos de PC (Fig. 9 a y b). Los MD de TgROP18 / ATP muestrean tres grupos de puntos, lo que indica tres estados: muestras de MD1 alrededor de {20, - 5, - 15, 10}; MD2 alrededor de {13, - 3, 18, 8}; y muestra MD3 / MD4 alrededor de {15, 15, 0, 0}. Estos estados presentan una alta superposición en el primer y segundo modo y muestrean más diversamente en el tercer y cuarto modo. En general, cada ejecución de MD llena un grupo de puntos y ninguna simulación salta entre grupos, a excepción de MD2 que muestrea dos grupos pequeños que clasificamos en un solo estado (Fig. 9b). Esta observación sugiere que cada MD ejecute muestras alrededor de una sola conformación de TgROP18 (o dos en el caso de MD2). Además, MD4, que se inició a partir de una estructura representativa de MD3, muestra alrededor de la misma conformación que MD3 y, por lo tanto, valida el muestreo de ese estado. Por otro lado, las MD de TgROP18 / 30C muestrean dos estados: muestra MD1 / MD4 alrededor de {- 50, 0, 0, 0}; y muestra MD2 / MD3 alrededor de {20, - 10, 0, - 5}. Estos estados, a diferencia de TgROP18 / ATP, presentan una alta superposición en el tercer y cuarto modo y las muestras de manera más diversa en el primer y segundo modo. Como en el caso de TgROP18 / ATP, cada MD muestra alrededor de una conformación de la proteína. En este sistema, MD4 se inició con una estructura representativa de MD1. Observamos que las regiones muestreadas por

MD1 y MD4 se superponen y se parecen en cierta medida, pero se pueden distinguir inequívocamente en el segundo y cuarto modo PC. La inspección de las estructuras de ambos MD revela que estas diferencias se deben a la posición del enlazador desordenado, que es intrínsecamente altamente móvil, y la hoja $\beta 4a / \beta 4b$, que está lejos del bolsillo de unión.

Cada modo de PC se puede describir mediante cambios concertados en las subestructuras de TgROP18. Para describir los movimientos relacionados con los modos PC, hemos generado coordenadas de estructuras que muestrean a lo largo de los modos PC. La estructura TgROP18 presenta dos dominios denominados lóbulo N (residuos 209–360) y lóbulo C (residuos 186–208 y 361–548). El primer modo PC representa un movimiento de bisagra entre el lóbulo N y el lóbulo C, donde los dominios están cerca de cuerpos rígidos. El segundo modo PC representa tres cambios concertados: un movimiento de tapa de la lámina $\beta 4a / \beta 4b$ (residuos 337–342 y 345–350), la rotación de la hélice C (residuos 283–310) y el desplazamiento del enlazador desordenado. El tercer modo de PC también representa cambios concertados: un movimiento de tapa de la hélice C, una reorganización del enlazador desordenado y la apertura del bucle formado por los residuos Val437-Arg451. Finalmente, el cuarto modo PC representa una pseudo-rotación que involucra el *loop* G, la hoja $\beta 4a / \beta 4b$, la hélice C y el enlazador desordenado.(91)

La representación estructural de los modos de PC permite una caracterización intuitiva de los estados de TgROP18 / ATP. En este sentido, el muestreo de TgROP18 / ATP a lo largo de los modos 2º, 3º y 4º puede considerarse como movimientos naturales del complejo Michaelis. Estos movimientos implican el desplazamiento del enlazador desordenado, que está de acuerdo con la pobre definición de densidad de electrones en esa región de la estructura cristalina. Además, la falta de muestreo a lo largo del primer modo PC indica que en los MD de TgROP18 / ATP la enzima no sufre un amplio movimiento de bisagra entre lóbulos.

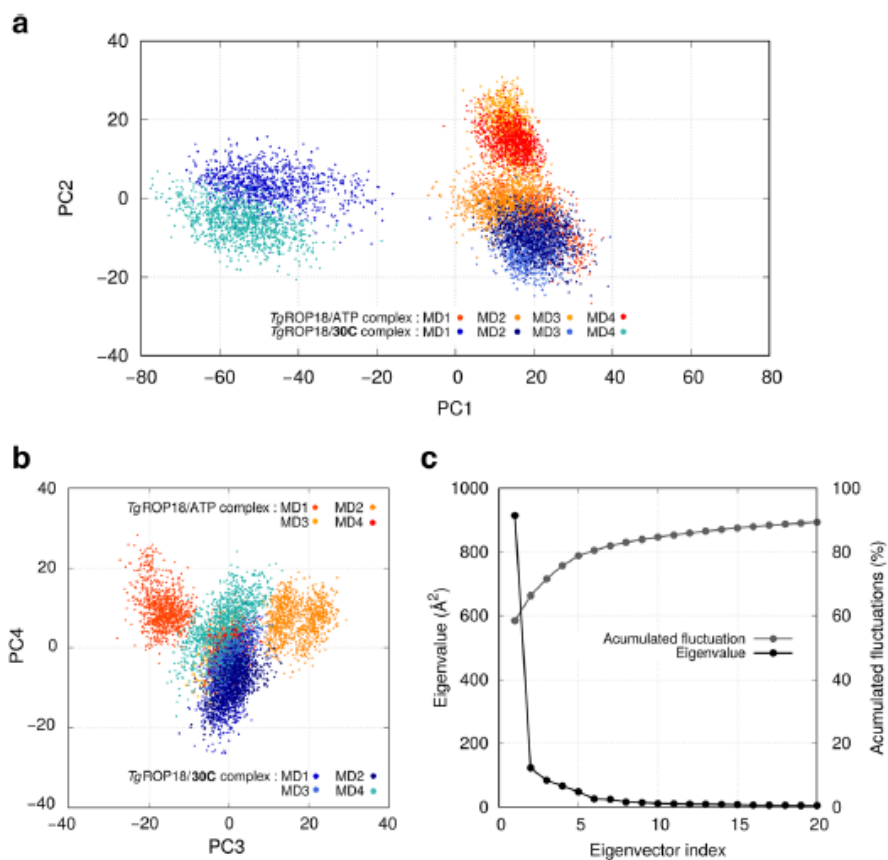


Figura 9. Las proyecciones de todas las corridas de MD se muestran en el análisis de componentes principales PC. En el panel a, proyección sobre el primer y segundo modo PC. En el panel b, proyección sobre el 3^o y 4^o modo PC. Los puntos correspondientes al complejo con ATP están coloreados en tonos naranjas, mientras que los correspondientes a 30C están coloreados en tonos azules. En el panel c, la gráfica de los valores propios y la acumulación de fluctuación frente al índice del modo PC. Solo se muestran 20 modos de PC del 1053 obtenido

5.1.2.7 Análisis dinámicos de dominios

PCA reveló que TgROP18 / 30C tiene dos estados: uno que se superpone con las conformaciones muestreadas por TgROP18 / ATP y otro claramente diferente. Además, observamos que los modos de PC involucraban reordenamientos como el cuerpo rígido de las subestructuras en TgROP18. Por lo tanto, nuestro objetivo fue identificar dominios dinámicos que pudieran explicar la diferencia entre las conformaciones muestreadas por TgROP18 / 30C y aquellas muestreadas por TgROP18 / ATP. Con este objetivo, obtuvimos 50 estructuras de MD1 / MD4 de TgROP18 / 30C, 50 de MD2 / MD3 de TgROP18 / 30C y 50 estructuras de todos los MD de TgROP18 / ATP. Estos grupos de estructuras se compararon con el software DynDom (91), que modela la diferencia entre conformaciones como movimientos de tornillo.

La comparación del estado muestreado por MD1 / MD4 de TgROP18 / 30C con el muestreado por TgROP18 / ATP predijo tres dominios (Fig. 10a): el lóbulo C (residuos 189–215, 310–326 y 360–539), el subdominio C-hélice del lóbulo N (residuos 283–302) y los residuos restantes del lóbulo N (residuos 223–282 y 327–359). Tras el movimiento del tornillo, los dominios presentaron un RMSD de 1.6 Å, 1.4 Å y 1.4 Å para el lóbulo C, la hélice C y el lóbulo N, respectivamente. Los valores bajos de RMSD indican que el modelado es exitoso. El movimiento del tornillo entre el lóbulo C y el lóbulo N (Fig. 10b) presenta un cierre del 95% y requiere una rotación de 34°. Los residuos identificados para doblarse provienen del enlazador desordenado (residuos 209–223), la región bisagra (residuos 359–360) y los residuos 326–327. Por otro lado, el movimiento del tornillo entre el lóbulo C y la hélice C (Fig. 10c) tiene un cierre del 97%, requiere una rotación de 58° y una traslación de 0.9 Å. Los residuos que se doblan en este movimiento son de la hélice C (residuos 302–311). Por último, el movimiento entre el lóbulo N y la hélice C (Fig. 10d) tiene un cierre del 87% y requiere una rotación de 40 ° y una traslación de 2,4 Å. En este caso, los residuos que se doblan son de la lámina β 3- β 5 (residuos 281–282).

La comparación del estado muestreado por MD1 / MD4 de TgROP18 / 30C con el muestreado por MD2 / MD3 de TgROP18 / 30C hace que los resultados sean comparables a los mostrados anteriormente. Se encuentran dos dominios: uno correspondiente al lóbulo C (residuos 190–211, 308–325 y 360–539), y uno correspondiente a todo el lóbulo N con la hélice C incluida (residuos 222–307 y 326–359). En este caso, los dominios presentaron un RMSD de 1.6 Å y 2.5 Å para el lóbulo C y el lóbulo N, respectivamente. El movimiento del tornillo entre los dominios tiene un cierre del 95%, requiere una rotación de 34° y una translación de 1.3 Å. Los residuos que se doblan son del enlazador desordenado (residuos 211–222), la región bisagra (residuos 359–360), la hélice C (residuos 307–310) y los residuos 325–326. Encontramos que el dominio que corresponde al lóbulo C es análogo al encontrado en el análisis anterior de DynDom. Además, el alto valor RMSD del dominio N-lóbulo indica que el modelo no se ajusta bien. Además, el dominio N-lóbulo es análogo a la fusión de los dominios C-helix y N-lóbulo encontrados anteriormente. Habiendo dicho eso los datos indican que los dominios identificados en las dos comparaciones son aproximadamente equivalentes. Además, verificamos si los dominios podrían definirse con varias otras combinaciones de MD. La comparación de los MD de TgROP18 / ATP entre sí no genera dominios. La comparación del estado muestreado por MD2 / MD3 de TgROP18 / 30C y el muestreado por TgROP18 / ATP tampoco genera dominios. Esto indica que, en estos casos, los desplazamientos intradominio e interdominio son comparables y, por lo tanto, no se pueden identificar dominios. Finalmente, los modos de PC pueden estar relacionados con el análisis DynDom. El primer modo PC, que acumula el 58.4% de la fluctuación muestreada, representa el movimiento de bisagra del lóbulo C / N-lóbulo encontrado en ambos análisis DynDom. Los modos PC 2°, 3° y 4°, que incluyen un 17,3% adicional de las fluctuaciones, incluyen movimientos del enlazador desordenado, la hélice C y la hoja β 4a / β 4b. Esto también está de acuerdo con el análisis DynDom. Primero, porque C-helix fue reconocido como un dominio; y segundo, porque el enlazador desordenado se identificó como una región de flexión, lo que es consistente con los diversos desplazamientos que puede sufrir.

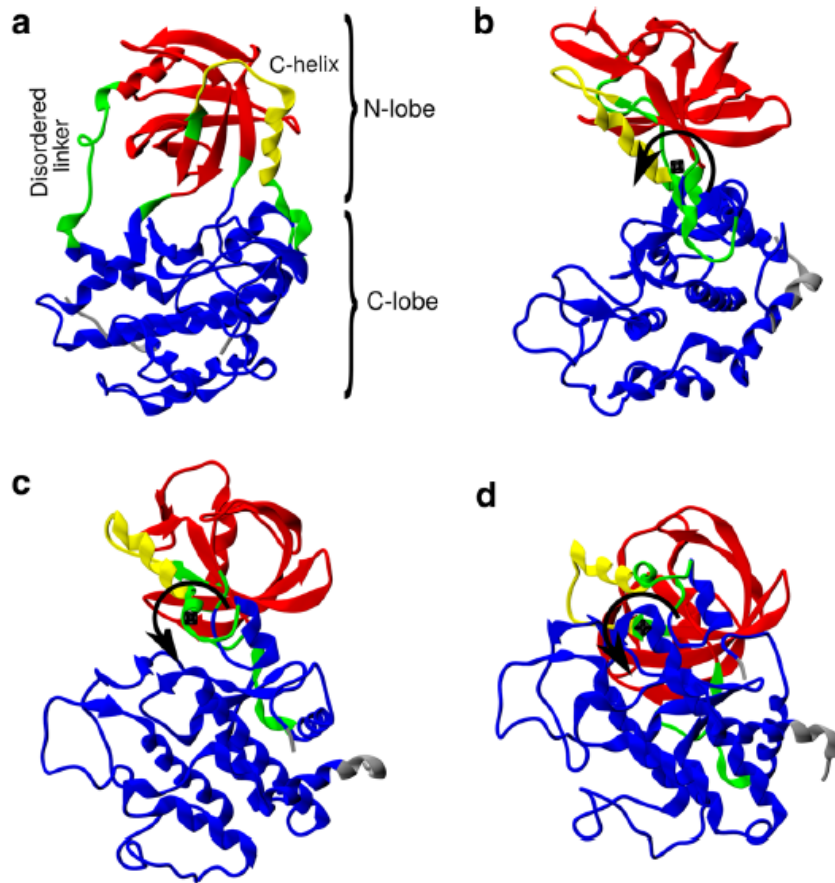


Figura 10. Análisis de dominio dinámico para comparar TgROP18 / ATP con MD1 / MD4 de TgROP18 / 30C. En el panel (a), dominios identificados por el servidor DynDom (azul, amarillo y rojo) y regiones de plegado (verde). En los paneles (b), (c) y (d), vistas paralelas a los ejes de tornillo que modelan la diferencia entre conformaciones. Las flechas negras de rotación indican el movimiento calculado del tornillo.

5.1.2.8 Análisis de correlación de cadena peptídicas

Para caracterizar aún más los sistemas, realizamos un análisis de correlación entre los átomos de carbonos α . Para cada sistema y cada corrida de MD, obtuvimos los vectores de desplazamiento en fragmentos de los carbonos α . Luego, la correlación por par de residuos se calculó como el promedio del producto escalar de los vectores de desplazamiento. Las matrices de correlaciones se muestran como mapas de calor en la figura 10a. Los mapas de correlación de TgROP18 / ATP y TgROP18 / 30C son muy similares. Los valores de correlación se encuentran entre - 0.3 y 0.8. La presencia de diagonales inversas con alta correlación refleja las múltiples láminas β antiparalelas que contiene la estructura de TgROP18; Por otro lado, el aumento de la correlación se acerca a la diagonal de la marca en la matriz las hélices α en TgROP18.

Para evaluar el efecto de 30C, calculamos la diferencia entre las matrices de correlación de TgROP18 / ATP y TgROP18 / 30C (Fig. 11b). La matriz de diferencia muestra pocos puntos distintos de cero que equivalen a valores de - 0,20 a 0,25 (círculos en la figura 11b). Esto implica que no hay diferencias importantes en las correlaciones de pares de residuos individuales.

En un enfoque diferente, la matriz de diferencia se dividió en dos regiones (Fig. 9b): las que corresponden a residuos del mismo lóbulo (es decir, regiones con correlaciones intralobulares) y las que corresponden a residuos de diferentes lóbulos (es decir, regiones con correlaciones entre lóbulos). Los dos triángulos blancos representan las correlaciones intralobulares del lóbulo N (residuos 209–360) y una parte del lóbulo C (361–548); el cuadrado negro representa correlaciones entre lóbulos. Curiosamente, los puntos en la matriz muestran que las correlaciones intralobulares aumentan mientras que la correlación interlobular disminuye. En aras de la claridad, la figura 11c muestra estos cambios de correlación en la estructura de TgROP18 indicando cuándo la correlación por pares aumenta (naranja) o disminuye (azul).

Este análisis muestra que algunas regiones están más afectadas por el cambio de correlación. Estas regiones se pueden apreciar visualmente en la figura 11c como los nodos con muchas conexiones. Las regiones más afectadas son, en orden decreciente: la hélice C, el bucle de activación, el bucle catalítico y la lámina β 4a / β 4b. Por otro lado, es interesante que algunos cambios de correlación sean en residuos que están lejos del sitio de unión, como la correlación entre el residuo Cys478 y los residuos Leu492-Pro498, del lóbulo C. La conformación muestreada en MD2 / MD3 solo corresponde a la disminución en la correlación del bucle G (pequeños puntos azules en la Fig. 11b) mientras que la conformación muestreada en MD1 / MD4 corresponde al resto de los cambios de correlación (grandes manchas azules y manchas naranjas, en la Fig. 11b). Estos son consistentes con los análisis anteriores. Los análisis de PCA y DynDom mostraron que 30C induce una conformación más abierta en MD1 / MD4 de TgROP18, mientras que no cambia la conformación de TgROP18 en MD2 / MD3.

5.2 Discusión fase *in silico*

5.2.1. Evaluación estructural de la farmacología

El núcleo tiazolidinona presenta índices terapéuticos altos *in vitro* contra *T. gondii* debido a sus efectos biológicos demostrados y la información experimental reportada por varios autores; este tipo de datos facilita proponer estudios con enfoques de diseño racional que pueden dar lugar a nuevas alternativas farmacológicas utilizando blancos moleculares específicos del parásito; Además, la evidencia muestra que los enfoques *in silico* vinculados con el trabajo experimental pueden dar como resultado nuevos esquemas de flujo de trabajo que favorecen el proceso de diseño y desarrollo de nuevos fármacos. Las herramientas del descubrimiento moderno de fármacos que utilizan técnicas experimentales *in silico* tienen el poder de analizar millones de compuestos para determinar su posible asociación con un blanco único o múltiple que contribuiría a mejorar la actividad de compuestos obsoletos o la generación de nuevos, lo que permite reducir sustancialmente tiempo y costos para el desarrollo y descubrimiento de nuevos medicamentos. Finalmente, la mejor comprensión del mecanismo de acción del medicamento puede conducir a su mejora, otorgando especificidad al compuesto y, por lo tanto, aumentando su efectividad. Estas metodologías responden al llamado del diseño racional de medicamentos contra la toxoplasmosis y otras patologías.

Al realizar una revisión cronológica de las modificaciones del núcleo tiazolidinona con fin de mejorar la especificidad del tratamiento por el parásito. En los últimos años, los métodos computacionales han jugado un papel importante en los esfuerzos para obtener compuestos efectivos que puedan superar las limitaciones de los tratamientos farmacológicos actuales para diversas enfermedades. La obtención de estos compuestos bioactivos se basa en un diseño racional, donde las herramientas bioinformáticas se utilizan para proporcionar información crucial para identificar y describir un blanco adecuado. Una gran cantidad de herramientas computacionales disponibles brindan soporte para superar diferentes tipos de problemas, por ejemplo, si la estructura de una biomolécula diana como proteínas,

ADN o ARN son desconocidas, se puede obtener a través de técnicas de modelado molecular como el modelado de homología, que construye un modelo tridimensional combinando la información experimental resueltas previamente (Khan et al., 2016), registradas en el Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>) (Berman et al., 2000). Cabe mencionar que, en algunos casos, el descubrimiento del fármaco sigue dos rutas: (i) diseño del fármaco basado en la estructura (cuando se conoce el sitio específico estructural del objetivo) y (ii) diseño del fármaco basado en el ligando (al comenzar desde un compuesto compuesto con efecto conocido y la estructura del receptor es desconocida).

5.2.2 Preparación de modelos de posibles blancos farmacológicos de tiazolidinonas en *T. gondii*.

Un aspecto inherentemente difícil del desarrollo de fármacos es identificar objetivos farmacológicos y dilucidar el modo de acción de un compuesto dado. Para identificar objetivos, se emplean métodos bioquímicos (por ejemplo, estudios desplegables con medicamentos inmovilizados) y enfoques genéticos (por ejemplo, análisis de cepas de parásitos resistentes) (92). Un blanco farmacológico ideal se expresa únicamente dentro del patógeno o tiene un bajo grado de similitud con las proteínas del huésped homólogo y lleva a cabo una actividad funcional que es esencial para la supervivencia del parásito. Las herramientas computacionales son valiosas para identificar objetivos adecuados. Incluyen estudios funcionales, estructurales e *in vitro* y proporcionan información valiosa sobre la interacción de blancos seleccionados con ligandos. Además, la calidad de los modelos de los blancos identificados también es importante para obtener resultados cercanos a los blancos reales del receptor de proteínas. El servidor Swiss-Model utiliza un método de modelado de homología, siendo la evaluación de calidad el último paso. La función de puntuación QMEAN es el criterio de referencia utilizado para estimar la calidad global de los modelos de consulta; este puntaje refleja la confiabilidad global prevista del modelo (93). Las gráficas de Ramachandran mapean la riqueza de conformaciones del esqueleto del polipéptido (que muestra los valores de los ángulos ϕ y Ψ) y se usan ampliamente para ver si los ángulos de torsión de la cadena principal son estereoquímicamente factibles en un modelo de proteína. Por

lo tanto, predice posibles choques en su estructura y proporciona una vista simple de su conformación de los ángulos ϕ - ψ dentro de distintas regiones en el diagrama de Ramachandran, donde cada región corresponde a una estructura secundaria particular (94). Los resultados del análisis de las parcelas de Ramachandran y el puntaje QMEAN sugieren que, en general, los dos modelos predichos elegidos (TgPDI y TgRNR2) presentaron una calidad aceptable para su uso en estudios de acoplamiento molecular y dinámica molecular.

5.2.3 Descripción del efecto del derivado 30C en el sitio activo de la proteína TgROP18

Varios estudios sugieren que los compuestos con núcleo de tiazolidinona tienen una potente actividad biológica, como antiinflamatorios, antibacterianos, anticancerígenos, antivirales, antiparasitarios, entre otros (30)(95)(96). La tiazolidinona podría considerarse un núcleo importante (Hit) con actividad *in vitro* contra *T. gondii* (Rocha-Roa, et al., 2018). El estudio de su farmacodinámica es importante para mejorar las posibilidades de lograr una molécula líder que tenga éxito en modelos animales.

El acoplamiento molecular es un enfoque de simulación computacional en el que un ligando candidato se une a un receptor. El método predice la orientación preferida para unir el ligando para formar un complejo estable. El acoplamiento molecular se usa para predecir la afinidad y la actividad de unión de la molécula pequeña a sus objetivos proteicos mediante el uso de funciones de puntuación. Por lo tanto, el acoplamiento juega un papel importante en el diseño racional de las drogas. La sensibilidad de los cálculos de acoplamiento muestra que incluso pequeños cambios en la conformación del ligando pueden conducir a grandes diferencias en las puntuaciones de las posturas acopladas resultantes. Exploramos los sitios activos de cuatro proteínas diferentes de *T. gondii* que podrían estar involucradas con la interacción del núcleo de tiazolidinona. Los resultados de la re-puntuación realizada con DSX-Score y X-Score, revelan una tendencia del derivado 30C a estar presente entre los cinco mejores compuestos para cada proteína. Por esta razón,

se aceptan los valores entregados por Autodock Vina para las energías libres de unión. La Tabla 2 muestra más claramente que 30C fue el derivado que presentó los mejores valores de energía libre de unión (valores resaltados en negrita). Estos resultados sugieren que el derivado 30C estaría presentando un efecto multi-objetivo ya que se encuentra entre las mejores energías libres de unión presentadas por los derivados probados en los sitios activos de las proteínas evaluadas, exhibiendo una gran afinidad por las proteínas del dominio de la quinasa, como TgROP18 y TgCDPK. Para seleccionar un objetivo farmacológico que cumpla con las condiciones mencionadas, pocos estudios de investigación motivan la exploración de posibles inhibidores de TgROP18 (Nicole Jung, 2017). Sin embargo, estudios recientes informan que TgROP18 tiene interacciones con proteínas humanas involucradas en la respuesta inmune contra *T. gondii*. Además, es un factor clave para el control de la virulencia y el desarrollo de toxoplasmosis (El Hajj et al., 2007, Niedelman et al., 2012). Estudiamos las interacciones en el complejo TgROP18 / 30C mediante simulaciones moleculares de MD, aunque TgCDPK1 también es una proteína para considerar en futuros estudios. Encontramos que 30C podría inducir dos conformaciones en TgROP18. Es posible que las dos conformaciones sean parte del procedimiento de unión de 30C, es decir, la conformación abierta representaría un primer paso en la unión que podría conducir a una conformación cercana; la conformación cerrada que se encuentra aquí es similar a la resultante de la unión de ATP, en la que se induce flexibilidad en los dos lóbulos, causando su cierre y, en consecuencia, una reorganización de su C-hélice. Por lo tanto, se puede sugerir que la segunda conformación de 30C dentro de TgROP18 estaría imitando el efecto del sustrato natural (99). En 300 ns de MD4 no hemos detectado grandes cambios en la estructura alcanzada por MD1 / MD4 o MD2 / MD3, pero los tiempos de simulación necesarios para el cambio en la conformación pueden ser mucho más largos. En este sentido, la razón por la que encontramos las dos conformaciones podría deberse a que el sesgo de la estructura inicial permitió que el sistema alcanzara mínimos de energía libre diferentes. Se necesitarían simulaciones más especializadas para probar esta hipótesis. Por ejemplo, la dinámica molecular dirigida y las simulaciones de muestreo general han

sido efectivas para describir la liberación de ligandos de sus receptores (100). Además, estos métodos podrían usarse para extraer 30C de ambos estados y afirmar si son dos modos de unión diferentes o dos etapas en un solo procedimiento de unión.

$\Delta G-TgPDI$ (kcal/mol)	$\Delta G-TgRNR2$ (kcal/mol)	$\Delta G-TgROP18$ (kcal/mol)	$\Delta G-TgCDPK1$ (kcal/mol)
30C (- 8.7)	34A (- 7.7)	30C (-8.9)	30C (-10.0)
15C (-8.2)	34B (- 7.5)	36A (- 8.5)	34B (-9.2)
18C (- 8.1)	36A (- 6.7)	24C (- 8.4)	34A (- 9.1)
36A (- 8.0)	30C (- 6.3)	34B (-8.3)	36A (- 8.7)
24C (- 7.9)	15C(- 6.3)	34A (- 8.2)	18C (- 8.5)

Tabla 2. Resumen de los mejores compuestos acoplados en los sitios activos de las proteínas estudiadas de T.gondii

Algunos residuos del sitio activo TgROP18 interactúan con 30C para formar y estabilizar el complejo receptor / ligando. Estos residuos coinciden con los que estabilizan el ATP. Encontramos que la estabilización de 30C en el sitio activo TgROP18 se debe principalmente a la solvatación no polar y las interacciones de Van der Waals. Dentro del sitio activo de las proteínas quinasas, se describen algunas regiones comunes en las que encaja el sustrato ATP natural, con un bolsillo para cada uno de los grupos característicos que lo forman, el bolsillo de unión a Adenina y el bolsillo de unión a Ribosa, los que tienen una superficie hidrófoba y la región de unión con Fosfato que es hidrofílica (Figura. 10a). Nuestros resultados sugieren que 30C cumple con algunas características que podrían describir una molécula inhibidora de la proteína quinasa. El 30C podría ser un inhibidor competitivo del ATP porque ocupa el bolsillo de ribosa y la región de fosfato de unión donde interactúa con el G-loop. Los inhibidores de quinasa se clasifican de acuerdo con la naturaleza de la inhibición. Esto posiciona el ligando 30C en un posible tipo II, dado que puede ser competitivo con ATP, induce cambios conformacionales significativos y actúa en el sitio activo. La Figura 10b muestra el notable cambio

conformacional inducido por 30C en la superficie del sitio activo, modificando y exponiendo regiones hidrofóbicas de este sitio de unión a ATP para facilitar su acoplamiento molecular. El ligando 30C presenta restos altamente hidrofóbicos. Debido a esto, contacta los residuos hidrofóbicos del sitio de unión de TgROP18 y también puede enterrarse más profundamente que el ATP. Esto permite que ocurran algunas interacciones polares cerca del sitio de unión: Ly281-Glu300, Gln214-Lys365, Gln216-Asp362. Estas interacciones cierran los lóbulos y atrapan la molécula 30C en el núcleo hidrofóbico de TgROP18. Se ha informado que cuando Glu300 se une a través de un puente de sal con el residuo Lys281, el lóbulo N se mueve como una estructura rígida que permite un movimiento similar al aliento, que apoya la conformación activa (101). Curiosamente, 30C puede unirse a TgROP18 preservando la interacción Lys281-Glu300 y manteniendo la conformación activa pero sin el sustrato, inhibiendo así la actividad catalítica de la enzima. Descubrimos que el complejo TgROP18 / ATP, que muestrea alrededor del 2 ° 3 ° y 4 ° modo PC, sufre cambios conformacionales que involucran la C-hélice, el G-loop, y hélice α 2 (residuos 220-231). Debido a su disposición espacial, es razonable pensar que estos movimientos afectan la bolsa del lóbulo N donde se une la sacarosa, se encontró en la cristalización. Por consiguiente, esta relación sugiere que las modificaciones en ese sitio por el efecto de un ligando podrían afectar el sitio de unión a ATP al restringir estas subestructuras.

Finalmente, con el fin de mejorar la afinidad y especificidad de los compuestos de tiazolidinona por la proteína TgROP18, se analizaron las interacciones de los ligandos evaluados y se complementó con la información recopilada en la literatura sobre los tipos de inhibidores para las proteínas quinasas. Se observaron tendencias de las relaciones estructura-actividad (SAR) cuando analizamos en detalle las conformaciones de acoplamiento, los puntajes y las interacciones entre los derivados de tiazolidinona y los residuos del sitio de unión. Todos los compuestos fueron reconocidos como inhibidores potenciales de enzimas estudiadas dentro de *T. gondii*. Encontramos que los grupos hidrofóbicos unidos a C2 dentro del núcleo de tiazolidinona facilitan las interacciones de estos compuestos con las regiones *Adenine Pocket* y *Ribose Pocket* del sitio activo TgROP18 a través

de contactos hidrofóbicos; y también, que las sustituciones con anillos aromáticos en la amina secundaria (N3) del núcleo de tiazolidinona tendrían una fuerte tendencia a interactuar con Asp427 y Lys281 que juegan un papel indispensable en la fosfotransferencia del grupo γ -fosfato. Además, es interesante mencionar que los derivados con mayor afinidad (34A, 36A, 34B, 37B y 30C) tienen un grupo aromático moderadamente voluminoso unido a su resto de hidrazina, tales como: naftaleno en el caso de 34A, 34B; grupo cumarina en 36A; y grupo ferroceno en 37B y 30C, que se comporta de manera similar debido a la presencia de los dos anillos de ciclopentadienilo. Con base en lo anterior, se puede sugerir que los fragmentos de este tipo anclados a la fracción hidrazona serían modificaciones para conservarse en la estructura de los nuevos derivados de tiazolidinona (voluminoso hidrofóbico aromático-hidrazona-tiazolidinona) con actividad anti-toxoplasma; por lo tanto, el derivado de 30C puede tomarse como punto de partida para realizar modificaciones adicionales en su estructura con el fin de diseñar nuevos fármacos con afinidad y especificidad mejoradas con una actividad anti-T gondii.. Se necesitan más estudios enzimáticos para desarrollar nuestro conocimiento de la base de bioactividad molecular de los derivados de tiazolidinona.

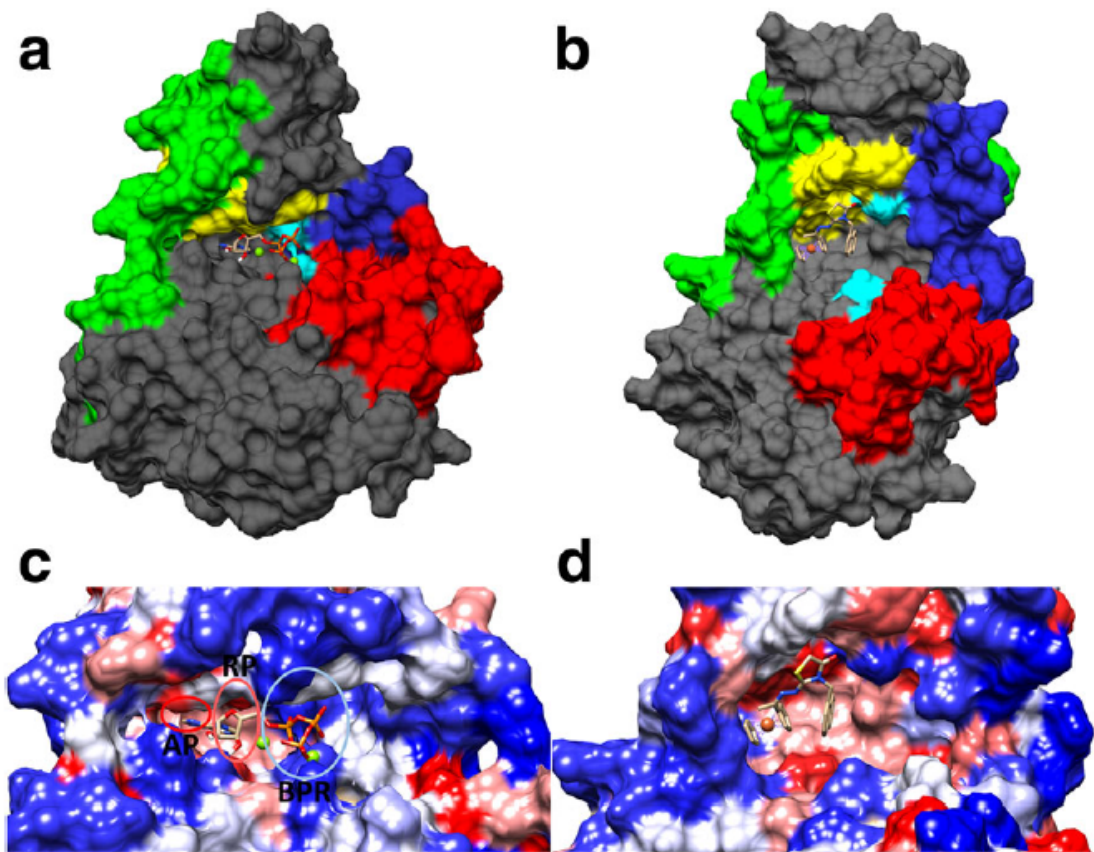


Figura 11. Cambios estructurales en la proteína TgROP18 causados por la acción del ligando 30C en uno de los dos estados posibles. Estructuras representativas de los complejos ATP-TgROP18 (a) y TgROP18 / 30C (b) después de las simulaciones MD; el bucle G se muestra en amarillo, la región desordenada se muestra en verde, los residuos de la tríada catalítica se muestran en azul cian, el bucle A se muestra en rojo y el hélix-C se muestra en azul. Las regiones en gris son esquemáticas. c Sitio activo de la proteína modelo TgROP18, delimitado por bolsillo de adenina (AP), bolsillo de ribosa (RP) y región de fosfatos de unión (BPR). De izquierda a derecha, el sitio activo se describe con el AP hidrofóbico que interactúa con grupos sustituyentes hidrofóbicos, y RP que podría interactuar con grupos donantes de electrones, y describe el BPR con un perfil hidrofílico y tiende a formar enlaces H con átomos aceptores. d Cambio sobre la superficie electrostática del sitio activo de TgROP18 causado por el ligando 30C después de la simulación MD.

La comprensión de dinámica estructural del sitio activo de las quinasas nos da una idea para el diseño de moléculas que puedan tener mayor afinidad por aminoácidos específicos del sitio activo de estas proteínas, se propuso moléculas que deben tener: una cabeza aromática (color azul, figura 12), este grupo aromático puede

encajar en el bolsillo hidrofóbico del sitio activo. Un centro acido polar, conformado por el grupo farmacóforo tiazolidinona que podría interaccionar con residuos hidrofílicos del centro activo (color:rojo figura 12). Una cola alifática para formar interacciones π - π con residuos hidrofóbicos. Estas características nos llevaron a la síntesis de 5 ariliden 4-tiazolidinona. También conservamos el grupo hidrazono-4-tiazolidinonas.

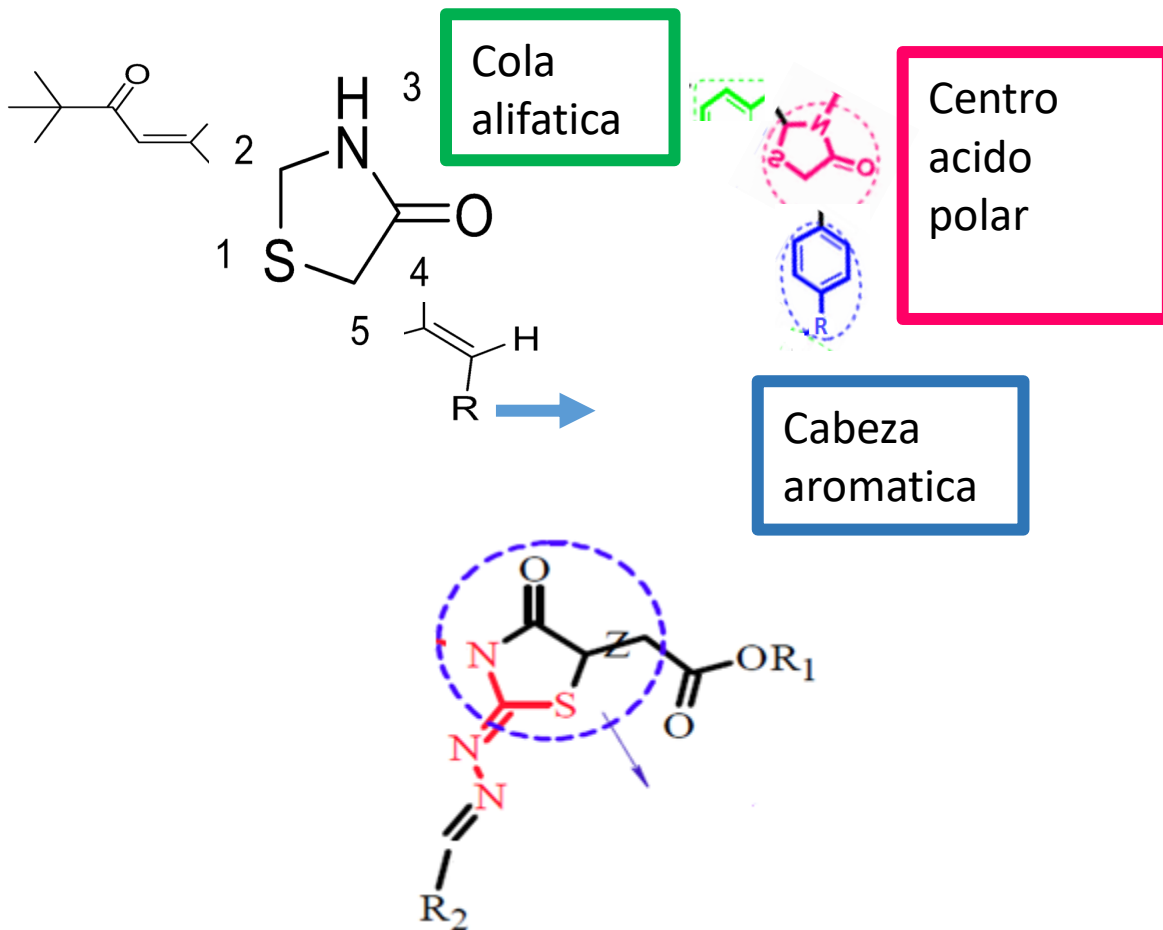
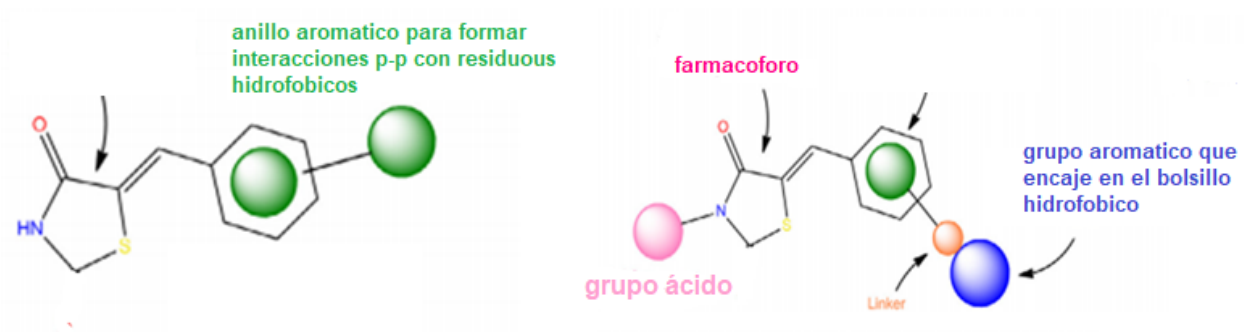
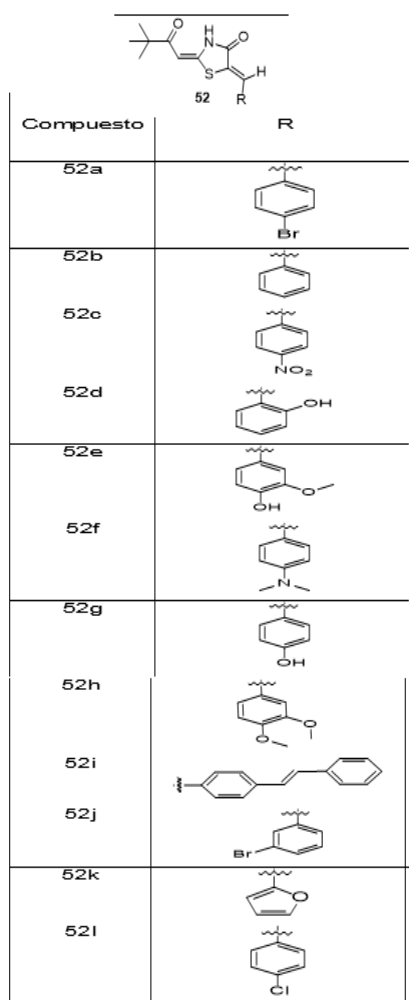


Figura 12. Grupo de moléculas diseñadas derivados 5 ariliden 4-tiazolidinona y 2 hidrazono-4-tiazolidinonas.

5.3 Resultados Fase experimental.

5.3.1 Síntesis de derivados tiazolidinona a) 5- (ARILIDEN) -2- (3,3-DIMETIL-2-OXOBUTILIDEN) -4-TIAZOLIDINONA y b) 2-HIDRAZONO-4-TIAZOLIDINONAS. se describe en la sección de material suplementario (ANEXO 1 Química).

a) 5-(ARILIDEN)-2-(3,3-DIMETIL-2-OXOBUTILIDEN)-4-TIAZOLIDINONA



b) 2-HIDRAZONO-4-TIAZOLIDINONAS

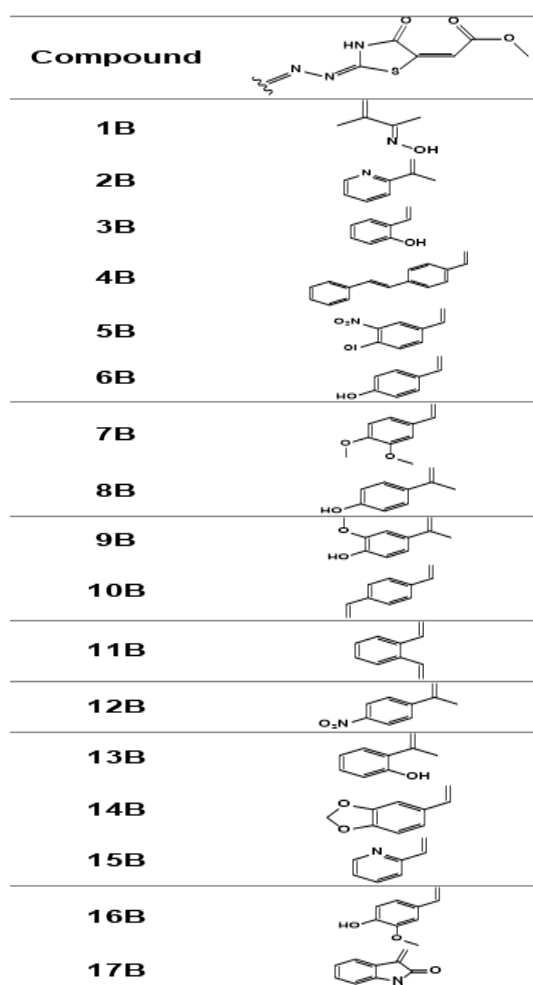
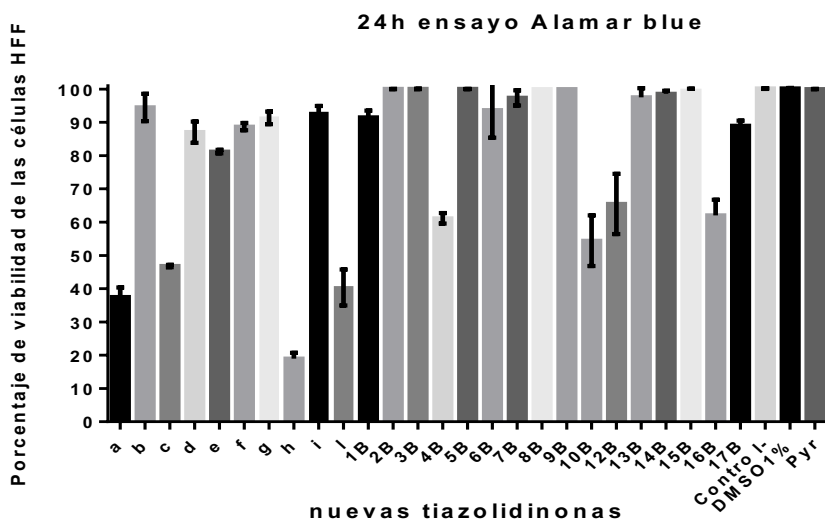


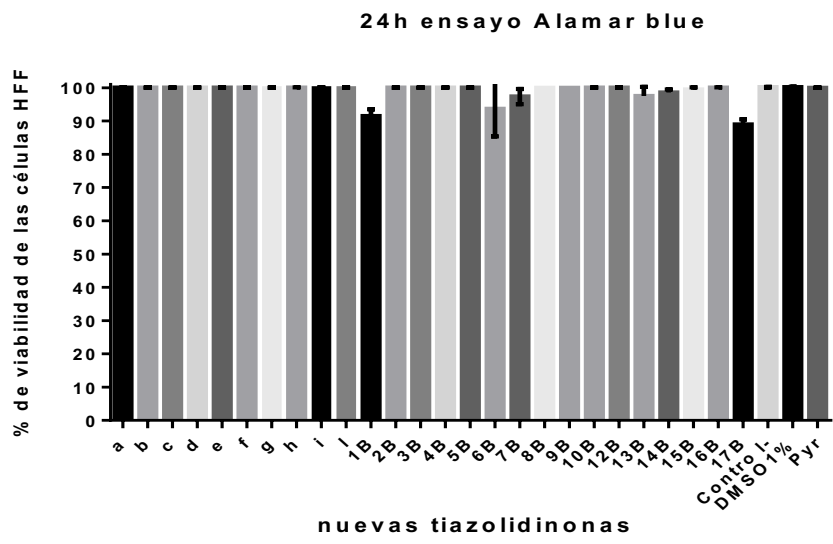
Figura 13. Derivados tiazolidinona a) 5- (ARILIDEN) -2- (3,3-DIMETIL-2-OXOBUTILIDEN) -4-TIAZOLIDINONA y b) 2-HIDRAZONO-4-TIAZOLIDINONAS

5.3.2 Evaluación de la viabilidad de las células HFF expuestas a los derivados tiazolidinonas por ensayo de azul Alamar.

El azul de Alamar, también conocido como ensayo de resazurina, se usó para describir la citotoxicidad de las nuevas tiazolidinonas para las células HFF y para determinar las concentraciones que se utilizarían en los experimentos de infección. El tratamiento de las células HFF con las moléculas a, c, h, l 4B, 10B, 12B, 16B a una concentración de 10 μ M durante 24 h fue tóxico, reduciendo más del 50% de la viabilidad celular en comparación con el control negativo (Figura 14. A). Sin embargo, el tratamiento con estas moléculas a una concentración de 5 μ M no fue tóxico (Figura 14 B). También se aumentó la concentración para el objetivo de aproximarnos a la toxicidad media TD50 (figura 15). El análisis estadístico se realizó en Graph pad prism 6.0. La prueba de Kruskall Wallis y la prueba de Dunn se aplicaron para hacer comparaciones múltiples entre los tratamientos y el control negativo. También la prueba de Mann Whitney para comparar entre una concentración dada y el control.



A.



B.

Figura 14. A. Una vez confluentes, las células HFF se trataron con una concentración de compuesto de 10 μ M durante 24 h. Esto fue seguido por un ensayo Alamar Blue con resazurina 0,5 mM a 37 °C con 5% de CO₂ durante 4 h. Los resultados en el gráfico de barras son el promedio \pm desviación estándar del porcentaje de viabilidad por triplicado de un experimento representativo. Se hicieron tres replicas del experimento cada uno por triplicado. B. grafica datos a 5 μ M no se observa efecto en la viabilidad celular

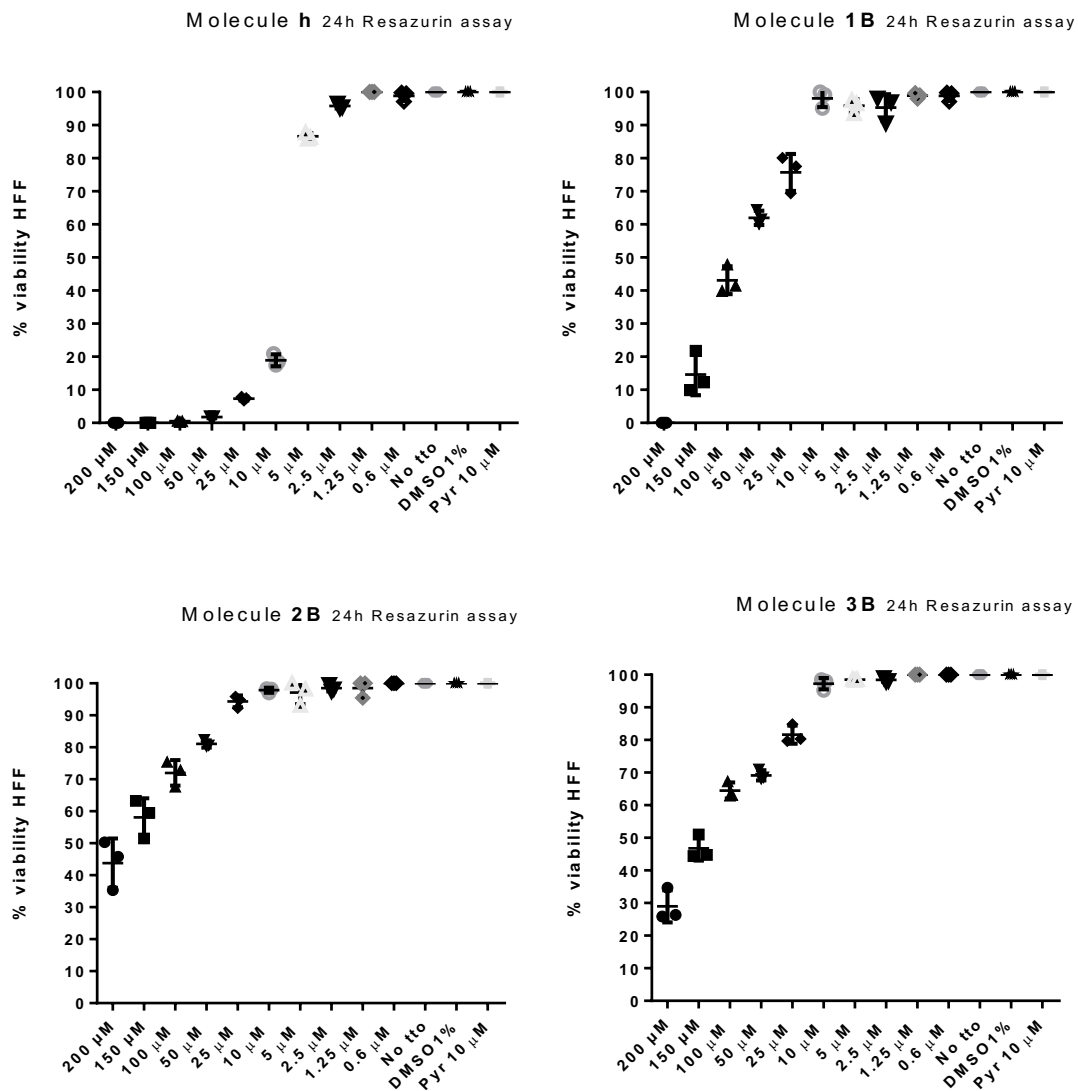


Figure 15. A medida que se aumenta la concentración se reduce la viabilidad de las células HFF. El ensayo de citotoxicidad nos permite aproximarnos a la toxicidad media TD50,

5.3.3 Viabilidad de los taquizoitos *T. gondii* RH GFP Ensayo de viabilidad 24h.

Los taquizoitos *T. gondii* GFP se trataron con compuestos a la concentración de 5 μ M y 10 μ M durante 24 h de acuerdo a la viabilidad de las células HFF evaluada anteriormente en 7.2.2 y la Pirimetamina a la concentración de 10 μ M como se muestra en la Figura. 16. Los parásitos que fluorescen de color verde se consideraron viables y el porcentaje de viabilidad de taquizoitos se comparó con parásitos sin tratamiento. Las moléculas con etiqueta a, d, e, f, h, i, 1B, 2B, 3B, 4B, 6B, 9B, 13B. redujeron más del 50% de la viabilidad de los parásitos. Las que mejor inhibieron la viabilidad de parásito fueron las moléculas e,f,h, 1B, 2B, 3B

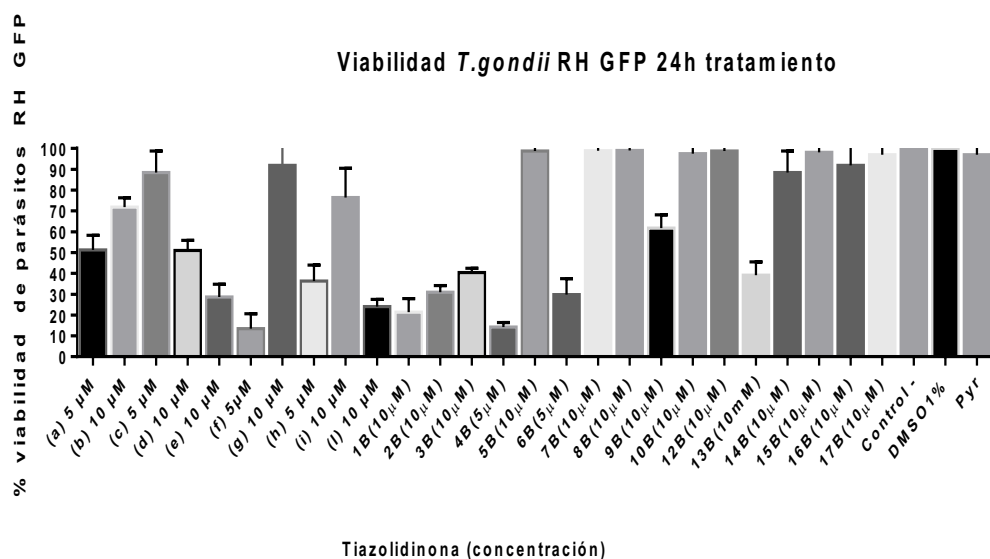


Figura 16. Efecto directo sobre el parásito. Los taquizoitos RH-GFP de *T. gondii* aislados, se trataron con compuestos a 10 μ M y 5 μ M durante 24 h 37 ° C con 5% de CO₂. Los resultados en el gráfico de barras son el promedio \pm desviación estándar del porcentaje de viabilidad por triplicado de un experimento representativo. Se hicieron tres réplicas del mismo experimento con los cuales se obtuvieron resultados similares.

5.3.4 Ensayo de proliferación intracelular a 48 horas.

La fluorescencia de los parásitos GFP se cuantificó después de 48 h de tratamiento usando un microscopio fluorescente estándar EVOS Light Cube GFP con filtro de excitación 470/22 y de emisión: 526/60 (Thermo Fisher Scientific, EEUU) con un objetivo 10X en el sistema de imágenes en color EVOS FL. Las imágenes fueron grabadas y ajustadas para contraste con ImageJ Moléculas (a, e, f, h, l) del grupo 5- (ariliden) -2- (3,3-dimetil-2-oxobutiliden) -4-tiazolidinona y (1B, 2B, 3B, 4B, 6B, 13B) del grupo 2-hidrazon-4-tiazolidinona redujeron el porcentaje de proliferación al mismo nivel del control de pirimetamina Figura. 17

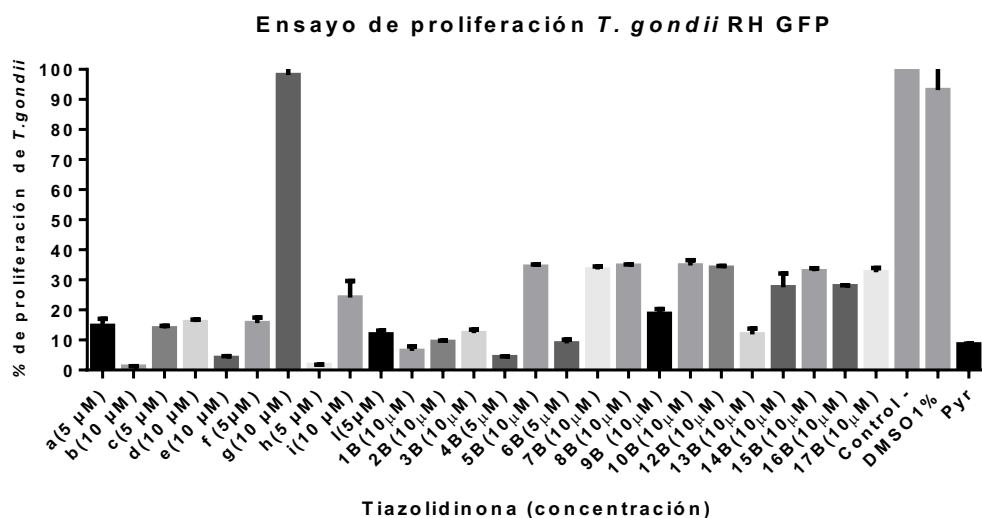
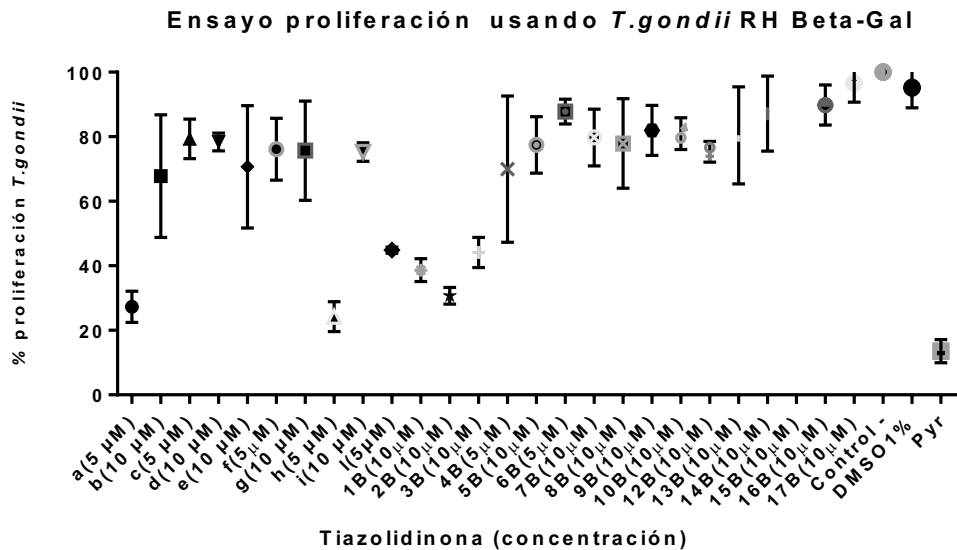


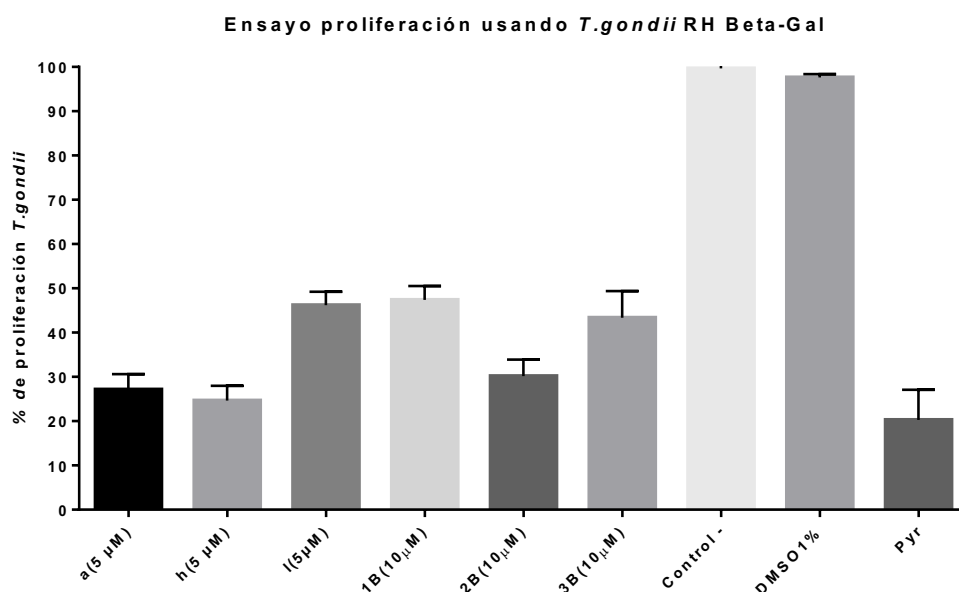
Figura 17. Efecto sobre la proliferación intracelular del parásito. Las placas con los compuestos se infectaron con un inóculo de aproximadamente 10.000 parásitos por pozo. Se observa disminución de la proliferación del parásito.

5.3.5 Uso de *Toxoplasma gondii* que expresa beta-galactosidasa para la evaluación colorimétrica.

Aunque estos métodos individuales tienen sus propias ventajas y desventajas. Filtramos moléculas en las que los resultados se correlacionaron con la viabilidad de *T. gondii* GFP, la proliferación y el ensayo de β -galactosidasa. Las moléculas (e, f, 4B, 6B, 13B) redujeron más del 50% de la viabilidad de los parásitos y también redujeron el porcentaje de proliferación en el mismo nivel de control de pirimetamina por GFP pero no se seleccionaron para experimentos en ME49 debido a que no redujeron la proliferación más del 50% de la proliferación usando beta galactosidasa. Las moléculas a y l reducen la viabilidad y la proliferación del parásito, pero después del ensayo de 5 días, la morfología de la HFF no fue la mejor en comparación con el control (Fig. 18).



a)



b)

Figura 18. a) Moléculas (a, h, l) del grupo 5- (ariliden) -2- (3,3-dimetil-2-oxobutiliden) -4-tiazolidinona y (1B, 2B, 3B) del grupo 2-hidrazon-4-tiazolidinona reducen más del 50% de la proliferación del parásito, pero el grupo de ariliden se evaluó a 5 μ M porque mostraron toxicidad a 10 μ M. b) moléculas que redujeron significativamente la proliferación del parásito

5.3.6 Efecto sobre la proliferación en la cepa de *T. gondii* RH cereza, ensayo de 5 días.

Tan pronto llegué a la Universidad de Wisconsin en Madison, mostré los avances experimentales en la cepa RH tanto con la técnica fluorimétrica como colorimétrica, donde se me aconsejó realizar experimentos con la cepa RH cereza fluorescente con el fin de verificar si los resultados de los experimentos realizados en Colombia eran reproducibles. Se sembraron células HFF en placas de 24 pozos y se dejaron crecer hasta lograr una monocapa confluyente. Una vez que se alcanzó la confluencia, se agregaron 20,000 taquizoitos marcados con cereza RH a cada pozo y las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h para permitir la infección. Luego se reemplazó el medio y se agregaron los compuestos disueltos en DMSO (Fisher Scientific, EE.UU.) a una concentración de 10 y 5 µM de acuerdo con los resultados de citotoxicidad de HFF. La concentración de DMSO no superó el 1% en todas las pruebas para evitar la citotoxicidad. Todas las concentraciones se realizaron por duplicado y se usó pirimetamina 10 µM como control positivo. Luego se tomó una lectura fluorescente con un lector de placas IncuCyte S3 con excitación 530/25 y emisión 590/25 (Figura 19.1)

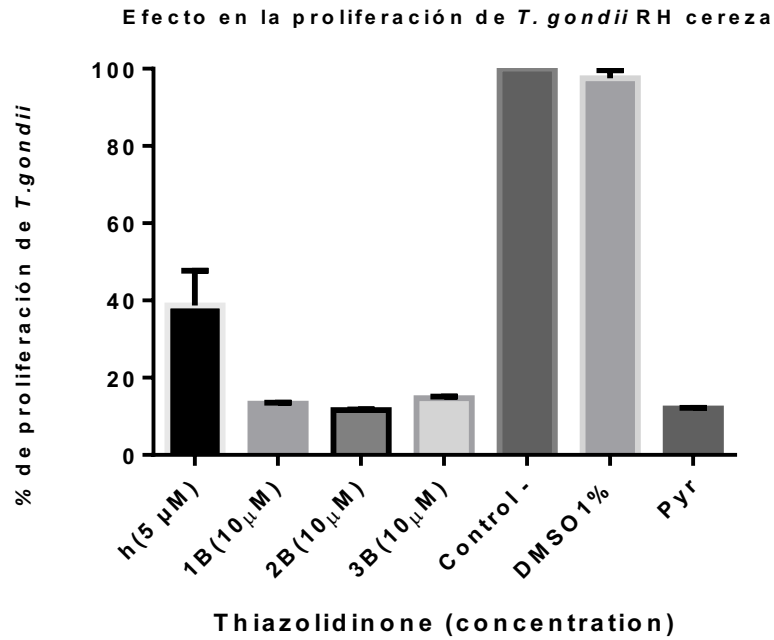


Figure 19.1 Los resultados en el gráfico de barras son el porcentaje de crecimiento de un experimento representativo. Se realizaron tres experimentos independientes cada uno por triplicado

5.3.7 Efecto sobre la proliferación del parásito *T. gondii* ME49 cereza ensayo de 5 días.

Las moléculas h, 1B, 2B, 3B fueron seleccionadas para análisis posteriores utilizando, debido a que los experimentos realizados en Colombia correlacionaban con los realizados en la Universidad de Wisconsin con la cepa cereza fluorescente (Fig 19.1). Se hicieron experimentos en *T. gondii* ME49 cereza fluorescente (Fig 19.2). Se sembraron células HFF en placas de 24 pozos y se dejaron crecer hasta lograr una monocapa confluyente. Una vez que se alcanzó la confluencia, se agregaron 40,000 taquizoitos de cereza ME49 a cada pozo y las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h para permitir la infección. Luego se reemplazó el medio y se agregaron los compuestos disueltos en DMSO (Fischer Scientific) a una concentración de 10 y 5 µM de acuerdo con los resultados de citotoxicidad de HFF. La concentración de DMSO no superó el 1% en todas las pruebas para evitar la citotoxicidad. Todas las concentraciones se realizaron por duplicado y se usó pirimetamina 10 µM como control positivo. Luego se tomó una lectura fluorescente con un lector de placas IncuCyte S3 con excitación 530/25 y emisión 590/25.

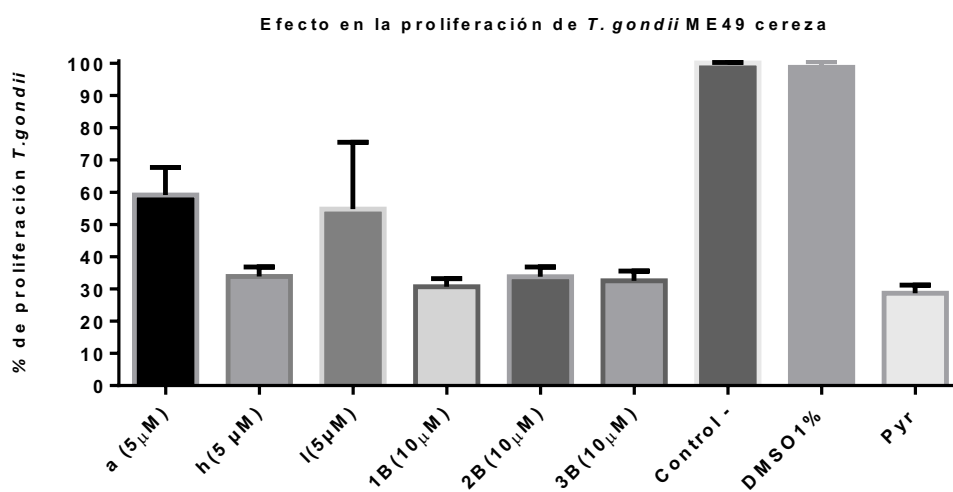


Figure 19.2. Efecto en la proliferación intracelular sobre la cepa ME49. Los resultados en el gráfico de barras son el porcentaje de crecimiento de un experimento representativo. Se hizo tres experimentos independientes cada uno por triplicado.

5.3.8 Pretratamiento de la célula huésped y resultados de exposición extracelular a taquizoitos.

Para describir un posible modo de acción, tanto las células HFF como los taquizoitos fueron pretratados con 10 μM de las moléculas. En pretratamiento de las células HFF no hubo cambio en el crecimiento del parásito como si hubo para el pretratamiento de los taquizoitos con las moléculas antes de la infección con disminución del crecimiento del parásito. Cuando las células HFF fueron tratadas con 2B no se midió ningún cambio significativo en el crecimiento. Sin embargo cuando los taquizoitos fueron tratados con 2B antes de la infección, el porcentaje de crecimiento se redujo al 40.3% figura 20 De estos datos, se puede razonar que 2B puede ser absorbido por la célula huésped para afectar el crecimiento de *T. gondii* mientras que las moléculas h, 1B y 3B puede provocar un efecto directo sobre el parásito extracelular antes de la invasión y sobre la célula hospedera

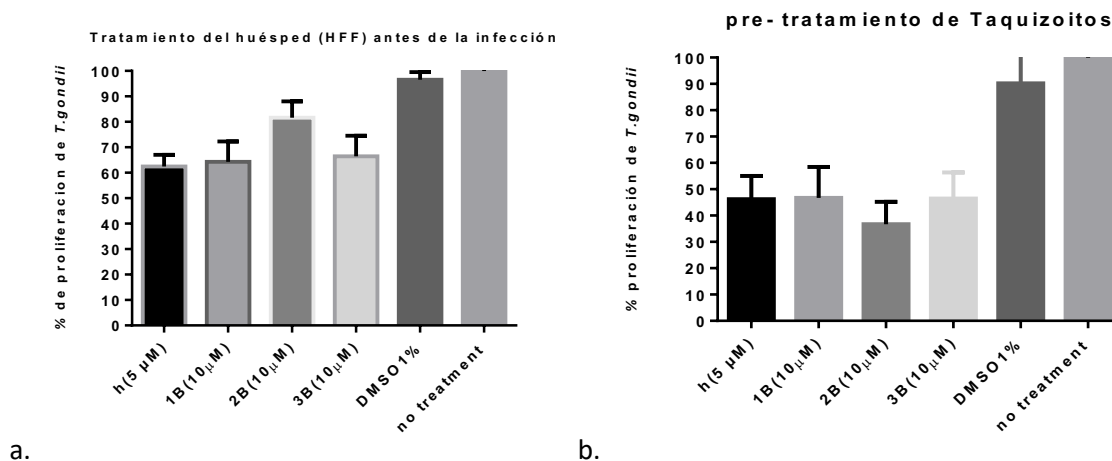


Figure 20. Pretratamiento de células huésped y resultados de exposición extracelular a taquizoitos. (a) Las células HFF se pretrataron con compuestos a 10 μM (molécula h a 5 μM) y se dejaron incubar a 37 ° C durante 24 h. Luego se lavaron las células y se infectaron con 40.000 taquizoitos de cereza ME49. (b) Los taquizoitos de cereza ME49 aislados se pretrataron con compuestos a 10 μM durante 4 h a temperatura ambiente, luego se usaron 40.000 parásitos para infectar HFF. Se tomaron lecturas de fluorescencia 5 días después de la infección para ambos experimentos. Se calculó la dosis tóxica media (TD 50): Dosis del fármaco con la cual se presenta el 50 % de la viabilidad de célula hospedera h (8 μM), 1B (60 μM), 2B (206 μM), 3B (125 μM). El IC50 es la concentración de un compuesto necesaria para reducir in vitro el crecimiento poblacional de organismos en un 50 por ciento. h (0,39 μM), 1B (0,46 μM), 2B (0,20 μM), 3B (0,66 μM). Cuanto menor sea un índice terapéutico (IT) más riesgo presenta la administración de dicho medicamento. Mayor toxicidad de la molécula.

Por el contrario, un IT elevado nos indica que el medicamento es menos toxico para las células HFF. El índice terapéutico como medida de eficacia es calculada por $TD50/IC50$. El IT fue: h de 20, 1B de 128, 2B de 1.000, 3B de 188. La concentración inhibitoria media máxima es una medida de la potencia de una sustancia para inhibir una función biológica o bioquímica específica, se graficó las unidades de fluorescencia para la cepa cereza-ME49 se hizo la transformación y normalización de los datos para hallar el IC50 (ANEXO).

5.4 Discusión fase experimental

Sintetizamos 29 nuevos derivados de tiazolidin-4-ona sin sustitución en N- con alto rendimiento, un grupo de moléculas compuestas por el heterociclo 5-ariliden-1,3-tiazolidin-4-ona, tiene en su estructura un anillo de 5 miembros con grupos tioéter, amina y carbonilo en las posiciones 1,3 y 4 respectivamente, además en el carbono 5 se encuentra un doble enlace C=C. Otro grupo de moléculas fueron las 2-hidrazono-4-tiazolidinonas. Exploramos el espacio químico y la influencia en la actividad biológica de diferentes grupos (alifático, anillos aromáticos y bicíclicos sustituidos). Hemos confirmado que este andamiaje de las 2-hidrazono-4-tiazolidinonas puede ser tan efectivo o mejor que el fármaco de referencia pirimetamina *in vitro* contra los taquizoitos de *T. gondii*. La molécula **Metil (Z) -2 - ((E) -4-oxo-2 - (((E) -1- (piridin-2-il) etilideno) hidrazono) tiazolidin-5-ilideno) acetato (2B)** fue más activa contra el parásito por diferentes técnicas y la menos citotóxica medida por morfología y técnica de resazurina.

En el ensayo de inhibición del crecimiento de cinco días, los compuestos se agregaron solo una vez, justo antes de la adición de taquizoitos y por lo tanto estuvieron presentes durante múltiples ciclos, hasta 20, de replicación de parásitos. Específicamente, los compuestos se probaron contra, (i) el inóculo inicial de taquizoitos cuando intentan invadir las células huésped, (ii) los taquizoitos intracelulares que intentan replicarse dentro de la PV, y (iii) los taquizoitos que se han salido de las células infectadas iniciales e infectan las células vecinas. El experimento de pretratamiento de células y parásitos es la primera aproximación para describir en donde podría afectar más al parásito si en invasión o en proliferación. Por lo tanto, los compuestos que fueron altamente eficaces en este ensayo inhibieron tanto la invasión como la replicación de la célula huésped. Además, dichos compuestos eran estables a 37 °C y podían transportarse no solo a través de la membrana plasmática celular, sino también a través de la membrana de la PV. En este entorno, entonces, lo mejor de las tiazolidinonas sintetizadas, en términos de IC50 y TI, fueron todas las derivadas del 2-hidrazono- (1B, 2B, 3B),

mostrando mejores valores que el compuesto de referencia pirimetamina (Tabla 1). En particular, es posible afirmar que la sustitución del 2-hidrazono influyó en la actividad biológica. Además, con respecto a la influencia del sustituyente muestran datos de IC50 y (TI) de 2B(1000)> 3B(188)> 1B(128), h(20) siendo la molécula 2B que mostró ser más específico para el parásito en este modelo *in vitro*. En general, los derivados tiazolidinona sin sustituciones en el NH mostraron una actividad inhibidora del crecimiento mínima.

Utilizamos diferentes técnicas para describir el efecto de las nuevas tiazolidinonas en la invasión y el crecimiento intracelular de *Toxoplasma gondii* en un modelo de infección *in vitro*. En este trabajo se han descrito técnicas fluorimétricas (GFP y cereza) y colorimétricas (B-Gal). Estos objetos técnicos tienen sus ventajas y desventajas. Por ejemplo, a pesar de que se usaron dos cepas RH (GFP y BetaGal) algunos resultados no correlacionan y esto puede ser debido que tienen sus modificaciones genéticas en diferentes partes; por ejemplo el parásito RH-GFP tiene la proteína fluorescente anclada a la proteína del citoesqueleto, y el RH-Beta Gal tiene la enzima anclada al antígeno de superficie. Los ensayos *in vitro* basados en células son un elemento crucial del proceso de descubrimiento de fármacos. En comparación con los modelos animales que requieren un alto costo, los ensayos que usan células cultivadas son simples, rápidos y rentables, así como versátiles y fácilmente reproducibles. La idea es describir el efecto de las moléculas mediante diferentes técnicas antes de pasar al modelo animal, pero en este trabajo se requiere estudios *in vivo* para validar las investigaciones farmacológicas *in vitro*. Por este motivo, se ha introducido una química combinatoria y biología computacional para diseñar nuevas moléculas, también una combinación de tecnologías de detección apropiadas, para aumentar la eficiencia del descubrimiento de fármacos contra este parásito protozoario.

Publicaciones recientes (Trotsko et al., 2019) (23) muestran el interés que existe en el estudio del núcleo tiazolidinona contra el parásito *Toxoplasma gondii* debido a los altos índices terapéuticos de estas moléculas. Tenório et al 2005 sintetizaron una serie de 164 tiosemicarbazonas, así como las 4-tiazolidinonas estructuralmente

relacionadas para determinar su actividad. Se descubrió que los compuestos tenían IC50 que oscilaban entre 80 y 500 μM según la microscopía de células huésped infectadas. En comparación, tanto la hidroxurea como la sulfadiazina tenían IC50 de 100 μM en este ensayo. Los autores no notaron ninguna alteración morfológica en las células Vero a la concentración de compuesto más alta de 30 mM. De todos los compuestos probados, las 4-tiazolidinonas con sustituyentes fenilo en la posición N-3 mostraron las IC50 más bajas. Con esto en mente, de Aquino et al en el 2008 hicieron un conjunto adicional de 4-tiazolidinonas con el grupo fenilo fijado en la posición N-3 y un conjunto de tiosemicarbazonas con el fenilo en la posición N-4 (4-ariltiazolidinonas). Los dos compuestos con la IC50 más baja, 2i y 2k, fueron 4-ariltiazolidinonas con IC50 de 50 μM contra taquizoitos intracelulares y 1 mM contra las células Vero del huésped. Nuestros resultados muestran resultados alentadores con IC50 de 0,2 μM .

Para los acoplamientos el programa Autodock Tool (103) fue usado para la preparación de los receptores y del ligando; dicha preparación consistió en: eliminación de cualquier tipo de ligando adicional cocrystalizado, adición de hidrogenos polares y adición de cargas para el caso de la proteína, para el ligando se adicionaron hidrogenos polares, cargas y se asignaron torsiones.

Posteriormente se usó el programa Autodock Vina ([Trott O, Olson AJ, 2011](#)) para la realización de los respectivos cálculos de acoplamiento molecular. En ambos casos se usó una estructura cristalográfica con análogos del sustrato natural en su sitio activo, la estructura con código PDB 4JRN para la proteína ROP18 (40) y la estructura con código 3KU2 para la proteína CDPK1 (104). Las cajas para los acoplamientos fueron centrados en el sitio de unión del sustrato natural y se usaron dimensiones para ambas cajas de 22 Angström. Cada acoplamiento fue realizado por triplicado.

Los resultados para el acoplamiento molecular de 2B en el sitio activo de la proteína TgROP18 presentó una puntuación para la energía libre de unión de -6.8 kCal/mol, mientras que para el sitio activo de la proteína TgCDPK1 fue de -7.4 kCal/mol, lo cual sugiere que de ocurrir dichas interacciones la más favorable sería la interacción

con el sitio activo de la proteína TgCDPK1, esto puede estar relacionado ya que el compuesto 2B estaría presentando una mayor cantidad de puentes de hidrogeno dentro del sitio activo de TgCDPK1, además al ser un sitio más compacto, gracias a la presencia de su dominio calmodulina, posiblemente haría que la cantidad de interacciones aumente. Los resultados de nuestros acoplamientos concuerdan con estudios previos los cuales sugieren que derivados tiazolidinona tendrían mayor preferencia por el sitio activo de la proteína TgCDPK1, además las interacciones del compuesto 2B con el sitio activo de TgROP18 son similares a las presentadas por otros compuestos tiazolidinonas, por ejemplo interacciones con los residuos Val266, Gly261, Phe263, Ala264, Asp427 y Leu416. Interacciones en el sitio activo de TgCDPK1 también fueron similares, tales como Leu181, Val65, Gly58, Lys59, Gly60, Lys80, Ile194, Leu57; para mayor descripción revisar nuestro estudio previo (9). Las interacciones bidimensionales del compuesto 2B se observan en figura 21, correspondiente a las interacciones presentes en la proteína TgROP18 y TgCDPK1 respectivamente.

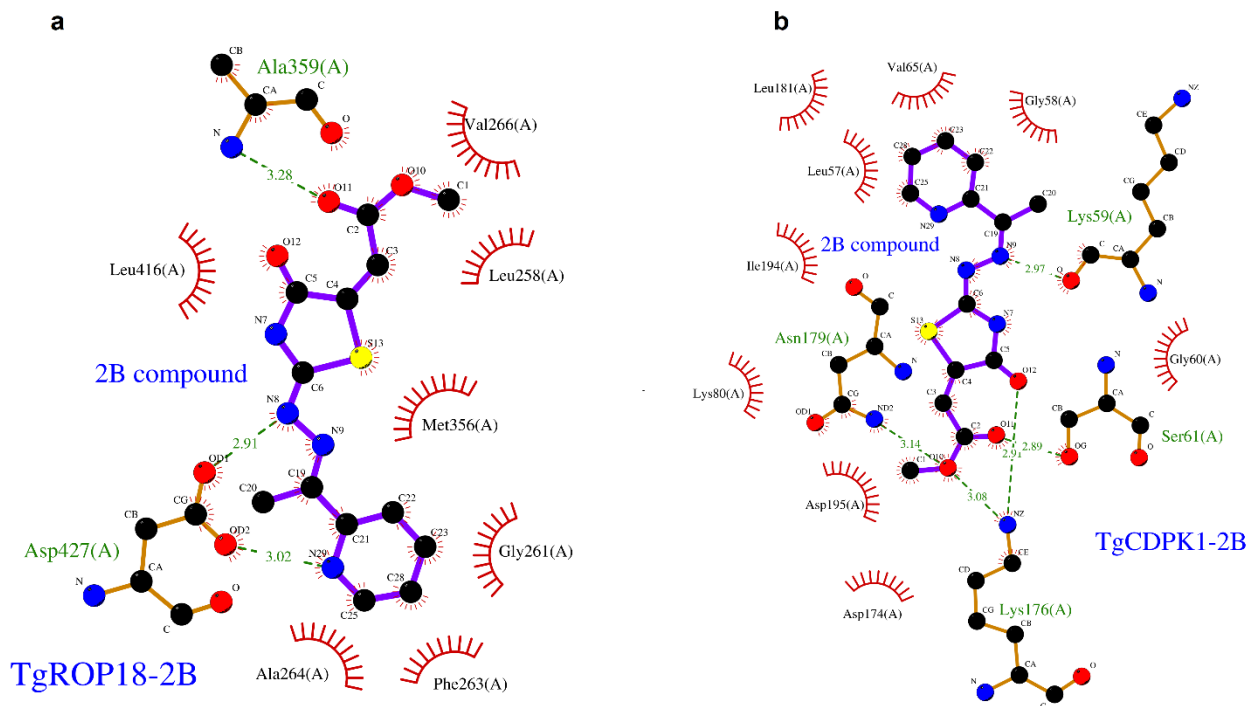


Figure 21. Los resultados para el acoplamiento molecular de 2B en el sitio activo de la proteína TgROP18 y el sitio activo de la proteína TgCDPK1, lo cual sugiere que de ocurrir dichas interacciones la más favorable sería la interacción con el sitio activo de la proteína TgCDPK1, esto puede estar relacionado ya que el compuesto 2B estaría presentando una mayor cantidad de puentes de hidrogeno dentro del sitio activo de TgCDPK1, además al ser un sitio más compacto, gracias a la presencia de su dominio calmodulina, posiblemente haría que la cantidad de interacciones aumente.

6 Conclusiones

- Se lograron sintetizar nuevas tiazolidinonas que fueron caracterizadas estructuralmente
- De acuerdo con la evaluación de morfología observada al microscopio y la prueba del azul de alamar (resazurina) para efecto citotóxico de las nuevas tiazolidinonas en las células HFF las moléculas 2B presentan un IC50 bajo y un índice terapéutico alto
- Se demostró que era posible identificar nuevas tiazolidinonas con efecto *in vitro* contra *T. gondii* utilizando herramientas *in silico*, las que aportan además aproximación sobre su mecanismo de acción.
- Los resultados de nuestros acoplamientos concuerdan con estudios previos los cuales sugieren que los derivados tiazolidinona tendrían mayor preferencia por el sitio activo de la proteína TgCDPK1, además las interacciones del compuesto 2B con el sitio activo de TgROP18 son similares a las presentadas por otros compuestos tiazolidinonas.

7 Perspectivas

La molécula que presentaron alto índice terapéutico (IT) 2B(1000)> 3B(188)> 1B(128), h(20) siendo la molecula 2B que mostró mayor índice de especificidad para el parásito en este modelo *in vitro*. A continuación, se presentan los pasos a seguir en la evaluación y optimización de la molécula 2B *in vitro* e *in vivo*.

Los agentes infecciosos intracelulares generalmente son más difíciles de alcanzar que las extracelulares y aunque pueden no ser resistentes a los tratamientos en el sentido convencional, resultan en fracasos frecuentes y opciones de tratamiento limitadas. A medida que entendamos mejor las infecciones intracelulares, debería ser posible desarrollar terapias mejor dirigidas. Hay una serie de nuevas tecnologías que ofrecen una promesa sobre los tratamientos convencionales, tales tecnologías aún enfrentan desafíos para ingresar a las células huésped. Quizás los avances más prometedores se encontrarán en el campo de las nanopartículas y la aplicación de polímeros catiónicos, donde varios estudios han demostrado que ambas plataformas pueden mejorar la eficacia antibacteriana contra las bacterias que residen dentro de las células huésped (Atbiaw et al , 2018).

La entrega del compuesto terapéutico al sitio deseable es un problema importante en el tratamiento de muchas enfermedades. La utilización convencional de medicamentos se caracteriza por una pobre biodistribución, eficacia limitada, efectos secundarios indeseables y falta de selectividad. La distribución de una molécula activa en el cuerpo es principalmente una función de sus propiedades fisicoquímicas. Un enfoque alternativo para la administración clásica de la terapia antibacteriana consiste en asociar el medicamento a un vehículo submicroscópico, ocultando y protegiendo así la molécula de la degradación y entregándola a las células blanco que son inaccesibles de manera controlada, esto se define como una 'bala mágica. Los liposomas y las nanopartículas son los principales portadores desarrollados para estas estrategias de focalización logística y son de naturaleza coloidal, biodegradables y de comportamiento similar a los patógenos intracelulares. La capacidad de los portadores circulantes para dirigirse a estas células depende

en gran medida de las características del tejido y de las propiedades del portador. Inmediatamente después de la inyección, las partículas extrañas son sometidas a opsonización por proteínas plasmáticas. De esta manera, los "portadores clásicos o convencionales" son reconocidos por el sistema fagocítico mononuclear. Los microorganismos patógenos a veces pueden sobrevivir y reproducirse después de haber sido ingeridos por las células fagocíticas, especialmente los macrófagos, que dificultan el tratamiento de estos tipos de infección. Las ubicaciones intracelulares de estos microorganismos los protegen del mecanismo de defensa del huésped y de la acción de los antibióticos, que pueden encontrar dificultades para penetrar las células fagocíticas. (Atbiaw et al , 2018)

Al cargar antibióticos en los portadores coloidales, liposomas y nanopartículas, se puede esperar una entrega mejorada a las células infectadas. El interés en los liposomas se dirige a su estructura vesicular limitada por una o más capas protectoras externas que consisten en lípidos dispuestos en una configuración de bicapas y sobre su capacidad de interactuar con las células vivas de una de cuatro maneras: adsorción, endocitosis, intercambio de lípidos y fusión. Previo a un análisis en ratones se podría también explorar la posibilidad de un vehículo para la molécula con mejor índice terapéutico

También se debe tener en cuenta que el primer análisis que se debe hacer en modelo animal es la dosis máxima tolerada (MTD), la dosis máxima factible (MFD), dosis límite (1000 mg / kg), la saturación de exposición y la dosis que proporcionan un margen de exposición de 50 veces. La más común de estas, la dosis máxima tolerada, se define como la dosis más alta de un medicamento que no causa efectos secundarios inaceptables o toxicidad manifiesta en un período de tiempo específico. Estos efectos secundarios pueden variar desde efectos leves, como un aumento de peso reducido, efectos moderados, como la pérdida de peso hasta un 20% o efectos sustanciales, como la falta de respuesta. La MTD puede determinarse mediante estudios de toxicidad aguda, estudios de escalada de dosis de corta duración y estudios de rango de dosis. Estos estudios están diseñados con un número mínimo de animales e incluyen criterios de valoración toxicológicos como observaciones

clínicas y patología clínica, por ejemplo, análisis de sangre para la función hepática. Esta dosis máxima tolerada se usa luego para evaluaciones de seguridad a más largo plazo. La razón para usar el MTD en estudios a largo plazo es maximizar la probabilidad de detectar cualquier efecto de enfermedad crónica u otros peligros de un candidato a fármaco. (106)(107) También es bioéticamente importante determinar la MTD antes de realizar cualquier estudio PK o ADME para minimizar la morbilidad animal. Los estudios de dosis máxima tolerada no están diseñados para causar mortalidad, por lo tanto, la muerte no es un punto final apropiado. En general, la determinación de la dosis máxima tolerada (MTD) se realiza de una manera que conserva el compuesto y minimiza el número de animales sacrificados. Por lo tanto, un solo ratón recibe una inyección única (IP, IV, SC, IM o PO) de 400 mg / kg (o menos si se anticipa que el compuesto es extremadamente potente, por ejemplo, productos naturales); un segundo ratón recibe una dosis de 200 mg / kg y un tercer ratón recibe una dosis única de 100 mg / kg. Los ratones se observan durante un período de 2 semanas. Se sacrifican si pierden más del 20% de su peso corporal o si hay otros signos de toxicidad significativa. Si se deben sacrificar los 3 ratones, se evalúan los siguientes 3 niveles de dosis: 50, 35 y 12.5 mg / kg y luego 12.5, 5.0 y 2.5 mg / kg de acuerdo con la concentración informada para toxoplasmosis previamente (106)(107). Este proceso se repite hasta que se encuentre una dosis tolerada. Esta dosis se denomina MTD y se usa para calcular la cantidad de material administrado a los ratones durante las pruebas. A los ratones se les permite alimento y agua *ad libitum*. Las inyecciones se administran con mayor frecuencia por IP, pero ocasionalmente se pueden requerir dosis de SC, PO y IV. Los volúmenes de dosis son generalmente de 0,1 mL / 10 gramos de peso corporal, pero pueden ser de hasta 0,2 mL / 10 gramos de peso corporal para las rutas IP, IV, SC y PO. El vehículo estándar utilizado para las pruebas de toxicidad aguda es DMSO al 10% en solución salina / Tween 80 al 0.05%.

Existen ensayos *in vitro* bien establecidos y modelos animales para el desarrollo de fármacos anti-*Toxoplasma gondii* preclínico, pero no existe una cascada de pruebas estándar. Muy a menudo, los compuestos anti-*Toxoplasma* se evalúan inicialmente *in vitro* en ensayos de replicación de taquizoitos. Los ensayos comunes usan *T.*

gondii que expresa β -galactosidasa o proteínas fluorescentes, o formación de placa o absorción de uracilo [3H] en *T. gondii* no transgénico. *T. gondii* requiere una célula huésped para replicarse; por lo tanto, también es importante evaluar los efectos de los compuestos sobre la viabilidad de las células huésped mientras se evalúa el grado de inhibición del compuesto. Aunque los ensayos de inhibición de *T. gondii* se pueden realizar en diferentes cepas de *T. gondii*, las tasas de replicación varían entre diferentes cepas, y la cepa RH tipo I a menudo se usa inicialmente porque está bien adaptada al cultivo *in vitro* y se replica de manera relativamente rápida y confiable. La cepa RH suele ser mortal en ratones dentro de los 10 días, proporcionando un modelo que refleja una infección fulminante y diseminada que no está controlada por el sistema inmunitario del huésped. Esta cepa es útil para evaluar la infección aguda; sin embargo, este modelo no evalúa la actividad contra los quistes de tejido cerebral, y las cepas de tipo I no son la cepa dominante en la mayoría de las áreas del mundo. Las cepas de tipo II son más prominentes en América del Norte y Europa, son menos virulentas en ratones y establecen quistes de tejido en el cerebro del ratón. La susceptibilidad a la infección con cepas de tipo II difiere entre las cepas de ratón y se desconoce el grado en que los quistes de tejido en el cerebro del ratón se asemejan a la infección humana latente por *T. gondii*. Experimentos recientes han indicado que la replicación de los bradizoítos se producen dentro de los quistes de tejido cerebral establecidos hasta 8 semanas después de la infección, lo que pone en duda la presunción de que la infección latente de bradizoíto está latente metabólica (108,109). El uso de cepas que producen infección crónica en el ratón permiten demostrar la reducción de quistes cerebrales por compuestos experimentales (110,111). Además de los modelos de infección murina aguda y latente, se han evaluado modelos de toxoplasmosis congénita y ocular, así como otras especies animales, pero la mayoría de los compuestos experimentales se prueban inicialmente en modelos en donde los ratones se infectan por vía oral o por inyección intraperitoneal, y la carga del parásito en los tejidos o la supervivencia se mide como resultado.

Las pruebas futuras de compuestos preclínicos contra cepas de *T. gondii* genéticamente diversas y no arquetípicas, tanto *in vitro* como *in vivo*, deberían ser

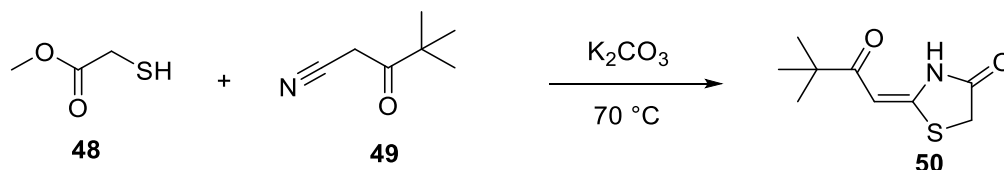
reveladoras porque la virulencia y la patogénesis varían entre las cepas. Las cepas de parásitos recientemente caracterizadas, como la cepa EGS que forma quistes de paredes gruesas espontáneamente en cultivo de tejidos, permite el estudio de inhibidores contra quistes *in vitro*. (112) Además, esta cepa se ha modificado genéticamente para expresar fluorescencia específica del estadio para caracterizar aún más la actividad contra los bradizoítos y los quistes de tejido (112). Más allá de las mejoras en las pruebas en cascada, es probable que los nuevos métodos de identificación de objetivos contribuyan al descubrimiento de fármacos. La investigación futura de objetivos farmacológicos en *Toxoplasma* ha sido avanzada recientemente por un cribado de todo el genoma usando CRISPR / Cas9 para identificar genes esenciales (Das C Hansen KC y Tyler JK, 2017). Usando los datos fenotípicos de este cribado, que está disponible a través de www.toxodb.org, los investigadores pueden investigar proteínas que confieren aptitud para potenciales objetivos farmacológicos (26). Es difícil identificar con precisión el mecanismo de acción de un compuesto dado a través del organismo, especialmente en casos donde se reportan múltiples blancos farmacéuticos para el mismo compuesto, las moléculas que presentan índices terapéuticos altos mostraron energías de afinidad bajas al sitio activo de las proteínas de *T. gondii*. Nuestros resultados sugieren que puede haber una relación de la estructura y la afinidad por las proteínas del parásito.

8 Anexos

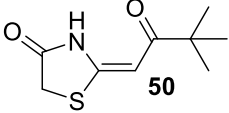
ANEXO 1: Química

SÍNTESIS DE PRECURSOR 2-(3,3-DIMETIL-2-OXOBUTILIDEN)-4-TIAZOLIDINONA 50. Procedimiento general para la síntesis de 2-(3,3-dimetil-2-oxobutiliden)-4-tiazolidinona 50.

Características principales del compuesto 50.



Esquema 1. Síntesis del precursor 50 2-(3,3-dimetil-2-oxobutiliden)-4-tiazolidinona.

Compuesto 50	P.M. (g/mol)	Rend. (%)	Punto de fusión ($^\circ\text{C}$)
	199,07	98	182-184

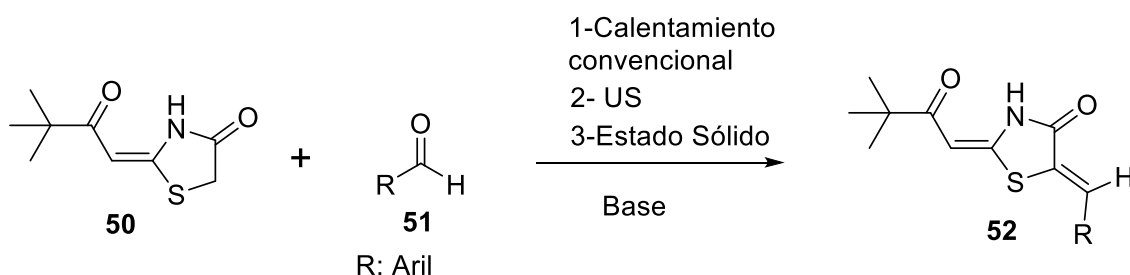
Se planteó una ruta sintética para la formación de la nueva 2-(3,3-dimetil-2-oxobutiliden)-4-tiazolidinona 50, esquema 15, mediante una ciclocondensación entre el tioglicato de metilo 48, y 4,4-dimetil-4-oxopentanitrilo 49 en presencia de carbonato de potasio y calentamiento a $70\text{ }^\circ\text{C}$ durante 10 minutos, la reacción fue monitoreada por CCF, el sólido formado se filtró y se lavó con agua

Para corroborar la formación del precursor 50, se realizó la caracterización teniendo en cuenta el punto de fusión, el espectro infrarrojo (IR), espectrometría de masas por IE (impacto de electrones), RMN ^1H , ^{13}C y HSQC. En el espectro de IR del compuesto 50, se puede evidenciar las bandas correspondientes al estiramiento de tensión simétrica y asimétrica del enlace C-H entre 2958 y 2867 cm^{-1} correspondiente al grupo t-butilo y metileno. También se observa un estiramiento C=O a 1737 cm^{-1} procedente de la cetona. Se observa una banda de absorción del C=C a 1623 cm^{-1} perteneciente al alqueno y la absorción correspondiente al enlace

=C-H se observa a 3091 cm⁻¹, además se ve una banda ancha correspondiente a la vibración de tensión fuerte del enlace N-H en 3215 cm⁻¹ y una absorción fuerte del enlace C=O a 1712 cm⁻¹ correspondiente al grupo amida presente en el anillo tiazolidínico, una banda intensa a 1502 cm⁻¹ correspondiente a la vibración C-N y una banda de tensión del enlace C-O a 1108 cm⁻¹.

SÍNTESIS DE DERIVADOS 5-ARILIDEN-4-TIAZOLIDINONA.

Una vez obtenido el precursor 50, se continuo con la obtención de los derivados 5-ariliden-4-tiazolidinona 52 mediante una condensación tipo Knoevenagel, a continuación se describirán tres metodologías de síntesis, esquema 2,



Esquema2. Metodologías sintéticas implementadas en la obtención de nuevas 5-(ariliden)-2-(3,3-dimetil-2-oxobutiliden)-4-tiazolidinona.

OPTIMIZACIÓN EN LAS CONDICIONES DE REACCIÓN PARA OBTENER EL COMPUESTO 52.

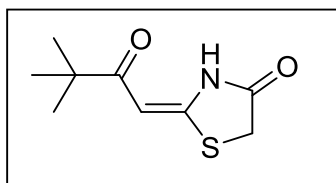
En esta sección se describirán las tres metodologías planteadas para la obtención de 5-(ariliden)-2-(3,3-dimetil-2-oxobutiliden)-4-tiazolidinona 52.

Síntesis comparativa de compuestos 52 utilizando Calentamiento convencional Vs Ultrasonido Vs Estado sólido.

Para la síntesis vía calentamiento convencional (Metodología A) y ultrasonido (Metodología B) de la molécula 52 se implementó la metodología desarrollada por Rosanna Maccari y colaboradores(114), en la cual el carbono metileno activo de 50 realiza una adición nucleofílica sobre un carbonilo (Aldehído aromático) 51 en presencia de diferentes bases. Las reacciones fueron monitoreadas con CCF en la cual se evidencio la formación de un producto crudo, al cual se le hace un

tratamiento con HCl 10% ó agua para neutralizar la base y luego lavarlo con agua destilada fría ya que de esta forma se puede colectar un producto puro con unos altos rendimientos en la reacción. Y para la síntesis vía estado sólido (Metodología C) se implementó la metodología de Shah y colaboradores(115).

La síntesis de 2-(3,3-dimetil-2-oxobutiliden)-4-tiazolidinona se realizó siguiendo el protocolo de Anton y colaboradores(Tverdokhlebov et al , 2004). Se tomó 1 mmol de 4,4-dimetil-4-oxopentanitrilo y 1,2 mmol de tioglicato de metilo en presencia de 5 mmol de K₂CO₃ a fusión 70°C, en agitación constante un tiempo de reacción de 10 minutos, para obtener así el producto 50 el cual fue tratado con lavados de agua para luego ser filtrado y colectado.



Síntesis de 2-(3,3-dimetil-2-oxobutiliden)-4-tiazolidinona 50. Solido beige, rend 98 %; p.f. 182,5-184,5 °C. FTIR (ATR) ν (cm⁻¹): 3215 (N-H), 2958-2887 (C-H, CH₂/CH₃), 1737 (C=O_{cetona}), 1712 (C=O_{amida}) 3091 (=C-H), 1623 (C=C). 1502 (C-N), 1108 (C-O).RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) 1,06 ppm (s, 9H, H-9), 3,71 ppm (s, 2H, H-5), 6,26 ppm (s, 1H, H-6), 11,58 ppm (s, 1H, H-3); RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) 27,31 (C-9), 32,58 (C-5), 42,17 (C-8), 94,18 (C-6), 160,74 (C-2), 175,13 (C-4), 202,87 C-7). MS (70 eV, EI) m/z (%):199 (18), 142 (100, M+), 114 (28), 86 (8), 68 (18).

Procedimiento general para la síntesis de 5-(ariliden)-2-(3,3-dimetil-2-oxobutiliden)-4-tiazolidinona 52a-l.

Metodología A

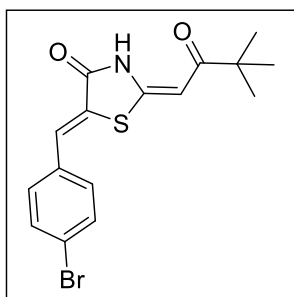
Para la síntesis de la molécula 52 se implementó la metodología desarrollada por Rosanna Maccari y colaboradores (117), en la cual se hace reaccionar 1 mmol del precursor 50 realiza una adición nucleofílica sobre un carbonilo (1 mmol) (Aldehído aromático) 51 en presencia de piperidina/EtOH (3 gotas/ 10 mL) en calentamiento a reflujo con agitación constante y tiempos de reacción hasta de 24 horas. La reacción fue monitoreada con CCF, en la cual se evidencio la formación de un producto crudo, al cual se le hace un tratamiento con HCl 10% para neutralizar la base y luego lavarlo con agua destilada fría ya que de esta forma se puede colectar un producto puro con un altos rendimientos en la reacción, para luego ser caracterizado mediante diferentes técnica instrumentales.

Metodología B

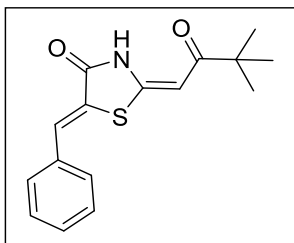
La síntesis de 5-(ariliden)-2-(3,3-dimetil-2-oxobutiliden)-4-tiazolidinona 52a-l se realizó siguiendo la metodología de Maccari y colaboradores(117). Donde se tomó 1mmol de 2-(3,3-dimetil-2-oxobutiliden)-4-tiazolidinona 50, 1mmol de aldehído correspondiente 51a-l, 2 gotas de piperidina en 5 mL de etanol, sometiendo la reacción a ultrasonido por 10 minutos. Luego se neutralizo con HCl 10% para neutralizar la base y luego lavar el producto obtenido 52a-l con agua destilada fría para luego colectarlo y caracterizarlo.

Metodología C

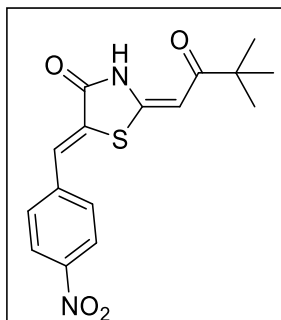
A continuación se muestra la síntesis de la molécula objetivo 52. Reportada por Shah y colaboradores(115). Se hizo reaccionar 1 mmol la 4-tiazolidinona 50 con diferentes aldehídos (1 mmol) mediante una condensación tipo Knoevenagel en presencia de una base como la Urea 10% mol en baño de glicerina a 120°C, los tiempos de reacción son de máximo 30 minutos, el producto crudo fue lavado con agua fría para luego ser colectado y caracterizado mediante técnicas espectroscópicas.



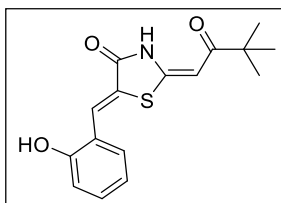
5-(4-bromobenziliden)-2-(3,3-dimtil-2-oxobutiliden)tiazolidin-4-ona 52a. Solido Amarillo, rend 88 %: p.f.= 229-231 °C. FTIR (ATR) ν (cm^{-1}): 3143 (NH), 3043 (=C-H), 2962-2863 (C-H), 1691 (C=O_{cetona}), 1643 (C=O_{amida}), 1600 (C=C), 655 (C-Br), 687 (C-S). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) 1,13 ppm (s, 9H, H-9), 6,43 ppm (s, 1H, H-6), 7,57 ppm (s, 1H, H-10) 7,63 ppm (dd, 2H, J=8,39 Hz, H-12), 7,79 (dd, 2H, J=8,39 Hz, H-13), 12,25 ppm (s, 1H, H-3), RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) 27,07 (C-9), 42,59 (C-8), 95,11 (C-6), 123,62 (C-5), 125,99 (C-11), 129,56 (C-10), 132,32 (C-12), 132,75 (C-13) 133,50 (C-14), 152,49 (C-2), 167,32 (C-4), 203,70 (C-7). MS (70 eV, EI) m/z (%): 367(24), 308 (100, M+), 215 (10), 162 (15), 134 (35).



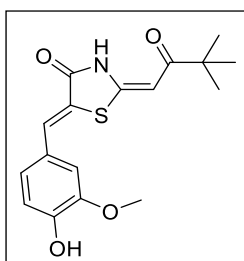
5-(benzlliden)-2-(3,3-dimetil-2-oxobutliden)tiazolidin-4-ona 52b. Solido Amarillo, rend 84 %; p.f.= 205,9-207,5 °C. FTIR (ATR) ν (cm^{-1}): 3355 (NH), 3151 (=C-H)_{aromático}, 3048 (=C-H)_{alqueno}, 2963-2866 (C-H), 1688 (C=O_{cetona}), 1645 (C=O_{amida}) 1601 (C=C), 636 (C-S). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃-d) 1,23 ppm (s, 9H, H-9), 5,95 ppm (s, 1H, H-6), 6,47 ppm (s, 1H, H-10), 7,51 ppm (t, 1H, H-14), 7,70 ppm (d, 2H, H-12), 7,77 ppm (t, 2H, H-13), 12,13 ppm (s, 1H, H-3). RMN ¹³C (100 MHz, CDCl₃-d) 26,94 (C-9), 42,93 (C-9), 94,69 (C-6), 95,52 (C-10), 123,73 (C-11), 130,67 (C-12), 131,46 (C-13), 152,08 (C-2), 204,48 (C-7). MS (70 eV, EI) m/z (%): 287 (16), 230 (100, M+), 163 (5), 135 (35), 91 (26), 68 (34).



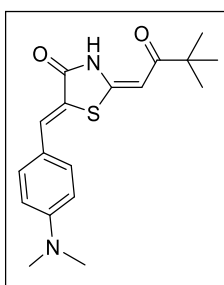
5-(4-nitrobenzylidene)-2-(3,3-dimetil-2-oxobutiliden)-thiazolidin-4-ona 52c. Solido Amarillo, rend 98 %; p.f.=249,3-251,0 °C. FTIR (ATR) ν (cm^{-1}): 3429 (NH), 3183 (=C-H)_{Aromático}, 3141 (=C-H)_{Alqueno}, 2967-2870 (C-H), 1719 (C=O)_{Cetona}, 1648 (C=O)_{Amida}, 1610 (C=C), 1510 (NO₂), 683 (C-S). RMN ¹H (400 MHz, CDCl₃-d) 1,24 ppm (s, 9H, H-9), 6,00 ppm (s, 1H, H-6), 6,44 ppm (s, 1H, H-10), 7,78 ppm (d, 2H, H-13), 8,33 ppm (s, 2H, H-12), 11,85 ppm (s, 1H, H-3). MS (70 eV, EI) m/z (%): 332 (15), 319 (10), 275 (100, M+), 229 (7), 180 (12), 68 (22).



2-(3,3-dimetil-2-oxobutiliden)-5-(2-hidroxi-benziliden)thiazolidin-4-ona. 52d. Solido Amarillo, rend 91 %, p.f. =189-191 °C. FTIR (ATR) ν (cm^{-1}): 3400-3200 (NH), 3400-3200 (OH), 3156 (=C-H)_{Aromático}, 3075 (=C-H), 2961-2886 (CH), 1702 (C=O)_{Cetona}, 1637 (C=O)_{Amida}, 1590 (C=C), 1090 (C-O), 687 (C-S). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) 1,12 ppm (s, 9H, H-9), 6,40 ppm (s, 1H, H-6), 6,99 ppm (d, 1H, H-13), 7,03 ppm (d, 1H, H-15), 7,33 (t, 1H, H-14), 7,53 ppm (d, 1H, H-16), 7,89 ppm (s, 1H, H-10), 10,40 ppm (s, 1H, OH-12) 12,13 ppm (s, 1H, H-3). 303 (28), 246 (100, M+), 179 (52).

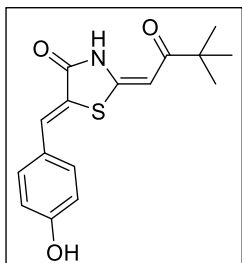


2-(3,3-dimetil-2-oxobutiliden)-5-(4-hidroxi-3-metoxibenziliden)thiazolidin-4-ona 52e. Solido Amarillo, rend 84 %, p.f.= 237,9-239,5 °C. FTIR (ATR) ν (cm^{-1}): 3500-3200 (NH), 3500-3200 (OH), 3177 (=C-H)_{Aromático}, 3006 (=C-H)_{Alqueno}, 2967-2867 (C-H), 1699 (C=O)_{Cetona}, 1646 (C=O)_{Amida}, 1604 (C=C), 1087 (C-O), 687 (C-S). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) 1,13 ppm (s, 9H, H-9), 3,86 ppm (s, 3H, H-17), 6,39 ppm (s, 1H, H-6), 7,00 ppm (d, 1H, H-16), 7,18 ppm (dd, 1H, H-15), 7,26 ppm (d, 1H, H-12), 7,53 ppm (s, 1H, H-15), 9,86 ppm (s, 1H, OH-14), 12,06 ppm (s, 1H, H-3). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) 27,19 (C-9), 42,48 (C-8), 56,24 (C-17), 94,35 (C-6), 115,22 (C-16), 116,66 (C-15), 120,77 (C-5), 124,33 (C-12), 125,23 (C-11), 131,89 (C-10), 148,42 (C-13), 149,42 (C-14), 153,32 (C-2), 167,72 (C-4), 203,32 (C-7). MS (70 eV, EI) m/z (%): 333 (46), 276 (100, M+), 180 (18).

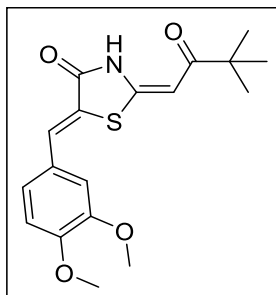


2-(3,3-dimetil-2-oxobutiliden)-5-(4-(dimetilamino)benziliden)thiazolidin-4-ona 52f. Solido Naranja, rend 98 %, p.f.=245,4-247,1 °C. FTIR (ATR) ν (cm^{-1}): 3500-3200 (NH) 3056 (=C-H)_{Aromático}, 3004 (=C-H)_{Alqueno}, 2962-2821 (C-H), 1688 (C=O)_{Cetona}, 1626 (C=O)_{Amida}, 1472 (C=C), 1015 (C-N), 688 (C-S). RMN ¹H (400 MHz, DMSO-d₆) 1,13 ppm (s, 9H, H-9), 3,04 ppm (s, 6H, H-16), 6,36 ppm (s, 1H, H-6), 6,88 ppm (d, 2H, H-13), 7,49 ppm (s, 1H, H-10), 7,53 ppm (s, 2H, H-12), 11,97 ppm (s, 1H, H-3). RMN ¹³C (100 MHz, DMSO-d₆) 27,26 (C-9), 40,11 (C-16), 42,39 (C-8), 93,74 (C-6), 112,55 (C-13), 117,52 (C-11), 121,25 (C-5), 132,25 (C-10), 132,57 (C-12), 151,55 (C-14), 153,37 (C-2), 167,92 (C-

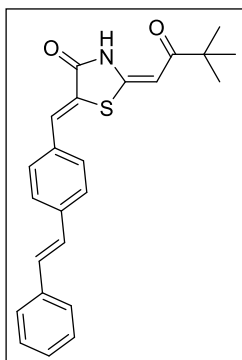
4), 203,37 (C-7). MS (70 eV, EI) m/z (%): 330 (80), 273 (100, M+), 177 (90), 145 (15).



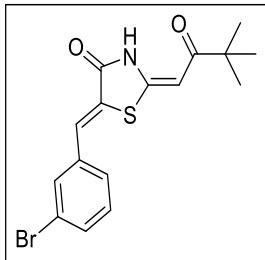
2-(3,3-dimetil-2-oxobutiliden)-5-(4-hidroxibenziliden)thiazolidin-4-ona 52g. Solido Amarillo, rend 91, p.f. = 286,2-287,6 °C. FTIR (ATR) ν (cm^{-1}): 3500-3200 (NH), 3400-3200 (OH), ($=\text{C-H}$)_{Aromático}, ($=\text{C-H}$), -2850 (CH), 1685 (C=O)_{Cetona}, 1623 (C=O)_{Amida}, 1587 (C=C), 1029 (C-O), 692 (C-S). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) 1,13 ppm (s, 9H, H-9), 6,39 ppm (s, 1H, H-6), 6,97 ppm (d, 2H, H-13), 7,51 ppm (s, 1H, H-10), 7,55 ppm (d, 2H, H-12), 10,24 ppm (s, 1H, H-10), 12,04 ppm (s, 1H, H-3). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) 27,17 (C-9), 42,47 (C-8), 94,31 (C-6), 116,75 (C-13), 120,53 (C-5), 125,23 (C-11), 131,54 (C-10), 132,81 (C-12), 153,37 (C-2), 159,83 (C-14), 167,78 (C-4), 203,37 (C-7). MS (70 eV, EI) m/z (%): 303 (30), 246 (100, M+). 179 (52).



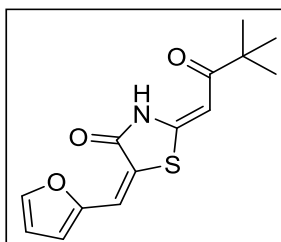
5-(3,4-dimetoxibenzilideno)-2-(3,3-dimetil-2-oxobutilideno)thiazolidin-4-ona 52h. Solido Amarillo, rend 85, p.f.=151,1-152,7 °C. FTIR (ATR) ν (cm^{-1}): 3511 (NH), 3100 ($=\text{C-H}$), 2953-2835 (CH), 1673 (C=O)_{Cetona}, 1641 (C=O)_{Amida}, 1585 (C=C), 688 (C-S). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) 1,13 ppm (s, 9H, H-9), 3,85 ppm (s, 6H, OCH₃), 6,41 ppm (s, 1H, H-6), 7,19 ppm (d, 1H, J=8,98 Hz, H-15), 7,26 ppm (dd, 1H, H-16), 7,27 ppm (m, 1H, J=1,76 Hz, H-12), 7,56 ppm (s, 1H, H-10), 12,11 ppm (s, 1H, H-3). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) 27,15 (C-9), 42,53 (C-8), 56,13 (C-17), 56,19 (C-18), 94,57 (C-6), 112,64 (C-15), 114,32 (C-12), 123,93 (C-16), 127,01 (C-11), 131,45 (C-10), 136,42 (C-5), 149,40 (C-13), 150,86 (C-2), 153,10 (C-14), 167,60 (C-4), 203,42 (C-7). MS (70 eV, EI) m/z (%): 347 (34), 290 (100, M+), 195 (15).



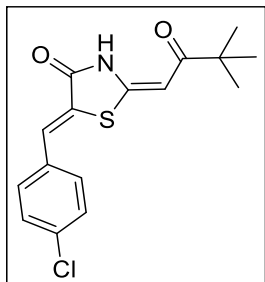
2-(3,3-dimetil-2-oxobutilideno)-5-(4-((E)-stiril)benzilideno)thiazolidin-4-ona 52i. Solido Amarillo, rend 98, p.f.= 250,3-252,2 °C. FTIR (ATR) ν (cm^{-1}): 3185 (NH), 3022 ($=\text{C-H}$), 2961-2886 (CH), 1710 (C=O)_{Cetona}, 1629 (C=O)_{Amida}, 1587 (C=C), 690 (C-S). RMN ^1H (400 MHz, DMSO- d_6) 1,14 ppm (s, 9H, H-9), 6,44 ppm (s, 1H, H-6), 7,36 ppm (m, 2H, H-15), 7,36 ppm (m, 2H, H-16), 7,44 ppm (m, 3H, H-18), 7,44 ppm (m, 3H, H-19), 7,50 ppm (s, 1H, H-10), 7,69 ppm (m, 4H, H-13), 7,69 ppm (m, 4H, H-17), 7,82 ppm (d, 2H, H-12), 12,22 ppm (s, 1H, H-3). MS (70 eV, EI) m/z (%): 389 (32), 332 (100, M+).



-5-(3-bromobenzilideno)-2-(3,3-dimetil-2-oxobutilideno)thiazolidin-4-ona 52j. Solido Amarillo, rend 82, p.f.=197,1-197,7 °C. FTIR (ATR) ν (cm^{-1}): 3421 (NH), 3142 ($=\text{C-H}$)_{Aromático}, 3069 ($=\text{C-H}$)_{Alqueno}, 2963-2865 (CH), 1691 (C=O)_{cetona}, 1650 (C=O)_{Amida}, 1604 (C=C), 676 (C-S). MS (70 eV, EI) m/z (%): 367 (20), 310 (100, M+), 215 (10), 162 (10), 134 (30), 89 (25), 68 (45).



2-(3,3-dimetil-2-oxobutilideno)-5-(furan-2-ilmetileno)thiazolidin-4-ona 52k. Solido Café, rend 91, p.f.=199,3-201,1 °C. FTIR (ATR) ν (cm^{-1}): 3142 (NH), 3046 ($=\text{C-H}$), 2966-2850 (CH), 1689 (C=O)_{cetona}, 1644 (C=O)_{amida}, 1611 (C=C), 1099 (C-O), 688 (C-S). MS (70 eV, EI) m/z (%): 277 (23), 220 (100, M+), 125 (22), 97 (13), 68 (18)



5-(4-clorobenzilideno)-2-(3,3-dimetil-2-oxobutilideno)thiazolidin-4-ona 52l. Solido Amarillo, rend 87, p.f.= 234,7237.9 °C. FTIR (ATR) ν (cm^{-1}): 3175 (NH), 3090 ($=\text{C-H}$), 2963-2866 (CH), 1696 (C=O)_{cetona}, 1655 (C=O)_{amida}, 1605 (C=C), 683 (C-S). MS (70 eV, EI) m/z (%): 321(18), 264 (100, M+), 169 (15), 134 (12), 89 (10), 68 (25).

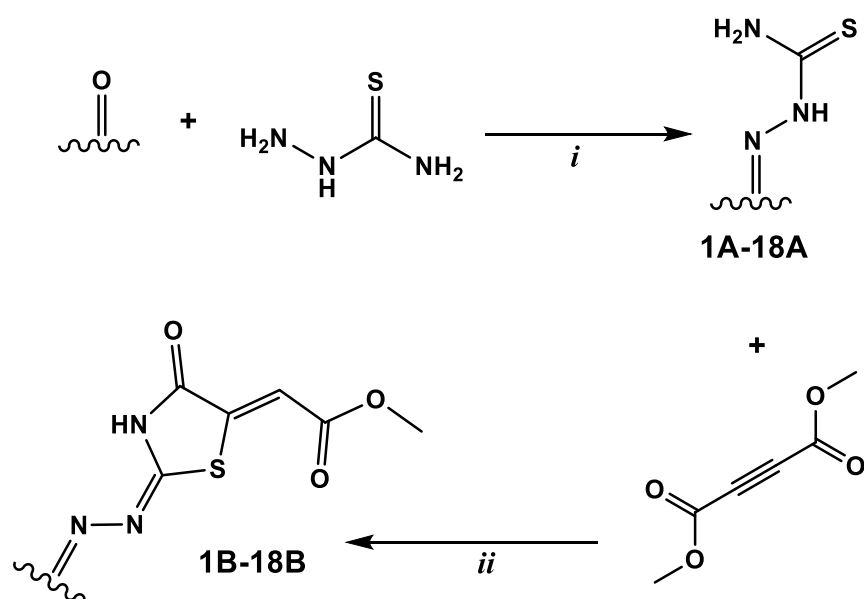
Metodología implementada para la cristalización de las moléculas 52 g, 52a, 52e y 52 l.

Las moléculas 52g, 52a, 52e y 52l fueron cristalizadas realizando el siguiente procedimiento: El producto puro colectado se puso en agitación y calentamiento a ebullición utilizando 20 mL de etanol, luego la solución resultante se deja en reposo con evaporación lenta del solvente, pasado un tiempo se observa la formación de cristales

SÍNTESIS DE COMPUESTOS 2-HIDRAZONO-4-TIAZOLIDINONA. PROCESO GENERAL

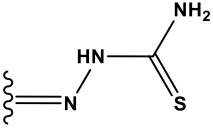
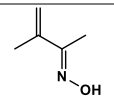
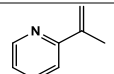
Se preparó una solución de 1mmol de 2-hidrazona obtenida 3 y 1mmol de DMAD 4 (Dimetil acetilendicarboxilato) en 2 mL de MeOH. Se sometió a agitación constante a 500 rpm a temperatura ambiente (24°C) entre 1 y 2 horas. La reacción se controló mediante cromatografía de capa delgada. Se filtró y se lavó con agua fría las 2-hidrazono-4-tiazolidinonas obtenidas 5.

Esquema 3. Ruta sintética de compuestos 2-hidrazono-4-tiazolidinonas. Como se describe en el esquema 3 para la síntesis de los compuestos **1A-18A** y **1B-18B**, se disolvieron diferentes compuestos carbonilos (**1**) (1mmol) en 1 mL de etanol y se reaccionaron con tiosemicarbazida (**2**) (1.1 mmol) en presencia de radiación por microondas en intervalos de 30 segundos a una potencia de 40 W. La solución se filtró y el sólido obtenido se lavó con agua-hielo. Las hidrazonas (**3**) intermediarias obtenidas se hicieron reaccionar con 1mmol de DMAD (Dimetil acetilendicarboxilato) en 2 mL de metanol a temperatura ambiente y agitación constante a 500 rpm para obtener los derivados 2-hidrazono-4-tiazolidinonas (**1B-18B**) con altos porcentajes de rendimiento. Todos los compuestos se lavaron con agua-hielo, se secaron a temperatura ambiente (25°C) y se caracterizaron por métodos espectroscópicos.



Esquema 3. Síntesis general de los derivados 1A-18A y 1B-18B. Reactivos y condiciones: (i) EtOH, microondas a 40 W de potencia; (ii) MeOH, agitando a 500 rpm y temperatura ambiente.

Tabla 1.

Compound		Tiempo de reacción	punto de fusión (°C)	peso molecular (g/mol)	rendimiento (%)	color
1A		8'	227-229	174,22	70,0	blanco
2A		12'	218-220	194,26	88,9	blanco


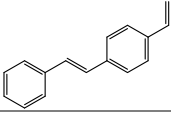


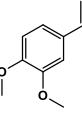
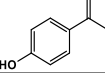
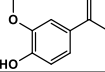


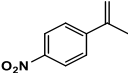

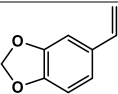



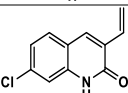
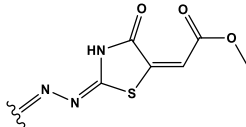
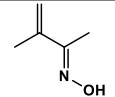
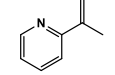
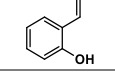
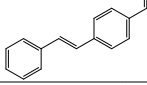
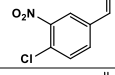
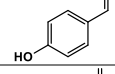
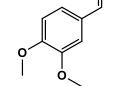
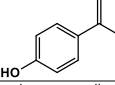
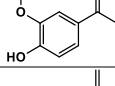
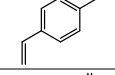
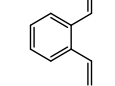
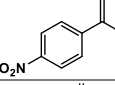
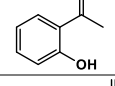
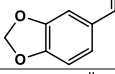
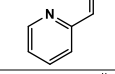
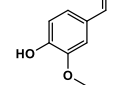
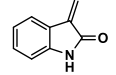
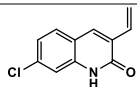
3A		17'	210-212	194,05	86,6	amarillo
4A		16'	229-231	195,24	80,9	amarillo
5A		30'	252-254	281,38	83,3	blanco
6A		5' 2"	223-225	258,68	82,2	blanco
7A		4'	193-195	195,24	88,6	blanco
8A		12'	198-199	239,29	72,0	blanco
9A		20'	189-191	209,27	86,2	Beige
10A		5'	182-184	239,29	96,4	Beige
11A		7'	179-180	280,37	81,4	gris
12A		11'	230-232	280,37	82,5	amarillo
13A		13'	178-180	224,24	66,6	verde
14A		3'	188-190	209,27	92,9	blanco
15A		2'	195-197	223,25	65,8	Salmon
16A		2'30"	189-191	225,27	87,3	blanco
17A		9'	254-256	220,25	75,4	amarillo
18A		17'	267-269	280,73	97,3	amarillo

Tabla 2.

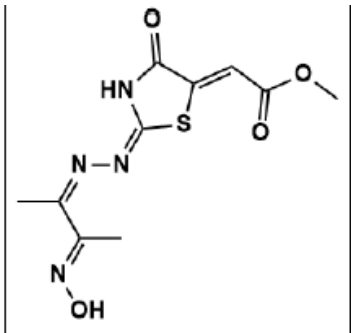
Compound		Reaction time	Melting points (°C)	M. weight (g/mol)	Yield (%)	Color
1B		2h-40'	258-260	284,29	91.4	Beige
2B		1H-13'	254-256	304,32	91.3	amarillo
3B		2H-30'	296-298	305,31	91.5	amarillo
4B		2H-35'	295-297	391,44	90.7	naranja
5B		10H-30'	278-280	368,75	78.9	Beige
6B		2H-45'	289-291	305,31	88.8	Orange
7B		2H	288-289,7	349,36	95.2	amarillo
8B		1H-10'	265-267	319,34	94.3	amarillo
9B		1H	229-231	349,36	88.1	naranja
10B		1H-35'	238-240	500,51	92.8	amarillo
11B		1H-43'	221-223	500,51	95.5	café
12B		1H-20'	284-286	343,33	86.6	amarillo
13B		1H-45'	230-232	319,34	90.5	amarillo
14B		1H-25'	299-300	333,32	92.5	gris
15B		2H-20'	280-282	290,3	77.4	Beige
16B		2H-15'	295-296	335,34	76.4	amarillo
17B		1H-30'	290-291	330,32	87	naranja



Protocolo experimental

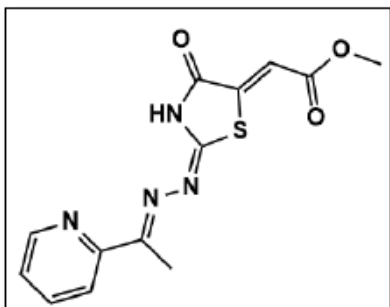
Los reactivos tiosemicarbazida, aldehídos y cetonas se adquirieron de las compañías Merck.KGaA, 64271 Darmstadt, EDM Millipore Corporation (Germany) y Alfa Aesar, 30 Bond Street, Ward Hill. Para la síntesis de los compuestos 2-hidrazono-4-tiazolidinonas se utilizaron equipos como un Horno Microondas LG modelo No. MH-1449C/00 de 1350 W, plancha de agitación y calentamiento Thermo Scientific Cimarec Digital 7x7, modelo No. SP88857100. Los espectros infrarrojos se registraron utilizando un espectrómetro FT-IR Thermo Scientific Nicolet 380. Los espectros de masas se realizaron en un cromatógrafo de gases acoplado a masas (Shimadzu GCMS-QP2010 Ultra) y los puntos de fusión se determinaron en un Fusiómetro digital Electrothermal IA-9100. Los análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) se realizaron en un equipo Bruker Avance 400 utilizando DMSO-*d*₆ como disolvente. Los cambios químicos se expresan como partes por millón (ppm). Las constantes de acoplamiento *J* se presentan en Herz (Hz). Todas las reacciones se controlaron mediante TLC realizada en placas de sílica gel 60 F₂₅₄

CARACTERIZACIÓN DE 2-HIDRAZONO-4-TIAZOLIDINONAS



2-((2-((3-(hidroxiimino) butan-2-ilideno) hidrazono) -4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato de metilo. (1B)

Sólido beige, rend 91.4 %; p.f 258-260°C. FTIR (ATR) ν (cm⁻¹):3400-2800 (OH), 1617 (C=N), 1699 (C=OAmida), 3427 (NH), 1727 (C=Oester), 2958-1437 (-CH₃). RMN 1H (DMSO-*d*₆) 12.91 ppm (s, 1H, H-3), 6.67 ppm (s, 1H, H-11), 3.79 ppm (s, 3H, H-14), 2.21 ppm (s, 3H, H-15), 2.04 ppm (s, 3H, H-16), 11.87 ppm (s, 1H, H-18). RMN 13C (100 MHz, DMSO-*d*₆) 9.73 (C-16), 13.51(C-15), 52.89 (C-14), 114.90 (C-11), 136.40 (C-9), 143.35 (C-5), 155.13 (C-2), 162.72 (C-8), 166.10 (C-4), 166.3 (C-12). MS, m/z (EI/%): 284 (2.30) (M⁺), 267 (100) (M-17).

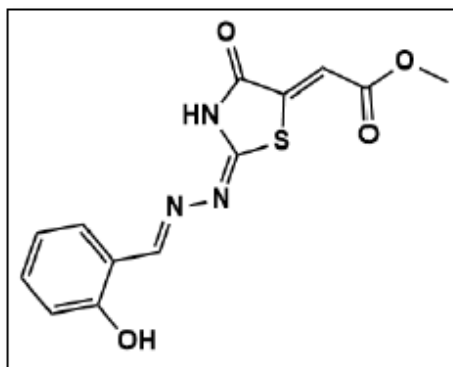


2-(4-oxo-2-((1-(piridin-2-il) etiliden) hidrazono) tiazolidin-5-ilideno) acetato de metilo. (2B)

Sólido amarillo, rend 91.3 %; p.f 254-256°C. FTIR (ATR) ν (cm⁻¹): 1618(C=N), 1703 (C=OAmida), 3429 (NH), 1718 (C=Oester), 2952-1437 (-CH₃), 1633 (C=C aromático), 3066 (=C-H). RMN 1H (DMSO-*d*₆) 13.01 ppm (s, 1H, H-3), 6.72 ppm (s, 1H, H-11), 3.81 ppm (s, 3H, H-14), 8.12 ppm (d, 1H, $3J=7.962$ Hz, H-17), 7.97 ppm (t, 1H, H-18), 7.52 ppm (t, 1H, H-19), 8.69 ppm (d, 1H, $J=4.128$, H-20). RMN 13C (100 MHz, DMSO-*d*₆) 14.34 (C-9), 52.94 (C-14), 114.99 (C-11), 121.13 (C-20), 125.46 (C-19), 130.01 (C-15), 137.3 (C-18), 143.33 (C-5), 149.50 (C-17), 155.08 (C-2), 162.61 (C-8), 166.02 (C-4), 166.42 (C-12). MS, m/z (EI/%): 304 (0.75) (M⁺), 226 (15.04) (M-78), 79 (100).

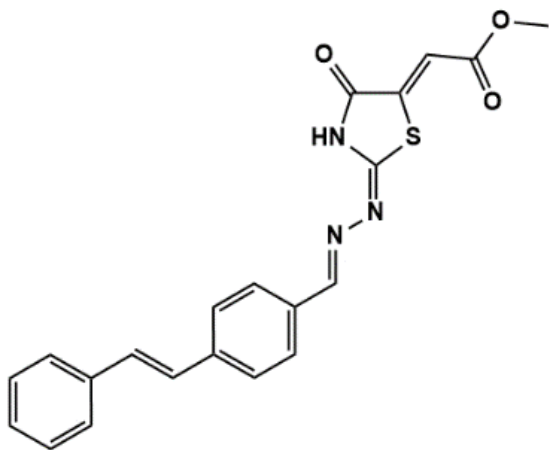
2-(2-((-2-hidroxibencilideno) hidrazono) -4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato de metil. (3B)

Sólido amarillo, rend 91.5 %; p.f 296-298°C. FTIR (ATR) ν (cm⁻¹): 3500-3400(OH), 1622(C=N), 1702 (C=OAmida), 3432 (NH), 1726 (C=Oester), 2956-1437 (-CH₃), 1643 (C=C aromático), 1332 (C-O). RMN 1H (DMSO-*d*₆) 12.97 ppm (s, 1H, H-3), 8.76 ppm (s, 1H, H-8), 6.99 ppm (d, 1H, $3J= 8.0$ Hz, H-11), 7.39 ppm (m, 1H, H-12), 6.97 ppm (d, 1H, $3J= 8$ Hz, H-13), 7.33 ppm (dd, 1H, $3J= 7.51$ Hz, H-14), 6.72 ppm (s, 1H, H-16), 3.81 ppm (s, 1H, H-21). RMN 13C (100 MHz, DMSO-*d*₆) 52.98 (C-21), 115.06 (C-16), 116.95 (C-11), 119.25 (C-9), 120.13 (C-13), 129.86 (C-12), 133.33 (C-14), 142.90 (C-5), 158.43 (C-2), 158.51 (C-8), 166.18 (C-4), 166.37 (C-17). MS, m/z (EI/%): 305 (86.28) (M⁺), 288 (100) (M-17), 212 (7.64) (M-93).



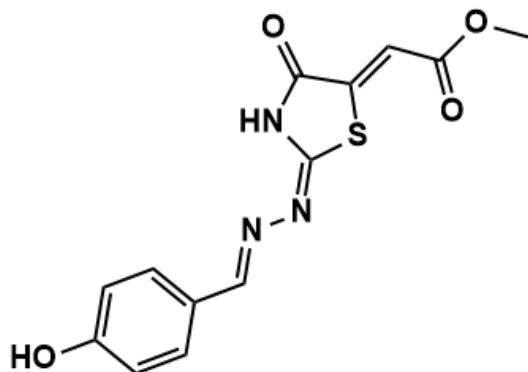
2-(-2-((-2-hidroxibencilideno) hidrazono) -4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato de metil. (3B)

Sólido amarillo, rend 91.5 %; p.f 296-298°C. FTIR (ATR) ν (cm⁻¹): 3500-3400(OH), 1622(C=N), 1702 (C=OAmida), 3432 (NH), 1726 (C=Oester), 2956-1437 (-CH₃), 1643 (C=C aromático), 1332 (C-O). RMN 1H (DMSO-*d*₆) 12.97 ppm (s, 1H, H-3), 8.76 ppm (s, 1H, H-8), 6.99 ppm (d, 1H, 3*J*= 8.0 Hz, H-11), 7.39 ppm (m, 1H, H-12), 6.97 ppm (d, 1H, 3*J*= 8 Hz, H-13), 7.33 ppm (dd, 1H, 3*J*= 7.51 Hz, H-14), 6.72 ppm (s, 1H, H-16), 3.81 ppm (s, 1H, H-21). RMN 13C (100 MHz, DMSO-*d*₆) 52.98 (C-21), 115.06 (C-16), 116.95 (C-11), 119.25 (C-9), 120.13 (C-13), 129.86 (C-12), 133.33 (C-14), 142.90 (C-5), 158.43 (C-2), 158.51 (C-8), 166.18 (C-4), 166.37 (C-17). MS, m/z (EI/%): 305 (86.28) (M⁺), 288 (100) (M-17), 212 (7.64) (M-93).



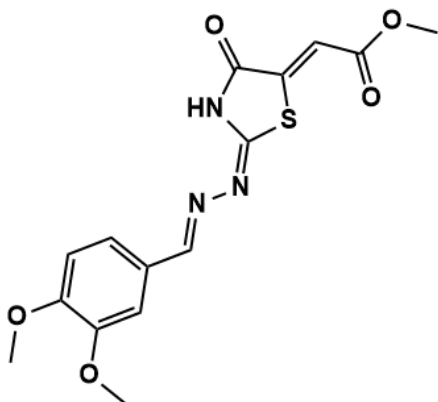
2-(-4-oxo-2-((-4 -(estiril) bencilideno) hidrazono) tiazolidin-5-ilideno) acetato de metilo. (4B)

Sólido naranja, rend 90.7 %; p.f 295-297°C. FTIR (ATR) ν (cm⁻¹): 1607(C=N), 1653 (C=OAmida), 3448 (NH), 1710 (C=Oester), 2952-1437 (-CH₃), 3140 (C-H), 3065 (=C-H). RMN 1H (DMSO-*d*₆) 12.94 ppm (s, 1H, H-3), 7.92 ppm (d, 2H, 3*J*= 8.332 Hz, H-13), 7.75 ppm (d, 2H, 3*J*= 8.39 Hz, H-14), 6.70 ppm (s, 1H, H-16), 7.44 ppm (s, 1H, H-19), 7.67 ppm (d, 1H, 3*J*= 7.533 Hz, H-20), 7.37 ppm (d, 2H, *J*=5.48 Hz, H-22), 7.42 ppm (d, 2H, 3*J*= 7.61 Hz, H-23), 7.32 ppm (t, 2H, H-24), 3.81 ppm (s, 1H, H-28). RMN 13C 56 (100 MHz, DMSO-*d*₆) 52.90 (C-28), 114.59 (C-16), 127.07 (C-14), 127.16 (C-13), 127.49 (C-22), 128.24 (C-149), 128.44 (C-20), 129.26 (C-23), 130.27 (C-24), 136.72 (C-9), 137.32 (C-21), 139.56 (C-12), 143.69 (C-5), 153.46 (C-2), 162.98 (C-8), 164.33 (C-4), 166.45 (C-17). MS, m/z (EI/%): 390 (9.39) (M-1), 313 (19.36) (M-77), 178 (15.11) (M-212), 43 (100)



2-((2-((-4-hidroxibencilideno) hidrazono) -4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato de metilo. (6B)

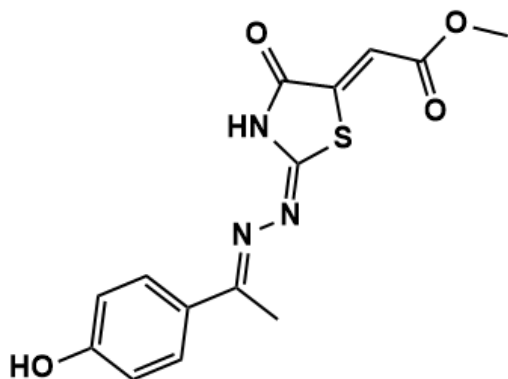
Sólido naranja, rend 88.8 %; p.f 289-291°C. FTIR (ATR) ν (cm⁻¹): 3500-3200(OH), 1607(C=N), 1698 (C=OAmida), 3392 (NH), 1726 (C=Oester), 2955-1436 (-CH₃), 3068 (=C-H), 1632 (C=Caromático), 3158 (C-H), 1331(C-O). RMN 1H (DMSO-*d*₆) 12.80 ppm (s, 1H, H-3), 8.41 ppm (s, 1H, H-9), 6.66 ppm (s, 1H, H-11), 3.38 ppm (s, 3H, H-14), 6.90 ppm (d, 2H, 3J=8.626 Hz, H-19), 7.69 ppm (d, 2H, 3J=8.6 Hz, H-20), 10.13 ppm (s, 1H, H-22). RMN 13C (100 MHz, DMSO-*d*₆) 52.89 (C-14), 114.40 (C-11), 116.33 (C-19), 125.21 (C-15), 130.50 (C-20), 136.41 (C-18), 143.59 (C-5), 159.01 (C-8), 161 (C-2), 166.18 (C-4), 166.4 (C-12). MS, m/z (EI/%): 305 (100) (M⁺), 120 (62.09) (M-185), 106 (85.50) (M-199).



2-((2-((-3,4-dimetoxibencilideno) hidrazono) -4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato de metilo. (7B)

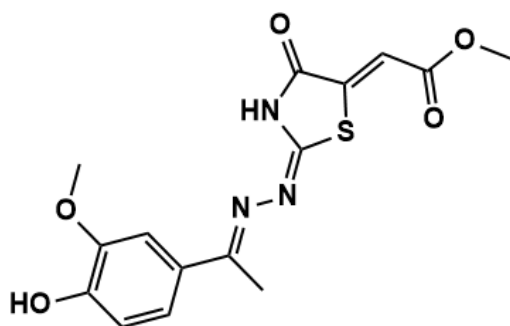
Sólido amarillo, rend 95.2 %; p.f 288-289.7°C. FTIR (ATR) ν (cm⁻¹): 1609(C=N), 1700(C=OAmida), 3424 (NH), 1718 (C=Oester), 2955-1433 (-CH₃), 3068 (=C-H), 1625 (C=Caromático), 3140 (C-H), 1241-1023(C-Oester). RMN 1H (DMSO-*d*₆) 8.44

ppm (s, 1H, H-9), 6.65 ppm (s, 1H, H-11), 3.79 ppm (s, 3H, H-14), 7.37 ppm (d, 1H, $4J= 1.83$ Hz, H-16), 7.10 ppm (d, 1H, $3J= 8.80$ Hz, H-17), 7.40 ppm (s, 1H, H-20), 3.83 ppm (s, 6H, H-23, H-25), H-3 ausente. RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) 52.86 (C-14), 56.11 (C-23, C-24), 110.25 (C-20), 112.13 (C-17), 114.07 (C-11), 122.99 (C-16), 126.94 (C-15), 147.01 (C-5), 149.40 (C-18), 152.06 (C-19), 153.82 (C-2), 158.68 (C-8), 165.43 (C-4), 166.48 (C-12). MS, m/z (EI/%):



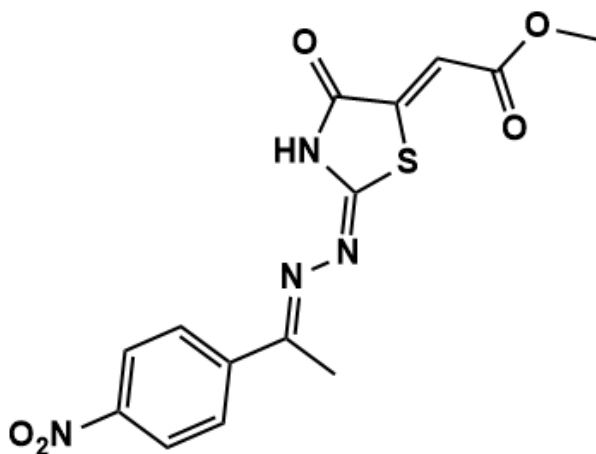
2-((2-((1-(4-hidroxifenil) etilideno) hidrazono) -4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato de metilo. (8B)

Sólido amarillo, rend 94.3 %; p.f 265-267°C. FTIR (ATR) ν (cm $^{-1}$): 3569-3070 (OH), 1607(C=N), 1682 (C=OAmida), 3424 (NH), 1704 (C=Oester), 2955-1437 (-CH $_3$), 3151 (=C-H), 1627 (C=Caromático), 1334(C-O). RMN 1H (DMSO- d_6) 12.82 ppm (s, 1H, H-3), 2.40 ppm (s, 3H, H-9), 6.67 ppm (s, 1H, H-11), 3.80 ppm (s, 3H, H-14), 6.88 ppm (d, 2H, $3J=8.753$ Hz, H-19), 7.79 ppm (d, 2H, $3J=8.759$ Hz H-20), 9.96 ppm (s, 1H, H-22). RMN ^{13}C (100 MHz, DMSO- d_6) 15.10 (C-9), 52.87 (C-14), 114.34 (C-11), 115.78 (C-19), 128.53 (C-15), 128.85 (C-20), 143.77 (C-5), 158.18 (C-2), 160.22 (C-18), 163.14 (C-8), 166.04 (C-4), 166.45 (C-12). MS, m/z (EI/%): 319 (11.90) (M+), 304 (7.79) (M-15), 120 (29.26) (M-199), 43 (100).



2-(-2-((-1-(4-hidroxi-3-metoxifenil) etiliden) hidrazono) -4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato de metilo. (9B)

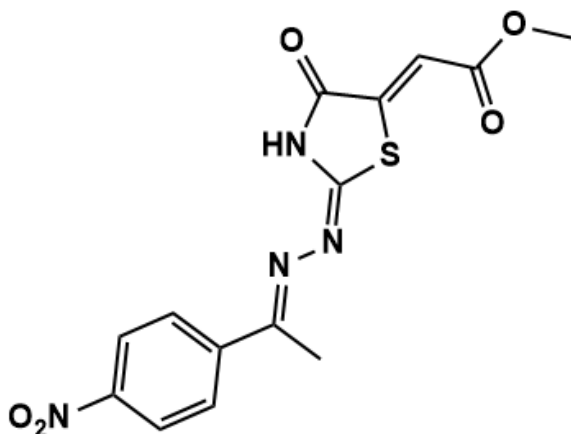
Sólido amarillo-naranja, rend 88.1 %; p.f 229-231°C. FTIR (ATR) ν (cm⁻¹) 3500-3200 (OH), 1515(C=N), 1608 (C=OAmida), 3467(NH), 1713 (C=Oester), 2954-1424 (-CH₃), 3136 (=C-H), 1627 (C=Caromático), 1332(C-O), 1204-1179 (C-Oester). RMN 1H (DMSO-*d*₆) 12.83 ppm (s, 1H, H-3), 2.42 ppm (s, 3H, H-9), 6.67 ppm (s, 1H, H-11), 3.78 ppm (s, 3H, H-14), 7.49 ppm (d, 1H, $4J=1.918$ Hz, H-16), 6.89 ppm (d, 1H, $3J=8.315$ Hz, H-19), 7.37 ppm (dd, 1H, $4J=1.915$ Hz, $3J=8.303$ Hz, H-20), 3.86 ppm (s, 3H, H-23), 9.58 ppm (s, 1H, H-24). RMN 13C (100 MHz, DMSO-*d*₆) 15.15 (C-9), 52.86 (C-14), 56.02 (C-23), 110.77(C-16), 114.38 (C-11), 115.73 (C-19), 121.07 (C-20), 128.99 (C-15), 143.67 (C-5), 147.88 (C-17), 149.80 (C-18), 158.31 (C-2), 163.09 (C-8), 166.07 (C-4), 166.37 (C-12). MS, m/z (EI/%): 349 (49.65) (M⁺), 334 (33.99) (M-15), 226 (6.20) (M-123), 164 (55.03) (M-185), 43 (100)



2 (-2-((-1-(4-Nitrofenil) etilideno) hidrazono) -4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato de metilo. (12B)

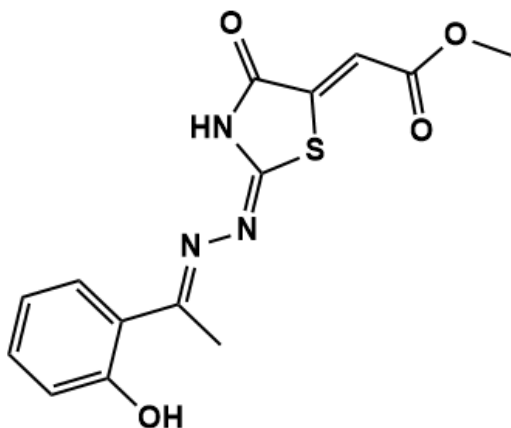
Sólido amarillo, rend 86.6 %; p.f 284-286°C. FTIR (ATR) ν (cm⁻¹), 1611(C=N), 1702(C=OAmida), 3489 (NH), 1721 (C=Oester), 2958-1437 (-CH₃), 3066(=C-H), 1211-1186 (C-Oester), 1634 (C=Caromático), 1522-1342 (NO₂). RMN 1H (DMSO-*d*₆) 12.99 ppm (s, 1H, H-3), 2.45 ppm (s, 3H, H-9), 6.70 ppm (s, 1H, H-11), 3.79 ppm (s, 3H, H-14), 8.33 ppm (d, 2H, $3J=8.998$ Hz, H-19), 8.14 ppm (d, 2H, $3J=8.984$ Hz, H-20). RMN 13C (100 MHz, DMSO-*d*₆) 15.48 (C-9), 52.96 (C-14), 115.12 (C-11), 124.22 (C-19), 128.27 (C-20), 143.21 (C-5), 143.63 (C-15), 148.7 (C-18), 158 (C-2),

161.97 (C-8), 166.15 (C-4), 166.37 (C-12). MS, m/z (EI/%): 348 (96.92) (M+), 333 (25.08) (M-15), 317 (6.36) (M-31), 149 (50.95) (M-199), 85 (100).



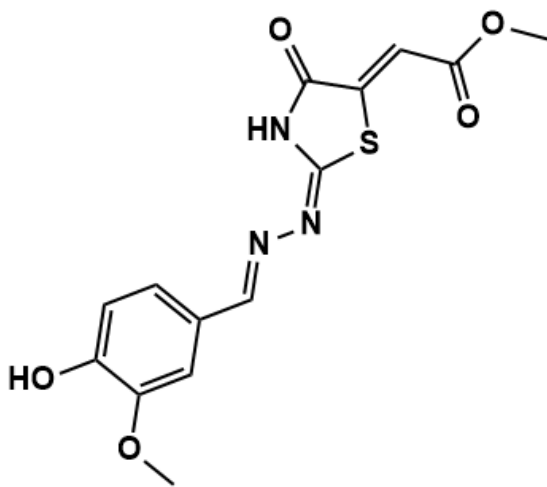
2-((2-((-1-(4-Nitrofenil) etilideno) hidrazono) -4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato de metilo. (12B)

Sólido amarillo, rend 86.6 %; p.f 284-286°C. FTIR (ATR) ν (cm⁻¹), 1611(C=N), 1702(C=OAmida), 3489 (NH), 1721 (C=Oester), 2958-1437 (-CH₃), 3066(=C-H), 1211-1186 (C-Oester), 1634 (C=Caromático), 1522-1342 (NO₂). RMN 1H (DMSO-*d*₆) 12.99 ppm (s, 1H, H-3), 2.45 ppm (s, 3H, H-9), 6.70 ppm (s, 1H, H-11), 3.79 ppm (s, 3H, H-14), 8.33 ppm (d, 2H, 3J=8.998 Hz, H-19), 8.14 ppm (d, 2H, 3J=8.984 Hz, H-20). RMN 13C (100 MHz, DMSO-*d*₆) 15.48 (C-9), 52.96 (C-14), 115.12 (C-11), 124.22 (C-19), 128.27 (C-20), 143.21 (C-5), 143.63 (C-15), 148.7 (C-18), 158 (C-2), 161.97 (C-8), 166.15 (C-4), 166.37 (C-12). MS, m/z (EI/%): 348 (96.92) (M+), 333 (25.08) (M-15), 317 (6.36) (M-31), 149 (50.95) (M-199), 85 (100).



2-(-2-((-1-(2-hidroxifenil) etilideno) hidrazono) -4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato de metilo. (13B)

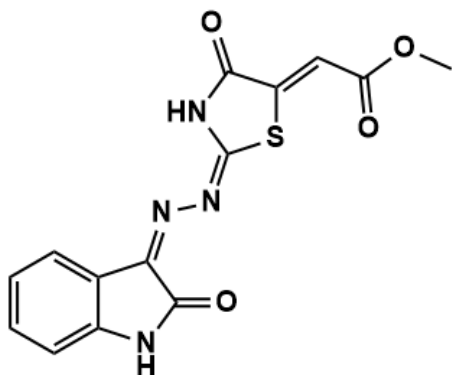
Sólido amarillo, rend 90.5 %; p.f 230-232°C. FTIR (ATR) ν (cm⁻¹), 1610(C=N), 1693(C=OAmida), 3466 (NH), 1711 (C=Oester), 2952-1438 (-CH₃), 3136(=C-H), 1200-1178 (C-Oeter), 1620 (C=Caromático), 1323 (C-O), 3466 (OH). RMN 1H (DMSO-*d*₆) 13.03 ppm (s, 1H, H-3), 2.52 ppm (s, 1H, H-9), 6.75 ppm (s, 1H, H-11), 3.81 ppm (s, 3H, H-14), 7.69 ppm (d, 1H, $3J=7.28$ Hz, H-16), 6.97 ppm (t, 1H, H-17), 7.39 ppm (t, 1H, H-18), 7.80 ppm (d, 1H, $3J=7.478$ Hz, H-19), 12.18 ppm (s, 1H, H-22). RMN 13C (100 MHz, DMSO-*d*₆) 15.41 (C-9), 53.04 (C-14), 115.57 (C-11), 117.59 (C-17), 119.60 (C-18), 119.77 (C-15), 130.01 (C-16), 132.82 (C-19), 142.30 (C-20), 158.47 (C-2), 159.48 (C-8), 165.77 (C-4), 166.30 (C-12), 168.77 (C-5). MS, m/z (EI/%): 319 (1.63) (M⁺), 302 (2.86) (M-17), 185 (5.33) (M-134), 69 (100).



2-(-2-((-4-hidroxi-3-metoxibencilideno) hidrazono)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato de metilo. (16B)

Sólido amarillo, rend 76.4 %; p.f 295-296°C. FTIR (ATR) ν (cm⁻¹), 1619(C=N), 1695(C=OAmida), 3415(NH), 1718 (C=Oester), 2955-1431 (-CH₃), 3061(=C-H), 1212-1127 (C-Oeter), 1333 (C-O), 3266(C-H). RMN 1H (DMSO-*d*₆) 12.76 ppm (s, 1H, H-3), 8.41 ppm (s, 1H, H-9), 6.68 ppm (s, 1H, H-11), 3.80 ppm (s, 3H, H-14), 7.31 ppm (d, 1H, $3J=8.225$ Hz, H-16), 6.91 ppm (d, 1H, $3J=8.154$ Hz, H-17), 7.38 ppm (s, 1H, H-20), 3.86 ppm (s, 3H, H-23), 9.76 ppm (s, 1H, H-24). RMN 13C (100 MHz, DMSO-*d*₆) 52.90 (C-14), 56.04 (C-23), 111.47 (C-20), 114.37 (C-11), 116.22 (C-17), 123.13 (C-16), 125.57 (C-15), 143.60 (C-5), 148.39 (C-19), 150.59 (C-18),

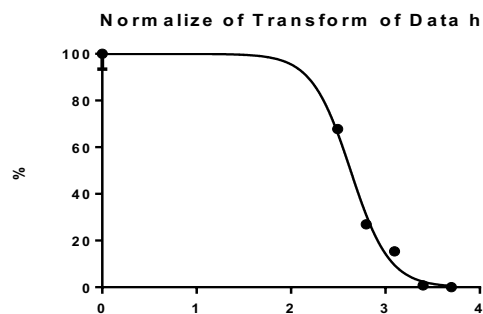
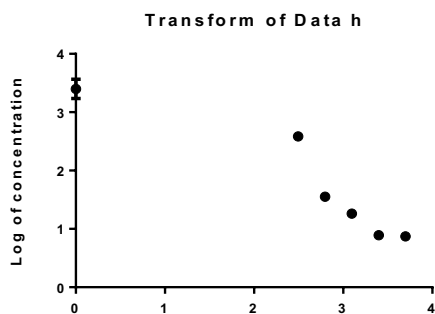
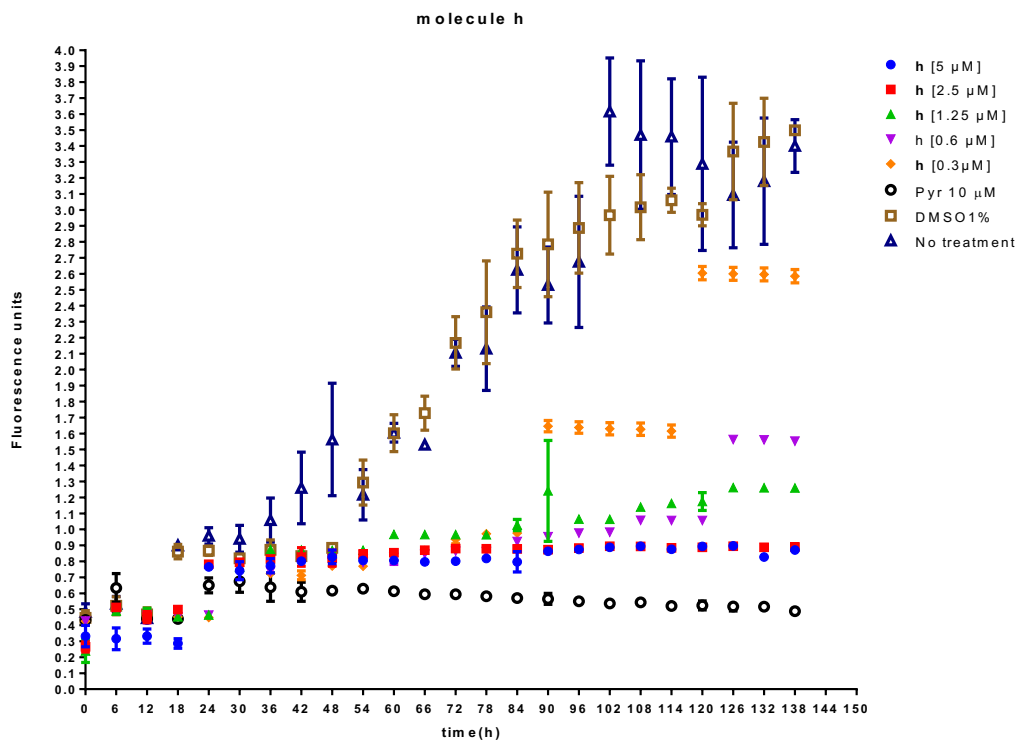
158.81 (C-2), 159.31 (C-8), 166.20 (C-4), 166.41 (C-12). MS, m/z (EI/%): 335 (100) (M+), 150 (14.31) (M-185), 136 (18) (M-199), 123 (8.57) (M-212).



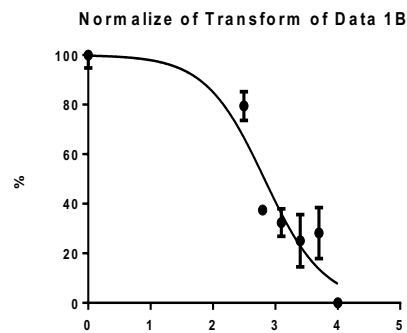
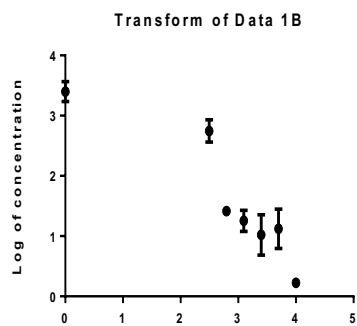
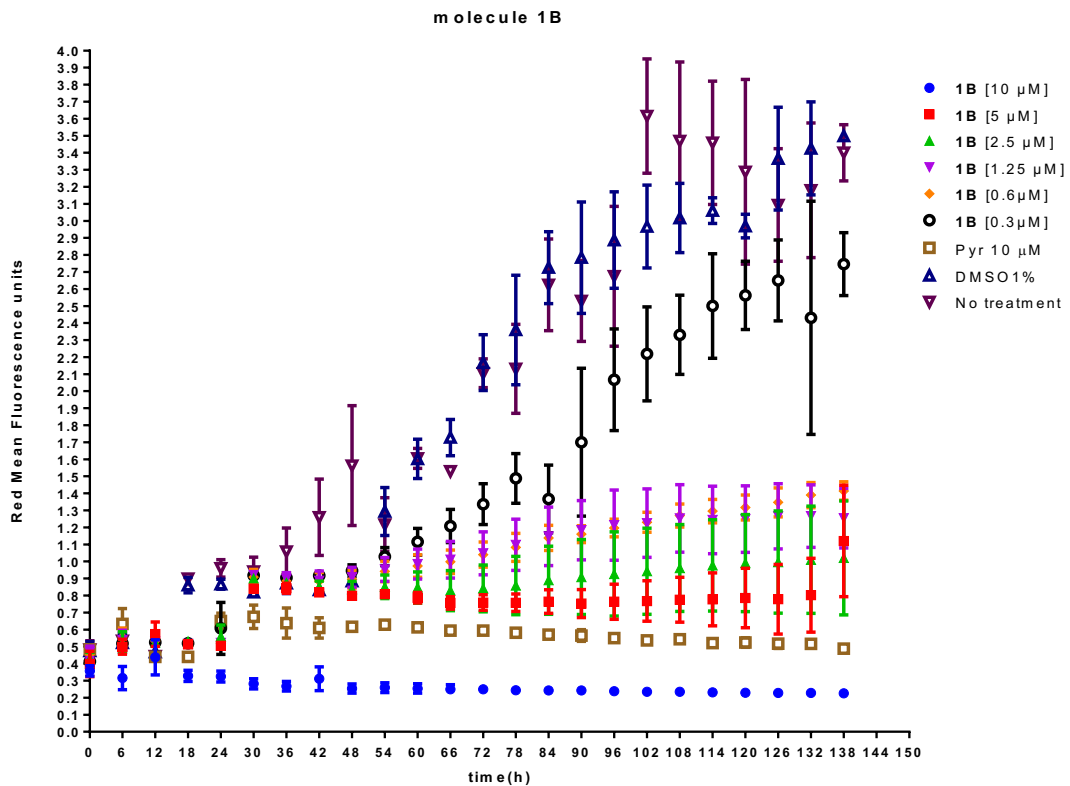
2-(-4-oxo-2-((-2-oxoindolin-3-ilideno) hidrazono) tiazolidin-5-ilideno) acetato de metilo. (17B)

Sólido naranja, rend 87 %, p.f 290.4- 291.7 °C. FTIR (ATR) ν (cm⁻¹), -----. RMN 1H (DMSO-*d*₆) 13.38 ppm (s, 1H, H-3), 10.76 ppm (s, 1H, H-10), 7.58 ppm (d, 1H, 3J= 7.39 Hz, H-13), 7.05 ppm (t, 1H, H-14), 7.40 ppm (t, 1H, H-15), 6.88 ppm (d, 1H, 3J= 7.77 Hz, H-16), 6.73 ppm (s, 1H, H-18), 3.80 ppm (s, 3H, H-21). RMN 13C (100 MHz, DMSO-*d*₆) 53.01 (C-21), 111.01 (C-16), 115.79 (C-18), 120.82 (C-12), 122.26 (C-13), 122.57 (C-14), 133.55 (C-15), 142.62 (C-5), 144.24 (C-11), 147.64 (C-8), 153.57 (C-2), 159.14 (C-9), 163.85 (C-4), 166.29 (C-19).

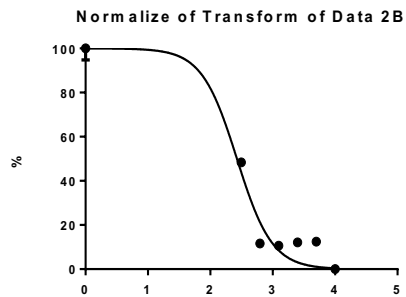
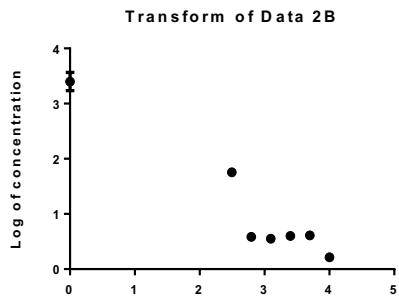
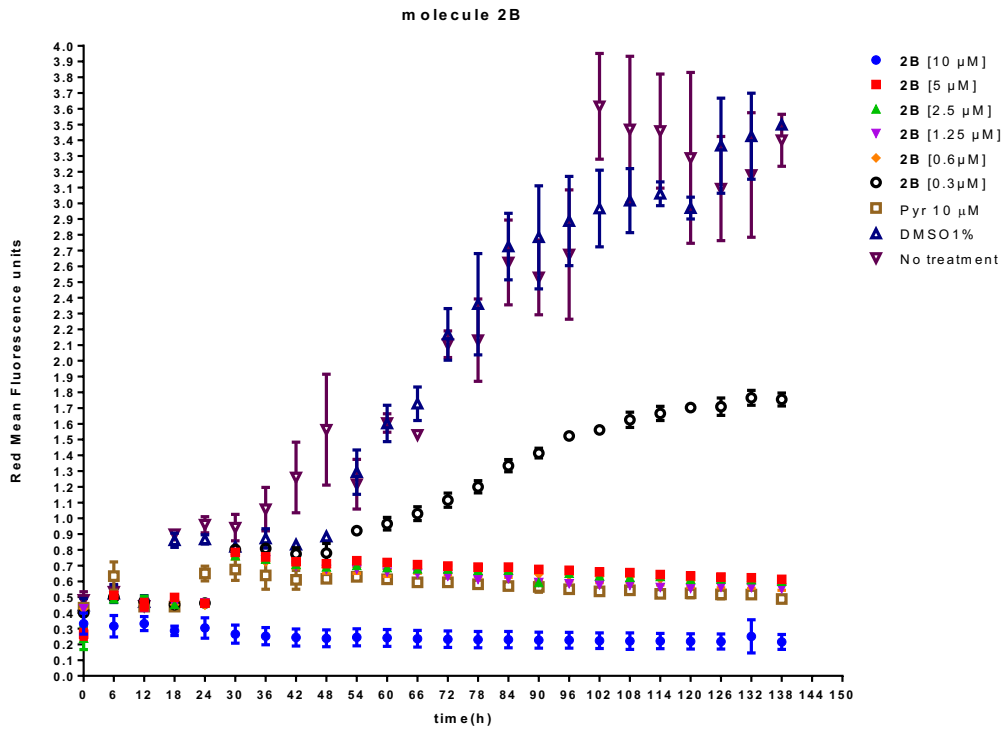
ANEXO 2. IC50



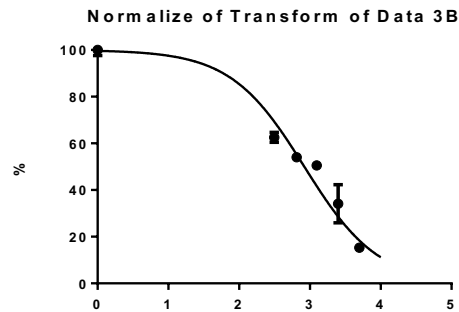
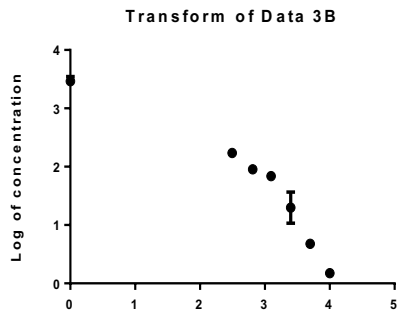
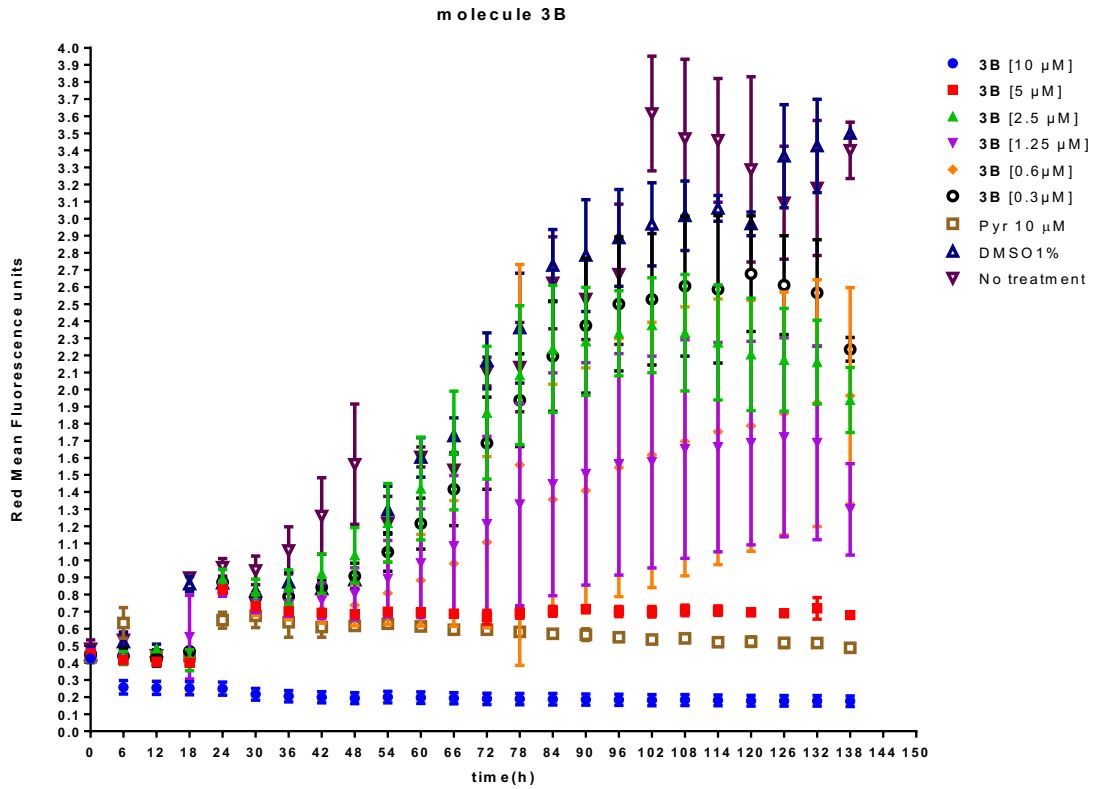
LogIC50	2,631
HillSlope	-2,100
IC50	427,8
Std. Error	
LogIC50	0,01542
HillSlope	0,1625
95% Confidence Intervals	
LogIC50	2,598 to 2,664
HillSlope	-2,445 to -1,756
IC50	396,7 to 461,2
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	16
R square	0,9892
Absolute Sum of Squares	265,2
Sy.x	4,071
Number of points	
Analyzed	18



LogIC50	0,07362
HillSlope	0,1617
95% Confidence Intervals	
LogIC50	2,671 to 2,979
HillSlope	-1,254 to -0,5772
IC50	468,3 to 952,2nM
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	19
R square	0,8831
Absolute Sum of Squares	2567
Sy.x	11,62
Number of points	
Analyzed	21



HillSlope	-1,540
IC50	267,3
Std. Error	
LogIC50	0,05561
HillSlope	0,2987
95% Confidence Intervals	
LogIC50	2,311 to 2,543nM
HillSlope	-2,165 to -0,9152
IC50	204,4 to 349,4nM
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	19
R square	0,9532
Absolute Sum of Squares	1048
Sy.x	7,428
Number of points	
Analyzed	21



HillSlope	-0,8331
IC50	833,8
Std. Error	
LogIC50	0,04796
HillSlope	0,09169
95% Confidence Intervals	
LogIC50	2,821 to 3,021
HillSlope	-1,025 to -0,6412
IC50	661,7 to 1051nM
Goodness of Fit	
Degrees of Freedom	19
R square	0,9467
Absolute Sum of Squares	1043
Sy.x	7,408
Number of points	
Analyzed	21

9 Bibliografía

1. Jasper S, Ss V, Ss J, Horo S, Yj S, Qd N. Corticosteroids as adjuvant therapy for ocular toxoplasmosis (Review). 2013;(4).
2. The New England Journal of Medicine Downloaded from nejm.org at UNIVERSITY OF CALGARY on November 19, 2012. For personal use only. No other uses without permission. Copyright © 1992 Massachusetts Medical Society. All rights reserved. 1992;
3. Dannemann B, Mccutchan JA, Israelski D, Antoniskis D, Leport C, Luft B, et al. Treatment of Toxoplasmic Encephalitis in Patients with AIDS A Randomized Trial Comparing Pyrimethamine plus Clindamycin to Pyrimethamine plus Sulfadiazine. 2017;116(1):33–43.
4. Katlama C, Wit S De, Doherty EO, Glabeke M Van. Pyrimethamine-Clindamycin vs . Pyrimethamine-Sulfadiazine as Acute and Long- Term Therapy for Toxoplasmic Encephalitis in Patients with AIDS. 1996;268–75.
5. Alday H, Doggett J. Drugs in development for toxoplasmosis: advances, challenges, and current status. Drug Des Devel Ther [Internet]. 2017;Volume11:273–93. Available from: <https://www.dovepress.com/drugs-in-development-for-toxoplasmosis-advances-challenges-and-current-peer-reviewed-article-DDDT>
6. Ascenzio MD, Bizzarri B, Monte C De, Carradori S, Bolasco A, Secci D, et al. European Journal of Medicinal Chemistry Design , synthesis and biological characterization of thiazolidin-4-one derivatives as promising inhibitors of *Toxoplasma gondii*. 2014;86.
7. Chimenti F, Bizzarri B, Bolasco A, Secci D, Chimenti P, Carradori S, et al. Synthesis and evaluation of 4-acyl-2-thiazolyhydrazones derivatives for anti-*Toxoplasma* efficacy in vitro. J Med Chem. 2009;52(15):4574–7.
8. Rocha-Roa C, Molina D, Cardona N. A perspective on thiazolidinone scaffold development as a new therapeutic strategy for toxoplasmosis. Vol. 8, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. Frontiers Media S.A.; 2018.
9. Molina D, Cossio-Pérez R, Rocha-Roa C, Pedraza L, Cortes E, Hernández A, et al. Protein targets of thiazolidinone derivatives in *Toxoplasma gondii* and insights into their binding to ROP18 11 Medical and Health Sciences 1108 Medical Microbiology. BMC Genomics. 2018 Nov 29;19(1).
10. Sroka S, Bartelheimer N, Winter A, Heukelbach J, Ariza L, Ribeiro H, et al. Prevalence and Risk Factors of Toxoplasmosis among Pregnant Women in Fortaleza , Northeastern Brazil. 2010;83(3):528–33.
11. Peng H, Tan F, Lindsay DS. Pathogenesis of *Toxoplasma gondii* in Humans. 2016;l.
12. Alvarado-esquivel C, Sa LF, Estrada-martí S, Cerrillo-soto SM, Elí G, Guido-

- arreola CA, et al. Association between *Toxoplasma gondii* infection and history of blood transfusion : a case-control seroprevalence study.
13. Wohlfert EA, Blader IJ, Wilson EH. Brains and Brawn : *Toxoplasma* Infections of the Central Nervous System and Skeletal Muscle. *Trends Parasitol* [Internet]. 2017;xx:1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2017.04.001>
 14. Lalibertø J, Carruthers VB. Review Host cell manipulation by the human pathogen *Toxoplasma gondii*. 2008;65:1900–15.
 15. Hunter CA, Sibley LD. Modulation of innate immunity by *Toxoplasma gondii* virulence effectors. [cited 2017 May 5]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3689224/pdf/nihms481755.pdf>
 16. Pfaff AW, de-la-Torre A, Rochet E, Brunet J, Sabou M, Sauer A, et al. New clinical and experimental insights into Old World and neotropical ocular toxoplasmosis. *Int J Parasitol*. 2014;44(2):99–107.
 17. Gómez-Marín JE, de-la-Torre A, Barrios P, Cardona N, Álvarez C, Herrera C. Toxoplasmosis in military personnel involved in jungle operations. *Acta Trop*. 2012 Apr;122(1):46–51.
 18. Report C. Successful treatment of cerebral toxoplasmosis with cotrimoxazole. 2011;32(1):6–9.
 19. Wallon M, Peyron F. Congenital Toxoplasmosis : A Plea for a Neglected Disease. 2018;1–9.
 20. Müller J, Naguleswaran A, Müller N, Hemphill A. Neospora caninum: Functional inhibition of protein disulfide isomerase by the broad-spectrum anti-parasitic drug nitazoxanide and other thiazolides. *Exp Parasitol*. 2008;118(1):80–8.
 21. Biology S, Parker LJ, Tomabechei Y, Handa N, Yuki H, Honma T, et al. Flexibility of the P-loop of Pim-1 kinase : observation of a novel conformation induced by interaction with an inhibitor. 2012;860–6.
 22. Ascenzio MD, Bizzarri B, Monte C De, Carradori S, Bolasco A, Secci D, et al. European Journal of Medicinal Chemistry Design , synthesis and biological characterization of thiazolidin-4-one derivatives as promising inhibitors of *Toxoplasma gondii*. 2014;86.
 23. Carradori S, Secci D, Bizzarri B, Chimenti P, Monte D, Guglielmi P, et al. Synthesis and biological evaluation of anti- *Toxoplasma gondii* activity of a novel scaffold of thiazolidinone derivatives. 2017;6366(May).
 24. Edy Susanto M. 済無No Title No Title. *J Chem Inf Model*. 2019;53(9):1689–99.
 25. Winzer P, Ojo KK, Reid MC, Siddaramaiah LK, Mu J, Zhang Z, et al.

- Neospora caninum Calcium-Dependent Protein Kinase 1 Is an Effective Drug Target for Neosporosis Therapy. 2014;9(3).
26. Gajria B, Bahl A, Brestelli J, Dommer J, Fischer S, Gao X, et al. ToxoDB: An integrated toxoplasma gondii database resource. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(SUPPL. 1).
 27. Kallio JP, Auer S, Jänis J, Andberg M, Kruus K, Rouvinen J, et al. Structure – Function Studies of a *Melanocarpus albomyces* Laccase Suggest a Pathway for Oxidation of Phenolic Compounds. *J Mol Biol [Internet]*. 2009;392(4):895–909. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.06.053>
 28. Montazeri M, Sharif M, Sarvi S, Mehrzadi S, Ahmadpour E, Daryani A. A systematic review of in vitro and in vivo activities of anti-toxoplasma drugs and compounds (2006-2016). *Front Microbiol.* 2017;8(JAN).
 29. Aye Y, Li M, Long MJC, Weiss RS. Ribonucleotide reductase and cancer : biological mechanisms and targeted therapies. 2021;(June 2014):2011–21.
 30. Kaur S, Kaur R, Bhatia R, Kumar K, Singh V, Shankar R, et al. Bioorganic Chemistry Synthetic and medicinal perspective of thiazolidinones : A review. *Bioorg Chem [Internet]*. 2017;75:406–23. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2017.10.014>
 31. Lim DC, Cooke BM, Doerig C, Saeij JPJ. Toxoplasma and Plasmodium protein kinases : Roles in invasion and host cell remodelling. *Int J Parasitol [Internet]*. 2012;42(1):21–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2011.11.007>
 32. Wernimont AK, Artz JD, Jr PF, Lin Y, Amani M, Allali-hassani A, et al. reveal mechanism of activation by calcium. 2013;17(5):596–601.
 33. Billker O, Lourido S, Sibley LD. *NIH Public Access.* 2010;5(6):612–22.
 34. Larson ET, Ojo KK, Murphy RC, Johnson SM, Kim JE, Leibly DJ, et al. *NIH Public Access.* 2013;55(6):2803–10.
 35. Guex N, Peitsch MC, Schwede T. SWISS-MODEL : an automated protein homology-modeling server. 2003;31(13):3381–5.
 36. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, et al. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004;25:1605–12.
 37. Laskowski RA, Watson JD, Thornton JM. ProFunc : a server for predicting protein function from 3D structure. 2005;33:89–93.
 38. Morris GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. *NIH Public Access.* 2010;30(16):2785–91.
 39. Manuscript A. *NIH Public Access.* 2011;31(2):455–61.

40. Lim D, Gold DA, Julien L, Rosowski EE, Niedelman W, Yaffe MB, et al. Structure of the *Toxoplasma gondii* ROP18 Kinase Domain Reveals a Second Ligand Binding Pocket Required for Acute. 2013;288(48):34968–80.
41. Meagher KL, Redman LT, Carlson HA. Development of Polyphosphate Parameters for Use with the AMBER Force Field. 2003;1016–25.
42. Li P, Merz KM. Supporting Information MCPB . py : A Python Based Metal Center Parameter Builder. :1–25.
43. Revision D, Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb A, et al. Gaussian 09, Revision. 2015;1–20.
44. Amber C. Amber 2016 Reference Manual. 2016;
45. Humphrey W, .pdf.
46. Striepen B, Yingxin C, Matrajt M, Soldati D, Roos DS. Expression , selection , and organellar targeting of the green fluorescent protein in *Toxoplasma gondii*. 1998;92:325–38.
47. Seeber F, Boothroyd JC. *Escherichia coli* [β -galactosidase as an in vitro and in vivo reporter enzyme and stable transfection marker in the intracellular protozoan parasite *Toxoplasma gondii*. 1996;169:39–45.
48. Arruda R, Santos S, Rodrigues L, Miranda-sapla MM, Freitas B, José R, et al. Acta Tropica Pravastatin and simvastatin inhibit the adhesion , replication and proliferation of *Toxoplasma gondii* (RH strain) in HeLa cells. Acta Trop [Internet]. 2017;167:208–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.12.006>
49. Li S, Li A, Molina Lara DA, Gómez Marín JE, Juhas M, Zhang Y. Transfer Learning for *Toxoplasma gondii* Recognition . mSystems. 2020;5(1):1–12.
50. Melo EJT De. Hydroxyurea inhibits intracellular *Toxoplasma gondii* multiplication. 2000;185:79–82.
51. Liu M, Lin T, Sartorelli AC. Synthesis and Antitumor Activity of Amino Derivatives of Pyridine-2- carboxaldehyde Thiosemicarbazone. 1992;(8):3672–7.
52. Walcourt A, Loyevsky M, Lovejoy DB, Gordeuk VR, Richardson DR. Novel aroylhydrazone and thiosemicarbazone iron chelators with anti-malarial activity against chloroquine-resistant and -sensitive parasites. 2004;36:401–7.
53. Tenório RP, Carvalho CS, Pessanha CS, De Lima JG, De Faria AR, Alves AJ, et al. Synthesis of thiosemicarbazone and 4-thiazolidinone derivatives and their in vitro anti-*Toxoplasma gondii* activity. Bioorganic Med Chem Lett. 2005;15(10):2575–8.
54. Hamama WS, Ismail MA, Shaaban S, Zoorob HH. Progress in the Chemistry of 4- Thiazolidinones. 2008;060(9).

55. de Aquino TM, Liesen AP, da Silva REA, Lima VT, Carvalho CS, de Faria AR, et al. Synthesis, anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activities of benzaldehyde 4-phenyl-3-thiosemicarbazones and 2-[(phenylmethylene)hydrazono]-4-oxo-3-phenyl-5-thiazolidineacetic acids. *Bioorganic Med Chem.* 2008;16(1):446–56.
56. Carvalho CS, Melo EJT De, Tenório RP, Góes AJS. Anti-parasitic action and elimination of intracellular Toxoplasma gondii in the presence of novel thiosemicarbazone and its 4-thiazolidinone derivatives Anti-parasitic action and elimination of intracellular Toxoplasma gondii in the presence of novel thio. 2010;43(February).
57. Mrsa C. Looking Toward Basic Science for Potential Drug Discovery Targets Against. *Med Res Rev.* 2009;30(1):1–22.
58. Liesen AP, De Aquino TM, Carvalho CS, Lima VT, De Araújo JM, De Lima JG, et al. Synthesis and evaluation of anti-Toxoplasma gondii and antimicrobial activities of thiosemicarbazides, 4-thiazolidinones and 1,3,4-thiadiazoles. *Eur J Med Chem [Internet].* 2010;45(9):3685–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.05.017>
59. Aquino TM, Nascimento AAPL, Spacov ICG, Carvalho CS, Lima VT, Alves AQ, et al. Synthesis, anti-toxoplasma gondii and antimicrobial activities of 2-hydrazolyl-3-phenyl-5-(4-nitrobenzylidene)-4-thiazolidinone substituted derivatives. *Lat Am J Pharm.* 2011;30(8):1567–73.
60. Asadollahi-Baboli M, Mani-Varnosfaderani A. Therapeutic index modeling and predictive QSAR of novel thiazolidin-4-one analogs against Toxoplasma gondii. *Eur J Pharm Sci [Internet].* 2015;70:117–24. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2015.01.014>
61. Leite ACL, Espíndola JWP, de Oliveira Cardoso MV, de Oliveira Filho GB. Privileged Structures in the Design of Potential Drug Candidates for Neglected Diseases. *Curr Med Chem.* 2019;26(23):4323–54.
62. Zoe S, Moose RE, Charles A, Hidaka K, Hayashi Y, Kiso Y, et al. research papers Structure of the aspartic protease plasmepsin 4 from the malarial parasite Plasmodium malariae bound to an allophenylnorstatine-based inhibitor research papers. 2006;246–52.
63. Bhaumik P, Horimoto Y, Xiao H, Miura T, Hidaka K, Kiso Y, et al. Crystal structures of the free and inhibited forms of plasmepsin I (PMI) from Plasmodium falciparum. *J Struct Biol [Internet].* 2011;175(1):73–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2011.04.009>
64. Bhaumik P, Xiao H, Parr CL, Kiso Y, Gustchina A, Yada RY, et al. Crystal Structures of the Histo-Aspartic Protease (HAP) from Plasmodium falciparum. *J Mol Biol [Internet].* 2009;388(3):520–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.011>
65. Bhaumik P, Xiao H, Hidaka K, Gustchina A, Kiso Y, Yada RY, et al.

- Structural insights into the activation and inhibition of histo-aspartic protease from *Plasmodium falciparum*. *Biochemistry*. 2011;50(41):8862–79.
66. Li H, Child MA, Bogyo M. *Biochimica et Biophysica Acta* Proteases as regulators of pathogenesis : Examples from the Apicomplexa ☆. *BBA - Proteins Proteomics* [Internet]. 2012;1824(1):177–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2011.06.002>
 67. Zhao G, Song X, Kong X, Zhang N, Qu S, Zhu W, et al. Immunization with *Toxoplasma gondii* aspartic protease 3 increases survival time of infected mice. *Acta Trop* [Internet]. 2017; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.02.030>
 68. Spinks D, Smith V, Thompson S, Robinson DA, Luksch T, Smith A, et al. Development of Small-Molecule *Trypanosoma brucei* N -Myristoyltransferase Inhibitors : Discovery and Optimisation of a Novel Binding Mode. 2015;1821–36.
 69. Foe IT, Child MA, Majmudar JD, Ward GE, Martin BR, Foe IT, et al. Global Analysis of Palmitoylated Proteins in *Toxoplasma gondii* Resource Global Analysis of Palmitoylated Proteins in *Toxoplasma gondii*. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2015;18(4):501–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2015.09.006>
 70. Caballero MC, Alonso M, Deng B, Attias M, Souza D. Chagas Filho and Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia Estrutural e [Internet]. *BBA - Proteins and Proteomics*. Elsevier B.V.; 2016. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.01.010>
 71. Brown RWB, Sharma AI, Engman DM, Brown RWB, Sharma AI, Dynamic DME. Dynamic protein S-palmitoylation mediates parasite life cycle progression and diverse mechanisms of virulence. 2017;9238(February).
 72. Xia L, Vries H De, Ijzerman AP, Heitman LH. Scintillation proximity assay (SPA) as a new approach to determine a ligand ' s kinetic profile . A case in point for the adenosine A 1 receptor. 2016;115–26.
 73. Schenone M, Wagner BK, Clemons PA. chemical biology and drug discovery. 2013;9(april).
 74. Kumar G, Banerjee T, Kapoor N, Surolia N, Surolia A. Research Communication SAR and Pharmacophore Models for the Rhodanine Inhibitors of *Plasmodium falciparum* Enoyl-Acyl Carrier Protein Reductase. 2010;62(March):204–13.
 75. Kaushik D, Paliwal D, Kumar A. 2D QSAR and Molecular docking studies of chloroquine-thiazolidinone derivatives as potential pflDH inhibitors of *Plasmodium falciparum*. *Int J Pharmacol Pharm Sci Int J Pharmacol Pharm Sci* [Internet]. 2015;2(5):42–53. Available from: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.736.3692&rep=rep1&type=pdf>

76. Moreira DRM, Lima C, Verissimo M, Cardoso O, Srivastava M, Hernandez MZ, et al. Structural Design , Synthesis and Structure – Activity Relationships of Thiazolidinones with Enhanced Anti- Trypanosoma cruzi Activity. 2013;1–13.
77. Huang R, Que X, Hirata K, Brinen LS, Hyun J, Hansell E, et al. Molecular & Biochemical Parasitology The cathepsin L of Toxoplasma gondii (TgCPL) and its endogenous macromolecular inhibitor , toxostatin α . 2009;164:86–94.
78. Ramsay RR, Nikolic MRP, Nikolic K, Uliassi E, Bolognesi ML. A perspective on multi - target drug discovery and design for complex diseases. Clin Transl Med [Internet]. 2018; Available from: <https://doi.org/10.1186/s40169-017-0181-2>
79. Sestito S, Runfola M, Tonelli M, Chiellini G, Rapposelli S. New Multitarget Approaches in the War Against Glioblastoma : A Mini-Perspective. 2018;9(August):1–8.
80. Du J, An R, Chen L, Shen Y, Chen Y, Cheng L, et al. Toxoplasma gondii virulence factor rop18 inhibits the host nf-kb pathway by promoting p65 degradation. J Biol Chem. 2014;289(18):12578–92.
81. El Hajj H, Lebrun M, Arold ST, Vial H, Labesse G, Dubremetz JF. ROP18 is a rhoptry kinase controlling the intracellular proliferation of Toxoplasma gondii. PLoS Pathog. 2007;3(2):0200–11.
82. Hermanns T, Müller UB, Könen-waisman S, Howard JC, Steinfeldt T. The Toxoplasma gondii rhoptry protein ROP18 is an Irga6-specific kinase and regulated by the dense granule protein GRA7. 2016;18(October 2015):244–59.
83. Sánchez V, De-la-Torre A, Gómez-Marín JE. Characterization of ROP18 alleles in human toxoplasmosis. Parasitol Int [Internet]. 2014;63(2):463–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.parint.2013.10.012>
84. Torres-Morales E, Taborda L, Cardona N, De-la-Torre A, Sepulveda-Arias JC, Patarroyo MA, et al. Th1 and Th2 immune response to P30 and ROP18 peptides in human toxoplasmosis. Med Microbiol Immunol. 2014;203(5):315–22.
85. Arenas AF, Salcedo GE, Montoya AM, Gomez-Marin JE. MSCA: a spectral comparison algorithm between time series to identify protein-protein interactions. BMC Bioinformatics [Internet]. 2015;16(1):152. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2105/16/152>
86. Lyne PD, Lamb ML, Saeh JC. Accurate prediction of the relative potencies of members of a series of kinase inhibitors using molecular docking and MM-GBSA scoring. J Med Chem. 2006;49(16):4805–8.
87. Xu L, Sun H, Li Y, Wang J, Hou T. Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 3. the impact of force fields and ligand charge

- models. *J Phys Chem B*. 2013;117(28):8408–21.
88. Sun H, Li Y, Tian S, Xu L, Hou T. Assessing the performance of MM/PBSA and MM/GBSA methods. 4. Accuracies of MM/PBSA and MM/GBSA methodologies evaluated by various simulation protocols using PDBbind data set. *Phys Chem Chem Phys*. 2014;16(31):16719–29.
 89. Gohlke H, Kiel C, Case DA. Insights into protein-protein binding by binding free energy calculation and free energy decomposition for the Ras-Raf and Ras-RalGDS complexes. *J Mol Biol*. 2003;330(4):891–913.
 90. Pierdominici-Sottile G, Palma J. New insights into the meaning and usefulness of principal component analysis of concatenated trajectories. *J Comput Chem*. 2015;36(7):424–32.
 91. Hayward S, Berendsen HJC. Systematic analysis of domain motions in proteins from conformational change: New results on citrate synthase and T4 lysozyme. *Proteins Struct Funct Genet*. 1998;30(2):144–54.
 92. Müller J, Hemphill A. Drug target identification in protozoan parasites. *Expert Opin Drug Discov*. 2016;11(8):815–24.
 93. Benkert P, Künzli M, Schwede T. QMEAN server for protein model quality estimation. *Nucleic Acids Res*. 2009;37(SUPPL. 2):510–4.
 94. Ho BK, Brasseur R. The Ramachandran plots of glycine and pre-proline. *BMC Struct Biol*. 2005;5:1–11.
 95. de Oliveira JF, Lima TS, Vendramini-Costa DB, de Lacerda Pedrosa SCB, Lafayette EA, da Silva RMF, et al. Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: Synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay [Internet]. Vol. 136, *European Journal of Medicinal Chemistry*. Elsevier Masson SAS; 2017. 305–314 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.05.023>
 96. Tripathi AC, Gupta SJ, Fatima GN, Sonar PK, Verma A, Saraf SK. 4-Thiazolidinones: The advances continue. *Eur J Med Chem*. 2014;72:52–77.
 97. Nicole Jung-Eun Kim, Victoria Breckwich Vásquezc, Elizabeth Torrese, R. M., Bud Nicola and CK. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav*. 2017;176(3):139–48.
 98. Niedelman W, Gold DA, Rosowski EE, Sprokholt JK, Lim D, Arenas AF, et al. The rhopty proteins ROP18 and ROP5 mediate *Toxoplasma gondii* evasion of the murine, but not the human, interferon-gamma response. *PLoS Pathog*. 2012;8(6).
 99. Qiu W, Wernimont A, Tang K, Taylor S, Lunin V, Schapira M, et al. Novel structural and regulatory features of rhopty secretory kinases in *Toxoplasma gondii*. *EMBO J* [Internet]. 2009;28(7):969–79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2009.24>

100. Rocha-Roa C, Cossio-Pérez R, Molina D, Patiño J, Cardona N. In silico study of Moxifloxacin derivatives with possible antibacterial activity against a resistant form of DNA gyrase from *Porphyromonas gingivalis*. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2018;95:30–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.07.015>
101. Rafai NH, Lajis MA, Hosni NAJ. Performance of TiAlN-PVD Coated Carbide Tools in Milling AISI D2 Hardened Steels. 2013;36(2):1481–5.
102. Trotsko N, Bekier A, Paneth A, Wujec M, Dzitko K. Synthesis and in vitro anti-toxoplasma gondii activity of novel thiazolidin-4-one derivatives. *Molecules*. 2019;24(17).
103. Allouche A. Software News and Updates Gabedit — A Graphical User Interface for Computational Chemistry Softwares. *J Comput Chem*. 2012;32:174–82.
104. Wernimont AK, Artz JD, Finerty P, Lin YH, Amani M, Allali-Hassani A, et al. Structures of apicomplexan calcium-dependent protein kinases reveal mechanism of activation by calcium. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2010;17(5):596–601. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nsmb.1795>
105. Atbiaw N. Review on targeted drug delivery against intracellular pathogen. *Pharm Pharmacol Int J*. 2018;6(3):183–9.
106. Sanford AG, Schulze TT, Potluri LP, Watson GF, Darner EB, Zach SJ, et al. IJP : Drugs and Drug Resistance Derivatives of a benzoquinone acyl hydrazone with activity against *Toxoplasma gondii*. *IJP Drugs Drug Resist* [Internet]. 2018;8(3):488–92. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2018.11.001>
107. Aston WJ, Hope DE, Nowak AK, Robinson BW, Lake RA, Lesterhuis WJ. A systematic investigation of the maximum tolerated dose of cytotoxic chemotherapy with and without supportive care in mice. *BMC Cancer*. 2017;17(1):1–10.
108. Watts E, Zhao Y, Dhara A, Eller B, Patwardhan A, Sinai AP. Novel approaches reveal that *toxoplasma gondii* bradyzoites within tissue cysts are dynamic and replicating entities in vivo. *MBio*. 2015;6(5):1–24.
109. Maxson & Mitchell. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav*. 2016;176(1):139–48.
110. Doggett JS, Nilsen A, Forquer I, Wegmann KW, Jones-Brando L, Yolken RH, et al. Endochin-like quinolones are highly efficacious against acute and latent experimental toxoplasmosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(39):15936–41.
111. Subba R, Vidadala R, Rivas KL, Ojo KK, Hulverson MA, Zambriski JA, et al. HHS Public Access. 2017;59(13):6531–46.
112. McPhillie M, Zhou Y, El Bissati K, Dubey J, Lorenzi H, Capper M, et al. New

paradigms for understanding and step changes in treating active and chronic, persistent apicomplexan infections. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6(May):1–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep29179>

113. Das C Hansen KC and Tyler JK LMS. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2017;176(3):139–48.
114. Maccari R, Vitale RM, Ottanà R, Rocchiccioli M, Marrazzo A, Cardile V, et al. Structure-activity relationships and molecular modelling of new 5-arylidene-4-thiazolidinone derivatives as aldose reductase inhibitors and potential anti-inflammatory agents. *Eur J Med Chem* [Internet]. 2014;81:1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.05.003>
115. Shah S, Singh B. Urea/thiourea catalyzed, solvent-free synthesis of 5-arylidene-thiazolidine-2,4-diones and 5-arylidene-2-thioxothiazolidin-4-ones. *Bioorg Med Chem Lett.* 2012;22(17):5388–91.
116. Tverdokhlebov A V., Andrushko AP, Resnyanska E V., Tolmachev AA. Pyrrolo[2,1- *b*]thiazol-3(2 *H*)-ones as Precursors of *N* -Alkyl-2-(1 *H* -pyrrol-2-ylthio)acetamides and *N* -Alkyl-2-(1 *H* -pyrrol-2-ylthio)propanamides. *Synthesis (Stuttg).* 2004;2004(14):2317–22.
117. Maccari R, Vitale RM, Ottanà R, Rocchiccioli M, Marrazzo A, Cardile V, et al. Structure-activity relationships and molecular modelling of new 5-arylidene-4-thiazolidinone derivatives as aldose reductase inhibitors and potential anti-inflammatory agents. *Eur J Med Chem.* 2014;81:1–14.