

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Parasitología



TESIS DOCTORAL

***Trichomonas vaginalis*: corroboración experimental de modelos virtuales de cribado farmacológico y caracterización biomolecular de aislados**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Alexandra Ibáñez Escribano

Directores

José Antonio Escario García-Trevijano

Vicente Jesús Arán Redó

Juan José Nogal Ruiz

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

***Trichomonas vaginalis*: CORROBORACIÓN EXPERIMENTAL
DE MODELOS VIRTUALES DE CRIBADO FARMACOLÓGICO Y
CARACTERIZACIÓN BIOMOLECULAR DE AISLADOS**

Alexandra Ibáñez Escribano

Directores:

Dr. D. José Antonio Escario García-Trevijano

Dr. D. Vicente J. Arán Redó

Dr. D. Juan José Nogal Ruiz

Madrid, 2015

**CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL CAMPUS MONCLOA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



***Trichomonas vaginalis*: CORROBORACIÓN EXPERIMENTAL DE MODELOS
VIRTUALES DE CRIBADO FARMACOLÓGICO Y CARACTERIZACIÓN
BIOMOLECULAR DE AISLADOS**

MEMORIA DE TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

Presentada por:

Alexandra Ibáñez Escribano

Y dirigida por los doctores:

D. José Antonio Escario García-Trevijano

D. Vicente J. Arán Redó

D. Juan José Nogal Ruiz

Madrid, 2015



Departamento de Parasitología
Facultad de Farmacia
UCM

José Antonio Escario García-Trevijano, Doctor en Farmacia y Catedrático de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, Vicente J. Arán, Doctor en Química Orgánica e Investigador Científico Titular del Instituto de Química Médica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y Juan José Nogal Ruiz, Doctor en Farmacia y Contratado Doctor del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que la Tesis Doctoral titulada “*Trichomonas vaginalis*: Corroboración experimental de modelos virtuales de cribado farmacológico y caracterización biomolecular de nuevos aislados” presentada por Dña. Alexandra Ibáñez Escribano, ha sido realizada en el Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid bajo su supervisión, cumpliendo todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

De acuerdo con la normativa vigente, se firma el presente certificado, autorizando su defensa como directores de la presente Tesis Doctoral.

En Madrid, a 24 de octubre de dos mil quince.

Dr. José Antonio Escario

Dr. Vicente J. Arán

Dr. Juan José Nogal Ruiz

Fdo.

Fdo.

Fdo.

“Daria todo lo que sé, por la mitad de lo que ignoro”

René Descartes

Con todo mi cariño y agradecimiento a:

Mis padres y abuelos

Mis hermanos, Álvaro y Gonzalo

Mi compañero de viaje, Atsis

Y a todos los que siguen creyendo en mí

Esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a:

Beca-contrato predoctoral PICATA del Campus de Excelencia Internacional Campus Moncloa (UCM-UPM y CSIC) 2011-2015.

Ha sido parcialmente financiada gracias a los siguientes proyectos:

“Desarrollo de nuevos agentes quimioterápicos para enfermedades olvidadas y cáncer: Síntesis, estudio biológico y optimización de compuestos cabezas de serie” Referencia: SAF2009-10399. Subprograma Ministerio de Educación y Defensa. 2009-2013.

“Selección racional, obtención y evaluación de nuevos compuestos tricomonocidas y antimaláricos” Referencias: A/024093/09 y A/030156/10 otorgada por la Agencia Española de Cooperación Internacional al Desarrollo (AECID). 2010-2012.

“Acción integral para el desarrollo virtual y experimental de moléculas con actividad antiparasitaria: resistencia, diseño, modificación estructural y corroboración experimental” Referencia: AP/036539/11 concedida por la AECID. 2012-2013.

“Fortalecimiento institucional en la investigación de nuevos agentes antiparasitarios contra enfermedades parasitarias olvidadas y de alto impacto social” Referencia: Proyecto de Cooperación Internacional de la UCM en la IX convocatoria de 2012. 2013-2014.

“*In vitro* Investigation of Trichomonocidal Activity of 3,3'-diindolylmethane and Artemisinin”. Contrato Artículo 83 entre el grupo de Terapia Antiparasitaria y el laboratorio BioResponse LC. 2013-2014.

Grupo de Investigación UCM-CEI Campus Moncloa (Clúster Medicina Innovadora) “Terapia Antiparasitaria”. Referencia: 911120.

Agradecimientos

Durante este capítulo tan importante en mi vida profesional quiero agradecer a muchas personas su apoyo constante y la confianza que han depositado en mí. Gracias a todos por ayudarme en cada tropiezo del camino. Esta Tesis también es en parte vuestra, creada de trocitos de todos vosotros.

En primer lugar quiero agradecer a mis directores su paciencia y ayuda. A **José Antonio Escario**, porque desde el primer momento apostó en una estudiante de licenciatura ilusionada y con muchas ganas de aprender. Desde el primer momento me brindó la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación como una más. Has sido el mejor padre científico que se puede tener y el que me ha enseñado el verdadero significado de la palabra equipo.

A **Vicente Arán**, por sus innumerables consejos y enseñanzas y su risa imborrable. Gracias por enseñarme a crear un ambiente de grupo divertido, en el que se pueden sacar grandes ideas disfrutando de una reunión de trabajo, a pesar de que a veces no seamos capaces de seguirte en tus explicaciones químicas con la agilidad que debiéramos.

A **Juan José Nogal**, por apostar en mí siendo aún una estudiante de farmacia, incluso antes de que tuviera claro que mi vocación era la docencia y la investigación. Por enseñarme todo lo que se y porque a veces, pensar distinto puede ser más enriquecedor que opinar de la misma forma.

Y a mi “directora en la sombra”, **Alicia Gómez Barrio**. Sin su apoyo, confianza y buenos consejos ni yo ni esta Tesis hubiésemos llegado a donde estamos ahora. Gracias por estar siempre ahí, discreta pero siempre pendiente.

A **Paco Ponce**, porque contigo empecé en el mundo de la biología molecular y te convertiste en un director en funciones durante mi primera etapa como doctoranda. Tu ayuda en las crisis informáticas y moleculares, así como el cariño en la distancia que me brindaste durante mi estancia es algo que siempre recordaré con cariño.

No puedo olvidarme en esta familia científica de dar las gracias a mis dos compañeras y hermanas, mi **Cris** y mi **Yane**, por entenderme con una sola mirada, por no ser necesario una palabra para entender la vorágine de sentimientos, alegrías y frustraciones. Gracias por vuestra infinita paciencia, apoyo, risas y abrazos.

A mis compañeras de departamento, **Vega, Virginia** y **Bea** porque os habéis convertido en amigas. Un ejemplo de voluntad y ganas de sacar adelante un doctorado sin poder dedicarle todo el tiempo que a uno le gustaría. Sois todo un ejemplo a seguir.

A mi compañero y vecino de laboratorio, **Juan González**. Gracias por tu sonrisa incluso en los días grises. Por esos ánimos y nuestro "A tope" que se han convertido en el saludo de media mañana. Y al resto de compañeros que han pasado por el Departamento, **Laura Ullate, Pablo y Rory**, porque también habéis sido partícipes de esto.

A **Mercedes**, por sus visitas al laboratorio en los momentos que más se hacían falta para animar con un toque dulce el día. Y a **Catina**, responsable de que me enamorase de la Parasitología y escogiese más adelante esta especialidad para continuar mi carrera profesional.

A **Paco Bolás**, por su apoyo desde el primer día que comuniqué mi deseo de solicitar la beca de colaboración. Nunca olvidaré ese apoyo constante y la confianza en mi capacidad para poder sacar adelante este trabajo y tratarme como una más del personal docente e investigador del Departamento.

Y al resto de miembros de esta otra familia parasitológica, **Juan García, Marta, Carmen Cuéllar, Carmen Cuesta, D. Antonio, Jose Luis Guillén, Ángel Sánchez-Covisa, Maruxi, Maribel**, porque con ellos he aprendido y compartido día a día una etapa muy enriquecedora de mi vida. Son innumerables los recuerdos que me arrancan una sonrisa sin los cuales no podría haber llegado al final de esta etapa.

A **Javier, Inés, Piedad, Manoli y Judith**, no sólo excelentes profesionales capaces de resolver cualquier problema técnico o burocrático sino gente maravillosa que ha hecho de este Departamento un sitio donde se puede ser feliz trabajando a pesar de las dificultades.

A mis chic@s C.E.U., muchos de ellos no solo colegas sino también amigos (**Ángela, Carmencita, Fer, Carolina, Luciana, Angélica, Sergio, Loli, Tiago**). Por muchos más momentos de risas dentro y fuera del ámbito parasitológico.

No quiero olvidarme tampoco de grandes investigadores como **Jorge** (porque siempre serás "Jorge el de Alcalá") y **Rafa Martínez**, parasitólogos de los que he aprendido mucho y espero poder seguir enriqueciéndome de sus consejos.

Y por supuesto mi agradecimiento y cariño al **Dr. Alderete** y **Sue Aldrete**. Thanks for your help and *savoir faire*. You have become a mentor and the kind of researcher I will like to be: "*It is the stars,/ The stars above us, govern our conditions.*" (*King Lear, act 4, scene 3*). "*The fault, dear Brutus, is not in our stars,/ But in ourselves.*" (*Julius Caesar, act 1, scene 2*)

No puedo dejar de agradecer a mi tutora, la Dra. **Imelda** López-Villaseñor la oportunidad de aprender todo lo que se sobre biología molecular. Mi estancia científica en su laboratorio del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, marcó un antes y un después en mi vida. Ha

sido sin duda una de las experiencias más enriquecedoras que he vivido nunca tanto a nivel profesional como personal. **Karla**, la mejor técnico académico y amiga que podría haber encontrado, **Nataly** y **Erick**, estoy segura de que lograréis llegar muy lejos, son grandes investigadores. **Lluvia**, **Ernesto**, **Luciana**, **Felipe**, y por supuesto al Dr. **Roberto** Hernández, Dra. **Ana** María Cevallos y el Dr. **Roberto** Coria, gracias.

Mi familia y amigos siempre respetando mi decisión y animándome a cumplir un reto y un sueño. Gracias mamá, por sacrificar tantas cosas por tu familia. Y por supuesto a lo más preciado que tengo, mi “chinito”. Alvarete, aunque no puedas leer estas palabras, gracias por formar parte de mi día a día. Me has enseñado a valorar las pequeñas cosas y a que se puede superar cualquier obstáculo. Mis mayores virtudes te las debo a ti.

Aunque no pueda nombrar uno a uno a todos mis amigos que habéis estado pendientes de mí, desde mis amigos de la infancia, del colegio, de francés, compis de la carrera (gracias **Cova**), de la “farma”, amistades no tan antiguas pero que parece que nos conociésemos desde hace años, a mi reciente nueva “familia”, etc., a todos una y otra vez GRACIAS. Este trabajo está formado por trocitos y vivencias que he compartido con vosotros, porque todos me habéis ayudado a hacerlo posible.

A todos y cada uno de vosotros, que habéis formado parte de cada paso en estos 5 años de doctorado. Sin vuestro cariño y comprensión, esta Tesis no habría sido posible.

Abreviaturas

%Abs	Porcentaje de absorción
%IC	Porcentaje de inhibición de crecimiento
2D	Bidimensional
5-NI	5-nitroimidazol
5-NI	5-nitroimidazoles
5-NI	5-nitroimidazoles
A	Alto
A.	Promedio
Ac	Anticuerpo
Acmo	Anticuerpo monoclonal
ACT	Actinina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEMPS	Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios
ALD	α -aldolasa
AP	Adhesina
ARNdc	Ácido ribonucleico de doble cadena
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
Asint.	Asintomático
Ax	Axostilo
B	Bajo
BD	Base de datos
BHE	Barrera hematoencefálica
Bn	Bencilo
BSA	Albúmina sérica bovina
C	Carga
Cariofil.	Cariofileno
C.D.	Cara diafragmática
Crisant.	Crisantenilo
c.s.p.	cantidad suficiente para
C.V.	Cara visceral
C'	Coefficiente de correlación de Matthews

CAM	Complejo de Ataque a la Membrana
CARDD	Computational-Aided Rational Drug Design
CC ₅₀	Concentración citotóxica 50
CD59	Protectina
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CDF	Factor de desprendimiento celular
CE ₅₀	Concentración efectiva 50
cél.	célula
CEV	Células del epitelio vaginal
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
Citoadh.	Citoadherencia
Citotox.	Citotoxicidad
CLogP	Coefficiente de partición octanol/agua
CMC	Concentración mínima citocida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CML	Concentración mínima letal
CoA	Coenzima A
CoMFA	Comparative Molecular Field Analysis
CoMSIA	Comparative Molecular Similarity Indices Analysis
CP	Cisteín-proteasa
CSIC	Consejo Superior de Investigaciones Científicas
CV	Cribado virtual
D.	Directo
D	Dureza
D.S.	Desviación estándar
DIM	3,3'-Diindolilmetano
DM	Descriptor molecular
DMPA	Sistemas depot de medroxiprogesterona
DMSO	Sulfóxido de dimetilo
DS	Doble estocástico
E	Electronegatividad
Efect. Rep.	Efectos sobre la reproducción
ENO	α -enolasa

Esp.	Especificidad
Est.	Estómago
Et	Etilo
F.	Fluorocromo
Fd	Ferredoxina
FDA	Food and Drug Administration
Fn	Fibronectina
FN	Falsos negativos
FP	Falsos positivos
FR	Flagelo recurrente
GAP	3-fosfato deshidrogenasa
GAPDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
GEN	General
Go	Complejo de Golgi
GPI	Glucosilfosfatidilinositol
GR	Glóbulos rojos
Grasa Pelv.	Grasa pélvica
h	Hidrogenosoma
H	Hígado
H ₀	Hipótesis nula
Ha	Aceptores de puentes de hidrógeno
Hd	Donadores de puentes de hidrógeno
HD	Hidrogenasa
I.T.S.	Infección de transmisión sexual
I3C	Indol-3-carbinol
IF	Inmunofluorescencia
Ig	Inmunoglobulina
IGS	Espaciador intergénico
IP	Indice de patogenia
IRP	Promotor génico dependiente de hierro
Irrit.	Irritación
IS	Indice de selectividad
ISSR/Inter-SSR	Intermicrosatélite

ITS	Internal Transcribed Spacer
<i>k</i> -MCA	Análisis de clúster mediante <i>k</i> -Medias
LGO	<i>Leave-Group-Out</i>
LGT	<i>Lateral gene transfer</i>
Liq. Asc.	Líquido Ascítico
LPS	Lipofosfoglicano
MA	Masa atómica
M	Medio
Me	Metilo
ME	Muestra endocervical
Met	Metilo
Mh	<i>Mycoplasma hominis</i>
min	minutos
MLST	Multilocus Sequence Typing
Mo	Membrana ondulante
Mort.	Mortalidad
MS	Microsatélite
MTT	3-[4,5-dietiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
MTZ	Metronidazol
MTZ	Metronidazol
MU	Muestra uretral
Mut.	Mutagénesis
MV	Muestra vaginal
Nu	Núcleo
N	Mínimo
N.I.H.	Instituto Nacional de Salud Norteamericano
NAAT	Amplificación de ácidos nucleicos
NMRI	Naval Marine Resarch Institute
NS	No estocástico
nt	Nucleótido
O(H)	Orina de hombre
O(M)	Orina de mujer
OMS	Organización Mundial de la Salud

P	Polarizabilidad
P.B.S.	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
p.i.	Post-infección
Panc.	Páncreas
pb	Pares de bases
PBS-G	Phosphate buffer saline glucose
Perit.	Peritoneo
PFOR	Piruvato:ferredoxina oxidorreductasa
Ph	Fenilo
Pip	Piperidino
Pir	Pirrolidino
PM	Probabilidad mutua
PMN	Leucocitos polimorfonucleares
Q	Porcentaje de buena clasificación
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity Relationship</i>
R	Refractividad
R.	Reverso
Resist.	Resistente
RFA	Razón de falsa alarma
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RSZ	Resazurina
S	Blandura
SBF	Suero bovino fetal
SC	Sistema del Complemento
SCG	Gen de copia única (<i>Single Copy Gen</i>)
SCS	Succinil coenzima A sintetasa
SE	Serie de entrenamiento
Sens.	Sensibilidad
SH	Suero humano
SIDA	Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida
Sint.	Sintomatología
SMC	Sistema multclasificador

SNP <i>Polimorphism</i>)	Polimorfismo de nucleótido simple (<i>Single Nucleotide</i>)
SP	Serie de predicción
SS	Estocástico
SSR	Microsatélite
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TDZ	Tinidazol
TDZ	Tinidazol
TOMOCOMD	TOpological MOlecular COmputer Design
TPSA	Área de superficie polar
Tum.	Tumorigénico
Tv	<i>Trichomonas vaginalis</i>
TVV	<i>Trichomonas vaginalis</i> virus
TYM	Trypticase Yeast Maltose
UAH	Universidad de Alcalá de Henares
U.C.M.	Universidad Computense de Madrid
UE	Unión Europea
UNG	Uretritis no gonocócica
V	Voto mayoritario
VdW	Volumen de van der Waals
v.o.	vío oral
VC	Validación cruzada
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
VN	Verdaderos negativos
VP	Verdaderos positivos
VPH	Virus del papiloma humano
X	Máximo

Índice

Índice

ABREVIATURAS

I. SUMMARY	1-5
II. RESUMEN	6-11
III. INTRODUCCIÓN	12-69
1. Antecedentes históricos	12
2. Encuadre taxonómico	12
3. Morfología	13
4. Ciclo biológico	16
5. Epidemiología y factores de riesgo	17
6. Manifestaciones clínicas y complicaciones asociadas a la enfermedad	19
7. Métodos de diagnóstico	22
8. Tratamiento farmacológico	27
8. A. 5-Nitroimidazoles	27
8. B. Otras alternativas terapéuticas	33
9. Patogenia	37
9. A. Factores asociados al hospedador:	38
a) pH vaginal y microflora	38
b) Ciclo menstrual y niveles hormonales	39
c) Presencia de hierro	41
d) Presencia de zinc	42
e) Niveles de poliaminas	43
9. B. Factores asociados al parásito:	44
9. B. 1) Mecanismos dependientes de contacto	44
a) Adhesión	44
b) Fagocitosis	47
9. B. 2) Mecanismos independientes del contacto	48
a) Cisteín-proteasas (CP)	48
b) Factor de desprendimiento celular (CDF)	50
c) Presencia de virus de doble cadena (TVV)	50
d) Presencia de <i>Mycoplasma hominis</i>	51
9. C. Respuesta inmunitaria	52
10. Caracterización genotípica	53
10. A. RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)	54
10. B. RFLP (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)	54
10. C. Genes ribosomales	54
10. D. Espaciadores internos (ITS)	55
10. E. Microsatélites (MS o SSR)	57
10. F. Polimorfismo de nucleótido simple (SNP)	58
11. Métodos de cribado farmacológico	60
11. A. Métodos <i>in silico</i>	60
11. B. Métodos <i>in vitro</i>	64
11. C. Métodos <i>in vivo</i>	67

IV. MATERIALES Y MÉTODOS	70-117
1. MATERIALES	70
A. Material de laboratorio	70
B. Material biológico	71
C. Medios de cultivo	73
D. Soluciones, colorantes y reactivos	74
E. Programas informáticos y estadísticos	80
F. Productos ensayados	82
F.1. Compuestos de referencia	82
F.2. Productos naturales	82
- Fracciones de <i>Artemisia absinthium</i>	82
- 3,3'-Diindolimetano (DIM)	83
F.3. Productos de síntesis	84
- Serie VATR	84
- Serie FR	89
2. MÉTODOS	90
A. Mantenimiento y conservación de los aislados y las líneas celulares	90
B. Cribado farmacológico	91
B. 1. Método <i>in silico</i>	91
B. 1. 1. Creación de la base de datos (BD)	91
B. 1. 2. Diseño de la Serie de Entrenamiento y Serie de Predicción	92
B. 1. 3. Obtención de los modelos de predicción QSAR	92
B. 1. 4. Sistemas multclasificadores de ensamblaje de los modelos QSAR	95
B. 1. 5. Validación de los modelos	95
B. 2. Método <i>in vitro</i>	96
B. 2. 1. Recuento hemocitométrico	96
B. 2. 2. Método espectrofluorimétrico	97
B. 2. 3. Determinación de la citotoxicidad inespecífica en líneas celulares	98
B. 3. Método <i>in vivo</i>	99
C. Caracterización biológica	102
C. 1. Sensibilidad a fármacos de referencia: metronidazol y tinidazol	102
C. 2. Citoadherencia celular	102
C. 3. Citotoxicidad parasitaria	104
C. 4. Presencia de virus TVV	105
C. 5. Presencia de <i>Mycoplasma hominis</i>	106
C. 6. Sensibilidad al sistema del complemento	107
C. 7. Modelo murino de patogenia experimental de <i>Trichomonas vaginalis</i>	111
D. Caracterización molecular	112
D. 1. Extracción de ADN	112
D. 1. 1. Extracción de ADN mediante <i>kit</i>	112
D. 1. 2. Extracción de ADN mediante fenol-cloroformo	113
D. 2. Amplificación de ADN	114
D. 3. Electroforesis de los productos de PCR	116
D. 4. Purificación de ADN y secuenciación de los productos de PCR	117

V. RESULTADOS	118-173
I. PROCEDIMIENTO SECUENCIAL DE CRIBADO FARMACOLÓGICO FRENTE <i>A Trichomonas vaginalis</i>	119
I. 1. Ensayos <i>in silico</i>	119
I. 2. Ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	126
I. 2. A. Estandarización del método espectrofluorimétrico empleando resazurina para el cribado <i>in vitro</i> frente a <i>T. vaginalis</i>	126
I. 2. B. Cribado farmacológico <i>in vitro</i> de nuevos agentes tricomonocidas	132
I. 2. B. 1. Actividad farmacológica de extractos naturales	132
<i>Artemisia absinthium</i>	132
3,3'-Diindolilmetano (DIM)	133
I. 2. B. 2. Actividad farmacológica de nuevas moléculas de síntesis	134
Familia VATR (5-nitroindazoles)	134
Familia FR (nitroquinoxalinonas)	147
I. 3. Validación de los modelos de predicción mediante el cribado virtual de las series químicas VATR y FR	151
II. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLADOS DE <i>Trichomonas vaginalis</i>	153
II. 1. Caracterización biológica	153
II. 1. A. Sensibilidad a los fármacos de referencia	153
II. 1. B. Citoadherencia	155
II. 1. C. Citotoxicidad celular	155
II. 1. D. Presencia de virus (TVV)	157
II. 1. E. Presencia de <i>Mycoplasma hominis</i>	158
II. 1. F. Patogenia experimental en modelo murino	160
II. 1. G. Estrategias de evasión del sistema del complemento de <i>T. vaginalis</i> : Papel de la CD59 y sensibilidad al suero humano	162
II. 2. Caracterización molecular	168
II. 2. A. ITS: <i>Internal Transcribed Spacers</i>	168
II. 2. B. MS/SSR: Microsatélites	169
II. 2. C. SNP: <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>	171
GP63a	171
PMS1	172
VI. DISCUSIÓN	174-194
I. PROCEDIMIENTO SECUENCIAL DE CRIBADO FARMACOLÓGICO FRENTE A <i>Trichomonas vaginalis</i>	174
II. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLADOS DE <i>Trichomonas vaginalis</i>	185
VII. CONCLUSIONES / CONCLUSIONS	195-198
VIII. PROPUESTAS FUTURAS / FUTURE PROPOSAL	199-202
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	203-226
X. LISTA DE FIGURAS	227-231
XI. LISTA DE TABLAS	232-235
XII. ANEXOS	236-251

I. Summary

Summary

***Trichomonas vaginalis*: EXPERIMENTAL VALIDATION OF NOVEL COMPUTATIONAL MODELS FOR PHARMACOLOGICAL SCREENING AND BIOMOLECULAR CHARACTERIZATION OF ISOLATES**

Trichomonosis is one of the most prevalent sexually transmitted infections (S.T.I.) worldwide, with an estimated 276 million cases per year (WHO, 2012). This epidemiological data underestimate the health problem due to the percentage of asymptomatic cases and the fact that trichomonosis is not a reportable disease.

Clinically, *Trichomonas vaginalis* infection can produce a wide range of pathological manifestations, from asymptomatic presentation to severe inflammatory and invasive lesions in genitourinary tract of both men and women. However, the occurrence of symptomatic infection in men is rare, and these patients are considered to be asymptomatic carriers of the parasite. The microhemorrhagic lesions produced during the parasite-host cell interaction and the local inflammation induced, even in subclinical infections, explain the strong association between trichomonosis and the risk in the transmission and acquisition of H.I.V. (Draper *et al.*, 1998; McClelland *et al.*, 2007) as well as other genitourinary pathogens including *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, papillomavirus and herpesvirus. Not with understanding, the role displayed by *T. vaginalis* as viral vector could explain its role as a risk factor in the development of cervical and prostate neoplasia.

Metronidazole (MTZ) is currently available for treating trichomonosis. However, this compound has been the drug of choice since 1959, and metronidazole resistant isolates have been reported since 1962 in unsuccessfully treated patients. Nowadays, it is estimated that between 2.5% and 10% of all clinical cases of trichomonosis are caused by *T. vaginalis* resistant isolates. The alternative drug approved for *T. vaginalis* treatment is tinidazole (TDZ), another 5-nitroimidazole. Although both treatments are well tolerated, these drugs are contraindicated during breast feeding and pregnancy. In addition, adverse side effects and cross-resistance among 5-nitroimidazoles derivatives have been reported.

No alternative drugs are available for treatment of refractory cases, being necessary the research of therapeutic alternatives for this S.T.I. However, the expenditure on new drug discovery for the pharmaceutical industry is high, not being profitable the investment in a parasitic disease defined by some authors as a “neglected infection of poverty”. For this reason, the development of new methods for the identification of potential active agents in the preclinical research is urgently needed. In the last years, the computer-based methods have emerged as a complementary approach for drug discovery. Many research groups are using computational techniques due to its cost- and time-efficient properties. In this sense, a sequential step-wise methodology based on *in silico*, *in vitro* and *in vivo* experimental procedures for the prompt detection of potential trichomonocidal agents has been designed and validated.

On the other hand, *T. vaginalis* is a very complex organism. This parasite has developed diverse mechanism for the colonization of the genitourinary tract. *T. vaginalis* must

survive in a hostile environment exposed to pH and hormones fluctuations, immune responses and a protective bacterial flora that guards the host from pathogenic organisms.

Although the pathogenesis of *T. vaginalis* is not fully understood, it is widely accepted that this parasite possess contact and non-contact dependent mechanisms for the colonization of genitourinary tract. Adhesion is the first and critical step in the interaction with the epithelial cell to establish the infection. Other interesting factors include enzymatic secretions that help the parasite in tissue invasion and immune system evasion. All this notwithstanding, it is conceivable that the variable pathobiology of this S.T.I. depends on many intrinsic (biological and genetic) factors from the parasite and the host, as well as extrinsic factors like zinc or iron-rich environments.

The draft genome of this protozoon was recently published (Carlton et al., 2007). Surprisingly, *T. vaginalis* possess one of the highest (160 MB) and repetitive genomes (> 65% repetitive and transposable elements), with a core set of 60,000 protein-coding genes. However, for the moment, more studies are needed for a better understanding of this surprising large genome and its relation with the variable behavior of the parasite.

In light of the exposed above, the study of biomolecular features for a better understanding of the dynamics and pathology of *T. vaginalis* is critical.

The **main objectives** of this thesis are:

- I. Design and validation of a sequential procedure for the accurate identification of putative trichomonacidal agents.
- II. Biological characterization of *T. vaginalis* isolates with the aim of identify the most relevant phenotypic features for the correct classification of isolates. In addition, identify genomic regions for intraspecific differentiation and determine the correlation between the biological and the genetic studies conducted.

The **concrete objectives** are:

- I. Related to the design and validation of a sequential procedure for the accurate identification of putative trichomonacidal agents, the specific objectives are:
 - A. Development of computational LDA (Linear Discrimination Analysis)-based QSAR (Quantitative Structure-Activity Relationship) models based on a *de novo* dataset composed by molecules previously assayed against *T. vaginalis*.
 - B. Validation of an *in vitro* screening assay using resazurin as spectrofluorometric substrate for the substitution of the classic method of microscopic count.
 - C. Pharmacologic screening of natural products and two chemical series following the procedure proposed.
- II. Biological characterization of *T. vaginalis* isolates with the aim of identified the most relevant phenotypic features for the correct classification of isolates. In addition, identify genomic regions for intraspecific differentiation and determine the correlation between the biological and the genetic studies conducted.

- A. Phenotypic characterization of isolates by the study of sensitivity to MTZ and TDZ, cytoadherence, cytotoxicity to mammalian cells, presence of viruses and bacteria, experimental pathogenicity in mice and sensitivity to human sera.
- B. Explore the mechanisms of immune evasion by the use of CD59 for the protection against the complement system.
- C. Molecular characterization of novel genetic markers like internal transcribed spacers (ITS), microsatellites (MS) and single nucleotide polymorphisms (SNP) in single copy genes (SCG) of the isolates previously characterized phenotypically.

According to the two main objectives of this thesis, the results and discussion has been presented in two chapters.

The first part of the thesis deals with the proposal of a sequential methodology which involves the creation of 45 LDA-QSAR models based on atom-type linear indices. Firstly, a data set of 592 molecules (active and inactive entities) previously evaluated against *T. vaginalis* and collected from the literature was created. Then, cluster analyses were performed for both active and inactive series, in order to split the dataset into training and predicting series. Finally the forty five QSAR models were firstly designed using the TOMOCOMD-CARDD (TOPOlogical MOlecular COMputer Design-Computed Aided "Rational" Drug Design) software based on 2D (topological) molecular descriptors, and then, Linear Discriminant Analysis was implemented using the STATISTICA software. Finally, the multiclassifier software DSDE, selected the best combination of the 45 initial *in silico* models. The three models selected (22, 26 and 45) and the fourth virtual model based on an assembly of the previous ones showed an adequate percentage of correct classification (accuracy) varying from 92.7% - 97.0% for the training set and 84.9% - 90.1% for the test set. However, the posterior use in the virtual screening of novel chemical entities showed a reduction in the correct classification as active/inactive according to the *in vitro* results. However, a correlation between the accuracy of the virtual models proposed and the existence of chemical analogs in the database was observed. In this sense, the feedback of the training set with novel chemical entities is necessary to reinforce the robustness of these LDA-QSAR models.

The second filter of these sequential step-wise procedure is the *in vitro* screening. A modified fluorimetric assay for the screening of trichomonacidal drugs using resazurin as redox dye has been optimized. Although this method had been previously developed by other research groups, the detection of spontaneous reduction of the substrate by the culture media obligates to refine the technique. To validate the assay, the experimental conditions were adjusted. Then, the trichomonacidal activity of three trichomonacidal drugs (MTZ, secnidazole and clotrimazole) and eight chemical compounds were determined by the classical method of hemocytometer count and by the proposed fluorimetric assay in parallel. The results show a perfect correlation, demonstrating that the resazurin microtiter assay is an affordable, rapid, sensitive and less time consuming method for the screening of new trichomonacidal agents.

Only those compounds with active antiparasitic profile are tested to determine the unspecific cytotoxic activity in Vero mammalian cells in order to support the specific antiprotozoal activity. Finally, the best candidates are evaluated *in vivo* in a murine model of intraperitoneal trichomonosis.

Two chemical families composed by 148 5-nitroindazole derivatives and 21 nitroquinoxalinones have been evaluated following the sequential screening exposed above. For the first series, twelve molecules displayed a remarkable activity against *T. vaginalis* with a inhibitory concentration 50 (IC_{50}) < 20 μ M. The 5-nitroindazole derivative VATR 145 showed the highest activity against the *T. vaginalis* metronidazole-resistant isolate (IC_{50} = 0.5 μ M), even higher than that of the reference drug (IC_{50} MTZ = 4.2 μ M). On the other hand, in relation to quinoxalinones, the 7-nitro-4-(3-piperidinopropyl) derivative FR9 achieved the highest trichomonacidal activity (IC_{50} = 18.7 μ M) and was subsequently assayed *in vivo*. A 50% reduction of pathogenic injuries after 7 days of oral treatment with 50 and 100 mg/kg doses was observed in the experimental groups.

The results obtained in the second chapter of this thesis demonstrate the polymorphic behavior of this parasite which is reflected in the clinical profile. The comprehension of *T. vaginalis* pathobiology is one of the main challenges for the investigators. For the biological and molecular characterization, ten *T. vaginalis* isolates from different geographic regions have been evaluated. JH31A4, C-1:NIH and IR78 were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), other three samples were isolated in an epidemiologic study performed by our research group in the Community of Madrid and four fresh isolates were acquired during the development of this thesis between January and March of 2014. The determination of the 5-nitroimidazole sensitivity classified all the isolates as metronidazole and tinidazole sensitive with the exception of IR78, which was MTZ and TDZ resistant. Only two fresh isolates were positive to *Mycoplasma hominis* and 60% of them were classified as TVV+. The experimental pathogenicity displayed in mice, especially the hepatic injuries, suggests a correlation with the clinical symptoms.

In parallel, the genetic studies revealed no nucleotide divergence in the internal transcribed spacer regions (ITS) between *T. vaginalis* isolates. However the determination of length variation in three selected MS (006, 129 and 184) and the sequencing of the two housekeeping genes GP63a and PMS1, grouped identically the ten isolates in two clusters.

According to the last objective proposed, the correlation between the presence of TVV and MTZ resistance with the molecular classification was observed. These findings confirm the robustness of these 5 loci, in addition with the determination of TVV and the pathogenic studies in murine model for the correct classification of lab and fresh isolates.

Also, a first incursion in the determination of *T. vaginalis* immune evasion was also conducted. Confocal microscopy of *T. vaginalis* laboratory cultures, trichomonads harvested from mice ascites and parasites co-cultured with murine erythrocytes which possess membrane-associated CD59 were compared. The results showed that, host CD59 is acquired by *T. vaginalis* to evade complement-mediated lysis.

In summary, the **conclusions** obtained in this thesis are:

I. 1. The critical step for the development of accurate ADL-QSAR models is the design of a database with a wide variability of chemical structures to assure an adequate extrapolation power.

I. 2. The ADL-QSAR models based on linear indices are insufficient for the correct prediction of novel trichomonacidal compounds. The design and incorporation of quadratic and bilinear indices could increase the correct identification of active agents.

I. 3. The use of the multiclassifier software DSDE is an efficacy tool for the selection of the best virtual models designed by TOMOCOMD-CARDD software.

I. 4. The fluorimetric *in vitro* screening assay shows an excellent correlation with the microscopic count method. The resazurin method proposed is less-time consuming and sensitive, and could easily be automated in substitution of the classical procedure.

I. 5. The 1-bencil-3-[5-(methylamino)pentyl-5-oxy]-5-nitroindazole VATR 145 has achieved a high trichomonacidal activity against the resistant isolate, being more active than the reference drug. In addition, the 3-aminoindazole VATR 137 also displayed a remarkable activity *in vitro*. These results suggest the use of 1-bencil-5-nitroindazole derivatives with 3-aminoalkoxy substituents as scaffolds for the synthesis and evaluation of potential trichomonacidal agents.

I. 6. The sequential procedure proposed is a useful tool for the identification of novel trichomonacidal agents in preclinical studies.

II. 1. The biological characterization of *T. vaginalis* isolates corroborates the intraspecific variability of the parasitic population in a holistic fashion (experimental pathogenicity and other phenotypic factors like cytoadherence and cytotoxicity).

II. 2. *T. vaginalis* has the ability to acquire host CD59. The procurement of this protein appears to be by an alternative mechanism to evade complement-mediated lysis.

II. 3. The molecular characterization of *T. vaginalis* using ITS1-5.8 rRNA-ITS2 region is not suitable for intra-species differentiation.

II. 4. The use of three microsatellites (MS: 006, 129 and 184) and single nucleotide polymorphisms of GP63a and PMS1 genes, are useful genetic markers to classify *T. vaginalis* isolates in two clusters: Type I and Type II.

II. 5. A correlation between the genetic aggrupation in both clusters and presence of TVV, and MTZ sensitivity was observed.

II. 6. Identification of TVV, pathogenicity in mouse model and the 5 molecular loci are consolidated as biomolecular markers for the classification of both fresh and long-term cultured isolates.

II. Resumen

Resumen

***Trichomonas vaginalis*: CORROBORACIÓN EXPERIMENTAL DE MODELOS VIRTUALES DE CRIBADO FARMACOLÓGICO Y CARACTERIZACIÓN BIOMOLECULAR DE AISLADOS**

La tricomonosis urogenital humana, causada por *Trichomonas vaginalis*, es una de las infecciones de transmisión sexual (I.T.S.) de mayor prevalencia en el mundo, con un total estimado de 276 millones de casos nuevos cada año (WHO, 2012). Estos datos epidemiológicos subestiman el problema sanitario debido al porcentaje de casos asintomáticos y a que la enfermedad no es de declaración obligatoria.

Esta enfermedad cursa con un rango de manifestaciones clínicas que van desde casos asintomáticos hasta cuadros graves e invasivos de conductos genitourinarios y vejiga. El hombre es mayoritariamente asintomático convirtiéndose en un portador sano, que puede transmitir no sólo esta parasitosis, sino también otros patógenos genitourinarios de origen bacteriano (*Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*) y vírico (VIH, herpesvirus y papilomavirus). En este mismo sentido, las microhemorragias causadas por la interacción del parásito con el epitelio vaginal y la inflamación a nivel local, aumentan entre 2,5 y 5 veces el riesgo de adquirir y transmitir el VIH (Draper *et al.*, 1998; McClelland *et al.*, 2007). Asimismo, el papel vectorial de *T. vaginalis* como portador de virus parece explicar la mayor virulencia y el papel que desempeña en la transmisión de otras I.T.S. en personas co-infectadas. Por último, otra de las complicaciones graves que puede desencadenar esta enfermedad es el riesgo de desarrollar lesiones preneoplásicas en cérvix y próstata.

El único tratamiento efectivo es el metronidazol, fármaco que lleva utilizándose desde los años 60, así como el tinidazol, autorizado en 2004 para el tratamiento de esta I.T.S., ambos con estructura de 5-nitroimidazol. En la actualidad, se considera que entre un 5% y un 10% de los casos de tricomonosis se producen por aislados quimiorresistentes. Aunque son fármacos bien tolerados, se han descrito casos de hipersensibilidad y efectos secundarios que obligan a interrumpir el tratamiento, además de estar contraindicados en mujeres lactantes y durante el primer trimestre de embarazo.

Por ello, es una prioridad en esta parasitosis, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas no existentes en la actualidad. Sin embargo, la obtención de nuevos fármacos supone un coste elevado para la industria farmacéutica. Es por ello por lo que resulta fundamental contar con técnicas de búsqueda de potenciales agentes activos en la etapa pre-clínica. En esta línea, ha sido y es una constante en el ámbito de la farmacología antiinfecciosa, contar con una metodología estandarizada para el cribado que permita identificar de forma económica, rápida y eficaz nuevos agentes antiinfecciosos en general y tricomonocidas en particular. En los últimos años, gracias al avance de la ciencia computacional que permite el desarrollo de modelos virtuales, son muchos los grupos que emplean este tipo de técnicas para simplificar y abaratar las primeras etapas de investigación con el objetivo de lograr una búsqueda racional de nuevas alternativas terapéuticas. En este sentido, con el fin de poder implementar estas metodologías informáticas, se ha diseñado un proceso secuencial de cribado, integrado por una serie de filtros *in silico*, *in vitro* y finalmente *in vivo*.

Por otro lado, este organismo unicelular, probablemente amparado en su gran genoma, ha demostrado tener una alta variabilidad intraespecífica en su comportamiento patogénico. Ha desarrollado numerosos mecanismos que le han permitido sobrevivir y colonizar un nicho sometido a intensas fluctuaciones ecológicas y fisiológicas. *T. vaginalis* tiene que responder a cambios hormonales, de pH, al sistema inmune del hospedador y a una flora que va a competir por el mismo nicho.

Se ha postulado que los mecanismos, tanto dependientes como independientes de contacto, que regulan la interacción parásito-hospedador, influyen decisivamente en la variabilidad clínica de la infección. De entre ellos, la adhesión es uno de los factores cruciales que va a desencadenar los mecanismos de patogénesis sobre las células epiteliales. Otros factores serían la secreción de moléculas citotóxicas que permiten al parásito lograr una invasión tisular y obviamente, numerosos mecanismos que le permitan evadir la respuesta inmune del hospedador para lograr sobrevivir en ese ambiente hostil. Asimismo, aunque no se conocen del todo las razones del elevado número de pacientes asintomáticos (la mayoría de las infecciones en varones y hasta la mitad de las mujeres infectadas), parece estar influenciado por factores intrínsecos tanto del propio hospedador como del parásito (genéticos y fenotípicos), desarrollados en gran medida por el nicho en el que habitan. Asimismo también es importante tener en cuenta ciertos factores extrínsecos así como la presencia de determinados elementos como el Zn, que dificultan el asentamiento, colonización y la propagación parasitaria, o los niveles de hierro, elemento que parece ser crucial en la regulación de la expresión de genes parasitarios relacionados con la patogenicidad.

La secuenciación completa de *T. vaginalis* ha revelado que este parásito posee uno de los genomas de mayor tamaño y complejidad, constituido por más de un 60% de secuencias repetitivas y en torno a 60000 genes codificantes, muchos de ellos homólogos a los de otros organismos con los que puede co-habitar en el nicho genitourinario (Carlton *et al.*, 2007). Sin embargo, este conocimiento más profundo del genoma parasitario, por el momento, no ha permitido explicar la variabilidad en las manifestaciones clínicas.

Por todo ello resultaría importante, para intentar aclarar algunas de estas incógnitas, el intentar profundizar en la caracterización biomolecular de aislados de *T. vaginalis* con el fin de lograr una clasificación intraespecífica de los mismos, y estudiar si existe alguna variación genotípica que pueda verse traducida en cambios en su comportamiento biológico. Es de destacar que *T. vaginalis* es uno de los pocos protozoos que no se encuentra catalogado por subtipos o cepas, debido a la ausencia de marcadores adecuados. Algunos grupos han intentado buscar correlaciones sin éxito, lo que refleja la complejidad biológica y molecular de este parásito.

Ante la situación descrita, los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral están enfocados hacia la investigación de distintos campos de la farmacología antiparasitaria y por otro lado, al estudio más pormenorizado del parásito a diversos niveles biológicos y moleculares. Por ello, el trabajo se ha desarrollado siguiendo dos objetivos generales:

Objetivos generales:

- I. Diseño y validación de un método de cribado secuencial para la búsqueda de nuevos agentes tricomonocidas, que permita el ensayo en el laboratorio de un elevado número de moléculas de forma rápida, económica y eficaz.
- II. Caracterización biológica de aislados de *T. vaginalis* con el fin de determinar qué características fenotípicas podrían ser relevantes para su clasificación. Del mismo modo, se ha llevado a cabo la identificación de marcadores genéticos que sirvan de apoyo a los estudios biológicos y determinar la correlación de los mismos.

Objetivos específicos:

- I. Dentro del diseño y validación del método de cribado secuencial, los objetivos específicos han sido:
 - A. Desarrollo y validación de nuevos modelos QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship) a partir de una base de datos (BD) nueva.
 - B. Estandarización y validación de un método de cribado *in vitro* espectrofluorimétrico empleando resazurina como agente redox que permita sustituir el método clásico de recuento al microscopio.
 - C. Cribado farmacológico de productos naturales y series químicas siguiendo el procedimiento propuesto.
- II. Respecto al segundo objetivo de esta Tesis, basado en el estudio biológico y molecular de aislados de *T. vaginalis*, los objetivos específicos propuestos son:
 - A. Caracterización fenotípica de los aislados mediante el estudio de la sensibilidad a los dos fármacos de referencia, citoadherencia y citotoxicidad en células de mamífero, determinación de la presencia de virus o bacterias, patogenia experimental en ratón y sensibilidad a suero humano.
 - B. Primeros estudios sobre los mecanismos de evasión de la CD59 (protectina) frente a la acción del Sistema del Complemento (SC).
 - C. Caracterización molecular de nuevos marcadores genotípicos, como espaciadores de transcripción interna (ITS), microsátélites (MS) o la presencia de polimorfismos nucleotídicos sencillos (SNP) en genes de copia única (SCG) en los aislados parasitarios caracterizados biológicamente.

Los resultados y la discusión de los dos principales objetivos planteados en esta Tesis Doctoral se presentan en dos capítulos.

El primer objetivo planteado es la estandarización de un método secuencial de cribado farmacológico. Para ello se han creado un total de 45 modelos QSAR-ADL basados en índices lineales. Estos modelos se han desarrollado a partir de una base de datos compuesta por 592 moléculas activas e inactivas previamente evaluadas frente a *T. vaginalis* y publicadas por grupos científicos distintos. A continuación, se realizó un análisis de cluster para la división de la base de datos en una serie de entrenamiento y otra

de predicción, que permitiese la obtención de los 45 modelos virtuales empleando en software TOMOCMOD-CARDD a partir de descriptores moleculares 2D (topológicos). Las funciones discriminantes empleando el análisis discriminante lineal se implementaron con el software STATISTICA. Finalmente, se seleccionaron los tres mejores modelos cuyo uso combinado presentaba la mayor capacidad predictiva. El ensamblaje de todos los modelos y la selección de la combinación más adecuada se realizaron empleando el programa DSDE basado en sistemas multclasificadores. Los tres modelos escogidos (22, 26 y 45) y un cuarto formado por el ensamblaje de los tres anteriores mostraron un buen porcentaje de correcta clasificación con valores entre 92,7% - 97,0% para la serie de entrenamiento y 84,9% - 90,1% al cribar la serie de predicción. Sin embargo, su validación posterior con estructuras químicas nuevas redujo los valores de buena clasificación en activos e inactivos respecto a los resultados *in vitro* obtenidos. No obstante, existe una correlación entre la exactitud en la predicción virtual de los modelos propuestos y la presencia de análogos químicos en la base de datos a partir de la cual se entrena a los modelos *in silico*. Por ello, es esencial la retroalimentación constante de la serie de entrenamiento con estructuras químicas nuevas, para mejorar la robustez de estos modelos QSAR-ADL.

En el modelo secuencial propuesto, tras el cribado virtual, las moléculas seleccionadas como potencialmente activas deben pasar por un segundo filtro de cribado *in vitro*. En esta Tesis se ha puesto a punto un método de cribado espectrofluorimétrico empleando resazurina como colorante redox para determinar la actividad tricomonocida de nuevos agentes. Aunque el método había sido desarrollado previamente por otros autores, en el laboratorio se detectó que el medio de cultivo empleado causaba la reducción espontánea del sustrato. Por ello, se procedió al ajuste de las condiciones experimentales y a la validación de la técnica evaluando distintos compuestos químicos mediante la técnica propuesta y, de forma paralela, mediante el método clásico de recuento al microscopio. Los resultados mostraron una perfecta correlación entre ambas técnicas, demostrando que el protocolo de cribado *in vivo* empleando resazurina es una técnica barata, rápida, sensible y que requiere menos tiempo para el estudio de la actividad farmacológica de nuevos agentes frente a *T. vaginalis*.

Sólo aquellos compuestos con un perfil antiparasitario adecuado se evalúan frente a células de mamífero para conocer su citotoxicidad inespecífica. De esta manera, aquellos candidatos con una actividad tricomonocida adecuada son evaluados *in vivo* en un modelo murino de tricomonosis intraperitoneal.

Dos familias químicas formadas por 148 derivados de 5-nitroindazol y 21 quinoxalinonas han sido evaluadas en esta Tesis siguiendo el protocolo descrito. Respecto a la primera familia química, doce moléculas mostraron una actividad notable frente al parásito con concentraciones inhibitorias 50 (CI_{50}) < 20 μ M. El 5-nitroindazol VATR 145 mostró la actividad más elevada frente al aislado de *T. vaginalis* resistente a metronidazol con una actividad tricomonocida (CI_{50} = 0,5 μ M) superior a la del propio fármaco de referencia (CI_{50} = 4,2 μ M). Asimismo, la 7-nitro-4-(3-piperidinopropil)-quinoxalin-2-ona FR 9 resultó ser el compuesto más activo dentro de la segunda familia química evaluada por lo que se ensayó *in vivo* posteriormente, logrando una reducción del 50% en las lesiones en los ratones tras el tratamiento por vía oral durante 7 días de dosis de 50 y 100 mg/kg.

En el segundo capítulo se muestran los resultados de la caracterización biomolecular de nuevos aislados parasitarios. Los resultados expuestos demuestran la variabilidad de este organismo. La comprensión de la patobiología de *T. vaginalis* sigue sin estar clara para los investigadores. Por ello se evaluaron 10 aislados de *T. vaginalis* procedentes de distintas regiones geográficas, de los cuales tres (JH31A4, C-1:NIH e IR78) pertenecen a la colección de la American Type Culture Collection (ATCC), otros tres se aislaron en un estudio epidemiológico realizado por el Departamento en la Comunidad de Madrid en los años 90 y otros cuatro corresponden a aislados frescos recogidos durante los meses de enero a marzo de 2014. La evaluación biológica consistió en el estudio de distintos caracteres fenotípicos. Todos los aislados a excepción de IR78 se catalogaron como sensibles a los dos fármacos de referencia (metronidazol y tinidazol). Tan sólo dos aislados frescos resultaron positivos a la presencia de *Mycoplasma hominis* y, en lo que respecta a la presencia de virus (TVV), el 60% de los aislados fueron positivos. En cuanto a los estudios de patogenia experimental en modelo murino, los resultados mostraron una correlación entre las lesiones hepáticas producidas tras la inoculación intraperitoneal de los aislados a los ratones y el desarrollo de síntomas por parte de las pacientes de las que se aislaron las muestras.

De forma paralela, se llevó a realizo la caracterización molecular de los diez aislados. En primer lugar, se secuenció la región ITS con el fin de buscar un marcador adecuado que permitiese la clasificación intraespecífica de *T. vaginalis*. Sin embargo los resultados mostraron un 100% de homología entre los diez aislados. Por ello, se evaluaron otro tipo de marcadores genéticos. La determinación del tamaño de los amplicones de tres microsatélites (MS: 006, 129 y 184) y el estudio de los polimorfismos nucleotídicos simples (SNP) de los dos genes conservados de copia única (SNP) GP63a y PMS1, agruparon de forma idéntica a los aislados en dos grupos.

Continuando con los objetivos propuestos, se evaluaron los resultados obtenidos en la caracterización biológica y molecular, observando una correlación entre la presencia de TVV, la sensibilidad a MTZ y la clasificación mediante los 5 marcadores moleculares evaluados.

Asimismo, y en relación con el estudio del comportamiento biológico de este parásito, se quiso conocer cómo el parásito es capaz de evadir algunos de los mecanismos que posee el sistema inmune. Para estudiar el papel de la CD59 en la evasión de la lisis del sistema del complemento por parte del parásito se llevaron a cabo estudios de microscopía confocal de aislados. Se compararon muestras de *T. vaginalis* mantenidos en cultivo, trofozoítos aislados de líquido ascítico de ratón y aislados co-cultivados con eritrocitos. Los resultados demostraron la capacidad de *T. vaginalis* de secuestrar la CD59 de la superficie de las células del hospedador y, de esta manera, evadir la acción lítica del sistema del complemento.

A continuación se exponen las **conclusiones** obtenidas en esta Tesis:

I.1. El punto crítico en el diseño de modelos virtuales QSAR-ADL se sustenta en la diversidad estructural de los compuestos que integran la base de datos (BD).

I.2. La creación de modelos QSAR-ADL a partir de índices lineales parece insuficiente para integrar el filtro *in silico* en el procedimiento secuencial de búsqueda de nuevos agentes

tricomonoidas. La incorporación de modelos basados en índices cuadráticos y bilineales podrían consolidar la robustez del método de predicción *in silico* diseñado.

I.3. El sistema multclasificador DSDE es una herramienta eficaz en la selección y ensamblaje de los mejores modelos de predicción virtual diseñados por el programa TOMOCOMD-CARDD v.2.

I.4. El método de cribado *in vitro* mediante el revelado fluorimétrico con resazurina muestra una excelente correlación con el método de recuento al microscopio. La sensibilidad, fiabilidad, reproducibilidad y bajo coste de esta técnica propuesta lo convierte en una alternativa adecuada para el estudio *in vitro* de agentes tricomonoidas sustituyendo al método clásico.

I.5. El derivado **VATR 145**, con estructura de 1-bencil-3-[5-(metilamino)pentiloxi]-5-nitroindazol, destaca por mostrar una actividad tricomonoida frente al aislado resistente superior a la del fármaco de referencia. Asimismo, el compuesto **VATR 137**, un 3-aminoindazol, mostró una notable actividad *in vivo*. La actividad de estas estructuras sugiere el empleo de derivados de 1-bencil-5-nitroindazol con radicales 3-aminoalcoxilo como “cabezas de serie” para la síntesis y evaluación de nuevos agentes tricomonoidas.

I.6. El procedimiento de cribado secuencial se presenta como una herramienta útil para la selección de nuevos agentes tricomonoidas durante los estudios preclínicos.

II.1. La caracterización biológica de los aislados de *T. vaginalis* demuestra la variabilidad intraespecífica y la heterogeneidad en el comportamiento de las poblaciones, tanto a nivel de patogenia experimental como en relación con otros factores fenotípicos como la citoadherencia y la citotoxicidad.

II.2. Se confirma la capacidad de *T. vaginalis* para incorporar la molécula CD59 (protectina) del hospedador, inhibiendo el complejo de ataque a la membrana del sistema del complemento activado, lo que le convierte en un excelente mecanismo de evasión inmunológico.

II.3. La caracterización molecular de *T. vaginalis* mediante la secuenciación de la región ITS1-5,8S ARNr-ITS2 no permite la diferenciación intraespecífica.

II.4. La caracterización genómica de los aislados de *T. vaginalis* estudiados, empleando tres marcadores microsatélites (MS: 006, 129 y 184) y la secuenciación de los SNP de dos genes de copia única (SCG: GP63a y PMS1), permiten la agrupación intraespecífica en dos tipos: Tipo I y II.

II.5. Entre los aislados de *T. vaginalis* estudiados, se confirma una correlación entre la presencia de TVV, la sensibilidad a 5-nitroimidazoles y el agrupamiento resultante de la caracterización genómica en dos tipos (Tipo I y Tipo II).

II.6. La presencia de TVV, la patogenia en el modelo experimental y el panel de los 5 *loci* se consolidan como marcadores biomoleculares adecuados para la caracterización de aislados frescos y de laboratorio.

III. Introducción

Introducción

1. ANTECEDENTES HISTÓRICOS

Trichomonas vaginalis fue descrito originariamente por el microscopista francés Alfred Donné en 1836. El hallazgo fue publicado en la Academia de Ciencias Francesa a través de una monografía titulada “*Animalículos observados en los fluidos y secreciones purulentos de los órganos genitales de hombre y mujer*”. Aunque no señala su carácter patológico, describe su forma y apariencia, así como los cambios de pH que sufría el medio de aislamiento. Donné, en colaboración con el Dr. Dujardin, denominó a este protozoo *Trichomonas*, combinando los vocablos *Tricho* (pelo) y *-Monas* (movimiento en francés antiguo) basándose en sus características morfológicas al microscopio (Barbier, 1971; Campbell, 2001). Años más tarde, el Dr. Ehrenberg le dio el nombre específico de *Trichomonas vaginalis* por su localización (Thorburn, 1974). Se consideró un comensal de la vagina hasta que en 1916 el ginecólogo alemán Höhne definió la vaginitis ocasionada por el flagelado como *trichomoniasis* (Harp y Chowdhury, 2011). En 1938, el Dr. Procaccini detectó el protozoo en los sedimentos urinarios de muestras de soldados italianos que habían servido en Etiopía. Desde entonces, *T. vaginalis* comenzó a ser considerado un agente patógeno.

2. ENCUADRE TAXONÓMICO

Siguiendo los criterios de Cavalier-Smith (2003) y Cepicka (2010), *Trichomonas vaginalis* se encuadra taxonómicamente de la siguiente forma:

Dominio **Eukaryota**

Reino **Protozoa** (Goldfuss, 1818; R. Owen, 1858)

Subreino **Biciliata** (Cavalier-Smith, 2004)

Infra-reino **Excavata** (Cavalier-Smith, 2002)

Filo **Metamonada** (Grassé, 1952; Cavalier-Smith, 1981, 2003)

Subfilo **Trichozoa** (Cavalier-Smith 1996/7; Cavalier-Smith, 2003)

Superclase **Parabasalia** (Honigberg, 1973; Cavalier-Smith, 2003)

Clase **Trichomonadea** (Kirby 1974; L. Margulis, 1974; Cavalier-Smith, 2003)

Orden **Trichomonadida** (Kirby, 1974)

Familia **Trichomonadidae** (Chalmers y Pekkola, 1918)

Subfamilia **Trichomonadinae** (Chalmers y Pekkola, 1918)

Género ***Trichomonas*** (Donné, 1836)

Los géneros que componen la familia Trichomonadidae son: *Tritrichomonas*, *Trichomonas*, *Tetratrichomonas*, *Pentatrichomonas*, *Trichomitus*, *Trichomitopsis*, *Pseudotrypanosoma* y *Cochlosoma*, existiendo una estrecha relación filogenética entre ellos tal y como reflejan los estudios moleculares (Cepicka *et al.*, 2006; Hampl *et al.*, 2006).

Todos los miembros del género *Trichomonas* poseen cinco flagelos, cuatro anteriores y un quinto flagelo posterior con una porción distal libre que lo diferencia de otras especies de la misma familia. Se asemeja a los géneros *Tetratrichomonas*, *Pentatrichomonas*, *Trichomitopsis*, *Pseudotrypanosoma* y *Cochlosoma* en la ultraestructura del cariomastigonte, debido a la presencia de fibra costal y membrana ondulante (Cepicka *et al.*, 2006).

3. MORFOLOGÍA

Los protozoos de la familia Trichomonadidae poseen un tamaño y morfología variable en función de las condiciones fisicoquímicas del medio, como el pH, la temperatura, la presencia de nutrientes y la presión osmótica, etc; adquiriendo una forma piriforme, esférica u ovalada en los medios de cultivo líquidos.

El movimiento vibratorio y adireccional característico de los tricomonádidos se debe a la presencia de tres o más flagelos en el extremo anterior y un flagelo recurrente asociado a la membrana ondulante del parásito. La **figura 1** muestra de forma esquemática la morfología del protozoo. El complejo cinetosomal está compuesto por unas estructuras cilíndricas llamadas cinetosomas. Cada flagelo se encuentra anclado a un cinetosoma en su extremo anterior. Los cuatro cinetosomas de los flagelos anteriores se disponen rodeando a un quinto que da origen al flagelo posterior o recurrente (FR). El número de flagelos presentes en el trofozoíto, así como la longitud de la membrana ondulante, son características morfológicas importantes para poder clasificar taxonómicamente a los tricomonádidos.

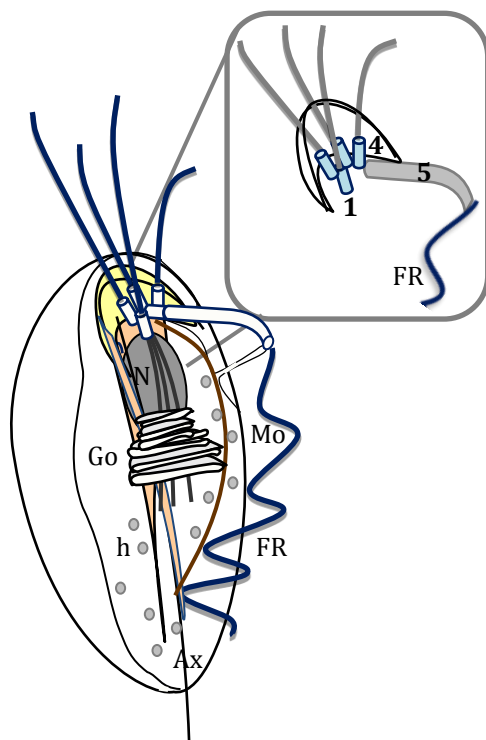


Figura 1: Esquema morfológico de un tricomonádido en el que se observa: *Complejo cinetosomal*, compuesto por los cuatro cinetosomas de los flagelos anteriores y el quinto del flagelo recurrente (FR). La *costa* (coloreada de marrón), cuyo origen comienza en los cinetosomas 2 y 5, y ejerce de soporte de la membrana ondulante (Mo). El *aparato parabasal*, formado por los filamentos parabasales que conectan el complejo cinetosomal con el complejo de Golgi (Go). *Complejo pelta-axostilar* (de color amarillo), constituido por la pelta que soporta el canal periflagelar de donde emergen los flagelos y el axostilo. En color gris se representan los hidrogenosomas (h), con localización fundamentalmente paraxostilar y paracostal.

Diseño modificado a partir del realizado por el Dr. Francisco Ponce Gordo.

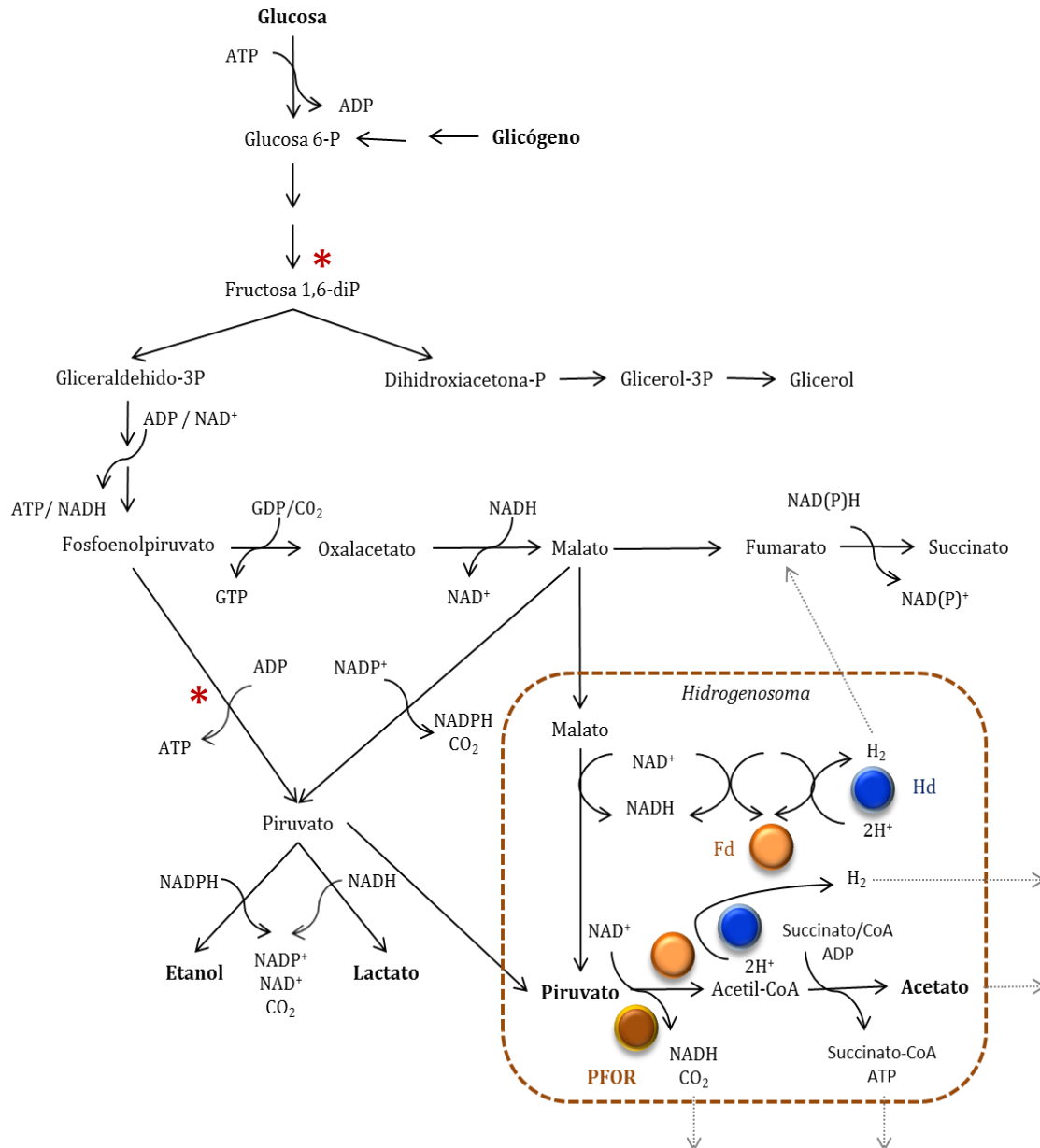
El citoesqueleto, con funciones motoras y reproductoras, está formado por microtúbulos que dan lugar a la formación de diversas estructuras como el complejo pelta-axostilar, la costa y los filamentos parabasales. El axostilo (Ax) constituye el eje de la célula sobresaliendo en la parte posterior del protozoo en forma de punta de flecha y uniéndose en la región anterior a la pelta, estructura citoesquelética con forma de media luna que rodea el área de donde emergen los flagelos anteriores. El complejo pelta-axostilar engloba al núcleo (Nu) y el aparato parabasal, formado por fibras estriadas que conectan las vesículas de Golgi (Go) o dictiosomas al aparato flagelar. La costa, formada por un haz de fibras estriadas, se encuentra asociada al cinetosoma del flagelo recurrente ejerciendo una función de soporte mecánico a la membrana ondulante. El citoplasma presenta numerosas vacuolas y vesículas relacionadas con procesos de endocitosis, digestión y transporte, así como ribosomas e hidrogenosomas (h) estrechamente unidos a gránulos de glucógeno y al retículo endoplasmático rugoso (Ribeiro *et al.*, 2002; Benchimol *et al.*, 2009).

El flagelado se alimenta mediante pinocitosis y fagocitosis, proceso que tiene lugar preferentemente en la región posterior de la célula, formando vacuolas de distintos tamaños. Los tricomonádidos son protozoos microaerófilos, carentes de mitocondrias y peroxisomas.

El núcleo (Nu) se localiza en la porción anterior del trofozoíto, rodeado por una membrana nuclear porosa. Los tricomonádidos poseen un genoma de gran tamaño. Se encuentra organizado en 4 a 6 cromosomas, según el género, con un tamaño variable, siendo mayor en los géneros *Trichomonas* y *Tritrichomonas* (133-177 Mb) mientras que *Tetratrichomonas gallinarum* presenta el más pequeño (86 Mb), dentro de las especies estudiadas (Zabáková *et al.*, 2008). Se considera el organismo unicelular con el genoma más grande secuenciado hasta la fecha (*Giardia duodenalis*, 12 Mb, *Plasmodium falciparum*, 23 Mb).

Los orgánulos implicados en el metabolismo energético son los hidrogenosomas, descubiertos por Lindmark y Müller en 1973. Estos orgánulos, presentes en protozoos de la superclase Parabasalia, están evolutivamente relacionados con las mitocondrias. Se localizan en su mayoría en las regiones paraxostilar y paracostal, tienen una forma esférica o ligeramente alargada, con un tamaño que oscila entre 0.2 a 1 μm de diámetro, aunque en condiciones de estrés como un tratamiento farmacológico, pueden llegar a duplicar su tamaño (Benchimol *et al.*, 2009). El hidrogenosoma es el responsable de la formación de ATP mediante la oxidación del piruvato y el malato en condiciones anaeróbicas. Los hidratos de carbono son la principal fuente de ATP del tricomonádido, comenzando su metabolismo en el citosol, donde se lleva a cabo la glicolisis. Algunos intermediarios de esta ruta metabólica, como el piruvato o el malato continúan su catabolismo en los hidrogenosomas. El piruvato sufre una descarboxilación oxidativa por acción de la piruvato:ferredoxina oxidoreductasa (PFOR) formando acetato, H_2 y CO_2 . La ferredoxina (Fd), actúa como proteína transportadora de electrones en el hidrogenosoma y una vez reducida por la acción de la oxidoreductasa, vuelve a ser oxidada mediante la acción de la hidrogenasa (HD) produciendo hidrógeno molecular. Este orgánulo recibe su nombre por el hidrógeno molecular que generan durante el metabolismo energético en condiciones anaeróbicas.

Como muestra la **figura 2**, el metabolismo de los hidratos de carbono se lleva a cabo parcialmente en el hidrogenosoma y no finaliza con la oxidación completa de la glucosa. Los productos que se generan tras el metabolismo son acetato, lactato, malato, glicerol, CO₂ e H₂. Este metabolismo energético comienza en el citoplasma a través de la vía clásica Embden-Meyerhoff-Parnas con la obtención de ATP (Benchimol, 2009). A continuación, algunos intermediarios de la glicolisis como el piruvato o el malato sufren una descarboxilación oxidativa en el interior del hidrogenosoma.



* Reacciones metabólicas en las que las enzimas que intervienen son distintas en el hombre y en *T. vaginalis*.

PFOR: Piruvato:ferredoxina oxidoreductasa; Fdx: Ferredoxina; Hd: Hidrogenosoma

Figura 2: Ruta de la glicolisis y la descarboxilación oxidativa en *T. vaginalis*. Esquema modificado a partir de los publicados por Benchimol (2009), Horváthová *et al.* (2012) y Müller *et al.* (2012).

4. CICLO BIOLÓGICO

T. vaginalis es un parásito de transmisión sexual de ciclo biológico directo. Presenta únicamente formas trofozoíticas, no existiendo ninguna forma de resistencia o quiste. Aunque se han descrito formas redondeadas en ambientes desfavorables o cultivos agotados, este estado es reversible en cuanto el parásito vuelve a encontrarse en un medio adecuado y rico en nutrientes. Estas formas polimastigontes o pseudoquísticas son organismos esféricos e inmóviles caracterizados por la internalización de flagelos y membrana ondulante (Pereira-Neves *et al.*, 2003).

El único hospedador natural de *T. vaginalis* es el ser humano. Su multiplicación se produce en la mucosa genitourinaria del hombre y la mujer mediante criptopleuromitosis. Este tipo de fisión binaria se caracteriza por la formación de un huso microtubular o *spindle* de localización externa al núcleo. La membrana nuclear se mantiene y los microtúbulos se polarizan en dos orgánulos llamados atratóforos, que realizan el papel de los centrosomas. La división comienza con la duplicación de las estructuras cinetosomales, seguida de la división del núcleo mediante mitosis. La **figura 3** muestra un trofozoíto durante el proceso de división en dos células hijas.

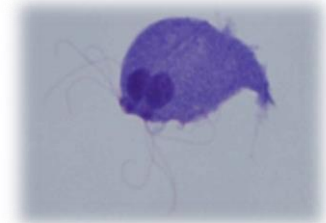


Figura 3: Trofozoíto en criptopleuromitosis. En la región anterior se observan los dos penachos flagelares, los complejos cinetosomales duplicados y los núcleos.

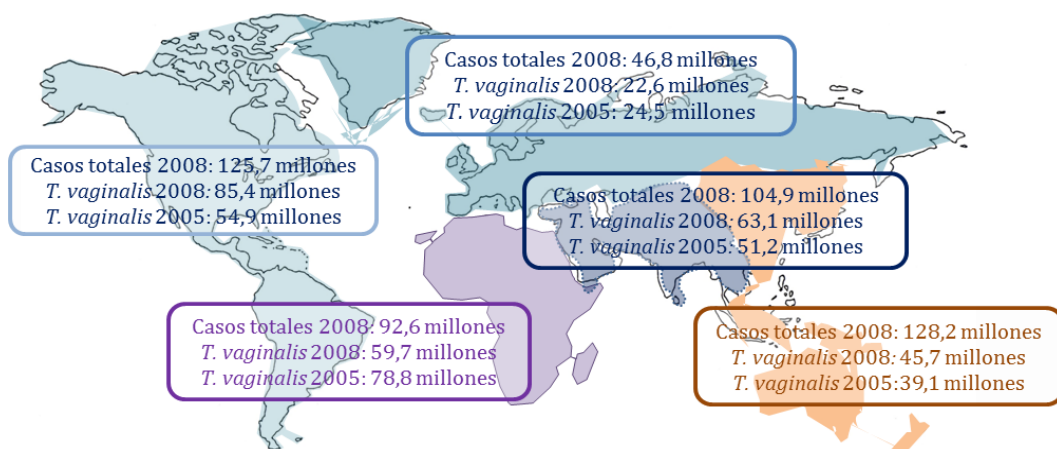
Algunos autores han estudiado la viabilidad de *T. vaginalis* en otras localizaciones anatómicas distintas al tracto genitourinario. Ryu *et al.* (2002) determinaron la supervivencia de los trofozoítos en distintas condiciones, estimando una supervivencia inferior al 10% tras exponer la muestra a 4 °C durante 30 minutos. *T. vaginalis* es muy sensible al aumento de temperatura, no pudiendo sobrevivir a más de 45 °C. Al no presentar formas de resistencia es susceptible a los detergentes y aguas cloradas, recuperándose menos de un 10% de parásitos viables tras 24 h en muestras de orina.

Se han descrito casos de transmisión vertical de madre a neonato a través del canal del parto. La mayoría de las tricomonosis neonatales son asintomáticas o se logra la curación espontánea de las mismas tras la disminución de los niveles de estrógenos maternos en el recién nacido a partir de la sexta semana (Cudmore *et al.*, 2004) o tras el tratamiento con metronidazol (MTZ) (Bellanger *et al.*, 2008).

Duboucher *et al.* (2003) diagnosticaron la coinfección por *T. vaginalis* y *Pneumocystis* en un varón VIH+ aquejado de problemas respiratorios. Aunque la presencia de tricomonádidos en pulmón se asociaban a *T. tenax* (Mallat *et al.*, 2004; Bellanger *et al.*, 2008; Leterrier *et al.*, 2012), un parásito saprófito humano de localización oral, los estudios genómicos han permitido identificar otros tricomonádidos (*T. vaginalis*, *Pentatrichomonas hominis* y *Tetratrichomonas* spp.) en pacientes con afecciones pulmonares (Jongwutiwes *et al.*, 2000; Duboucher *et al.*, 2003; Kutisova *et al.*, 2005; Mantini *et al.*, 2009; López-Escamilla *et al.*, 2013).

5. EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO

Las infecciones de transmisión sexual (I.T.S.) pueden ser causadas por 30 patógenos distintos. *T. vaginalis* es el agente etiológico de más del 50% de las I.T.S. curables en el mundo. El último informe de la OMS de 2008 estimó más de 498 millones de casos nuevos de clamidiasis, gonorrea, sífilis y tricomonosis en adultos de edades comprendidas entre los 15 y los 49 años. El 55,4% de los casos (276,4 millones) se debieron a *T. vaginalis*, detectándose un aumento del 11,2% en la incidencia de esta I.T.S., en comparación con los datos obtenidos en el estudio llevado a cabo en 2005 (WHO, 2012). En la **figura 4** se reflejan los datos epidemiológicos de cada una de las regiones estudiadas (WHO 2011, 2012). Este aumento general en el número de casos podría estar relacionado con la tendencia a mantener relaciones sexuales a edades cada vez más tempranas y el incremento en el uso de anticonceptivos orales en lugar de preservativos (Whaley, 1999). A pesar de los esfuerzos llevados a cabo por los organismos internacionales para establecer medidas de vigilancia, los datos epidemiológicos, especialmente en lo que respecta a la tricomonosis, siguen subestimando las cifras reales (Van der Pol, 2007; WHO, 2011), debido al número elevado de casos asintomáticos (Miller *et al.*, 2005) y a que se trata de una enfermedad de declaración no obligatoria (Soper, 2004). Asimismo, el mayor número de pacientes con tricomonosis se encuentran en países en vías de desarrollo o en regiones de bajos recursos económicos dentro de los países industrializados (Sutton *et al.*, 2007), catalogándose como una enfermedad olvidada ligada a la pobreza (Hotez, 2008; Hotez y Gurwith, 2011).



Datos tomados de los informes de la OMS (2011, 2012)

Figura 4: Incidencia total de las cuatro I.T.S. curables más importantes (clamidiasis, gonorrea, sífilis y tricomonosis) y de tricomonosis en el mundo. Datos publicados por la OMS en sus dos últimos informes.

Existen diversos factores de riesgo de índole social, económica y cultural asociados con esta enfermedad. Los estudios epidemiológicos coinciden en que el mayor número de casos se producen en mujeres (Johnston y Mabley, 2008; Satterwhite *et al.*, 2013; Rogers *et al.*, 2014), pudiendo llegar hasta quintuplicar el número de pacientes en comparación con el número de infecciones en varones (Bachmann *et al.*, 2011). Esta I.T.S. es de 4 a 12 veces más prevalente en adultos y adolescentes de raza negra, destacando en EEUU el mayor número de casos en población afroamericana en comparación con otros grupos

étnicos (Klebanoff *et al.*, 2001; Crosby *et al.*, 2002; Huppert *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2005; Johnston y Mabley, 2008; Allsworth *et al.*, 2009; Bachmann *et al.*, 2011). En algunos estudios, el porcentaje de población de raza negra no hispana diagnosticada con tricomonosis superó el 90% (Hobbs *et al.*, 2006). Estos trabajos estiman que un 20% de la transmisión del VIH en este grupo poblacional se atribuye a la infección concomitante con *T. vaginalis* (Sorvillo *et al.*, 2001).

La tricomonosis es una I.T.S. que aparece frecuentemente asociada a otras patologías genitourinarias en ambos sexos. Distintos estudios han confirmado que la coinfección con *Chlamydia* es más común en mujeres con tricomonosis que sin ella (Miller *et al.*, 2005; Helms *et al.*, 2008a; Allsworth *et al.*, 2009). Estos últimos también publicaron una mayor prevalencia en mujeres infectadas con *T. vaginalis* y con el virus del herpes tipo 1 y 2 (Cherpes *et al.*, 2006), existiendo seis veces más casos de *Treponema* en mujeres con tricomonosis y hasta trece veces más coinfecciones con VIH. Otras patologías a destacar son la gonorrea (Schwebke y Hook, 2003; Helms *et al.*, 2008a), la vaginosis bacteriana (Seña *et al.*, 2007) y el papilomavirus (VPH) (Noel *et al.*, 2010). En este sentido es importante mencionar la prevalencia significativa, de hasta 6,5 veces más, en las coinfecciones de *T. vaginalis* y cepas de VPH de alto riesgo, como la tipo 16, aunque también se han publicado coinfecciones con las cepas 31, 52, 56 y 68 (Noel *et al.*, 2010; Lazenby *et al.*, 2014). Continuando con los factores característicos de esta enfermedad, destaca que el número de casos de tricomonosis en mujeres tiende a aumentar con la edad hasta la menopausia (Wendel, 2003; Huppert *et al.*, 2005; Miller *et al.*, 2005; Helms *et al.*, 2008a; Andrea y Chapin, 2011; Donders *et al.*, 2013) a diferencia de otras I.T.S. como las causadas por el virus del papiloma humano (VPH) o *Chlamydia* en las que la población más afectada son jóvenes y adolescentes de menos de 25 años (Depuydt *et al.*, 2010).

Al igual que otras I.T.S., la tricomonosis es factor de riesgo en la infección y transmisión del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Está ampliamente demostrado que el tratamiento eficaz de la tricomonosis reduce el riesgo de contagio por VIH (Kissinger *et al.*, 2009). El mejor mecanismo de protección frente a la infección por VIH es una mucosa cervico-vaginal intacta y sana. El riesgo de transmisión en un único contacto sexual entre un individuo infectado y una pareja sana es inferior al 1% (Thurman y Doncel, 2011). Sin embargo, en pacientes coinfectados con este parásito el riesgo de transmisión y/o infección por VIH-1 aumenta de 1,5 hasta 3 veces (Laga *et al.*, 1993; McClelland *et al.*, 2007; Van Der Pol *et al.*, 2008; Shafir *et al.*, 2009; Bachmann *et al.*, 2011). Recientemente, a través de modelos matemáticos, Quinlivan *et al.* (2012) estimaron que en torno al 22% de los casos de transmisión del VIH de mujeres a sus parejas, podían ser atribuibles a la presencia de *T. vaginalis*.

La promiscuidad sexual (Sutton *et al.*, 2007; Helms *et al.*, 2008a; Rogers *et al.*, 2014) y la prostitución (Johnston y Mabley, 2008) son los comportamientos y grupos poblacionales de riesgo mayor. Cwikel *et al.* (2008) calcularon que entre un 13-45% de las prostitutas de todo el mundo se encontraban infectadas por *T. vaginalis*. Además, la drogadicción en grupos marginales es otro de los factores psicosociales asociados a esta I.T.S. en países industrializados (Johnston y Mabley, 2008), incluyendo consumidores de marihuana, delincuentes y reclusos (Johnston y Mabley, 2008; Sutcliffe *et al.*, 2010).

6. MANIFESTACIONES CLÍNICAS Y COMPLICACIONES ASOCIADAS A LA ENFERMEDAD

La tricomonosis se caracteriza por presentar un rango amplio de manifestaciones clínicas que cursan desde casos asintomáticos hasta cuadros clínicos graves caracterizados por procesos inflamatorios y signos clínicos que podrían confundirse con otras etiologías genitourinarias.

En el varón, más del 70% de las infecciones son asintomáticas (Seña *et al.*, 2007; Harp y Chowdhury, 2011). Seña *et al.* (2007) detectaron que el 71,7% de los varones cuyas mujeres estaban infectadas, mostraban un diagnóstico positivo a esta parasitosis y, de ellos, un 77,3% eran asintomáticos. Estos porcentajes tan elevados se han corroborado en otros estudios (Hobbs *et al.*, 2006). Las manifestaciones clínicas más comunes son la descarga uretral, irritación, disuria y prurito o ardor tras el coito. Al igual que en la mujer, *T. vaginalis* ocasiona en el hombre procesos inflamatorios a lo largo de todo el tracto genitourinario (prostatitis, epididimitis, uretritis, orquitis y balanopostitis) (**Tabla 1**). Entre las infecciones genitourinarias más comunes, la tricomonosis puede ocasionar uretritis no gonocócica (UNG) en el varón, así como infertilidad transitoria a causa de la disminución de la motilidad y la viabilidad espermática (Tuttle *et al.*, 1977; Gopalkrishnan *et al.*, 1990; Lewis, 2014). Algunos trabajos afirman que las infecciones sintomáticas por *T. vaginalis* en varones pueden desaparecer de forma espontánea a los 10 días (Poole y McClelland, 2013). Este curación podría deberse a que el parásito, al localizarse en la uretra puede ser arrastrado y eliminado durante la micción. Asimismo, el ambiente oxidativo del tracto genitourinario masculino, gracias a la presencia de Zn²⁺, parece dificultar el asentamiento y el desarrollo de esta parasitosis (Poole y McClelland, 2013).

La clínica en la mujer se conoce mejor debido en gran parte a que entre un tercio y la mitad de las pacientes desarrollan síntomas (Schwebke y Burgess, 2004; Seña *et al.*, 2007; Harp y Chowdhury, 2011). Los signos y síntomas de esta I.T.S. son poco específicos, como prurito, disuria, edema o eritema en las paredes vaginales, flujo vaginal abundante, dolor abdominal leve o dispareunia (dolor durante el coito). En algunas pacientes se han descrito procesos inflamatorios graves que incluyen adenitis, salpingitis (inflamación de las trompas de Falopio), endometritis, peritonitis pélvica o abscesos tubo-ováricos e infección de las glándulas de Bartholin y de Skene (Petrin *et al.*, 1998; Moodley *et al.*, 2002; Soper, 2004; Cherpes *et al.*, 2006). Sin embargo, el signo más característico de esta I.T.S. en las mujeres sintomáticas es la generación de una leucorrea descrita como mucopurulenta, espumosa y amarillo-verdosa, con fuerte olor característico (**Tabla 1**). Asimismo, otro signo frecuente de la tricomonosis es la *colpitis macularis*, también conocida como *cérvix con apariencia de fresa*, detectable mediante colposcopia debido a la formación de microhemorragias en la mucosa cercana al cuello del útero (Schwebke y Burgess, 2004). Sin embargo, este signo solo se da en un 2%-5,4% de las pacientes que desarrollan síntomas (Petrin *et al.*, 1998; Seña *et al.*, 2007).

Las secuelas a largo plazo de esta enfermedad incluyen embarazos ectópicos y un riesgo mayor, de entre 1,9 a 4,7 veces, de padecer infertilidad tubárica a causa de la obstrucción de las trompas (Grodstein *et al.*, 1993; Poole y McClelland, 2013). Es importante destacar el riesgo en estas pacientes de desarrollar complicaciones tras intervenciones quirúrgicas

como histerectomías, cesáreas, abortos o desarrollo de enfermedad inflamatoria pélvica atípica (EIP).

Tabla 1: Signos y síntomas clínicos de la tricomonosis urogenital en hombres y mujeres.

Manifestaciones clínicas	Prevalencia		Fuente bibliográfica
	Hombre	Mujer	
	Síntomas		
Asintomático	15-50%	10-50%	(Sherrard <i>et al.</i> , 2014)
	77%	27%	(Seña <i>et al.</i> , 2007)
	75%	26%	(Hobbs <i>et al.</i> , 2006)
	12%	59%	(Seña <i>et al.</i> , 2007)
Descarga uretral/vaginal	20-60%	70%	(Sherrard <i>et al.</i> , 2014)
		65%	(Ryu y Min, 2006)
	28%	83%	(Hobbs <i>et al.</i> , 2006)
Prurito	7%	33%	(Seña <i>et al.</i> , 2007)
		35%	(Ryu y Min, 2006)
Disuria o dolor en la micción	7%	8%	(Seña <i>et al.</i> , 2007)
Dolor abdominal	1%	19%	(Seña <i>et al.</i> , 2007)
Dispareunia o dolor antes/durante/después del coito		6%	(Ryu y Min, 2006)
	Signos		
Ninguno	71%	9%	(Seña <i>et al.</i> , 2007)
	77%	10-15%	(Sherrard <i>et al.</i> , 2014)
Eritema vulvar difuso		22-37%	(Schwebke y Burgess, 2004)
Eritema y edema en la pared vaginal		18%	(Ryu y Min, 2006)
Flujo abundante mucopurulento, amarillo verdoso característico	7%	32%	(Seña <i>et al.</i> , 2007)
		10-30%	(Sherrard <i>et al.</i> , 2014)
Flujo espumoso		42%	(Schwebke y Burgess, 2004)
		10%	(Schwebke y Burgess, 2004)
Flujo maloliente		47%	(Seña <i>et al.</i> , 2007)
		50%	(Schwebke y Burgess, 2004)
Colpitis macularis		5%	(Seña <i>et al.</i> , 2007)
		2%	(Petrin <i>et al.</i> , 1998), (Sherrard <i>et al.</i> , 2014)
pH vaginal > 4,5		82%	(Seña <i>et al.</i> , 2007)
Tinción Gram de muestra uretral anormal	34%		(Seña <i>et al.</i> , 2007)
	Coinfecciones		
Ninguna	75%	35%	(Seña <i>et al.</i> , 2007)
Vaginosis bacteriana		53%	(Seña <i>et al.</i> , 2007)
	11%	13%	(Seña <i>et al.</i> , 2007)
<i>Chlamydia trachomatis</i>	11%		(Schwebke y Hook, 2003)
	17%	5,6%	(Miller <i>et al.</i> , 2005)
	15%		(Reynolds y Wilson, 1996)
		12%	(Hobbs <i>et al.</i> , 2006)

	10%	11%	(Seña <i>et al.</i> , 2007)
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	9%		(Waugh y Wilson, 2008)
	10%		(Reynolds y Wilson, 1996)
		10%	(Hobbs <i>et al.</i> , 2006)
<i>Neisseria</i> y <i>Chlamydia</i>	5%		(Schwebke y Hook, 2003)
<i>Treponema pallidum</i>		2%	(Hobbs <i>et al.</i> , 2006)

La infección por *T. vaginalis* en gestantes puede causar numerosas complicaciones.; incrementa hasta 1,3 veces el riesgo de sufrir partos prematuros (Poole y McClelland, 2013), el nacimiento de neonatos con bajo peso (Pastorek *et al.*, 1996; Cotch *et al.*, 1997) o la predisposición a la ruptura prematura de membranas placentarias, debido a los procesos inflamatorios derivados de la infección, que cursan con la secreción de proteasas que podrían estar implicadas en estas complicaciones gestacionales (Sutton *et al.*, 1999). El estudio epidemiológico llevado a cabo por Cotch *et al.* (1997) confirmó que las mujeres gestantes infectadas de raza negra mostraban un riesgo del 11% de desarrollar complicaciones, mientras que en el grupo caucásico, el riesgo se reducía al 1,6%.

A pesar de los escasos estudios en recién nacidos, se ha documentado la transmisión vertical. El neonato puede infectarse por medio de la ingesta o aspiración del meconio en el canal del parto, derivando en casos de vaginitis, infecciones del tracto urinario o síndrome de dificultad respiratoria (Smith *et al.*, 2002). En la mayoría de los casos, las infecciones en los recién nacidos se resuelven durante las seis primeras semanas de forma espontánea (Poole y McClelland, 2013), tras la reducción de los niveles de estrógenos procedentes de la madre a concentraciones prepuberales (Ford *et al.*, 1987).

Una de las complicaciones más graves es el desarrollo de procesos neoplásicos en próstata (Sutcliffe *et al.*, 2006) y cérvix (Alexander, 1973; Viikki *et al.*, 2000). En el hombre, la próstata puede intervenir como reservorio de *T. vaginalis*, habiéndose aislado del estroma, submucosa y uretra prostática (Gardner *et al.*, 1986). En ambas localizaciones se desencadenan procesos inflamatorios subclínicos y crónicos que parecen estar implicados en el desarrollo posterior de procesos neoplásicos (Sutcliffe *et al.*, 2012). Mitteregger *et al.* (2012) detectaron ADN del parásito en tejidos procedentes de hiperplasias prostáticas benignas. En la mujer, se han aislado formas pseudoquísticas de *T. vaginalis* de lesiones neoplásicas de cérvix (Afzan y Suresh, 2012). Estos estudios confirman el riesgo elevado de desarrollar lesiones invasivas e intraepiteliales escamosas en pacientes con esta parasitosis (Viikki *et al.*, 2000; Donders *et al.*, 2013; Lazenby *et al.*, 2014). La hipótesis que mejor explica la asociación entre tricomonosis y el desarrollo de neoplasias, es el aumento de determinadas citoquinas proinflamatorias inducidas a causa de los procesos inflamatorios desencadenados por el parásito. Existen estudios que han demostrado la acción de estas citoquinas en la estimulación de la proliferación celular, que derivaría en el desarrollo de procesos carcinogénicos (Nelson *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2006; Waugh y Wilson, 2008; Briganti *et al.*, 2009; Azevedo *et al.*, 2011).

7. MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

Los signos y síntomas de la tricomonosis son inespecíficos, por lo que se requiere la toma de muestras y su examen en el laboratorio para el diagnóstico.

En las mujeres, la muestra vaginal se toma con hisopo estéril, recomendándose la observación inmediata al microscopio. Si es necesario se procede a la siembra en medio de cultivo. El diagnóstico en muestras de orina presenta una sensibilidad menor, independientemente de la técnica empleada (Lawing *et al.*, 2000; Sherrard *et al.*, 2014). Lawing *et al.* (2000) demostraron que no todas las mujeres diagnosticadas mediante muestras vaginales de tricomonosis presentaban trofozoítos en las muestras de orina, corroborándose el diagnóstico en un 75% de los casos. En el hombre, las muestras que se emplean para el diagnóstico son uretrales o de orina fundamentalmente, aunque también se han descrito estudios con muestras de semen (Hobbs *et al.*, 2006).

En la **tabla 2** se esquematizan los métodos de diagnóstico más relevantes. La técnica más utilizada en clínicas y hospitales es el examen directo al microscopio de la muestra (Radonjic *et al.*, 2006). El parásito se identifica por su morfología y movimiento característico. Sin embargo la sensibilidad de esta técnica no es muy elevada.

El cultivo de la muestra en medio líquido o semisólido es la técnica de referencia o *gold standard*. Existen diversos medios para el cultivo de *T. vaginalis*, como el medio Kupferberg, Kupferberg STS, Hirsch, Trichosel, Diamond modificado, suero Lash, o el más reciente, denominado InPouch TV (Thomason *et al.*, 1988; Borchardt *et al.*, 1997). Sin embargo, el más utilizado es el Diamond (TYM) o Diamond modificado (Hobbs y Sena, 2013). Este diagnóstico requiere de 2 a 7 días de observación diaria. Es una técnica económica y sencilla, pero requiere un tiempo de espera y la necesidad de que los organismos se encuentren vivos (**Tabla 2**). Ya se han comercializado dispositivos que contienen un medio de cultivo similar al Diamond y que permiten introducir la muestra del paciente para su incubación. El sistema InPouch TV permite emplear no sólo muestras vaginales y uretrales sino también de orina. Una de las grandes ventajas de estos sistemas es que permiten la observación directa de la muestra al microscopio en el propio dispositivo y su transporte sin necesidad de conservarlo en refrigeración como los medios convencionales (Sood *et al.*, 2007).

En los últimos años se han descrito métodos de diagnóstico molecular, basados en la amplificación de ácidos nucleicos (NAATs) mediante PCR para aumentar la sensibilidad del diagnóstico respecto al cultivo. Algunos proceden de adaptaciones de técnicas aprobadas por la agencia *Food and Drug Administration* (FDA) para el diagnóstico de clamidiasis y gonorrea (Amplicor® *C. trachomatis/N. gonorrhoeae* assay-Roche Diagnostic Corporation, Indianapolis, IN). Esta técnica permite la detección de ADN de *T. vaginalis* a partir de muestras vaginales, endocervicales y de orina con rangos de sensibilidad superiores al 90% (Van Der Pol *et al.*, 2006). Otra técnica molecular aprobada en 2011 por la FDA es la APTIMA TV (Gen-Probe) vinculada a la detección del ARN ribosomal 18S de *T. vaginalis*. Este método comercial emplea muestras endocervicales, vaginales o de orina de pacientes tanto asintomáticas como sintomáticas, y cuenta con el distintivo CE para su uso en la UE (Hobbs y Sena, 2013). Aunque puede emplearse con muestras uretrales y de orina

de hombre, la FDA no ha aprobado esta técnica para el diagnóstico en varones (Bachmann *et al.*, 2011). Aunque el diagnóstico de la tricomonosis en el hombre resulta más complicado debido a la proporción elevada de casos asintomáticos y a la dificultad de obtener muestras uretrales adecuadas, la técnica diagnóstica más efectiva es la PCR. La amplificación de ácidos nucleicos mediante PCR permite detectar al parásito con un límite de un tricomonádido por reacción de PCR (Lee *et al.*, 2012). Este límite es significativamente inferior al de detección del cultivo (300 trofozoítos/mL) (Radonjic *et al.*, 2006) o la observación al microscopio (10.000 parásitos/mL) (Sood *et al.*, 2007). El inconveniente principal del diagnóstico mediante PCR es el riesgo de inhibidores en la muestra que puedan invalidar el resultado (Lawing *et al.*, 2000; Hobbs *et al.*, 2006).

Asimismo cabe destacar el desarrollo de métodos de diagnóstico basados en la hibridación de ácidos nucleicos. BD Affirm™ VPIII (Becton-Dickinson) está diseñado para el diagnóstico de *T. vaginalis*, *Gardnerella vaginalis* y *Candida albicans*. Este test usa sondas de captura que se encuentran integradas en una tarjeta para la lectura automatizada de la misma. Su ventaja principal es que permite diagnosticar tres de las patologías ginecológicas más frecuentes en la mujer mediante una reacción de hibridación en un pequeño dispositivo que cambia de color (azul)

cuando la muestra es positiva, lográndose detectar co-infecciones en menos de 1 hora (Figura 5) (Tutorial BD Affirm™ VPIII Microbial Identification System). Posee una sensibilidad superior a la de la observación en fresco y en menor tiempo (Huppert *et al.*, 2005; Hegazy *et al.*, 2012), aunque se han descrito casos de falsos positivos, no resultando eficaz en muestras uretrales (Miller *et al.*, 2005). Este test se encuentra aprobado por la FDA y la Unión Europea (marca CE) (Hobbs y Sena, 2013).

En la última década, la FDA ha aprobado dos técnicas diagnósticas nuevas en muestras vaginales, definidas como *point-of-care diagnostics* (Workowski y Berman, 2010). Ambas técnicas han demostrado ser más sensibles que el diagnóstico en fresco, aunque pueden darse falsos positivos en poblaciones con prevalencia baja de esta I.T.S. El método OSOM® *Trichomonas* Rapid Test (Genzyme Diagnostics, Cambridge, Massachusetts), anteriormente comercializada con el nombre de XenoStrip *T. vaginalis* test (Xenotope Diagnostics) se basa en la detección cualitativa antigénica del parásito mediante inmunocromatografía capilar. El fundamento del método OSOM® es similar a los test de embarazo, obteniéndose el resultado en unos 10 minutos. Está indicado para la detección de antígenos de muestras vaginales y emplea dos anticuerpos monoclonales murinos, uno de los cuales se encuentra inmovilizado en la superficie de la tira reactiva de nitrocelulosa y conjugado a las partículas rojas. En caso de que la muestra sea positiva, generará un complejo con los antígenos específicos de la muestra. El anticuerpo de captura secundario anti-ratón se une al complejo antigénico, apareciendo la línea azul indicativa de que la

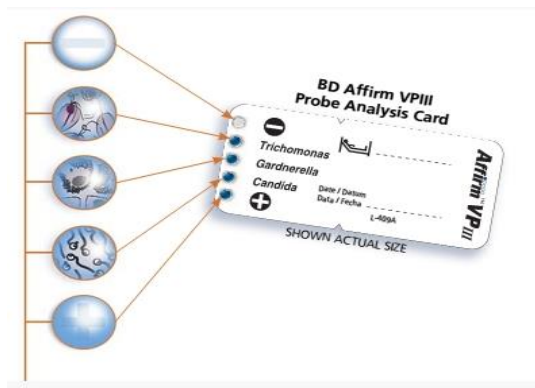


Figura 5: Test de hibridación de ADN BD Affirm™ VPIII. Las imágenes han sido tomadas de www.moleculardiagnosis.bd.com.

muestra es positiva (Pillay *et al.*, 1994; Huppert *et al.*, 2005). Todas las tiras contienen un control interno de color rojo que debe aparecer en todos los casos para validar la prueba. En caso de que la muestra sea positiva y existan antígenos de *T. vaginalis*, aparecerá una línea azul (Figura 6).

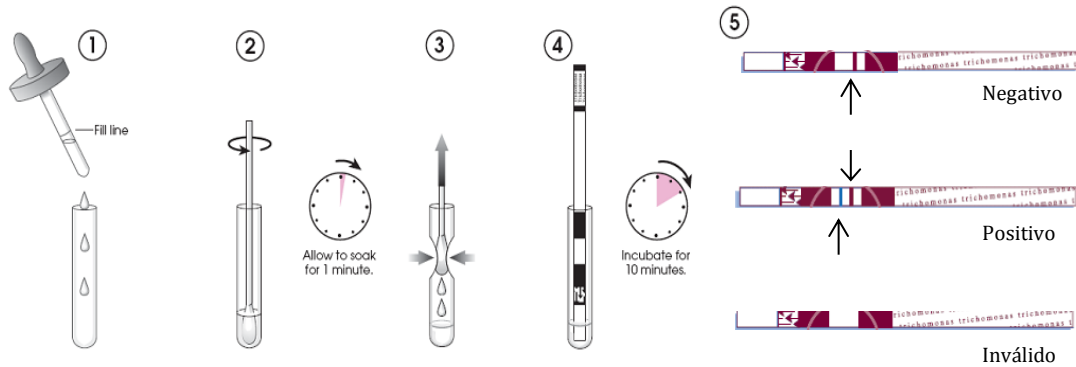


Figura 6: Procedimiento para el diagnóstico de *T. vaginalis* mediante el test rápido OSOM® Trichomonas Rapid Test (Genzyme Diagnostics). Imagen tomada del Testing Handbook provisto con el test.

Recientemente se ha diseñado en el Reino Unido un test de aglutinación en látex para el diagnóstico rápido de la tricomonosis en muestras vaginales denominado Tv latex agglutination test (Kalon Biological, Surrey, UK). Emplea partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos (IgG) anti-*T. vaginalis* de conejo. En caso de que la muestra sea positiva, se produce la aglutinación de las mismas con los antígenos parasitarios. El resultado de la prueba se obtiene en tres minutos. Las principales ventajas de este método son la rapidez, sencillez y economía, ya que no requiere ningún tipo de instrumentación. Sin embargo, el laboratorio recomienda que los reactivos del kit se almacenen entre 4 y 8 °C, dificultando su posible uso como método de diagnóstico de campo. Esta técnica no está aprobada aún, ni en EEUU ni en la UE (Hobbs y Sena, 2013).

Las últimas investigaciones en este campo se encuentran encaminadas a buscar nuevas técnicas de diagnóstico rápido que puedan ser empleadas para muestras de ambos sexos. Alderete y Neace (2013) han identificado anticuerpos en el suero de pacientes infectados frente a proteínas de *T. vaginalis* altamente inmunogénicas [α -actinina (ACT), aldolasa (ALD), α -enolasa (ENO) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAP)]. Sus últimos estudios se han centrado en la generación de una proteína recombinante compuesta por la combinación de epítomos de ALD, ENO y GAP previamente seleccionados en función de su reactividad con sueros de pacientes de ambos sexos. Los resultados, hasta el momento, son satisfactorios. Sin embargo el equipo continúa buscando nuevos antígenos con el fin de desarrollar y comercializar un sistema rápido de detección de la tricomonosis a través de una muestra sérica.

Tabla 2: Porcentajes de sensibilidad (Sens.) y especificidad (Esp.) de las distintas técnicas diagnósticas descritas para identificar *T. vaginalis*.

Diagnóstico	Test	Muestra	Cebadores	Sens. (%)	Esp. (%)	Referencias	Ventajas	Limitaciones
Observación al microscopio	Muestra en fresco	MV / O(M)		58,5	100	Lawing <i>et al.</i> , 2000	Fácil, rápido (resultado en el mismo día de la toma), sencillo y de bajo coste.	Requiere un microscopio y un especialista. La sensibilidad y especificidad dependerán de las aptitudes del microscopista. No aplicable en muestras de varón.
		MV		71,4	100	Huppert <i>et al.</i> , 2007		
		MV		61,5	100	Van der Pol <i>et al.</i> , 2005		
		MV		71,71		Hegazy <i>et al.</i> , 2012		
		MV		66,67	100	Radonjic <i>et al.</i> , 2006		
		MV		48,2	100	Pillay <i>et al.</i> , 1994		
		MV		55	100	Sood <i>et al.</i> , 2007		
		MV		64,9	100	Nye <i>et al.</i> , 2009		
		MV		64,4		Huppert <i>et al.</i> , 2007		
		MV		68,5		Van der Pol <i>et al.</i> , 2005		
MV		74	100	Kalon Lab				
Tinción	Giemsa	MV		71,43	99,44	Radonjic <i>et al.</i> , 2006	Rápida, bajo coste. Papanicolaou útil en citologías.	Requiere tiempo, microscopio y es considerado subjetivo.
	Naranja de Acridina			52		Soper, 2004		
	Papanicolaou	MV		94,3	100	Lawing <i>et al.</i> , 2000		
Cultivo	Medio Diamond	O(M)		60,4	100	Lawing <i>et al.</i> , 2000	Mejora la sensibilidad con respecto a la observación en fresco.	Requiere equipación y especialista. Periodo de incubación largo. Riesgo de falsos negativos.
		O(H)		56	100	Van der Pol <i>et al.</i> , 2005		
		MV		95,8		Huppert <i>et al.</i> , 2007		
		MV		76	100	Kalon Lab		
		MV		89,2	100			
	MU//O(H)		48	100	Nye <i>et al.</i> , 2009			
	MV		90		Huppert <i>et al.</i> , 2000			
InPouch™			92	98	Soper, 2004	Menos manipulación, sencillo, fácil transporte	Más caro que el cultivo.	
Prueba de hibridación de ácidos nucleicos	Affirm VP III			92	99,7	BD Diagnostics	Resultados en 45 min. Detección de coinfecciones con <i>Gardnerella</i> y <i>Candida</i> .	Complejidad moderada. Requiere especialista e instrumental. No aplicable en asintomáticos ni muestras de varón.
		MV		63,4	99,9	Andrea <i>et al.</i> , 2011		
		MV		98,7	94,6			
		ME		98,7	97,3	Nye <i>et al.</i> , 2009		

NAAT (Test de amplificación de ácidos nucleicos)	APTIMA TV	O(M)	98,7	98,2	Nye <i>et al.</i> , 2009	Alta sensibilidad y especificidad.	Caro, requiere equipo cualificado e instrumental de laboratorio.		
		MU	96	90,5					
		O(H)	96	96,3					
		MV	97,9	95,3	Huppert <i>et al.</i> , 2007				
		MV	98	95,6	Hardick <i>et al.</i> , 2003				
		O(H)	90,1	98,9	Andrea <i>et al.</i> , 2011				
		MV	100	100					
		MV	TV3 y TV7	88,7				97,1	Lawing <i>et al.</i> , 2000
		O(M)	64,2	100					
		MV	TVA	48,7	100			Van der Pol <i>et al.</i> , 2005	
	MV	TVK	79,5	97,8					
	O(H)	TVK	96	99,2					
	O(H)	β-tubulina	92	99,4					
	PCR casera	MV	BTUB9 y 2	80,95	97,21	Radonjic <i>et al.</i> , 2006	Detectan <i>T. vaginalis</i> con concentraciones menores a las del cultivo. Altamente sensible y específico. Se puede emplear con muestras de varón.	Riesgo de presencia de agentes inhibidores de PCR en las muestras. Caro. Requiere equipo cualificado e instrumental de laboratorio.	
		MV	TVK3 y TVK7	100	99,2	Pillay <i>et al.</i> , 2004			
		MV	β-tubulina	98,7	100	Nye <i>et al.</i> , 2009			
		ME	β-tubulina	96	100				
		O(M)	β-tubulina	90,6	100				
		MU	β-tubulina	92	100	Hobbs <i>et al.</i> , 1999			
		O(H)	β-tubulina	80	100				
MU		TVK3 y TVK7	82	95					
MV		95	99	Kalon Biological Ltd					
MV		97,98	99,37	Hagezy <i>et al.</i> , 2012					
Test rápidos	Tv latex agglutination test	MV	83,3	98,8	Huppert <i>et al.</i> , 2007	Sensible. Resultados en 10 minutos.			
		MV	66,6	100	Pillay <i>et al.</i> , 2004				
	OSOM rapid antigen test/Xeno-Strip	MV	76,7	99,1	Jones <i>et al.</i> , 2013				
		MV	78,9-90		Huppert <i>et al.</i> , 2007				
MV	89,6	97,5							

MV, Muestra vaginal; ME, Muestra endocervical; O(M), Orina de mujer; MU, Muestra uretral; O(H) Orina de hombre

8. TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO

8. A. 5-NITROIMIDAZOLES

El **metronidazol** [1-hidroxietil-2-metil-5-nitroimidazol; **Figura 7**] (MTZ) es el fármaco de referencia empleado para el tratamiento de la tricomonosis. La alternativa farmacológica es el tinidazol [1-[2-etilsulfonietil]-2-metil-5-nitroimidazol, **Figura 8**] (TDZ). Estos dos 5-nitroimidazoles (5-NI) son los únicos medicamentos aprobados por la FDA para el tratamiento de la tricomonosis.

El MTZ fue descubierto por Cosar y Jolou en 1959, a partir de la azomicina, un antibiótico semisintético producido por *Streptomyces* y descubierto por Nakamura a mediados de los años 50 con estructura de 2-nitroimidazol (Durel *et al.*, 1960; Vazquez *et al.*, 2001). En tan solo un año se autorizó su uso en el tratamiento clínico de la tricomonosis humana en Europa y cuatro años después en EEUU (Moreno y Docampo, 1985). Este fármaco es activo frente a otros protozoos como *Giardia duodenalis* y *Entamoeba histolytica* y su espectro de actividad incluye bacterias anaerobias Gram positivas y negativas de los géneros *Bacteroides*, *Fusobacterium* y *Clostridium* entre otros (Moreno y Docampo, 1985). Es uno de los 100 fármacos más prescritos en EEUU (Bendesky *et al.*, 2002), y pertenece a la lista de fármacos esenciales definidos por la OMS (WHO, 2006).

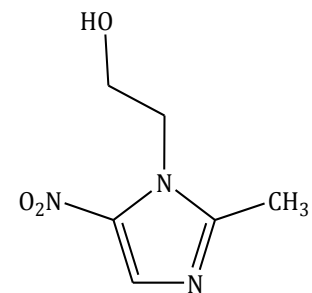


Figura 7: Estructura química del metronidazol.

El régimen posológico recomendado es una única dosis de 2 g de MTZ por vía oral. No obstante, la guía de tratamiento de I.T.S. editada por la OMS recomienda el uso de MTZ durante 5 días en infecciones uretrales y neonatales (**Tabla 3**). En caso de fallo en el tratamiento, los clínicos prescriben habitualmente el mismo tratamiento. Si no se logra la eliminación del parásito, algunos médicos prescriben TDZ o bien alargan la duración del tratamiento (Workowski y Berman, 2010).

Tabla 3: Régimen posológico descrito por la OMS (2005a).

Tratamiento	Fármaco	Dosis	Vía de administración	Duración
Infecciones vaginales	Metronidazol	2 g	Oral	Dosis única
	Tinidazol	2 g	Oral	Dosis única
Alternativa en infecciones vaginales	Metronidazol	400 mg o 500 mg	Oral	2 veces/día; 7 días
	Tinidazol	500mg	Oral	2 veces/día; 5 días
Infecciones uretrales	Metronidazol	400 mg o 500 mg	Oral	2 veces/día; 7 días
	Tinidazol	500 mg	Oral	2 veces/día; 5 días
Infecciones neonatales	Metronidazol	5 mg/kg	Oral	3 veces/día; 5 días

Como se ha descrito anteriormente, la tricomonosis es un factor de riesgo en la transmisión y adquisición del SIDA. La tasa de infecciones persistentes (Gatski y Kissinger, 2010) y de reinfecciones por *T. vaginalis* en pacientes con VIH puede triplicarse, destacando un porcentaje de resistencia al tratamiento de hasta un 10% en pacientes VIH+ (Kissinger *et al.*, 2008). Asimismo, en personas coinfectadas con el virus, se ha observado que el tratamiento con MTZ es más eficaz si se administra en varias tomas, en lugar del régimen de dosis única de 2 g (Kissinger *et al.*, 2008). Estos datos parecen sugerir que el tratamiento antirretroviral o los mecanismos desencadenados por la infección vírica podrían interactuar con el MTZ, recomendándose a pacientes seropositivos la terapia con MTZ multidosis (Kissinger y Adamski, 2013).

Aunque existen formulaciones de MTZ para la administración intravaginal, su eficacia es menor en comparación con el tratamiento oral, ya que no se alcanzan los niveles terapéuticos adecuados en uretra y glándulas anejas (Workowski y Berman, 2010).

El **tinidazol** (TDZ), es la alternativa terapéutica al MTZ. Pertenece a la misma familia química de los 5-nitroimidazoles con un sustituyente sulfona (**Figura 8**). Fue sintetizado en 1969 y aprobado en 2004 para su uso en EEUU por la FDA con el nombre comercial de Tindamax® (Bachmann *et al.*, 2011). En comparación con el MTZ, este fármaco muestra una actividad *in vitro* superior, una mejor distribución tisular y una mayor capacidad para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), debido a su carácter lipofílico. Llega a alcanzar en líquido cefalorraquídeo (LCR) niveles de hasta un 80% frente al 42% detectado con MTZ. Su semivida es de 13 h uniéndose a proteínas plasmáticas en un 12% (Vazquez *et al.*, 2001). Estas propiedades farmacocinéticas explican la capacidad de este fármaco para alcanzar en suero y tracto genitourinario de varones y mujeres tratados 2 a 3 veces al día con 500 mg/ entre 1,4 y 2 veces más concentración que la que se alcanza con el MTZ (Bachmann *et al.*, 2011).

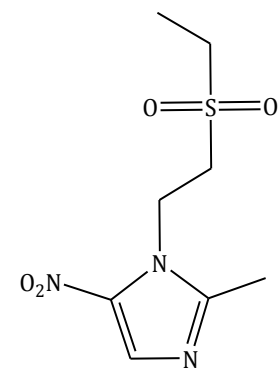


Figura 8: Estructura química del tinidazol.

El tratamiento de la/s pareja/s sexual/es resulta de gran importancia, aunque no se hayan manifestado síntomas, para reducir los casos de reinfección (OMS, 2005a). Está demostrada la existencia de un porcentaje elevado de parejas varones infectadas que no son diagnosticadas debido al carácter asintomático de la infección (Van Der Pol *et al.*, 2005; Hobbs *et al.*, 2006). Se recomienda evitar cualquier contacto sexual hasta no haber confirmado la curación total del paciente y su/s pareja/s (Hobbs *et al.*, 2006).

Se han descrito efectos secundarios asociados al consumo de estos fármacos, entre los que destaca la hipersensibilidad a los 5-NI. De todos los efectos adversos descritos en la ficha técnica de la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPS), los más comunes son las alteraciones gastrointestinales y el desarrollo de sabor metálico (duBouchet *et al.*, 1997). El consumo de alcohol está contraindicado durante el tratamiento con ambos 5-NI, ya que ocasiona “efecto antabus” (Bendesky *et al.*, 2002).

El tratamiento con MTZ está contraindicado durante el primer trimestre de embarazo. Aunque existen estudios contradictorios sobre el efecto mutagénico y teratogénico de estos 5-NI, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) considera que existen evidencias suficientes como para considerar al MTZ agente carcinogénico en animales, pero insuficientes en humanos (Bendesky *et al.*, 2002). Es por ello por lo que este medicamento está catalogado como un fármaco de Categoría B (Caro-Paton *et al.*, 1997; Cudmore *et al.*, 2004). Su excelente absorción y paso a través de membranas provoca que ambos 5-NI alcancen tejido placentario, fetal y líquido amniótico (Heisterberg, 1984; Karhunen, 1984). El fármaco se secreta por la leche materna habiéndose detectado tanto en suero materno como en lactantes (Scott Gray *et al.*, 1961; Erickson *et al.*, 1981). Por ello, en mujeres en periodo de lactancia, se recomienda la interrupción de la misma desde el inicio del tratamiento con MTZ hasta 12-24 h tras la última dosis o de 3 días en caso de que el fármaco empleado sea el TDZ, a fin de reducir la exposición del neonato al fármaco (Workowski y Berman, 2010).

El mecanismo de acción de esta familia de fármacos se ha estudiado ampliamente. Los 5-NI son pro-fármacos, que se metabolizan en el interior del parásito para transformarse en agentes activos. El compuesto penetra en el protozoo mediante difusión pasiva, acumulándose en el interior del trofozoíto. La enzima responsable de la activación del fármaco es la piruvato:ferredoxina oxidorreductasa (PFOR), situada en el hidrogenosoma y responsable de la conversión del piruvato en acetil-CoA con la liberación de CO₂ y protones.

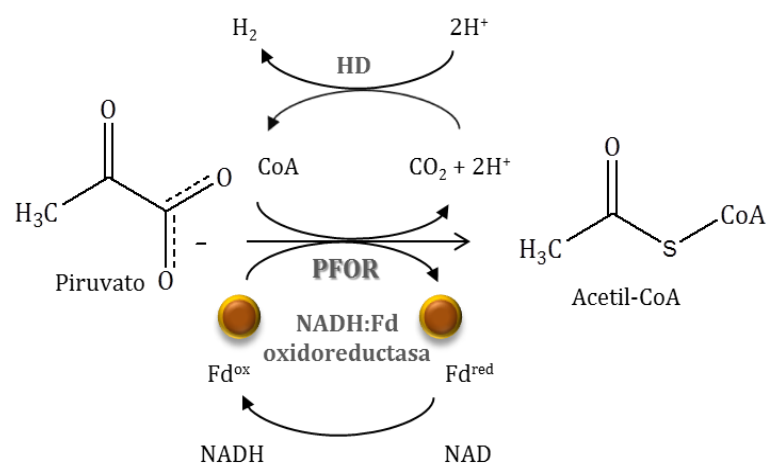


Figura 9: Proceso de descarboxilación oxidativa llevada a cabo en el hidrogenosoma de *T. vaginalis*.

CoA: Coenzima A; *PFOR:* Piruvato:ferredoxina oxidorreductasa; *Fd:* Ferredoxina; *HD:* Hidrogenasa.

Esta descarboxilación oxidativa está asociada a un proceso de fosforilación a nivel de sustrato que lleva consigo la consecuente producción de ATP. Tal y como muestra la **figura 9**, los electrones, que se liberan de esta reacción, son captados por una proteína aceptora denominada ferredoxina (Fd). Esta reacción se completa por la acción de la hidrogenasa que produce hidrógeno molecular (H₂).

Cuando el MTZ se encuentra en el interior del hidrogenosoma compite con la Fd por los electrones. Al presentar un potencial redox superior se produce la activación del fármaco a causa de la transferencia de los electrones de la Fd al grupo NO₂ del MTZ como se observa en el panel A de la **figura 10**, causando la reducción y activación del fármaco con la consecuente disminución de la producción de hidrógeno. El panel B refleja los pasos necesarios para lograr la reducción total de un grupo NO₂ en NH₂, requiriéndose 6 e⁻/molécula. Durante este proceso se van a generar los distintos intermediarios tóxicos (Moreno y Docampo, 1985). Los radicales formados (2, 4 y 6 de la **figura**

10.B) actúan sobre los residuos de adenina y timina del ADN del parásito originando la ruptura de cadenas sencillas y dobles de ADN y con ello la inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas que derivan en la muerte del organismo (Ings *et al.*, 1974; Edwards, 1980; Knox *et al.*, 1981; Moreno y Docampo, 1985). *T. vaginalis* se caracteriza por presentar un genoma con porcentaje de A+T del 68% (Carlton *et al.*, 2007), lo que explica la alta toxicidad selectiva de este grupo de fármacos como tricomonocidas (Cudmore *et al.*, 2004). Asimismo, en los últimos años se ha observado que estos intermediarios citotóxicos también forman aductos con las proteínas del parásito que llevan a la apoptosis del mismo (Ings *et al.*, 1974; Leitsch *et al.*, 2009). Los estudios proteómicos de Leitsch *et al.* (2009) identificaron seis proteínas citosólicas que formaban aductos covalentes con MTZ y TDZ. Todas ellas se encuentran implicadas en procesos redox mediados por la tioredoxina, responsable de la eficiente depleción de las reservas de tiol en el parásito y la alteración del equilibrio redox celular.

El potencial redox necesario para la activación del MTZ es de -486 mV (Knox *et al.*, 1981). Este potencial no puede ser alcanzado en las condiciones aeróbicas en las que se encuentran las células eucarióticas de los mamíferos (-430 mV) (Land *et al.*, 2004), resultando difícil la reducción total del grupo nitro a las dosis terapéuticas a las que se administran estos fármacos. Asimismo, al tratarse de células aerobias, el oxígeno provoca la reoxidación de los radicales aniónicos, generando de nuevo el compuesto inicial inactivo (**Figura 11**), sin llegar a causar grandes lesiones (Moreno y Docampo, 1985). Este ciclo fútil y el

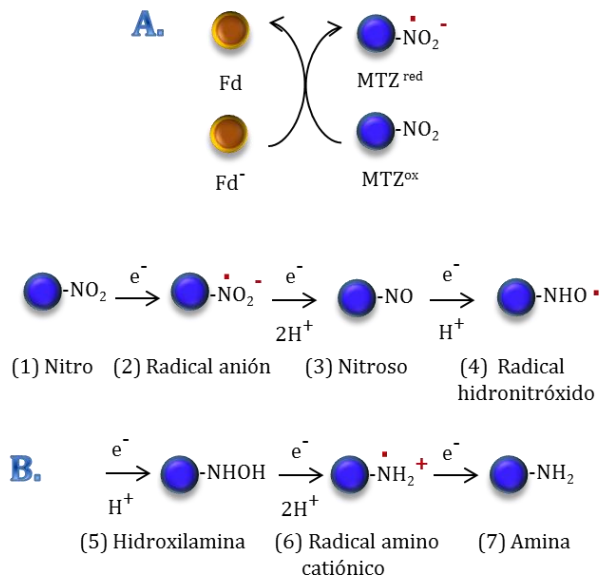


Figura 10: (A) Activación del MTZ por transferencia electrónica de la Fd al grupo nitro. (B) Reducción secuencial del radical nitro mediante transferencia electrónica.

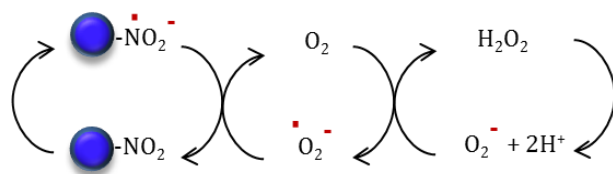


Figura 11: Ciclo fútil de reoxidación del radical aniónico en presencia de oxígeno.

bajo potencial redox explican la toxicidad selectiva de este grupo de fármacos en organismos anaerobios, así como la resistencia aeróbica observada a los 5-NI. Ya en los años 80, Moreno y Docampo (1985) indicaron que la activación del MTZ no debía ser sólo a causa de la ruta metabólica de la PFOR.

Estudios recientes confirmaron esta hipótesis, describiéndose otras rutas de activación de los 5-NI en la que estarían implicadas enzimas redox, como la tiorredoxín-reductasa, capaz de reducir el grupo nitro del fármaco y generar radicales tóxicos como los producidos por la PFOR (Leitsch *et al.*, 2009). O bien, a través de la ruta metabólica del malato en la que los electrones generados durante la descarboxilación oxidativa del malato para generar piruvato, son transferidos a la Fd a través de la NADH:Fd oxidoreductasa (**Figura 12**).

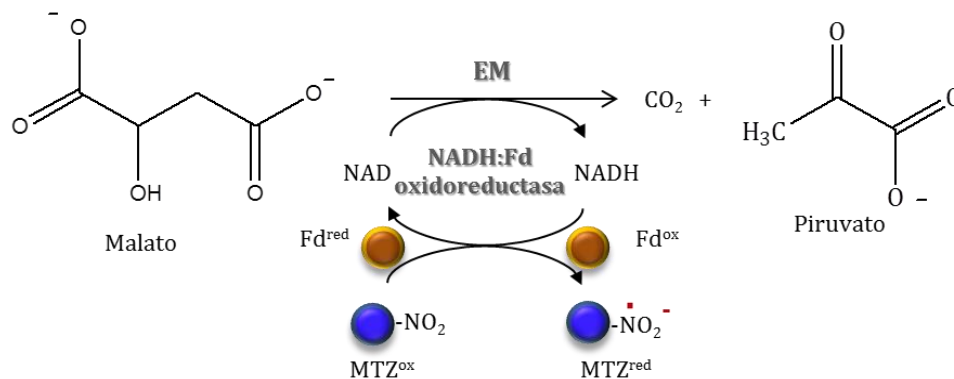


Figura 12: Activación alternativa del MTZ a través de la ruta de la descarboxilación oxidativa del malato. EM: Enzima málica o malato deshidrogenasa

Asimismo se han identificado distintos genes en *T. vaginalis* que codifican para nitrorreductasas, cuyas construcciones recombinantes en modelos de *E. coli* han demostrado la capacidad de reducir MTZ, sugiriéndose otras vías de activación de este grupo de fármacos en el protozoo (Pal *et al.*, 2009).

Aunque el éxito en el tratamiento de la tricomonosis con MTZ se sitúa por encima del 90%, el primer caso de resistencia clínica se publicó a los dos años de su comercialización (Robinson, 1962). Hasta la fecha, no se ha aprobado un tratamiento alternativo con fármacos de otras familias químicas. Desde 1962 se han publicado fenómenos de resistencia al tratamiento en todos los continentes (Meri *et al.*, 2000; Perez *et al.*, 2001; Dunne *et al.*, 2003). Algunos estudios han registrado datos de fallo en el tratamiento con 2 g de MTZ en al menos el 7% de las mujeres (Van Der Pol *et al.*, 2005), habiéndose estimado que de todos los casos clínicos que se diagnostican, entre el 2-10% son casos de resistencia.

Este parásito puede desarrollar dos tipos de resistencia:

Resistencia aeróbica basada en la reoxidación de los aniones tóxicos del MTZ por la presencia de oxígeno (**Figura 11**). Este tipo de resistencia es la que sucede de forma común en los aislados clínicos de pacientes refractarios al tratamiento con MTZ. En la vagina existen niveles de oxígeno que oscilan entre 15-56 μM (Kulda y Hrady, 2008). Las concentraciones de O_2^- y de H_2O_2 que se generan son fácilmente detoxificadas por acción de catalasas y superóxido dismutasas presentes en este parásito (Rasoloson *et*

al., 2001). Asimismo, la conversión del fármaco de nuevo a la forma oxidada causa la disminución de la entrada de más profármaco por difusión pasiva al interior del hidrogenosoma (Muller y Lindmark, 1976; Moreno y Docampo, 1985).

La resistencia aeróbica está catalogada en baja, moderada o alta por el CDC (**Tabla 4**), en función de la respuesta al fármaco que presente el aislado tras someterle a un test de susceptibilidad en el que se estudia la concentración mínima letal (CML) del MTZ o del TDZ mediante observación al microscopio (Schwebke y Barrientes, 2006).

Tabla 4: Catalogación de la resistencia aeróbica de aislados en función de la concentración mínima letal detectada en presencia de MTZ o TDZ.

Rango de CML ($\mu\text{g/mL}$)	Nivel de resistencia
< 50	Sensible a MTZ o TDZ
50-100	Baja
100-200	Moderada
200-400	Alta

La **resistencia anaeróbica** en cambio, está mediada por cambios en el parásito que conllevan la reducción en más de un 50% de la expresión de enzimas claves para la activación del fármaco en el hidrogenosoma como la PFOR o la ferredoxina (Quon *et al.*, 1992; Rasolomon *et al.*, 2001; Leitsch *et al.*, 2009), así como otras enzimas presentes en este orgánulo como la malato deshidrogenasa (Leitsch *et al.*, 2009) o la NADH oxidasa en determinados aislados que han desarrollado una resistencia elevada (Rasolomon *et al.*, 2001). Estos aislados resistentes han sido generados *in vitro* mediante la exposición de los flagelados a concentraciones crecientes del fármaco, forzando al parásito a sobrevivir ante una presión creciente del compuesto (Kulda *et al.*, 1993). Se considera que poseen resistencia anaeróbica todos aquellos aislados que presenten una CML por encima de 3 $\mu\text{g/mL}$ (Schwebke y Barrientes, 2006).

Aunque el MTZ y el TDZ son los dos únicos fármacos aprobados para el tratamiento de la tricomonosis, existen otros compuestos de la misma familia, a excepción del clotrimazol, cuyo uso en clínica no se ha aprobado. Las moléculas más conocidas son (**Figura 13**):

Secnidazol: presenta una absorción rápida por vía oral. Su semivida plasmática es mayor a la del MTZ y el TDZ (entre 17-29 h). Se han descrito efectos secundarios similares a los del MTZ, resultando las alteraciones gastrointestinales las más frecuentes. Cudmore *et al.* (2004) lo describen como una alternativa terapéutica adecuada para el tratamiento de esta I.T.S.

Satranidazol: muestra una semivida igual a la descrita en el secnidazol aunque presenta una actividad *in vitro* inferior a la del fármaco de referencia.

Ornidazol: con una actividad similar a la del MTZ, muestra una semivida plasmática de 12-14 h. Sköld *et al.* (1977) publicaron la curación del 100% de un grupo de 20 pacientes tratadas con una única dosis de 2 g del compuesto. Sin embargo, 8 de ellas mostraron efectos secundarios describiendo principalmente estados de fatiga y

mareos. Los estudios séricos revelaron niveles de ornidazol en sangre entre 5 y 8 veces superiores a la CMI registrada para este compuesto, manteniéndose hasta 36 h tras la ingestión. Su potencial redox es -467 mV, inferior al del MTZ (Leitsch *et al.*, 2009).

Clotrimazol: Imidazol de baja absorción sistémica que se emplea en formulaciones tópicas para el tratamiento de la tricomonosis, con una actividad inferior que los 5-NI. duBouchet *et al.* (1997) registraron sólo un 11,1% de curación en un grupo de 45 mujeres tratadas con este fármaco, aunque ninguna desarrolló efectos adversos. Es el tratamiento prescrito en mujeres embarazadas más común (Singh y Jain, 2007), siendo la alternativa terapéutica recomendada por el CDC durante el primer trimestre de embarazo para aliviar los síntomas (100 mg clotrimazol intravaginal/día durante 6 días) seguido de un tratamiento de 2 g de MTZ durante el segundo trimestre (Cudmore *et al.*, 2004).

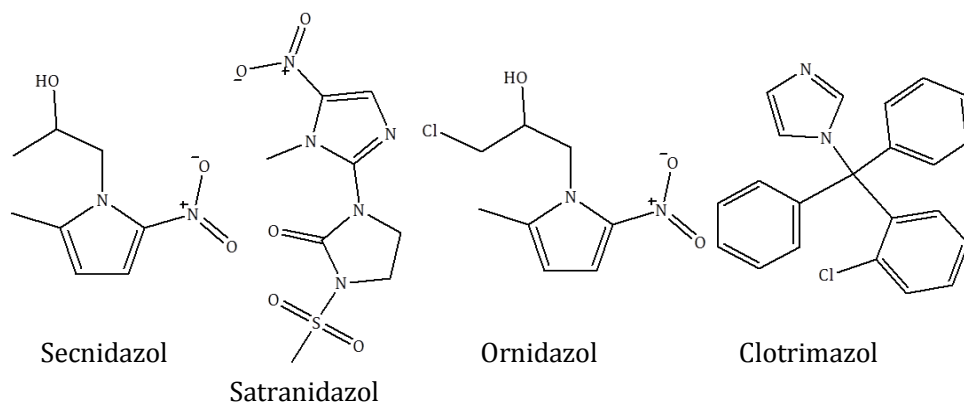


Figura 13: Estructura química de otros fármacos tricomonocidas.

8. B. OTRAS ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS

La búsqueda de alternativas farmacológicas eficaces para el tratamiento de esta parasitosis continúa siendo de gran importancia hoy en día. La literatura contiene un gran número de trabajos que describen la actividad tricomonocida de extractos de plantas de distintas regiones geográficas como Oceanía (Desrivot *et al.*, 2007), África (De Villers *et al.*, 2010; Cheikh *et al.*, 2011), Yemen (De Villers *et al.*, 2010), México (Calzada *et al.*, 2007), Panamá (Muelas-Serrano *et al.*, 2000; Gómez-Barrio *et al.*, 2004), Guatemala (Muelas-Serrano *et al.*, 2000), Ecuador (Muelas-Serrano *et al.*, 2000), Argentina (Muelas-Serrano *et al.*, 2000), Brasil (Frasson *et al.*, 2012; Brandelli *et al.*, 2013; Tasca Cargnin *et al.*, 2013), Filipinas (Vital y Rivera, 2011), Turquía (Ertabaklar *et al.*, 2009), España (Martín *et al.*, 1998; Martínez-Díaz *et al.*, 2015) o Irán (Ali Youse *et al.*, 2012; Hassani *et al.*, 2013), entre otros.

A continuación, se recogen los compuestos de origen natural ensayados *in vitro* y que podrían ser fuente de nuevas alternativas terapéuticas (**Tabla 5**). Tan solo se citan aquellos estudios que han presentado una actividad antiparasitaria relevante con valores de $IC_{50} \leq 100 \mu\text{g/mL}$ y/o MIC en torno a 1 mg/mL.

Tabla 5: Actividad tricomonocida de las especies naturales más relevantes obtenidas de la literatura científica. En la tabla se especifica la especie, denominación común, actividad tricomonocida, uso tradicional de los extractos de la planta y la composición mayoritaria del extracto estudiado.

Especie	Nombre común	Parte de la planta	Actividad ($\mu\text{g/mL}$)	Uso tradicional	Compuestos aislados	Referencia
<i>Aframomum sceptrum</i>		Rizoma	$\text{IC}_{50} = 0,12$; $\text{MIC}_{100} = 1,72$	Antimicrobiano	beta-pineno, óxido de cariofileno y cipereno	Cheikh-Ali <i>et al.</i> , 2011
<i>Allium hirtifolium</i>	Chalote persa	Granos	$\text{MIC}_{100} = 10-5$	Tratamiento de los síntomas asociados a los resfriados y gripes, frente al asma, antiinflamatorio (artritis y arteroesclerosis), antineoplásico	Sulfuros orgánicos (alicina)	Taran <i>et al.</i> , 2006
<i>Arbutus unedo</i>	Madroño	Hojas	$\text{MIC}_{100} = 500$	Tratamiento de las hemorroides, hipertensión, diarrea y ansiedad	Glicósidos y taninos	Ertabaklar <i>et al.</i> , 2009
<i>Artemisia absinthium</i>	Ajenjo, hierba santa	Aérea	$\text{IC}_{50} = 87,18$	Antihelmíntico, antiséptico, febrífugo, repelente de insectos y en el tratamiento de alteraciones hepatobiliares, dispepsia y fiebre crónica	Lactonas sesquiterpénicas, flavonoides, polifenoles	Guilani y Janbez, 1995; González-Coloma <i>et al.</i> , 2012; Martínez-Díaz <i>et al.</i> , 2015
<i>Bocconia frutescens</i>		Aéreas	$\text{IC}_{50} = 30,9$	Antipruriginoso, tratamiento de alteraciones en la piel (dermatitis, úlceras, tiña, verrugas, etc), disentería e infecciones respiratorias (tos ferina, tuberculosis)	Alcaloides	Sánchez-Arreola <i>et al.</i> , 2006; Calzada <i>et al.</i> , 2007
<i>Carica papaya</i>	Papaya	Semilla	$\text{IC}_{50} = 5,6$	Antibacteriano, antipuriginoso, vermífugo y antiamebiano	Isotiocinato de bencilo y glucosinolatos	Calzada <i>et al.</i> , 2007; O'Hare y Williams, 2014
<i>Cocos nucifera</i>	Coco	Fibra de la cáscara	$\text{IC}_{50} = 5,8$	Tratamiento de la artritis y la diarrea	Polifenoles	Esquenazi <i>et al.</i> , 2002; Calzada <i>et al.</i> , 2007

<i>Cussonia</i> spp.		Hjas	MIC ₁₀₀ = 300-1000	Analgésico, antimalárico, antiinflamatorio, antidiarreico y contra las enfermedades mentales y la I.T.S.		De Villiers <i>et al.</i> , 2010
<i>Geranium mexicanum</i>	Geranio de olor, pata de león	Corteza	IC ₅₀ = 56	Antipruriginoso, antidiarreico	Flavonoides	Barbosa <i>et al.</i> , 2007; Calzada <i>et al.</i> , 2007
<i>Hypericum polyanthemum</i>		Aéreas	MIC ₁₀₀ = 325	Antimalárico	Floroglucinol y benzopiranos	Tasca Cargnin <i>et al.</i> , 2013
<i>Lygodium venustum</i>	Culebrina	Aéreas	IC ₅₀ = 60,9	Antidiarreico, contra mordedura de víbora		Calzada <i>et al.</i> , 2007
<i>Myristica fatua</i>		Fruto	IC ₅₀ = 35,2	Antirreumático		Desrivot <i>et al.</i> , 2007
<i>Neurolaena lobata</i>		Hojas	MIC ₁₀₀ = 1000; IC ₉₀ = 500	Antimalárico	Lactonas sesquiterpénicas	Muelas-Serrano <i>et al.</i> , 2000
<i>Sapindus saponaria</i>	Boliche, amole, jaboncillo	Fruto	MIC ₁₀₀ = 156	Limpieza de la ropa, curación de úlceras, inflamación y heridas externas	Saponinas	Damke <i>et al.</i> , 2013
<i>Scaevola balansae</i>		Hojas, corteza	IC ₅₀ = 29,3	Reconstituyente		Desrivot <i>et al.</i> , 2007
<i>Tarchonanthus camphoratus</i>	Arbusto de alcanfor	Hojas	MIC ₁₀₀ = 500	Enfermedades respiratorias y para perfumar las casas		de Brum Viera <i>et al.</i> , 2015
<i>Voacanga globosa</i>	bayag-usa	Hojas	MIC ₁₀₀ = 1000	Antibacteriano	Alcaloides, saponinas y taninos	Vital y Rivera, 2011

En lo que respecta a los agentes de síntesis, en las últimas décadas se han descrito numerosas moléculas con estructura no imidazólica y actividad tricomonocida *in vitro* e *in vivo* que han llegado a ser empleadas como tratamiento alternativo a los 5-NI en ciertas regiones. Algunas de ellas se utilizaron tópicamente antes de la aparición del MTZ. Sin embargo, sólo lograban una mejora de los síntomas, no pudiéndose alcanzar en muchos casos la cura total debido a la dificultad del fármaco para alcanzar órganos anejos profundos, que *T. vaginalis* puede colonizar. De igual forma, otros tratamientos se han empleado en casos clínicos de resistencia a los fármacos de referencia. En la siguiente tabla se muestran los compuestos más relevantes.

Tabla 6: Fármacos empleados como alternativa terapéutica para el tratamiento de la tricomonosis.

Fármaco	Estructura	Mecanismo de acción	Observaciones	Fuente
Hanamicina	Polieno aromático	Similar al de la anfotericina B. Se asocia al ergosterol de la membrana del parásito causando la formación de poros.	Empleado en India a nivel tópico. Toxicidad elevada, desarrollando ulceraciones en la mucosa genitourinaria.	Cudmore <i>et al.</i> , 2004
Paromomicina	Aminoglicósido	También empleado en el tratamiento de la amebosis, critosporidiosis y giardiosis. Se une al ARNr 16S inhibiendo la síntesis de proteínas.	Baja absorción intestinal, formulaciones tópicas. Empleado en pacientes alérgicos al MTZ o en tratamientos conjuntos con 5-NI. Estudios con resultados de efectividad contradictorios. Casos de ulceraciones vaginales dolorosas.	Helms <i>et al.</i> , 2008b; Nyirjesty <i>et al.</i> , 2011; Schwebke <i>et al.</i> , 2013; Secor, 2012
Ácido bórico	Ácido trioxobórico	Antiséptico debido a su carácter ácido.	En supositorios y duchas vaginales en casos de hipersensibilidad al MTZ. Estudios con resultados contradictorios en cuanto a su eficacia.	Aggarwal y Shier, 2008; Schwebke <i>et al.</i> , 2013
Furazolidona	Nitrofurano	Tratamiento frente a bacterias entéricas y <i>Giardia</i> . Interfiere en rutas metabólicas al interaccionar con distintos sistemas enzimáticos. Se une al ADN.	Escasa absorción intestinal aunque eficaz tras su administración intravaginal.	Narcisi y Secor, 1996; Secor, 2012

Nitazoxanida	Derivado sintético de la sialicilamida	Aprobado como agente frente a la giardiosis y la criptosporidiosis, actuando de forma similar a los 5-NI a través del grupo nitro. También activo frente a algunos helmintos mediante la inhibición de la polimerización de la tubulina.	Altamente activo <i>in vitro</i> frente a <i>T. vaginalis</i> . Absorción intestinal limitada, limitando su uso a nivel intravaginal.	Adagu <i>et al.</i> , 2002; Cedillo-Rivera <i>et al.</i> , 2002; Secor, 2002; Wright <i>et al.</i> , 2010
Miltefosina	Fosforilcolina	Leishmanicida. Inhibe la síntesis de fosfolípidos gracias a su estructura.	Altamente activo <i>in vitro</i> frente a aislados sensibles y resistentes de <i>T. vaginalis</i> . Algunos estudios alertan sobre posibles efectos teratogénicos.	Blaha <i>et al.</i> , 2006; Dorlo <i>et al.</i> , 2012; Ouellete <i>et al.</i> , 2004; Rocha <i>et al.</i> , 2014
Nonoxinol-9	Hexacosanol	Contraceptivo espermicida empleado en formulaciones tópicas durante más de 50 años. Detergente no iónico con actividad microbicida.	En desuso debido a que puede provocar ulceraciones genitales, erosiones en el epitelio y alteración de la flora aumentando el riesgo de adquirir VIH, no protegiendo frente a otras I.T.S.	Wilkinson <i>et al.</i> , 2002

9. PATOGENIA

La distinta sintomatología provocada por el parásito sienta sus bases en los mecanismos de patogenia. Los mecanismos de patogenia, aún hoy en día, no han podido ser explicados de forma clara. En las últimas décadas se han realizado estudios que han permitido revelar de forma parcial el comportamiento y evolución de este parásito. *Trichomonas* se encuentra en un ambiente complejo, que sufre cambios bruscos, en el que influyen el pH, la microflora, la respuesta inmune del hospedador, los niveles de hierro y zinc, poliaminas y calcio, etc. En este sentido, el parásito ha tenido que ser capaz de desarrollar mecanismos de adaptación al hospedador para colonizar y mantener la infección en este ambiente tan hostil. La interacción parásito-hospedador es un proceso multifactorial dependiente de mecanismos inherentes al paciente (hospedador) y al parásito **figura 14**.

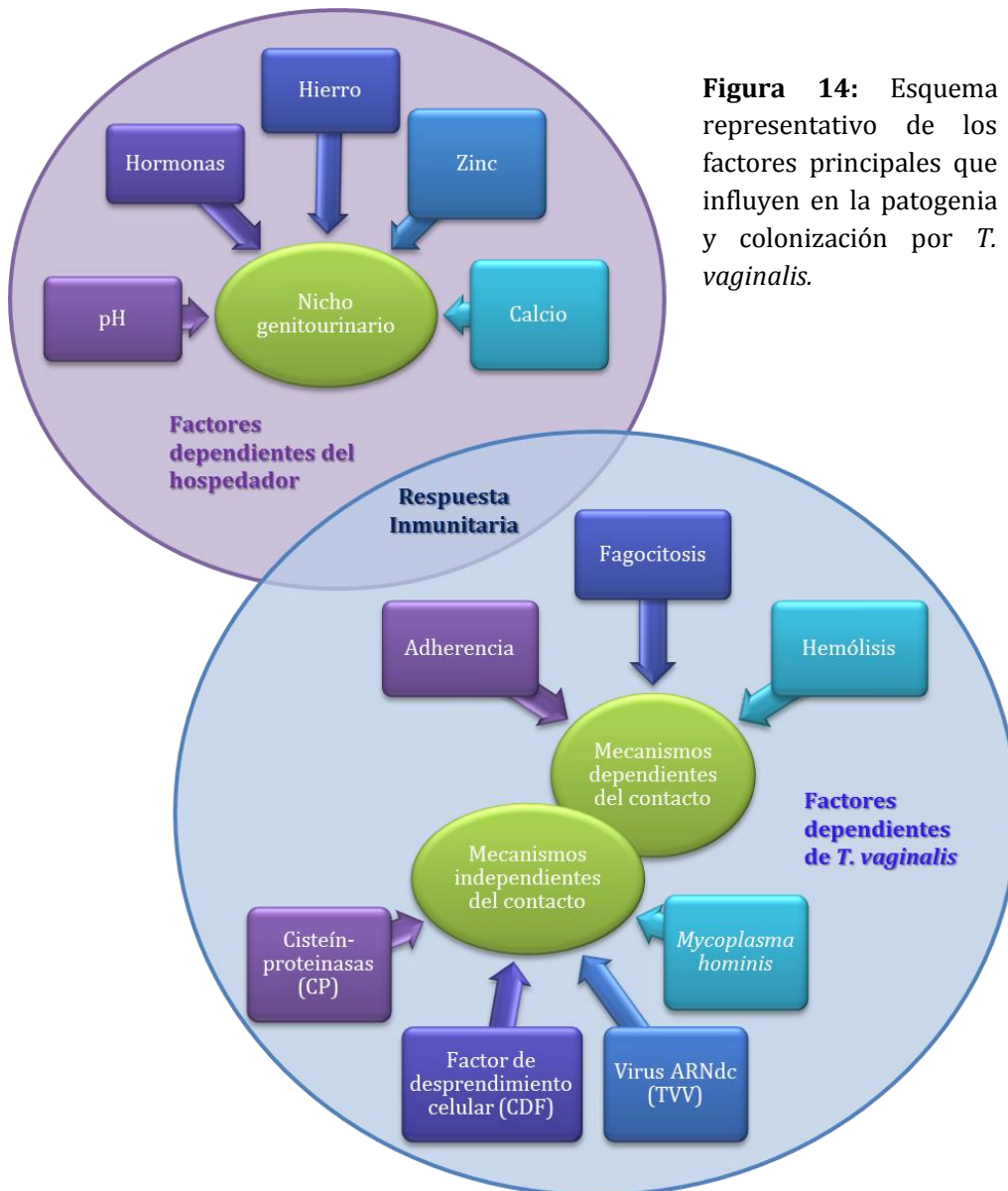


Figura 14: Esquema representativo de los factores principales que influyen en la patogenicidad y colonización por *T. vaginalis*.

9. A. FACTORES ASOCIADOS AL HOSPEDADOR

Los factores más relevantes asociados al hospedador son:

a) pH vaginal y microflora: *T. vaginalis* crece en un pH próximo a 5,0. El pH vaginal de una mujer sana es ácido, por debajo de 4,5. La existencia de enfermedades genitourinarias concomitantes o una alteración de la flora (especialmente la disminución de la población de *Lactobacillus acidophilus* y/o un incremento de las bacterias anaerobias), están asociadas a un aumento del pH. Esta circunstancia facilita el asentamiento del parásito en caso de un contacto de riesgo. Existen muchos factores asociados al parásito cuya expresión y funcionalidad van a estar determinados por el pH del medio (Fiori *et al.*, 1996). Asimismo, el propio parásito a través de la fagocitosis de las bacterias de la microflora, reduce la población de *Lactobacillus*, principal responsable del ambiente ácido en la vagina (Sood y Kapil, 2008). Esta alteración de la flora y la secreción de determinados factores favorece un ambiente alcalino que asegure su propio asentamiento.

b) Ciclo menstrual y niveles hormonales: El papel que juegan estos dos elementos en la presentación clínica de la tricomonosis es de gran relevancia. La exacerbación de los síntomas en la mujer está asociada a las fluctuaciones hormonales durante el transcurso del ciclo menstrual. El nivel de estrógenos alcanza dos picos máximos durante el ciclo: el primero durante la ovulación y el segundo en la mitad de la fase lútea (periodo previo a la menstruación). En cambio la progesterona comienza a secretarse durante la segunda parte del ciclo, es decir, tras la ovulación, disminuyendo drásticamente con el comienzo de la menstruación (**Figura 15**). Durante el embarazo, la mujer presenta niveles de estrógenos y progesterona elevados.

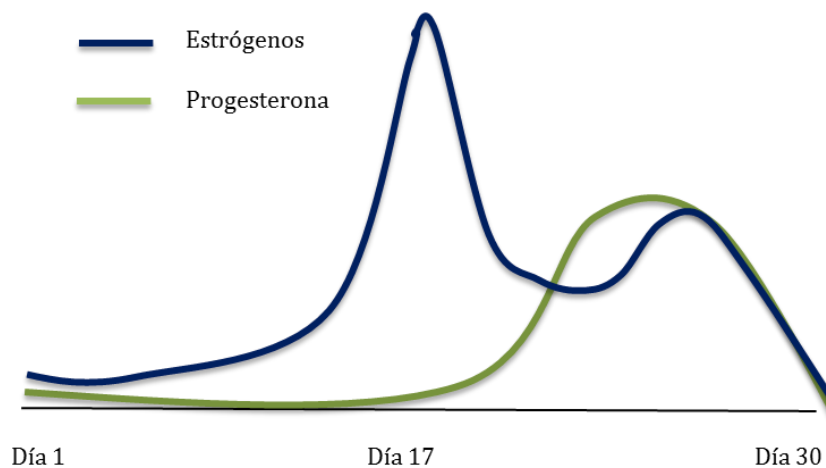


Figura 15: Niveles de estrógenos y progesterona durante el ciclo de una mujer fértil no embarazada.

La presencia de receptores específicos para estrógenos y andrógenos en la superficie de *T. vaginalis* refleja la importancia de las hormonas en el desarrollo de esta parasitosis (Ford, 1987). Hay estudios que parecen indicar que tanto un ambiente hipo como hiperestrogénico podrían favorecer distintos mecanismos relacionados con el asentamiento del parásito. En la literatura científica se pueden encontrar dos hipótesis contrapuestas que no se han logrado confirmar.

La primera teoría explicaría por qué algunas pacientes experimentan una exacerbación de los síntomas durante la menstruación. Este periodo se caracteriza por presentar niveles bajos de estrógenos y un incremento en la disponibilidad de hierro a través de los glóbulos rojos en el aparato genitourinario. Asimismo, durante la menstruación la flora vaginal sufre una disminución de la población de lactobacilos (Eschenbach *et al.*, 2000), convirtiéndose en otro factor que puede influir en el asentamiento parasitario. La situación hormonal contraria se produce durante el embarazo, periodo en el que la mujer presenta una mayor concentración de estrógenos y progestágenos. Según esta hipótesis el desarrollo de síntomas se vería disminuido tal y como han llegado a relatar algunas pacientes. Los estudios de Garber *et al.* (1991) demostraron que la presencia de estrógenos en la cavidad genitourinaria induce una disminución en la secreción de factores de virulencia asociados al parásito como el factor de desprendimiento celular (CDF). Por otro lado, el nivel de estrógenos en sangre condiciona la producción de

glucógeno en las células del epitelio vaginal. Una deficiencia estrogénica induce una disminución de la flora normal, que emplea y transforma el glucógeno en ácido láctico como sustrato energético. En estas condiciones, el pH vaginal aumentaría, favoreciendo el asentamiento de *T. vaginalis* como se ha explicado en el punto anterior (**Figura 16**, teoría A). Siguiendo esta línea de pensamiento, Baeten *et al.* (2001) observaron que las mujeres que usaban sistemas depot de medroxiprogesterona (DMPA) presentaban una susceptibilidad menor a la infección por *T. vaginalis*.

Sin embargo, y en contra de lo defendido en el apartado anterior, este ambiente (bajos niveles de estrógenos, un menor glucógeno disponible y un pH alto) es el que presentan las adolescentes pre-menárquicas y las mujeres postmenopáusicas, poblaciones en las que el asentamiento es poco frecuente. Asimismo, Sharma *et al.* (1997) describieron la curación de un caso de tricomonosis recurrente en una mujer menopáusica tras retirarle la terapia de reemplazo hormonal. Este grupo defiende la idea de que los estrógenos pueden favorecer el asentamiento del parásito (**Figura 16**, teoría B). En relación a esta segunda teoría, se podría asociar este factor biológico (niveles hormonales altos) con un incremento del crecimiento de *T. vaginalis* en animales ovariectomizados y estrogenizados tras la infección experimental. El incremento de glucógeno, observado en la mucosa vaginal de ratas ovariectomizadas tras el tratamiento con estradiol, sugiere una posible asociación entre la susceptibilidad a la infección y la acumulación de este sustrato (glucógeno) empleado como nutriente por el parásito.

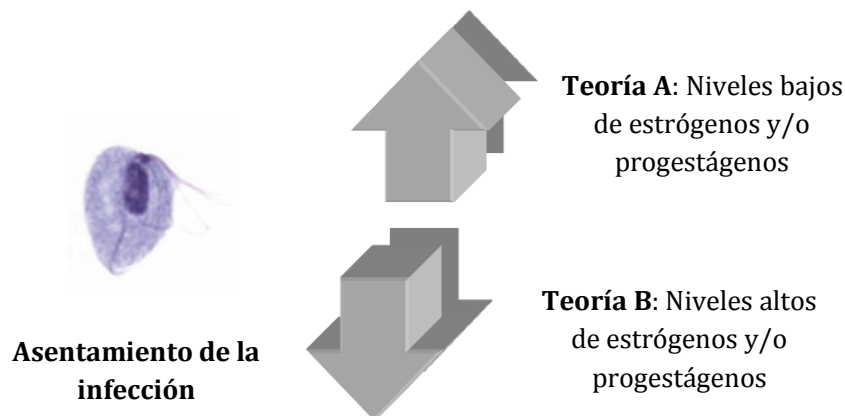


Figura 16: Resumen gráfico de las dos teorías que reflejan la influencia de los niveles de hormonas sexuales femeninas en el asentamiento de *T. vaginalis* a nivel genitourinario.

La existencia de trabajos que muestran resultados contrapuestos refuerza la idea de que la patogenicidad de este parásito se debe a la correlación entre los distintos factores de virulencia y el microambiente genitourinario. Un único factor no puede explicar la patología de esta I.T.S., aunque, tal y como se ha demostrado, parece que la influencia del factor hormonal en el establecimiento de esta parasitosis es de gran importancia.

De forma concomitante a las fluctuaciones de hormonas, se va a producir la renovación periódica de la mucosa junto con la descamación fisiológica durante el ciclo menstrual del epitelio cervical y vaginal, que van a permitir que el parásito acceda a capas más profundas.

c) Presencia de hierro: el hierro es uno de los factores que más se han estudiado en la patogenia de *T. vaginalis*. Su papel como inductor de numerosos genes asociados al asentamiento y colonización del parásito (Crouch *et al.*, 2001), así como a la exacerbación de su patogenia, son indiscutibles. También es esencial para el desarrollo adecuado del metabolismo del parásito y su multiplicación. *T. vaginalis* presenta un metabolismo fermentativo en el que participan proteínas citoplasmáticas e hidrogenosomales con núcleos Fe-S (Figuroa-Angulo *et al.*, 2009). Hay estudios que corroboran el papel regulador del hierro en determinadas proteínas parasitarias como las cisteín-proteasas (CP) o las adhesinas (AP), así como en otras enzimas (**Tabla 7**). Sin embargo, en muchos de los genes que codifican para estas proteínas no se han logrado identificar elementos reguladores de hierro (IRE) ni promotores génicos dependientes de hierro (IRP) (Kummer *et al.*, 2008) como se observa en el gen que codifica a la adhesina AP65 (Tsai *et al.*, 2002).

Tabla 7: Proteínas reguladas por la acción del hierro (Figuroa-Angulo *et al.*, 2012; Arroyo *et al.*, 2015).

Proteína	Tipo de proteína	Función	Regulación por Fe
AP23	Adhesina	Citoadherencia	+
AP33	Adhesina y enzima hidrogenosomal	Citoadherencia y actividad succinil CoA sintetasa	+
AP51	Adhesina y enzima hidrogenosomal	Citoadherencia y actividad succinil CoA sintetasa	+
AP65	Adhesina y enzima hidrogenosomal	Citoadherencia y actividad málica	+
AP120	Adhesina y enzima hidrogenosomal	Citoadherencia y actividad PFOR	+
TvCP4	CP de superficie	Hemólisis	+
TvCP12	CP de superficie	Citotoxicidad	-
TvCP30	CP de superficie	Citoadherencia, desorganización del citoesqueleto y degradación de proteínas	-
TvCP39	CP de superficie	Citotoxicidad y degradación de inmunoglobulinas	-
TvCP62	CP	Citoadherencia	+
TvCP65	CP de superficie	Citotoxicidad	-
TvCP2, CP3, CP4 y CPT	CP de secreción	Inducción de la apoptosis en células del hospedador	-

TvLEGU-1	CP de superficie	Citoadherencia	+
TvLIP	Triacilglicerol lipasa	Hemólisis	+
TvGAPDH	Proteína de unión a fibronectina y deshidrogenasa	Citoadherencia	+
P270	Proteína de superficie	Variación fenotípica	-

Los niveles de hierro altos van condicionan procesos metabólicos asociados al hidrogenosoma, regulando el potencial de membrana del orgánulo, así como la expresión de enzimas hidrogenosomales entre las que se encuentran las AP (Kim *et al.*, 2006). También se ha confirmado que este elemento induce modificaciones en los componentes de la matriz extracelular del hospedador, como el incremento de moléculas de fibronectina (Fn) que favorece la adhesión de los trofozoítos (Crouch *et al.*, 2001; Crouch y Alderete, 2001). Asimismo, este ambiente rico en Fe se correlaciona con procesos de evasión del sistema inmune del hospedador. El hierro induce la expresión de determinadas CP implicadas en la degradación del componente C3b del complemento (Alderete *et al.*, 1995b) o la fosforilación de la proteína inmunógena de superficie P270 (Alderete, 1999).

Aunque en condiciones de bajo hierro la capacidad de adhesión se encuentra mermada debido a la disminución en la expresión de las adhesinas (AP) el parásito va a inducir otras proteínas que permite la colonización. En este ambiente, el parásito aumenta hasta tres veces su unión a mucina y posteriormente va a causar la degradación proteolítica de la mucosa a través de la secreción de CP con actividad mucinasa (Lehker y Sweeney, 1999). En otras palabras, en condiciones de bajo hierro, el parásito estimula su actividad citotóxica mediada por algunas CP (CP30 o CP65) (Álvarez-Sánchez *et al.*, 2007; Kummer *et al.*, 2008) lo que va a permitir una mayor motilidad y con ello una penetración mejor a capas más profundas del epitelio, logrando de esta forma colonizar y sobrevivir en el ambiente vaginal.

Debido a que no existe hierro libre en el tracto genitourinario, *T. vaginalis* lo adquiere mayoritariamente a través de la lactoferrina presente en las secreciones cervicales, a través de receptores específicos, que se incrementan en número y afinidad mediante procesos de retroalimentación negativos. La concentración de lactoferrina es elevada en la mucosa vaginal tras la fase post-menstrual (Lehker y Alderete, 1992). Como fuentes alternativas de hierro, el parásito es capaz de tomar Fe a partir del grupo hemo y la hemoglobina por medio de la hemólisis y la fagocitosis de los glóbulos rojos. Durante el periodo menstrual los eritrocitos están presentes en el medio vaginal, periodo que coincide con una disminución de los niveles de lactoferrina (Lehker *et al.*, 1990; Ardan *et al.*, 2009). *T. vaginalis* también es capaz de internalizar ferritina aunque no es capaz de emplear la transferrina (Arroyo *et al.*, 2015).

d) Presencia de zinc: este elemento está presente en el fluido prostático del hombre, favoreciendo un ambiente oxidativo que dificulta el crecimiento del parásito. Los niveles normales de Zn^{2+} en el fluido prostático de un individuo sano son de $590 \pm 45 \mu\text{g/mL}$ (Zaichick *et al.*, 1996). El carácter citotóxico del Zn^{2+} explica por qué esta I.T.S. cursa de

forma asintomática en la mayoría de los varones (Krieger y Rein, 1982). Por el contrario, si las secreciones prostáticas de zinc disminuyen ($< 1,6 \text{ mM}$) existe un riesgo mayor a desarrollar prostatitis crónica en caso de tricomonosis (Krieger y Rein, 1982). Estudios moleculares y proteómicos confirman la regulación negativa de algunas CP (CP70, CP65, CP39, CP25 y CP20) por este elemento. Entre las CP caracterizadas, se encuentran dos proteasas que se han correlacionado de forma directa con el efecto citotóxico de *T. vaginalis* en células (Hernandez-Gutierrez *et al.*, 2003; Solano-Gonzalez *et al.*, 2006), Según los estudios de Vázquez-Carrillo *et al.* (2001) la presencia de Zn^{2+} disminuyó hasta un 80% los niveles de transcripción de CP65, causando una disminución del efecto citotóxico en un 30%. En la actualidad este grupo están llevando a cabo los mismos estudios en la CP39.

De igual forma, este elemento también regula positivamente la expresión de dos fimbrinas, esenciales junto con la actina en la modificación estructural que sufre el parásito durante el contacto con las células del tracto genitourinario, adquiriendo una forma ameboidea (Figuroa-Angulo *et al.*, 2009).

e) Niveles de poliaminas: las poliaminas son moléculas presentes en todos los organismos y que, gracias a su naturaleza catiónica, interaccionan con los ácidos nucleicos. Se encuentran implicadas en procesos de proliferación celular como división celular, diferenciación, estabilización del ARN y ADN, crecimiento celular y apoptosis. García *et al.* (2005) observaron que la inhibición de la síntesis de putrescina en *T. vaginalis* provocaba una inhibición reversible del crecimiento normal del trofozoíto. No obstante, *T. vaginalis* no tiene la capacidad de sintetizar *ex novo* algunas de estas moléculas, como la espermina, debiéndola adquirir del hospedador. El metabolismo parasitario de estos compuestos comienza con la síntesis de putrescina a partir de ornitina. Los niveles de poliaminas en la mujer también sufren fluctuaciones en función del momento del ciclo en el que se encuentre. Sin embargo, las secreciones vaginales de mujeres infectadas presentan un nivel elevado de putrescina ($> 2 \text{ mM}$) sintetizada y secretada por el propio parásito (Figuroa-Angulo *et al.*, 2009) y responsable del olor característico de la leucorrea en esta infección. En los últimos años, se ha estudiado el papel que juegan las poliaminas como reguladores de determinados factores asociados al parásito. El metabolismo de estas moléculas, y concretamente el de la putrescina, está implicado en procesos de citoadherencia y citotoxicidad. Los estudios realizados por García *et al.* (2005) revelaron que la inhibición del metabolismo de las poliaminas ocasionaba un aumento en la capacidad de adhesión a células del epitelio vaginal inmortalizadas de entre 4 a 20 veces. En este mismo estudio observaron que en esas mismas condiciones, *T. vaginalis* inhibía la citotoxicidad mediada por contacto. Posteriormente, Álvarez-Sánchez *et al.* (2008) estudiaron la influencia de la putrescina en la expresión de CP65. Este equipo, siguiendo el método de García *et al.* (2005), inhibió la síntesis de putrescina y confirmó una disminución de los niveles de transcripción de la proteasa y por ende, de en la cantidad de proteína sintetizada implicada en la acción citotóxica del parásito. Figuroa-Angulo *et al.* (2012) también han confirmado el papel regulatorio de las poliaminas en la expresión a nivel post-transcripcional de CP39. Esta proteasa, al igual que CP65, también está implicada en la citotoxicidad parasitaria.

9. B. FACTORES ASOCIADOS AL PARÁSITO

Los factores asociados al parásito se agrupan en dos tipos:

9. B. 1) Mecanismos dependientes de contacto: la pared vaginal está formada por un epitelio escamoso estratificado externo sustentado por un tejido conjuntivo. El soporte y mantenimiento de las CEV se basa en la red de macromoléculas que conforman la matriz extracelular. El parásito requiere la interacción con la superficie de la célula del hospedador, en la que tanto proteínas como azúcares van a ser esenciales para la interacción entre ambas células.

La **figura 17** muestra de forma esquemática el control de los microambientes generados en los huecos que se establecen entre las dos membranas. La representación esquemática es una modificación de la publicada por Fiori *et al.* (1999) a partir de una fotografía de los estudios de citoadherencia entre una célula HeLa y un trofozoíto de *T. vaginalis*.

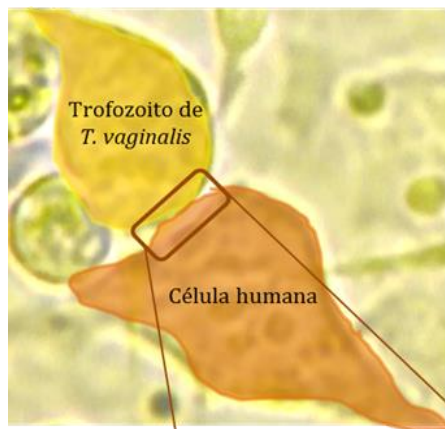
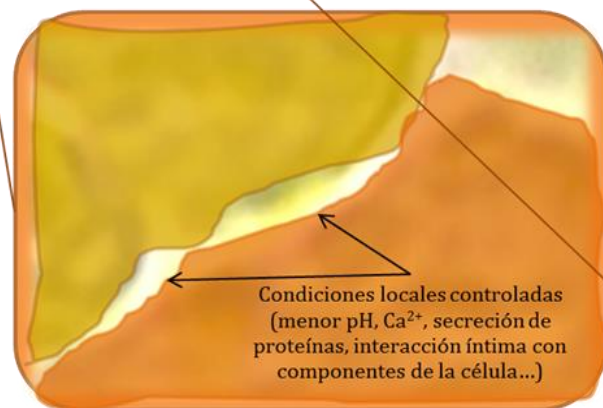


Figura 17:

Esquema representativo de la interacción entre *T. vaginalis* y la célula diana del hospedador con la generación de pequeños huecos entre ambas membranas que permiten al parásito controlar distintos factores como el pH o la concentración de iones. Esquema modificado a partir del publicado por Fiori *et al.* (1999).



Entre los factores contacto-dependientes asociados a *T. vaginalis* destacan:

a) La adhesión: el fenómeno de adhesión es uno de los procesos iniciales requeridos para el establecimiento de la infección a través de la interacción parásito-hospedador. La adhesión es un proceso multifactorial dependiente de pH, temperatura, hierro y tiempo de contacto, en el que intervienen numerosas proteínas. El parásito sufre un cambio morfológico rápido tras el contacto con la célula del epitelio vaginal, pasando de una forma elipsoidal a una ameboide, incrementando el área de adhesión. Esta transformación

induce la síntesis de diversos factores entre las que destacan las adhesinas (AP) (Arroyo *et al.*, 1993). El contacto se establece entre estas proteínas parasitarias (AP120, AP65, AP51, AP33 y AP23) y un receptor de la célula hospedadora (García *et al.*, 2003).

Estas AP destacan por su diversidad funcional y el mimetismo molecular que presentan, co-localizándose en el hidrogenosoma donde desarrollan diversos papeles enzimáticos (**Tabla 8**) o pudiéndose expresar en la superficie del parásito donde intervienen en el proceso de interacción con el hospedador. La presencia o no de determinados estímulos condiciona su localización en el parásito y con ello la función que finalmente desarrollarán estas proteínas (Alderete *et al.*, 1995a; Engbring *et al.*, 1996; Alderete *et al.*, 2001; García *et al.*, 2003; Moreno-Brito *et al.*, 2005; Figueroa-Angulo *et al.*, 2009).

Tabla 8: Actividad enzimática descrita de cuatro de las cinco adhesinas descritas hasta el momento en *T. vaginalis*.

Proteína	Función enzimática	Referencia bibliográfica
AP120	PFOR	Moreno-Brito <i>et al.</i> , 2005
AP65	Enzima málica	O'Brien <i>et al.</i> , 1996
AP51	Subunidad β de la SCS	Alderete <i>et al.</i> , 1998
AP33	Subunidad α de la SCS	Enbring y Alderete, 1998

SCS: Succinil coenzima A sintetasa; PFOR: Piruvato:ferredoxina oxidoreductasa

Algunos investigadores asocian la multifuncionalidad de estas AP, denominadas *moonlighting proteins*, al hecho de que estén codificadas por familias multigénicas (O'Brien *et al.*, 1996; Alderete *et al.*, 1998; Engbring y Alderete, 1998). Según estos autores, a causa de un fenómeno de duplicación génica durante el proceso de divergencia evolutiva, una de las copias podría haber adquirido funciones nuevas (Figueroa-Angulo *et al.*, 2012). Sin embargo esta teoría requiere estudios más detallados, ya que se contradice con los resultados descritos por García *et al.* (2003), quienes confirmaron que todas las adhesinas codificadas por los distintos genes podían localizarse en la superficie del protozoo. La multifuncionalidad de estas adhesinas ha suscitado el interés de distintos grupos de investigación.

Según los resultados publicados, la secuencia de sucesos sería la siguiente:

- 1.- En primer lugar, determinados estímulos, como el contacto celular o el hierro van a favorecer la expresión y secreción de estas AP al medio extracelular.
- 2.-A continuación, dichas proteínas pueden asociarse de forma no específica a distintas células epiteliales del hospedador así como a eritrocitos (Addis *et al.*, 1997).
- 3.- Algunas adhesinas como la AP65, una vez secretada, se re-asocia por un lado a la superficie de *T. vaginalis* y al mismo tiempo a la célula hospedadora a través de receptores específicos en ambas membranas, actuando de puente entre ambas células

gracias a una conformación dimérica por medio del dominio N-terminal de las dos moléculas de AP65 (García y Alderete, 2007) (**Figura 18**).

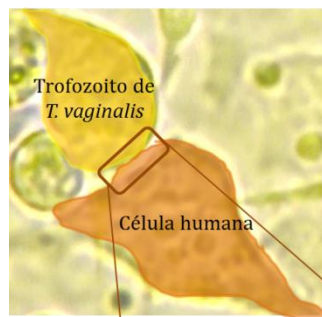
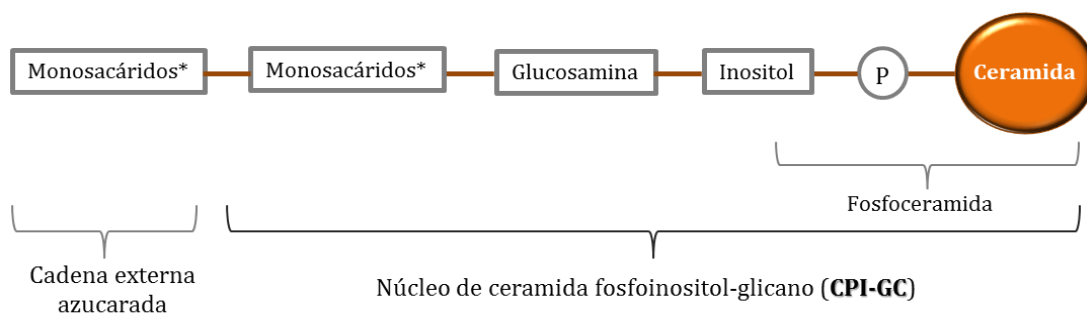


Figura 18: Representación gráfica del mecanismo de interacción entre *T. vaginalis* y la célula del hospedador a través de AP propuesto por García y Alderete, 2007.



Es importante resaltar el carácter complejo del proceso de adhesión. En él intervienen otras biomoléculas, como el lipofosfoglicano (LPG), el polisacárido de superficie más abundante de *T. vaginalis*, con más de 2,3 millones de copias por célula (Fichorova *et al.*, 2006). El parásito se encuentra cubierto de un glicocálix denso cuyo LPG se ancla a la membrana plasmática a través de uniones inositolfosfoceramida y no a través de puentes glucosilfosfatidilinositol (GPI) como cabría esperar de un eucariota. Este LPG revela una composición glicolípídica altamente específica y rica en galactosa, glucosamina y ramnosa, más parecida a la de los procariotas (Bastida-Corcuera *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2009); y sin manosa, monosacárido abundante en el LPG de eucariotas (Singh *et al.*, 2009) (**Figura 19**).



Monosacáridos*: Ramnosa, galactosa, xilosa, glucosamina, galactosamina, N-acetilactosamina

Figura 19: Esquema de la estructura del LPG de *T. vaginalis* propuesto por Singh *et al.* (2009).

Entre las funciones del LPG, destaca el papel clave en la interacción con las células del hospedador a través de lectinas (Lehker y Sweeney, 1999; Singh *et al.*, 2009), como las galectinas, localizadas en la superficie de células epiteliales vaginales, ectocervicales y endocervicales (Okumura *et al.*, 2008). Asimismo, se ha confirmado que el LPG de *T. vaginalis* también interviene en el desarrollo de la respuesta inmunitaria mediada por células epiteliales a través de la inducción de algunas citoquinas (IL-6) y quimiocinas como MIP-3 α y especialmente IL-8 (Fichorova *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2009).

Del mismo modo, el parásito es capaz de reconocer y unirse de forma específica a otros componentes de la matriz extracelular y de la membrana basal del hospedador como la mucina, la fibronectina (Fn), la laminina o el colágeno de la mucosa vaginal (Crouch y Alderete, 1999; Lehker y Sweeney, 1999). La asociación a la mucina se encuentra mediada por lectinas (Lehker y Sweeney, 1999), mientras que la unión a las otras dos glicoproteínas requiere la interacción con proteínas receptoras y carbohidratos presentes en la superficie del parásito (Crouch y Alderete, 1999). Estos procesos también están regulados por la concentración de Fe, incrementándose la unión a Fn y mucina en condiciones de niveles bajos de Fe (Lehker y Sweeney, 1999; Crouch *et al.*, 2001). El calcio también parece estar implicado en la inducción de la expresión de receptores para Fn (Crouch *et al.*, 2001). Además de todas estas proteínas, hay que tener en cuenta algunas enzimas que son secretadas por *T. vaginalis* y que intervienen en el proceso de adhesión. Recientemente, se ha descrito la importancia de la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) que al igual que las AP puede adquirir una función no enzimática y localizarse en la superficie del parásito, actuando como receptor de Fn, plasminógeno y colágeno (Lama *et al.*, 2009).

Existe otra familia multigénica que codifica para numerosas proteínas de tipo BspA, conocidas por el papel como mediadoras de la unión entre células del hospedador y bacterias. Se piensa que *T. vaginalis* podría haber adquirido estos genes a partir de procariotas mediante una transferencia genética lateral. Noël *et al.* (2010) estudiaron el papel de estas proteínas como mediadoras en la interacción con el mucus, la matriz extracelular y células del hospedador. También parecen jugar un papel importante en la endocitosis de virus y en la evasión a la respuesta inmunitaria del hospedador.

b) Fagocitosis: este proceso se encuentra estrechamente relacionado con la obtención de nutrientes y con la evasión del sistema inmune. Estudios de microscopía han mostrado la secuencia de acontecimientos en el proceso de fagocitosis de *T. vaginalis*: (1) Adhesión parásito-célula diana (Rosset *et al.*, 2002; Pereira-Neves y Benchimol, 2007; Midlej y Benchimol, 2010). Algunos autores sugieren la posible implicación de los receptores de manosa presentes en la superficie del parásito como responsables de este primer evento (Midlej y Benchimol, 2010). (2) Fagocitosis de la célula diana gracias a una reorganización citoplasmática de la actina que permite al parásito fagocitar a través de cualquier parte de su cuerpo celular (Pereira-Neves y Benchimol, 2007). Este proceso puede producirse mediante dos mecanismos distintos: a través de la generación de pseudópodos que rodean e internalizan a la célula diana o bien mediante procesos de succión causando la elongación de la membrana plasmática de la célula diana y su posterior internalización a través de un canal endocítico estrecho (Rendon-Maldonado *et al.*, 1998; Pereira-Neves y Benchimol, 2007; Midlej y Benchimol, 2010). (3) Digestión de la célula fagocitada en el interior de vacuolas a través de enzimas lisosomales (Rendon-Maldonado *et al.*, 1998; Midlej y Benchimol, 2010).

Mediante microscopía electrónica se ha podido confirmar la capacidad de *T. vaginalis* para fagocitar CEV, lactobacilos, leucocitos, eritrocitos y levaduras. La ingestión de levaduras y bacterias ocasiona un aumento del pH vaginal generando un microambiente favorable para el crecimiento y multiplicación de este parásito y, al mismo tiempo, una disminución de la flora endógena, que actúa como mecanismo de protección de la mujer frente a la colonización de patógenos. Este mecanismo de evasión del sistema inmune también se ve favorecido por la fagocitosis de los leucocitos (Rendon-Maldonado *et al.*, 1998). La actividad β -hemolítica de *T. vaginalis*, publicada por Krieger *et al.* (1981), está descrita como un proceso de virulencia del parásito. Al mismo tiempo, los eritrocitos son fuente de ácidos grasos y hierro para el parásito (Petrin *et al.*, 1998), permitiendo la regulación de numerosos genes (Lehker y Alderete, 1992) y factores ligados a la patogenia. Estudios posteriores también han identificado la presencia de fosfolipasas A1 y A2 con actividad lítica, que contribuyen al desarrollo del proceso inflamatorio (Lubick y Burgess, 2004) y a la actividad hemolítica (Vargas-Villarreal *et al.*, 2005).

Por otro lado y desde un punto de vista evolutivo, la fagocitosis de bacterias de la microbiota podría explicar la adquisición de genes bacterianos a través de una transferencia lateral (*Lateral Gene Transfer* o LGT). Esto justificaría la presencia de enzimas en este parásito con funciones esenciales en la colonización de la mucosa que presentan origen bacteriano (Hirt, 2013); como las familia de las BspA (Nöel *et al.*, 2010), entre otras.

9. B. 2) Mecanismos independientes del contacto: el parásito puede secretar sustancias tóxicas que van a intervenir en numerosos procesos vitales.

a) Cisteín-proteasas (CP): Son factores líticos esenciales en los procesos de adherencia y colonización del tracto genitourinario, aunque también intervienen en otros procesos relacionados con la evasión inmunitaria o la adquisición de nutrientes. Se han descrito hasta la fecha 23 CP con tamaños entre 23 Y 110 KDa, cuya expresión y funcionalidad varía según las características de los aislados (Neale y Alderete, 1990) y la presencia de algunos factores en el medio (**Tabla 9**).

Tabla 9: Función y regulación de las CP descritas.

CP	Función	Regulación por Fe	Regulación por otros factores
CP (30 KDa)	Desorganización del citoesqueleto	ND	
TvCP4	Hemólisis	+	
TvCP12	Citotoxicidad	-	
TvCP30	Citoadherencia y degradación de proteínas.	-	
TvCP39	Citotoxicidad. Degradación de proteínas de la matriz extracelular, Hb e Ig	-	Zn (-) y poliaminas (+)
TvCP62	Citoadherencia	+	

TvCP65	Citotoxicidad. Degrada colágeno y Fn	-	Zn (-) y poliaminas (+)
CP2, CP3, CP4 y CPT	Inducción de la apoptosis de células del hospedador	-	
TvLEGU-1	Citoadherencia	+	
TvLEGU-2	Transportador de precursores de proteínas en retículo endoplásmico	No lo regula	

Las funciones en las que participan estas CP son:

a.1) La degradación de componentes de la mucosa y células del tracto genitourinario, que permiten la penetración del parásito a capas más profundas. Está ampliamente aceptada la relación entre la secreción de estas proteasas parasitarias y los mecanismos de adherencia y colonización del tracto genitourinario. Los estudios de Lecker y Sweeney (1999) revelaron la importancia de la función mucinasa de las CP en las primeras fases de colonización de la mucosa vaginal. Otros estudios también mostraron su implicación en la degradación de componentes estructurales de la superficie de mucosas como la Fn o el colágeno (Alderete, 1999; Alvarez-Sanchez *et al.*, 2000; Mendoza-Lopez *et al.*, 2000; Hernández-Gutiérrez *et al.*, 2004) Hernández-Gutiérrez *et al.* (2004) estudiaron el papel de la CP39. Esta CP presenta funciones diversas entre las que destaca su capacidad para degradar distintos tipos de colágeno, pudiendo ser una de las moléculas implicadas en los nacimientos prematuros en mujeres embarazadas infectadas o intervenir en el estrechamiento observado previo al parto de la pared cervical.

a.2) La citotoxicidad celular: la CP65 o la CP30 se encuentran estrechamente relacionadas con estos procesos de citotoxicidad celular (Alvarez-Sanchez *et al.*, 2000).

a.3) La inducción de la apoptosis en CEV por la acción conjunta de varias proteasas (CP2, CP3, CP4 y CPTotal) (Sommer *et al.*, 2005).

a.4) La mediación en la citoadherencia a las células del hospedador: Arroyo y Alderete (1989) demostraron que las CP juegan un papel esencial en la adhesión a las células del hospedador y no únicamente en fenómenos de citotoxicidad. Estas CP podrían mediar en la activación de precursores inactivos de AP presentes en la superficie, que pasarían a conformaciones activas tras la digestión específica, o bien podrían intervenir en la modificación de los receptores de las células diana. En un primer momento, estas AP van a encontrarse enmascaradas en la superficie parasitaria por proteínas específicas. Las CP eliminan de forma específica proteínas inmunogénicas de enmascaramiento, permitiendo a las AP realizar su función en el reconocimiento y unión al hospedador (Arroyo y Alderete, 1989). Las CPs que cumplen esta función serían CP30 y CP62 (Mendoza-Lopez *et al.*, 2000).

a.5.) La evasión de la respuesta inmunitaria a través de la degradación de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas IgA, IgM e IgG humanas identificadas en los lavados vaginales de mujeres infectadas (Provenzano y Alderete, 1995), así como por medio de la lisis del factor C3b (Alderete *et al.*, 1995b) o del inhibidor de proteasas secretado por los leucocitos (Drapeer *et al.*, 1998).

a.6) Otras funciones son los procesos relacionados con la adquisición de nutrientes, como la degradación de la hemoglobina para la adquisición de hierro (Dailey *et al.*, 1990; Mendoza-Lopez *et al.*, 2000). Algunas CP como la CP39 se unen a receptores específicos de eritrocitos y células humanas vaginales y prostáticas corroborando el papel de estas CP en la obtención de nutrientes en ambos microambientes (Hernández-Gutiérrez *et al.*, 2004).

b) Factor de desprendimiento celular (*cell-detaching factor*, CDF): es una glicoproteína de unos 200 kDa secretada por el parásito, que se inactiva a un pH inferior a 5 o por efecto de la temperatura (Garber *et al.*, 1989). La producción de este factor se ve regulada por la presencia de estrógenos (Garber *et al.*, 1991), pudiendo estar implicada en la exacerbación de los síntomas durante la menstruación por la disminución de los niveles de estas hormonas. Esta proteína inmunogénica soluble tiene como función producir un desprendimiento del epitelio genitourinario (Garber *et al.*, 1989; Escario *et al.*, 2010), favoreciendo la penetración del parásito a capas más profundas. Se ha descrito una correlación entre el desarrollo de síntomas graves y la mayor actividad de la CDF en comparación con aislados procedentes de pacientes asintomáticas o con una presentación clínica leve (Garber *et al.*, 1991).

c) Presencia de virus de doble cadena: se han descrito tres tipos de virus de ARN de doble cadena (ARNdc) denominados de forma genérica como virus de *T. vaginalis* (TVV) (Tai y Ip, 1995), clasificados dentro de la familia Totiviridae, a la que pertenecen virus ARNdc no fragmentados capaces de infectar protozoos parásitos y hongos (Liu *et al.*, 1998; Bessarab *et al.*, 2000). Las distintas poblaciones víricas pueden presentar tamaños (33 a 200 nm) y formas variables (icosaédrico, filamentoso, cilíndrico o esférico), identificándose en la membrana plasmática, asociados al complejo de Golgi, en el interior de vacuolas y citoplasma y, en menor proporción, en el núcleo de *T. vaginalis* (Benchimol *et al.*, 2002a,b). Este parásito puede estar infectado por más de una especie de TVV, sin embargo las implicaciones que puedan derivarse de esta coinfección no se han dilucidado (Khoshnan y Alderete, 1993; Tai *et al.*, 1993; Tai y Ip, 1995; Bessarab *et al.*, 2000). Los virus TVV penetran por endocitosis (Benchimol *et al.*, 2002b). Son capaces de regular la transcripción de genes de *T. vaginalis* y variar la expresión de determinados antígenos de superficie, como la proteína P270, así como otras proteínas entre las que destacan algunas CP. Influyen en la patogenia del parásito (Wang *et al.*, 1987; Khoshnan y Alderete, 1994; Provenzano y Alderete, 1995; Provenzano *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 1998; Bessarab *et al.*, 2000; Bessarab *et al.*, 2011). En virtud de la expresión en la superficie de la proteína inmunogénica P270, se han clasificado los aislados de *T. vaginalis* en dos grupos: *T. vaginalis* tipo I y tipo II. Los aislados tipo I sintetizan P270 de forma basal, no pudiéndose localizar en la superficie del parásito. Estos aislados no se encuentran infectados por TVV, siendo por tanto, V- (virus negativo). Mientras que los aislados de *T. vaginalis* Tipo II son poblaciones heterogéneas en las que algunos trofozoítos expresan en su superficie P270, siendo V+ (infectados por TVV) (Khoshnan y Alderete, 1994; Fraga *et al.*, 2005). A pesar de lo que se podría esperar, estos virus no se detectan en los sobrenadantes de cultivos infectados. De igual forma, los intentos de infectar aislados TVV- con partículas virales no han tenido éxito (Khoshnan y Alderete, 1994). En un intento por investigar el papel de los TVV en la virulencia del parásito, algunos grupos han tratado de correlacionar aislados Tipo II con el desarrollo de una clínica concreta (Fraga *et al.*, 2007), o el desarrollo de resistencia a los 5-NI (Wang *et al.*, 1987). Sin embargo se requieren más estudios que confirmen los resultados aportados.

En función de estos hallazgos, algunos autores han descrito el papel potencial de este parásito como transmisor de virus humanos. Pindak *et al.* (1989) y Sayed-el Ali *et al.* (1999) corroboraron la capacidad de *T. vaginalis* para fagocitar células infectadas por reovirus y por herpes simplex tipo II, confirmando la presencia de partículas víricas en el interior de las vacuolas y en el citoplasma del parásito. Los virus pudieron ser recuperados tras varios días en el interior del protozoo. El herpes simplex tipo II se mantuvo viable en el interior de los tricomonádidos hasta seis días. Ante este posible papel como transmisor de virus, se investigó *in vitro* si partículas víricas o bien linfocitos infectados por distintos subtipos de VIH-1 podrían ser incorporados y transmitidos por *T. vaginalis* (Rendon-Maldonado *et al.*, 2003). Los resultados de este equipo confirmaron que el parásito incorpora partículas víricas capaces de mantenerse en el citoplasma durante 48 horas, pero no se han detectado evidencias de replicación o liberación del virus como puede ocurrir con TVV. En cuanto a las células infectadas por VIH, el protozoo tiene la capacidad de fagocitar linfocitos. No obstante, la digestión por acción del fagolisosoma de dicha célula y del virus parece llevarse a cabo antes de que el propio virus pueda evadir la acción lítica de las enzimas, a diferencia del virus del herpes que sí es capaz de escapar de la degradación digestiva. Ningún estudio ha demostrado que estos virus humanos tengan capacidad replicativa en el interior del trofozoíto, aunque la supervivencia de los mismos durante un cierto periodo en el interior del trofozoíto sí que podría conllevar graves consecuencias en aquellos casos en los que exista co-infección por ambos patógenos, convirtiéndose el parásito en un transportador pasivo.

d) Presencia de *Mycoplasma hominis*: *T. vaginalis* es un parásito que puede encontrarse asociado con *Mycoplasma hominis*. Esta bacteria, al igual que el protozoo, reside únicamente en el tracto genitourinario humano, y se caracteriza por una dependencia metabólica alta del hospedador que parasita a causa de su pequeño tamaño génico (0,7-0,83 Mb) (Xiao *et al.*, 2006). Esta curiosa asociación es estrictamente especie-específica, no habiéndose descrito otras simbiosis similares con otras bacterias. Los estudios de Rappelli *et al.* (2001) detectaron una coinfección en el 90% de los aislados estudiados. Los resultados revelaron que *M. hominis* presente en los aislados de *T. vaginalis* eran capaces de transmitirse a células de cérvix humano, así como a otros aislados no infectados (Rappelli *et al.*, 2001). Otros trabajos han confirmado la capacidad de esta bacteria para sintetizar ADN y replicarse en el interior del parásito. Esta simbiosis permitiría a la bacteria protegerse de la respuesta inmune del hospedador y de la presión antibiótica. Sin embargo, los beneficios, así como los cambios fisiológicos y nutricionales, que podrían derivarse de esta asociación parásito-bacteria, aún no están del todo claros (Dessi *et al.*, 2006). Algunos investigadores han sugerido un posible efecto beneficioso en cuanto a la patogenia y la resistencia a fármacos (Xiao *et al.*, 2006, 2008). En este sentido, los estudios genómicos han llegado a correlacionar dichos patrones con la resistencia al MTZ. Sin embargo, si se analizan los resultados de este grupo, tan sólo el 50% de las muestras *Mycoplasma+* mostraron resistencia reducida (concentración mínima letal por encima de 13 µg/mL) o moderada (CML > 50 µg/mL) (Xiao *et al.*, 2006). Morada *et al.* (2010) sugieren que las poblaciones de trofozoítos coinfectados consumen una mayor cantidad de arginina que los cultivos de *T. vaginalis* axénicos. La depleción de arginina en la vagina podría contribuir a una producción menor de óxido nítrico y por tanto una disminución de la eficacia de la *explosión respiratoria* de los macrófagos y con ello una alteración en la respuesta inmune del hospedador. Sin embargo, la variabilidad entre

aislados de *T. vaginalis*, los cuales no resultan ser en todos los casos igual de susceptibles a una infección bacteriana, así como una heterogeneidad en el propio aislado al no encontrarse todos los trofozoítos infectados (Rappelli *et al.*, 2001) y la posible co-infección por más de una cepa bacteriana, dificulta en gran medida la interpretación de resultados debido a la variabilidad que se obtiene en los patrones de ADN (Xiao *et al.*, 2006, 2008) asemejándose a lo observado en las infecciones por TVV (Snipes *et al.*, 2000; Fraga *et al.*, 2005).

9. C. RESPUESTA INMUNITARIA

Aunque se ha ido comentando a lo largo de este punto, es importante mencionar la evasión del parásito a la **respuesta inmunitaria** desarrollada por el hospedador:

T. vaginalis ha desarrollado numerosos mecanismos implicados en la supervivencia y colonización del tracto genitourinario, y en la evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador. El tracto genital femenino está protegido por una microflora bacteriana, responsable de su pH ácido, que junto con otros mecanismos del sistema inmunitario, protegen de la invasión de patógenos. Los mecanismos más relevantes son: a) las enzimas, b) la secreción del inhibidor de la proteasa de leucocitos producido por CEV, c) las IgG e IgA secretora (Mestecky y Fultz, 1999) o d) las proteínas surfactantes (MacNeill *et al.*, 2004).

A continuación se recogen los factores que se han citado a lo largo de esta revisión y que intervienen en la supervivencia de *T. vaginalis* a la respuesta inmunitaria del hospedador:

- ⇒ La fagocitosis de lactobacilos de la microflora vaginal, levaduras o incluso células del sistema inmunitario (Rendon-Maldonado *et al.*, 1998).
- ⇒ La inducción de la apoptosis de neutrófilos por medio de la activación de la vía de las caspasas (Kang *et al.*, 2006).
- ⇒ La capacidad de enmascaramiento del parásito con componentes localizados en la matriz extracelular vaginal como la fibronectina (Crouch *et al.*, 2001) o de proteínas séricas del hospedador (Peterson y Alderete, 1982); que le permiten la evasión del sistema inmunitario y de la acción degradativa de determinadas sustancias proteolíticas del fluido vaginal o plasmático (Peterson y Alderete, 1983).
- ⇒ Las degradación de Ig por parte de CP de *T. vaginalis* (Mestecky y Fultz, 1999).
- ⇒ La evasión al sistema del complemento a través de la lisis de la C3b (Alderete *et al.*, 1995). En relación con la protección frente a la acción del complejo de ataque a la membrana (CAM), es importante mencionar que este parásito secreta al medio externo enzimas capaces de lisar ácido siálico como la neuraminidasa (Padilla-Vaca y Anaya-Velázquez, 1997) o Neu5Ac liasa (Meysick *et al.*, 1996). El ácido siálico protege a las células autólogas de la acción lítica del complemento, impidiendo la unión de C3b en la superficie de las mismas. Algunos investigadores sugieren que el ácido siálico podría ser una fuente de nutrientes para el parásito, lo que explica la secreción de estas enzimas y la presencia en la superficie parasitaria de sitios de unión al ácido siálico

(Bonilha *et al.*, 1995; Meysick *et al.*, 1996). Sin embargo, no se ha estudiado el posible papel de estas enzimas en la captación de ácido siálico del hospedador con el fin de emplearlo como factor de evasión del complemento.

10. CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA

El genoma de *T. vaginalis* es uno de los de mayor tamaño secuenciado en un organismo vivo, incluido el hombre. Está constituido por aproximadamente 160 Mb organizados en 6 cromosomas y en torno a 46.000 genes codificantes (Carlton *et al.*, 2007; Smith y Johnson, 2011). Más del 65% del genoma está compuesto por familias génicas repetidas entre las que se encuentran un elevado porcentaje de elementos transponibles y secuencias codificantes para proteínas homólogas presentes en bacterias (*Treponema pallidum* y *Chlamydia poxvirus*), virus (VIH) y otros protozoos parásitos como *Entamoeba histolytica*, *Leishmania major* o *Giardia duodenalis* (Carlton *et al.*, 2007). Algunos estudios mencionan la posible incorporación de ciertos genes bacterianos por *T. vaginalis* mediante un proceso de transferencia genética lateral (de Koning *et al.*, 2000; Strese *et al.*, 2014). Strese *et al.* (2014) definen este fenómeno como la adquisición e incorporación de material genético de un organismo donador, sin que exista un proceso de transferencia sexual o vertical, en al menos un 0,25% de los genes de este protozoo. La transmisión potencial se habría producido mediante un proceso de fagocitosis, seguido de una fisión binaria, que habría incorporado en su genoma y en el de sus células hijas dichos genes, sin la necesidad de estar presentes en un gameto para poder ser transmitido a la progenie, como ocurriría en un organismo de reproducción sexual. Esto explicaría cómo *T. vaginalis* puede tener tantos genes homólogos al de otros organismos eucariotas y procariotas (Carlton *et al.*, 2007). Este fenómeno ya se ha descrito en otros protozoos parásitos como *Giardia* o *Entamoeba* (Nixon *et al.*, 2003). Sin embargo, la ausencia de genes procariotas en *Tritrichomonas tenax* y *Tritrichomonas gallinae* parece indicar que este fenómeno de transferencia debió suceder tras la divergencia de ambos géneros (Strese *et al.*, 2014). La presencia de, al menos, un 5% de familias génicas inestables o pseudogenes, que han sufrido eventos de duplicación reciente, también podría haber contribuido al aumento del genoma de este parásito (Woehle *et al.*, 2014). En lo que respecta al genoma de *T. vaginalis*, algunos autores atribuyen su tamaño a uno o varios procesos de expansión y duplicación de las familias génicas completas durante la evolución de los parabasálidos, especialmente durante la transición de *T. vaginalis* de una localización intestinal al tracto genitourinario (Zubacova *et al.*, 2008). Existen numerosas incógnitas en cuanto al por qué de un genoma tan grande y repetido así como a la posible relación que pueda existir con su patogenicidad. Algunos autores han postulado que la duplicación de genes y, por consiguiente, la aparición de genes redundantes, podrían estar asociados a la supervivencia del parásito ante los cambios drásticos de su ecosistema natural. Este hecho explicaría como cientos de genes pueden aumentar o disminuir su expresión hasta 100 veces ante un estímulo como la presencia de oxígeno (Gould *et al.*, 2013). Esta adaptación justifica la existencia de procesos de co-regulación entre familias génicas. Sin embargo todavía sólo se ha podido especular de forma teórica con hipótesis que intentan explicar este fenómeno.

Los estudios genómicos en *T. vaginalis* se han dirigido al conocimiento de regiones génicas, el diagnóstico y la caracterización de los aislados en función de propiedades fenotípicas como la resistencia a 5-NI, la presencia o no de TVV, el origen geográfico, la

correlación con la patogenia clínica, etc., mediante técnicas diversas. Se describen a continuación los estudios más relevantes:

10. A. RAPD (RANDOM AMPLIFIED POLYMORPHIC DNA)

Este método de análisis de ADN mediante la amplificación aleatoria de fragmentos polimórficos se emplea en estudios filogenéticos y de caracterización de aislados. Se utilizan varios cebadores diseñados al azar que permiten la comparación de polimorfismos en numerosos *loci*. A pesar de tratarse de una de las técnicas más empleadas para este tipo de estudios, su principal inconveniente es la baja reproducibilidad. Snipes *et al.* (2000) publicaron un estudio de epidemiología molecular basado en la caracterización de 109 aislados clínicos mediante tres métodos distintos: análisis comparativo de las secuencias mediante RAPD, estudio de mutaciones por medio de la secuenciación de la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2 y la determinación de RNA de doble cadena. Los resultados mostraron una correlación significativa entre los patrones de RAPD y la presencia de TVV en los aislados de *T. vaginalis*. Los análisis de comparación de secuencias diferenciaron los aislados de tipo I de los de tipo II de forma estadísticamente significativa. Asimismo, Vanacova *et al.* (1997) también lograron diferenciar los aislados en función de su susceptibilidad a MTZ y la clínica de las pacientes. Estos resultados coinciden con los de Rojas *et al.* (2004a). No obstante, y en contraposición a los estudios de Snipes *et al.* (2000), los resultados de Vanacova no mostraron ninguna concordancia con la presencia de TVV. En 2001, Hampl *et al.* realizaron un estudio de RAPD empleando 27 cebadores con el fin de buscar correlaciones entre los patrones genómicos de los aislados y la presencia de TVV, presencia de *Mycoplasma*, el origen geográfico o el desarrollo de resistencias. Sin embargo, los dendrogramas no mostraron asociaciones entre los resultados genómicos y los fenotípicos. En este sentido, Kaul *et al.* (2004) analizaron 15 aislados frescos de mujeres asintomáticas y otros 15 de pacientes con síntomas procedentes de India. Los resultados agruparon todas las muestras asintomáticas. No obstante, los valores de *bootstrap* en los aislados estudiados fue muy bajo entre los agrupamientos y la sensibilidad a MTZ.

10. B. RFLP (RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM)

Los resultados obtenidos en la aplicación de esta técnica a la amplificación de la secuencia que codifica para la proteína de choque térmico (HSP70) y la resistencia a MTZ no mostraron ninguna correlación entre los fragmentos de 36 aislados (Stiles *et al.*, 2000). En cambio, Meade *et al.* (2009) obtuvieron dos agrupaciones claramente diferenciadas tras el análisis de 129 aislados de *T. vaginalis* empleando la misma diana EcoRI-HSP70. En ambos estudios se corrobora la heterogeneidad genómica que muestra este parásito, en función del número elevado de patrones de RFLP obtenidos por ambos grupos.

10. C. GENES RIBOSOMALES

El análisis de los **genes ribosomales**, en particular, el que codifica para la subunidad pequeña (ARNr 18S) continúa siendo una de las herramientas principales para el análisis filogenético de especies debido a su naturaleza conservada y evolución lenta (Cepicka *et al.*, 2006). En el campo de la tricomonosis, la secuenciación del ARNr **18S** ha sido una

herramienta empleada en estudios de diagnóstico rápido de esta enfermedad mediante PCR, mejorando la sensibilidad del diagnóstico de referencia (Mayta *et al.*, 2000; Dwivedi *et al.*, 2012). La región genómica codificante de los ARN ribosomales 18S, 5.8S y 28S se esquematiza en la **figura 20**.

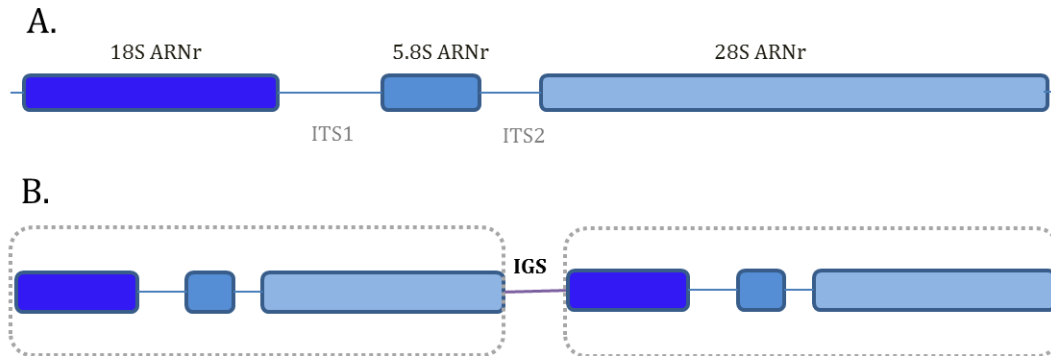


Figura 20: Esquema de la región genómica codificante de los ARN ribosomales 18S, 5.8S y 28S. **A.** Esquema de una unidad transcripcional en la que cada ARNr se separa por un espaciador interno no codificante (ITS). **B.** Representación de dos unidades transcripcionales separadas por el espaciador intergénico (IGS).

El *locus* 18S ha sido más estudiado que la subunidad 5S, especialmente en el campo de la filogenética. Los expertos coinciden en la necesidad de revisar la taxonomía de este grupo, ya que los estudios moleculares de la subunidad 18S parecen indicar que los tricomonádidos no procederían de ramas eucariotas tan primitivas como se podría pensar (Gunderdon *et al.*, 1995; Embley y Hirt, 1998; Viscogliosi *et al.*, 1999). El empleo de este marcador no sólo ha sido relevante para el estudio de la evolución de este parásito, sino también en el diagnóstico específico de infecciones en pacientes inmunocomprometidos. Duboucher *et al.* (2003) confirmaron la presencia de *T. vaginalis* en lavados broncopulmonares de un paciente con SIDA coinfectado con *Pneumocystis* y problemas respiratorios. Gracias a la amplificación y secuenciación de la subunidad 18S los investigadores pudieron confirmar el agente causal descartando un posible caso de infección por *T. tenax*. Hasta la fecha, la identificación de trofozoítos en muestras de esputo o lavados broncopulmonares se asociaban a *T. tenax*. Sin embargo, estos resultados corroboran la capacidad adaptativa de *T. vaginalis* para sobrevivir en distintos ambientes así como la fiabilidad de este marcador para la diferenciación interespecífica. Mantini *et al.* (2009) identificaron una nueva especie de *Tetratrichomonas* presente en la cavidad bronquial de una mujer afectada por un enfisema pulmonar. La secuenciación de la subunidad 18S y su posterior comparación filogenética con otras secuencias publicadas permitió su clasificación.

10. D. ESPACIADORES INTERNOS (ITS)

Los genes que codifican a los ARNr están mucho más conservados que los **espaciadores internos (ITS)**, convirtiéndose estos últimos en marcadores adecuados para la diferenciación inter e intra-específica de organismos (Hillis y Dixon, 1991). Este hecho explica el alto número de estudios en otros parásitos en los que se ha realizado la diferenciación inter e intra-específica con éxito empleando esta región como marcador

molecular (Beltrame-Botelho *et al.*, 2005; Bostrom *et al.*, 2005; Dávila y Momen, 2000; Som *et al.*, 2000; Santos *et al.*, 2002).

Los tricomonádidos se caracterizan por presentar un *locus* ITS2 pequeño que presenta una estructura secundaria formada por una rama en lugar de tres (Katiyar *et al.*, 1995). La secuencia genética compuesta por las regiones 18S ARNr - ITS1- 5.8S ARNr - ITS2 - 28S ARNr se encuentra codificada en una única unidad transcripcional formada por varias copias en tándem y de número variables en función del organismo (**Figura 20.A**). El análisis del genoma de *T. vaginalis* reveló la existencia de 254 copias de la subunidad ribosomal pequeña y 251 copias del 5.8S ARNr (Carlton *et al.*, 2007). Cada una de estas unidades transcripcionales se separan mediante otra secuencia no codificante denominada espaciador intergénico (IGS) (**Figura 20.B**). Simoes-Barbosa *et al.* (2005) emplearon este *locus* para el estudio de la variabilidad entre aislados obtenidos de pacientes con y sin sintomatología. Sin embargo no lograron detectar una asociación clara entre la clínica y los perfiles de IGS-RFLP, considerando este marcador inadecuado para los estudios de caracterización intraespecífica en *T. vaginalis*.

Todos los estudios han confirmado la idoneidad del *locus* ITS1 - 5.8S ARNr - ITS2 como herramienta para estudios filogenéticos en tricomonádidos (Felleisen, 1997; Walker *et al.*, 2003; Kleina *et al.*, 2004; Ibáñez-Escribano *et al.*, 2013). Otros grupos se han centrado en la caracterización de aislados, habiendo obtenido variabilidades de entre el 15% y el 4% en la región ITS de los aislados secuenciados. Algunos autores han asociado mutaciones de nucleótidos específicos especialmente en el ITS1 con fenómenos de resistencia al metronidazol (Snipes *et al.*, 2000; Kazemi *et al.*, 2010) y con el desarrollo de tricomonosis asintomáticas en las pacientes (Rivera *et al.*, 2009).

Este *locus* también ha sido empleado para el diagnóstico de casos de sospecha de tricomonosis pulmonar. Mallat *et al.* (2004), Bellanger *et al.* (2008) y Leterrier *et al.* (2012) amplificaron muestras pulmonares de pacientes afectados por un pneumotórax post-trasplante cardíaco, un glioblastoma y un adenocarcinoma esofágico, respectivamente, identificando la presencia de *T. tenax* en los lavados broncopulmonares mediante la secuenciación de este *locus*. Jongwutiwes *et al.* (2000) emplearon esta región e identificaron *Pentatrichomonas hominis* en una mujer de 28 años afectada por un lupus eritematoso y coinfectada al mismo tiempo por *Strongyloides* y *Opistorchis*.

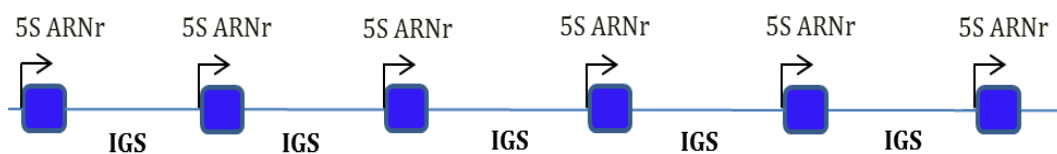


Figura 21: Disposición nucleotídica en tándem de los genes que codifican el ARNr 5S en *T. vaginalis*, separados por una secuencia intergénica (IGS) no codificante.

La subunidad 5S del ARNr de *T. vaginalis* se encuentra codificada en otra región del genoma, en más de 200 copias en tándem (**Figura 21**). No existen estudios que empleen este *locus* como marcador para la caracterización molecular de este parásito, tan sólo el trabajo de Torres-Machorro *et al.* (2009), en el que se compara la secuencia de este gen en tres tricomonádidos distintos (*T. vaginalis*, *T. tenax* y *Tritrichomonas foetus*), confirmando

una divergencia de entre un 94-98%, así como una localización cromosómica variable entre los organismos.

Independientemente del *locus* que se emplee (ribosomal o espaciador no codificante), en todos los casos se amplifica la región y se secuencia el producto de PCR para su análisis comparativo. Los nuevos secuenciadores siguen basándose en el método de Sanger. Sin embargo las nuevas tecnologías permiten llevar a cabo de forma automatizada la secuenciación de varias muestras a la vez mediante cromatografía capilar.

La **figura 22** compara la metodología de secuenciación antigua empleando el método de Sanger en geles de poliacrilamida y revelados con radiactividad, y el que se lleva a cabo actualmente con secuenciadores automáticos capaces de generar un cromatograma en función de las señales obtenidas por los fluorocromos con los que se marcan los nucleótidos del ADN amplificado (Applied Biosystems Chemistry Guide, 2009).

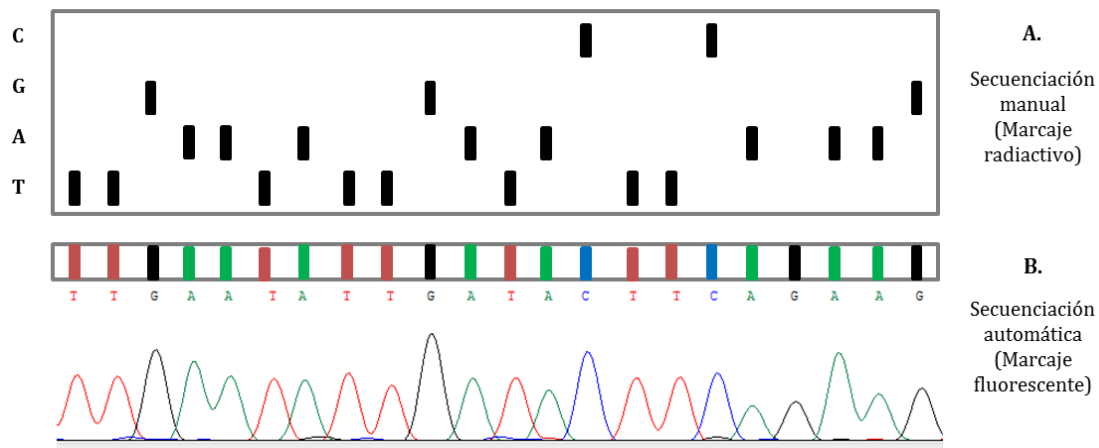


Figura 22: Comparación de la secuenciación de Sanger mediante el método enzimático empleando geles de poliacrilamida y revelando mediante marcaje radiactivo (A) y la secuenciación automática empleando fluorocromos (B).

10. E. MICROSATÉLITES (MS o SSR)

Las regiones microsatélites son secuencias cortas de dos a seis nucleótidos repetidas en tándem formando fragmentos de 100 nucleótidos aproximadamente (**Figura 23**) y distribuidas ampliamente de forma multialélica y ubicua en eucariotas y procariontes en numerosas copias (Chambers y MacAvoy, 2000; Ellegren, 2004; Conrad *et al.*, 2011). Ramel (1997) sostiene la hipótesis de que se trata de ADN basura. Sin embargo, cada vez son más los estudios que confirman que estas regiones repetidas están implicadas en procesos de organización de la cromatina, regulación génica, replicación del ADN, activación de la transcripción y en los procesos de reparación mediante mismatch, entre otros (Kashi *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2004). Los microsatélites pueden ubicarse en distintas regiones genómicas, como las regiones no codificantes, los marcos abiertos de lectura o regiones UTR, con implicaciones en el desarrollo de patologías como la enfermedad de Huntington, algunos tipos de cáncer, ataxia cerebrosespinal, etc. (Li *et al.*, 2004).

La región que se encuentra flanqueada por dos MS se denomina intermicrosatélite (ISSR o Inter-SSR) (**Figura 23**). Este fragmento génico puede ser codificante y también ha sido

objeto de estudio. Con el fin de investigar el polimorfismo genético de cepas y clones de organismos vivos, Zietkiewicz *et al.* (1994) diseñaron cebadores para la caracterización molecular de distintos organismos por medio de la huella genómica o *fingerprinting* a través de la comparación de patrones de bandas entre muestras. Para ello, diseñaron cebadores formados por uno de los dímeros más comunes en los genomas eucariotas (CA_n) a cuyos extremos 5' y 3' ancló una región de dos nucleótidos distintos con el fin de aumentar la especificidad de unión y la reproducibilidad de la técnica (**Figura 23**). El polimorfismo que se detecta con esta metodología no se debe a la variación del tamaño de los MS de destino sino a las mutaciones (inserciones o deleciones) que se han producido durante la evolución del organismo. Las principales ventajas de este marcador molecular son: la reproducibilidad, la rapidez y sencillez de la técnica. Asimismo, es recalable el polimorfismo elevado asociado a la tasa de mutación espontánea que le convierte en un marcador excelente para estudios intraespecíficos (Zietkiewicz *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 1997).

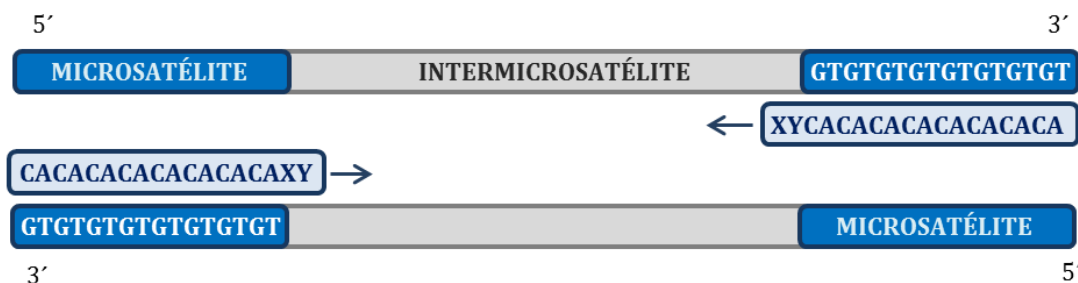


Figura 23: Representación de una región microsatélite (SSR) de 2 nucleótidos repetidos en tándem flanqueando a un intermicrosatélite (ISSR). Los cebadores siguen el modelo diseñado por Zietkiewicz *et al.* (1994).

Estos marcadores se consideran buenas herramientas en la identificación de infecciones mixtas así como en el estudio de genética poblacional de distintos parásitos como *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* spp., *Trypanosoma cruzi* o *Plasmodium* spp. (Rossi *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 1999; Anderson *et al.*, 2000; Ajzenberg *et al.*, 2002; Bulle *et al.*, 2002; Gomez *et al.*, 2003; Ford *et al.*, 2010; Conrad *et al.*, 2011).

Aunque no existen trabajos de ISSR en *T. vaginalis*, en 2011, el grupo de Conrad *et al.* llevaron a cabo los primeros estudios de MS en *T. vaginalis*. Para ello analizaron el genoma en busca de regiones de menos de 400 bp formadas por repeticiones de 2-6 nucleótidos. Los estudios bioinformáticos generaron 86 MS, de los cuales se seleccionaron un panel de 21 marcadores MS capaces de diferenciar entre aislados. Un año más tarde, este mismo grupo corroboró la utilidad de este panel de marcadores de MS para la caracterización de 235 muestras de *T. vaginalis* procedentes de todos los continentes (Conrad *et al.*, 2012).

10. F. POLIMORFISMO DE NUCLEÓTIDO SIMPLE (SNP)

Se trata de alteraciones en la secuencia que afectan a un único nucleótido (**Figura 24**). Se encuentran distribuidos por todo el genoma, produciéndose en 1 de cada 1000 bases (Syvänen, 2001). Su localización es relevante en el resultado fenotípico que puede ocasionar dicha mutación. Muchos SNP se producen en regiones no codificantes por lo que

son empleados como marcadores evolutivos. No obstante, también se encuentran en regiones codificantes, incluyendo genes de copia única (SCG: *Single-Copy Gene*). Conrad *et al.* (2011) estudiaron este tipo de genes en busca de los marcadores óptimos para la caracterización de aislados en el laboratorio e identificaron un número elevado de SCG. Seleccionaron sólo aquellos que presentasen un tamaño no muy elevado (<400 pb), no mostrasen similitud con secuencias de otros organismos y representasen a genes constitutivos o *housekeeping*, factores de virulencia potenciales o de interés como dianas farmacológicas. El estudio de los SNP requiere no sólo la amplificación del fragmento sino su posterior secuenciación para la comparación entre aislados, al igual que los ARNr y los ITS.

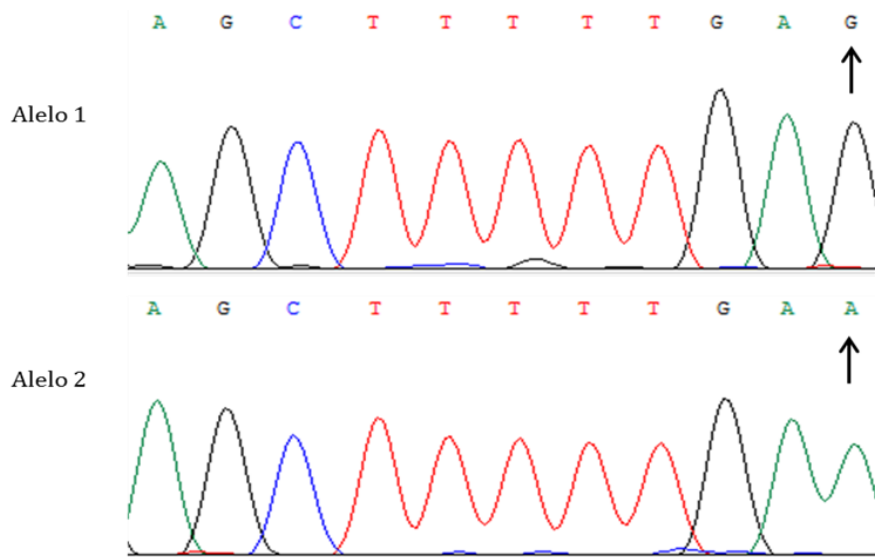


Figura 24: Ejemplo de polimorfismo de nucleótido simple o SNP.

En los estudios de Conrad *et al.* (2011), de los 21 SCG iniciales, se seleccionaron seis como los más adecuados para la caracterización genética de este parásito, junto con los 21 MS seleccionados. La combinación de los MS y SNP permitió un año más tarde diferenciar dos tipos de poblaciones asociadas con la presencia de TVV y la sensibilidad a MTZ tras genotipar 235 muestras positivas (Conrad *et al.*, 2012). A diferencia de los SSR, estos marcadores presentan una menor tendencia a fenómenos de homoplasia al mostrar un ratio de mutación menor (Conrad *et al.*, 2011; Cornelius *et al.*, 2012). Cornelius *et al.* (2012) seleccionaron siete genes constitutivos de copia única con el fin de caracterizar 68 aislados que agruparon en dos poblaciones diferentes. Esta tipificación multilocus de secuencias, también conocida como **Multilocus Sequence Typing (MLST)**, se emplea para los estudios poblacionales de patógenos mediante la secuenciación de fragmentos internos de los genes seleccionados. Las diferencias o SNP con respecto al gen de referencia permiten conocer la evolución del aislado e identificar el número de alelos en las secuencias estudiadas.

11. MÉTODOS DE CRIBADO FARMACOLÓGICO

11. A. MÉTODOS *IN SILICO*

Se define como cribado o *screening* virtual (CV) al conjunto de técnicas computacionales que permiten identificar compuestos potencialmente interesantes desde el punto de vista farmacológico, a partir de las representaciones de la estructura molecular de los compuestos químicos almacenados en grandes bases de datos (Talevi y Bruno-Blanch, 2010).

Gracias al avance de las ciencias computacionales, en los últimos años ha sido posible el diseño de modelos computacionales capaces de evaluar virtualmente un número de moléculas elevado, que por el clásico método *in vitro* resultaría muy laborioso. Las ventajas que presentan estos sistemas son la rapidez de los cálculos matemáticos computacionales y el bajo coste debido al carácter teórico del proceso. Dichos modelos virtuales permiten analizar entidades teóricas, aún no sintetizadas, como método de síntesis racional dirigida. A través de estos procedimientos se evita la síntesis de compuestos químicos que van a resultar inactivos en los ensayos *in vitro*, así como ensayos *in vivo* innecesarios, priorizando el análisis en el laboratorio de aquellas moléculas con mayor probabilidad de ser activas (Willett, 2006; Verma *et al.*, 2010). La **figura 25** muestra de forma esquemática las distintas técnicas de CV que se han desarrollado en los últimos años y que podrían agruparse en:

1. **CV en función del receptor:** permiten estudiar las interacciones ligando-receptor. Se diseña la molécula conociendo previamente su mecanismo de acción. Su principal inconveniente es que se requiere conocer la estructura 3D del receptor, resultando de gran dificultad en aquellos casos en los que el receptor presenta dominios transmembrana. La metodología más conocida actualmente basada en este tipo de determinaciones es el *docking* (Willett, 2006).
2. **CV en función del ligando:** En estos casos solo se conoce la estructura de la molécula objeto de estudio. A su vez se pueden subdividir en dos metodologías:
 - 2.1. Superposición de farmacóforos: se necesita conocer las características químicas y geométricas de las moléculas con el fin de poder superponer sus conformaciones en 3D y determinar cuál es el farmacóforo (Escalona *et al.*, 2003). Presenta un coste computacional elevado debido a que el sistema calcula la conformación energética activa de cada molécula que no siempre resulta ser la más termodinámicamente más estable (Willett *et al.*, 1998).
 - 2.2. Descriptor: según Talevi y Bruno-Blanch (2010), un descriptor es una variable que refleja algún aspecto de la estructura molecular. A partir de estos descriptores se diseñan los modelos QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*), métodos para la obtención de modelos matemáticos y/o computacionales cuyo fin es encontrar una correlación estadísticamente significativa entre estructura y actividad empleando una técnica quimiométrica. En otras palabras, la estructura química de un compuesto va a permitir conocer las propiedades del mismo. A través de los modelos QSAR se

busca estudiar la correlación entre descriptores y afinidad de unión, actividad o toxicidad empleando métodos quimiométricos (Verma *et al.*, 2010).

- a) Los modelos **QSAR-3D** requieren un análisis conformacional de todas las estructuras moleculares que formen parte de la serie de entrenamiento. Estos modelos emplean *descriptores 3D*, también definidos como *dependientes*, entre los que destacan el método CoMFA (*Comparative Molecular Field Analysis*) y el método CoMSIA (*Comparative Molecular Similarity Indices Analysis*) (Verma *et al.*, 2010). Ambas técnicas QSAR-3D han sido empleadas en la búsqueda de nuevas cabezas de serie empleando el MTZ como estructura principal para la búsqueda de alternativas frente a aislados *T. vaginalis* resistentes (Kumar *et al.*, 2012b). El inconveniente principal de estas técnicas basadas en descriptores 3D es que se requiere optimizar la geometría de todas las moléculas de la serie de entrenamiento, siendo necesario un número mínimo adecuado de moléculas activas conocidas para poder generar el modelo QSAR (Talevi y Bruno-Blanch, 2010).
- b) A pesar de la ventaja que presentan los modelos 3D en cuanto a diferenciación de isómeros ópticos, la dificultad computacional de estos estudios ocasiona que los modelos más ampliamente utilizados por su mayor sencillez y bajo coste, sean los modelos basados en *descriptores independientes*, como los *topológicos (2D)* y los *constitucionales*, que dependen solo de la fórmula química, como el peso molecular o el número de heteroátomos. Estos modelos **QSAR-2D** permiten analizar bases de datos compuestas por millones de moléculas en un tiempo corto al no tener en cuenta la conformación de la molécula. Sin embargo, a veces pueden presentar problemas para diferenciar isómeros ópticos así como la interpretación de los propios modelos en función de los descriptores 2D que se hayan empleado para su diseño. Siguiendo esta línea el equipo de Marrero-Ponce ha diseñado un software (TOMOCOMD-CARDD®) capaz de generar modelos virtuales a partir del cálculo de descriptores topológicos. A través de este software, en los últimos años se han diseñado modelos de CV que han permitido la selección racional de compuestos potencialmente activos frente a distintos parásitos como *Plasmodium falciparum* (Marrero-Ponce *et al.*, 2005; Montero-Torres *et al.*, 2006), *Trypanosoma cruzi* (Montero-Torres *et al.*, 2005; Vega *et al.*, 2006; Castillo-Garit *et al.*, 2011, 2012) o *Trichomonas vaginalis* (Marrero-Ponce *et al.*, 2005; Meneses-Marcel *et al.*, 2005; Marrero-Ponce *et al.*, 2006; Marrero-Ponce *et al.*, 2008; Meneses-Marcel *et al.*, 2008; Rivera-Borroto *et al.*, 2009). Los modelos generados han mostrado porcentajes de sensibilidad y especificidad por encima del 82,8 % y del 75 %, respectivamente.

2.3. Similitud: Para poder diseñar un modelo QSAR, se requiere crear una serie de entrenamiento que esté conformada por un número mínimo de ligandos conocidos que presenten la actividad buscada. Sin embargo, existen casos en los que no se puede disponer de suficientes entidades moleculares con la propiedad deseada. Es por ello por lo que se han diseñado metodologías basadas en la similitud química entre compuestos. Esta metodología se basa en la cuantificación del grado de relación entre estructuras. Este tipo de CV está fundamentado en el *Principio de Propiedad Similar*

enunciado por Johnson y Maggiora en los años 90. Este principio enuncia que aquellas moléculas que sean estructuralmente similares es probable que también presenten propiedades similares (Willett, 2006). El principal inconveniente de este tipo de CV es que no da información precisa sobre las propiedades moleculares y farmacocinéticas más adecuadas para la mejor interacción ligando-diana (Talevi y Bruno-Blanch, 2010). Este tipo de CV basado en la similitud estructural a partir de ligando ha sido empleado por el grupo de Pérez-Villanueva generando mapas SAS (*Structure-Activity Similarity*) a partir de una colección de benzimidazoles ya ensayados, con el fin de encontrar estructuras consenso con actividad potencial frente a *T. vaginalis* y *Giardia intestinalis* (Pérez-Villanueva *et al.*, 2010).

Todos los métodos de CV presentan distintas ventajas e inconvenientes, no existiendo ninguno que destaque frente a otro. La elección del método de CV más adecuado dependerá de los conocimientos que existan sobre la diana y el ligando. En los últimos años se ha producido un incremento en el número de artículos científicos en el campo de la Química Médica en los que se incluyen CV. El objetivo del empleo de descriptores farmacocinéticos es descartar aquellas estructuras que puedan mostrar futuros problemas de biodisponibilidad o toxicidad, considerando que más de un 90% de los fármacos retirados del mercado lo son por efectos tóxicos y que un tercio de las moléculas que presentan una actividad relevante en los ensayos *in vitro*, deben ser descartadas durante las fases I a III de los ensayos clínicos a causa de la toxicidad o problemas farmacocinéticos (Schuster *et al.*, 2005).

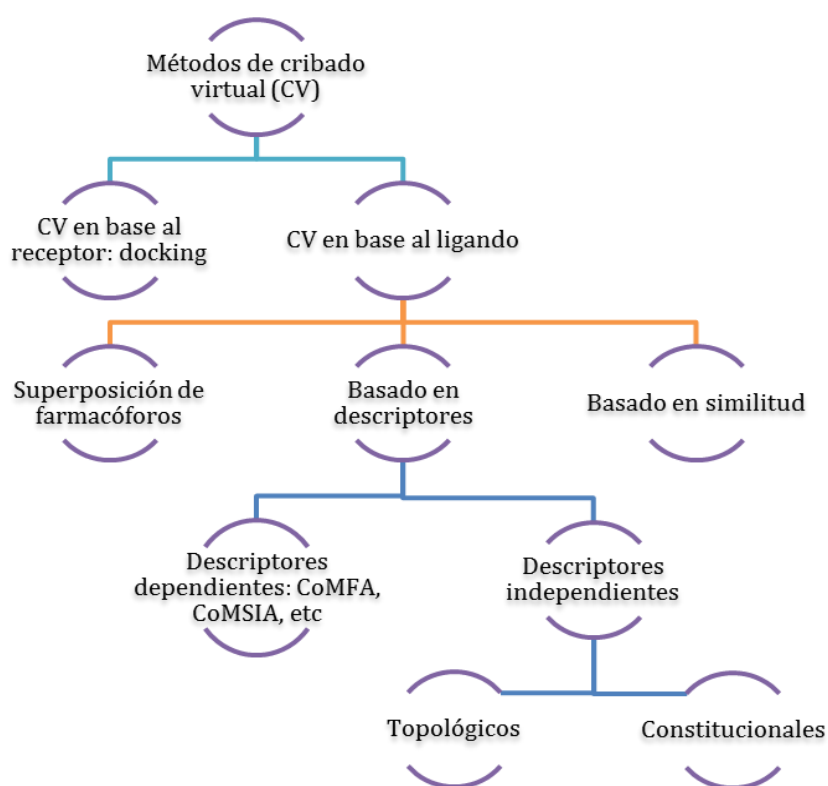


Figura 25: Esquema de los principales métodos de CV desarrollados para el cribado *in silico* de nuevos fármacos.

Todo estudio QSAR requiere seguir una serie de pasos generales:

- 1) Planteamiento del problema
- 2) Previsión de las propiedades estructurales a determinar
- 3) Elección del modelo QSAR, muchas veces determinado por el tipo de compuesto que se busca
- 4) Generación de las series
- 5) Cálculo de los descriptores moleculares (DM)
- 6) Análisis estadístico y validación de los modelos
- 7) Validación de los modelos generados

Determinación computacional de parámetros farmacocinéticos: existen programas bioinformáticos capaces de calcular descriptores relacionados con propiedades fisicoquímicas que van a condicionar la absorción, distribución, metabolismo y/o excreción (ADME) de esa molécula. La absorción de un compuesto químico depende de la solubilidad de dicha molécula y de la permeabilidad intestinal. Aunque existen procesos de absorción mediados por transportadores activos, los parámetros que se pueden predecir virtualmente hacen referencia a la capacidad de la molécula para ser absorbida mediante difusión pasiva a través de membrana.

Existen numerosos estudios que hacen referencia a estas propiedades farmacocinéticas siendo la regla de Lipinski o regla de los 5 (RO5 = Rule of 5), descrita por Lipinski y colaboradores en 1997 (Lipinski *et al.*, 2001), la más conocida. En ese trabajo, el equipo de Lipinski llevó a cabo un estudio pormenorizado de distintas propiedades de un número de moléculas significativo, con el objetivo de definir los parámetros teóricos que sugieren si una molécula va a presentar una absorción y permeabilidad baja. En la **tabla 10**, se muestran los valores más adecuados que una molécula tenga una buena biodisponibilidad oral y una adecuada permeabilidad a nivel intestinal.

Tabla 10: Propiedades fisicoquímicas estimadas por la RO5 para que una molécula presente una buena biodisponibilidad oral y permeabilidad intestinal.

Propiedad	Abreviatura	Límite	Observación
Peso molecular	PM	≤ 500	Un compuesto químico de gran tamaño encuentra dificultades para atravesar la membrana intestinal y la hematoencefálica
Aceptores de puentes de H	Ha	≤ 10	Recuento del número de oxígenos y nitrógenos
Donadores de puentes de hidrógeno	Hd	≤ 5	Sumatorio del número de enlaces NH y OH
Coefficiente de partición	CLogP	≤ 5	Coefficiente de la solubilidad en medio orgánico (octanol) y medio acuoso. Define la lipofilia de la molécula y con ello su biodisponibilidad oral

Área de superficie polar	TPSA	< 120 Å ²	Superficie ocupada por todos los átomos polares, principalmente N y O, así como los hidrógenos polares unidos a estos dos átomos. Puede limitar la difusión pasiva a nivel intestinal
--------------------------	------	----------------------	---

Posteriormente, Lipinski (2004) publicó las propiedades teóricas de las moléculas que atraviesan la barrera hematoencefálica (BHE) y cuya diana farmacológica se encuentre en el SNC (**Tabla 11**).

Tabla 11: Propiedades fisicoquímicas necesarias para lograr una buena permeabilidad a través de la BHE.

Abreviatura	Límite
TPSA	< 60-70 Å ²
Ha	≤ 5
CLogP - Ha	> 0

En la actualidad se está promoviendo el uso de estas herramientas computacionales durante el proceso inicial de búsqueda de cabezas de serie o *hits* frente a una patología. El trabajo multidisciplinar de los equipos de predicción *in silico*, los de síntesis y los de ensayos *in vitro* e *in vivo* permiten un diseño racional de nuevas moléculas más eficaz. En la actualidad, se han diseñado diversos *softwares* capaces de determinar empíricamente las propiedades fisicoquímicas de un compuesto en función de su estructura mediante cálculos computacionales.

11. B. MÉTODOS *IN VITRO*

Se pueden encontrar numerosos estudios dentro del campo de la farmacología orientados a la evaluación *in vitro* de compuestos frente a *T. vaginalis*. Sin embargo, los resultados se expresan de diversas formas. Los distintos protocolos de cribado, los parámetros para cuantificar la actividad, las condiciones de experimentación entre las que destacan los inóculos, concentraciones y tiempos de incubación distintos, hacen difícil la comparación de resultados.

La **metodología** empleada en la búsqueda de nuevos agentes tricomonicidas es variada. A pesar de no existir protocolos preestablecidos, en la mayoría de los casos se lleva a cabo el **recuento al microscopio** de los trofozoítos vivos tras la incubación de los mismos con distintas concentraciones del compuesto en estudio durante 24 o 48 h (Camuzat-Dedenis *et al.*, 2001; Delmas *et al.*, 2002; Rathelot *et al.*, 2002; Aguirre *et al.*, 2004; Arán *et al.*, 2005; Coro *et al.*, 2005; Kouznetsov *et al.*, 2005; Martínez-Grueiro *et al.*, 2005; Gómez-Barrio *et al.*, 2006; Giordani *et al.*, 2009; Dornbush *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2014). Esta misma técnica también la utilizan otros grupos pero con ligeras modificaciones. Se incuban los trofozoítos con el fármaco, posteriormente son lavados y sub-cultivados en medio fresco durante 48 h y finalmente se valora la viabilidad mediante recuento al microscopio (Navarrete-Vazquez *et al.*, 2003; Andrzejewska *et al.*, 2004; Torres-Gomez *et al.*, 2008; Hernández-Núñez *et al.*, 2009; Valdez-Padilla *et al.*, 2009; Nava-Zuazo *et al.*, 2010). Otros grupos emplean el microscopio invertido con el fin de determinar la concentración mínima inhibitoria 100 (CMI₁₀₀) o concentración que logra el 100% de actividad

tricomonocida por la ausencia de motilidad (Malagoli *et al.*, 2002; Carta *et al.*, 2004), mientras que Blaha *et al.* (2006) corroboran la CMI₁₀₀ cultivando los trofozoítos expuestos al compuesto en medio fresco, no debiéndose observar crecimiento alguno. Si se desea aumentar el contraste para el recuento de los protozoos se pueden emplear **indicadores** como el azul de bromofenol (Hui *et al.*, 2006), el colorante azul Tripán (Crozet *et al.*, 2009; Kumar *et al.*, 2012a) o revelando la prueba con SYTOX, un colorante fluorescente con afinidad por el ADN, pudiendo acceder al material genético a través de la membrana celular de aquellas células que estén muertas (Rocha *et al.*, 2014). Asimismo, existen otras metodologías basadas en la cuantificación de productos procedentes del metabolismo del parásito como el ácido láctico (Escario, 1985; Iturrino *et al.*, 1987) o la fosfatasa ácida (Martínez-Grueiro *et al.*, 2003). También se puede cuantificar enzimas secretadas por los trofozoítos viables, como la lactato deshidrogenasa (Tasca Cargnin *et al.*, 2013), o la actividad enzimática del parásito mediante la incorporación de colorantes redox como el Alamar Blue® (Campos Aldrete *et al.*, 2005) o la resazurina (Duarte *et al.*, 2009; Giordani *et al.*, 2011; Natto *et al.*, 2012).

Los resultados de la actividad tricomonocida pueden expresarse de diversas formas. Los **parámetros** que más se emplean en el campo de la farmacología frente a *T. vaginalis* son:

a) Concentración Mínima Inhibitoria/Concentración letal (CMI/CMI₁₀₀ en inglés, MIC/LC): en algunos casos se diferencia entre CMI y concentración mínima citocida (CMC), también denominada por algunos autores concentración letal (CL). La CL se define como la concentración que elimina el 100% de los organismos viables (Silva Rocha *et al.*, 2013). Aunque algunos investigadores usan los dos términos indistintamente (Martin *et al.*, 1998), es importante recalcar que la CMI es la concentración a la que se inhibe el crecimiento visible del protozoo, no permitiendo un incremento en el número de flagelados; en otras palabras, hace referencia a la concentración citostática (Kouznetsov *et al.*, 2004, 2005; Meneses-Marcel *et al.*, 2005). Sin embargo, muchos autores definen este parámetro como la concentración mínima a la cual no observan crecimiento ni trofozoítos móviles al microscopio (Chavalitshe-winkoon-Petmitr *et al.*, 2003; Carta *et al.*, 2004; Wright *et al.*, 2010) o no se produce un cambio de color en el colorante redox (Campos-Aldrete *et al.*, 2005). Realmente esta definición haría referencia al segundo parámetro (CMC o CL) que indica la concentración citocida a la que no hay organismos viables (Escario García-Trevijano y Gómez Barrio, 1992; Martin *et al.*, 1998).

b) Concentración inhibitoria 50/Concentración efectiva 50 (CI₅₀/CE₅₀): concentración del compuesto necesaria para lograr la inhibición de crecimiento del 50% del cultivo, en condiciones *in vitro*. Diferentes estudios emplearon este parámetro para definir la actividad observada en los cultivos tras someter a los trofozoítos a distintas concentraciones de extractos (Gómez-Barrio *et al.*, 2004; Campos Aldrete *et al.*, 2005; Blaha *et al.*, 2006; Natto *et al.*, 2012; Tasca Cargnin *et al.*, 2013; Rocha *et al.*, 2014).

c) Inhibición del crecimiento 90/Concentración efectiva 90 (IC₉₀/CE₉₀): Gracias a la curva dosis-respuesta que se obtiene al evaluar la viabilidad de los cultivos tras exponerlos a distintas concentraciones del compuesto, se pueden determinar otros porcentajes de actividad (Gómez-Barrio *et al.*, 2004; Blaha *et al.*, 2006)

La actividad registrada depende del **tiempo de exposición** del cultivo al compuesto. Blaha *et al.* (2006) estudiaron el comportamiento de los cultivos tras mantener durante 30 min, 1 h, 6 h y 24 h los parásitos en contacto con los compuestos químicos. En la mayoría de los estudios de actividad farmacológica frente a *T. vaginalis* el tiempo de exposición es de 24 y/o 48 h (Campos Aldrete *et al.*, 2005; Wright *et al.*, 2010; Rocha *et al.*, 2014; Benchimol *et al.*, 2014) aunque pueden encontrarse trabajos como los de Carta *et al.* (2004) en el que determinan la CMI tras 72 h y 96 h de exposición.

En muchos casos, los **aislados** empleados en los estudios farmacológicos no están caracterizados ni catalogados, ya que proceden de muestras clínicas que son axenizadas para su posterior empleo en los trabajos de cribado (Carta *et al.*, 2004; Rocha *et al.*, 2014). A pesar de ello, existen aislados de *T. vaginalis* registrados y catalogados por la *American Type Culture Collection* (ATCC). Estos aislados parecen los más recomendables para los estudios farmacológicos. No obstante, en algunos trabajos de viabilidad parasitaria ambos tipos de aislados (silvestres y de la ATCC) se someten a las mismas concentraciones de fármaco (Adagu *et al.*, 2001; Duarte *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 2010; Tasca Cargnin *et al.*, 2013).

El **diluyente** principal de los compuestos de síntesis, que se emplea en la preparación de las soluciones stock, es el sulfóxido de dimetilo (DMSO). Un líquido orgánico polar muy empleado en farmacología como solvente al ser miscible tanto en agua y medios hidrófilos como en medios orgánicos. Su concentración final en el cultivo varía en un rango del 0,01% (v/v) (Adagu *et al.*, 2001) hasta un 2% (v/v) (Chavalitshewinkoon-Petmitr *et al.*, 2005) sin interferir en el crecimiento normal de los parásitos. Duarte *et al.* (2009) estudiaron la citotoxicidad de distintos solventes orgánicos como la acetona, el metanol, el etanol, el isopropanol y el DMSO así como los surfactantes Tween 20, Tween 80 y Triton X-100 en cultivos axénicos de *T. vaginalis*. Finalmente la acetona y el DMSO resultaron ser los mejores solventes como vehículos en estudios de cribado.

Algunos trabajos tan sólo exponen los cultivos a una sola **concentración** del compuesto, mientras que otros realizan una batería de pruebas a distintas concentraciones que les permite determinar los parámetros anteriormente citados gracias a las curvas de dosis-respuesta. Cada vez es mayor el número de grupos que para permitir la comparación de actividades entre distintos compuestos, preparan y estudian la actividad tricomonida en concentraciones micromolares (μM) (Adagu *et al.*, 2001; Kouznetsov *et al.*, 2004; Duarte *et al.*, 2009; Wright *et al.*, 2010; Natto *et al.*, 2012; Rocha *et al.*, 2014), aunque aún pueden encontrarse trabajos en los que se siguen preparando las soluciones stock en $\mu\text{g/mL}$ (Carta *et al.*, 2004; Campos Aldrete *et al.*, 2005; Coro *et al.*, 2005; Marrero-Ponce *et al.*, 2006; Meneses-Marcel *et al.*, 2005, 2006; Rivera-Borroto *et al.*, 2008). En los estudios de extractos naturales, al no trabajar con un compuesto puro del que se pueda conocer su peso molecular, las concentraciones que se evalúan en todos los casos son en $\mu\text{g/mL}$ o mg/mL (Martin *et al.*, 1998; Muelas-Serrano *et al.*, 2000; Gómez-Barrio *et al.*, 2004; Taran *et al.*, 2006; Tasca Cargnin *et al.*, 2013; de Brum Viera *et al.*, 2015).

Es frecuente observar que en estudios de cribado *in vitro* se estudia de forma paralela la toxicidad inespecífica frente a líneas celulares de mamífero para determinar su carácter tóxico. Si dicha molécula ejerce efectos deletéreos sobre estas células, pone en evidencia que no presenta una actividad parasitaria específica o toxicidad selectiva. El objetivo de

estas evaluaciones es buscar moléculas que muestren una actividad frente al patógeno sin mostrar toxicidad inespecífica. Algunos grupos, en función de la actividad antiparasitaria *in vitro* y los resultados de citotoxicidad, determinan los compuestos antiparasitarios y tóxicos, mientras que otros calculan el índice de selectividad (IS) (Hernández-Núñez *et al.*, 2009; Navarrete-Vazquez *et al.*, 2011). Este índice se define como el cociente entre la concentración citotóxica 50 (CC₅₀) y la actividad tricomonocida expresada como concentración inhibitoria 50 (CI₅₀).

No existe una determinada línea celular que se utilice de forma general en este tipo de estudios de citotoxicidad inespecífica. En la literatura se encuentran numerosos ensayos en los que se emplean desde células procedentes de ovario de hámster chino (CHO) de la Colección Europea de Cultivos Celulares Animales (Evans *et al.*, 2001) a líneas tumorales (Hamid *et al.*, 2004). En el año 2009 se publicó una normativa internacional (ISO 10993-5:2009) que sugiere el uso de determinadas líneas celulares para los ensayos de citotoxicidad: CCL 1 (clon 929 de la NCTC), CCL 163 (clon A31 procedente de Balb/3T3), CLC 171 (MRC-5), CCL 81 (células Vero) y CCL 10 (BNHK-21 [C-13]) y V-79 379A de la ATCC. Sin embargo, el propio informe indica que pueden emplearse otras líneas celulares siempre que los resultados obtenidos sean similares a los derivados del empleo de los linajes indicados en el informe. Asimismo, este informe también recomienda la técnica descrita por Mosmann (1983) para la determinación de la citotoxicidad en células mediante el empleo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Esta sal de tetrazolio permite determinar la actividad proliferativa de las células gracias a la transformación del colorante ocre-amarillo en cristales añil-morados de formazano insolubles en soluciones acuosas gracias a la acción de distintas enzimas de localización microsomal, citosólica y mitocondrial (Gonzalez y Tarloff, 2001). La actividad metabólica de las células está relacionada con la formación de los cristales, pudiendo cuantificarse mediante espectrofotometría (Hamid *et al.*, 2004). Otras técnicas empleadas para el estudio de la toxicidad celular son los colorantes redox como el Alamar Blue® o su componente mayoritario, la resazurina (O'Brien *et al.*, 2000; Hamid *et al.*, 2004; Borra *et al.*, 2009).

11. C. MÉTODOS *IN VIVO*

No existe un modelo animal capaz de establecer y reproducir la infección con *T. vaginalis*, aceptado por toda la comunidad científica. Los modelos más empleados son:

a) Modelo intraperitoneal murino: se lleva a cabo mediante la inoculación de parásitos vivos en la cavidad intraperitoneal. Debido a la colonización y virulencia del protozoo, se van a desarrollar lesiones en los órganos de la cavidad abdominal, pélvica y eventualmente en la cavidad torácica. El modelo intraperitoneal de Teras y Roigas (1966) ha sido empleado posteriormente por distintos investigadores como modelo *in vivo* para el estudio de la eficacia de nuevos agentes tricomonocidas (Cavier *et al.*, 1972; Nogal-Ruiz *et al.*, 2003a, b), caracterización de aislados (Meingassner *et al.*, 1978; Meingassner y Thurner, 1979; Gómez-Barrio *et al.*, 2002), o para el estudio de factores de patogenicidad con el fin de determinar si existe una posible correlación entre el grado de virulencia de cada aislado en ratón y las características clínicas que desarrolla



Mus musculus

en pacientes. Los resultados observados por distintos grupos han sido contradictorios. El grupo de Bhatt *et al.* (1993) no logró definir una asociación clara entre los casos asintomáticos y sintomáticos en pacientes y la infección desarrollada en el ratón. En cambio Rojas *et al.* (2004b) observaron una correlación clara. La determinación del índice de patogenia en este modelo se sustenta en la mortalidad, la presencia de líquido ascítico y las lesiones en los órganos abdominales, que deberán ser analizadas mediante necropsia macroscópicamente y puntuadas de acuerdo a unos criterios determinados (Toyos, 1974; Meingassner *et al.*, 1978; Nogal-Ruiz *et al.*, 1997).

b) Modelo murino subcutáneo: empleado por primera vez por Honigberg *et al.* (1966), se basa en la inoculación subcutánea de trofozoítos vivos que generan una lesión local. Este modelo ha sido empleado en estudios de virulencia y sensibilidad a agentes quimioterapéuticos (Meingassner *et al.*, 1978; Meingassner y Thurner, 1979; Kuczynska *et al.*, 1984; Jayarao *et al.*, 1991; Coombs y Mottram, 2001). El inconveniente principal descrito por autores como Meignesser *et al.* (1978) es que los resultados se basan en la evaluación macroscópica de la existencia o no de la lesión, lo que puede suponer un método menos informativo en comparación con la evaluación de las lesiones en la cavidad peritoneal y la presencia de trofozoítos viables en el modelo intraperitoneal.

c) Modelo intravaginal: se han realizado enormes esfuerzos para estandarizar un modelo intravaginal que se asemejase a la infección del tracto genitourinario humano. Sin embargo, no se ha logrado desarrollar un modelo reproducible. Se han empleado distintos animales como los saimiris o monos ardilla, que desarrollan síntomas durante 3 meses. Sin embargo el coste y cuidado de este tipo de animales no hace factible la estandarización de este modelo animal (Street *et al.*, 1983).



Saimiri sciureus

También se han realizado ensayos en cobayas, que no requieren tratamiento estrogénico previo, y que presentan infecciones sintomáticas similares a las observadas en la mujer (Hayward-McClelland *et al.*, 1999). Pese a ello, no se ha considerado un hospedador adecuado para este parásito (Newton *et al.*, 1960). Otros roedores requieren un tratamiento estrogénico previo para lograr el asentamiento de la infección. En esta sentido, se ha experimentado con hámsters y ratas ovariectomizadas y pre-tratadas con *Candida albicans* y estrógenos (Meingassner *et al.*, 1975; Meneses-Marcel *et al.*, 2008).



Cavia porcellus

El ratón es el modelo más ampliamente extendido en estudios inmunológicos, de patogénesis o de cribado (Abraham *et al.*, 1996; Cobo *et al.*, 2011). Además del tratamiento previo con estrógenos (Cappuccinelli *et al.*, 1974; Meysick y Garber, 1992), McGrory y Garber estudiaron en 1992 el efecto de la pre-inoculación con *Lactobacillus acidophilus* previo a la infección intravaginal con *T. vaginalis*. Los resultados demostraron que el grupo control y el tratado con lactobacilos presentaban un porcentaje de infección similar (83,5% vs. 79%, respectivamente, al 3^{er} día post-infección). Sin embargo, a partir del 7^o día las diferencias entre grupos fueron muy altas. Este trabajo concluyó sus observaciones indicando que la pre-inoculación con *L. acidophilus* presentaba una mayor influencia en el

establecimiento de una infección vaginal por *Trichomonas* en el ratón que el propio estadio estral que pudiera presentar el animal en el momento de la inoculación. Asimismo no observaron cambios en la flora vaginal de los ratones en ninguno de los grupos estudiados (McGrory y Garber, 1992), coincidiendo con las observaciones hechas por Maysick y Garber en el mismo año sobre la posible influencia del tratamiento con estrógenos en la flora del ratón. El modelo de McGrory ha sido empleado por otros investigadores como modelo animal para el estudio de la eficacia de agentes microbicidas en la vagina (Lushbaugh *et al.*, 2000) y en estudios inmunológicos (Abraham *et al.*, 1996). Sin embargo, otros investigadores no han logrado establecer una infección duradera con este modelo (Cobo *et al.*, 2011). El modelo intravaginal muestra numerosas dificultades técnicas que impiden la implantación adecuada de la infección debido a que el roedor presenta un ciclo estral distinto a la mujer, cuya vagina está expuesta a cambios hormonales durante el ciclo menstrual. Según los estudios de Kulda (1990), el momento más adecuada para la infección es durante el proestrus y el estrus, periodos en los que existe mayor concentración de estrógenos. Es por esta razón, por la que es indispensable el tratamiento hormonal de los roedores previo a la infección, evitando que los animales pasen a fases de metestrus o diestrus. Cobo *et al.* (2011), en sus estudios de estandarización de un modelo murino de infección intravaginal, expusieron que era indispensable el tratamiento previo con hormonas sexuales (estrógenos) y esteroides (dexametasona); así como una inoculación elevada de hasta 10^6 trofozoítos de *T. vaginalis* para lograr la implantación de la infección.

El tratamiento únicamente con *Lactobacillus*, antibióticos o estradiol no fue eficaz, no detectándose tricomonádidos el 7º día p.i. Sin embargo, no era necesario ningún tratamiento previo si se infectaba con *Tritrichomonas foetus*, pudiendo reducir la dosis infectante a solo 100 trofozoítos y logrando una infección persistente de más de un mes. Los autores expusieron distintas razones que podían explicar estos resultados en ambos tricomonádidos. Por un lado el pH vaginal en ratón y bóvidos es cercano a 7 a diferencia del pH vaginal ácido que puede favorecer el asentamiento de *T. foetus* frente a *T. vaginalis*. En segundo lugar, sugerían que los azúcares terminales del lipofosfoglicano (LPG) de superficie en ambos parásitos podrían diferir, siendo un factor clave en la adhesión a las células epiteliales de la vagina del hospedador murino.

Asimismo, la presencia de leucocitos polimorfonucleares (PMN) parece ser un mecanismo de defensa contra la infección por *T. vaginalis* que no parece influir tanto en *T. foetus*. Este hecho explicaría el papel del pretratamiento con estrógenos y dexametasona al reducir la presencia de PMN en el lugar de infección (Cobo *et al.*, 2011).

IV. Material y Métodos

Materiales y Métodos

MATERIALES

A. MATERIAL DE LABORATORIO

Equipos empleados en el mantenimiento y cultivo del parásito

- Campana de flujo laminar (Telstar S.A., Tarrasa, España)
- Microscopio óptico (Olympus BH-2)
- Estufa de CO₂ al 5% y 37 °C (Heraeus Instruments, S.A.)
- Autoclave (P-Selecta)
- Congelador progresivo (Nicol LM100, Winterthur S.A.)
- Balanza de precisión (Mettler AE 100)

Equipos de biología molecular

- Termociclador (Mastercycler gradient, Eppendorf)
- Cubeta de electroforesis (Durviz S.L.)
- Transiluminador ultravioleta (Uvitec, Durviz S.L.)

Material de disección

- Tijeras, pinzas y agujas enmangadas
- Soporte de corcho para disección y alfileres

Material de plástico

- Jeringuillas de 5 mL y 1 mL
- Tubos de centrifuga de 50 mL
- Tubos de plástico de 25 mL
- Crioviales (Nunc)
- Filtros de esterilización Stericup-Steritop (Millipore S.A.)
- Filtros de 0,22 µm (Millipore S.A.)
- Frascos de cultivo celular (Nunc)
- Placas estériles de 96 pocillos (Nunc)

Material de vidrio

- Tubos de ensayo con tapón de rosca (16 × 100 mm) Pyrex
- Hemocitómetro de Neubauer
- Portaobjetos y cubreobjetos

B. MATERIAL BIOLÓGICO

Trichomonas vaginalis

Los estudios de cribado farmacológico se han llevado a cabo empleando tres aislados distintos, mientras que para los estudios de caracterización biológica y molecular se amplió el número de aislados a diez. A continuación se citan los aislados y las características de los mismos:

El cribado farmacológico *in vitro* se realiza con el aislado de referencia *T. vaginalis* **JH31A4** [nº de referencia 30236™ y lote SF-2, de la *American Type Culture Collection* (ATCC)]. Este aislado procede de una muestra endocervical tomada en el *John Hopkins Hospital* de Baltimore (EEUU) en 1963. Se caracteriza por su baja patogenicidad y su alta sensibilidad al metronidazol.

Los compuestos activos frente al aislado JH31A#4 se ensayan posteriormente en **IR78** con número de referencia 50138™, cuyo aislamiento se produjo en Viena (1978). Esta cepa se considera resistente a metronidazol, por lo que se utiliza en los estudios de quimiosensibilidad (Muller *et al.*, 1988)

Los estudios *in vivo* se realizan con la cepa de referencia **C:1-NIH** Diamond L.S. (nº de referencia 30001™ y lote SF-2761) procedente de la ATCC. Su aislamiento se produjo a partir de exudado vaginal de una mujer adulta con vaginitis aguda en 1956 en el Instituto Nacional de Salud Norteamericano (N.I.H.) en Bethesda, Maryland (EEUU).

Un estudio prospectivo sobre la prevalencia de la tricomonosis en la Comunidad de Madrid realizado por el Departamento de Parasitología (Facultad de Farmacia, U.C.M.) y con la colaboración de los Centros de Promoción de la Salud (Ayuntamiento de Madrid) permitió la obtención de 18 aislados. Estos aislados se identifican con el número de referencia de la historia clínica del paciente (Rodríguez Gallego, 1996). Tres de estos aislados se han incorporado a los ensayos de caracterización expuestos en el segundo capítulo de esta Tesis. Los aislados **1807**, **1232** y **11** de *T. vaginalis* proceden de muestras tomadas en los Centros de Promoción de la Salud de los distritos de Tetuán, Villaverde y Centro (Madrid), respectivamente. Estos aislados se catalogaron como cepas de patogenicidad alta (1807), media (1232) y baja (11) en un modelo experimental murino realizado en el Departamento de Parasitología (Facultad de Farmacia, U.C.M.) (Gómez-Barrio *et al.*, 2002) y se conservan en la colección de aislados de *T. vaginalis* del Departamento de Parasitología (Facultad de Farmacia, U.C.M.).

Con el fin de ampliar el estudio de caracterización biológica y molecular de aislados de *T. vaginalis* y comparar las posibles diferencias entre aislados mantenidos durante varios pases en el laboratorio frente a aislados frescos recién obtenidos y con un máximo de 10 pases *in vitro*, se contactó con el Centro de Salud Sandoval situado en el barrio de Chamberí de Madrid, quien proporcionó 4 aislados frescos durante el periodo comprendido entre Enero y Marzo de 2014. Cada aislado fue denominado con la letra inicial S seguida de los tres últimos dígitos del historial clínico de la paciente. El aislado **S019** procede de una mujer latinoamericana prostituta de 43 años cuyos análisis mostraron seropositividad al estudio de sífilis y negativo a VIH, *Candida*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* y hepatitis B y C. Los aislados **S351** y **S760** también

proceden de prostitutas de origen latino de 26 años y 46 años, respectivamente, con serología negativa al resto de patógenos en ambos casos. La última muestra, denominada **S852**, se aisló de una mujer española de 35 años negativa al resto de patógenos analizados y que declaró haber tenido menos de 5 parejas sexuales en el último año.

Todos los aislados se axenizaron, se congelaron, y se encuentran conservados en N₂ líquido en medio TYM suplementado con suero y un 10% del criopreservante sulfóxido de dimetilo (DMSO).

Líneas celulares de mamíferos para ensayos de citotoxicidad inespecífica

La determinación de la citotoxicidad inespecífica de los compuestos con actividad tricomonocida se ensayó en dos líneas celulares de mamífero. La línea J774 de macrófagos murinos de origen peritoneal procede del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitaria del Instituto de Salud Carlos III. Esta línea ha sido utilizada de forma habitual por el grupo de investigación y se empleó en los primeros ensayos de citotoxicidad inespecífica y en los ensayos de citotoxicidad del aceite esencial de *Artemisia absinthium* y sus respectivas fracciones.

Posteriormente, se continuaron los estudios empleando la línea celular Vero CCL-81™, procedente de la ATCC y gentilmente cedida al grupo de investigación por el laboratorio Biolab S.L. de control de calidad de productos farmacéuticos, toxicología y microbiología. Esta segunda línea celular (Vero CCL-81) sustituyó a la línea celular de macrófagos murinos J774 en los ensayos de citotoxicidad inespecífica en el cribado *in vitro* al tratarse de una de las recomendadas por la normativa ISO en estudios de citotoxicidad inespecífica. La línea Vero CCL-81 pertenece a células de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*), cuyo crecimiento en monocapa facilita la reproducibilidad en los estudios de citotoxicidad inespecífica.

Ambas líneas celulares se encuentra en criopreservación en N₂ líquido en medio RPMI suplementado con un 10% del criopreservante DMSO.

Línea de células tumorales HeLa

Dos de los estudios de caracterización biológica de aislados de *T. vaginalis* han sido la determinación de la citoadherencia y la citotoxicidad de los aislados tras mantenerlos en contacto con células de mamífero. La línea celular escogida para estos estudios son células HeLa cedidas por el grupo de Parasitología del Departamento de Ciencias Farmacéuticas y de la Salud de la Universidad San Pablo CEU. Al igual que el resto de líneas celulares se encuentra conservada en N₂ líquido.

Animales de experimentación: ratón (*Mus musculus* L.) cepa NMRI

Los estudios *in vivo* del modelo murino de tricomonosis experimental (Nogal-Ruiz *et al.*, 1999) se realizan en la cepa de ratón no consanguínea NMRI (*Naval Marine Research Institute*).

Los ratones NMRI se crían y mantienen en el animalario del Departamento de Parasitología (Facultad de Farmacia, U.C.M.), en condiciones controladas de temperatura, humedad, fotoperiodo, alimentación, ventilación y limpieza de jaula y cama por técnicos

especialistas y siguiendo las normas dispuestas en el RD 53/2013 sobre la protección de los animales utilizados en experimentación. Los animales empleados en la experimentación fueron hembras adultas de 17-20 g al inicio de los ensayos.

C. MEDIOS DE CULTIVO

Medio TYM

El medio de cultivo TYM (Trypticase-Yeast-Maltose) es el más comúnmente empleado para el mantenimiento *in vitro* del parásito. *T. vaginalis* no tiene capacidad metabólica para la síntesis *de novo* de numerosas macromoléculas y algunos ácidos grasos y esteroides. Dichos componentes los adquiere de las secreciones vaginales mediante la fagocitosis de células del hospedador y bacterias de la microflora endógena. Para el mantenimiento *in vitro* del parásito es necesario un medio de cultivo que contenga una fuente de hidratos de carbono, lípidos, aminoácidos y trazas de metales (Petrin *et al.*, 1998).

Composición:

Caldo soja tripticaseína (Pronadisa)	20 g
Extracto de levadura (Pronadisa)	10 g
Maltosa (Panreac)	5 g
L (-) cisteína (Fluka)	1 g
Ácido L (+)-ascórbico (Probus)	0,2 g
H ₂ O destilada c.s.p.	1000 mL

Preparación:

- 1.- Los componentes se disuelven en agua destilada en un vaso de precipitados en las cantidades indicadas.
- 2.- A continuación se añade un 10% de suero bovino fetal estéril (Gibco®) inactivado previamente en baño de agua a 56 °C durante 30 minutos, fraccionado en tubos estériles de 50 mL y conservado a -20 °C hasta su empleo.
- 3.- Posteriormente se añade penicilina G (1000 U.I./mL) y estreptomina (2 mg/mL) al medio con el fin de prevenir posibles contaminaciones bacterianas. En los procesos de axenización de aislados frescos se han adicionado 500 µg/mL de gentamicina (Sigma-Aldrich) al cultivo, hasta un máximo de 3 veces.
- 4.- Se ajusta el pH a 6,4 utilizando HCl 5N.
- 5.- El medio se esteriliza por filtración (0,22 µm) en sistemas Stericup-Steritop (Millipore).
- 6.- Se conserva en nevera a 4 °C hasta su uso.

Medio RPMI

El medio empleado para el cultivo de la línea de macrófagos fue el medio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) suplementado con un 10% de suero bovino fetal inactivado.

Composición:

RPMI 1640 (Sigma-Aldrich)	4,16 g
HEPES (Sigma-Aldrich)	2 g
NaHCO ₃ (Panreac)	0,6 g
SBF inactivado	50 mL
Penicilina (Penilevel)	25 mg
Estreptomicina (Reig Jofré)	50 mg
H ₂ O destilada c.s.p.	500 mL

Preparación:

- 1.- Los componentes se disuelven en agua destilada en un vaso de precipitados en las cantidades indicadas.
- 2.- Se ajusta el pH a 7,2.
- 3.- El medio se esteriliza mediante filtración en membrana de 0,22 µm.
- 4.- Se conserva en refrigeración (4 °C) y en oscuridad.

D. SOLUCIONES, COLORANTES Y REACTIVOS

D.1. Soluciones y reactivos generales

Los reactivos, soluciones y colorantes generales más comunes en el mantenimiento de las cepas del parásito y de las líneas celulares son:

P.B.S. (Phosphate Buffered Saline) 10X

NaCl	8 g
HK ₂ PO ₄	1,21 g
H ₂ KPO ₄	0,34 g
H ₂ O	1000 mL

Azul Tripán (colorante vital)

Azul Tripán 0,4%	1 mL
P.B.S. 1X	9 mL

Giemsa

Giemsa (Merck)	1 mL
H ₂ O destilada	9 mL

Solución EDTA/Tripsina

EDTA	30 mg
Tripsina	50 mg
P.B.S. 1X	100 mL

Ajustar la solución a un pH = 7,2 y esterilizar mediante filtración. La solución se fracciona en volúmenes de 10 mL y se conserva a -20 °C hasta su uso.

D.2. Soluciones específicas empleadas en los estudios de cribado farmacológicoSolución de resazurina

La resazurina es el componente principal del colorante comercial Alamar Blue®. Se trata de un colorante azul con una estructura química de tipo oxacina capaz de reducirse produciéndose la pérdida de un átomo de oxígeno unido al nitrógeno del núcleo de fenoxacina. Esta modificación irreversible, da lugar a un intermediario fluorescente de color rosa denominado resorufina de color rosa que puede continuar reduciéndose de forma reversible a dihidroresorufina, de color rosa palo y no fluorescente (**Figura 26**).

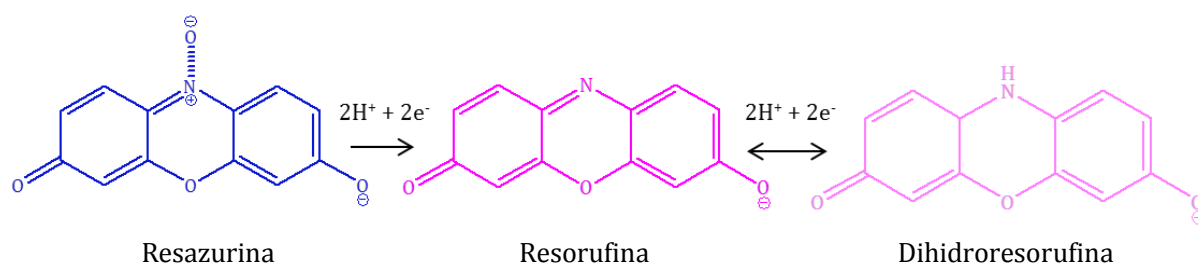


Figura 26: Metabolismo de la resazurina. El colorante redox, inicialmente azul y no fluorescente se reduce rápidamente a resorufina (rosa y fluorescente). Si la reducción continúa puede convertirse en dihidroresorufina (rosa palo y sin fluorescencia).

Este colorante ha sido ampliamente utilizado para estudios de viabilidad y citotoxicidad en numerosos modelos celulares (O'Brien *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2001; Hamid *et al.*, 2004; Carneiro Borra *et al.*, 2009), microbiológicos (Palomino *et al.*, 2002; Sarker *et al.*, 2007), virales (Casrouge *et al.*, 2006; Mo *et al.*, 2008) y parasitológicos (Campos Aldrete *et al.*, 2004; Bénéré *et al.*, 2007; Duarte *et al.*, 2009; Bilbao-Ramos *et al.*, 2012; Natto *et al.*, 2012). La célula viable es capaz, a través de reductasas, de generar el intermediario rosado, pudiéndose cuantificar el producto enzimático final (resorufina) espectrofotométricamente y también por métodos fluorimétricos, correlacionándose la concentración de resorufina producida con la viabilidad de las células del ensayo.

La estandarización del nuevo método de cribado *in vitro* frente a *Trichomonas vaginalis*, se llevó a cabo empleando la resazurina como colorante redox con el fin de sustituir el recuento hemocitométrico como método clásico de cribado.

El peso molecular de la resazurina es 251,18 g/mol. Las soluciones de este colorante redox se preparan en P.B.S. 1X a una concentración stock de 3 mM para los ensayos de cribado *in vitro* frente al parásito y a 1 mM para los ensayos de citotoxicidad inespecífica en líneas celulares de mamífero.

Preparación:

Resazurina (1 mM)	1,26 mg
P.B.S. 1X	5 mL

El colorante disuelto debe esterilizarse mediante filtración. La solución debe prepararse inmediatamente antes de su empleo (extemporáneamente) y mantenerse protegido de la luz.

Solución anestésica

Uretano	15 g
Solución salina (NaCl 0,9%)	100 mL

D.3. Soluciones específicas empleadas en los estudios de caracterización biológica

Ensayos de citoadherencia

Solución fijadora de glutaraldehído al 3%

Glutaraldehído	3 mL
P.B.S. 1X c.s.p.	100 mL

Conservar a 4 °C hasta su uso.

Solución bloqueante de glicerol (500 mM)

Glicerol (P.M.=75 g/mol)	3,75 g
P.B.S. 1X c.s.p.	100 mL

Esterilizar en autoclave y conservar a 4 °C y protegido de la luz hasta su uso.

Ensayos de citotoxicidad

Solución fijadora de formaldehído al 2%

Formaldehído (37-38% pureza)	5 mL
P.B.S. 1X c.s.p.	100 mL

Conservar a temperatura ambiente.

Cristal violeta 0,13%

Cristal violeta	0,091 g
Etanol	50 mL
Formaldehído (37-38% pureza)	50 mL

Conservar a temperatura ambiente.

Solubilizador SDS 1%

SDS	1 g
Etanol	50 mL
H ₂ O destilada	50 mL

Conservar a temperatura ambiente.

Ensayos de inmunofluorescencia (IF) para la detección de TVVSolución para desengrasar portaobjetos

Acetona	20 mL
Etanol	20 mL

Los portaobjetos que se van a emplear en los ensayos de IF deben sumergirse durante un mínimo de 24 h en un frasco Couplin con la solución de acetona:etanol (1:1). Guardar en papel de aluminio hasta su uso.

Los cubreobjetos deberán sumergirse en etanol absoluto al menos 15 minutos antes de uso.

Solución fijadora de formaldehído al 2%

Formaldehído (37-38% pureza)	1,35 mL
Etanol	23,65 mL

Esterilizar por filtración y conservar a temperatura ambiente.

Solución bloqueante

Albúmina sérica bovina (BSA)	1 g
P.B.S. 1X	50 mL

Conservar a 4 °C.

Solución de lavado P.B.S.-Tween 80 1%

Tween 80	1 mL
P.B.S. 1X (pH 7,4)	99 mL

Conservar a temperatura ambiente.

Tampón (Buffer) de azida sódica 0,09% para la dilución de los anticuerpos (Ac)

Azida sódica	18 mg
H ₂ O destilada	20 mL

Esterilizar por filtración y conservar a 4 °C.

Anticuerpo monoclonal primario C20A3 anti-P270 (1:100)

Ac monoclonal C20A3 (IgG _{2a})	1 µL
Tampón de azida sódica 0,09%	99 µL

Conservar a -20 °C. Este Ac monoclonal ha sido cedido gentilmente por el Prof. J.F. Alderete para la realización de estos ensayos.

Azul de Evans

Azul de Evans stock (10 mg/mL)	0,5 mL
P.B.S. -Tween 80	4,5 mL

Preparar antes de usar. Conservar a 4 °C.

Ensayos de microscopía para la identificación de CD59 en la superficie de *T. vaginalis*

Anticuerpo monoclonal primario MEM-43/5 anti-CD59 (1:200)

Ac monoclonal anti-CD59 (Thermo)	0,5 µL
Tampón de azida sódica 0,09%	99,5 µL

Preparar antes de usar. Conservar a -20 °C. El Ac anti-CD59 es un IgG2b de ratón que reacciona frente a CD59 humano y murino (número de catálogo MA1-19135, Thermo Scientific).

Anticuerpo monoclonal primario 12G4 anti-AP65 (1:200)

Ac monoclonal 12G4 (IgG _{2a})	0,5 µL
Tampón de azida sódica 0,09%	99,5 µL

Conservar a -20 °C. Este Ac monoclonal ha sido cedido gentilmente por el Prof. J.F. Alderete para la realización de estos ensayos.

Anticuerpo secundario anti-ratón IgG FITC (1:200)

Ac secundario IgG FITC MA1-19135 (Thermo)	0,5 µL
Tampón de azida sódica 0,09%	99 µL

Conservar a 4 °C y protegido de la luz.

Anticuerpo secundario anti-ratón IgG Alexa (1:1000)

Ac secundario antiIgG-Alexa (Sigma)	0,5 µL
Tampón de azida sódica 0,09%	995 µL

Conservar a 4 °C y protegido de la luz. El anticuerpo secundario está producido en cabra y reacciona frente a IgG de ratón y fue cedido por el Centro de Microscopía Confocal de la UAH para la elaboración de estos estudios.

D.4. Soluciones y reactivos específicos empleados en los estudios molecularesTampón de Extracción de ADN

TRIS	20,0 g
EDTA	10,0 g
NaCl	5,0 g
SDS	1,0 g
HCl (pureza 38%)	0,2 mL
H ₂ O destilada	c.s.p. 1000 mL

Ajustar a pH = 7,4 y conservar a 4 °C hasta su uso.

Solución de precipitación de acetato de sodio 3M

Acetato de sodio	12,305 g
H ₂ O destilada	50 mL

Filtrar y guardar a 4 °C hasta su uso.

TAE (Tris-Acetato-EDTA)

50X: Tris base	242 g
Ácido acético glacial	57,1 mL
EDTA 0,5M (pH 8)	100 mL
H ₂ O destilada c.s.p.	1000 mL
1X: TAE 50X	20 mL
H ₂ O c.p.s.	1000 mL

Tampón de muestra

Azul de bromofenol	0,025 g
Sacarosa	2,5 g
Glicerol	3 mL
H ₂ O destilada c.s.p.	10 mL

Gel de agarosa 1,5%

Agarosa	0,75 g
TAE 1X c.s.p.	50 mL

Solución de bromuro de etidio (0,5 µg/mL)

Bromuro de etidio (10 mg/mL)	50 µL
TAE 1X c.s.p.	1000 mL

E. PROGRAMAS INFORMÁTICOS Y ESTADÍSTICOS

Para el diseño de los modelos *in silico* presentados en esta Tesis Doctoral se emplearon los siguientes programas informáticos:

E.1. ChemDraw v.8. (CambridgeSoft Corporation)

Herramienta perteneciente al paquete ChemOffice, utilizada para dibujar todas las estructuras químicas presentadas en esta Tesis Doctoral, así como la BD a partir de la cual se crearon los modelos *in silico*. Este programa también permite la conversión de la estructura química al formato SMILES para su posterior análisis en otros softwares *on line* como Molinspiration u OSIRIS.

E.2. TOMOCOMD-CARDD®

Se trata de un programa interactivo para el diseño molecular y la investigación en química médica. El programa TOMOCOMD (TOPological MOlecular COMputer Design) está formado por 4 subprogramas, cada uno de los cuales permite el dibujo de las estructuras químicas y el cálculo molecular en 2D y 3D de los descriptores moleculares (DM). En esta Tesis Doctoral, el subprograma que se empleó fue el CARDD (Computer-Aided Rational Drug Design) a partir del cual se calcularon los modelos de índice lineal. El programa calcula a través de álgebra lineal los descriptores moleculares topológicos (2D) (Marrero-Ponce *et al.*, 2004; Marrero-Ponce *et al.*, 2012).

E.3. STATISTICA v.10. (StatSoft Inc, Tulsa, OK, EEUU)

Es el programa estadístico con el cual se calcularon las funciones discriminantes mediante la función de Análisis Discriminante Lineal (ADL) en la creación de los modelos QSAR. A través de este programa los cálculos de las propiedades fisicoquímicas realizadas por el software TOMOCOMD-CARDD® pudieron ser evaluadas estadísticamente.

E.4. DSDE

Software diseñado por Meneses Gómez y Cedré Gutiérrez en 2013 en la Facultad de Matemáticas-Física y Computación de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (Cuba). Permite la combinación de modelos QSAR para el ensamblaje de los mismos como implementación al software TOMOCOMD-CARDD®.

E.5. Molinspiration (<http://www.molinspiration.com>)

Esta aplicación informática es una herramienta que permite el cálculo de propiedades moleculares a través de la estructura química del compuesto objeto de estudio. La biodisponibilidad oral y permeabilidad a través de la barrera intestinal y hematoencefálica de los compuestos de síntesis con mayor actividad tricomonocida se estudiaron por medio del cálculo computacional de distintos parámetros farmacocinéticos.

Las propiedades calculadas mediante este programa fueron las definidas en la RO5 de Lipinski (Lipinski *et al.*, 2001), junto con la determinación de la superficie polar molecular (PSA) y el número de enlaces rotacionales. La estimación del porcentaje de absorción (% Abs.) se realizó siguiendo el criterio descrito por Zhao *et al.* (2002). El trabajo publicado por este equipo muestra distintas ecuaciones matemáticas para el cálculo del % Abs.

empleando propiedades farmacocinéticas como CLogP, TPSA, Ha, Hd, polarizabilidad o volumen de McGowan. La determinación empírica del % Abs. de las moléculas que mostraron mejor actividad *in vitro* se llevó a cabo a cabo según la ecuación basada en la RO5 de Lipinski:

$$\% \text{ Abs} = 90 - 3,34 \text{ Ha} - 5,56 \text{ Hd} + 0,0716 \text{ PM}$$

E.6. OSIRIS Property Explorer (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo>)

Este software permite predecir distintas propiedades toxicológicas como el potencial mutagénico, tumorigénico, irritante o efectos nocivos sobre la reproducción. Este programa también permite el cálculo del “*drug score*”. Esta propiedad tiene en cuenta la combinación del resto de propiedades toxicológicas y fisicoquímicas anteriormente citadas y en función de ellas define si una molécula es una buena candidata para poder ser un medicamento. A partir de todos estos parámetros, realiza una comparación con las propiedades de medicamentos comercializados. Cuanto mayor sea el valor numérico calculado por el programa, mayor será su parecido a fármacos que se encuentran en el mercado.

E.7. SPSS v.20 (IBM)

Mediante este programa estadístico se calcula la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) y la citotoxicidad celular 50 (CC₅₀) empleando el análisis Probit. Este análisis estadístico también permite conocer los límites de confianza.

En cuanto a los ensayos *in vivo*, es necesario realizar un estudio estadístico de los resultados de cada lote de ratones para corroborar la ausencia o existencia de actividad significativa tras el tratamiento al ratón. La comparación de los índices de patogenicidad entre grupos tratados y no tratados se determina a través de las pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis y de Wilcoxon cuando el número de grupos a comparar es mayor de dos. La hipótesis nula (H₀) defiende que las poblaciones se distribuyen de forma igual. En el caso de que se comparen dos grupos de muestras independientes el análisis escogido es la U de Mann-Whitney.

E.8. ChromasPro v.1.7.5. (Technelysium Pty Ltd, Australia)

Se trata de una aplicación de Windows que permite la lectura de los cromatogramas de ADN y su edición manual en caso de que fuera necesario. Todas las secuencias genómicas enviadas por el Servicio de Genómica del Parque Científico de Madrid (Campus de Excelencia Internacional Campus Moncloa) fueron previamente revisadas a través de este programa.

E.9. MegAlign

Programa perteneciente al paquete bioinformático Lasergene y empleado en los alineamientos de las secuencias genómicas estudiadas en esta Tesis Doctoral. Los estudios y comparaciones de secuencias se han realizado tras el alineamiento mediante ClustalW.

E.10. Peak Scanner Software v.1.0

Programa bioinformático cedido por la Unidad de Genómica del Parque Científico del CEI Campus Moncloa para el análisis de los fragmentos de MS. El programa es capaz de detectar la intensidad de fluorescencia de distintos fluorocromos. En función del cromóforo empleado, en nuestro caso HEX o FAM, se estudia el resultado obtenido y con ello se puede conocer el tamaño de nucleótidos del amplicón.

F. PRODUCTOS ENSAYADOS

F.1. Compuestos de referencia

El metronidazol (**MTZ**) se empleó en los ensayos farmacológicos *in vitro* como fármaco de referencia (control positivo) a la dosis de 25 μ M y 1,5 mM para los ensayos *in vitro* en aislados sensible (JH31A4) y resistente (IR78), respectivamente. Ambas concentraciones producen una actividad tricomonocida del 100% en los respectivos aislados.

Para la puesta a punto del método de cribado se ensayaron dos fármacos con estructura 5-nitroimidazol (**MTZ** y **secnidazol**), el antimicótico **clotrimazol** [1-[(2-clorofenil)difenilmetil]imidazol], el compuesto de síntesis **G-1** (**Figura 27**) (Meneses-Marcel *et al.*, 2008) y siete derivados de síntesis con estructura de 3-alcoxi-5-nitroimidazol y 5-nitroindazolinona pertenecientes a la serie VATR (Apartado F.3., **figura 29 serie IA y tabla 14 serie IIIA**).

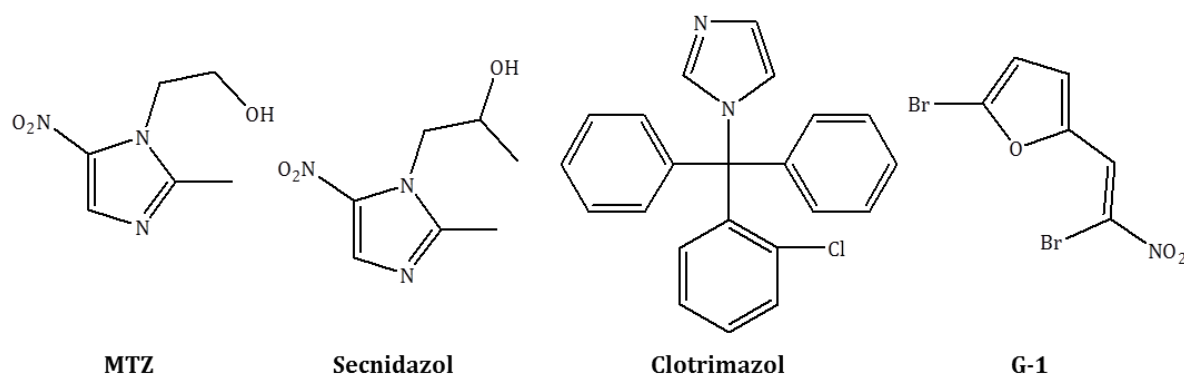


Figura 27: Estructuras químicas de los compuestos químicos ensayados durante la puesta a punto del método de cribado fluorimétrico frente a *T. vaginalis*.

En los ensayos de caracterización biológica, se determinó la sensibilidad de los aislados a distintas concentraciones de los dos únicos fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de la tricomonosis: el **MTZ** (**Figura 27**) y el **tinidazol** (**TDZ**) (**Figura 8**).

F.2. Productos naturales

Fracciones de *Artemisia absinthium*

La búsqueda de compuestos con potencial actividad tricomonocida no se centró únicamente en estructuras químicas de síntesis. También se estudió la actividad tricomonocida del aceite esencial de un cultivo controlado de *Artemisia absinthium* variedad Candial® procedente de Ejea de los Caballeros (Zaragoza, España) en 2008.

El extracto bruto se obtuvo a partir del destilado mediante presión de vapor de las partes aéreas de la planta. El fraccionamiento del aceite esencial mediante cromatografía en columna empleando como eluyente hexano:diclorometano se llevó a cabo por el equipo de la Dra. González Coloma del Instituto de Ciencias Agrarias del CSIC. Se obtuvieron nueve fracciones que se analizaron mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) siguiendo las indicaciones descritas por Martínez-Díaz *et al.* (2015). La composición del aceite esencial (ICA11) y de las nueve fracciones se muestra a continuación:

Tabla 12: Composición del aceite esencial y de las nueve fracciones del cultivo de *Artemisia absinthium* tras el análisis espectrográfico mediante GC-MS.

Compuesto	ICA11	Fracciones								
		F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8	F9
Linalol	2,0	-	-	-	-	-	-	-	17,3	-
<i>cis</i> -Epoxicimeno	39,8	-	-	-	13,5	63,9	86,6	5,6	-	-
Alcanfor	4,5	-	-	-	-	1,4	7,2	27,0	-	-
<i>cis</i> -Crisantenol	11,9	-	-	-	-	-	-	60,8	63,0	0,7
Butirato de (<i>E</i>)-3-hexenilo	1,1	-	-	-	-	-	-	1,7	12,4	-
Acetato de crisantenilo	5,3	-	-	1,0	35,7	22,1	0,9	-	-	-
(5 <i>Z</i>)-2,6-Dimetilocta-5,7-dien-2,3-diol	2,0	-	-	-	-	-	-	-	-	67,8
<i>trans</i> -Cariofileno	3,8	29,5	-	-	-	-	-	-	-	-
Germacreno-D	2,3	15,5	-	-	-	-	-	-	-	-
β -Selineno	1,1	8,8	-	-	-	-	-	-	-	-
3,6-Dihidrocamazuleno	5,8	2,5	42,5	7,9	-	-	-	-	-	-
Camazuleno	2,6	1,1	41,4	81,7	-	-	-	-	-	-

3,3'-Diindolilmetano (DIM)

El 3,3'-diindolilmetano (**Figura 28**) es un dímero presente en plantas de la familia *Cruciferae*. Esta molécula se genera durante la digestión en un medio ácido de estas plantas que contienen el precursor indol-3-carbinol (I3C). El compuesto ha sido cedido por el Dr. Michael Zelings, responsable del laboratorio BioResponse con el objetivo de estudiar su actividad tricomonocida y realizar estudios de sinergia en combinación con MTZ.

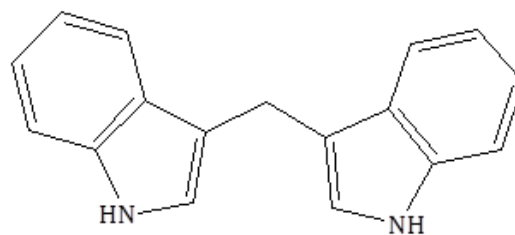


Figura 28: Estructura química del nutracéutico DIM.

F.3. Productos de síntesis

Serie VATR

La serie VATR está compuesta por 145 moléculas sintetizadas a partir de los cabezas de serie **VA5-13l** y **VA5-13h** con estructura general de tipo 5-nitroindazol y **VATR 33**, caracterizado por la ausencia del grupo nitro. Las estructuras químicas fueron sintetizadas por el equipo del Dr. Vicente J. Arán en el Instituto de Química Médica del CSIC. La serie completa está compuesta por cinco grupos en relación a su estructura química:

Serie I:

La primera serie de compuestos (**VATR 1-VATR 39**) se ha dividido a su vez en otros tres sub-grupos. La serie IA está formada por 19 compuestos con estructuras de 5-nitroindazolin-3-ona disustituidas en posiciones 1, 2, y las series IB y IC formadas por 5 y 15 moléculas con estructuras de 3-alcoxi-5-nitroindazol sustituido en posiciones 1 y 2, respectivamente (**Figura 29, Tabla 13**).

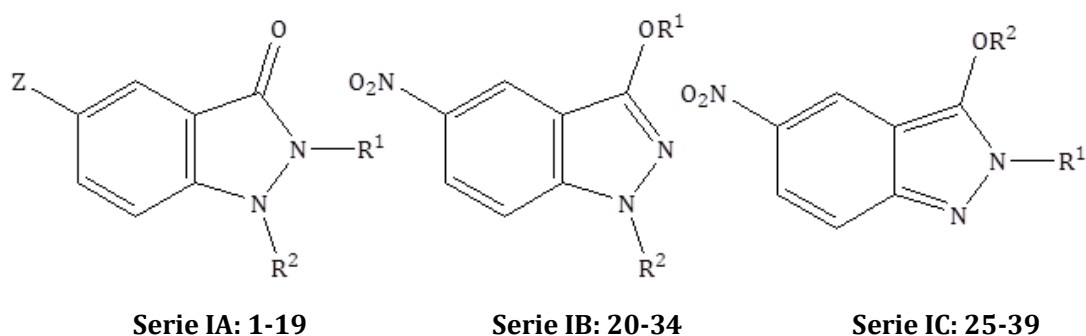


Figura 29: Estructura general de las series IA, IB y IC de la familia VATR.

Tabla 13: Estructura química de las 39 moléculas pertenecientes al primer grupo de 5-nitroindazoles ensayados frente a *T. vaginalis*.

Serie IA	Serie IB	Serie IC	Z	R ¹	R ²
1	20	25	NO ₂	Me	Me
2	-	26	NO ₂	Me	Pr
3	-	27	NO ₂	Me	iPr
4	21	-	NO ₂	Me	Ph
5	-	28	NO ₂	Me	Bn
6	-	29	NO ₂	Ph	Me
7	-	-	NO ₂	Ph	Pr
8	-	30	NO ₂	Ph	iPr
9	22	31	NO ₂	Bn	Me
10	-	-	H	Bn	Me
11	-	32	NO ₂	Bn	Pr
12	-	33	NO ₂	Bn	iPr
13	-	34	NO ₂	Bn	Bu
14	-	35	NO ₂	Bn	Pn

15	-	36	NO ₂	Bn	Bn
16	23	-	NO ₂	Phe	Me
17	24	37	NO ₂	Nm	Me
18	-	38	NO ₂	Nm	Pr
19	-	39	NO ₂	Nm	iPr

Me: metilo; Pr: propilo; iPr: isopropilo; Ph: fenilo; Bn: bencilo; Pn: pentilo; Nm: 2-naftilmetilo; Phe: fenetilo.

Serie II:

Este segundo grupo de la familia química VATR se compone de un total de 40 moléculas con estructura de 5-nitroindazol-3-ona, derivadas a partir de la molécula **VATR 9** perteneciente a la serie IA. Tan sólo existe una excepción: la molécula **79**, 3-propoxi derivado obtenido durante el proceso de síntesis del **VATR 74**. La **tabla 14** muestra como todas los compuestos presentan radicales distintos en posiciones *orto*, *meta* o *para* del grupo bencilo localizado en la posición 2 (**Figura 30**).

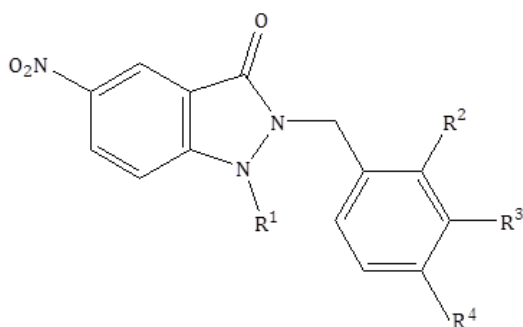


Figura 30: Estructura química de los derivados de 5-nitroindazol-3-ona con sustituyentes en el grupo 2-bencilo y pertenecientes a la serie II de la familia VATR. La serie IIA se caracteriza por presentar un sustituyente metilo en posición 1 mientras que la serie IIB presenta otros radicales alifáticos (R¹).

Es importante indicar que los compuestos **65**, **68**, **69**, **64**, **74** y **79** presentan radicales distintos a los de la estructura general de este grupo con los siguientes grupos en posición 2: fenacilo, ciclohexilmetilo, 1-feniletilo y picolilo (PI). Asimismo y en base a su estructura química, este segundo grupo químico también ha sido dividido en tres series en base al radical presente en posición 1.

La serie IIA está formada por 30 moléculas con estructura de 1-metil-5-nitroindazol-3-ona (**VATR 40-VATR 69**), mientras que la serie IIB está formado por 5 estructuras con un radical propilo en posición 1 (**VATR 70-VATR 74**) y la última serie IIC por 4 entidades con un grupo isopropilo en la mencionada posición (**VATR 75-VATR 78**).

Durante el periodo de evaluación de la serie IIA y mientras se realizaba la síntesis de las series IIB y IIC se realizaron distintos cambios en el proceso de cribado *in vitro* con el fin de mejorar la metodología llevada a cabo hasta el momento. La serie IIA fue ensayada a 100, 10 y 1 µg/mL, mientras que el resto de compuestos evaluados tras esta serie pasaron a ser ensayados a 6 concentraciones que van desde 300 µM hasta 1,6 µM.

Tabla 14: Estructura química de las 40 estructuras pertenecientes al segundo grupo de 5-nitroindazoles ensayados frente a *T. vaginalis*.

Serie IIA	Serie IIB	Serie IIC	R ¹ [▲]	R ²	R ³	R ⁴
40	70	75	Me/Pr/iPr	F	H	H
41	-	-	Me	H	F	H
42	-	-	Me	H	H	F
43	-	-	Me	Cl	H	H
44	-	-	Me	H	Cl	H
45	-	-	Me	H	H	Cl
46	71	76	Me/Pr/iPr	Br	H	H
47	-	-	Me	H	Br	H
48	-	-	Me	H	H	Br
49	-	-	Me	OCH ₃	H	H
50	-	-	Me	H	OCH ₃	H
51	-	-	Me	H	H	OCH ₃
52	-	-	Me	NO ₂	H	H
53	-	-	Me	H	NO ₂	H
54	-	-	Me	H	H	NO ₂
55	72	77	Me/Pr/iPr	CN	H	H
56	-	-	Me	H	CN	H
57	-	-	Me	H	H	CN
58	-	-	Me	CF ₃	H	H
59	-	-	Me	H	CF ₃	H
60	-	-	Me	H	H	CF ₃
61	73	78	Me/Pr/iPr	Me	H	H
62	-	-	Me	H	Me	H
63	-	-	Me	H	H	Me
64	74	-	Me/Pr	Pl	H	H
65*	-	-	Me	-	-	-
66	-	-	Me	H	CO ₂ CH ₃	H
67	-	-	Me	H	H	CO ₂ CH ₃
68**	-	-	Me	H	H	H
69***	-	-	Me	H	H	H
-	79 [♦]	-	-	Pl	H	H

[▲] Todas las estructuras de la serie IIA presentan como R¹ un grupo metilo, las pertenecientes a la serie IIB un grupo propilo y las de la serie IIC un grupo isopropilo.

[♦] La estructura VATR 79 difiere del resto de estructuras de la serie IIB y IIC en que en posición 3 presenta un radical propoxilo. Es el segundo producto de reacción obtenido durante la síntesis del VATR 74.

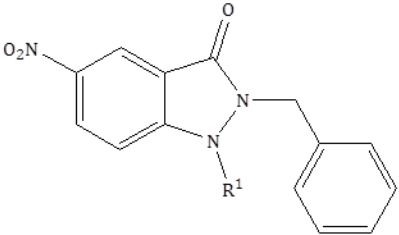
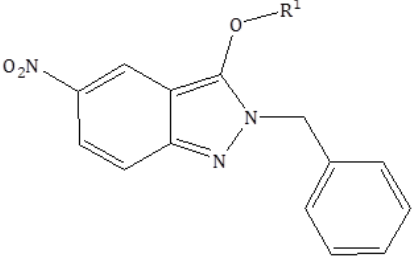
Las moléculas señaladas con uno, dos y tres asteriscos presentan en posición 2 los siguientes radicales: fenacilo, ciclohexilmetilo y 1-feniletilo respectivamente. Pl: Picolilo.

Serie III:

La serie IIIA está formada por estructuras derivadas de **VATR 9** con sustituyentes en posición 1 (**Tabla 15.A**). A la serie IIIB pertenecen los derivados generados durante el proceso de síntesis, caracterizados por poseer grupos alcoxi en posición 3 (**Tabla 15.B**). También forman parte de esta serie los compuestos (**VATR 104-VATR 124**) cuya estructura no se puede indicar por motivos de confidencialidad:

- Las 1-(aminoalquil)-5-nitroindazolinonas **106-113** y las moléculas **104** y **105**, ftalimido derivados precursores de algunas de las indazolinonas mencionadas.
- Los 3-(aminoalcoxi)-5-nitroindazoles **123** y **124** y los ftalimido derivados **121** y **122**.

Tabla 15: Estructura química general de las moléculas que integran las series IIIA (A) y IIIB (B) de la familia VATR.

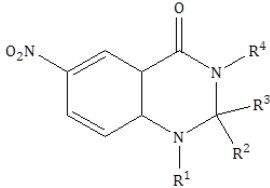
Serie IIIA	Serie IIIB	R ¹	Estructura química
80	-	CH=CH ₂	 <p style="text-align: center;">A</p>
81	-	CH ₂ CH=CH ₂	
82	-	CH ₂ C≡CH	
83	-	(CH ₂) ₂ COOH	
84	-	(CH ₂) ₃ COOH	
85	-	CH ₂ COOCH ₃	
86	114	(CH ₂) ₂ COOCH ₃	
87	115	(CH ₂) ₃ COOCH ₂ CH ₃	
88	-	(CH ₂) ₃ CONH ₂	
89	-	(CH ₂) ₃ CONHCH ₃	
90	-	(CH ₂) ₃ CON(CH ₃) ₂	
91	-	CH ₂ CN	 <p style="text-align: center;">B</p>
92	116	(CH ₂) ₂ Br	
93	117	(CH ₂) ₃ Br	
94	118	(CH ₂) ₂ OH	
95	119	(CH ₂) ₃ OH	
96	120	(CH ₂) ₂ OCH ₃	
97	-	(CH ₂) ₃ OCH ₂ CH ₃	
98	-	(CH ₂) ₂ OCOCH ₃	
99	-	COOEt	
100	-	COOBn	
101	-	COCH ₃	
102	-	COPh	
103	-	4-CH ₃ PhSO ₂	

Bn: bencilo; Ph: fenilo; Pir: pirrolidino; Pip: piperidino

Serie IV:

A esta cuarta serie pertenecen aquellos compuestos derivados de los procesos de síntesis de las moléculas anteriormente presentadas en las series I a III y que no muestran la estructura general citada al tratarse de derivados minoritarios de síntesis. El grupo de estructuras de la **125** a la **129** son oxoquinazolinonas generadas durante la síntesis de las estructuras de la serie II. Durante este proceso, los grupos CH_2 ácidos de los restos N_1 -acetato o N_2 -picolilo atacan al otro nitrógeno del anillo causando la expansión del anillo de indazolinona al de quinazolinona. En el caso de la serie IVB formada por las moléculas **130** a **134**, no se pueden mostrar por estar en proceso de patente. Su estructura general corresponde a 3-(hidroxialquil)amino-5-nitroindazoles, procedentes de la transposición intramolecular de 3-(aminoalcoxi)-5-nitroindazoles del tipo **123** y **124**.

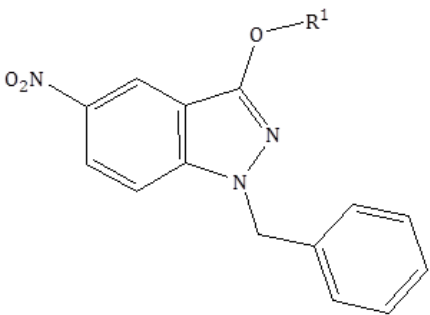
Tabla 16: Estructura general de los compuestos de la serie IVA con estructura de 6-nitro-4-oxoquinazolina.

SERIE	COMPUESTO	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	Estructura
IVA	125	H	$\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	H	Bn	
	126	H	CONH_2	H	Bn	
	127	Pr	2-piridilo	H	H	
	128	$\text{CH}_2\text{COOCH}_3$	COOCH_3	H	Bn	
	129	CH_2CONH_2	CONH_2	H	Bn	

Serie V:

Este último grupo de estructuras derivados del indazol se ha sintetizado a partir del 1-bencil-5-nitroindazol-3-ol. Los dos primeros compuestos de la serie presentan radicales 3-(ω -bromuroalcoxilo), mientras que el resto de estructuras de esta última serie son 3-(ω -aminoalcoxi)indazoles o precursores sintéticos.

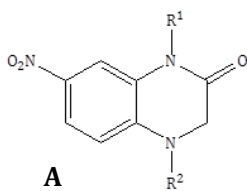
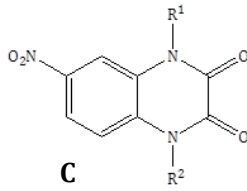
Tabla 17: Estructura química de los 3-alcoxi-1-bencil-5-nitroindazoles pertenecientes a la serie V.

COMPUESTO	R ¹	Estructura
135	$(\text{CH}_2)_2\text{Br}$	
136	$(\text{CH}_2)_5\text{Br}$	
137	$(\text{CH}_2)_2\text{NH}_2$	
138	$(\text{CH}_2)_2\text{NHCH}_3$	
139	$(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	
140	$(\text{CH}_2)_2\text{Pip}$	
141	$(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$	
142	$(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$	
143	$(\text{CH}_2)_3\text{Pip}$	
144	$(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$	
145	$(\text{CH}_2)_5\text{NHCH}_3$	
146	$(\text{CH}_2)_5\text{Pip}$	
147	$(\text{CH}_2)_2\text{ftalimido}$	
148	$(\text{CH}_2)_3\text{ftalimido}$	

Serie FR

Durante el transcurso de esta Tesis se ha analizado la posible actividad antiparasitaria de otras familias químicas. Dos series formadas por 10 moléculas con estructura de 7-nitroquinoxalin-2-ona y otras 10 entidades moleculares con estructura de 6-nitroquinoxalin-2,3-diona con diversos sustituyentes en posiciones 1 y 1,4 se sintetizaron en el Instituto de Química Médica del CSIC por el Dr. Vicente J. Arán y el Dr. Felipe Reviriego para su ensayo en el modelo de cribado *in vitro* estandarizado (**Tabla 18**).

Tabla 18: Estructura química de las dos series de nitroquinoxalinas ensayadas frente a *T. vaginalis*. : **A)** Estructura general de las 7-nitroquinoxalin-2-onas 1,4 disustituidas (**FR 6-FR 16**). **B)** el derivado 8-nitrooxacino[3,2-*a*]quinoxalin-5-ona (**FR 17**), formado por ciclación de FR 10. **C)** Estructura química general de la serie de las 6-nitroquinoxalin-2,3-dionas 1,4 disustituidas (**FR 26-FR 35**).

COMPUESTO	Serie	R ¹	R ²	Estructura
FR 6	7-nitroquinoxalin-2-onas 1,4-sustituidas	H	[CH ₂] ₂ NMe ₂	 A
FR 7		H	[CH ₂] ₃ NEt ₂	
FR 8		H	[CH ₂] ₂ Pip	
FR 9		H	[CH ₂] ₃ Pip	
FR 10		H	[CH ₂] ₃ OH	
FR 12		Me	[CH ₂] ₂ NMe ₂	
FR 13		Me	[CH ₂] ₃ NEt ₂	
FR 14		Me	[CH ₂] ₂ Pip	
FR 15		Me	[CH ₂] ₃ Pip	
FR 16		Me	[CH ₂] ₃ OH	
B FR 17	*	H	1,3-oxacina	B
FR 26	6-nitroquinoxalin-2,3-dionas 1,4-sustituidas	H	Me	 C
FR 27		H	[CH ₂] ₄ Cl	
FR 28		H	[CH ₂] ₅ Cl	
FR 29		H	[CH ₂] ₅ Br	
FR 30		H	[CH ₂] ₆ Br	
FR 31		Me	Me	
FR 32		Me	[CH ₂] ₄ Cl	
FR 33		Me	[CH ₂] ₅ Cl	
FR 34		Me	[CH ₂] ₅ Br	
FR 35		Me	[CH ₂] ₆ Br	

Me: metilo; Et: etilo; Pip: piperidino.

*8-nitrooxacino[2,3-*a*]quinoxalin-5-ona

MÉTODOS

A. MANTENIMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LOS AISLADOS Y LAS LÍNEAS CELULARES

T. vaginalis puede mantenerse en cultivos *in vitro* por pases sucesivos cada 24-48 h en tubos de vidrio con 5 mL de medio de cultivo y mantenidos en estufa a 37 °C y 5% de CO₂. La viabilidad del parásito se comprueba mediante su observación directa al microscopio.

Los cultivos de las líneas celulares empleadas en esta Tesis Doctoral se mantienen mediante pases sucesivos en frascos de cultivo celular de 75 cm² (Nunc) a 37 °C y 5% CO₂. El medio de cultivo empleado para las distintas líneas celulares es RPMI-1640 suplementado con un 10% de SBF y antibióticos. Las células en crecimiento consumen los nutrientes del medio siendo necesario sustituir cada 3-4 días el medio consumido por RPMI fresco. El pase de células se lleva a cabo retirando el medio del frasco de cultivo y lavando las células con P.B.S. estéril para eliminar posibles restos de suero que puedan inhibir la acción de la tripsina. A continuación, se añade 10 mL de solución EDTA-tripsina con el fin de despegar las células del frasco de cultivo. El EDTA actúa como quelante de los iones Ca²⁺ mientras que la tripsina rompe las uniones intracelulares. Tras mantener en estufa durante unos minutos la solución en contacto con las células, se recoge la solución en la que se encontrarán las células despegadas y se centrifugan a 1100g durante 5 minutos. Se retira el sobrenadante y el precipitado de células se resuspende en medio fresco para determinar su concentración mediante recuento en cámara Neubauer empleando azul Tripán como colorante vital.

La conservación prolongada de los cultivos parasitarios y celulares se lleva a cabo mediante congelación gradual en N₂ líquido a -80 °C (Yaeger, 1988).

- 1.- Concentración del cultivo mediante centrifugación a 350g (2000 r.p.m.) durante 5 minutos.
- 2.- Se resuspende el precipitado con una solución de sulfóxido de dimetilo (DMSO) que actúa como agente criopreservante en un volumen final de 5% en medio fresco.
- 3.- Reparto en crioviales de congelación (Nunc).
- 4.- Congelación gradual 1 °C/min, hasta alcanzar -70 °C en el congelador progresivo (Nicoool LM 10).
- 5.- Introducción en las cajas del tanque de N₂ líquido.

La recuperación de los aislados congelados se produce mediante la extracción del vial del tanque y su posterior inmersión en agua tibia a 37 °C. Una vez descongelado, se incorpora en un frasco de cultivo con medio fresco y atemperado suplementado con suero y antibióticos. A las 24 h de la descongelación se recomienda realizar un cambio de medio con el fin de eliminar cualquier posible resto de criopreservante así como de células muertas.

B. CRIBADO FARMACOLÓGICO

La metodología a seguir para el cribado farmacológico de agentes de síntesis o derivados de plantas frente a *T. vaginalis* se basa en el tamizaje de las moléculas mediante una serie de filtros que sólo van a permitir pasar al siguiente ensayo aquellas moléculas que cumplan con los criterios de cada filtro tal y como muestra la siguiente figura:

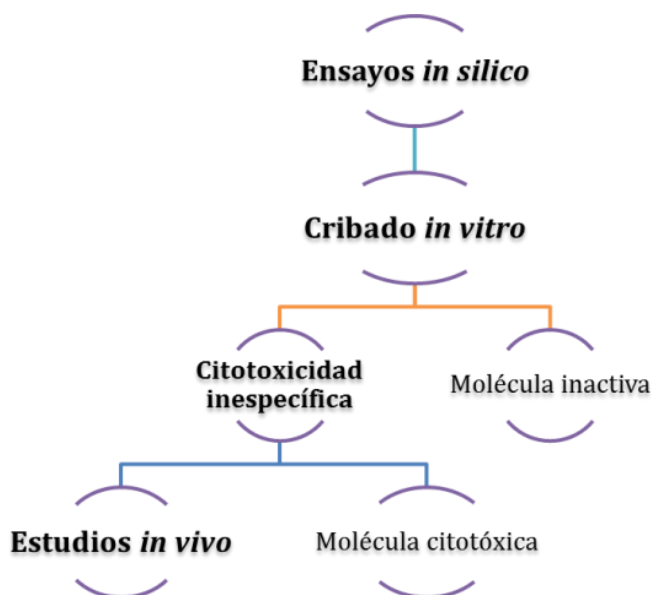


Figura 31: Diseño esquemático del método de cribado secuencial frente a *T. vaginalis*.

B.1. MÉTODO IN SILICO

Los modelos se crearon a partir del cálculo de las diez propiedades fisicoquímicas implementadas en el programa TOMOCOMD-CARDD®. Tras la realización de los cálculos en los cuatro sistema matriciales posibles, se llevó a cabo el análisis discriminante lineal y los cálculos estadísticos empleando el software STATISICA®.

Para la creación de los modelos se siguieron los siguientes pasos:

B.1.1. Construcción de la base de datos (BD)

En primer lugar se comenzó con la construcción de una base de datos (BD) compuesta por un total de 592 compuestos (260 moléculas activas y 332 compuestos inactivos) con estructura química conocida y cuya actividad frente a *T. vaginalis* había sido previamente publicada en revistas científicas y/o Tesis Doctorales (los compuestos que integran la BD se pueden consultar en el material suplementario adjunto en el CD). Se descartaron aquellas moléculas sin actividad cuantitativa, no ensayada *in vitro* o estudiada en otra especie. Todas las moléculas que integran la BD fueron dibujadas individualmente con el programa ChemDraw Ultra v.8 perteneciente al paquete ChemOffice. Todas las moléculas fueron divididas en dos grupos según el criterio de actividad determinado en el laboratorio. Dicho criterio fue fijado teniendo en cuenta la experiencia propia en los estudios de actividad *in vitro* del equipo de investigación.

Se consideraron ACTIVAS todas aquellas moléculas que hubieran mostrado:

Actividad	≥ 50% a una concentración de 10 µg/mL o 15,8 µM
IC ₅₀	≤ 10 µg/mL o 15,8 µM
CMI ₁₀₀	≤ CMI ₁₀₀ del MTZ obtenida en las mismas condiciones de ensayo
CMI ₁₀₀	≤ 20 µg/mL o 50 µM (4 veces la CMI que obtenemos para el MTZ siguiendo la metodología del grupo de investigación)

El resto de moléculas que no cumplieron estos parámetros fueron clasificadas como INACTIVAS.

B.1.2. Diseño de la Serie de Entrenamiento (SE) y la Serie de Predicción (SP)

Una vez generada la BD se procede a la agrupación de los compuestos activos e inactivos en familias o *clusters* a través del análisis de conglomerados o *k*-MCA empleando el programa STATISTICA v.10 (StatSoft, DELL). El objetivo principal es generar subgrupos mediante el análisis de *clusters* mediante algoritmos del tipo *k*-Medias, basados en las propiedades fisicoquímicas de las moléculas. De esta forma, se asegura la representatividad de cada subgrupo en las series de entrenamiento (SE) y predicción (SP), a partir de los cuales se crearán los modelos de predicción virtual.

Para crear las SE y SP, de forma aleatoria, un 25% de las moléculas que conforman cada *cluster* del grupo de los activos y de los inactivos pasan a formar parte de la SP mientras que el 75% restante quedan en la SE. Con el fin de simplificar la nomenclatura de las moléculas en base al grupo al que pertenecen, se denominaron según el código numérico siguiente:

Tabla 19: Código numérico empleado para la clasificación de las moléculas que componen la BD.

Característica	ACTIVO		INACTIVO	
	SE	SP	SE	SP
Código Numérico	1	2	-1	-2

Previa a la agrupación por *clusters* se comprobó que no existieran moléculas repetidas, debiéndose excluir de la BD. Las moléculas que conforman la SP solo se emplearon para los procesos de validación externa de los modelos generados.

B.1.3. Obtención de los modelos de predicción QSAR

El siguiente paso consiste en la obtención de los modelos QSAR en función del procedimiento estadístico del Análisis Discriminante Lineal (ADL). Para ello en primer lugar se calculan los descriptores moleculares (DM) de las moléculas de la SE. En esta Tesis Doctoral se presentan un total de 45 modelos virtuales basados en relaciones de átomos, a partir de las cuatro propiedades atómicas clásicas (masa atómica (MA), electronegatividad (E), polarizabilidad (P) y fuerza de Van der Waals (VdW)) empleando matrices estocásticas (SS) y no estocásticas (NS), con DM totales y locales siguiendo los procedimientos descritos anteriormente por nuestro grupo de investigación (Marrero-Ponce *et al.*, 2005). A diferencia de los trabajos anteriores, en esta ocasión la BD fue

distinta y los modelos se ampliaron, implementándose con propiedades atómicas nuevas (coeficiente de partición (CLog P), carga (C), dureza (D), área de superficie polar (TPSA), refractividad (R), blandura (S) y la combinación de todas en un modelo general (GEN)) y las matrices dobles estocásticas (DS) y de probabilidad mutua (PM).

Los 45 modelos de clasificación QSAR/ADL se diseñaron empleando la nueva versión del programa TOMOCOMD-CARDD® (v.2) y siguiendo como técnica estadística el Análisis Discriminante Lineal calculado por el programa STATISTICA. Cada modelo QSAR va a estar definido por una ecuación matemática que permite relacionar la propiedad que se está buscando, en este caso, la actividad tricomonocida, con los DM definidos en el modelo. La técnica empleada en estos modelos ha sido el ADL a partir de los DM totales y locales. El ADL es una ecuación matemática lineal que representa la relación entre la variable dependiente (activo o inactivo) y las variables predictivas. En la siguiente tabla se muestran las variables que calcula el software en función de los parámetros citados:

Tabla 20: Variables calculadas por el programa TOMOCOMD-CARDD® v.2. para la obtención de los modelos QSAR-ADL.

Modelo	Matriz	DM	Variable		Modelo	Matriz	DM	Variable		
			Inicial	Final				Inicial	Final	
1	No Estocástica (NS)	MA	1	256	12	Estocástica (SS)	MA	2561	2816	
2		P	257	512	13		P	2817	3072	
3		E	513	768	14		E	3073	3328	
4		VdW	769	1024	15		VdW	3329	3584	
5		CLogP	1025	1280	16		CLogP	3585	3840	
6		C	1281	1536	17		C	3841	4096	
7		D	1537	1792	18		D	4097	4352	
8		TPSA	1793	2048	19		TPSA	4353	4608	
9		R	2049	2304	20		R	4609	4864	
10		S	2305	2560	21		S	4865	5120	
11		GEN			22		GEN			
Modelo	Matriz	DM	Variable		Modelo	Matriz	DM	Variable		
			Inicial	Final				Inicial	Final	
23	Doble Estocástica (DS)	MA	5121	5376	34	Probabilidad Mutua (PM)	MA	7681	7808	
24		P	5377	5632	35		P	7809	7936	
25		E	5633	5888	36		E	7937	8064	
26		VdW	5889	6144	37		VdW	8065	8192	
27		CLogP	6145	6400	38		CLogP	8193	8320	
28		C	6401	6656	39		C	8321	8448	
29		D	6657	6912	40		D	8449	8576	
30		TPSA	6913	7168	41		TPSA	8577	8704	
31		R	7169	7424	42		R	8705	8832	
32		S	7425	7680	43		S	8833	8960	
33		GEN			44		GEN			
					45		NS+SS+DS+PM			

Cada modelo se obtiene a partir de 256 variables distintas, de las cuales se selecciona la mejor combinación, considerando como máximo de variables aceptable para la obtención del modelo de 10 y la mínima de 2. La mejor combinación se escoge en función del principio de parsimonia o navaja de Occam (*Numquam ponenda est pluralitas sine necessitate*) y según los parámetros estadísticos obtenidos con el software STATISTICA. Un compuesto es clasificado como activo o inactivo en función de la diferencia de probabilidades (ΔP):

$$\Delta P = [P(\text{act}) - P(\text{inact})] \times 100$$

Donde: $P(\text{act})$ es la probabilidad con la que la ecuación/modelo clasifica un compuesto como activo y $P(\text{inact})$ la probabilidad de clasificarlo como inactivo. Según este criterio todos los compuestos con un $\Delta P > 0$ serán clasificados por el modelo como activos y aquellos que presenten un $\Delta P < 0$ pertenecerán al grupo de inactivos.

La calidad y la robustez de los modelos se determinan en función de los siguientes parámetros estadísticos (**Tabla 21**): λ de Wilks, F de Fisher, cuadrado de distancia de Mahalanobis (D^2), exactitud total (Q), coeficiente de correlación de Matthews (C'), sensibilidad (Sens.), especificidad (Esp.) y razón de falsa alarma (RFA).

Tabla 21: Definición y cálculo matemático de los parámetros estadísticos calculados para determinar la calidad y robustez de los modelos virtuales.

Nombre	Definición/Cálculo
λ de Wilks	Probabilidad de distribución en un análisis discriminante: Discriminación perfecta (0), no discrimina (1).
D^2	Similitud entre dos variables aleatorias. En otras palabras, medida de la separación entre el conjunto de activos e inactivos. A mayor valor, más fácil será la capacidad predictiva del modelo.
Q	Proporción de compuestos bien predichos en relación al número total $(VP + VN) / (VP + FP + VN + FN) \times 100$
C'	Relación concordante/discordante (1/-1) o predicción al azar (0) entre dos variables. $[(VP \times VN - FP \times FN) / \sqrt{(VN + FN) \times (VN + FP) \times (VP + FP) \times (VP + FN)}] \times 100$
Sens.	Proporción de compuestos activos correctamente identificados. $VP / (VP + FN) \times 100$
Esp.	Proporción de moléculas activas verdaderamente bien identificadas del total de moléculas clasificadas como activas. <i>Hit rate</i> $VP / (VP + FP) \times 100$
RFA	Proporción entre falsos positivos respecto al total de compuestos inactivos. $FP / (FP + VN) \times 100$

VP: Verdaderos positivos, VN: Verdaderos negativos, FP: Falsos positivos, FN: Falsos negativos

B.1.4. Sistemas multclasificadores (SMC) de ensamblaje de los modelos QSAR

La generación de un número elevado de modelos va a requerir posteriormente un importante volumen de cálculos computacionales para la predicción virtual de las BD químicas con un gasto de tiempo considerable al tener que cribar las moléculas a través de cada modelo individualmente. El objetivo tras la creación de los modelos QSAR-ADL es seleccionar aquellos que combinados, aumenten la precisión del análisis, cribando de forma sinérgica y mejorando las predicciones gracias al uso combinado de las variables individuales de los modelos ensamblados.

Para la selección de la mejor combinación de modelos individuales se emplea el software DSDE (Meneses Gómez & Cedré Gutiérrez, 2013), aunque previamente al ensamblaje es importante reducir el número de los candidatos/modelos teniendo en cuenta la diversidad de los mismo. Es esencial que los modelos escogidos calculen propiedades distintas y tengan en cuenta a través de sus variables aspectos diferentes de las moléculas, logrando de esta forma un mayor enriquecimiento del sistema de predicción. Las medidas de diversidad realizadas por medio del programa DSDE fueron de **desacuerdo** y **doble fallo**. Ambas determinaciones se realizan mediante la combinación de los modelos en conjuntos de 2, 3 y 4. A través de las determinaciones de desacuerdo se busca retirar aquellos modelos cuyas estimaciones y cálculos sean similares y por tanto no van a enriquecer la predicción, mientras que la medida de doble fallo tiene en cuenta aquellos casos en los que los dos clasificadores se equivocan. En otras palabras, el método de ensamble permite comparar los modelos individuales estimando las diferencias que existen entre ellos con el fin de escoger aquellos que más difieran y al mismo tiempo ejerzan un efecto sinérgico en la discriminación computacional de los compuestos activos e inactivos.

A continuación, los modelos seleccionados son ensamblados mediante el empleo de cinco métodos de combinación de clasificadores individuales diferentes: voto mayoritario, promedio, máximo, mínimo y mediana (Meneses Gómez & Cedré Gutiérrez, 2013). Finalmente se escoge la combinación de modelos que muestre los parámetros estadísticos (Q, C', Sens., Esp., RFA) más adecuados.

B.1.5. Validación de los modelos

Para corroborar el poder predictivo de los modelos es fundamental realizar validaciones de los mismos. Se validan únicamente los modelos seleccionados por el SMC.

B.1.5.a. Validación interna

La validación interna de los modelos se llevó a cabo mediante dos procedimientos distintos:

- Validación cruzada también llamada LGO (*Leave-Group-Out*): su finalidad es conocer si la capacidad predictiva del modelo se basa en un grupo de moléculas de la SE o si mantiene la calidad inicial aunque se introduzcan moléculas mal clasificadas. Para ello se van a crear grupos que contengan el 5, 10, 15, 20 y 25% de las moléculas de la SE. Posteriormente se van a dejar fuera de la serie, generando nuevos modelos con el fin de conocer si se ha producido algún cambio en la capacidad predictiva con respecto al original. Este proceso se repite el número de veces que sea necesario hasta lograr que todas las moléculas hayan sido retiradas una vez.

- Aleatorización de la variable respuesta: las moléculas de la SE y SP se catalogan en activas o inactivas con los códigos 1, -1, 2 y -2 (**Tabla 19**). En esta validación interna se va a introducir un error en la SE. Este desajuste se basa en la modificación del 5, 10, 20, 30, 40 y 50% de los compuestos activos de la SE que se incluyen en el grupo de inactivos y viceversa. Los parámetros estadísticos que se obtendrán del modelo diseñado con la nueva BD van a reflejar una baja robustez y mal poder de predicción. A través de este procedimiento se confirma que el modelo original es capaz de clasificar correctamente las moléculas y que los valores estadísticos obtenidos no se deben a un fenómeno de azar.

B.1.5.b. Validación externa

Se determinan los parámetros estadísticos de la SP formada por el 25% de las moléculas activas e inactivas de la BD. En otras palabras, se realiza el cribado virtual de la SP.

B.2. MÉTODO *IN VITRO*

B.2.1. Recuento hemocitométrico

El método clásico de cribado *in vitro* se ha llevado a cabo mediante el recuento al microscopio de trofozoítos viables en cámara Neubauer tras 24 h de contacto con el producto a ensayar.

La actividad tricomonocida se determina en comparación con un control de crecimiento no tratado. Para iniciar el ensayo se requiere un cultivo axénico de *T. vaginalis* en fase exponencial de crecimiento. Para la obtención del mismo se cultivan 5 mL de inóculo de *T. vaginalis* en una botella de 100 mL con medio TYM fresco suplementado con SBF y antibióticos durante 24-48 h en estufa a 37 °C y 5% CO₂. A continuación, se describe el procedimiento brevemente:

- 1.- El cultivo en fase exponencial se concentra mediante centrifugación a 2000 r.p.m. (350g) durante 5 minutos y se ajusta el inóculo según el número de tubos que se vayan a requerir en el ensayo.
- 2.- Se realiza una siembra controlada de 10⁵ *T. vaginalis*/mL en un volumen final de 2 mL/tubo en tubos de vidrio Pyrex.
- 3.- Los tubos se incuban en estufa a 37 °C y 5% CO₂ durante 5 h para asegurar que se encuentran en fase logarítmica cuando se añadan los compuestos.
- 4.- Tras la incubación se añaden los productos de síntesis o los extractos vegetales a las concentraciones requeridas. Los compuestos de síntesis se disuelven en DMSO, si no hay una indicación contraria por parte de los químicos médicos o de síntesis. Se adicionan 4 µL/tubo para obtener una concentración final de DMSO del 0,2% (v/v). A los tubos control de crecimiento se les añade sólo el diluyente (DMSO) para corroborar que no interfiere en la viabilidad de los cultivos. En todos los ensayos se incluye un control de MTZ (4 µg/mL). Los cultivos se incuban en estufa a 37 °C y 5% CO₂ durante 24 h en contacto con los diferentes compuestos.
- 5.- Al finalizar la incubación, se procede al recuento de los organismos viables mediante una cámara hemocitométrica al microscopio de todos los tubos. Se determina el porcentaje de inhibición de crecimiento (%IC) en comparación con los controles de crecimiento.

En los ensayos de cribado *in vitro* mediante recuento al microscopio los derivados de síntesis se han ensayado a tres concentraciones distintas (100, 10 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), salvo G-1 que se evaluó a 20, 10 y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los dos 5-nitroimidazoles (metronidazol y secnidazol) se cribaron a concentraciones más bajas (2, 1, 0,5, 0,25, 0,125 y 0,0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Finalmente, el clotrimazol, debido a su menor actividad tricomonocida en comparación con los 5-NI se estudió en un rango de concentraciones de 10 a 0,625 $\mu\text{g}/\text{mL}$. El método de recuento al microscopio ha sido empleado durante el proceso de estandarización de la técnica de cribado fluorimétrico empleando resazurina.

En todos los ensayos de cribado mediante recuento en cámara Neubauer la determinación de la inhibición de crecimiento para cada compuesto se realiza por triplicado en un mismo ensayo. La actividad tricomonocida mostrada corresponde a la media obtenida de los tres tubos.

B.2.2. Método espectrofluorimétrico

El procedimiento del método fluorimétrico coincide con el método de recuento hemocitométrico en los cuatro primeros pasos (1-4).

5.- Tras este periodo, un volumen de 200 μL de cada tubo es transferido a placas de microtitulación de 96 pocillos y fondo plano.

6.- Debido a la capacidad reductora de algunos componentes del medio de cultivo, este se retira de las placas mediante una centrifugación a 2000 r.p.m. (350g). Tras retirar el sobrenadante, el botón se resuspende en 200 μL de P.B.S. 1X estéril suplementado con 0,1% de glucosa.

7.- A continuación, se añaden 20 $\mu\text{L}/\text{pocillo}$ del colorante redox resazurina preparado previamente a una concentración stock de 3 mM en P.B.S. 1X.

8.- Las placas se incuban 1 h en estufa a 37 °C y 5% CO_2 y finalmente se procede a su lectura en el espectrofluorímetro (Infinite 200, TECAN) a $\lambda_{\text{excitación}}$ de 535 nm y $\lambda_{\text{emisión}}$ de 590 nm.

Todas las concentraciones se evalúan por triplicado y en dos ensayos independientes. En todos los ensayos se incluye una fila de control blanco en el que se añaden los compuestos pero sin los parásitos. Este control interno permite corroborar que la fluorescencia en los pocillos se debe a la viabilidad de *T. vaginalis* y no a falsos negativos producidos por posibles efectos reductores de los compuestos.

Los ensayos de quimiosensibilidad se han realizado frente al aislado de referencia JH31A4 sensible a MTZ. Solo aquellos que han mostrado una buena actividad frente a este aislado y una baja citotoxicidad inespecífica se han ensayado posteriormente frente al aislado de referencia IR78 resistente a MTZ.

Los primeros compuestos estudiados al inicio de esta Tesis (Series I y II VATR) se evaluaron a tres concentraciones (100, 10 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Posteriormente y en paralelo a la validación del método de cribado secuencial se han ido ensayando el resto de moléculas de síntesis a seis concentraciones diferentes para poder calcular la CI_{50} en un rango de concentraciones finales que van de 300 μM a 9 μM . Las concentraciones se obtienen mediante diluciones dobles seriadas sucesivas empleando

como disolvente DMSO puro. Asimismo, otra modificación realizada en el transcurso de esta Tesis ha sido la evaluación de los derivados de síntesis a concentraciones μM .

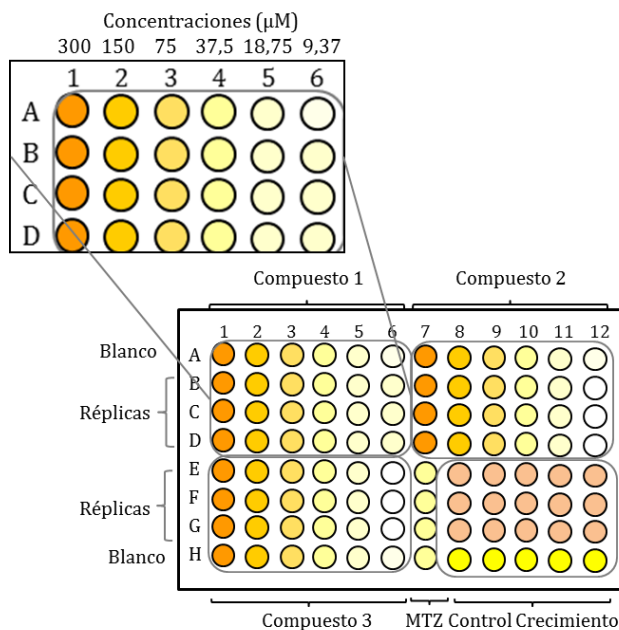


Figura 32: Diseño de la distribución en una placa de microtitulación para el cribado *in vitro* frente a *T. vaginalis* de 3 compuestos.

B.2.3. Determinación de la citotoxicidad inespecífica en líneas celulares

Los compuestos con actividad frente al parásito son ensayados a las mismas concentraciones frente a células Vero CCL-81 mantenidas en medio RPMI-1640 suplementado con un 10% de SBF y antibióticos en estufa a 37 °C y 5% CO_2 .

1.- Las células se despegan de los frascos de cultivo celular (frascos Roux) con una solución de 10 mL de EDTA-tripsina y tras centrifugaciones sucesivas a 2000 r.p.m. (350g) durante 5 minutos y se realiza el recuento en cámara Neubauer con ayuda del colorante vital Azul Tripán.

2.- Se realiza una siembra controlada de las células resuspendidas en RPMI en placas de microtitulación de 96 pocillos de fondo plano. A cada pocillo se añaden 50000 células/pocillo en 100 μL de medio suplementado dejando incubar las placas en estufa a 37 °C y 5% CO_2 .

3.- Tras 24 h de incubación para permitir que las células se adhieran al fondo del pocillo y cubran su superficie, se procede a la adición de 100 μL de los compuestos disueltos en RPMI. En los ensayos de citotoxicidad los derivados químicos deben ensayarse a las mismas concentraciones que las evaluadas en los ensayos frente al parásito. En todas las placas se incluye un control de células a las que se les añade RPMI con el diluyente DMSO a un volumen final de 0,2% (v/v).

4.- Se mantienen en cultivo las células en contacto con los compuestos a las distintas diluciones durante 24 h.

5.- El ensayo se revela añadiendo a cada pocillo 20 μL de resazurina a concentración stock 1 mM y dejando incubar con el colorante redox durante 3 h a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5% CO_2 .

6.- La lectura de las placas se lleva a cabo a $\lambda_{\text{excitación}}$ de 535 nm y $\lambda_{\text{emisión}}$ de 590 nm en el espectrofluorímetro (Infinite 200, TECAN).

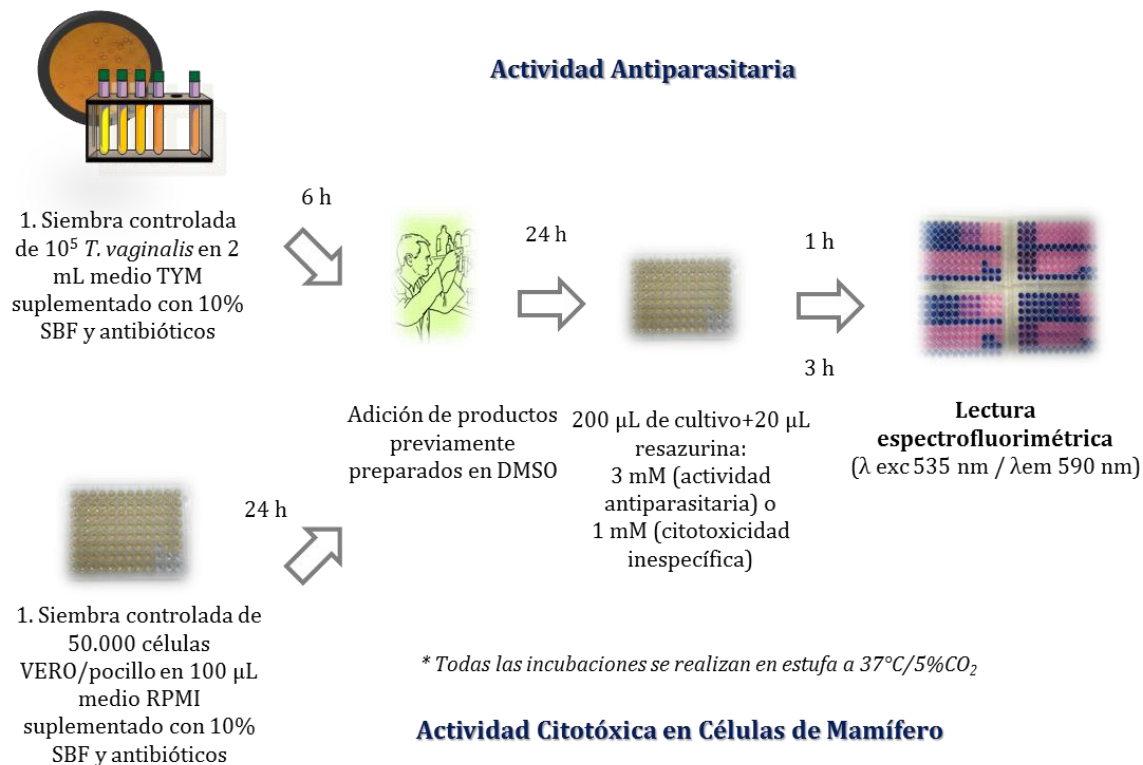


Figura 33: Cribado *in vitro* mediante el método fluorimétrico con resazurina.

Todas las concentraciones se evalúan por triplicado y en dos ensayos independientes. En todos los ensayos se incluye una fila de control blanco en el que se añaden los compuestos pero sin células. Este control interno permite corroborar que la fluorescencia de los pocillos se debe a la viabilidad de las células y no a falsos negativos producidos por posibles efectos reductores de los compuestos.

B.3. MÉTODO *IN VIVO*

El método de evaluación de la actividad farmacológica en el modelo murino de tricomonosis intraperitoneal se basa en el modelo de valoración de mortalidad y lesiones de Toyos (1974), modificado posteriormente por Escario (1985) y Nogal-Ruiz *et al.* (1997) (Figura 34).

Preparación del inóculo

1.- El inóculo se obtiene a partir de un cultivo axénico en medio TYM suplementado con SBF y antibióticos (Apartado C del capítulo de Materiales y Métodos) en frascos de vidrio previamente esterilizados de 100 mL durante 24-48 horas en estufa a 37 $^{\circ}\text{C}$ y 5% CO_2 .

2.- Concentración del cultivo mediante centrifugaciones sucesivas a 350g (2000 r.p.m.) durante 5 minutos a fin de ajustar el inóculo a 10^7 tricomonádidos/ratón.

Pauta de inoculación intraperitoneal

Para cada una de las pruebas de cribado *in vivo* y para los ensayos de patogenia experimental en modelo murino se han empleado lotes de 10 ratones hembra NMRI con un peso medio entre 16-20 g. A cada ratón se le inoculan por vía intraperitoneal 10^7 *T. vaginalis* en un volumen de 0,6 mL. Tras la inoculación de los ratones se procede a la observación y pesada de los animales con el fin de valorar la evolución de la infección experimental durante los 15 días posteriores. Si algún animal muriese durante este periodo se procede a la necropsia para la valoración de la mortalidad y las lesiones de manera inmediata.

En los estudios farmacológicos *in vivo* el compuesto a ensayar se disuelve previamente en carboximetilcelulosa (CMC) al 2%. Su administración se realiza mediante sonda bucofaríngea (vía oral) al tercer día post-infección. Las pautas de tratamiento farmacológico han sido de una dosis diaria durante siete días.

En todos los estudios de cribado *in vivo* se han incluido un grupo control de infección que no fue tratado y un grupo control de tratamiento. A este último lote de ratones, se les administró MTZ (25 mg/kg) disuelto en CMC al 2%, siguiendo las mismas pautas que el resto de compuestos a evaluar.

Necropsia

Los ratones se sacrifican mediante anestesia a término el decimoquinto día post-inoculación para su necropsia y valoración de las lesiones abdominales o intraperitoneales. Aquellos que por causa de la infección muriesen durante el transcurso de la prueba también deben ser sometidos a examen.

Valoración de las lesiones

La determinación del índice de patogenia se lleva a cabo puntuando las diversas lesiones en los órganos internos del animal según los criterios determinados por Toyos (Toyos 1974) y, posteriormente, modificados por Escario (1985) y Nogal Ruiz (1997), tal y como muestra la siguiente tabla:

Tabla 22: Valoración de la mortalidad y las lesiones observadas en los ratones tras la inoculación intraperitoneal de aislados axénicos de *T. vaginalis*.

I.- MORTALIDAD (días p.i.)	
Ratones muertos al 3 ^{er} día p.i.	50 puntos
Ratones muertos al 4 ^o día p.i.	44 puntos
Ratones muertos al 5 ^o día p.i.	38 puntos
Ratones muertos al 6 ^o día p.i.	32 puntos
Ratones muertos al 7 ^o día p.i.	26 puntos
Ratones muertos al 8 ^o día p.i.	20 puntos
Ratones muertos al 9 ^o día p.i.	14 puntos
Ratones muertos al 10 ^o día p.i.	8 puntos
Ratones muertos después del 10 ^o día p.i.	6 puntos
Ratones sacrificados el 15 ^o día p.i.	0 puntos

II.- LÍQUIDO ASCÍTICO	
Menos de 1 mL	2 puntos
De 1 a 2 mL	4 puntos
Más de 2 mL	6 puntos
III.- PERITONEO Y GRASA PÉLVICA	
Necrosis puntiforme en número de 1 a 3	2 puntos
Necrosis puntiforme múltiple y/o necrosis única de 3 a 5 mm de diámetro	4 puntos
Necrosis múltiples de 3 a 5 mm y/o necrosis única de 5 a 10 mm de diámetro	6 puntos
Necrosis extendida por toda la pelvis	8 puntos
Necrosis diseminada en cavidad abdominal afectando el meso intestino y zona perirrenal	10 puntos
IV.- BAZO, PÁNCREAS, ESTÓMAGO	
Necrosis puntiforme en número de 1 a 3 y/o esplenomegalia	2 puntos
Necrosis puntiforme múltiple y/o necrosis única de 3 a 5 mm de diámetro	4 puntos
Necrosis única de 5 a 8 mm	6 puntos
Necrosis de 8 a 10 mm afectando a más de un órgano	8 puntos
Necrosis de 10 a 15 mm englobando a más de un órgano	10 puntos
Necrosis mayores de 15 mm que ocupan más de un órgano e interesando también a hígado y asas intestinales	12 puntos
V.- HÍGADO (CARA VISCERAL)	
Necrosis puntiforme en número de 1 a 3 y/o fina capa superficial de fibrina sobre el lóbulo de Spigelio	2 puntos
Necrosis de 3 a 5 mm y/o necrosis parcial del lóbulo de Spigelio o de los lóbulos ventrales derecho o izquierdo	4 puntos
Necrosis de 5 a 8 mm y/o necrosis total del lóbulo de Spigelio o necrosis equivalente en los lóbulos ventrales derecho o izquierdo	6 puntos
Necrosis de 8 a 10 mm	8 puntos
Necrosis afectando a la mayor parte de la superficie	10 puntos
VI.- HÍGADO (CARA DIAFRAGMÁTICA)	
Necrosis puntiforme en número de 1 a 3 y/o fina capa superficial de fibrina y/o alteraciones en la coloración del órgano	2 puntos
Necrosis de 3 a 5 mm y/o grandes alteraciones de color	4 puntos
Necrosis de 5 a 8 mm y/o necrosis parcial de los lóbulos diafragmáticos derecho o izquierdo	6 puntos
Necrosis de 8 a 10 mm y/o necrosis parcial de los dos lóbulos y/o intensa de un lóbulo	8 puntos
Necrosis intensa afectando a varios lóbulos	10 puntos
Necrosis extendida a todos los lóbulos e interesando al diafragma	12 puntos

Día 1:

- 1.- Despegar las células HeLa del frasco de cultivo celular con una solución de 10 mL de EDTA-Tripsina y recuento del número de células vivas tras sucesivas centrifugaciones (2000 r.p.m./5 min) mediante recuento al microscopio con Azul Tripán. Ajustar el inóculo a $2,5 \times 10^5$ células/mL en medio RPMI.
- 2.- Siembra controlada de 200 μ L/pocillo del cultivo ajustado en placas estériles de 96 pocillos (5×10^4 células/pocillo), siguiendo el protocolo de García *et al.* (2007).
- 3.- Incubar las placas toda la noche en estufa a 37 °C y 5% CO₂.

Día 2:

- 4.- Preparar un cultivo de *T. vaginalis* en un frasco de vidrio de 100 mL con medio TYM fresco suplementado con SBF y antibióticos.
- 5.- Lavar las placas de células con P.B.S. 1X.
- 6.- Fijar a temperatura ambiente con glutaraldehído al 3% durante 1 h (García *et al.*, 2007).
- 7.- Retirar el fijador lavando dos veces con P.B.S. 1X.
- 8.- Bloquear las células en solución de glicerol 0,5 M durante toda la noche.

Día 3:

- 9.- Centrifugar el cultivo de trofozoítos y ajustar el inóculo a 5×10^6 *T. vaginalis*/mL.
- 10.- Marcar los tricomonádidos durante 30 min con la calceína AM proporcionada en el *kit* (2 μ L de la solución stock/mL de medio de cultivo TYM)* y dejar incubando a 37 °C.
- 11.- Lavar 2 veces con medio mixto RPMI:TYM (2:1) sin suero y ajustar de nuevo el inóculo de trofozoítos a $2,5 \times 10^6$ parásitos/mL.
- 12.- Añadir 100 μ L de los trofozoítos marcados ($2,5 \times 10^5$) a los pocillos e incubar 30-45 minutos.
- 13.- Lavar 2 veces con P.B.S. 1X atemperado a 37 °C. En este paso de lavado es importante tener mucho cuidado para evitar separar las células adheridas.
- 14.- Añadir 100 μ L de la suspensión de *T. vaginalis* marcadas a los pocillos control.
- 15.- Leer en el espectrofluorímetro ($\lambda_{\text{excitación}}$ 484 nm- $\lambda_{\text{emisión}}$ 535 nm).

*El *kit* recomienda el uso de 5 μ L de solución de calceína AM por mL de cultivo. Este es el procedimiento de García *et al.* (2003, 2005). Sin embargo, en estudios posteriores, García *et al.* (2007) redujeron este volumen a 2 μ L. Todos los ensayos se han realizado por duplicado y a dos concentraciones. Al no detectarse diferencias en los resultados, se escoge la concentración menor de colorante para el marcaje de los parásitos.

Al igual que en el caso anterior, los protocolos descritos por García *et al.* (2003, 2005) lisan los trofozoítos con Tritón X-100 antes de la lectura de las placas. Se ensayaron las dos condiciones para ver si la adición de Tritón permitía aumentar la sensibilidad de la detección de la fluorescencia. Sin embargo, tampoco se vieron diferencias significativas por lo que se eliminó este paso. García *et al.* (2007) tampoco indicaron este paso en su protocolo.

En todas las placas se incluyen los siguientes controles internos:

- Control de células HeLa sin trofozoítos.
- Control de trofozoítos sin células.
- Control de células HeLa con parásitos sin marcar.

C.3. CITOTOXICIDAD PARASITARIA

La citotoxicidad ejercida por los parásitos en un cultivo de células HeLa se evalúa siguiendo el protocolo de Alderete *et al.* (1985) modificado:

Día 1:

- 1.- Despegar las células HeLa del frasco de cultivo celular con una solución de 10 mL de EDTA-Tripsina y recuento del número de células vivas tras sucesivas centrifugaciones (2000 r.p.m./5 min) mediante recuento al microscopio con Azul Tripán. Ajustar el inóculo a $2,5 \times 10^5$ células/mL en medio RPMI.
- 2.- Siembra controlada de 200 μ L/pocillo (5×10^4 células) en las placas de microtitulación de 96 pocillos y dejar incubar toda la noche en estufa a 37 °C y 5% CO₂.
- 3.- Preparar un cultivo de *T. vaginalis* en frasco de vidrio de 100 mL con medio TYM fresco suplementado con SBF y antibióticos.

Día 2:

- 4.- Centrifugar el cultivo de *T. vaginalis* a 2000 r.p.m. (350g) durante 5 min y lavar el precipitado con P.B.S. 1X.
- 5.- Ajustar el inóculo en RPMI:TYM (2:1) sin suero, a una concentración de 10^5 y $0,5 \times 10^5$ trofozoítos/pocillo.*
- 6.- Añadir 100 μ L del cultivo de parásitos ajustado a los pocillos e incubar durante 2 h.**
- 7.- Eliminar el sobrenadante y lavar dos veces con P.B.S. 1X.
- 8.- Fijar con formaldehído (100 μ L/pocillo) a temperatura ambiente durante 10 min.
- 9.- Teñir con cristal violeta 0,13% (50 μ L/pocillo) a temperatura ambiente durante 10 min.
- 10.- Lavar dos veces con agua destilada y dejar secar al aire.
- 11.- Solubilizar el colorante en SDS al 1% (100 μ L/pocillo).

12.- Realizar las lecturas en un detector ELISA a 570 nm.

*Para la estandarización del ensayo se estudiaron cuatro ratios parásito:célula distintos: 2:1, 1:1, 1:2 y 1:4. Sin embargo los resultados han mostrado que el ratio que muestra más diferencias entre aislados es 2:1.

**En la estandarización se evaluó la citotoxicidad parasitaria tras 2, 4, 6 y 8 h de contacto con las células. No obstante, el tiempo más adecuado de incubación para analizar esta propiedad en estas condiciones es 2 h.

C.4. PRESENCIA DE VIRUS TVV

Día 1:

- 1.- Se centrifuga el cultivo de *T. vaginalis* a 2000 r.p.m. (350g) durante 5 min.
- 2.- Se retira el sobrenadante y se resuspende el precipitado en P.B.S. 1X.
- 3.- Se centrifuga de nuevo y se realiza un segundo lavado en P.B.S. 1X.
- 4.- Finalmente, tras retirar el sobrenadante, los parásitos se resuspenden en un eppendorf con solución fijadora de formol al 2% y se dejan fijando a 4 °C durante toda la noche o hasta continuar con el protocolo de inmunofluorescencia.

Día 2:

- 5.- Se centrifuga el eppendorf con los trofozoítos fijados y se retira el sobrenadante. Las células se deben resuspender en un volumen conocido de P.B.S. 1X estéril para realizar su posterior recuento en cámara Neubauer para ajustar el número de células por pocillo.
- 6.- Ajustar el número de trofozoítos a $2,5 \times 10^6$ *Trichomonas*/mL.
- 7.- Añadir 10 µL de la suspensión de parásitos a cada pocillo del portaobjetos y dejar secar a temperatura ambiente.
- 8.- Incubar los portaobjetos en acetona fría en frasco Couplin durante 10 min/4 °C.
- 9.- Guardar las láminas en papel de aluminio a 4°C o -20 °C hasta su uso.

Día 3:

- 10.- Cuando se vaya a realizar el ensayo, se deben sacar las láminas y dejarlas atemperar. En este ensayo no se requiere la permeabilización de las células porque se quiere marcar la proteína P270 que se encuentra en la superficie de los trofozoítos infectados por TVV.*
- 11.- Añadir 10 µL del Ac primario C20A3 (1:25) e incubar durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda.
- 12.- Lavar con ayuda de una pipeta Pasteur con P.B.S.-Tween 80 y a continuación realizar otros dos lavados más en frasco Couplin en agitación con intervalos de 10 min.
- 13.- Dejar secar a temperatura ambiente.

- 14.- Lavar con agua destilada para eliminar los restos de Tween.
- 15.- Secar a temperatura ambiente.
- 16.- Teñir con 5 µL de Azul de Evans a temperatura ambiente durante 5 min.
- 17.- Lavar con agua destilada y dejar secar.
- 18.- Añadir una gota de glicina tamponada Flouprep® e inmediatamente colocar el cubreobjetos limpio.
- 19.- Dejar unas horas secando y observar al microscopio de fluorescencia en el mismo día. No dejar más de 48 h para su observación.

**En caso de utilizar soportes de plástico para el ensayo es conveniente tras el paso 10 bloquear con BSA 2% entre 30 min/1 h y lavar con P.B.S. 1X antes de añadir el Ac primario.*

C.5. PRESENCIA DE *Mycoplasma hominis*

Para la detección de *Mycoplasma* en los aislados de *T. vaginalis* se emplea el kit comercial *Mycoplasma Detection Kit* (SouthernBiotech, Birmingham, USA), diseñado para la detección de contaminaciones de cultivos celulares por *Mycoplasma*. Detecta la presencia de la bacteria en el sobrenadante de los cultivos celulares mediante la amplificación del ARNr 16S. El cebador que incorpora el kit corresponde a una región conservada del gen 16S y que permite la detección de los géneros *Mycoplasma*, *Acholeplasma* y *Ureaplasma*. En este caso, se ajustó el protocolo del kit para su uso con ADN del parásito.

El protocolo empleado para los estudios de determinación de *Mycoplasma* en cultivos de *T. vaginalis* es el siguiente:

1.- A partir de ADN extraído mediante el kit comercial (apartado D.1.1 del capítulo de Materiales y Métodos), o mediante extracción con fenol-cloroformo (apartado D.1.2.) se realiza la reacción de amplificación añadiendo a un eppendorf los siguientes volúmenes de trabajo:

Primer/dNTP incluido en el kit	5 µL
Taq polimerasa*	25 µL
Control interno del kit	2 µL
ADN muestra o Control positivo	2 µL
H ₂ O milliQ c.s.p.	50 µL

* Se utiliza como polimerasa la TaqSelect™ DNA Polymerase 2X Premix without dNTPs (Lucigen, Middleton, USA) recomendada por el kit. El premix de la polimerasa contiene 0,1 U/ µL de enzima, buffer de reacción (pH=9, 3 mM MgCl₂ y estabilizadores. Como este primer contiene su propio buffer, se estandarizó la técnica empleando este buffer en lugar del que contiene el kit.

En todos los ensayos se incluye una muestra de control positivo. Este control incluido en el kit corresponde a *Mycoplasma orale*. Se añaden 2 µL de la muestra positiva en lugar de

ADN muestra de *T. vaginalis*, generándose una banda de 503 pb que permite validar la reacción. Asimismo todos los tubos deben incluir el control interno que permite eliminar potenciales falsos negativos. Se va a generar una banda de 270 pb (**Figura 35**) que corresponde a un plásmido de ADN que incluye secuencias específicas para la unión del cebador de *Mycoplasma* presente en el *kit*.

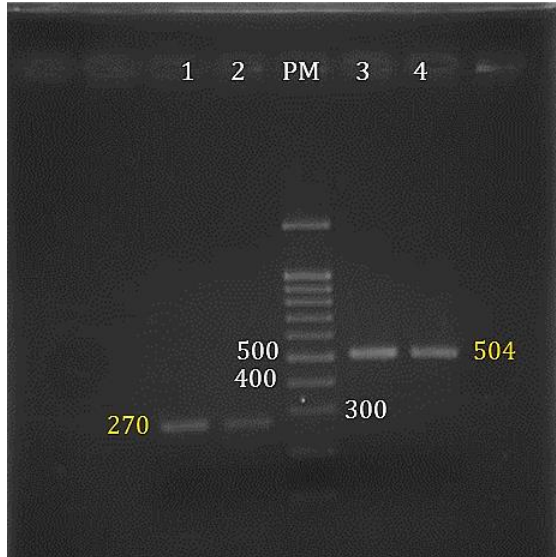


Figura 35: Gel de agarosa obtenido durante la estandarización del protocolo. Los carriles 1 y 2 corresponden a controles negativos a los que no sólo se les ha añadido el control interno. Los carriles 3 y 4 son controles +. Contienen 4 y 2 μ L del control positivo incluido en el *kit*.

C.6. SENSIBILIDAD AL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

Presencia de CD59 en la superficie de *Trichomonas vaginalis*

Microscopía confocal para la detección de CD59 en la superficie de *T. vaginalis*

Para la detección de esta proteína en la superficie del parásito se parte de trofozoítos vivos recuperados de líquido ascítico de ratón, tras la infección intraperitoneal de hembras NMRI (**Figura 34**).

Día 1:

- 1.- Se centrifuga el cultivo de *T. vaginalis* a 2000 r.p.m. (350g) durante 5 min.
- 2.- Se retira el sobrenadante y se resuspende el precipitado en P.B.S. 1X.
- 3.- Se centrifuga de nuevo y se realiza un segundo lavado en P.B.S. 1X.
- 4.- Finalmente, tras retirar el sobrenadante, los parásitos se resuspenden en un eppendorf con solución fijadora de formol al 2% y se dejan fijando a 4 °C durante toda la noche o hasta continuar con el protocolo de inmunofluorescencia.

Día 2:

- 5.- Se centrifuga el eppendorf con los trofozoítos fijados y se retira el sobrenadante. Las células se deben resuspender en un volumen conocido de P.B.S. estéril para realizar su posterior recuento en cámara Neubauer para ajustar el número de células por pocillo.

- 6.- Ajustar el número de trofozoítos a 5×10^6 *Trichomonas*/mL.
- 7.- Añadir 10 μ L de la suspensión de parásitos a cada pocillo del portaobjetos (Biomérieux, France) de fondo oscuro y dejar secar a temperatura ambiente.
- 8.- Incubar las muestras en acetona fría durante 10 min/4 °C.
- 9.- Guardar las láminas en papel de aluminio a 4°C o -20 °C hasta su uso.

Día 3:

- 10.- Cuando se vaya a realizar el ensayo, se deben sacar las láminas y dejarlas atemperar.
- 11.- Bloquear con BSA 2% durante 30 min/1 h y lavar con P.B.S. 1X.
- 12.- Añadir 10 μ L del Ac primario anti-AP65 (1:100) e incubar durante 1 h a 37 °C en cámara húmeda.
- 13.- Lavar con ayuda de una pipeta Pasteur con P.B.S.-Tween 80 y a continuación realizar otros dos lavados más en frasco Couplin en agitación en intervalos de 10 min.
- 14.- Dejar secar a temperatura ambiente.
- 15.- Añadir 10 μ L del Ac secundario IgG FITC (1:100) e incubar 30 min a 37 °C.
- 16.- Lavar siguiendo las indicaciones del punto 13.
- 17.- Añadir 10 μ L del Ac primario anti-CD59 (1:200) durante 30 min a 37 °C.
- 18.- Lavar siguiendo las indicaciones del punto 13.
- 19.- Añadir 10 μ L del Ac conjugado anti IgG-Alexa (1:1000).
- 20.- Realizar los lavados en P.B.S.-Tween 80 como se ha indicado anteriormente y retirar el exceso de Tween en un último lavado con agua destilada.
- 21.- Dejar secar a temperatura ambiente y en oscuridad.
- 22.- Finalmente, fijar con líquido de montaje que contenga DAPI (*Prolong® Gold antifade reagent* con DAPI, Invitrogen).
- 23.- Dejar incubando a temperatura ambiente y en oscuridad durante 24 h y examinar en un microscopio de láser confocal Leica TCS-SP5 (Leica, Microsystems, Madrid, España).

Los estudios de microscopía confocal se realizaron en el Servicio de Microscopía Confocal de la Universidad de Alcalá de Henares (UAH) pertenecientes al Centro de Investigación en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN).

El orden en la adición de los anticuerpos (primero el Ac monoclonal anti-AP65 seguido del secundario conjugado con FITC y finalmente el anti-CD59 junto con el Ac de cabra marcado con Alexa) es crítico para evitar posibles reacciones cruzadas entre los Ac secundarios.

Determinación de la concentración de C3 en suero humano (SH)

Previamente al estudio de la sensibilidad de los aislados al complemento es importante ajustar el volumen del SH que se debe añadir en función de la concentración de C3 que contengan los sueros.

Los sueros humanos fueron cedidos por la Escuela de Análisis Clínicos de la Universidad Complutense de Madrid situado en la Facultad de Farmacia. Los sueros se almacenaron a -20 °C hasta su utilización en la prueba.

La determinación cuantitativa de C3 se realiza mediante inmunodifusión radial en placa de 12 pocillos empleando el *kit* EASY RID ref. 93004 (Liofilchem s.r.l.) para la detección de h-C3c. Se modificó ligeramente el protocolo indicado por el fabricante, revelando la placa a los 24 h de incubación a temperatura ambiente.

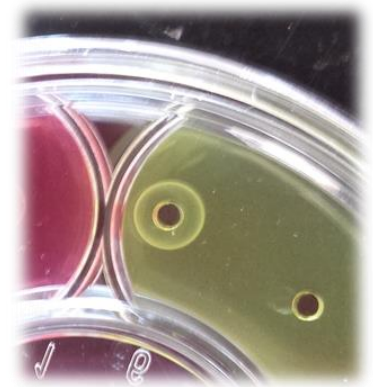


Figura 36: Resultado de la IDR tras incubar 24 h un volumen de 5 µL de SH en el pocillo del kit ESAY RID para determinar la concentración de C3c.

Ensayo de lisis para confirmar el efecto protector de CD59 frente a la lisis del complemento

Para esta determinación se cultivaron los aislados C-1:NIH e IR78 en ausencia y presencia de eritrocitos de ratón obtenidos mediante punción retroorbital. Los glóbulos rojos (GR) se lavaron en P.B.S. 1X estéril y resuspendidos en medio fresco con SBF descomplementado.

- 1.- A partir de un cultivo en fase exponencial de crecimiento con y sin GR se realiza una siembra controlada de $2,5 \times 10^5$ trofozoitos/tubo. El ensayo se realiza empleando 7 tubos/grupo.
- 2.- A cada tubo se le añade 1 mL con distintos volúmenes de TYM suplementado con distintas concentraciones de SH (**Figura 37**).
- 3.- Los tubos se incuban a 37 °C/5% CO₂ durante 1,5 h.
- 4.- La susceptibilidad de los cultivos a las distintas concentraciones de SH se revela siguiendo el protocolo de la resazurina indicado en el apartado B.2.2. Los cultivos se resiembran en placas estériles de 96 pocillos (200 µL/pocillo).
- 5.- Se centrifugan las placas a 2000 r.p.m. (350g) durante 5 minutos para retirar el sobrenadante.
- 6.- El precipitado se resuspende en el mismo volumen de P.B.S.-Glucosa 0,1%.
- 7.- A continuación, se añaden 20 µL a cada pocillo del colorante redox resazurina (solución stock 3 mM).

8.- Las placas se revelan tras 1 h de incubación en estufa a 37 °C y 5% CO₂ en el fluorímetro (Infinite 200, TECAN empleando un filtro con $\lambda_{excitación}$ 535 nm y $\lambda_{emisión}$ 590 nm).

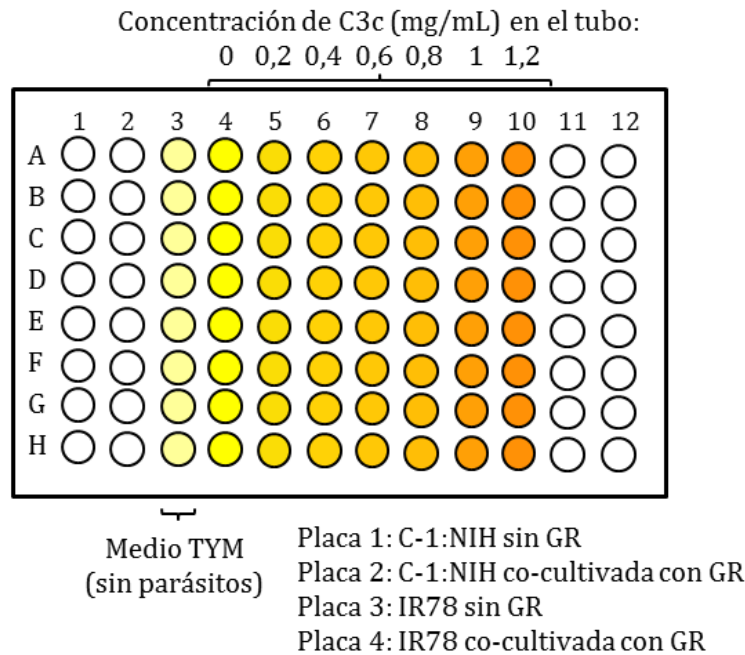


Figura 37: Distribución de las placas para el revelado de la susceptibilidad al suero de los dos aislados cultivados en presencia y ausencia de glóbulos rojos (GR).

Método de caracterización biológica mediante la determinación de la sensibilidad al componente C3 del SH

Para el ensayo se parte de un cultivo de 24/48 h para lograr una concentración adecuada de trofozoítos. A continuación, se describe con brevedad el método utilizado:

- 1.- Se centrifuga el cultivo a 2000 r.p.m. (350g) durante 5 min y se realiza el recuento en cámara Neubauer a dilución 1:50 en P.B.S.
- 2.- Se ajusta el inóculo para realizar una siembra controlada de $2,5 \times 10^5$ trofozoítos/tubo en un total de 4 tubos/aislado.
- 3.- Se añade 1 mL a cada tubo del cultivo ajustado.
- 4.- Añadir el volumen de SH indicado a continuación y ajustado en función de la concentración de C3c obtenida tras la IDR ([hC3c] = 125 mg/dL) de los sueros.

Volumen	Grupo experimental (C3 = 80 mg/dL)	Grupo control (Sin C3c)
Suero humano	0,64 mL	-
Medio TYM	0,36 mL	1 mL

5.- Incubar 1,5 h a 37 °C/5% CO₂.

6.- Revelar la prueba en placa de microtitulación de 96 pocillos siguiendo el esquema de la **figura 38**. Añadir a cada pocillo 200 µL del tubo de cultivo y centrifugar a 2000 r.p.m. durante 5 min para retirar el sobrenadante.

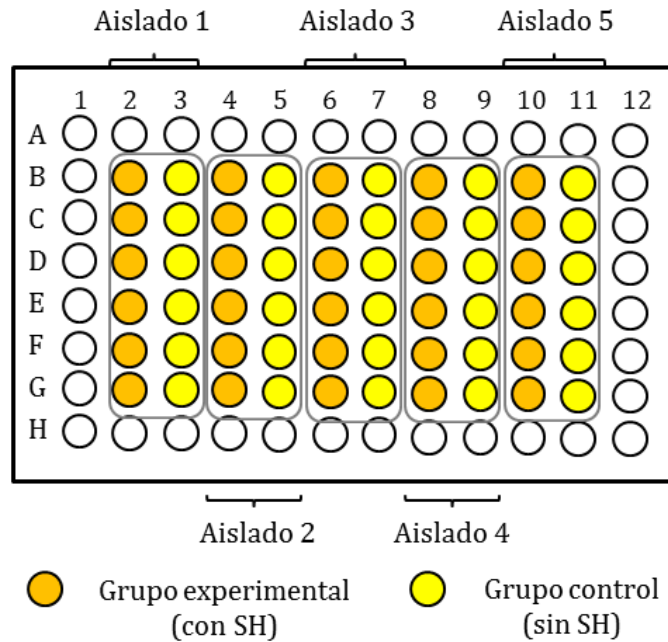


Figura 38: Diseño rotulado de la placa de titulación de 96 pocillos para el revelado del ensayo de sensibilidad de aislados de *T. vaginalis* al sistema del complemento.

7.- Resuspender en el mismo volumen de P.B.S.-Glucosa 0,1% y añadir 20 µL de resazurina (solución stock 3 mM).

8.- Tras incubar 1 h en estufa a 37 °C/5% CO₂ revelar en el fluorímetro ($\lambda_{excitación}$ de 535 nm y $\lambda_{emisión}$ de 590 nm).

C.7. MODELO MURINO DE PATOGENIA EXPERIMENTAL DE *Trichomonas vaginalis*

La evaluación de la patogenicidad en ratón de los 10 aislados de *T. vaginalis* se lleva a cabo siguiendo el mismo modelo descrito en el apartado B.3. de cribado *in vivo*, publicado por Nogal-Ruiz *et al.* (1997) y posteriormente implementado en el protocolo de cribado secuencial de agentes con actividad tricomonocida (Ibáñez-Escribano *et al.*, 2015).

D. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

El estudio de la variabilidad intraespecífica de los aislados de *T. vaginalis* se ha llevado a cabo mediante técnicas de análisis y secuenciación de regiones del ADN genómico total.

D.1. Extracción de ADN

D.1.1. Extracción de ADN mediante *kit*

La extracción de ADN genómico total se llevó a cabo siguiendo las pautas indicadas por el protocolo descrito en el kit *Speedtools DNA Extraction Kit* (Biotools B&M Labs. S.A.), a partir de 200 μ L de cada aislado en fase logarítmica de crecimiento.

- 1.- Se parte de 200 μ L de la muestra que se centrifugan en un eppendorf a 2000 r.p.m. (350g) durante 5 min para retirar el sobrenadante.
- 2.- El precipitado de trofozoítos, lavado con P.B.S. 1X, se incuba con 200 μ L de tampón de extracción comercial rico en agentes caotrópicos, que favorecen la lisis celular. A esta mezcla se le debe añadir 25 μ L de proteinasa K e incubar durante 10-15 min a 70 °C (Thermomixer compact, Eppendorf).
- 3.- A continuación, se adicionan 210 μ L de etanol, que favorece la unión del ADN a las partículas de sílica que componen la membrana de la columna de extracción.
- 4.- El ADN queda unido mediante enlaces débiles a la columna, realizándose a continuación, distintos lavados de la misma con los distintos tampones del *kit*.
- 5.- En un último paso, el ADN retenido en la columna se eluye mediante la adición de 100 μ L del tampón de elución. Este tampón es de baja fuerza iónica y pH ligeramente alcalino. El ADN puro extraído se conserva a -20 °C hasta su utilización (**Figura 39**).

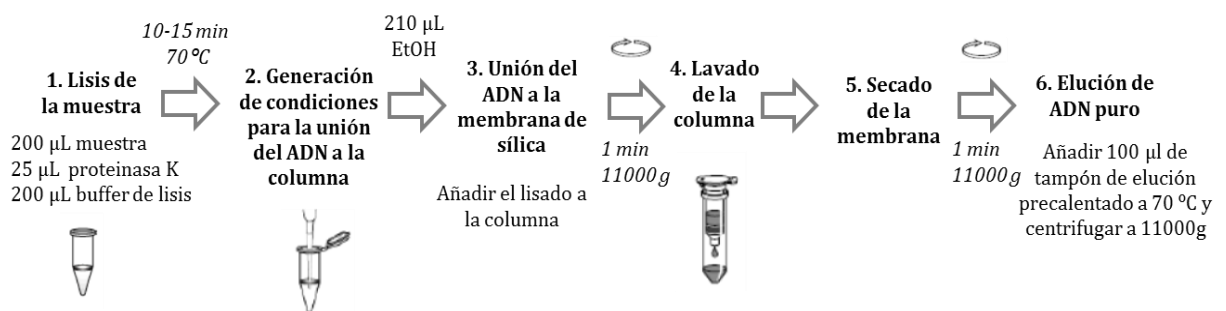


Figura 39: Esquema del protocolo de extracción de ADN mediante kit comercial.

D.1.2. Extracción de ADN mediante fenol-cloroformo

Para la extracción de ADN se requiere un cultivo del protozoo de 100 mL incubado durante 24-48 horas a 37 °C y 5% de CO₂.

Día 1:

- 1.- Se concentra el cultivo mediante centrifugaciones sucesivas a 350g (2000 r.p.m.) durante 5 minutos.
- 2.- Se desecha el sobrenadante y en un eppendorf se resuspende el precipitado de trofozoítos en cinco volúmenes (~1 mL) del tampón de extracción.
- 3.- Se añade a cada eppendorf 5 µL/mL de proteinasa K (Sigma Aldrich) resuspendida con agua ultrapura hasta una concentración de 20 µL/mL.
- 4.- Se incuba la muestra a 56 °C durante 2 h.
- 5.- Se reparte la muestra incubada en dos eppendorfs estériles (se busca un volumen final de trabajo de 0,5 mL) y se añade a cada eppendorf el mismo volumen de fenol.
- 6.- Las dos fases se mezclan mediante agitación vigorosa y posterior centrifugación a 400g (3000 r.p.m.) durante 5 minutos a 4 °C. El fenol es un compuesto orgánico (fase inferior) que favorece la precipitación de las proteínas y los restos lipídicos, separándose el material genético y las sales que se encuentran en la fase acuosa (fase superior).
- 7.- Se separan cuidadosamente, con una pipeta Pasteur de vidrio, la fase acuosa, donde se encuentran los ácidos nucleicos. A esta fase se le añade el mismo volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (48:1) con el fin de eliminar los restos de fenol que se hayan podido arrastrar durante el paso anterior. La mezcla se centrifuga durante 10 minutos a 400g (3000 r.p.m.) a 4 °C.
- 8.- Se desecha la fase orgánica y se procede a la precipitación de los ácidos nucleicos mediante la adición a la muestra de 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M muy frío y completar el volumen del eppendorf con etanol al 70% conservado a -20 °C.
- 9.- Se invierte sucesivamente el eppendorf y finalmente se deja precipitar la muestra durante toda la noche a -20 °C. Los cambios de temperatura al añadir el acetato y el etanol son importantes para lograr la precipitación del ADN.

Día 2:

- 10.- Se centrifuga la muestra durante 15 minutos a 7500g (13000 r.p.m.) y se elimina el sobrenadante dejando secar al aire los restos de fenol.
- 11.- Por último, se resuspende el botón de ADN en 50 µL de H₂O destilada estéril.

La concentración de ADN en solución se determina mediante lectura espectrofotométrica, exponiendo la muestra a luz ultravioleta. Los ácidos nucleicos absorben a 260 nm a razón de 1 unidad de densidad óptica (DO) por cada 50 µg/mL de ADN de cadena doble.

Asimismo, la pureza de la muestra extraída se evalúa mediante el cociente de las lecturas de absorbancias espectrofotométricas a $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$; que expresa la relación DNA/proteínas. Dicha relación debe ser: $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}} \geq 1,80$. Si el valor calculado es inferior a esa cifra significa que la muestra tiene una concentración de proteínas superior a la de una muestra de DNA puro teórico o que presenta impurezas, habitualmente restos de fenol. En tal caso, será necesario repetir la extracción con fenol-cloroformo.

D.2. Amplificación de ADN

La amplificación de ADN se realiza mediante el kit *Illustra™ PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads* (GE Healthcare), que incluye la Taq polimerasa recombinante (2,5 unidades/tubo), los nucleótidos (200 μM /dNTP), Tris-HCl (10 mM, pH 9), KCl (50 mM) y MgCl_2 (1,5 mM). Todos los componentes se encuentran liofilizados reduciendo de forma significativa el número de pasos de pipeteo y de esta forma disminuyendo el riesgo de contaminación.

En los ensayos para el estudio de las regiones ITS1-5.8S-ITS2 y SNP se han añadido los siguientes volúmenes:

Cebador directo (0,5 μM)	2 μL
Cebador reverso (0,5 μM)	2 μL
Muestra de ADN	5-10 μL
H ₂ O estéril c.s.p.	25 μL

Para el estudio de los MS se ha seguido los volumen estandarizados por Conrad *et al.* (2011):

Cebador directo (1,25 μM)	1 μL
Cebador reverso (5 μM)	5 μL
Fluorocromo (HEX/FAM) (5 μM)	5 μL
Muestra de ADN	5 μL
H ₂ O estéril c.s.p.	25 μL

La amplificación de la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2 se llevó a cabo empleando los cebadores diseñados por Felleisen (1997), mientras que la caracterización de los MS y SCG se realizó tomando como referencia la publicación de Conrad *et al.* (2011) (**Tabla 23**).

A partir del panel de 28 loci (21 MS y 7 SCG) propuestos por este equipo se escogieron los tres MS (006, 129 y 184) y los dos SCG (GP63a y PMS1) que mostraron más alelos para la caracterización de nuestros 10 aislados (**Tabla 24**).

Tabla 23: Cebadores empleados en la caracterización genómica.

Locus	Cebador	D./R.	Tm (°C)	% GC	Secuencia (5' - 3')
ITS	TFR2	D.	73,3	63,6	CGGTAGGTGAACCTGCCGTTGG
	TFR1	R.	72,5	56,5	TGCTTCAGTTCAGCGGGTCTTCC
MS	MS06-D	D.	83,1	48,7	GTCGTTTTACAACGTCGTGCGTGAAGGTTGAGCATGAGA
	MS06-R	R.	63,1	40,9	GAAAAACCTGAGGAACCAAAGA
	MS129-D	D.	80,2	48,7	GTCGTTTTACAACGTCGTGGCCTTGACCGATAAACTAGCC
	MS129-R	R.	63,4	42,1	GTTTATTGCCCGCCAAAAT
	MS184-D	D.	82,6	46,1	GTCGTTTTACAACGTCGTGCAGCAATTTGTTGTGGAGGA
	MS184-R	R.	65,2	45,0	GCTGCAAAGAAGGCACAAAA
	HEX	F.	59,2	47,3	[HEX]GTCGTTTTACAACGTCGTG
	FAM	F.	59,2	47,3	[FAM]GTCGTTTTACAACGTCGTG
	GP63-D	D.	61,8	39,1	TCTAAGATCTCAACAGCCAGAAA
	GP63-R	R.	71,7	47,8	AATGTCCTTGCCATCTGCTGCAA
SCG	PMS1-D1	D.	61,2	20,0	GTCAAAAAAATTTCAATCAAAATG
	PMS1-R1	R.	61,0	47,6	GAGTAACGGTCATATTGGCTG
	PMS1-D2	D.	58,5	43,4	GACTATCCTACGATGCTATTGAG
	PMS1-R2	R.	5,5	43,4	CTCAATAGCATCGTAGGATAGTC
	PMS1-RF	R.	67,8	57,8	CTCCGTGCGGACAATTCC

D.: Directo; R.: Reverso; F.: Fluorocromo

Tabla 24: Características de los tres MS y los dos SCG escogidos para la caracterización de los aislados de *T. vaginalis*.

Locus	Motivo/Nombre	Cromosoma	Alelos/nº SNP
MS006	TCC	III o IV	6
MS129	ATT	ND	4
MS184	TTG	III o IV	5
GP63a	Familia M8, metalopeptidasa tipo leishmanolisina		19
PMS1	Homólogo a MutI (proteína de reparación mediante mismatch)		13

Las reacciones de amplificación se realizan en un termociclador *Mastercycler gradient* Eppendorf®. Cada región va a emplear un programa de amplificación distinto que se muestra a continuación en la **tabla 25** (Felleisen, 1997; Conrad *et al.*, 2011).

Tabla 25: Programas de PCR empleados para la amplificación de los diferentes *loci*.

Loci	Fase	Ciclos	Temperatura	Tiempo	
ITS	I	Desnaturalización inicial	1	94 °C	10 min
		Desnaturalización		94 °C	1 min
	II	Hibridación	30	60 °C	1 min
		Elongación		72 °C	1 min
	III	Elongación final	1	72 °C	5 min
	IV	Fin		4 °C	∞
MS006	I	Desnaturalización inicial	1	95 °C	3 min
	II	Desnaturalización		95 °C	45 seg
		Hibridación	30	60 °C	1 min
		Elongación		72 °C	2 min
	III	Elongación final	1	72 °C	7 min
	IV	Fin		4 °C	∞
MS129 y MS184	I	Desnaturalización inicial	1	95 °C	2 min
		Desnaturalización		95 °C	30 seg
	II	Hibridación	30	47 °C	10 seg
		Pre-elongación		60 °C	10 seg
		Elongación		65 °C	45 seg
	III	Elongación final	1	72 °C	1 min
IV	Fin		4 °C	∞	
SCG (GP63a)	I	Desnaturalización inicial	1	95 °C	3 min
		Desnaturalización		95 °C	45 seg
	II*	Hibridación	40	55 °C	1 min
		Elongación		72 °C	2 min
	III	Elongación final	1	72 °C	7 min
	IV	Fin		4 °C	∞
SCG (PMS1)	I	Desnaturalización inicial	1	95 °C	3 min
		Desnaturalización		95 °C	45 seg
	II*	Hibridación	30	60 °C	1 min
		Elongación		72 °C	2 min
	III	Elongación final	1	72 °C	7 min
	IV	Fin		4 °C	∞

* En el programa de amplificación de los dos SCG, cada ciclo de la fase de elongación debe tener una extensión final de 5 seg.

D.3. Electroforesis de los productos de PCR

El análisis de los fragmentos se realiza mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% en el equipo *RunOne™ Electrophoresis System* (Embitec).

- 1.- Se añaden 2 µL de cada producto de PCR amplificado mezclado con el tampón de muestra a cada pocillo del gel.
- 2.- Se dejan correr las muestras durante 20 minutos a 100 V.
- 3.- Los geles se tiñen con bromuro de etidio (0,5 µg/mL), un agente intercalante, durante 10 min y, posteriormente, se retira el exceso de bromuro en baño de agua durante 5 min.

4.- Finalmente las bandas se visualizan mediante un transiluminador ultravioleta (Uvitec Durviz).

D.4. Purificación de ADN y secuenciación de los productos de PCR

Los productos de la amplificación se purifican previamente a su secuenciación. La purificación se realiza empleando el *kit* comercial *Illustra™ GFX™ PCR DNA and Band Purification Kit*. Se corrobora la presencia de bandas purificadas antes de llevarlas a la Unidad de Genómica mediante una nueva electroforesis en gel de agarosa y posterior tinción en bromuro de etidio.

Las regiones ITS1-5.8S ARNr-ITS2 y los SCG se han secuenciado en el Servicio de Secuenciación de la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid (CEI Campus Moncloa). Los cromatogramas se analizan manualmente con el programa ChromasPro y, posteriormente, se realizaran las alineaciones mediante ClustalW y el análisis de las mutaciones puntuales y estudios bioinformáticos con el paquete bioinformático Lasergene.

Sin embargo los MS no se han amplificado. La caracterización a través de estos loci se basa en comparar las diferencias en el tamaño del fragmento amplificado. Esta diferencia va a ser de tan sólo unos pocos nucleótidos, de manera que los polimorfismos entre amplicones no van a ser apreciables a través de una electroforesis en gel de agarosa. Para ello, Conrad *et al.* (2011) caracterizan los aislados mediante MS empleando cebadores a los que se les ancla un fluorocromo. De esta forma se puede conocer el tamaño exacto del amplicón. El fundamento de esta técnica fue diseñado por Oetting *et al.* (1995) y en términos generales se fundamenta en el anclaje en el extremo 5' del cebador directo una secuencia constante que también estará anclada al fluorocromo. La amplificación se lleva a cabo con el cebador directo, reverso y el fluorocromo que se unirá al extremo del amplicón. Siguiendo esta técnica, y tal y como se muestra en la **tabla 24**, los cebadores MS06-D, MS129-D y MS184-D muestran una secuencia de 19 nt (GTCGTTTTAACGTCGTG). Asimismo los dos fluorocromos HEX y FAM empleados para el marcaje de los MS también contienen la misma secuencia (**Figura 40**). Tras la amplificación en el laboratorio, los fragmentos se envían al Servicio de Genómica del Parque Científico de Madrid (CEI Campus Moncloa). Los resultados obtenidos del servicio de secuenciación se analizaron con el programa PeakScanner Software v 1.0.

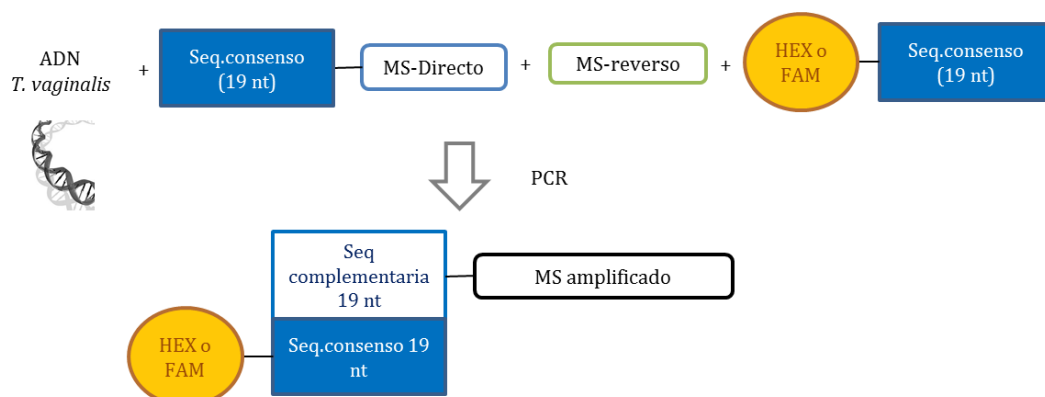


Figura 40: Esquema de la determinación de polimorfismos mediante MS empleando marcadores fluorescentes anclados a secuencias constantes.

V. Resultados

Resultados

I. PROCEDIMIENTO SECUENCIAL DE CRIBADO FARMACOLÓGICO FRENTE A *Trichomonas vaginalis*

A continuación se exponen los pasos orientados a la búsqueda racional de compuestos con actividad tricomónica, siguiendo el modelo de cribado secuencial descrito en Material y Métodos (**figura 31**).

Al final de este capítulo se reflejan los resultados de los ensayos *in vitro* realizados durante este periodo como integrante del grupo de Terapia Antiparasitaria. Se presentan de manera resumida las actividades mostradas por los extractos naturales y, a continuación, por las distintas series químicas evaluadas.

I.1. ENSAYOS *IN SILICO*

Tal y como se explica en el apartado de Métodos, en primer lugar, se generó una base de datos (BD) constituida por 592 moléculas. Todos los compuestos proceden de artículos científicos en revistas internacionales de impacto y de tesis doctorales sobre quimioterapia experimental frente a *T. vaginalis*. Los compuestos activos e inactivos se subdividieron en *clusters* mediante un análisis de conglomerados (*k*-means empleando distancia euclídea). A partir de los compuestos de cada *cluster*, se generaron las series de entrenamiento (SE) y predicción (SP) mediante selección aleatoria (**Tabla 26**).

Tabla 26: Número de moléculas que integran cada uno de los *clusters* obtenidos tras el análisis de conglomerados. A continuación se muestra el número de compuestos que conforman la SP y la SE tanto en el grupo de activos como de inactivos.

Grupo	Cluster	Moléculas totales	Nº Moléculas	
			SE	SP
ACTIVOS	1	18	13	5
	2	14	10	4
	3	29	22	7
	4	33	25	8
	5	39	29	10
	6	18	12	6
	7	28	21	7
	8	19	14	5
	9	12	9	3
	10	12	9	3
	11	25	19	6
	12	13	10	3

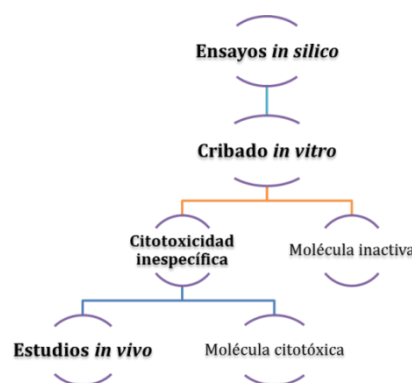


Figura 31: Diseño esquemático del método de cribado secuencial frente a *T. vaginalis*.

	1	48	36	12
	2	33	25	8
	3	46	34	12
	4	25	19	6
	5	26	19	7
	6	23	17	6
	7	11	8	3
INACTIVOS	8	17	13	4
	9	17	13	4
	10	18	13	5
	11	12	9	3
	12	11	8	3
	13	30	22	8
	14	10	7	3
	15	5	4	1

Los compuestos activos de la BD son 260 moléculas divididas en 12 *clusters*. Los grupos más pequeños están formados por 12 moléculas (grupos 9 y 10), mientras que el más numeroso cuenta con 39 entidades químicas (grupo 5). De los 332 compuestos inactivos, se generaron 15 *clusters*, existiendo tan sólo un grupo con 5 moléculas. El resto de agrupaciones cuentan con más de 10 compuestos, siendo el 1º y el 3º los de mayor tamaño con 46 y 48 entidades moleculares, respectivamente (**Tabla 26**).

El 25% de las moléculas de cada *cluster* se seleccionaron aleatoriamente para formar parte de la SP. El resto de moléculas conformaron la SE, a partir de la cual se diseñaron los modelos de predicción virtual. De esta forma, cada familia química (determinada por cada *cluster*) pudo estar representada en ambas series (**Figura 41**).

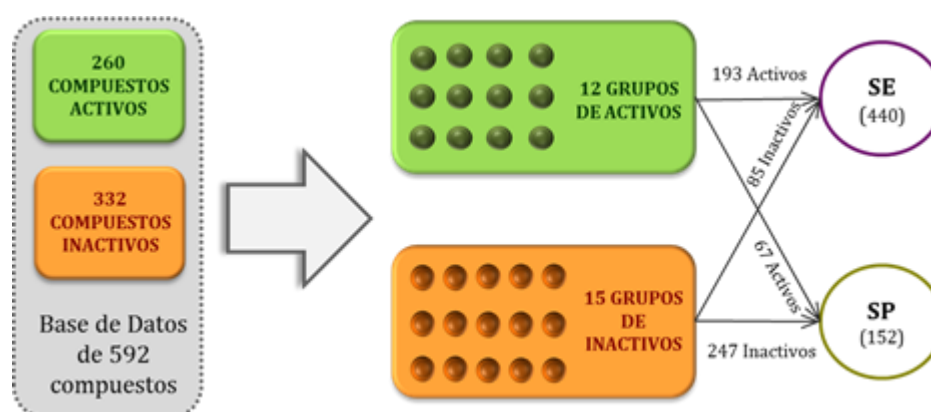


Figura 41: Diagrama esquemático sobre el proceso de generación de las series de entrenamiento (SE) y predicción (SP). La base de datos inicial de 592 compuestos (260 activos + 332 inactivos) se clasifica en grupos mediante análisis de conglomerados (*k*-MCA). Un 25% de las moléculas pasa a formar parte de la SP y el 75% restante conforman la SE.

Se obtuvieron un total de 45 modelos QSAR/ADL en función de las relaciones entre átomos empleando índices lineales (IL) no estocásticos (NS), estocásticos (SS), dobles estocásticos (DS) y de probabilidad mutua (PM). Se establecieron 10 modelos por cada una de las cuatro matrices empleadas. Los modelos 11, 22, 33 y 44 corresponden a modelos generales para cada una de las cuatro matrices. El modelo 45 corresponde al modelo general creado a partir de la combinación de los 4 modelos generales NS, SS, DS y PM. Se calcularon un total de 8960 variables distintas combinando matrices pseudográficas con y sin hidrógenos, así como descriptores moleculares (DM) locales y totales. En el **anexo I** se pueden consultar las variables empleadas para el diseño de todos los modelos.

La **tabla 27** muestra el poder predictivo de cada uno de los modelos individuales, determinado a partir de los parámetros estadísticos siguientes: porcentaje de buena clasificación/exactitud (Q), sensibilidad (Sens.), especificidad (Esp.) y razón de falsa alarma (RFA), así como otros valores estadísticos tales como el coeficiente de correlación de Matthews (C), la F de Fisher, la λ de Wilk's y la distancia de Mahalanobis (D^2). De acuerdo con los resultados paramétricos obtenidos en modelos de predicción anteriores, se consideran como adecuados los siguientes valores:

- ⇒ Porcentaje de buena clasificación/exactitud (Q) > 80%.
- ⇒ Sensibilidad (Sens.) > 80%.
- ⇒ Especificidad (Esp.) > 80%.
- ⇒ Razón de falsa alarma (RFA) < 10.
- ⇒ Coeficiente de Correlación de Matthews (C) > 0,7.
- ⇒ Lambda de Wilks (λ) < 0,5.
- ⇒ Distancia de Mahalanobis (D^2) > 4,5. Cuanto más elevado sea este valor, mayor distancia existe entre los centroides de los grupos de activos e inactivos.

El cribado *in silico* de nuevas series químicas, empleando los 45 modelos a la vez, supone un gasto excesivo de recursos, que requieren equipos informáticos muy potentes. Por todo ello, se procedió a la selección de aquellos modelos que calculando de forma conjunta y siguiendo el *Principio de Parsimonia* y la utilización de multclasificadores, mejoraran la selección de compuestos activos durante el proceso de cribado virtual. Todos los modelos se sometieron al método del ensamblaje empleando el software DSDE. En primer lugar, 28 de los 45 modelos fueron descartados, trabajando sólo con los 17 que mostraron mayor diversidad. Los modelos 2, 3, 8, 10, 13, 16, 17, 20, 22, 26, 32, 36, 39, 41, 43, 44 y 45 se sometieron a los procesos de ensamblaje mediante los métodos de voto mayoritario (V), promedio (A), máximo (X), mínimo (N) y mediana (M). Finalmente, se seleccionó la combinación formada por los modelos 22, 26 y 45 (**Tabla 28**), como la más adecuada para la predicción virtual de agentes tricomonocidas con porcentajes de sensibilidad y especificidad del 95,34% y el 97,87% para la SE, destacando el valor de RFA de tan sólo un 1,62%. Todos los valores estadísticos calculados a partir de los tres modelos combinados resultaron mejores que los modelos 22, 26 y 45 por separado.

Tabla 27: Parámetros estadísticos de cada uno de los 45 modelos QSAR/LDA basados en relaciones a átomos.

Modelo	Matriz	DM	λ Wilks	D ²	F	SE					SP				
						C'	Q	Sens.	Esp.	RFA	C'	Q	Sens.	Esp.	RFA
1		MA	0,417	5,658	(4,435) = 152,213	0,82	90,91	89,64	89,64	8,10	0,62	81,58	74,63	81,97	12,94
2		P	0,447	4,998	(5,434) = 107,318	0,78	88,86	93,26	83,33	14,57	0,70	84,87	89,55	78,95	18,82
3		E	0,357	7,281	(6,433) = 129,965	0,88	94,32	93,78	93,30	5,26	0,79	89,47	88,06	88,06	9,41
4		VdW	0,394	6,228	(6,433) = 111,177	0,84	92,05	89,12	92,47	5,67	0,73	86,84	79,10	89,83	7,06
5		CLogP	0,372	6,825	(5,434) = 146,547	0,84	91,82	94,30	87,92	10,12	0,65	82,89	79,10	81,54	14,12
6	NS	C	0,422	5,540	(4,435) = 149,016	0,81	90,68	89,12	89,58	8,10	0,77	88,82	85,07	89,06	8,24
7		D	0,421	5,562	(6,433) = 99,2832	0,78	89,09	87,05	87,96	9,31	0,71	85,53	82,09	84,62	11,76
8		TPSA	0,458	4,791	(8,431) = 63,8477	0,75	87,50	84,46	86,70	10,12	0,60	80,26	74,63	79,37	15,29
9		R	0,397	6,146	(9,430) = 72,6328	0,81	90,45	86,53	91,26	6,48	0,67	83,55	73,13	87,50	8,24
10		S	0,492	4,186	(7,432) = 63,8264	0,77	88,41	89,64	84,80	12,55	0,71	85,53	83,58	83,58	12,94
11		GEN	0,313	8,890	(7,432) = 135,706	0,88	93,86	90,16	95,60	3,24	0,76	88,16	80,60	91,53	5,88
12		MA	0,406	5,914	(6,433) = 105,573	0,80	90,00	87,05	89,84	7,69	0,62	80,92	67,16	86,54	8,24
13		P	0,438	5,180	(6,433) = 92,4692	0,73	86,59	85,49	84,18	12,55	0,72	86,18	86,57	82,86	14,12
14		E	0,377	6,689	(4,435) = 179,938	0,81	90,45	91,19	87,56	10,12	0,71	85,53	85,07	82,61	14,12
15		VdW	0,395	6,204	(3,436) = 223,041	0,82	90,91	89,12	90,05	7,69	0,68	84,21	74,63	87,72	8,24
16		CLogP	0,408	5,864	(5,434) = 125,898	0,81	90,45	89,64	88,72	8,91	0,65	82,89	82,09	79,71	16,47
17	SS	C	0,382	6,530	(8,431) = 87,0175	0,81	90,45	85,49	92,18	5,67	0,68	84,21	80,60	83,08	12,94
18		D	0,401	6,032	(5,434) = 129,512	0,81	90,45	89,64	88,72	8,91	0,69	84,87	82,09	83,33	12,94
19		TPSA	0,466	4,629	(6,433) = 82,6262	0,69	84,55	84,97	80,79	15,79	0,71	85,53	82,09	84,62	11,76
20		R	0,396	6,171	(7,432) = 94,2110	0,81	90,45	90,67	87,94	9,72	0,76	88,16	82,09	90,16	7,06
21		S	0,482	4,346	(5,434) = 93,3564	0,73	86,82	86,53	83,92	12,96	0,64	82,24	82,09	78,57	17,65
22		GEN	0,351	7,469	(4,435) = 200,914	0,85	92,73	89,64	93,51	4,86	0,76	87,50	74,63	96,15	2,35

Modelo	Matriz	DM	λ Wilks	D ²	F	SE					SP				
						C'	Q	Sens.	Esp.	RFA	C'	Q	Sens.	Esp.	RFA
23		MA	0,362	7,127	(8,431) = 94,9737	0,86	92,95	93,26	90,91	7,29	0,76	88,16	85,07	87,69	9,41
24		P	0,365	7,035	(7,432) = 107,401	0,83	91,59	95,34	86,79	11,34	0,70	84,87	85,07	81,43	15,29
25		E	0,365	6,817	(7,432) = 107,401	0,83	91,59	92,23	89,00	8,91	0,76	88,16	86,57	86,57	10,59
26		VdW	0,364	7,055	(7,432) = 107,696	0,85	92,73	93,26	90,45	7,69	0,69	84,87	77,61	86,67	9,41
27		CLogP	0,348	7,585	(8,431) = 101,087	0,83	91,36	91,71	88,94	8,91	0,60	80,26	73,13	80,33	14,12
28	DS	C	0,349	7,534	(8,431) = 100,403	0,83	91,82	91,19	90,26	7,69	0,75	87,50	86,57	85,29	11,76
29		D	0,367	6,968	(8,431) = 92,8573	0,83	91,59	95,34	86,79	11,34	0,73	86,84	86,57	84,06	12,94
30		TPSA	0,413	5,748	(7,432) = 87,7388	0,80	90,00	90,16	87,44	10,12	0,75	87,50	85,07	86,36	10,59
31		R	0,374	6,769	(7,432) = 103,332	0,83	91,82	91,71	89,85	8,10	0,69	84,87	80,60	84,38	11,76
32		S	0,524	3,668	(4,435) = 98,6701	0,73	86,59	89,64	81,60	15,79	0,70	84,87	89,55	78,95	18,82
33		GEN	0,348	7,586	(7,432) = 115,806	0,86	93,18	91,19	93,12	5,26	0,67	83,55	77,61	83,87	11,76
34		MA	0,413	5,746	(5,434) = 123,370	0,79	89,55	91,19	85,85	11,74	0,66	82,89	71,64	87,27	8,24
35		P	0,373	6,808	(8,431) = 90,7325	0,83	91,36	92,75	88,18	9,72	0,71	85,53	79,10	86,89	9,41
36		E	0,350	7,492	(7,432) = 114,375	0,85	92,73	91,71	91,71	6,48	0,72	86,18	80,60	87,10	9,41
37		VdW	0,367	6,976	(8,431) = 92,9611	0,84	91,82	93,78	88,29	9,72	0,69	84,87	82,09	83,33	12,94
38		CLogP	0,372	6,814	(6,433) = 121,633	0,83	91,59	92,23	89,00	8,91	0,67	83,55	76,12	85,00	10,59
39	PM	C	0,451	4,921	(8,431) = 65,5858	0,76	88,41	84,97	88,17	8,91	0,79	89,47	85,07	90,48	7,06
40		D	0,423	5,521	(8,431) = 73,5714	0,80	90,00	92,75	85,65	12,15	0,71	85,53	80,60	85,71	10,59
41		TPSA	0,495	4,122	(7,432) = 62,9171	0,67	83,86	82,90	80,81	15,38	0,63	81,58	71,64	84,21	10,59
42		R	0,397	6,138	(6,433) = 109,564	0,81	90,68	90,67	88,38	9,31	0,73	86,84	83,58	86,15	10,59
43		S	0,499	4,639	(6,433) = 72,5717	0,75	87,50	87,56	84,50	12,55	0,73	86,84	85,07	85,07	11,76
44		GEN	0,326	8,344	(8,431) = 111,191	0,88	94,32	93,26	93,75	4,86	0,69	84,87	79,10	85,48	10,59
45	NS+SS+DS+PM		0,264	11,260	(8,431) = 150,058	0,91	95,45	95,85	93,91	4,86	0,78	88,82	80,60	93,10	4,71

Tabla 28: Coeficiente de correlación de Matthews (C'), porcentajes de exactitud (Q) y razón de falsa alarma (RFA) obtenidos para las combinaciones de 2 a 5 modelos mediante distintos métodos de ensamblaje implementados en el software multclasificador DSDE.

Modelos	SE			SP			Método algebraico ^a
	C'	Q	FAR	C'	Q	FAR	
26, 45	0,931	96,59	3,64	0,774	88,82	5,88	A
26, 45	0,931	96,59	3,64	0,774	88,82	5,88	X
26, 45	0,931	96,59	3,64	0,774	88,82	5,88	M
44, 45	0,894	94,77	4,05	0,720	86,18	8,24	N
2, 3, 44	0,945	97,27	3,24	0,747	87,50	11,76	A
2, 3, 44	0,945	97,27	3,24	0,800	90,13	9,41	M
2, 3, 44	0,945	97,27	3,24	0,800	90,13	9,41	V
3, 26, 45	0,945	97,27	2,43	0,786	89,47	7,06	A
3, 44, 45	0,871	93,64	4,45	0,746	87,50	8,24	N
22, 26, 45	0,940	97,05	1,62	0,805	90,13	2,35	X
3, 22, 26, 45	0,945	97,27	1,62	0,830	91,45	2,35	X
3, 32, 44, 45	0,941	97,05	4,05	0,773	88,82	9,41	M
3, 36, 44, 45	0,857	92,95	6,07	0,706	85,53	9,41	N
3, 10, 22, 26, 44	0,945	97,27	3,24	0,800	90,13	7,06	A
3, 10, 22, 26, 44	0,954	97,73	2,83	0,787	89,47	9,41	M
3, 10, 22, 26, 44	0,954	97,73	2,83	0,787	89,47	9,41	V
3, 22, 26, 36, 45	0,945	97,27	2,02	0,828	91,45	3,53	X
3, 26, 36, 44, 45	0,829	91,59	7,29	0,680	84,21	9,41	N

^a V: Voto mayoritario; A: Media; X: Máximos; N: Mínimos; M: Mediana

Los tres modelos seleccionados se validaron mediante dos procesos distintos, a fin de determinar la robustez del poder predictivo de los mismos. A continuación, se muestran los resultados obtenidos tras la validación cruzada, dejando fuera un 5%, 10%, 15%, 20% y 25% de los compuestos de la SE. La **gráfica 42** confirma la robustez de los modelos finales, manteniendo un poder predictivo alto incluso tras retirar el 25% del total de moléculas. Los porcentajes de exactitud superan el 90% en todos los casos, mientras que la RFA se encuentra por debajo del 7,5% en todos los casos.

Los resultados del segundo método de validación mediante la aleatorización de la variable respuesta se muestran en la **figura 43**. La gráfica de barras muestra como cada uno de los modelos va reduciendo progresivamente su sensibilidad y especificidad a medida que se incrementan los falsos positivos y negativos tras intercambiar al azar porcentajes crecientes de moléculas del grupo de activos al de inactivos y viceversa. Todos los cálculos numéricos obtenidos tanto en la VC como en el proceso de aleatorización de la variable respuesta se pueden consultar en los **anexos II y III** respectivamente.

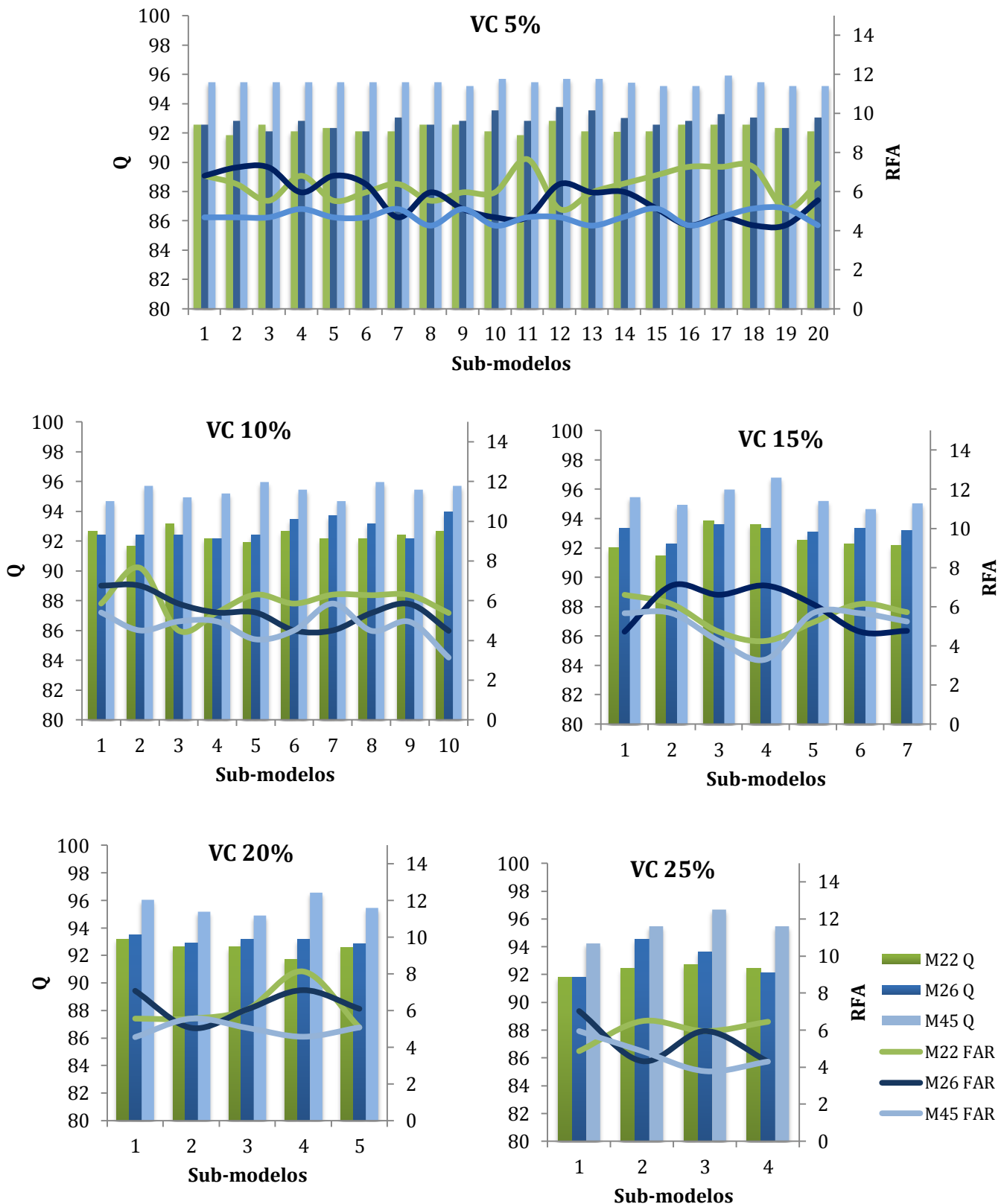


Figura 42: Representación gráfica de los parámetros de exactitud (Q) y razón de falsa alarma (RFA) mediante barras y líneas respectivamente. Cada sub-modelo se genera tras retirar todos los compuestos que conforman la SE en proporciones del 5%, 10%, 15%, 20% y 25%. Este método de validación interna denominado validación cruzada (VC) se llevó a cabo en los tres modelos (M22, 26 y 45) seleccionados por los sistemas multclasificadores.

La **figura 43** refleja los resultados obtenidos tras la validación mediante aleatorización de la variable respuesta. Como reflejan las tres gráficas, los valores de exactitud y RFA muestran un empeoramiento en la capacidad predictiva de los mismos a medida que se incrementa el porcentaje de moléculas de la SE que se intercambian del grupo de activos a inactivos y viceversa.

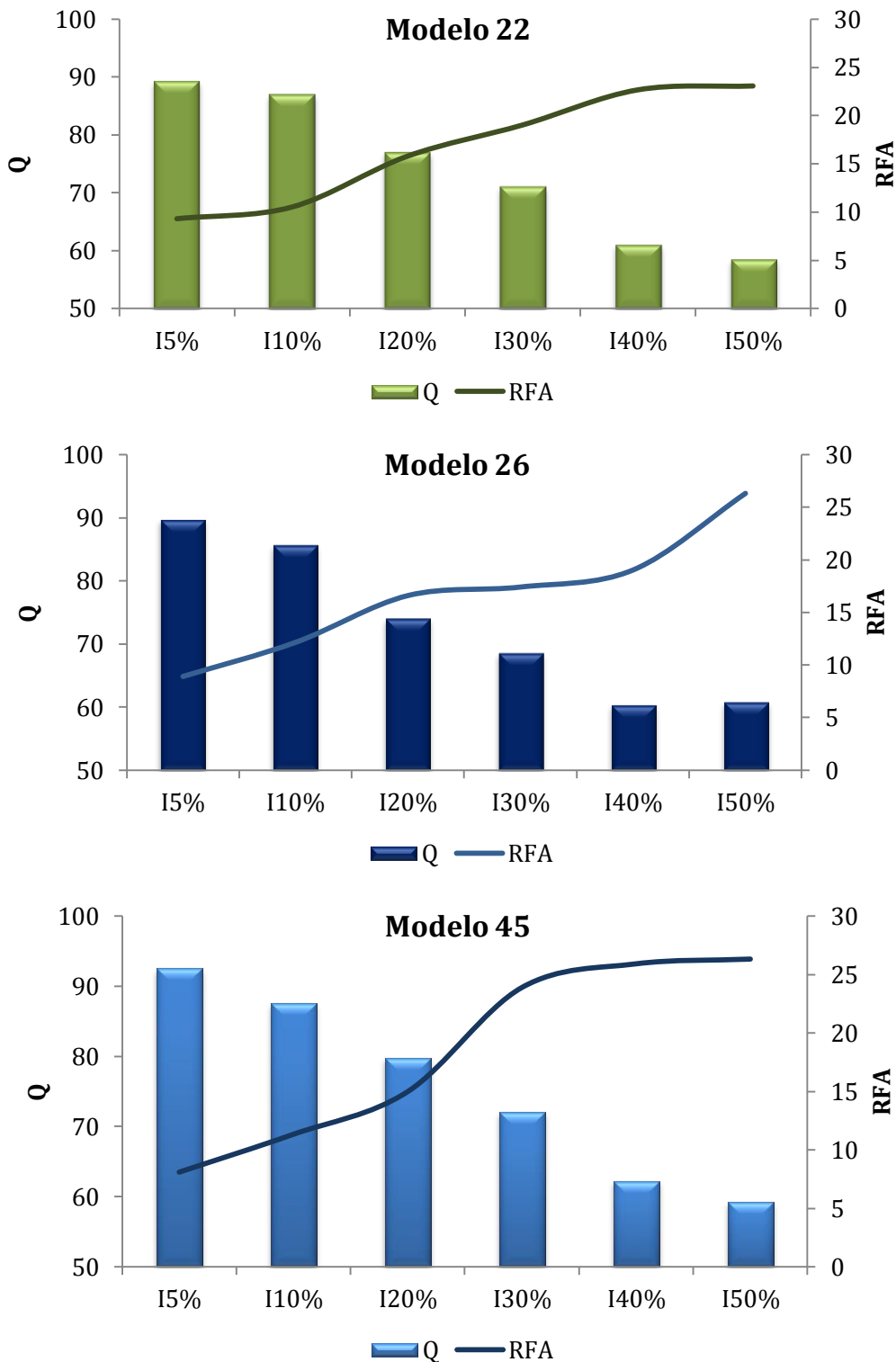


Figura 43: Resultados de validación interna mediante el proceso de aleatorización de la variable respuesta para los tres modelos individuales seleccionados mediante el ensamblaje.

Finalmente y como determinación de la calidad de los modelos, se llevó a cabo una validación externa de los tres modelos combinados a través de la SP, mostrando valores de exactitud del 90,13%, una sensibilidad por encima del 80% y una especificidad y RFA especialmente altas con porcentajes del 96,43% y 2,35% respectivamente.

Las tres ecuaciones que corresponden a los tres modelos individuales definidos mediante ADL son:

$$\text{Clasif (22)} = -6,027 - 4,669 {}^m f_{2L}^H(X_p) + 4,992 {}^m f_{3L}^H(X_p) - 1,5 {}^r f_{1L}^H(X_A) + 1,613 {}^r f_{5L}^H(X_A)$$

$$\text{Clasif (26)} = -6,772 - 2,287 \times 10^{-1} {}^v f_{3L}^H(X_A) - 8,377 \times 10^{-2} {}^v f_{1L}^H(X_D) + 9,186 \times 10^{-1} {}^v f_{4L}^H(X_p) - 9,315 \times 10^{-1} {}^v f_{10L}^H(X_p) + 6,239 \times 10^{-1} {}^v f_{12L}^H(X_x) - 2,513 \times 10^{-1} {}^v f_{13L}^H(X_A) - 4,92 \times 10^{-1} {}^v f_{7L}^H(X_x)$$

$$\text{Clasif (45)} = -4,228 - 3,391 {}^c f_{1L}^H(X_C) + 5,589 {}^c f_{1L}^H(X_x) + 4,567 \times 10^{-1} {}^c f_{3L}^H(X_x) - 1,072 {}^r f_{2L}^H(X_A) + 1,196 {}^r f_{6L}^H(X_A) - 4,659 {}^e f_{1L}^H(X_{MP}) + 1,338 \times 10 {}^a f_0^H(X_{MP}) - 5,814 \times 10 {}^a f_{2L}^H(X_{MP})$$

I.2. ENSAYOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

El método de cribado secuencial implica que las moléculas seleccionadas por los modelos *in silico* como potencialmente tricomonocidas pasan al siguiente filtro: el ensayo *in vitro*. Los agentes químicos se someten a ensayos de actividad tricomonocida *in vitro* para determinar la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀). Uno de los objetivos propuestos en esta Tesis Doctoral ha sido estandarizar un procedimiento nuevo que permita ensayar un número de moléculas mayor de forma más rápida y sensible empleando el colorante redox resazurina.

I. 2. A. Estandarización del método fluorimétrico empleando resazurina para el cribado *in vitro* de moléculas químicas frente a *T. vaginalis*

Para la estandarización del método de cribado *in vitro* se ajustaron las siguientes condiciones: número de parásitos iniciales, medio de cultivo durante la determinación fluorimétrica, concentración *stock* de resazurina y tiempo de incubación con el colorante redox.

Durante la estandarización de los parámetros, se detectó la reducción de resazurina a resorufina en presencia del medio de cultivo TYM sin la presencia de parásitos (**Figura 44**, pocillo A). El diagrama de barras de la **figura 44** muestra que la fluorescencia registrada en los pocillos que contenían el indicador disuelto en el medio TYM, era incluso superior a la de los pocillos con parásitos vivos y resazurina. A pesar de repetir los estudios empleando un medio TYM modificado (sin L-cisteína y el ácido ascórbico), la detección de fluorescencia se siguió produciendo (pocillo C).

Teniendo en cuenta estos resultados, finalmente el protocolo se ajusta para el mantenimiento de los parásitos (10⁵ *T. vaginalis*/mL) en tubos de vidrio con el medio de cultivo TYM sin modificar durante 24 horas en contacto con el compuesto químico a ensayar. A continuación, se añaden 200 µL de cada tubo a cada pocillo de la placa de 96 pocillos de fondo plano, valorando cada concentración por triplicado. Antes de añadir el revelador, se centrifuga la placa y se elimina el medio de cultivo. Los parásitos que se

encuentran el en fondo del pocillo son resuspendidos en medio PBS suplementado con un 0,1% de glucosa y finalmente se añaden 20 μ L de resazurina como sustrato revelador.

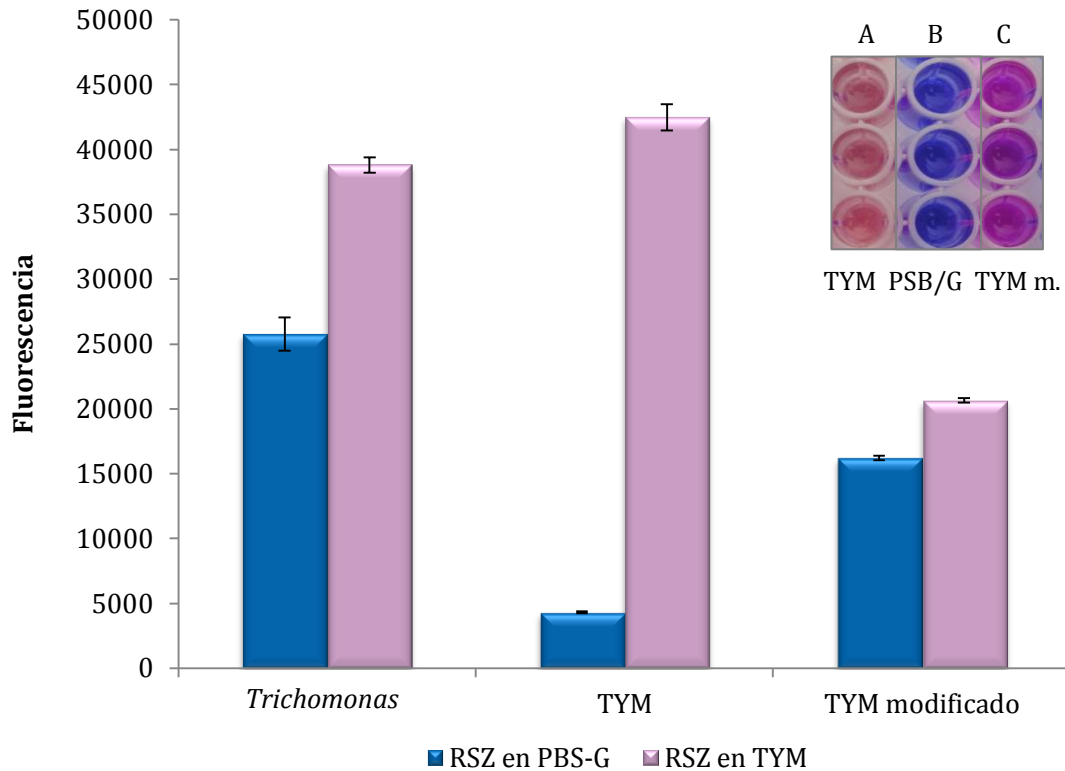
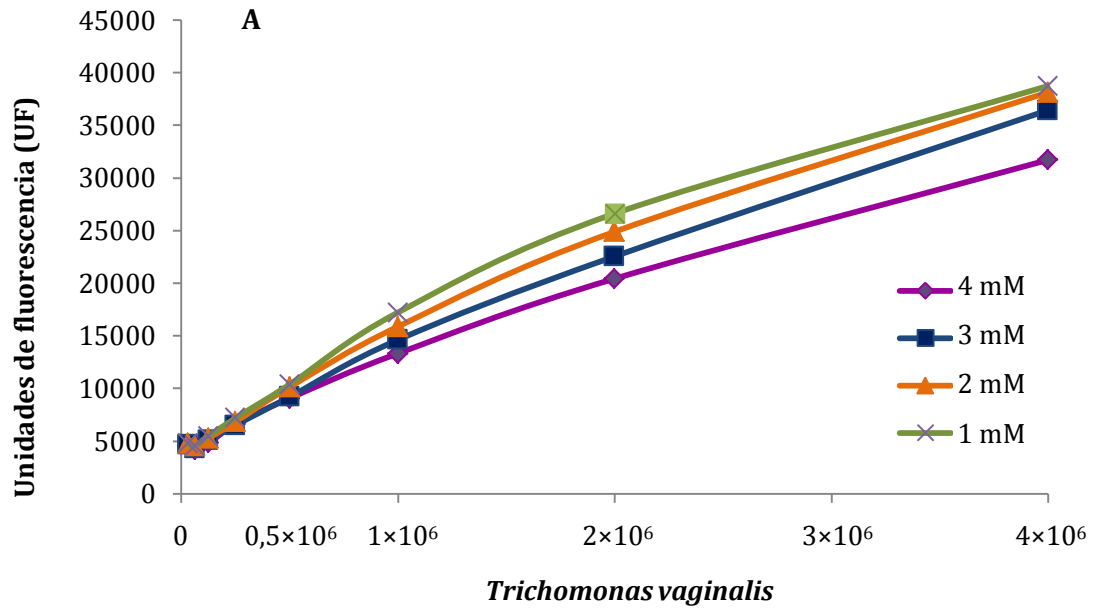


Figura 44: Gráfico comparativo de la intensidad de fluorescencia detectada en presencia (primer grupo de barras) y ausencia de parásitos (segundo y tercer grupo de barras) en dos condiciones: sustituyendo el medio de cultivo por PBS/glucosa (barras azules) y sin sustituir (barras moradas). En el extremo superior derecho del diagrama de barras se observa una foto tomada tras la incubación del sustrato durante 1 h con distintos blancos: medio TYM fresco (A), PBS-glucosa (B) y TYM modificado sin L-cisteína ni ácido ascórbico (C). La gráfica muestra la media y la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

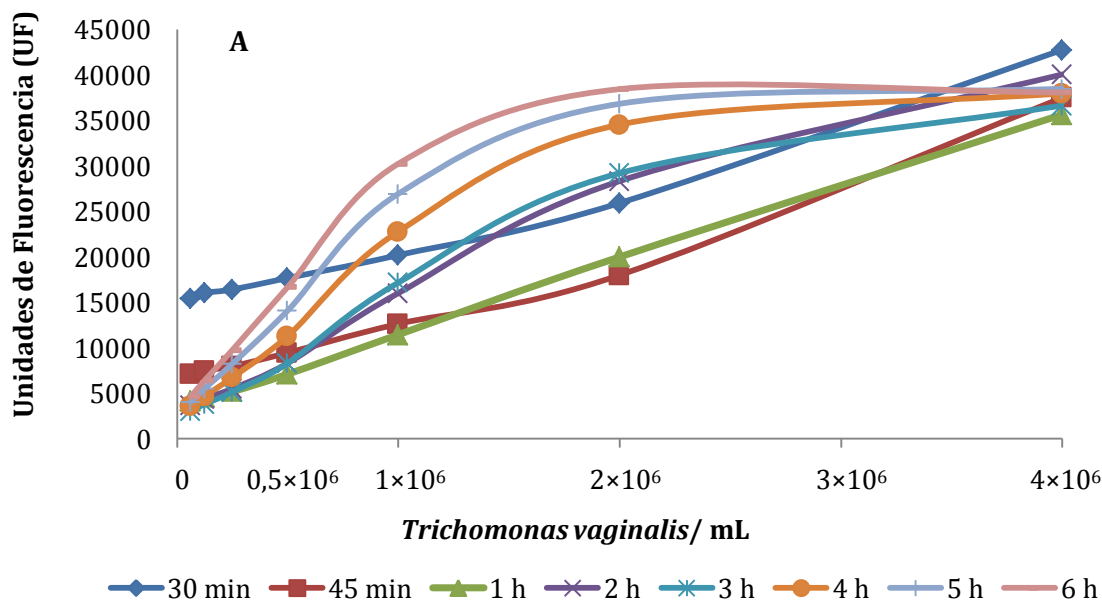
Tras escoger el medio más adecuado para revelar la prueba con este colorante, se continuó la estandarización determinando la concentración de resazurina óptima. Para ello se llevaron a cabo varias curvas de crecimiento incubando cuatro concentraciones *stock* del colorante redox disueltas en PBS (4, 3, 2 y 1 mM) con concentraciones crecientes de parásitos ($6 \times 10^4 - 4 \times 10^6$ parásitos/mL), revelando la placa a distintos tiempos. Se persigue que la intensidad de fluorescencia sea proporcional al crecimiento del parásito en la medición colorimétrica o fluorimétrica. La concentración de resazurina de 3 mM ($R^2 = 0,9916$) es la que mostró el coeficiente de correlación mayor de entre las ensayadas en las curvas de crecimiento. Los resultados gráficos y numéricos de las lecturas fluorimétricas tras 1 h de incubación con el colorante redox se reflejan en la **gráfica 45**. Los valores de la **tabla B** reflejan las unidades de fluorescencia registradas por el fluorímetro calculadas a partir de 6 experimentos independientes.

**B**

Inóculo/mL	4 mM	3 mM	2 mM	1 mM
4×10^6	31715 ± 3692	36442 ± 1964	38139 ± 2483	38750 ± 1655
2×10^6	20437 ± 3565	22556 ± 4544	24896 ± 8516	26623 ± 8083
1×10^6	13335 ± 2384	14630 ± 2664	15887 ± 4012	17228 ± 4727
5×10^5	9068 ± 1527	9202 ± 1468	10141 ± 1957	10389 ± 2076
$2,5 \times 10^5$	6595 ± 1197	6521 ± 676	6829 ± 1049	7196 ± 1142
$1,25 \times 10^5$	4822 ± 1263	5115 ± 813	5266 ± 1015	5465 ± 1200
$6,25 \times 10^4$	4520 ± 1128	4320 ± 1139	4534 ± 1340	4552 ± 1267
R²	0,9868	0,9916	0,9841	0,9728

Figura 45: Resultados de las curvas de crecimiento de *T. vaginalis* en presencia de cuatro concentraciones distintas del colorante redox. **A.** Los resultados para cada punto corresponden a la media ± desviación estándar (D.S.) de 6 experimentos realizados de forma independiente. **B.** Fluorescencia registrada en los estudios de estandarización del inóculo y la concentración de resazurina tras incubar las placas 1 h a 37 °C.

Asimismo se definió el tiempo de incubación óptimo, realizando nuevas curvas de crecimiento a distintos tiempos (30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h y 6 h). La **figura 46.A** muestra los resultados en las distintas condiciones. La mayor linealidad en las curvas de estandarización se obtiene tras una incubación de 1 h con un coeficiente de correlación lineal de $R^2 = 0,9983$ para un rango de entre 6×10^4 hasta 4×10^6 parásitos/mL (**Figura 46.B**). La solución *stock* de resazurina tenía una concentración de 3 mM en dicha estandarización.

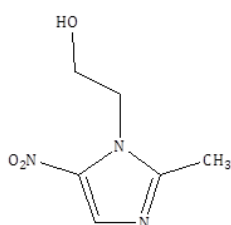
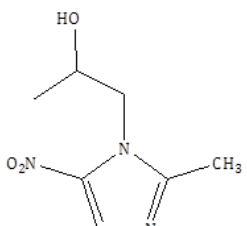
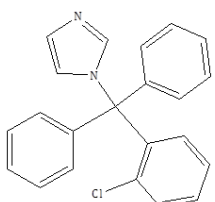
**B**

Tiempo	Pendiente (b)	Ordenada en el origen (a)	R ²
30 min	0,0066	14357,0	0,9713
45 min	0,0069	5747,3	0,9910
1 h	0,0076	4268,0	0,9983
2 h	0,0083	4861,4	0,9728
3 h	0,0085	5755,4	0,9359
4 h	0,0086	7960,3	0,8574
5 h	0,0087	8784,1	0,8440
6 h	0,0087	9340,2	0,8334

Figura 46: Resultados obtenidos tras la incubación con resazurina (3 mM) de concentraciones crecientes del parásito a distintos tiempos (30 min hasta 6 h). **A)** Gráfica representativa de la fluorescencia registrada a los distintos tiempos. **B)** Tabla resumen con los parámetros obtenidos para cada curva de crecimiento. Los resultados se han obtenido a partir de 6 experimentos independientes.

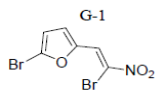
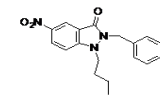
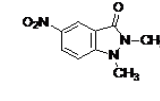
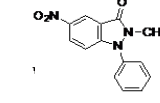
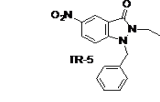
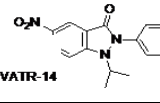
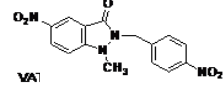
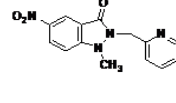
Una vez puestos a punto los parámetros más importantes de la metodología a seguir, se procedió a la determinación de la actividad farmacológica *in vitro* de tres fármacos activos frente a *T. vaginalis* (metronidazol, secnidazol y clotrimazol), así como de moléculas de síntesis. El cribado *in vitro* se realizó mediante el método recién estandarizado de la resazurina, en paralelo con el recuento en cámara Neubauer (**tablas 29 y 30**). Tanto los fármacos como los derivados sintéticos ensayados mostraron porcentajes de inhibición de crecimiento (%IC) similares por ambos métodos, no existiendo diferencias estadísticamente significativas tras la comparación no paramétrica de los resultados ($p < 0,05$). Los valores de concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) para el metronidazol fueron de $0,579 \pm 0,07 \mu\text{g/mL}$ en los ensayos con resazurina y de $0,563 \pm 0,05 \mu\text{g/mL}$ en el recuento hemocitométrico en microscopio. Los valores de actividad del secnidazol (CI_{50-RSZ} = $0,389 \pm 0,04 \mu\text{g/mL}$ vs. CI_{50-Neubauer} = $0,234 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$) y del clotrimazol (CI_{50-RSZ} = $3,459 \pm 0,43 \mu\text{g/mL}$ vs CI_{50-Neubauer} = $2,786 \pm 0,89 \mu\text{g/mL}$) también fueron semejantes.

Tabla 29: Comparación de la actividad tricomónica de tres fármacos evaluados mediante el método fluorimétrico revelado con resazurina frente al recuento hemocitométrico en el microscopio.

Fármacos de referencia	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Inhibición de Crecimiento (%) ^a		Estructuras
		Resazurina	Neubauer	
Metronidazol	2	100	94,9	
	1	92,1	91,5	
	0,5	77,6	81,1	
	0,25	46,1	51,6	
	0,125	20,2	19,9	
	0,0625	14,0	3,8	
Secnidazol	2	99,9	100	
	1	92,1	95,0	
	0,5	75,4	79,7	
	0,25	48,8	55,1	
	0,125	30,6	45,7	
	0,0625	31,2	30,0	
Clotrimazol	10	100	84,6	
	5	79,3	75,5	
	2,5	54,9	65,5	
	1,25	41,5	51,7	
	0,625	36,5	21,5	

^a Los datos de inhibición de crecimiento se han obtenido a partir de al menos tres experimentos independientes. Todos los resultados promedio mostraron valores de desviación estándar por debajo del 10%.

Tabla 30: Comparación de la actividad tricomonocida de varios compuestos de síntesis mediante el método fluorimétrico revelado con resazurina frente al recuento hemocitométrico en el microscopio.

Compuestos de síntesis	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Inhibición de Crecimiento (%) ^a		Estructuras
		Resazurina	Neubauer	
G-1	20	100	100	
	10	100	100	
	5	100	100	
VATR 7	100	62,4	78,2	
	10	0	0	
	1	0	0	
VATR 11	100	98,0	99,9	
	10	0	0	
	1	0	0	
VATR 14	100	5,6	11,4	
	10	0	9,0	
	1	0	3,1	
VATR 16	100	46,0	76	
	10	0	0	
	1	0	0	
VATR 19	100	38,7	37,6	
	10	0	0	
	1	0	0	
VATR 54	100	95,8	96,5	
	10	33,9	35,8	
	1	0	0	
VATR 64	100	86,4	90,8	
	10	0	2,1	
	1	0	0	

^a Los datos de inhibición de crecimiento se han obtenido a partir de al menos tres experimentos independientes. Todos los resultados promedio mostraron valores de desviación estándar por debajo del 10%.

La calidad del método propuesto se define como potencialmente excelente tras el cálculo del factor Z' . El valor de Z' es 0,8 ($Z' = 0,8$; $1 > Z' \geq 0,5$); siguiendo el criterio descrito por Zhang *et al.* (1999).

I. 2. B. Cribado farmacológico *in vitro* de nuevos agentes tricomonidas

I.2.B.1. Actividad farmacológica de extractos naturales

Artemisia absinthium

Se ha evaluado la actividad tricomonida y la citotoxicidad inespecífica de un aceite esencial de *Artemisia absinthium* var. *candial*. En la **tabla 31**, se muestra la actividad tricomonida del aceite esencial extraído por arrastre de vapor y de las nueve fracciones a través de cromatografía en columna (Martínez-Díaz *et al.*, 2015). Tanto el aceite esencial puro como las fracciones 1 y 4 presentaron una actividad tricomonida relevante con valores de CI_{50} entre 70 y 100 $\mu\text{g/mL}$. Asimismo, se evaluó *in vitro* el efecto del cariofileno y del crisantenol, dos de los componentes mayoritarios presentes en el aceite esencial (**tabla 12**). La actividad de ambos componentes fue del 100% a la máxima concentración ensayada con una CI_{50} , en ambos casos, de aproximadamente 75 $\mu\text{g/mL}$.

Tabla 31: Porcentaje de actividad tricomonida del aceite esencial puro ICA11, las 9 fracciones (F1-F9) y los dos compuestos químicos (cariofileno y crisantenol). También se indica la CI_{50} y los límites de confianza tras el análisis Probit.

Comp.	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)						CI_{50}	Límite de confianza
	500	250	100	75	37,5	18,75		
ICA11	99,1 \pm 0,4	87,4 \pm 1,3	53,7 \pm 0,5	51,7 \pm 3,3	14,5 \pm 2,4	0,8 \pm 1,2	87,2	[78,5-97]
F1	99,3 \pm 0,2	98,8 \pm 0,2	81,6 \pm 0,2	47,6 \pm 3,8	10,3 \pm 2,0	0,4 \pm 0,5	71,5	[58-88,2]
F2	100 \pm 0	44,3 \pm 5,6	11,8 \pm 4,0	2,7 \pm 3,9	1,2 \pm 1,7	0 \pm 0	218,5	[148-364]
F3	35,5 \pm 0,1	12,2 \pm 2,9	10,3 \pm 2,0	0,4 \pm 0,5	1,0 \pm 1,4	0 \pm 0	680,0	[545-1026]
F4	99,5 \pm 0,1	99,4 \pm 0,1	39,1 \pm 0,2	27,0 \pm 3,2	4,0 \pm 0,1	0 \pm 0	102,8	[83-136,5]
F5	99,3 \pm 0,4	43,3 \pm 2,6	2,4 \pm 3,4	3,7 \pm 5,3	0,0 \pm 0,0	0 \pm 0	234,6	[112-380]
F6	71,6 \pm 1,3	36,5 \pm 1,8	4,7 \pm 6,6	2,5 \pm 3,6	0,4 \pm 0,6	0 \pm 0	327,0	[290-375]
F7	100 \pm 0	47,9 \pm 4,3	27,0 \pm 6,8	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	198,6	[119-415]
F8	99,9 \pm 0,6	92,2 \pm 0,1	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	171,5	[157-186]
F9	4,7 \pm 6,7	1,7 \pm 2,5	0 \pm 0	1,7 \pm 2,4	0 \pm 0	0,5 \pm 0,7	-	-
Cariofil.	100 \pm 0	99,0 \pm 0,2	80,3 \pm 7,3	53,7 \pm 2,2	34,3 \pm 6,0	19,9 \pm 8,5	68,7	[57,9-76,4]
Crisant.	100 \pm 0	96,3 \pm 1,4	54,5 \pm 5,9	45,4 \pm 2,5	40,9 \pm 0,8	2,1 \pm 0,8	86,7	[77,1-95,5]

Los porcentajes de actividad expresan la media \pm D.S. de tres experimentos independientes

El aceite esencial mostró un porcentaje de citotoxicidad de $15,8 \pm 7,47$ a 300 $\mu\text{g/mL}$, mientras que las dos fracciones más activas (F1 y F4) mostraron una citotoxicidad inespecífica elevada, por encima del 80% a la misma concentración. El perfil citotóxico se mantuvo en F1 a 150 $\mu\text{g/mL}$, reduciendo la toxicidad de forma prácticamente total a partir de 75 $\mu\text{g/mL}$ tal y como muestra la **figura 47**. El perfil citotóxico de F4 disminuyó a la mitad a 150 $\mu\text{g/mL}$. Sin embargo, mantiene la citotoxicidad inespecífica por encima del 25% hasta una concentración de 18,75 $\mu\text{g/mL}$.

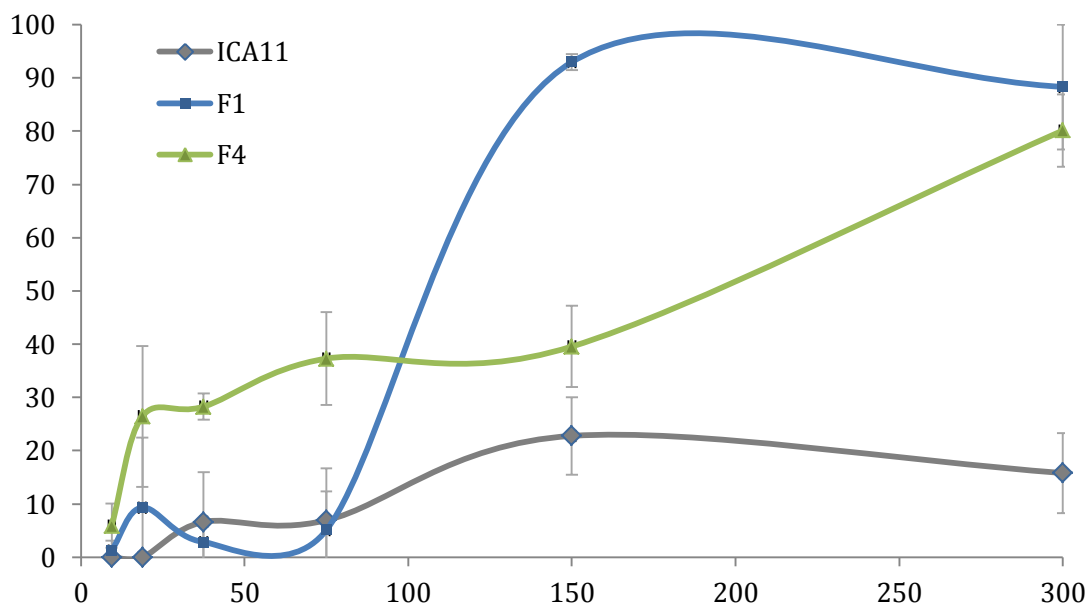


Figura 47: Representación gráfica de la citotoxicidad inespecífica media frente a macrófagos murinos J774, del aceite esencial ICA11 y de las dos fracciones más activas F1 y F4.

3,3'-Diindolilmetano (DIM)

La **tabla 32** muestra la actividad del DIM frente a dos aislados de *T. vaginalis*, así como la citotoxicidad inespecífica frente a células Vero. El compuesto natural mostró una actividad moderada frente al aislado sensible a metronidazol JH31A4 con una CI_{50} de 48,8 μM . La citotoxicidad inespecífica también fue elevada, por encima del 20% a partir de 50 μM . El índice de selectividad (IS) del compuesto fue de 4,21.

Tabla 32: Inhibición de crecimiento de *T. vaginalis* (actividad tricomonocida) y de células Vero (citotoxicidad inespecífica) tras 24 h de contacto con distintas concentraciones de DIM.

Conc. (μM)	Actividad tricomonocida					Citotoxicidad inespecífica		
	JH31A4		IR78					
300	94,6	\pm 6,9	90,8	\pm 0,1	59,3	\pm 8,2		
200	92,5	\pm 7,5	89,4	\pm 1,1	48,2	\pm 7,1		
150	78,1	\pm 6,6	81,9	\pm 3,9	40,5	\pm 9,0		
100	62,6	\pm 5,8	66,9	\pm 4,7	36,5	\pm 6,4		
50	40,5	\pm 6,5	38,5	\pm 6,9	26,4	\pm 9,9		
25	20,2	\pm 5,1	26,5	\pm 9,3	11,3	\pm 8,4		
CI_{50}/CC_{50}	48,8	[54,8-70,9]	73,9	[61,6-84,9]	205,4	[164,7-278,1]		

La actividad está expresada en porcentaje. Los valores muestran la media \pm D.S.

La **tabla 33** muestra el efecto tricomonocida de la combinación de concentraciones variables de DIM con dos concentraciones del fármaco de referencia. Las dos concentraciones de MTZ corresponden a las CI_{50} (1,58 μM) y CI_{25} (0,9 μM) frente al aislado JH31A4 de *T. vaginalis*. Resalta la disminución significativa del efecto citotóxico del compuesto DIM al combinarse con el MTZ. Los resultados estadísticos tras aplicar la

prueba no paramétrica de Wilcoxon para muestras relacionadas, confirma la diferencia estadísticamente significativa al comparar las medianas de los resultados de citotoxicidad de DIM cuando se administra sólo o combinado con las dos concentraciones de MTZ ($p < 0,05$).

Tabla 33: Porcentaje de actividad tricomonida y citotoxicidad inespecífica tras someter a los cultivos a una combinación de DIM y MTZ.

DIM conc (μM)	MTZ CI_{50} + DIM			MTZ CI_{25} + DIM		
	Act. tricomonida	Citotox. inespecífica		Act. tricomonida	Citotox. inespecífica	
300	100 \pm 0	0 \pm 0	0 \pm 0	99,8 \pm 0,2	5 \pm 7,2	
200	99,7 \pm 0,2	1,2 \pm 1,7		99,4 \pm 0,6	0 \pm 0	
150	97,1 \pm 0,7	3,9 \pm 5,5		98,3 \pm 0,4	2,4 \pm 3,4	
100	88,2 \pm 9,5	7,4 \pm 8,1		75,7 \pm 6,9	0 \pm 0	
50	65,5 \pm 17,4	5,5 \pm 0,2		51,1 \pm 9,7	0 \pm 0	
25	26,7 \pm 8,0	2,0 \pm 2,9		28,7 \pm 4,5	0 \pm 0	
$\text{CI}_{50}/\text{CC}_{50}$ IS	43,5 [20,1-59,7] > 6,90	>>300		44,5 [29,1-59,6] > 6,75	>>300	

I. 2. B. 2. Actividad farmacológica de nuevas moléculas de síntesis

Familia VATR (5-nitroindazoles)

Serie I

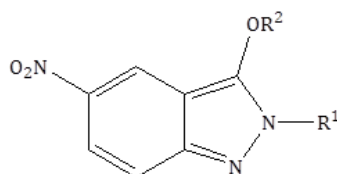
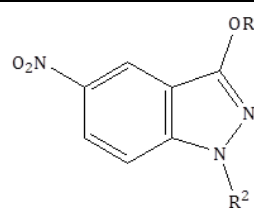
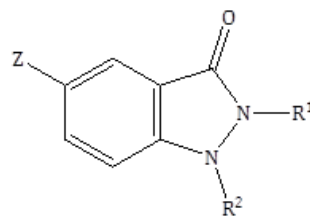
a) Actividad *in vitro*

Los resultados de inhibición de crecimiento (% IC) frente al aislado JH31A4 de *T. vaginalis* sensible al MTZ se reflejan en la **tabla 34**. El 41% (16/39) de los compuestos ensayados en este primer grupo muestran una actividad relevante, superior al 85%, a la máxima concentración ensayada. De todos ellos, los derivados **23**, **24**, **25** y **27** con estructura de 3-alcoxi-5-nitroindazol mantuvieron su actividad a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Solo los compuestos **23** y **24**, a la mínima concentración ensayada (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), presentaron actividades moderadas, de 43,1% y 37,8%, respectivamente.

Tabla 34: Actividad tricomonida de la serie IA (VATR 1-VATR 19) (indazolinonas 1,2-disustituidas), y de las series IB (VATR 20-VATR 24) y IC (VATR 25-VATR 39) (3-alcoxiindazoles sustituidos en posiciones 1 y 2, respectivamente).

Compuesto VATR	% IC (μM) ^a			Estructura química
	100 $\mu\text{g}/\text{mL}$	10 $\mu\text{g}/\text{mL}$	1 $\mu\text{g}/\text{mL}$	
1	94,7 (482,6)	41,2 (48,3)	0 (4,8)	
2	80,7 (425,1)	26,5 (42,5)	10,8 (4,3)	
3	24,3 (425,1)	14,1 (42,5)	0 (4,3)	
4	11,4 (371,4)	8,9 (37,1)	3,1 (3,7)	
5	89,2 (353,0)	10,3 (35,3)	1,2 (3,5)	
6	39,9 (371,4)	5,42 (37,1)	9,1 (3,7)	

7	52,3 (336,3)	35 (33,6)	0 (3,4)
8	37,6 (336,3)	0 (33,6)	0 (3,4)
9	87,5 (353,0)	22,1 (35,3)	5,5 (3,5)
10	31,3 (419,7)	8,2 (42,0)	36,9 (4,2)
11	90,1 (321,2)	27,8 (32,1)	37,9 (3,2)
12	52,3 (321,2)	35,0 (32,1)	0 (3,2)
13	63,3 (307,4)	0 (30,7)	0 (3,1)
14	84,2 (294,6)	0 (29,5)	0 (2,9)
15	46,9 (278,3)	0 (27,8)	0 (2,8)
16	12,0 (336,3)	26,2 (33,6)	0,2 (3,4)
17	93,4 (300,0)	27,1 (30,0)	10,5 (3,0)
18	95,3 (276,7)	14,7 (27,7)	1,0 (2,8)
19	47,9 (276,7)	25,1 (27,7)	24,5 (2,8)
20	100 (482,6)	35,1 (48,3)	25,7 (4,8)
21	92,4 (371,4)	29,2 (37,1)	1,0 (3,7)
22	100 (353)	37,1 (35,3)	0 (3,5)
23	97,6 (336,3)	64,2 (33,6)	43,1 (3,4)
24	69,2 (300,0)	60,6 (30,0)	37,8 (3,0)
25	100 (482,6)	58,0 (48,3)	0 (4,8)
26	93,9 (425,1)	31,7 (42,5)	11,2 (4,3)
27	90,4 (425,1)	67,8 (42,5)	6,6 (4,3)
28	NS	31,9 (35,3)	21,9 (3,5)
29	67,8 (371,4)	41,4 (37,1)	0,3 (3,7)
30	31,2 (336,3)	0 (33,6)	0 (3,4)
31	78,1 (353)	22,3 (35,3)	6,9 (3,5)
32	89,4 (321,2)	27,0 (32,1)	17,0 (3,2)
33	73,6 (321,2)	16,5 (32,1)	2,9 (3,2)
34	90,2 (307,4)	22,6 (30,7)	0 (3,1)
35	87 (294,6)	4,8 (29,5)	13,4 (2,9)
36	50,4 (278,3)	0 (27,8)	2,5 (2,8)
37	82,6 (300,0)	0 (30,0)	0 (3,0)
38	80,2 (276,7)	23,6 (27,7)	8,3 (2,8)
39	2,5 (276,7)	7,8 (27,7)	1 (2,8)
MTZ	100 (584,3)	100 (58,4)	96,8 (5,8)



Los resultados se expresan en porcentaje. Todos los resultados mostraron una desviación estándar por debajo del 10%.

NS = No soluble

^a La concentración micromolar (μM) correspondiente a las tres concentraciones ensayadas (100, 10 y 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se indica entre paréntesis.

b) Determinación *in silico* de propiedades fisicoquímicas y *drug-like scores* basadas en el software Molinspiration y OSIRIS.

Las propiedades fisicoquímicas más relevantes relacionadas con la biodisponibilidad oral de los cuatro compuestos más activos de esta primera serie (**23**, **24**, **25** y **27**) se muestran en la **tabla 35**. Las cuatro moléculas cumplen la regla de los 5 (RO5) de Lipinski, según la cual una molécula, para su buena biodisponibilidad oral debe no presentar más de cinco donadores de enlaces por puentes de H (Hd), ni más de diez aceptores de enlaces por puentes de hidrógeno (Ha), presentar un peso molecular (PM) menor de 500 y un coeficiente de reparto octanol-agua (CLogP) por debajo de 5. Asimismo, los porcentajes de absorción, calculados según los criterios de Zhao *et al.* (2002), mostraron valores más altos que el del fármaco de referencia (%Abs_{MTZ} = 76,75).





















Tabla 35: Determinación *in silico* de las propiedades farmacocinéticas asociadas a una buena biodisponibilidad oral y permeabilidad intestinal empleando el software Molinspiration.




COMP.	PM	CLogP	Ha	Hd	Viol. RO5	TPSA	Át.	Enlaces girat.	Vol.	%Abs*
23	297,31	3,613	6	0	0	72,884	22	5	263,138	91,25
24	333,34	4,587	6	0	0	72,884	25	4	290,328	93,83
25	207,19	1,809	6	0	0	72,884	15	2	174,687	84,79
27	235,24	2,548	6	0	0	72,884	17	3	208,076	86,8
MTZ	171,15	0,468	6	1	0	83,878	12	3	146,771	76,75
Rango	≤ 500	≤ 5	≤ 10	≤ 5	≤ 1	< 140	20-70	≤ 10	-	

* El porcentaje de absorción se calculó según la fórmula $\%Abs = 90 - 3,34Ha - 5,56Hd + 0,0716PM$ (Zhao *et al.*, 2002)

Los resultados del programa OSIRIS muestran ausencia de toxicidad en las moléculas **23** y **24**, mientras que las estructuras **25** y **27** presentan cierto riesgo de producir efectos mutagénicos y carcinogénicos. Asimismo, los valores de *Drug score* también fueron mayores en el caso de los dos primeros compuestos pertenecientes a la serie B (3-alcoxindazoles sustituidos en posición 1) con valores de 0,39 y 0,29, respectivamente, frente a valores inferiores a 0,2 de las otras dos entidades químicas con sustitución en posición 2 (serie IC). El fármaco de referencia también se ha sometido a esta evaluación presentando un riesgo elevado durante el embarazo y un *Drug score* de 0,51.

Tabla 36: Resultados de la evaluación *in silico* del riesgo mutagénico (Mut.), carcinogénico (Tum.), irritativo (Irrit.), efectos nocivos reproductivos (Efect. Rep.) y valores de *Drug score* de los compuestos más activos del grupo I de la familia química de 5-nitroindazoles empleando el software OSIRIS *Property Explorer*.

COMPUESTO	Mut.	Tum.	Irrit.	Efect. Rep.	<i>Drug score</i>
23					0,39
24					0,29
25					0,19
27					0,17
MTZ					0,51

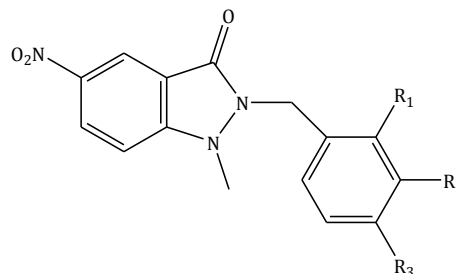
 Riesgo bajo
  Riesgo moderado
  Riesgo elevado

Serie II**a) Actividad *in vitro***

La **tabla 37** refleja el porcentaje de inhibición de crecimiento (%IC) de los 30 compuestos de la serie IIA evaluados en $\mu\text{g/mL}$. Tan sólo los derivados **53** y **69** presentaron %IC por encima del 50% a $10 \mu\text{g/mL}$. Todos los resultados mostraron una D.S. < 10%

Tabla 37: Actividad tricomonocida (% IC) de los derivados de 1-metil-5-nitroindazol-3-ona (VATR 40-VATR 69) de la serie IIA con un periodo de incubación de 24 h.

Compuesto VATR	% IC (μM) ^a			Estructura química
	100 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{g/mL}$	1 $\mu\text{g/mL}$	
40	91,4 (331,9)	15,2 (33,2)	0 (3,3)	
41	83,4 (331,9)	13,9 (33,2)	0,4 (3,3)	
42	95,1 (331,9)	2,9 (33,2)	0 (3,3)	
43	65,2 (314,7)	36,3 (31,5)	25,0 (3,1)	
44	75,8 (314,7)	33,3 (31,5)	28,8 (3,1)	
45	90,2 (314,7)	25,8 (31,5)	19,7 (3,1)	
46	25,0 (276,1)	0 (27,6)	5,2 (2,8)	
47	62,9 (276,1)	0 (27,6)	0 (2,8)	
48	69,8 (276,1)	0 (27,6)	0 (2,8)	
49	59,9 (319,2)	0 (31,9)	0 (3,2)	
50	77,9 (319,2)	28,0 (31,9)	9,1 (3,2)	
51	91,3 (319,2)	24,3 (31,9)	0 (3,2)	
52	61,4 (304,6)	31,5 (30,5)	25,1 (3,0)	
53	99,6 (304,6)	51,4 (30,5)	22,0 (3,0)	
54	98,2 (304,6)	47,0 (30,5)	0 (3,0)	
55	69,5 (324,4)	21,0 (32,4)	7,5 (3,2)	
56	86,0 (324,4)	11,5 (32,4)	13,5 (3,2)	
57	84,1 (324,4)	0 (32,4)	6,4 (3,2)	
58	39,0 (284,7)	7,8 (28,5)	5,9 (2,8)	
59	76,9 (284,7)	0 (28,5)	0 (2,8)	
60	72,9 (284,7)	21,7 (28,5)	13,9 (2,8)	
61	85,0 (336,3)	0 (33,6)	0 (3,4)	
62	80,2 (336,3)	0 (33,6)	0 (3,4)	
63	84,0 (336,3)	11,2 (33,6)	14,3 (3,4)	
64	90,8 (351,8)	2,1 (35,2)	0 (3,5)	
65	12,4 (278,3)	18,4 (27,8)	0 (2,8)	
66	77,2 (293,0)	19,2 (29,3)	0 (2,9)	
67	48,8 (293,0)	16,6 (29,3)	0 (2,9)	
68	95,1 (345,6)	69,8 (34,6)	29,8 (3,5)	
69	87,3 (336,3)	18,0 (33,6)	0 (3,4)	



^a La concentración micromolar (μM) correspondiente a las tres concentraciones ensayadas (100, 10 y 1 $\mu\text{g/mL}$) se indica entre paréntesis.

La actividad del resto de estructuras se evaluó preparando los compuestos en concentraciones micromolares. En este apartado de resultados se expondrán los siguientes valores: CI_{50} y la relación de actividad entre el MTZ y el compuesto objeto de estudio (relación MTZ/VATR).

Tabla 38: Actividad *in vitro* de las series IIB (70-74, 79) y IIC (75-78) de la familia VATR de 5-nitroindazoles.

COMPUESTO	CI_{50} (μ M)	Relación MTZ/VATR*
70	ND	
71	130,5	91,1
72	171,1	119,5
73	71,5	49,9
74	206,7	144,4
75	128,6	89,8
76	ND	
77	ND	
78	212,1	148,1
79	45,7	31,9

* El cálculo de la relación de actividad del MTZ con respecto al VATR se lleva a cabo considerando la $CI_{50\text{ MTZ}} = 1,43$
 ND: No determinada (molécula sin actividad antiparasitaria)

Ninguna de las indazolinonas de las series IIB (1-propil derivados) y IIC (1-isopropil derivados) mostraron una actividad relevante frente al parásito. El compuesto más activo, dentro de este grupo, es el derivados **73**, con una $CI_{50} = 71,5 \mu\text{M}$. Sin embargo, el compuesto **79** (5-nitro-2-picolil-3-propoxiindazol) mostró una CI_{50} destacable, inferior a $50 \mu\text{M}$. Las moléculas **70**, **76** y **77** no mostraron actividad tricomonida a $300 \mu\text{M}$ (%IC < 35%), por lo que no se pudo determinar la CI_{50} (**Tabla 38**). Ninguno de los compuestos pasó a la siguiente fase de estudio de citotoxicidad inespecífica porque carecen de actividad tricomonida, no pudiéndose calcular su índice de selectividad.

b) Determinación *in silico* de propiedades fisicoquímicas y *drug-like scores* basadas en el software Molinspiration y OSIRIS.

De los 39 compuestos de la serie II de VATR, tan sólo las moléculas **53**, **68** y **79** se seleccionaron para el estudio de las propiedades farmacocinéticas y de toxicidad, siguiendo el mismo criterio secuencial que en la serie I. Las tres moléculas mostraron parámetros farmacocinéticos adecuados para una buena biodisponibilidad oral con porcentajes estimados de absorción oral de 83,44, 90,68 y 90,99 respectivamente, probablemente debido al mayor volumen de las moléculas en comparación con el MTZ. Asimismo, la lipofilia también fue superior a la del fármaco de referencia, según indica el coeficiente de reparto calculado (CLogP) en la **tabla 39**.

















Tabla 39: Propiedades farmacocinéticas calculadas mediante la aplicación informática Molinspiration de los dos derivados más activos del grupo de las 1-metil-5-nitroindazol-3-onas y del derivado **79** (2-picolil-3-propoxi-5-nitroindazol).




COMP	PM	CLogP	Ha	Hd	Viol. RO5	TPSA	Át.	Enlaces girat.	Vol.	%Abs*
53	328,28	2,674	9	0	0	118,59	24	4	269,193	83,44
68	289,33	3,432	6	0	0	72,763	21	3	264,445	90,68
79	340,38	2,769	7	0	0	76,001	25	6	308,807	90,99
Rango	≤ 500	≤ 5	≤ 10	≤ 5	≤ 1	< 140	20-70	≤ 10	-	

* El porcentaje de absorción se calculó según la fórmula $\%Abs = 90 - 3,34Ha - 5,56Hd + 0,0716PM$ (Zhao et al., 2002).

Ni el derivado **53** ni el **68** parecen mostrar toxicidad a ninguno de los niveles evaluados por el software OSIRIS. Los valores de *Drug score* estimados para ambas moléculas fueron de 0,46 para **53** y 0,45 para **68**, resultando similares al del MTZ (*Drug score*_{MTZ} = 0,51) (Tabla 40).

Tabla 40: Parámetros de toxicidad y de las estructuras VATR **53**, **68** y **79** pertenecientes a la serie II de la familia de 5-nitroindazoles.

COMPUESTO	Mut.	Tum.	Irrit.	Efect. Rep.	Drug score
53					0,46
68					0,45
79					0,17
MTZ					0,51

 Riesgo bajo
  Riesgo moderado
  Riesgo elevado

Serie III

a) Actividad *in vitro*

De las 34 estructuras que conforman la serie IIIA, los derivados **90**, **94**, **106**, **111**, **112** y **113** se ensayaron posteriormente en células Vero. El resto de moléculas resultaron inactivas, no pudiéndose determinar la CI_{50} en más del 30% de los casos (10/32). Tan sólo el 1-(2-hidroxietil) derivado **94** mostró una actividad tricomonocida relevante y un porcentaje de citotoxicidad inespecífica de $14,7 \pm 4,3$ a 300 μ M.

Tabla 41: Actividad tricomonocida y citotóxica de los 34 derivados con sustituyentes en 1,2 que conforman la serie IIIA de la familia de 5-nitroindazoles VATR.

COMP.	CI_{50}	CC_{50}	IS	Relación MTZ/VATR	COMP.	CI_{50}	CC_{50}	IS	Relación MTZ/VATR
80	258,4				97	362,2			
81	358,9				98	265,6			
82	261,0				99	ND			
83	ND				100	ND			

84	ND				101	212,9			
85	ND				102	ND			
86	ND				103	151,5			
87	192,4				104	61,9			
88	104,1				105	ND			
89	182,0				106	49,4	> 300	> 6,1	34,47
90	48,9	> 300	> 6,1	34,17	107	276,2			
91	ND				108	ND			
92	347,7				109	278,4			
93	80,2				110	170,9			
94	17,9	> 300	> 16,8	12,53	111	48,9	> 300	> 6,1	34,17
95	128,4				112	40,8	> 300	> 7,3	28,46
96	284,6				113	41,3	> 300	> 7,3	28,86

 CI₅₀ = [0-10 μM]
 CI₅₀ = [10-20 μM]

ND: No determinado por ausencia de actividad tricomonida a la máxima concentración (300 μM).

Los derivados de la serie IIIB mostraron una actividad tricomonida superior a la serie de la serie IIIA (Tabla 42).

Tabla 42: Actividad tricomonida de los once 2-bencil-3-alcoxi-5-nitroindazol de la serie IIIB.

COMP.	CI ₅₀	CC ₅₀	IS	Relación MTZ/VATR	COMP.	CI ₅₀	CC ₅₀	IS	Relación MTZ/VATR
114	43,0	> 300	> 7,0	30,04	120	107,4			
115	20,6	> 300	> 14,5	15,15	121	ND			
116	64,7				122	93,1			
117	18,6	> 300	> 16,1	12,97	123	41,3	> 300	> 7,3	28,86
118	9,8	> 300	> 30,6	6,86	124	5,5	104,1	18,8	3,88
119	7,3	> 300	> 41,1	5,06	MTZ	1,36	> 300	> 100	

 CI₅₀ = [0-10 μM]
 CI₅₀ = [10-20 μM]

Los derivados de la familia VATR más activos pertenecen a esta serie IIIB, existiendo 3 compuestos (118, 119 y 124) con actividades tricomonidas altas (CI₅₀ < 10 μM) e índices de selectividad elevados, debido a la ausencia de citotoxicidad a las concentraciones ensayadas como tricomonidas. Solo VATR 124 mostró una toxicidad elevada a la máxima concentración ensayada (%C_{300 μM} = 98,1 ± 0,3), disminuyendo dicho efecto por debajo del 20% a la concentración de 75 μM. El resto de compuestos mostraron un perfil citotóxico bajo. Los porcentajes de citotoxicidad fueron iguales o menores al 20% a 300 μM, no considerándose como efecto citotóxico, según el criterio estimado en nuestro laboratorio. Destaca la ausencia de total de citotoxicidad del compuesto 118 (%C_{300 μM} = 0 ± 0) en el ensayo de 24 h de contacto.

b) Determinación *in silico* de propiedades fisicoquímicas y *drug-like scores* basadas en el software Molinspiration y OSIRIS.

























Ajustándose al criterio seguido en las series I y II, solo se han evaluado aquellos compuestos con una CI_{50} menor o igual a 45 μ M. En función de este límite, solo pasaron el filtro las moléculas **90** y **94** de la serie IIIA y 7 de los 11 alcoxi derivados (**114**, **115**, **117-119**, **123** y **124**). Todas las moléculas de esta tercera serie han mostrado unas propiedades fisicoquímicas dentro de los rangos estimados para lograr una buena biodisponibilidad oral con porcentajes de absorción superiores al 75% (**Tabla 43**).

































Tabla 43: Propiedades fisicoquímicas calculadas con el software Molinspiration de los compuestos de la tercera serie de VATR que mostraron actividad en los ensayos *in vitro*.




COMP.	PM	CLogP	Ha	Hd	Viol. RO5	TPSA	Át.	Enlaces girat.	Vol.	%Abs*
90	382,42	2,189	8	0	0	93,072	28	7	344,592	90,66
94	313,31	2,107	7	1	0	92,991	23	5	270,919	83,49
106	312,32	1,543	7	2	0	98,786	23	5	274,190	77,86
111	340,38	2,794	7	1	0	84,790	25	7	308,660	85,43
112	354,40	3,039	7	0	0	76,001	26	7	325,609	92,00
113	394,47	3,947	7	0	0	76,001	29	7	365,654	94,86
114	355,34	3,228	8	0	0	99,189	26	8	307,908	88,72
115	383,15	3,875	8	0	0	99,189	28	10	341,512	90,71
117	390,23	4,411	6	0	0	72,884	24	7	298,066	97,90
118	313,11	2,772	7	1	0	93,112	23	6	271,397	83,48
119	327,33	3,043	7	1	0	93,112	24	7	288,198	84,50
123	340,15	3,434	7	0	0	76,122	25	7	309,285	90,97
124	326,35	2,479	7	2	0	98,907	24	7	291,469	78,87
Rango	≤ 500	≤ 5	≤ 10	≤ 5	≤ 1	< 140	20-70	≤ 10	-	

La siguiente tabla sobre las estimaciones virtuales de toxicidad, muestra en el conjunto de moléculas seleccionadas de la serie IIIB, un riesgo mayor a producir efectos nocivos.

Tabla 44: Estimación de la toxicidad de los compuestos más activos de las series IIIA (**80-113**) y IIIB (**114-124**) de 5-nitroindazoles.

COMP.	Mut.	Tum.	Irrit.	Efect. Rep.	Drug score
90					0,48
94					0,48
106					0,46
111					0,50
112					0,67
113					0,43

114					0,09
115					0,13
117					0,07
118					0,18
119					0,09
123					0,30
124					0,17
MTZ					0,51

 Riesgo bajo
  Riesgo moderado
  Riesgo elevado



Serie IV

a) Actividad *in vitro*

La serie IVA de oxoquinazolininas presenta un compuesto con moderada actividad tricomonocida y cuya citotoxicidad se ha evaluado. Por su parte, la serie IVB muestra un 80% (4/5) de sus compuestos con una actividad biológica frente al parásito elevada.

Tabla 45: Actividad tricomonocidas (CI_{50}) y citotoxicidad inespecífica (CC_{50}) del grupo de las 6-nitro-4-oxoquinazolininas (**125-129**) y de los 2-bencil-3-(ω -hidroxialquilamino)indazoles (**130-134**). En la tabla también se muestra el índice de selectividad (IS) y la relación de actividad entre el compuesto VATR con respecto al fármaco de referencia.

COMPUESTO	CI_{50}	CC_{50}	IS	Relación MTZ/VATR
125	ND			
126	ND			
127	64,8			
128	58,2	> 300	> 5,2	40,63
129	ND			
130	45,4	> 300	> 6,6	31,73
131	15,7	> 300	> 19,1	10,98
132	8,5	> 300	> 35,2	5,96
133	52,7	> 300	> 5,7	36,77
134	10,0	> 300	> 29,9	7,00

 $CI_{50} = [0-10 \mu M]$
  $CI_{50} = [10-20 \mu M]$

Los compuestos más activos pertenecen a la serie de los 2-bencil-3-(ω -hidroxialquilamino)indazoles. No obstante, también son los compuestos que han mostrado mayor efecto citotóxico. El compuesto más activo **132** mostró una $CI_{50} = 8,5 \mu M$. Sin embargo, su citotoxicidad en células Vero se mantuvo desde la concentración de $300 \mu M$ ($\%C_{300 \mu M} = 27,6 \pm 7,7$) hasta la de $37,5 \mu M$ ($\%C_{37,5 \mu M} = 21,6 \pm 8,1$). En las diluciones sucesivas, el efecto citotóxico fue inferior al 20%. La citotoxicidad inespecífica de **134** a $300 \mu M$ fue de $23,3 \pm 6$, disminuyendo por debajo del 12% en la siguiente dilución de $150 \mu M$. Este mismo fenómeno se pudo observar con el derivado **131**, registrando el

porcentaje de citotoxicidad más alto de todos los 5-nitroindazoles ensayados hasta el momento ($\%C_{300\ \mu\text{M}} = 34,3 \pm 9,87$). El efecto citotóxico disminuyó por debajo del 20% en sucesivas diluciones.

b) Determinación *in silico* de propiedades fisicoquímicas y *drug-like scores* basadas en el software Molinspiration y OSIRIS.

Los cinco compuestos evaluados presentan estructuras químicas que sugieren una buena absorción oral e intestinal, en función de sus características farmacocinéticas. Al igual que en los casos anteriores, los cálculos de absorción se mantuvieron en rangos superiores al 75%.

























Tabla 46: Propiedades farmacocinéticas de los 6-nitro-4-oxoquinazolininas y los 2-bencil-3-amino-5-nitroindazoles con actividad tricomonocida.




COMP.	PM	CLogP	Ha	Hd	Viol. RO5	TPSA	Át.	Enlaces girat.	Vol.	%Abs*
128	413,38	1,852	10	0	0	121,981	30	8	351,985	86,20
130	282,30	3,205	6	1	0	75,677	21	4	249,754	84,61
131	312,32	2,573	7	2	0	95,905	23	6	274,814	77,86
132	326,36	2,818	7	1	0	87,116	24	6	291,757	85,43
134	340,38	3,088	7	1	0	87,116	25	7	308,559	85,43
Rango	≤ 500	≤ 5	≤ 10	≤ 5	≤ 1	< 140	20-70	≤ 10	-	

* El porcentaje de absorción se calculó según la fórmula $\%Abs = 90 - 3,34Ha - 5,56Hd + 0,0716PM$ (Zhao et al., 2002).

Tan sólo el derivado de quinazolina **128** no mostró riesgo en ninguno de los cuatro supuestos estudiados, manteniendo el mismo perfil que las 2-bencil-5-nitroindazol-3-onas 1-sustituídas de las que deriva (serie IIIA). Sin embargo, los 3-amino derivados presentan un riesgo elevado de producir efectos mutagénicos en los cuatro casos. El menor valor de *drug score* corresponde al compuesto **134**; que también mostró un riesgo elevado de desarrollar efectos carcinogénicos.

Tabla 47: Determinación de los posibles riesgos mutagénicos, carcinogénicos, irritativos o durante la reproducción de las estructuras químicas más activas de la serie IV. El valor de *drug score* se calcula con el software OSIRIS Property Explorer.

COMP.	Mut.	Tum.	Irrit.	Efect. Rep.	<i>Drug score</i>
128					0,37
130					0,35
131					0,34
132					0,41
134					0,19
MTZ					0,51

 Riesgo bajo
  Riesgo moderado
  Riesgo elevado

Serie V**a) Actividad *in vitro***

Los resultados de la última serie química de derivados de 5-nitroindazol muestran valores de CI_{50} similares a los del MTZ ($CI_{50\text{ VATR145}} = 2,5\ \mu\text{M}$; Relación $\text{VATR145/MTZ} = 1,8$) en el aislado sensible al fármaco de referencia siendo, en conjunto, los compuestos más activos de las cinco series de VATR. No obstante, los posteriores ensayos de citotoxicidad en células VERO también mostraron un perfil tóxico superior. A pesar de su toxicidad a las concentraciones más altas, los índices de selectividad muestran valores superiores o próximos a 10 en los compuestos más activos (**137, 138, 144 y 145**).

Tabla 48: Actividad tricomonocida (CI_{50}), citotoxicidad inespecífica (CC_{50}), toxicidad selectiva (IS) y relación de actividad con respecto al fármaco de referencia de los 14 compuestos de la serie V de los 5-nitroindazoles.

COMPUESTO	CI_{50}	CC_{50}	IS	Relación MTZ/VATR
135	330,3			
136	ND			
137	10,5	> 300	> 28,6	7,58
138	16,3	171,3	10,5	11,79
139	207,3			
140	265,1			
141	19,2	46,3	2,4	13,89
142	63,7			
143	104,0			
144	4,2	57,7	13,7	3,04
145	2,5	24,0	9,6	1,82
146	69,0			
147	82,1			
148	70,3			

 $CI_{50} = [0-10\ \mu\text{M}]$
 $CI_{50} = [10-20\ \mu\text{M}]$

b) Determinación *in silico* de propiedades fisicoquímicas y *drug-like scores* basadas en el software Molinspiration y OSIRIS.

Las propiedades farmacocinéticas derivadas de la estructura química de los cinco compuestos con actividad tricomonocida de esta serie continúan manteniendo unas buenas propiedades para la absorción oral, al igual que el resto de compuestos de esta familia química, encontrándose todos los parámetros dentro de los rangos aceptables (**Tabla 49**).

























Asimismo, ninguno de los compuestos de esta serie presenta una estructura que pueda sugerir riesgo de toxicidad en función de lo estimado por el software OSIRIS (**Tabla 50**).




Tabla 49: Principales propiedades farmacocinéticas evaluadas mediante softwares con el fin de estimar una buena biodisponibilidad oral en función de la estructura de los compuestos de la serie V que mostraron actividad tricomonocida.

COMP.	PM	CLogP	Ha	Hd	Viol. RO5	TPSA	Át.	Enlaces girat.	Vol.	%Abs*
137	312,32	2,208	7	2	0	98,907	23	6	274,667	77,86
138	326,35	3,189	7	1	0	84,911	24	7	292,342	84,43
141	326,35	2,479	7	2	0	98,907	24	7	291,469	80,16
144	354,40	3,255	7	2	0	98,907	26	9	325,073	80,88
145	368,43	4,236	7	1	0	84,911	27	10	342,748	87,44
Rango	≤ 500	≤ 5	≤ 10	≤ 5	≤ 1	< 140	20-70	≤ 10	-	

* El porcentaje de absorción se calculó según la fórmula $\%Abs = 90 - 3,34Ha - 5,56Hd + 0,0716PM$ (Zhao et al., 2002).

Tabla 50: Efecto tóxico de las cinco moléculas con estructura de 3-alcoxi-1-bencil-5-nitroindazol con una actividad tricomonocida mayor evaluado mediante el software OSIRIS.

COMP.	Mut.	Tum.	Irrit.	Efect. Rep.	Drug score
137					0,43
138					0,46
141					0,42
144					0,37
145					0,37
MTZ					0,51

 Riesgo bajo
  Riesgo moderado
  Riesgo elevado

c) Determinación de la actividad tricomonocida frente al aislado IR78 de *T. vaginalis* metronidazol-resistente

Siguiendo el procedimiento de cribado secuencial propuesto, las moléculas que mostraron una actividad relevante frente al aislado sensible JH31A4 con valores de $CI_{50} \leq 20 \mu M$ se evaluaron frente al aislado de *T. vaginalis* IR78. De los trece compuestos evaluados, los derivados **23** y **94** resultaron inactivos, mientras que **117**, **118**, **131** y **132** mostraron una actividad tricomonocida moderada (rango de CI_{50} entre 30 y 50 μM vs. $CI_{50} MTZ = 4,2$). Asimismo, los derivados **119**, **124** y **145** presentaron una actividad tricomonocida semejante a las del fármaco de referencia ($CI_{50} VATR_{119} = 9,1$; $CI_{50} VATR_{124} = 8,5$; $CI_{50} VATR_{145} = 0,5$) tal y como muestra la **tabla 51**.

En resumen, los compuestos con actividad tricomonocida más destacable son el derivado **119** [2-bencil-3-(3-hidroxipropoxi)-5-nitroindazol] y **124** [3(3-aminopropoxi)-2-bencil-5-nitroindazol] pertenecientes a la serie IIIB y especialmente el compuesto **145** (1-bencil-3-[5-(metilamino)pentiloxi]-5-nitroindazol] de la última serie (serie V). Estas cuatro moléculas mostraron una actividad tricomonocidas significativa en los ensayos con ambos aislados, con una especificidad antiparasitaria reseñable, tal y como muestra el índice de selectividad $IS > 10$ de la **tabla 51**. El compuesto **145** frente al aislado resistente es el

único que ha mostrado una actividad tricomonocida superior a la del metronidazol ($CI_{50}^{145} = 0,5 \mu\text{M}$ vs. $CI_{50}^{MTZ} = 4,2 \mu\text{M}$) y una actividad tricomonocida mayor que frente al aislado sensible, aunque con una citotoxicidad inespecífica superior en comparación con las otras dos moléculas (**119** y **124**). La comparación de la actividad del compuesto frente a los dos aislados de *T. vaginalis* muestra, a excepción del **145**, una actividad superior frente a JH31A4. No obstante, los derivados **119**, **124**, **134** y **137** presentaron valores de CI_{50} frente a IR78 similares a los obtenidos frente al aislado sensible (relación $CI_{50-IR78}/CI_{50-JH31A4} < 1,6$).

Tabla 51: Actividad tricomonocida (CI_{50}) frente al aislado IR78 de *T. vaginalis* de los 5-nitroindazoles seleccionados previamente por su actividad tricomonocida en JH31A4.

COMPUESTO VATR	CI_{50}	CC_{50}^a	IS	Relación MTZ/VATR	Relación $CI_{50-IR78}/CI_{50-JH31A4}$
117	39,1	> 300	> 7,7	9,31	2,11
118	49,8	> 300	> 6,0	11,86	5,07
119	9,1	> 300	> 33,0	2,17	1,26
124	8,5	104,1	12,2	2,02	1,53
131	34,8	> 300	> 8,6	8,30	2,21
132	49,3	> 300	> 6,1	11,75	5,78
134	11,0	> 300	> 27,4	2,61	1,10
137	14,3	596,3	41,7	3,41	1,37
138	74,7	171,3	2,3	17,79	4,59
144	59,1	57,7	1,0	14,08	14,09
145	0,5	24,0	49,7	0,12	0,19
MTZ	4,2	> 2400	> 100		

^a La CC_{50} corresponde a la misma reflejada en las tablas 40, 43 y 46.

 $CI_{50} = [0-10 \mu\text{M}]$  $CI_{50} = [10-20 \mu\text{M}]$

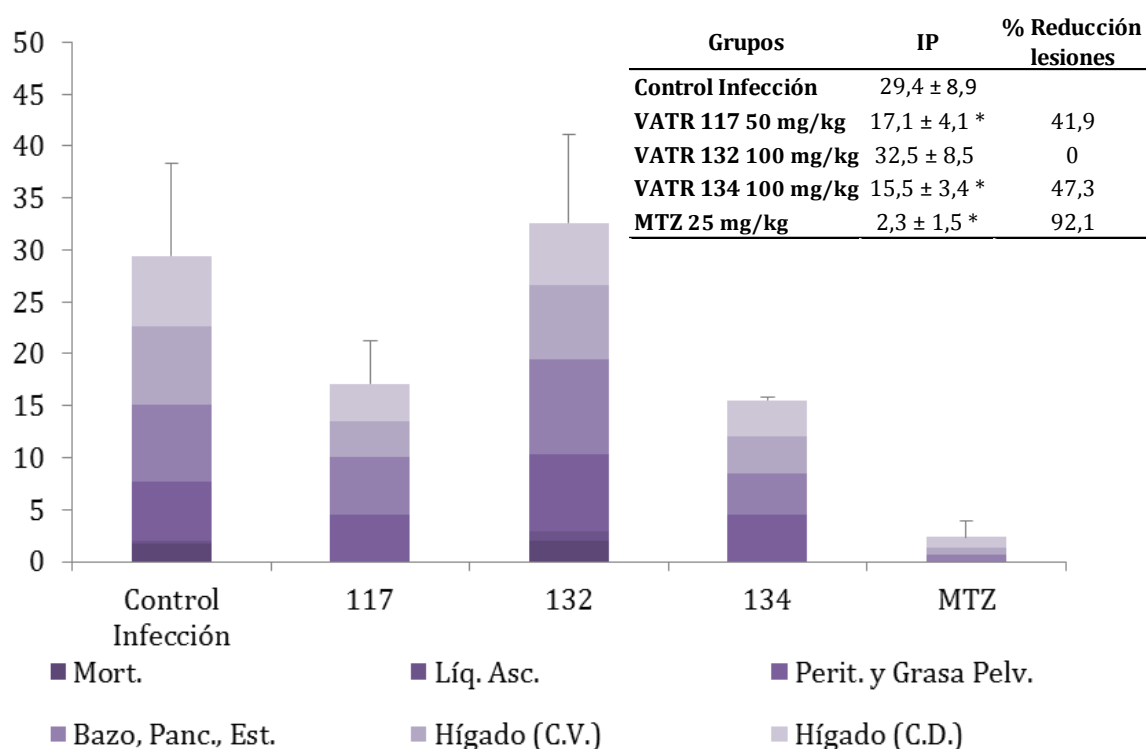
d) Determinación de la actividad tricomonocida *in vivo* de los compuestos más activos en los ensayos *in vitro* previos

Se evaluó la actividad *in vivo* de tres 5-nitroindazoles de la familia VATR (**117**, **132** y **134**). La administración de los compuestos fue por vía oral a ratones previamente infectados intraperitonealmente con el aislado C-1:NIH de *T. vaginalis*.

El tratamiento durante una semana con el compuesto **132** resultó inactivo en el modelo murino, no lográndose ninguna disminución de las lesiones en comparación con el grupo testigo de infección. La prueba U de Mann-Whitney para muestras independientes confirma la hipótesis nula de igualdad de distribución entre ambos grupos con una significación exacta de 0,918 ($p > 0,05$).

Los grupos experimentales tratados con los compuestos **117** y **134** muestran una disminución significativa de las lesiones y la mortalidad, que constituyen el índice de patogenia (IP) respecto al grupo testigo de infección ($p < 0,05$). Ambos lograron tasas de reducción de lesiones intraperitoneales similares del 36,8% y el 35,0%, respectivamente.

El grupo tratado con MTZ mostró valores de IP similares a los reflejados en otros experimentos con tasas de curación de más del 90%, llegándose a la cura total en alguno de los ratones del lote.



*Los grupos señalados mostraron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el grupo control de infección no tratado ($p < 0,05$).

Figura 48: Actividad *in vivo* de los 5-nitroindazoles (117, 132 y 134). Las fracciones coloreadas del diagrama de barras representan las puntuaciones obtenidas en función de las lesiones abdominales y la mortalidad.

Familia FR (nitroquinoxalinonas)

a) Actividad *in vitro*

La primera serie (quinoxalin-2-onas) mostró una actividad de moderada a alta frente al aislado JH31A4 de *T. vaginalis* sensible a MTZ, destacando la actividad del compuesto **FR 9** [7-nitro-4-(3-piperidinopropil)quinoxin-2-ona] con una $CI_{50} = 18,3 \mu M$. Se evaluó la citotoxicidad de nueve de los once compuestos frente a células Vero para verificar su toxicidad selectiva. Tan solo las moléculas **FR 10** y **FR 15** no continuaron la secuencia de cribado debido a la ausencia de actividad tricomonocida ($CI_{50} > 100 \mu M$). Ninguno de los derivados ensayados mostró citotoxicidad (**Tabla 52**). El derivado **FR 12** presentó la citotoxicidad máxima a $300 \mu M$, con un porcentaje de reducción de crecimiento del 17,3 %, seguido del derivado **FR 13** con un 10,8 %. Respecto a la segunda serie (quinoxalin-2,3-dionas), tan solo el compuesto **FR 35** presentó una actividad reseñable con una $CI_{50} = 25,4 \mu M$, seguido de **FR 33** con una $CI_{50} = 61,4 \mu M$. Los porcentajes de citototoxicidad de dichos compuestos a $300 \mu M$ fueron del 14,1% y del 0%, respectivamente. La ausencia de citotoxicidad inespecífica impide calcular la CC_{50} ni el IS en la mayoría de los casos.

Tabla 52: Resultados de la actividad tricomonocida (CI₅₀) frente al aislado sensible JH31A4 y la toxicidad inespecífica (CC₅₀) de los derivados de 7-nitroquinoxalin-2-ona (FR 6 – FR 17) y de 6-nitroquinoxalin-2,3-diona (FR 26 – FR 45).

COMPUESTO	CI ₅₀	CC ₅₀	IS	Relación MTZ/FR
FR 6	36,7	> 300	> 8,2	26,99
FR 7	38,3	> 300	> 7,8	28,16
FR 8	30,6	> 300	> 9,8	22,50
FR 9	18,2	> 300	> 16,5	13,38
FR 10	102,4			75,29
FR 12	50,7	648,4	12,8	37,28
FR 13	32,4	1235,1	38,1	23,82
FR 14	29,8	> 300	> 10,1	21,91
FR 15	109,7			80,66
FR 16	60,6	> 300	> 5,0	44,56
FR 17	41,8	> 300	> 7,2	30,74
FR 26	111,4			
FR 27	150,9			
FR 28	147,4			
FR 29	145,3			
FR 30	106,1			
FR 31	235,2			
FR 32	179,0			
FR 33	61,4			
FR 34	255,7			
FR 35	25,4	> 300	> 11,8	18,68
MTZ	1,4	> 600	> 100	

 CI₅₀ = [0-10 μM] CI₅₀ = [10-20 μM]

b) Determinación *in silico* de propiedades fisicoquímicas y *drug-like scores* basadas en el software Molinspiration y OSIRIS.

Todos los derivados de 7-nitroquinoxalin-2-ona se evaluaron con ambas aplicaciones informáticas, a excepción de los compuestos **FR 10** y **FR 15**, que carecen de actividad tricomonocida en los ensayos *in vitro*. En función de los mismos criterios, en la serie B solo se ha evaluado el compuesto **FR 35** (tabla 53). Todas las moléculas mostraron porcentajes de absorción notables con valores superiores al 75%, aplicando la fórmula descrita por Zhao *et al.* (2002). Todos los derivados químicos cumplen las reglas de Lipinski. También se determinó el número de enlaces giratorios, siendo en todos los casos, menos de 10 y el área superficial polar (TPSA) cuyo valor inferior fue de 72,609 en los compuestos **FR 12**, **FR 13** y **FR 14**. Por su parte, la 6-nitroquinoxalin-2,3-diona **FR 35** presentó el valor más alto (TPSA = 89,834).









































Tabla 53: Propiedades fisicoquímicas relacionadas con la biodisponibilidad oral de nitroquinoxalinonas.




COMP.	PM	CLogP	Ha	Hd	Viol. RO5	TPSA	Át.	Enlaces girat.	Vol.	%Abs*
FR 6	264,28	1,364	7	1	0	81,398	19	4	237,07	79,98
FR 7	306,37	2,387	7	1	0	81,398	22	7	287,42	83,00
FR 8	304,35	2,272	7	1	0	81,398	22	4	277,06	82,85
FR 9	318,38	2,543	7	1	0	81,398	23	5	293,86	83,86
FR 12	278,31	1,242	7	0	0	72,609	20	5	253,96	86,55
FR 13	320,39	2,264	7	0	0	72,609	23	7	304,36	89,56
FR 14	318,38	2,150	7	0	0	72,609	23	4	294,01	89,42
FR 17	249,23	1,057	7	1	0	87,394	18	1	206,08	78,90
FR 35	339,77	2,86	7	0	0	89,834	23	7	290,98	90,95
Rango	≤ 500	≤ 5	≤ 10	≤ 5	≤ 1	< 140	20-70	≤ 10	-	

* El porcentaje de absorción se calculó según la fórmula $\%Abs = 90 - 3,34Ha - 5,56Hd + 0,0716PM$ (Zhao et al., 2002).

Los derivados sintéticos con estructura de 7-nitroquinoxalin-2-ona no presentan riesgo de toxicidad en función de sus propiedades fisicoquímicas, salvo **FR 7**, que muestra un riesgo alto de producir efectos irritativos. Sin embargo, el derivado **FR 35** (6-nitroquinoxalin-2,3-diona), con un bajo *drug score*, presenta un riesgo moderado de desarrollar efectos mutagénicos y posibles problemas durante el embarazo, así como un riesgo tumoral alto. En cambio, los valores superiores de este parámetro se registraron en los derivados **FR 6** y **FR 12**. El resto de compuestos presentaron valores similares a los del fármaco de referencia (**tabla 54**).

Tabla 54: Efectos tóxicos (mutagénesis, carcinogénesis, irritación y efectos nocivos durante el embarazo) y *Drug score* de los compuestos derivados de nitroquinoxalinona determinados por el programa virtual OSIRIS.

COMP.	Mut.	Tum.	Irrit.	Efect. Rep.	<i>Drug score</i>
FR 6					0,74
FR 7					0,46
FR 8					0,47
FR 9					0,47
FR 12					0,76
FR 13					0,48
FR 14					0,49
FR 17					0,50
FR 35					0,11
MTZ					0,51

 Riesgo bajo
 Riesgo moderado
 Riesgo elevado

c) Determinación de la actividad tricomonocida frente al aislado IR78 de *T. vaginalis* resistente al MTZ

Tan solo **FR 6** y **FR 35** mantuvieron valores de CI_{50} inferiores a 100 μM en los ensayos frente al aislado IR78 de *T. vaginalis* resistente al MTZ.

Tabla 55: Inhibición de crecimiento registrado tras mantener en contacto 24 h distintas diluciones de los compuestos con el aislado metronidazol-resistente.

COMPUESTO	CI_{50}	CC_{50}^a	IS	Relación MTZ/VATR
FR 6	36,8	> 300	> 8	11,9
FR 7	> 300			
FR 8	> 300			
FR 9	338,2			
FR 12	160,6			
FR 13	261,4			
FR 14	> 300			
FR 17	144,2			
FR 35	70,6	> 300	> 4	22,8
MTZ	3,1	> 600	> 100	

^a Los valores de CC_{50} corresponden a los expuestos en la tabla 52.

d) Determinación *in vivo* de la actividad tricomonocida de las moléculas más activas *in vitro*

Se evaluó la actividad tricomonocida *in vivo* solamente del compuesto **FR 9** en el modelo murino intraperitoneal, a las dosis de 100 y 50 mg/kg/día durante una semana, por su actividad tricomonocida *in vitro* frente al aislado JH31A4 ($CI_{50} = 18,3 \mu\text{M}$), la ausencia de citotoxicidad inespecífica ($\%C_{300\mu\text{M}} = 3,3$), el riesgo de toxicidad bajo y una biodisponibilidad oral adecuada (**Tablas 53 y 54**). Los dos grupos de ratones NMRI hembra tratados mostraron una reducción estadísticamente significativa de las lesiones y de la mortalidad. Los análisis estadísticos rechazan la hipótesis nula de idéntica distribución del IP entre los grupos tratados en comparación con el testigo de infección ($p < 0,05$). Sin embargo no existieron diferencias entre el IP registrado en el grupo tratado con **FR 9** a la dosis de 50 mg/kg y a la de 100 mg/kg ($p = 0,628$). En ambos grupos se producen reducciones del 50,7% y un 46,1%, respectivamente (**Figura 49**).

Se identificaron lesiones en todos los órganos peritoneales incluyendo cara diafragmática del hígado en los dos grupos tratados con la nitroquinoxalinona **FR 9**. Sin embargo, no se aisló líquido ascítico de ninguno de los animales. El grupo tratado con MTZ redujo las lesiones con respecto al testigo de infección en más de un 90%, curando en su totalidad a un tercio de los animales infectados. El resto de animales del lote tratado con el fármaco de referencia mostraron algunas lesiones necróticas localizadas únicamente en cara visceral y diafragmática del hígado.

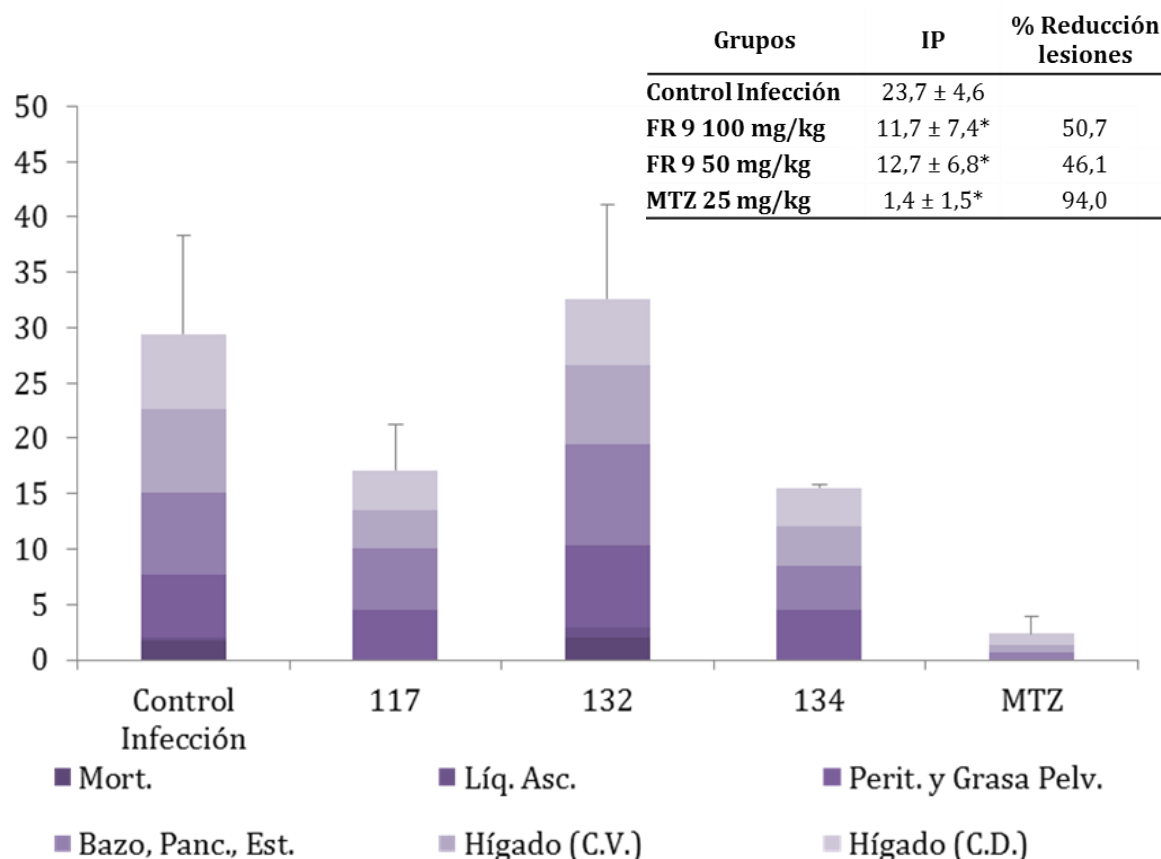


Figura 49: Actividad tricomonocida *in vivo* del compuesto **FR 9**. Las fracciones coloreadas del diagrama de barras representan las puntuaciones obtenidas en función de las lesiones y la mortalidad. La patogenia se expresada como IP (índice de patogenia) a partir de la media ± desviación estándar de las puntuaciones obtenidas para cada ratón.

I. 3. VALIDACIÓN DE LOS MODELOS DE PREDICCIÓN MEDIANTE EL CV DE LAS SERIES QUÍMICAS VATR Y FR

En la **tabla 56** se muestran los resultados obtenidos tras la predicción de la actividad de los 148 derivados de 5-nitroindazoles de la familia VATR y las 21 nitroquinoxalinonas pertenecientes a la serie FR empleando los modelos diseñados en esta Tesis. En primer lugar se ha comparado la capacidad predictiva del modelo ensamblado (**tabla 56, A**) frente a la combinación de los 3 modelos seleccionados (22, 26 y 45) junto con el ensamblado (**tabla 56, B**). En este último caso, el criterio de clasificación de las moléculas como activas o inactivas ha sido el siguiente: se consideran activas aquellas moléculas que hayan sido clasificadas como tricomonocidas por al menos dos de los cuatro modelos de predicción. En todos los casos, las moléculas cribadas virtualmente se clasifican como activas cuando muestran un $\Delta P \geq 60\%$.

Tabla 56: Cribado virtual de las 169 estructuras químicas ensayadas *in vitro*. A) Parámetros estadísticos tras la predicción del modelo ensamblado, B) Resultados tras la predicción de los 4 modelos (22, 26, 45 y ensamblado).

	Modelo	C'	Q	Sens.	Esp.	RFA
A	Ensamblado	0,08	58,58	47,50	27,94	37,98
B	22+26+45+Ensamblado	0,18	72,19	32,50	39,39	15,50

C': Coeficiente de correlación de Matthews; *Q*: Porcentaje de buena clasificación; *Sens.*: Sensibilidad; *Esp.*: Especificidad; *RFA*: Razón de falsa alarma.

Tal y como muestran los resultados, la predicción por medio de los cuatro modelos combinados posee una exactitud mayor ($Q = 72,19\%$) y una razón de falsa alarma mejor ($RFA = 15,50\%$) que cuando se emplea únicamente el modelo ensamblado. No obstante, en términos generales, los parámetros estadísticos resultan peores en comparación con los resultados de la predicción de la SP (**Tabla 28**).

A continuación, se muestran desdoblados los resultados tras el cribado virtual de cada una de las cinco series de la familia VATR y la serie FR por separado, tras evaluarlas empleando la combinación de los cuatro modelos.

Tabla 57: Cribado virtual de las series I a V de compuestos VATR y la serie FR.

Serie	C'	Q	Sens.	Esp.	RFA
I	0,45	84,62	75,00	37,50	14,29
II	0,54	92,50	66,67	50,00	5,41
VATR III	0,10	71,11	7,69	50,00	3,13
IV	0,53	70,00	50,00	100	0
V	0,64	21,43	0	0	66,67
FR	0,05	47,62	44,44	40,00	50,00

C': Coeficiente de correlación de Matthews; *Q*: Porcentaje de buena clasificación; *Sens.*: Sensibilidad; *Esp.*: Especificidad; *RFA*: Razón de falsa alarma.

Los modelos muestran una exactitud aceptable al clasificar en activos e inactivos algunas de las series de 5-nitroindazoles evaluadas previamente en el laboratorio ($Q \geq 70\%$ para las series I a IV), con $RFA < 15$. Sin embargo, no es capaz de predecir correctamente los 3-alcoxi-1-bencil-5-nitroindazoles (serie V) ni las nitroquinoxalinonas (FR) ($Q < 50\%$; $RFA > 20\%$).

II. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLADOS DE *Trichomonas vaginalis*

En este segundo capítulo se expone la caracterización biológica y molecular de diez aislados de *T. vaginalis* (JH31A4, C-1:NIH, 1807, 1232, 11, IR78, S019, S760, S351 y S852) procedentes de mujeres infectadas de distintas localizaciones geográficas. Las características fenotípicas estudiadas han sido:

- A. Sensibilidad a los fármacos de referencia
- B. Citoadherencia
- C. Citotoxicidad celular
- D. Presencia de virus (TVV)
- E. Presencia de *Mycoplasma*
- F. Patogenia en ratón
- G. Sensibilidad al complemento del suero humano

La caracterización molecular se ha llevado a cabo empleando los marcadores moleculares siguientes:

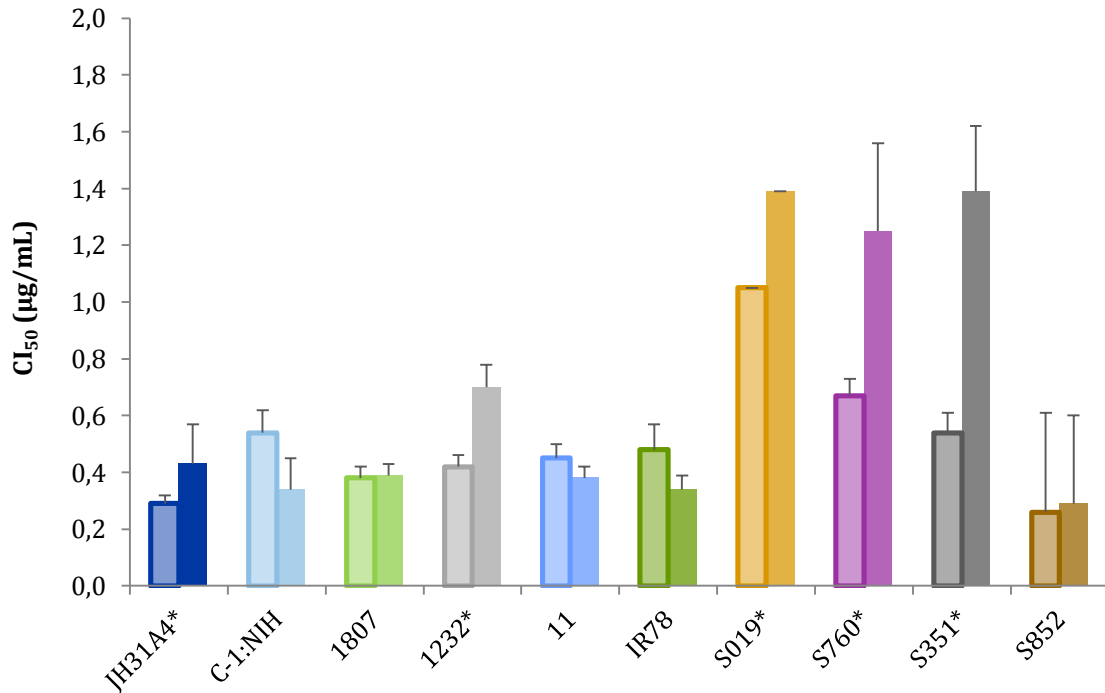
- A. *Internal transcribed spacers* (ITS) y el ARNr 5.8S
- B. Microsatélites (MS)
- C. *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) en genes de copia única (SCG)

II. 1. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA

II. 1. A. Sensibilidad a los fármacos de referencia

Los diez aislados de *T. vaginalis* se sometieron a concentraciones crecientes de metronidazol (MTZ) y tinidazol (TDZ). Se empleó la técnica espectrofluorimétrica con resazurina de evaluación de la quimiosensibilidad descrita en el capítulo I de Resultados. Los ensayos con el aislado IR78, debido a su carácter resistente, se realizaron a concentraciones mayores, partiendo de 512 µg/mL. A continuación se muestran los valores de la CML y la CI₅₀ expresados en µg/mL.

Los aislados JH31A4, 1232, S019, S760 y S351 de *T. vaginalis* tratados con TDZ mostraron una CI₅₀ mayor que los tratados con MTZ (**Figura 50**). Al contrario de lo que se podría esperar, estos aislados requieren una concentración superior de TDZ para disminuir la población al 50%. Por su parte, los aislados C-1:NIH e IR78 tratados con MTZ mostraron valores de CI₅₀ superiores a los obtenidos con el tratamiento de TDZ. El aislado IR78 mantiene esta sensibilidad para la CML. El resto de aislados mostraron valores de sensibilidad similares para ambos fármacos. Tan sólo IR78 resultó resistente a los 5-nitroimidazoles (**Tabla 58**).



*Diferencias estadísticamente significativas según la prueba de Wilcoxon para muestras relacionadas ($p < 0,05$).

Figura 50: Representación gráfica de los valores de CI₅₀ tras someter a los 10 aislados a concentraciones crecientes de MTZ (barras claras) y TDZ (barras oscuras).

Tabla 58: La concentración mínima letal (CML) y la inhibición del crecimiento del 50% (CI₅₀) expresadas en µg/mL (µM) de los diez aislados.

Aislado	MTZ		TDZ	
	CML	CI ₅₀ [Límites de confianza 95%]*	CML	CI ₅₀ [Límites de confianza 95%]*
JH31A4	4 µg/mL (23,4 µM)	0,29 [0,26-0,32]	4 µg/mL (16,2 µM)	0,43 [0,29-0,39]
C-1:NIH	2 µg/mL (11,7 µM)	0,54 [0,46-0,64]	4 µg/mL (16,2 µM)	0,34 [0,23-0,30]
1807	4 µg/mL (23,4 µM)	0,38 [0,34-0,43]	4 µg/mL (16,2 µM)	0,39 [0,35-0,44]
1232	2 µg/mL (11,7 µM)	0,42 [0,38-0,46]	4 µg/mL (16,2 µM)	0,70 [0,62-0,79]
11	4 µg/mL (23,4 µM)	0,45 [0,40-0,50]	4 µg/mL (16,2 µM)	0,38 [0,34-0,43]
IR78	512 µg/mL (2991 µM)	0,48 [0,39-0,57]	64 µg/mL (259 µM)	0,34 [0,29-0,39]
S019	8 µg/mL (46,7 µM)	1,05 [0,70-1,67]	4 µg/mL (16,2 µM)	1,39 [1,08-1,87]
S760	8 µg/mL (46,7 µM)	0,67 [0,60- 0,75]	4 µg/mL (16,2 µM)	1,25 [1,02-1,54]
S351	8 µg/mL (46,7 µM)	0,54 [0,48-0,62]	4 µg/mL (16,2 µM)	1,39 [1,08-1,87]
S852	4 µg/mL (23,4 µM)	0,26 [0,18-0,35]	4 µg/mL (16,2 µM)	0,29 [0,24-0,34]

* La CI₅₀ se ha calculado mediante análisis Probit con el software SPSS Statistics v.22 (IBM) a partir de seis ensayos independientes y reflejan valores en µg/mL.

II. 1. B. Citoadherencia

Los aislados que mostraron menos citoadherencia en las condiciones de estudio fueron 1807, 1232 y S019. El resto presentaron valores en torno al 17%. JH31A4 y C-1:NIH alcanzaron los porcentajes medios más altos de 20,4% y 19,2%, respectivamente.

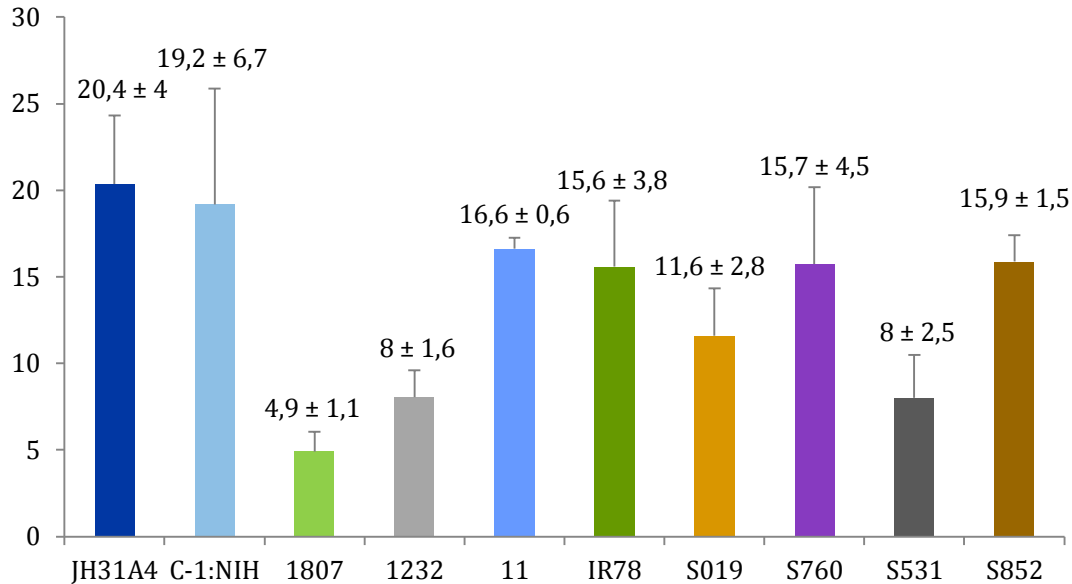


Figura 51: Porcentaje de citoadherencia obtenido para cada aislado tras 30 min de contacto con un cultivo de células HeLa.

II. 1. C. Citotoxicidad celular

Optimización del protocolo

En primer lugar se adaptó a las condiciones de nuestro laboratorio el protocolo descrito por Alderete *et al.* (1989) para la evaluación de la citotoxicidad celular de *T. vaginalis*. Esta técnica evalúa la viabilidad tras someter un cultivo celular al contacto con los parásitos, mediante la tinción con un colorante y su posterior lectura espectrofotométrica. El procedimiento seguido en el laboratorio se modificó empleando células HeLa y placas de 96 pocillos (apartado C.3 de Material y Métodos). La **figura 52** muestra la buena correlación lineal entre el número de células cultivadas en medio RPMI y la absorbancia ($R^2 = 0,9761$). También, se evaluó la idoneidad para el ensayo de dos concentraciones de células HeLa (10^5 y 5×10^4 cél./pocillo), considerando la más adecuada la de 5×10^4 cél./pocillo al obtenerse menor variabilidad entre las pruebas.

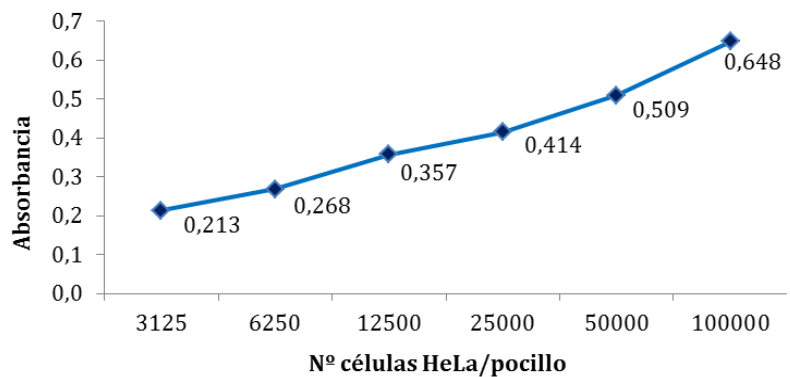


Figura 52: Determinación espectrofotométrica del número de células cultivadas en placas de 96 pocillos tras la tinción con cristal violeta.

Citotoxicidad parasitaria

La citotoxicidad parasitaria se evaluó a distintos ratios parásito:célula (2:1, 1:1, 1:2, 1:4) y a distintos tiempos de contacto (2, 4, 6 y 8 h). Los ratios 1:2 y 1:4 no mostraron diferencias a lo largo del tiempo en el periodo ensayado por lo que fueron descartados. La **figura 53** muestra de forma representativa los resultados de los aislados JH31A4 y 1807. Asimismo, la ausencia de diferencias significativas en la citotoxicidad de los diez aislados tras periodos de contacto largos (6 y 8 h) sugiere una posible saturación del sistema. A continuación se muestran los resultados de citotoxicidad parasitaria tras estandarizar la técnica a ratio parásito:célula 2:1 (**Figura 54**) y ratio 1:1 (**Figura 55**) tras 4 h de contacto.

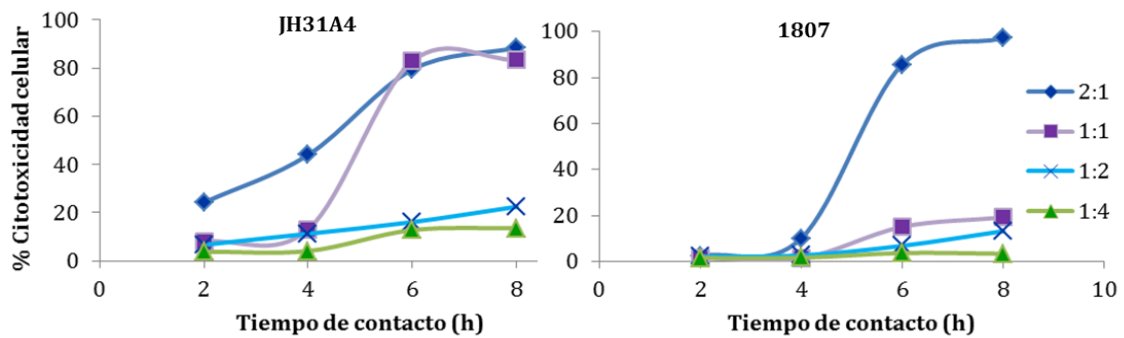


Figura 53: Porcentaje de citotoxicidad en células HeLa de los aislados JH31A4 y 1807 en función del tiempo de contacto (2, 4, 6 y 8 h) y del ratio parásito:célula.

Ratio 2:1

JH31A4*	C-1:NIH	1807*	1232*	11*	IR78*	S019*	S760	S351*	S852*
44,0 ± 4,5	10,0 ± 9,9	84,0 ± 9,7	60,7 ± 10,5	77,0 ± 5,0	16,4 ± 5,1	48,0 ± 10,9	35,0 ± 2,0	64,0 ± 4,7	20,4 ± 4,4

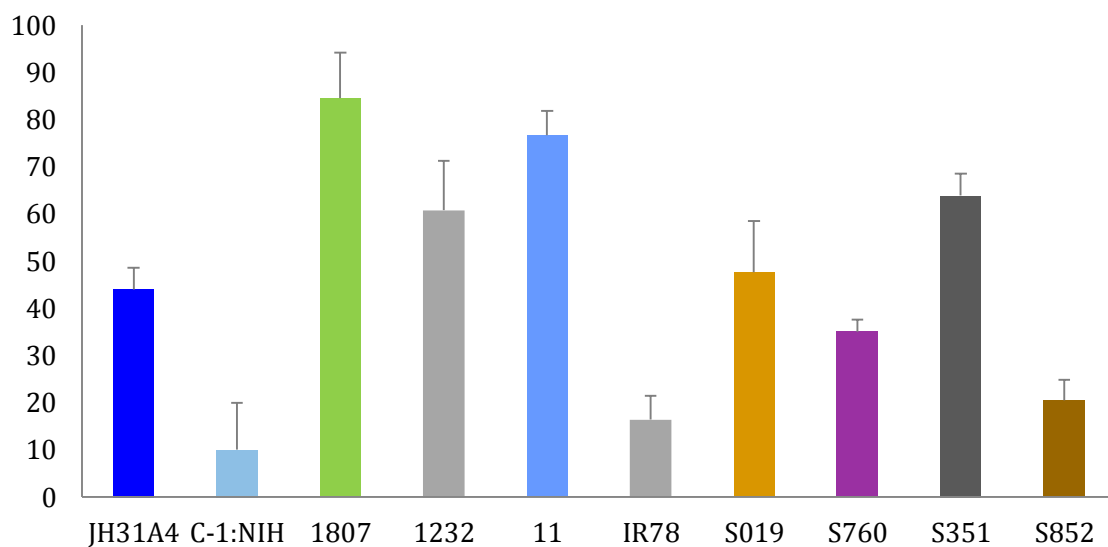


Figura 54: Porcentaje de citotoxicidad registrado tras mantener en contacto a los diez aislados con 50000 células HeLa en proporciones parásito:célula 2:1 durante 4 h.

Ratio 1:1

JH31A4	C-1:NIH	1807	1232*	11	IR78	S-019*	S-760	S-351*	S-852
13,0 ± 9,3	1,3 ± 2,2	20,8 ± 9,1	43,0 ± 9,7	6,2 ± 6,5	0 ± 0	55,0 ± 14,0	31,9 ± 20,0	35,0 ± 9,9	17,0 ± 18,3

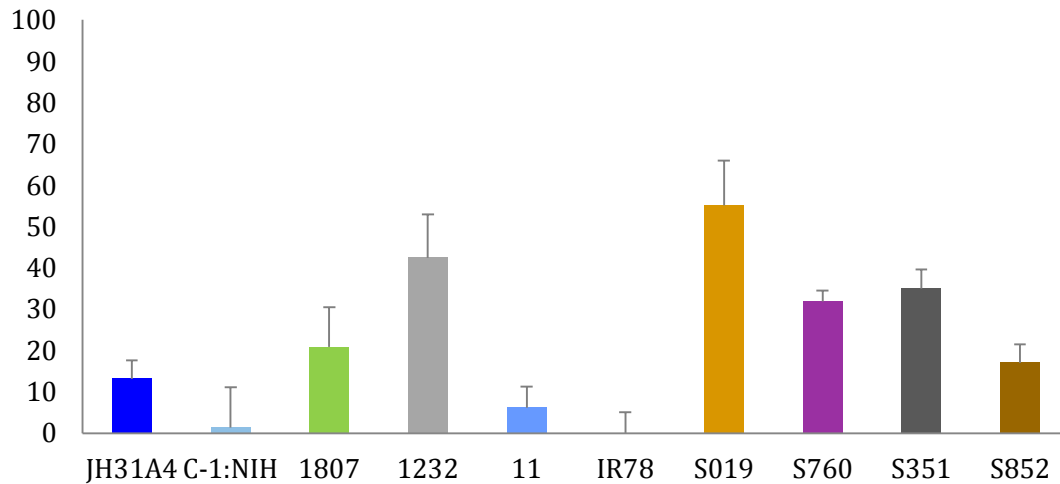


Figura 55: Porcentaje de citotoxicidad registrado tras mantener en contacto a los diez aislados con 50000 células HeLa en proporciones parásito:célula 1:1 durante 4 h.

El ratio 2:1 es el más adecuado para la caracterización de los aislados en función de la citotoxicidad que desarrollan frente a células HeLa. Aunque el comportamiento de los aislados sigue la misma tendencia en las dos condiciones, en aquellos que han presentado una baja actividad citotóxica como C-1:NIH, IR78 o S852, el ratio 2:1 ha permitido discernir mejor esta característica. Aunque pudiera esperarse un aumento de la citotoxicidad con el tiempo en todos los aislados, algunos de ellos como el S760 mostraron porcentajes de citotoxicidad similares tras 2 y 4 h de contacto.

II. 1. D. Presencia de virus (TVV)

La presencia de virus en *T. vaginalis* se correlaciona con la expresión de la proteína P270 en la superficie del parásito (Khoshnan y Alderete, 1994). El empleo de un anticuerpo monoclonal anti-P270 nos ha permitido detectar la expresión de la proteína en los diferentes aislados. Los aislados 1232, IR78, S852 y S351 pertenecen al Tipo I, también conocido como TVV- mientras que el resto de aislados (JH31A4, C-1:NIH, 1807, 11, S019 y S760) son del Tipo II/TVV+. La **figura 56** muestra una de las imágenes tomadas de cada tipo poblacional.

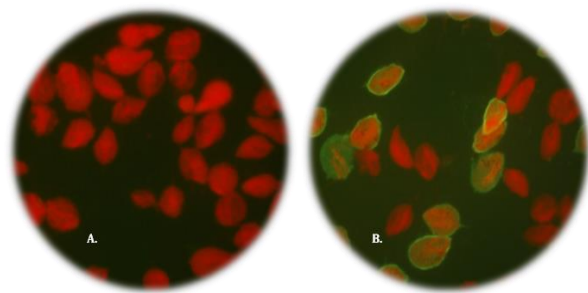


Figura 56: Imagen de los dos tipos poblacionales identificados mediante IFI empleando el Ac monoclonal C230 (anti-P270). **A.** Tipo I TVV-. **B.** Tipo II TVV+.

El 60% de los aislados estudiados son TVV+, con distintos porcentajes de trofozoítos infectados. El aislado que ha mostrado una subpoblación infectada mayor ha sido JH31A4 (P270s+ JH31A4 = 49,5%).

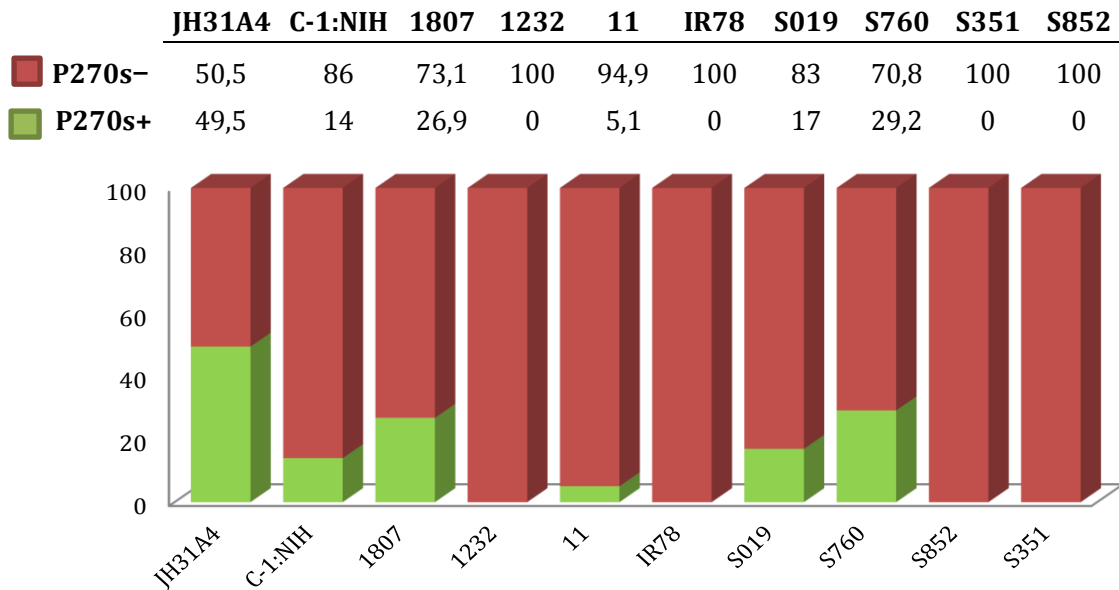


Figura 57: Diagrama de barras acumulado indicativo de los porcentajes de flagelados que expresan o no en su superficie la proteína inmunogénica P270 (P270s). Los resultados mostrados en la tabla proceden del recuento de seis campos.

II. 1. E. Presencia de *Mycoplasma hominis*

La **figura 58** muestra la amplificación del ADN que codifica para la región constante del ARNr 16S de *Mycoplasma*, a partir de cultivos axénicos de los 10 aislados. Solo los aislados S760 y S351 resultaron positivos al test, apareciendo una banda positiva por encima de los 400 pb (**Figura 58.C**, carriles 1 y 2). En el caso de S351 se observa una segunda banda correspondiente al marcador de control interno (carril 2, gel C). El resto de aislados (JH31A4, C-1:NIH, 1807, 1232, 11, IR78, S019 y S852) no presentaron ADN bacteriano tras la extracción.

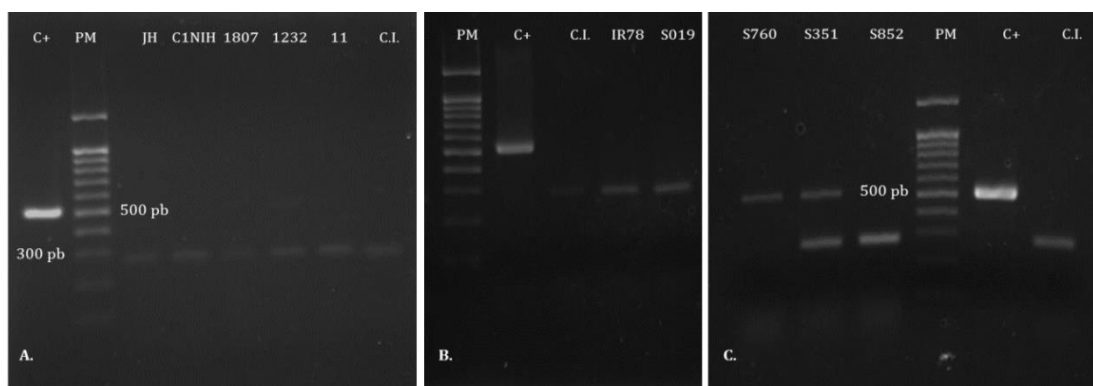


Figura 58: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio. Los tres geles muestran los resultados de la amplificación de los 10 aislados empleando los cebadores de la región constante del ARNr 16S de *Mycoplasma*. Todos los ensayos incluyen un control positivo (carriles 1A, 2B y 5C de los tres geles, respectivamente), un control negativo empleando agua como muestra de amplificación (carriles 8A, 3B y 6C) y un control interno que se revela como una banda a 270 pb en las muestras negativas.

II. 1. F. Patogenia experimental en modelo murino

Se ha evaluado la patogenia experimental de los diez aislados de *T. vaginalis* en el modelo murino de infección intraperitoneal siguiendo el baremo de Toyos modificado (Nogal *et al.*, 1997).

Los aislados se han clasificado en tres grupos en función de su índice de patogenia (IP):

- Cepas de alta patogenia (IP > 20)
- Cepas de media patogenia (IP 20-40)
- Cepas de baja patogenia (IP < 20)

La **figura 59** presenta la patogenia experimental de los aislados de *T. vaginalis* en el modelo murino.

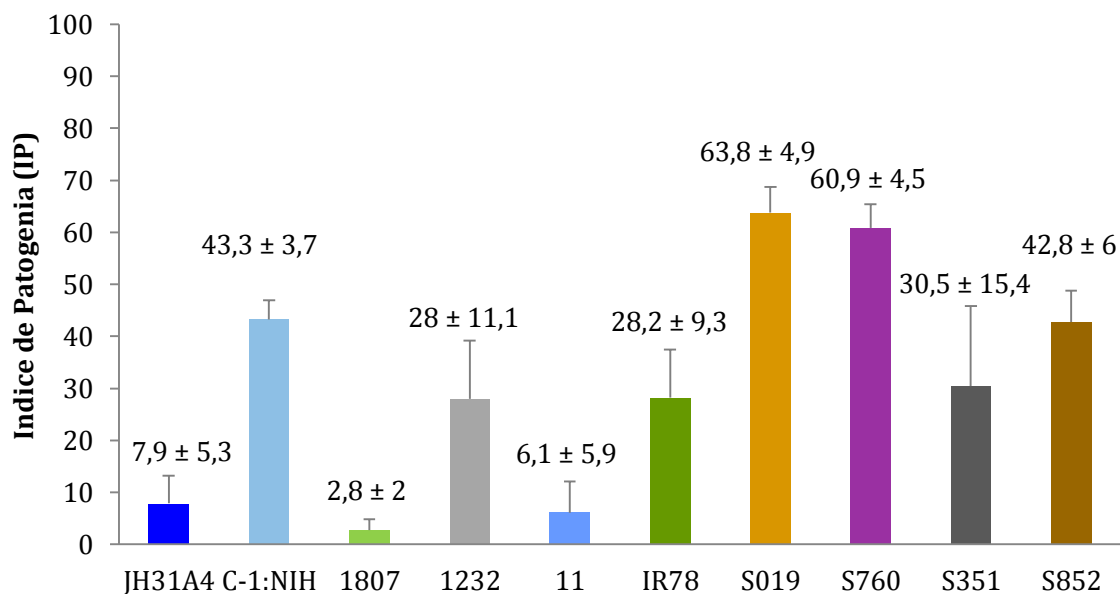


Figura 59: Representación gráfica mediante diagrama de barras de la patogenia experimental (IP) de los aislados de *T. vaginalis* en el modelo murino.

Los aislados C-1:NIH, S019, S760 y S852 resultaron ser los más virulentos con IP entre 64 y 40 puntos. Los aislados con patogenia media (valores de IP entre 28 y 38) son 1232 y IR78, mientras que JH31A4, 1807 y 11 resultaron ser de baja patogenia con IP < 8.

El análisis no paramétrico U de Mann Whitney se realizó para comparar estadísticamente los resultados de IP entre grupos 2 a 2. Los resultados (**Tabla 59**) muestran significación estadística entre los aislados en base a su patogenia. Se pueden diferenciar claramente tres grupos que se correlacionan con los agrupados previamente como baja (JH31A4, 1807 y 11), media (1232, IR78 y S851) y alta patogenia (C-1:NIH, S852 y S019, S760) con valores de significación $p > 0,125$.

Tabla 59: Valores de significación estadística tras el análisis no paramétrico U de Mann Whitney para muestras independientes 2 a 2.

	JH31A4	C-1:NIH	1807	1232	11	IR78	S019	S760	S351	S852
JH31A4	*	< 0,05	< 0,05	< 0,05	0,12	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
C-1:NIH		*	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	0,77
1807			*	< 0,05	0,13	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
1232				*	< 0,05	0,88	< 0,05	< 0,05	0,73	< 0,05
11					*	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
IR78						*	< 0,05	< 0,05	0,79	< 0,05
S019							*	0,15	< 0,05	< 0,05
S760								*	< 0,05	< 0,05
S351									*	0,037
S852										*

El 50% de aislados más virulentos (S019 y S760) causaron una mortalidad del 100%, mientras que los otros dos (C-1:NIH y S852) provocaron la muerte del 80,0% y el 81,3% de los animales de experimentación antes del día 15 p.i. El aislado S351 de virulencia media también destacó por la elevada mortalidad en más del 50% de los ratones. Tal y como cabría esperar, dos de los tres aislados de baja virulencia no fueron letales; mientras que el aislado 11 tan sólo causó la muerte de un ratón (**Figura 60**). Las puntuaciones obtenidas en base a las lesiones de cada órgano se muestran en la **figura 61**.

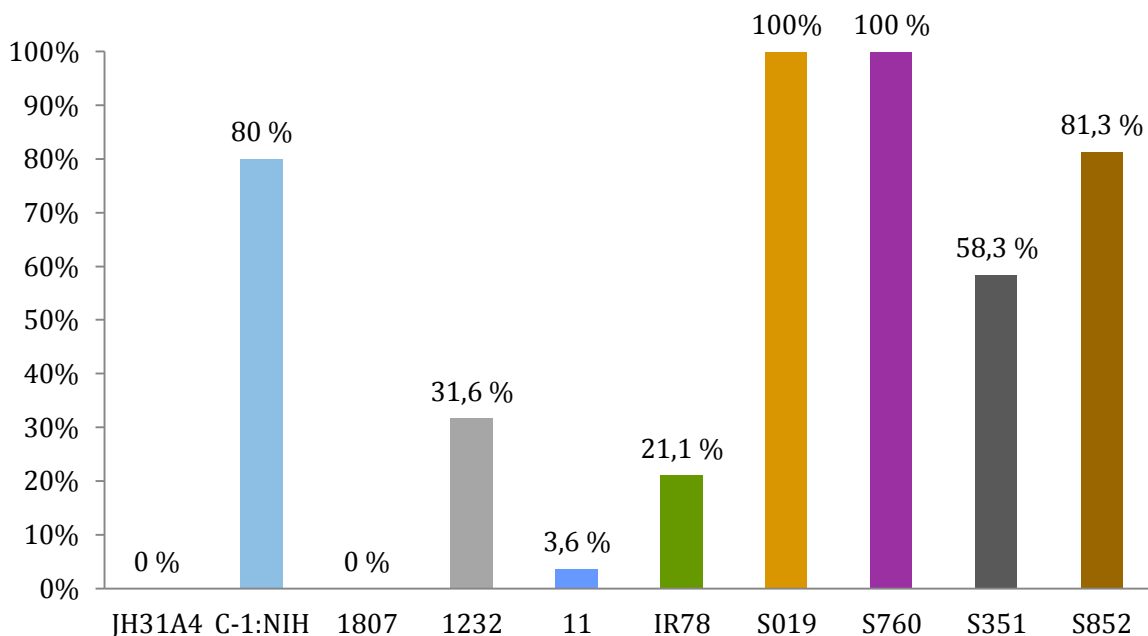


Figura 60: Porcentaje de mortalidad de los ratones infectados con los aislados de *T. vaginalis*.

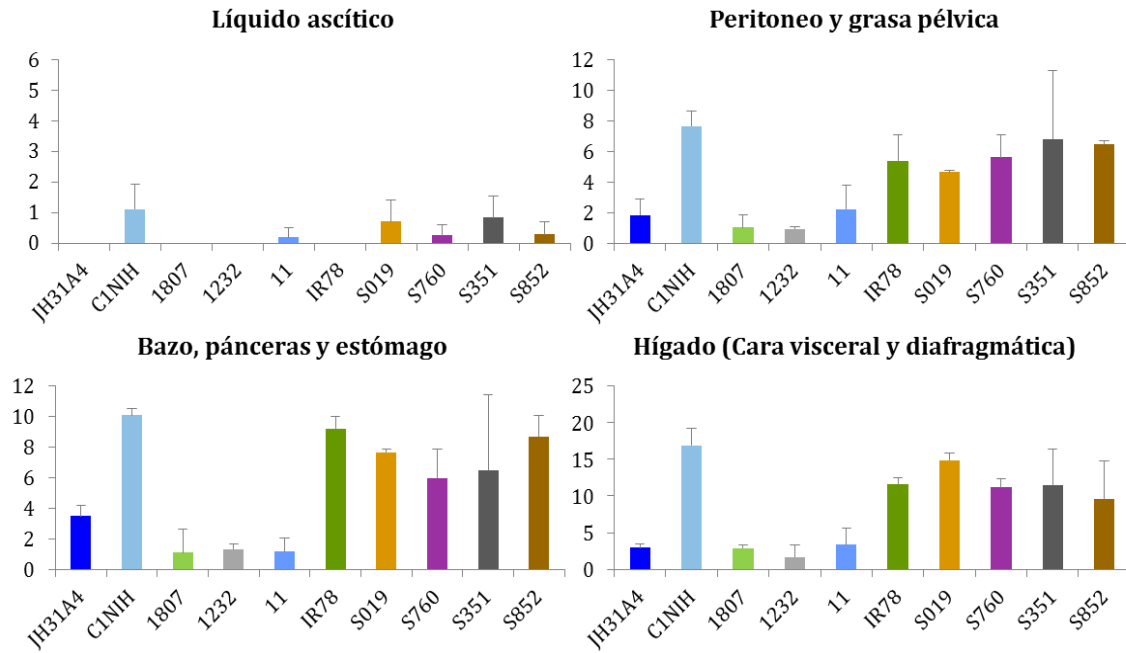


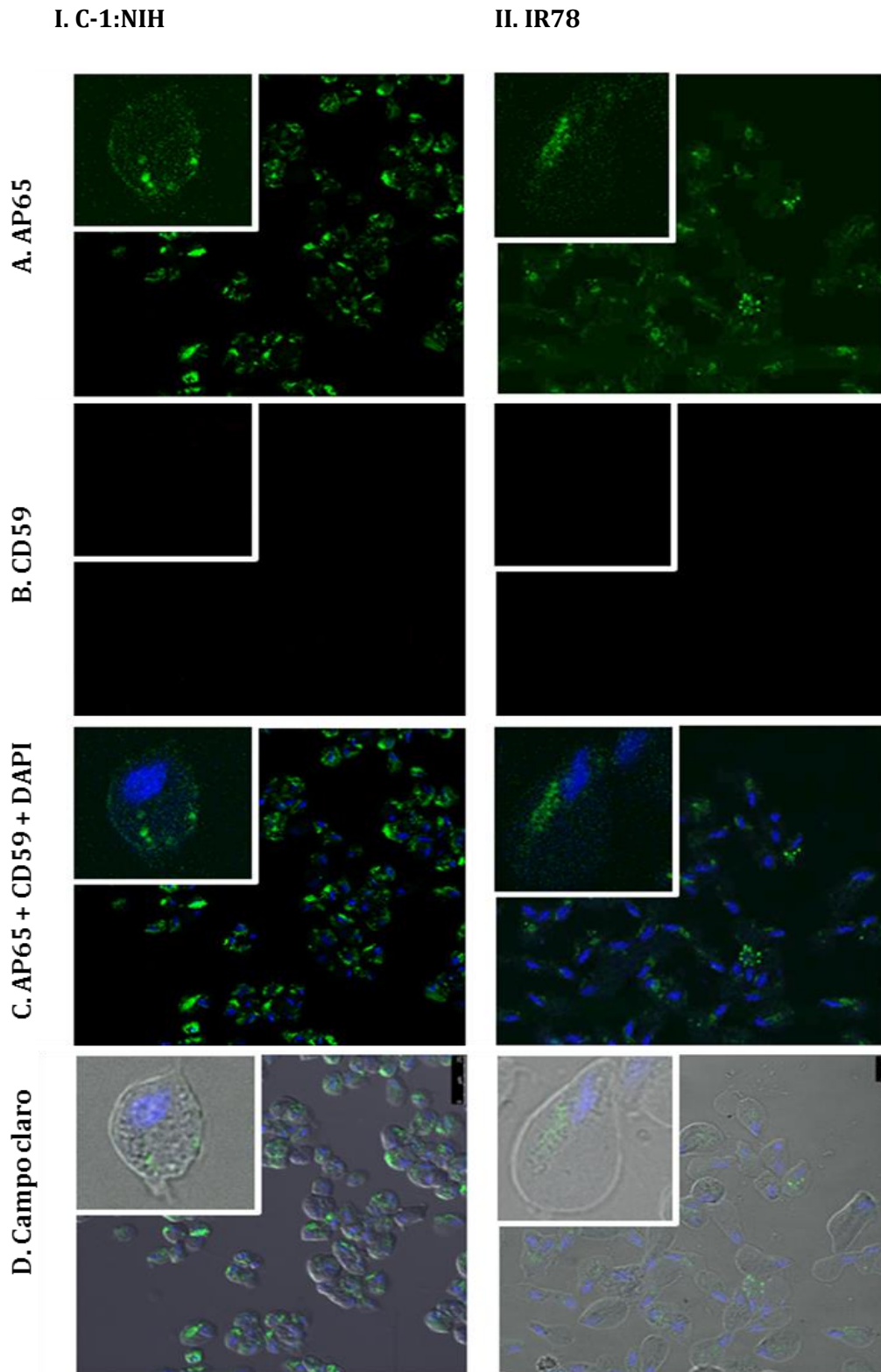
Figura 61: Puntuaciones obtenidas tras la evaluación de las lesiones generadas por los aislados en el modelo murino intraperitoneal.

II. 1. G. Estrategias de evasión del sistema del complemento de *T. vaginalis*: Papel de la CD59 y sensibilidad al suero humano

Papel de la CD59

En estudios previos se ha descrito la existencia de CPs capaces de lisar la fracción C3 del complemento e impedir su activación, tanto de la vía clásica como por la alternativa. En esta Tesis Doctoral, se han evaluado otros mecanismos capaces de evadir el efecto lítico del complemento, potenciando el efecto protector de esas CP. Entre los mecanismos de regulación del complemento, hemos centrado nuestra atención en la proteína CD59 o protectina, al tratarse de uno de los inhibidores más potentes de la formación del complejo de ataque a la membrana (CAM).

En primer lugar, se demostró la ausencia en *T. vaginalis* de secuencias de ADN homólogas al gen humano que codificasen para la CD59 (accession number CR407661). Este estudio se realizó mediante un análisis BLAST en las bases de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) y en el TrichDB (<http://www.trichdb.gov>). Tras confirmar que *T. vaginalis* carece de proteínas homólogas a CD59, como ocurre en otros parásitos, se planteó, a continuación, si el patógeno era capaz de secuestrar esta proteína de células del hospedador y cubrir su superficie como mecanismo de evasión del complemento. Para corroborar esta hipótesis, se llevaron a cabo estudios de microscopía confocal empleando un anticuerpo monoclonal (Acmo) anti-CD59 murino y su conjugado marcado con Alexa (rojo) y el Acmo 12G4 capaz de detectar la adhesina AP65 para marcar específicamente los trofozoítos de *T. vaginalis* y realizando su revelado con un conjugado marcado con FITC (verde). Estos estudios se realizaron con los aislados de *T. vaginalis* C-1:NIH e IR78. Inicialmente, se corroboró la ausencia de CD59 en la superficie de los dos aislados cultivados *in vitro* (**Figura 62**).



Escala: Panel I = 25 μ m Panel II = 10 μ m

Figura 62: Inmunofluorescencia de los aislados C-1:NIH (Panel I) e IR78 (panel II) mostrando la ausencia de CD59 en cultivos *in vitro*. Los trofozoítos son marcados con el Ac monoclonal 12G4 (A) mientras que la CD59 no es detectable (B). La detección de AP65 en combinación con DAPI se refleja en las columnas C y D (campo claro).

Se analizó la presencia de CD59 en los trofozoítos recuperados en el líquido ascítico de ratones infectados intraperitonealmente con el aislado C-1:NIH de *T. vaginalis*. La **figura 63** confirma la existencia de CD59 en la superficie del parásito. Asimismo, se aprecia en las imágenes de microscopía confocal una co-localización de la CD59 del hospedador y de la adhesina AP65 empleada para corroborar la presencia e integridad del parásito. Este hallazgo requiere la realización de estudios de inmunolocalización para confirmar lo observado en estas imágenes.

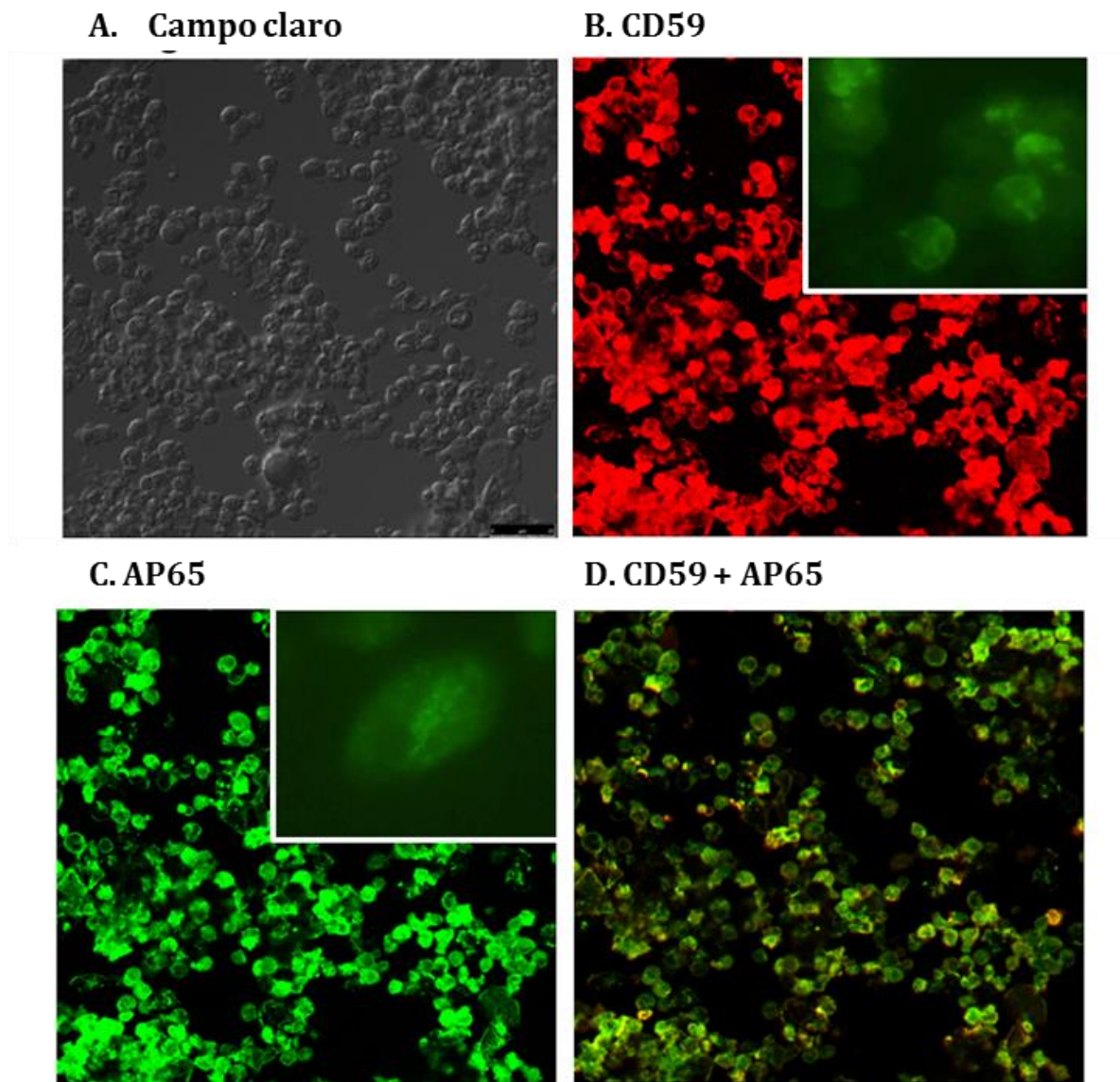


Figura 63: Detección en la superficie de *T. vaginalis* aislados de ratón (A) de CD59 (B). Los experimentos de microscopía confocal emplearon un Ac monoclonal frente a CD59 murino (B) así como frente a AP65 (C). El panel D muestra la combinación de ambas fluorescencias. Las muestras también se revelaron con el Ac secundario anti-ratón marcado con FITC (ventanas en apartados B y C), confirmando los resultados obtenidos con el conjugado marcado con Alexa. Escala: 25 μ m.

En un tercer estudio, se co-cultivaron los aislados C-1:NIH e IR78 con eritrocitos murinos. Teniendo en cuenta la capacidad hemolítica del parásito y la presencia de CD59 en la superficie de los glóbulos rojos (**Figura 64**), el objetivo de esta prueba fue determinar si la CD59 de estas células del hospedador podía ser incorporadas a la membrana de *T. vaginalis*, como se observó en el modelo murino.

A. Campo claro

B. CD59

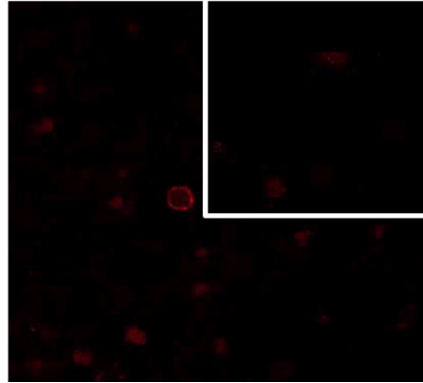
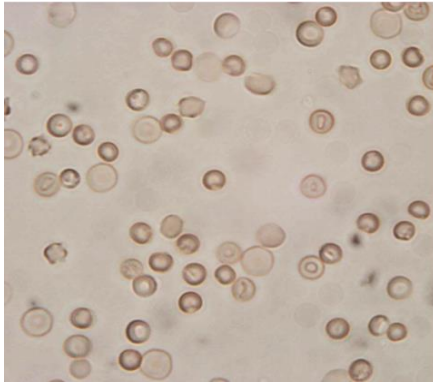


Figura 64: Confirmación de la presencia de CD59 en la superficie de glóbulos rojos de ratón.

Las imágenes de microscopía (**figura 65**) coinciden con los resultados previos tras las infecciones murinas (**Figura 63**). La ausencia de fluorescencia en los cultivos (**Figura 62**) y la presencia de una fluorescencia patente tras el contacto con células (glóbulos rojos) que contienen CD59 en su superficie, corroboran la hipótesis propuesta.

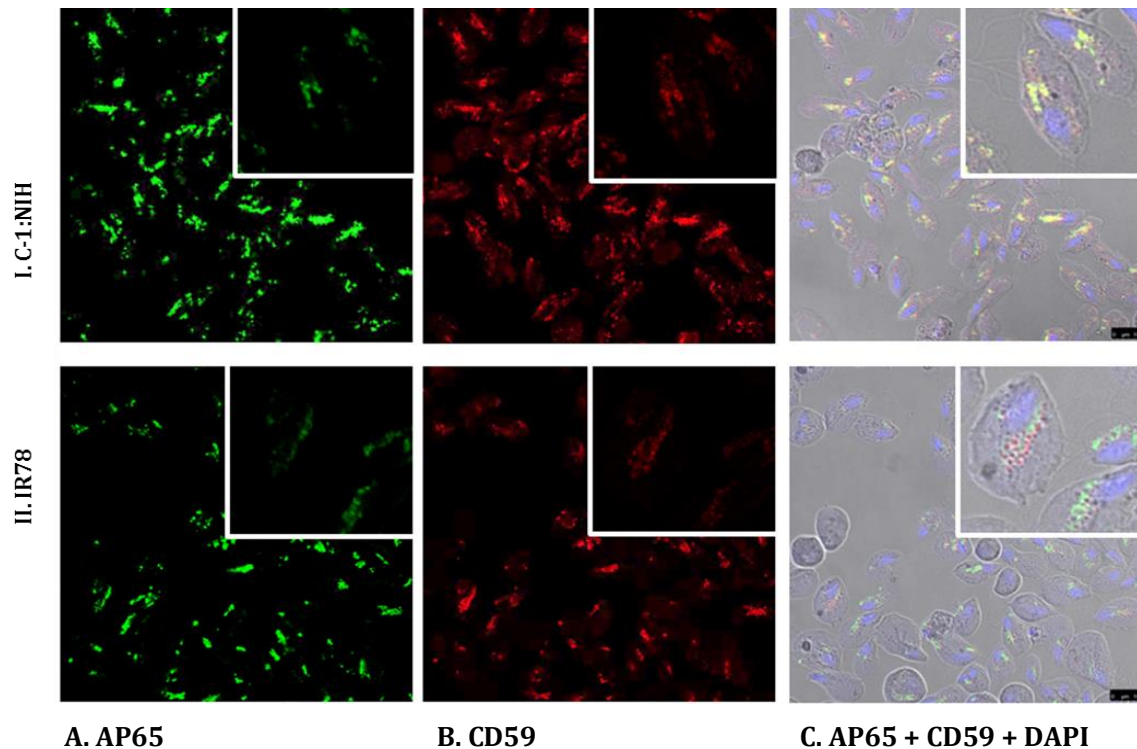


Figura 65: Microfotografías de microscopía confocal que muestran la adquisición de CD59 por los aislados de *T. vaginalis* C-1:NIH (I) e IR78 (II) cultivados en presencia de eritrocitos murinos. Los tricomonádidos muestran en su superficie AP65 (A), así como CD59 tras cultivarse con glóbulos rojos (B). La presencia e integridad de los parásitos se observa tras combinar los planos de fluorescencia para AP65 y CD59 en campo claro junto con el colorante DAPI (C). Escala: 10 µm.

Caracterización de los aislados en función de su sensibilidad al complemento (SC) del suero humano

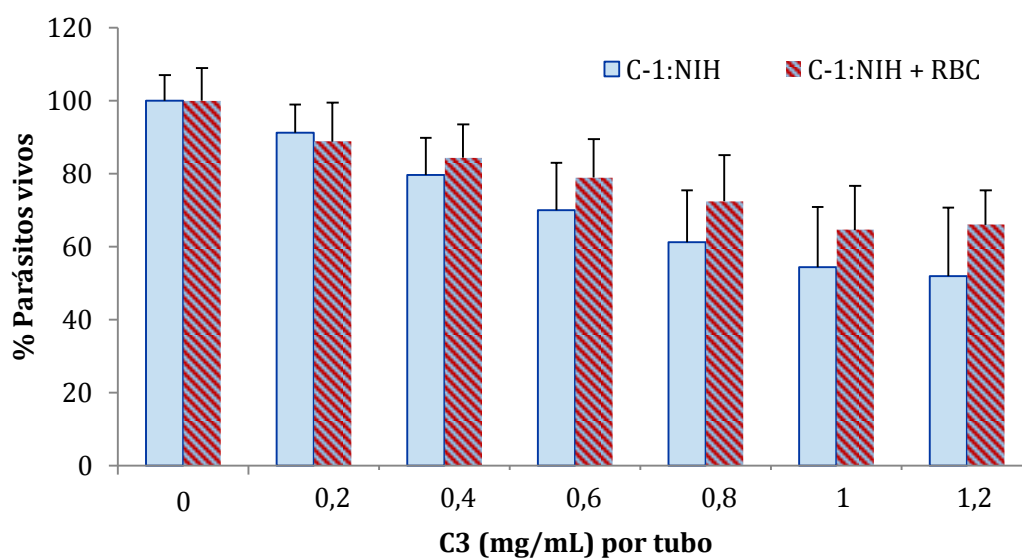
El efecto citolítico del sistema del complemento (SC) del suero humano se ha estudiado en los distintos aislados de *T. vaginalis*. Inicialmente, se estandarizó el procedimiento para poder evaluar las diferencias entre aislados de una forma rápida y eficaz.

En este sentido, se ha comprobado que la CD59 adquirida del hospedador proporciona al parásito cierto grado de protección al SC; en comparación con un cultivo axénico carente de CD59. Para ello, se sometieron a los dos aislados cultivados con y sin eritrocitos de ratón a distintos volúmenes de suero humano, con un rango de concentración de 0,2 mg/mL a 1,2 mg/mL de C3, durante 1,5 h. La viabilidad de los flagelados se determinó siguiendo el método espectrofluorimétrico con resazurina presentado en esta Tesis Doctoral. Los datos representados en diagrama de barras revelan la existencia de una acción lítica dependiente de la concentración de C3 en ambos aislados (C-1:NIH e IR78).

Asimismo, la **figura 66** muestra en todos los puntos una tendencia a una mayor supervivencia de los tricomonádidos co-cultivados con glóbulos rojos que en los cultivos sin células del hospedador. La regresión lineal aplicada al ensayo de los aislados estudiados muestra una correlación estadísticamente significativa entre la concentración de C3 en suero y la viabilidad de los trofozoitos cultivados con y sin glóbulos rojos ($p < 0,05$).

A la máxima concentración de C3 (1,2 mg/mL), se detectó un 21,4% más de trofozoitos en los cultivos de C-1:NIH suplementados con eritrocitos que en los cultivos control. El porcentaje de supervivencia del aislado IR78 fue un 23% superior en comparación del cultivo sin eritrocitos, esto es, un resultado similar al del cultivo de C1-NIH.

El análisis estadístico del experimento mediante *t*-Student de muestras emparejadas mostró una significación de 0,027 y 0,002, respectivamente. Los resultados muestran diferencias significativas en ambos aislados cuando se cultivan con y sin eritrocitos.



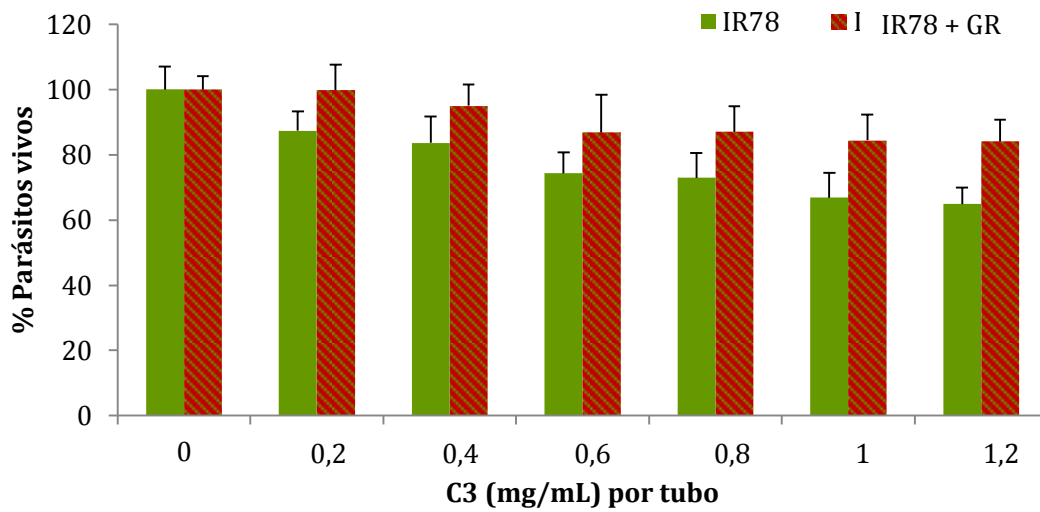


Figura 66: Viabilidad de los aislados C-1:NIH e IR78 cultivados en ausencia y presencia (barras rojas) de glóbulos rojos.

A continuación se muestran los resultados de sensibilidad de los diez aislados al complemento (SC) presente en suero humano (SH). Para esta caracterización, los cultivos se incubaron con un volumen de SH que contenía una concentración constante de C3 de 0,8 mg/mL. El porcentaje de trofozoitos viables, tras 1,5 h de incubación, se evaluó mediante la técnica espectrofluorimétrica con resazurina.

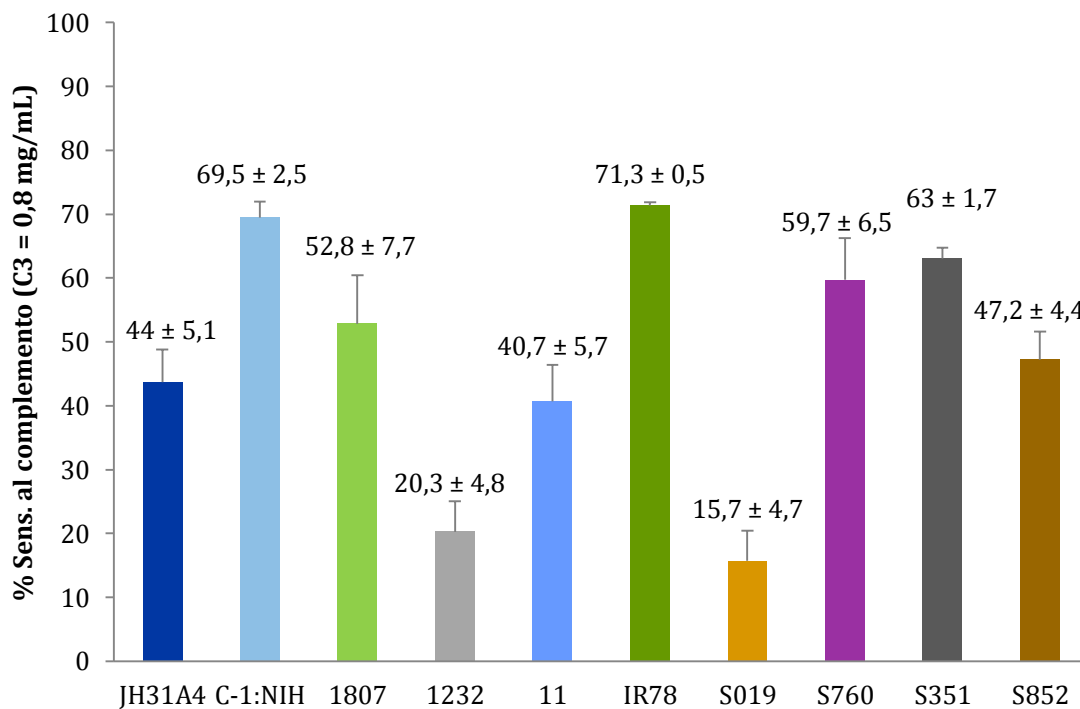


Figura 67: Porcentaje de supervivencia de los diez aislados. Se expresa la media y D.S. de tres experimentos independientes.

Los resultados mostrados en la **figura 67** se sometieron a un análisis no paramétrico para muestras independientes (U de Mann Whitney). Los aislados más resistentes a la acción del SH fueron 1232 y S019 con porcentajes de sensibilidad inferiores al 25%. Por su parte, los aislados JH31A4, 11 y S852 mostraron una sensibilidad media al suero de un 25 a un 45%. Y finalmente, los aislados más sensibles resultaron ser C-1:NIH, IR78, S351, S760, 1807 y S852 con porcentajes de sensibilidad superiores al 47,2%.

Tabla 60: Valores de significación estadística tras el análisis no paramétrico U de Mann Whitney para muestras independientes 2 a 2.

	JH	C1NIH	1807	1232	11	IR78	S019	S760	S351	S852
JH31A4	*	0,05	0,10	0,05	1,00	0,08	< 0,05	< 0,05	< 0,05	0,29
C1NIH		*	0,05	0,08	0,06	0,44	0,06	0,12	0,05	0,06
1807			*	< 0,05	0,05	0,05	< 0,05	0,17	< 0,05	0,33
1232				*	< 0,05	0,08	0,16	< 0,05	< 0,05	< 0,05
11					*	0,06	< 0,05	< 0,05	< 0,05	0,08
IR78						*	0,06	0,05	0,05	0,06
S019							*	< 0,05	< 0,05	< 0,05
S760								*	0,12	< 0,05
S351									*	< 0,05
S852										*

La siguiente tabla refleja de forma resumida las características biológicas mostradas por los diez aislados.

Tabla 61: Resultados de la caracterización biológica de los aislados de *T. vaginalis*

	Sensibilidad	Citoadh.	Citotox.	TVV	<i>Mycoplasma</i>	IP	Sens. SC
JH31A4	Sensible	Alta	Media	+	-	Bajo	Media
C-1:NIH	Sensible	Alta	Baja	+	-	Alto	Alta
1807	Sensible	Baja	Alta	+	-	Bajo	Alta
1232	Sensible	Baja	Alta	-	-	Medio	Baja
11	Sensible	Media	Alta	+	-	Bajo	Media
IR78	Resistente	Media	Baja	-	-	Medio	Alta
S019	Sensible	Media	Media	+	-	Alto	Baja
S760	Sensible	Media	Media	+	+	Alto	Alta
S351	Sensible	Baja	Alta	-	+	Medio	Alta
S852	Sensible	Media	Baja	-	-	Alto	Media

II. 2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

Se ha procedido a la caracterización molecular de los diez aislados estudiados biológicamente mediante el análisis de distintos *loci* para buscar e identificar uno o varios marcadores, que permitan distinguir variaciones intraspecíficas en este patógeno y su posible correlación con la virulencia.

II. 2. A. ITS: *Internal Transcribed Spacers*

La región ITS1-5.8S ARNr-ITS2 de los 10 aislados se secuenció empleando los cebadores TFR1 y TFR2 publicados por Felleisen (1997). Todos los productos de PCR generaron un amplicón de 372 pb (**figura 68**). No se detectó ninguna contaminación en los controles de PCR.

Los cromatogramas recibidos del Centro Genómico del Parque Científico (CEI Campus Moncloa) se revisaron manualmente para su procesamiento mediante el programa Chromas Pro v.1.5 (Technelysium Pty. Ltd., Australia). Las 10 secuencias se alinearon mediante el método Clustal W incluido en el programa MegAlign (*Laser-gene package*). El límite de la región ARNr 5.8S se estableció siguiendo el criterio definido por la base de datos Rfam 11.0, mientras que para las regiones ITS que flanquean la región codificante se siguieron los criterios establecidos por Felleisen (1997).

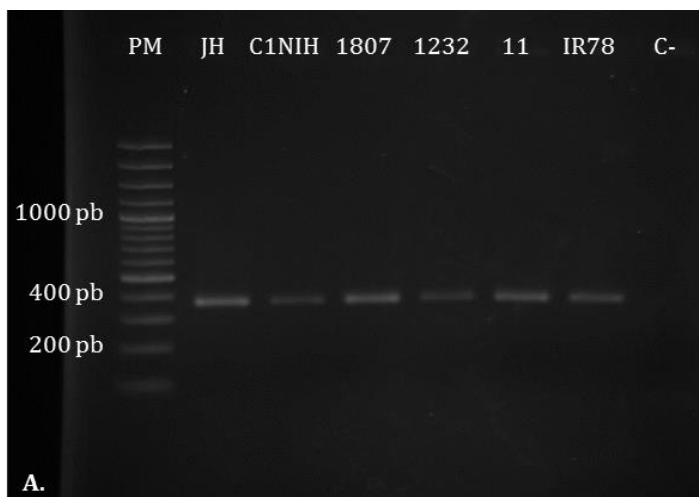
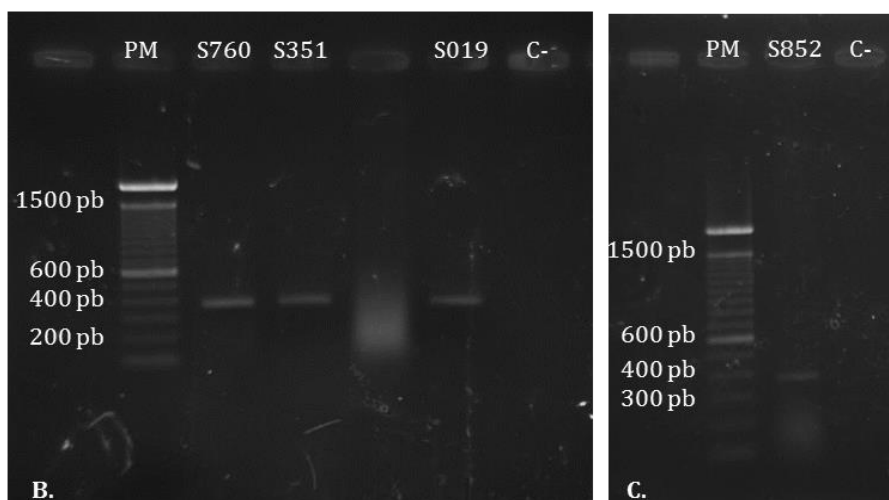


Figura 68:
Electroforesis en gel de agarosa 1,5 % de los productos de PCR purificados del locus ITS1 - 5.8S ARNr - ITS2 de aislados de *T. vaginalis*.



Los análisis comparativos de los 10 aislados no mostraron ninguna divergencia. No obstante, se llevó a cabo el alineamiento con otras 30 secuencias genómicas de *T. vaginalis* publicadas en las bases de datos GenBank/EMBL/DDBJ, mostrando ratios de identidad del 99,3% al 100%. El alineamiento completo de las 40 secuencias (Anexo suplementario; CD) muestra mutaciones puntuales de 1 único nucleótido en tres posiciones distintas de la región ITS1 y una diferencia en el locus ITS2. Las mutaciones puntuales incluyen 3 transversiones en la región ITS1 (T→C, A→C y C→T) y 1 transversión en la región ITS2 (A→T) (Anexo suplementario; CD). En la región codificante del 5.8S ARNr de la secuencia FJ376711 se pueden observar la inserción de dos cisteínas. Salvo esta excepción, el resto de secuencias presentaron los siguientes tamaños: ITS1 de 80 nucleótidos, 5.8S ARNr de 162 nucleótidos e ITS2 de 56 nucleótidos. Destaca la transversión C→T localizada en la posición 66 del ITS1, detectada en el 22,5% de las secuencias analizadas (9/40). El resto de mutaciones tan sólo se describieron en una única secuencia genómica.

II. 2. B. MS/SSR: Microsatélites

La homología elevada en las secuencias analizadas para el locus ITS1-5.8S-ITS2 nos obligó a buscar otras regiones genómicas que permitan la caracterización de los aislados de *T. vaginalis*. Carlton *et al.* (2011) estudiaron de forma exhaustiva un amplio panel de MS presentes en el genoma de este parásito, confirmando su utilidad para el estudio de la diferencias entre aislados, a través de estas regiones no codificantes. De los 86 MS genotipados por este grupo, se seleccionaron los tres *loci* con mayor frecuencia de mutación (MS006, MS129 y MS184). Los tres MS amplifican regiones de tripletes repetidas en tándem y con localizaciones en distintos cromosomas del parásito. Para la caracterización de estas regiones genómicas diseñaron los cebadores a los que se les asoció una secuencia constante para el anclaje de un fluorocromo (Hex/Fam).

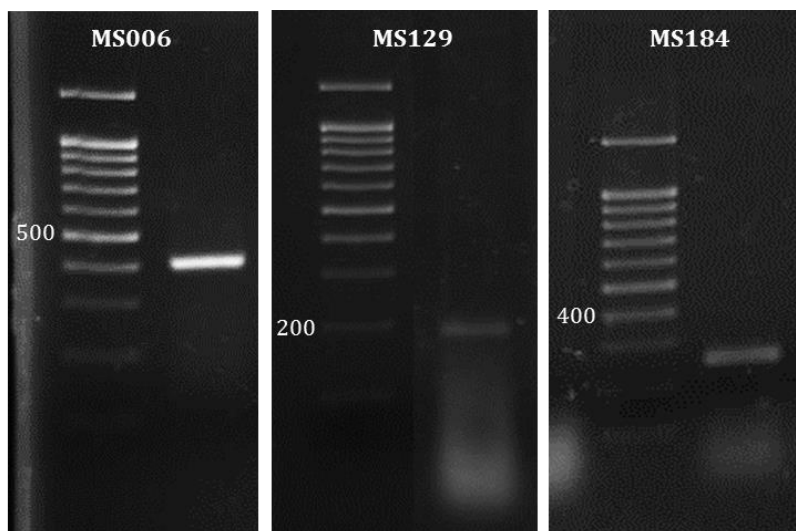


Figura 69: Tamaño de los amplicones del panel de microsatélites estudiados (MS006, MS129 y MS184). Imagen obtenida al evaluar los resultados del aislado JH31A4.

El objetivo de esta técnica es estudiar el tamaño de las regiones amplificadas, no siendo de interés su secuencia al tratarse de una región basada en repeticiones en tándem de los tripletes de distinto tamaño TCC, ATT o TTG, respectivamente. La variabilidad que puede encontrarse es de tan sólo unos pocos nucleótidos no llegando a ser diferenciada a través de una electroforesis en gel de agarosa. En la **figura 69** se muestra uno de los 10 aislados estudiados, tomándose la imagen como representativa para mostrar la diferencia de tamaños de los tres *loci* escogidos.

Los análisis de tamaño de fragmentos revelaron diferencias en las secuencias estudiadas (**Tabla 62**). En los tres marcadores analizados, el 80% de los aislados mostraron el mismo tamaño. Los aislados IR78 y S852 presentaron tamaños del amplicón MS006 de 412 y 407 nucleótidos (nt), respectivamente, mientras que el resto de los ocho aislados restantes, mostraron fragmentos MS006 idénticos de 395 nt. En lo que respecta al MS129, *T. vaginalis* S019 reveló un producto de PCR de 7 nt más pequeño que el resto de muestras (MS129_{S019} = 185 nt vs. MS129_{restantes} = 192 nt). Finalmente, los aislados 1232 y S019 presentaron un amplicón MS184 distinto al del resto de muestras parasitarias de 250 nt. Los aislados JH31A4, C-1:NIH, 1807, 11, S760 y S351 mostraron el mismo perfil de microsatélites. No obstante, S019 y S852 han presentado la mayor divergencia con respecto al resto de aislados con diferencias en dos de los tres *loci* estudiados. En resumen, los aislados pueden agruparse en dos clusters: el primero formado por JH31A4, C-1:NIH, 1807, 11, S760 y S351 no mostró diferencias en los tamaños de los tres MS analizados. Sin embargo el análisis de tamaño de los fragmentos de 1232, IR78, S019 y S852 presentaron al menos algún MS con un tamaño distinto a los aislados del primer grupo.

Tabla 62: Tamaño de los fragmentos de los tres MS estudiados en los 10 aislados. El análisis de la señal fluorescente se realizó con el programa PeakScanner v 1.0.

MS	JH31A4	C-1:NIH	1807	1232	11	IR 78	S019	S760	S852	S351	G3*
006	395	395	395	395	395	412	395	395	407	395	406
129	192	192	192	192	192	192	185	192	186	192	193
184	250	250	250	241	250	250	253	250	250	250	254

* Los datos mostrados para el aislado G3 han sido tomados del estudio de Carlton et al. (2011).

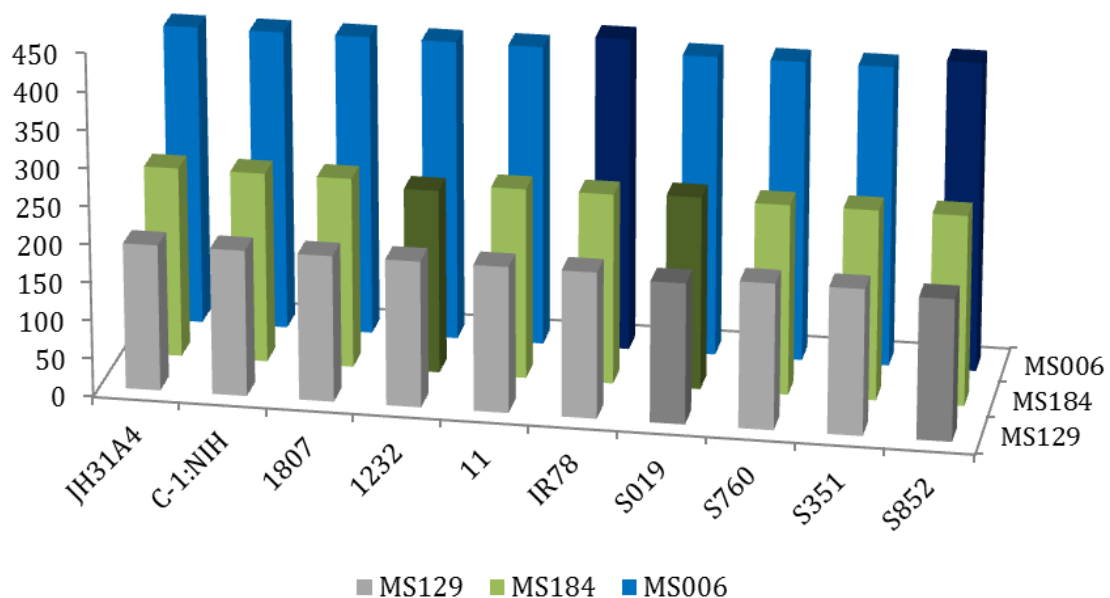


Figura 70: Tamaño de los fragmentos de PCR tras la amplificación de los microsatélites MS006, MS129 y MS184 de las 10 muestras de *T. vaginalis*. La gráfica destaca las divergencias observadas en el tamaño de los fragmentos de los tres MS para cada aislado.

II. 2. C. SNP: *Single Nucleotide Polymorphism*

Asimismo, Conrad *et al.* (2011) en su estudio de diversidad genética estudiaron genes de copia única (SCG). Los polimorfismos genéticos en un único nucleótido (SNP) suelen localizarse en este tipo de genes siendo de gran interés para el estudio de la evolución poblacional de los organismos. De los seis SCG propuestos por este grupo, se escogieron los tres que mostraron un mayor número de mutaciones puntuales (SNP) en las secuencias publicadas. Se diseñaron los cebadores con el fin de amplificar las regiones más hipervariables de los tres genes seleccionados. El primer SCG codifica a una proteína de superficie análoga a la metalopeptidasa leishmanina GP63a. Los otros dos *loci* pertenecen a genes conservados (housekeeping) denominados PMS1 y Mlh1a, que parecen estar implicados en procesos de reparación del ADN por mal-apareamiento mediante *mismatch*. De los tres SCG escogidos, Mlh1a no mostró muchas variaciones por lo que se descartó del estudio.

GP63a

Este gen presenta un tamaño de 1425 pb. La secuenciación y alineamiento de esta metalopeptidasa presente en los diez aislados de *T. vaginalis* mostró un número alto de mutaciones puntuales (Anexo suplementario; CD). La región codificante de la secuencia consenso no mostró regiones hipervariables a partir del nucleótido 332, a excepción de una mutación puntual en el aislado 11. Por ello, no se procedió a la secuenciación con el cebador reverso (GP63R) de los aislados con secuencias de menor tamaño.

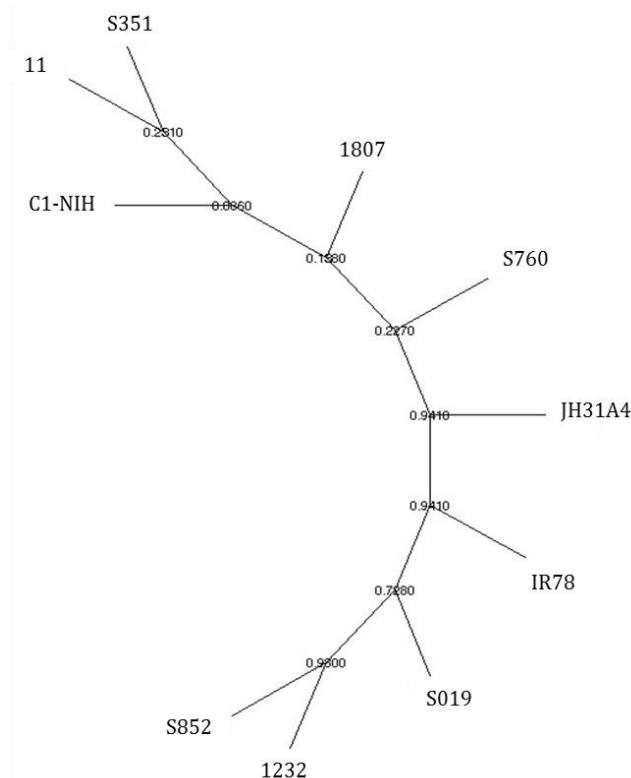


Figura 71: Dendrograma obtenido mediante NJ a partir de las secuencias del gen GP63a

Los aislados JH31A, C-1:NIH, 1807, S760 y S351 mostraron una similitud del 100% en los fragmentos analizados para este SCG. Los aislados 11 y 1232 de *T. vaginalis* presentaron

las mayores divergencias, con porcentajes entre 1,2% y 3,1%, con el resto de aislados del Departamento, así como con las otras secuencias de las bases de datos, a excepción de la XM_001324948, en la que existe una similitud del 100%.

Los alineamientos de nuestros aislados muestran 14 mutaciones puntuales de las cuales, 10 fueron conservadas; apareciendo en otros aislados analizados por otros grupos de investigación. De las otras cuatro mutaciones restantes, tres se localizan en las posiciones 203, 204 y 438 del aislado 11 (transversiones T→A y T→G y T→G) y la cuarta la presenta el aislado 1807 en posición 487. De nuestros 10 aislados, 1232 y S852 presentaron 7 de las 14 mutaciones. En contraposición, los aislados con menor variabilidad fueron JH31A4, C-1:NIH, 1807, S760 y S531, mostrando una única transición A→G en la posición 148 en relación con la secuencia consenso. Esta SNP también se encuentra presente en las secuencias HM365125 y HM365121.

Las diferencias presentes en las secuencias se muestran representadas en el dendrograma de la **figura 71**. En ella se puede apreciar cómo existe una diferencia clara en cuanto a la evolución de ese gen a lo largo de los aislados. Las diferencias mayores se encuentran en los grupos cuyas ramas se encuentran en extremos contrapuestos (S351/11 vs. S852/1232). A través de estas representaciones no se puede conocer cuál de los dos grupos es el más ancestral. No obstante se aprecia una evolución clara de GP63a a través de los aislados estudiados.

PMS1

Este SCG posee un tamaño de 1636 nt. Se compararon las secuencias de nuestros aislados con otras siete secuencias del mismo gen publicadas por otros autores y de un tamaño de 496 nt. Los resultados mostraron tan sólo una transición G→A en el aislado 1232. Dicha mutación puntual se encuentra en el aislado C-1:NIH (GenBank accession number DQ321767) (Malik et al., 2008). Sin embargo, en el resto de los nueve aislados objeto de estudio en esta Tesis, incluyendo nuestro aislado C-1:NIH, no se produjo dicha mutación. El resto de la secuencia es homóloga en nuestros 10 aislados. Tan solo se observaron dos transversiones puntuales G→A y A→G en las secuencias de *T. vaginalis* previamente publicadas de los aislados G3 y C1NIH por Carlton et al. (2007) y Malik et al. (2008).

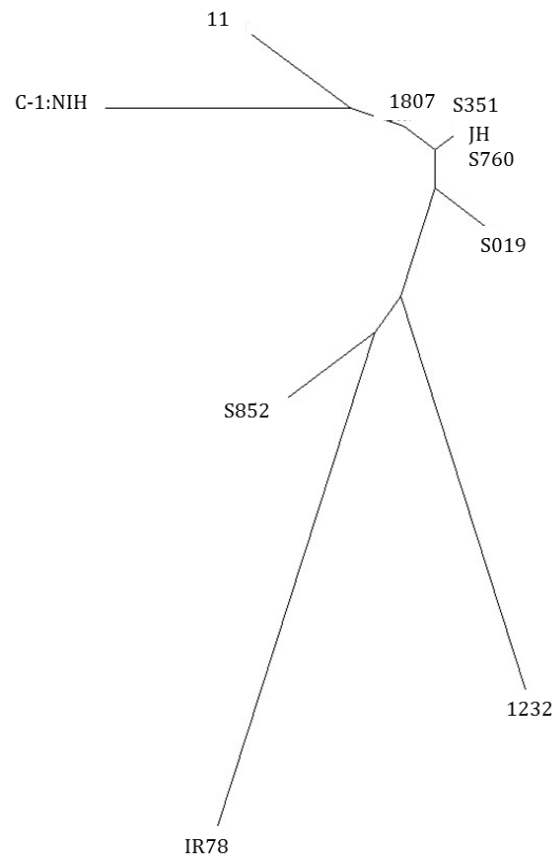


Figura 72: Dendrograma obtenido mediante NJ a partir de las secuencias del gen PMS1.

La mayoría de los polimorfismos puntuales se localizan en el resto de la secuencia amplificada. Los aislados con mayor número de mutaciones puntuales fueron IR78 y 1232 con 8 y 7 SNP, respectivamente. En la **figura 72**, se observa como ambos aislados se encuentran representados en las ramas más alejadas del resto de aislados. Asimismo, C-1:NIH, 11, S019 y S852 se encuentran alejados del centro del dendrograma. En estos cuatro aislados se identificaron entre 1 a 3 mutaciones nucleotídicas. El resto de secuencias, agrupadas en el centro, no mostraron ninguna divergencia con la secuencia consenso (Anexo suplementario; CD). Esta misma agrupación, con ligeras modificaciones en cuanto al orden evolutivo, es muy similar al observado en el gen GP63a (**Figura 71**). En este caso la diferencia en dos grupos es mucho más clara que en el caso de GP63a en el que la evolución era más lineal. En PMS1, se distinguen bien los dos extremos formados por los aislados 11, C-1:NIH, S351, 1807, JH31A4 y S760 por un lado y S852, IR78, 1232 y S019 por otro.

Para mostrar más claramente la agrupación idéntica con ambos SCG, se muestra en la **figura 73** el tanglegrama que compara los dos resultados. De esta forma se valida la selección de los dos marcadores para agrupar de forma fiable a aislados de *T. vaginalis*.

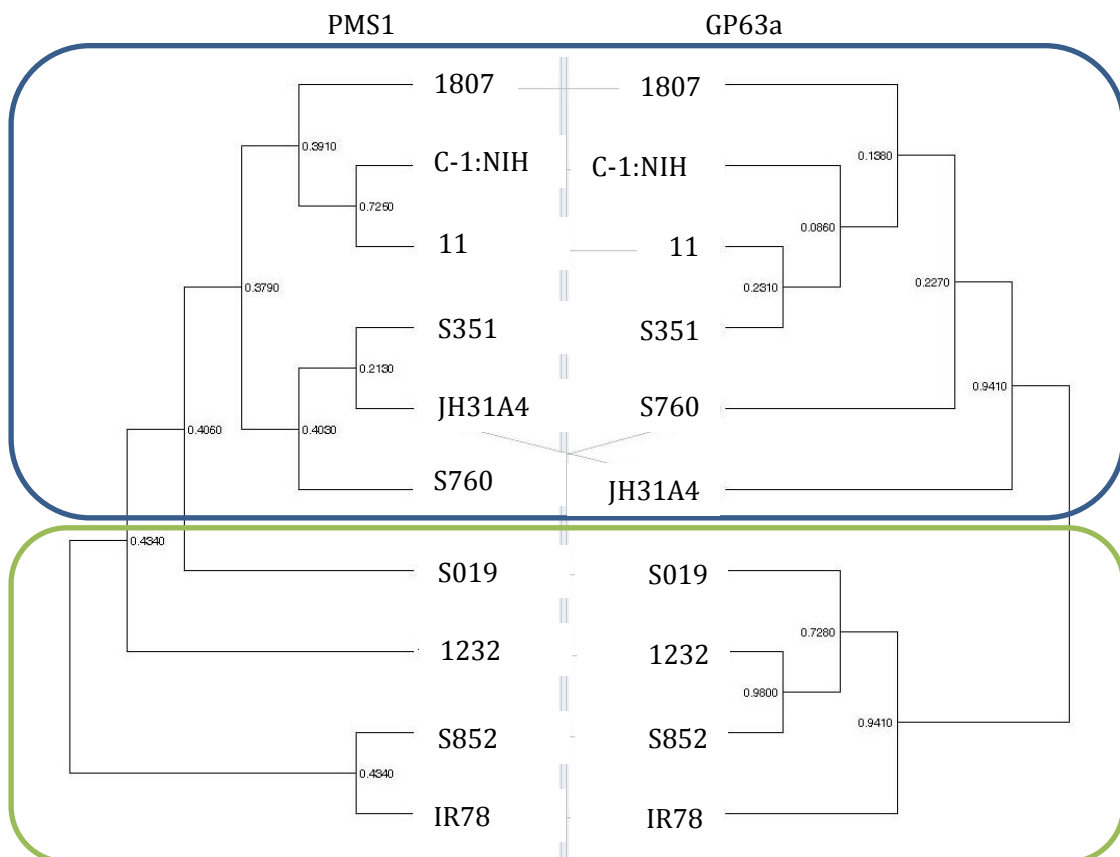


Figura 73: Tanglegrama comparativo entre las secuencias de los 10 aislados para los genes PMS1 y GP63a.

El tanglegrama refleja los dos grupos en los que se dividen los aislados. El grupo I, compuesto por los aislados 1807, C-1:NIH, 11, S851, S760 y JH31A4, y el grupo II por S019, 1232, S852 e IR78.

VI. Discusión

Discusión

I. PROCEDIMIENTO SECUENCIAL DE CRIBADO FARMACOLÓGICO FRENTE A *Trichomonas vaginalis*

El objetivo prioritario de este capítulo ha sido el desarrollo y puesta a punto de un método secuencial de cribado farmacológico frente a *T. vaginalis*. Este procedimiento está integrado por una serie de pasos o filtros, que comienzan por el cribado *in silico*, continúan con la evaluación *in vitro* y finalizan con el estudio *in vivo* (Ibáñez-Escribano *et al.*, 2014a). El protocolo basado en la jerarquía de cada filtro permite una reducción de tiempo y dinero, disminuyendo progresivamente el número de moléculas que van alcanzando cada filtro, de forma que sólo las más prometedoras llegan al final del proceso.

Los modelos *in silico* QSAR-ADL publicados hasta el momento se han basado en descriptores topológicos y conformacionales en 2D. Los 45 modelos presentados en esta Tesis han seguido las mismas directrices generales, perfeccionando y puliendo determinados aspectos que se consideran determinantes para el desarrollo correcto de este tipo de cribado computacional.

Nuestros modelos se han diseñado a partir de una base de datos (BD) creada *de novo* en la que se ha incrementado en más de 5,5 veces el número de compuestos activos e inactivos con respecto a la BD anterior con la que se diseñaron los modelos QSAR-LDA publicados hasta la fecha (Marrero-Ponce *et al.*, 2005; Meneses-Marcel *et al.*, 2005; Marrero-Ponce *et al.*, 2006; Meneses-Marcel *et al.*, 2006; Marrero-Ponce *et al.*, 2008). Es importante recalcar que todas las estructuras químicas han sido previamente ensayadas *in vitro* frente a *T. vaginalis* y proceden de artículos científicos o Tesis Doctorales. Sin embargo los modelos anteriores se diseñaron a partir de una BD cuyos compuestos inactivos (60 moléculas) corresponden a fármacos comercializados con otros usos terapéuticos de los cuales, no se conoce su actividad frente al parásito genitourinario. Es fundamental que el sistema de predicción se diseñe a partir de moléculas cuya verdadera actividad se haya corroborado en el laboratorio. En el caso contrario, podríamos favorecer un incremento de falsos negativos, ya que se podrían estar incluyendo en las SE y SP moléculas que realmente fuesen tricomonocidas pero al no haberse explorado su actividad, formarían parte de la serie de agentes inactivos y por tanto, se entrenarían a los modelos incorrectamente. La BD nueva se encuentra integrada por 260 moléculas activas y 332 inactivas, todas ellas evaluadas frente al parásito. Asimismo, no se siguieron los criterios de actividad descritos por los autores de las publicaciones, sino que a partir de los resultados publicados, y en función de la experiencia propia en el cribado en el laboratorio, se definieron unos criterios muy estrictos para catalogar a las moléculas en el grupo de activos o inactivos.

Se han diseñado un total de 45 modelos nuevos a partir de las cuatro propiedades atómicas clásicas (masa atómica, polarizabilidad, electronegatividad y fuerza de Van der Waals), a las que se les ha incluido seis nuevas (coeficiente de partición CLogP, carga, dureza, área de superficie polar, refractividad y blandura). Los modelos se constituyeron a partir de cuatro tipo de matrices, dos de ellas ya empleadas en los cálculos matemáticos para el diseño de modelos anteriores (estocástica, no estocástica) y dos matrices nuevas

(doble estocástica y de probabilidad mutua) implementadas en la segunda versión del software TOMOCOMD-CARDD v.2.

La calidad de los modelos diseñados fue buena, tal y como muestran los parámetros de λ de Wilks y la distancia de Mahalanobis (D^2) (**tabla 10**). El primer parámetro (λ de Wilks) refleja la discriminación total entre dos moléculas, pudiendo tomar valores entre cero y uno, siendo los más adecuados aquellos valores más cercanos a cero. En cambio, D^2 indica la separación que existe entre el grupo de activos e inactivos, buscando en este caso, modelos con valores altos de este parámetro. Es de destacar que los modelos que mostraron los mejores valores de estos dos parámetros, fueron seleccionados por el sistema multclasificador. El resto de parámetros reflejados en la **tabla 63** hacen referencia a la robustez de los modelos. El valor de C' , cuantifica si existe una relación lineal entre los DMs (descriptores moleculares) y las clasificaciones. En este sentido, todos los modelos obtenidos mostraron valores de C' por encima de 0,60 tanto en la SE como en la SP, destacando el valor obtenido en el modelo 45 con un valor de $C = 0,91$. El valor de Q refleja el porcentaje de buena clasificación de las moléculas, mientras que la sensibilidad (**Sens.**) se define como la probabilidad de predecir correctamente un caso positivo, y la especificidad (**Esp.**) es la probabilidad de que una predicción positiva sea correcta, es decir la precisión en la predicción (Baldi *et al.*, 2000; Rivera-Borroto *et al.*, 2007). Asimismo, otro parámetro de gran importancia es la razón de falsa alarma (**RFA**) que mide en qué proporción los modelos son capaces de clasificar un compuesto inactivo como positivo, por lo que su valor debe ser lo menor posible.

Aunque los parámetros estadísticos fueron menores al evaluar la SP, en términos globales los valores fueron buenos. Es reseñable el resultado obtenido tras la combinación de los modelos 22, 26 y 45 mediante el sistema multclasificador, con un valor de Q de 97,05% y 90,13% en las SE y SP, respectivamente y valores de RFA < 2,5 (**Tabla 63**).

Tabla 63: Robustez de los mejores modelos seleccionados mediante el sistema multclasificador (22, 26 y 45) así como del modelo nuevo generado a partir de los tres anteriores (Ensamble).

Mod.	Matriz	DM	SE					SP				
			C'	Q	Sens.	Esp.	RFA	C'	Q	Sens.	Esp.	RF A
22	SS	GEN	0,85	92,73	89,64	93,51	4,86	0,76	87,50	74,63	96,15	2,35
26	DS	VdW	0,85	92,73	93,26	90,45	7,69	0,69	84,87	77,61	86,67	9,41
45	NS+SS+DS+PM	GEN	0,91	95,45	95,85	93,91	4,86	0,78	88,82	80,60	93,10	4,71
Ensamblado			0,94	97,05	95,34	97,87	1,62	0,81	90,13	80,60	96,43	2,35

La validación externa tras la evaluación de la SP, confirma la buena predicción de las moléculas por los modelos diseñados. No obstante, es importante tener en cuenta que todas las moléculas que integran esta SP, poseen representantes químicos en la SE a partir de la cual se han diseñado y entrenado a los modelos de predicción. Por esta razón, se procedió a la evaluación *in silico* de las dos series químicas (VATR y FR) ensayadas *in vitro* previamente.

La capacidad predictiva del modelo ensamblado a partir del sistema multclasificador DSDE resultó menor que la exactitud mostrada por la combinación de los tres modelos seleccionados (22, 26 y 45) y el ensamblado (**Tabla 56**). La comparación de los parámetros en los dos casos muestra que a pesar de que la predicción de estas series en términos generales, no ha sido tan buena como la de la SP, los valores de exactitud y RFA son mejores en el segundo caso, en el que se realiza la predicción con los cuatro modelos.

Si se comparan los parámetros de predicción para cada una de las series (I a V) de los 5-nitroindazoles así como para la serie FR de nitroquinoxalinonas, se observa una gran diversidad de resultados. En otras palabras, los datos estadísticos nos indican que los modelos son capaces de predecir con mayor exactitud determinadas series químicas como las series I a IV de los 5-nitroindazoles, mientras que otras (la serie V y las nitroquinoxalinonas), no son capaces de clasificar correctamente a los derivados químicos (**tabla 57**). La predicción inadecuada de estas últimas series, explica en cierta manera la baja robustez que refleja el CV de las 169 moléculas en conjunto (**tabla 56**). No obstante, en un intento por determinar qué fallos está cometiendo el sistema para realizar los ajustes adecuados, se puede afirmar en términos generales que la mayoría de estas series derivan de cabezas de serie nuevas. Es decir, no existen derivados estructurales previamente evaluados que hayan podido incorporarse a la SE. La robustez de los modelos en la SP ha resultado adecuada, debido a que las estructuras químicas que integran esta serie de validación externa también está representada en la SE. Esta observación demuestra como el punto crítico en el diseño de modelos virtuales QSAR-LDA se sustenta en la existencia de una BD diversa y compuesta por numerosas estructuras químicas. Aunque la BD nueva presentada en esta Tesis está compuesta por un mayor número de moléculas, todas ellas evaluadas frente al parásito en comparación con la BD anterior (Meneses Marcel, 2006), resulta necesario incrementar la diversidad de la misma para ajustar la predicción de los modelos presentados.

A partir de los resultados obtenidos, los tres modelos seleccionados por el sistema multclasificador, así como el cuarto obtenido tras el ensamblado, podrían ser empleados de forma combinada para la búsqueda de estructuras químicas generales como potenciales cabezas de serie teniendo en cuenta las estructuras ya evaluadas en la literatura e incluidas en la BD. No obstante, resulta indispensable continuar afinando el sistema mediante la retroalimentación de la BD con nuevas estructuras químicas, entre las que se incluirían los 148 compuestos de la serie VATR y las 21 entidades químicas de la familia FR. Es necesario poner de manifiesto, que los modelos han sido calculados mediante índices lineales (IL). El programa TOMOCOMD-CARDD permite el cálculo de modelos basado en índices cuadráticos y bilineales que permitirían enriquecer aún más al sistema, reduciendo los errores de predicción detectados. En función de los resultados expuestos, la creación de modelos QSAR-LDA a partir de IL parecen insuficientes en la predicción de actividad tricomonida en algunas series químicas, tal y como muestran los resultados de sensibilidad y especificidad. El diseño de modelos nuevos empleando índices más complejos como los cuadráticos, capaces de poner de manifiesto diferencias mínimas entre propiedades fisicoquímicas de las moléculas así como, índices bilineales que estudian las relaciones de dos DM en un mismo modelo podrían permitir consolidar estos métodos de predicción *in silico* para la búsqueda de nuevos agentes con actividad tricomonida y poder ser aplicados para la detección de medicamentos comercializados

con otros usos (*drug-repurposing*) y para el diseño de potenciales cabezas de serie que ayuden a los químicos al diseño racional de nuevas series activas.

Continuando con el modelo de cribado secuencial, en un segundo filtro se propone un cribado *in vitro*. Para ello se ha estandarizado un sistema de evaluación de la actividad de los agentes químicos en cultivos de aislados sensibles y resistentes al MTZ empleando la resazurina como sustrato redox. Este método nuevo ha demostrado un buen factor $Z' > 0,9$ (Zhang *et al.*, 1999) desplazando al método clásico de recuento al microscopio. El método fluorimétrico es más sensible, y menos subjetivo, permitiendo analizar un mayor número de compuestos en menor tiempo. La sensibilidad del método empleando resazurina es mayor que el que se logra con las sales de tetrazolio como el MTT (Hamid *et al.*, 2004) al poseer un potencial redox mayor (Carneiro Borra *et al.*, 2009). Por otro lado, el empleo de MTT requiere la solubilización posterior de las sales, que en ocasiones puede llegar a ser incompleta (Back *et al.*, 1999). Además, el procedimiento de revelado con resazurina es más sencillo y breve, lo que aumenta la fiabilidad de la técnica.

Por todo ello, también se propone en este cribado secuencial el uso de resazurina en los estudios de citotoxicidad inespecífica en células, en lugar de la técnica de MTT recomendada por la normativa internacional ISO 10993-5:2009. Aunque el método colorimétrico para el cribado frente a *T. vaginalis* ya fue estandarizado por Campos Aldrete *et al.* (2005) empleando Alamar blue y por Duarte *et al.* (2009) utilizando resazurina, se debe señalar que ninguno de los grupos observaron interferencias entre el medio de cultivo y el colorante redox. Durante la estandarización de la técnica en el laboratorio se confirmó que algunos componentes del medio de cultivo TYM (L-cisteína y ácido ascórbico) causaban la reducción espontánea de la resazurina, debido a sus propiedades reductoras. Esta capacidad reductora provocaba un incremento en la fluorescencia de los pocillos con medio, que llegó a ser mayor que la del propio TYM con trofozoítos. Esta observación se corroboró al obtener una reducción en los valores de fluorescencia tras retirar estos dos componentes del medio (**Figura 45**) (Ibáñez Escribano *et al.*, 2012). Estos resultados coinciden con los observados por Bénéré *et al.* (2009) durante la estandarización de esta técnica de cribado farmacológico frente a *Giardia duodenalis*.

Asimismo, se han ido introduciendo otras modificaciones en el sistema clásico de cribado *in vitro* realizado en el laboratorio a lo largo de la elaboración de esta Tesis. En primer lugar, se realizan los ensayos *in vitro*, tanto de actividad antiparasitaria como de citotoxicidad inespecífica a seis concentraciones distintas para poder calcular la CI_{50} , la CC_{50} y el índice de selectividad (IS). Asimismo, salvo los estudios de extractos de plantas, se propone la evaluación de los compuestos de síntesis química a concentraciones micromolares en lugar de en $\mu\text{g/mL}$, como se venía haciendo anteriormente.

Finalmente sólo aquellas moléculas con un buen IS pasan a ser evaluadas en el modelo *in vivo*. El modelo de infección intravaginal de *T. vaginalis* presenta la dificultad de la instauración de la infección, que requiere tratar previamente al animal con estrógenos subcutáneamente y pre-infectarlo con *Lactobacillus* para favorecer la implantación de la infección parasitaria. McGrogy y Garber (1992) demostraron un aumento considerable en la duración de la infección en ratones tratados con estrógenos y *Lactobacillus acidophilus*. Años más tarde esta hipótesis fue confirmada por Abraham *et al.* (1996) y Lushbaugh *et al.*

(2000) empleando otras especies de *Lactobacillus*. Asimismo, la complejidad de los tratamientos previos a la infección dificulta el establecimiento de lotes homogéneos.

El modelo intraperitoneal propuesto procede del diseñado por Teras y Roigas (1966) y posteriormente por Toyos (1974). La mayor reproducibilidad de la infección y la posibilidad de evaluar por un lado la absorción del compuesto y al mismo tiempo el efecto tricomonocida del mismo en la cavidad abdominal, recomienda el uso de este modelo dentro de las opciones existentes, hasta el momento, para los ensayos farmacológicos preclínicos.

Artemisia absinthium

Se ha estudiado la actividad tricomonocida del extracto puro de un cultivo controlado de *Artemisia absinthium*. La dificultad que entraña el estudio de la actividad de extractos naturales se basa en que la actividad del extracto bruto puede deberse a un solo componente o a la acción sinérgica de varios. Del mismo modo, en ocasiones se descartan fracciones inactivas cuya composición puede estar formada por componentes que antagonizan o disminuyen el efecto. En este caso, se determinó la actividad tricomonocida del extracto bruto y de las nueve fracciones obtenidas mediante GC-MS. Aunque siete de las nueve fracciones mostraron efecto tricomonocida por encima del 70% a la máxima concentración (500 µg/mL), solo F1, F4 y F8 mantuvieron cierta actividad al disminuir la dosis (**Tabla 31**). De las tres, la fracción F1 con una $CI_{50} = 71,5$ µg/mL presentó una actividad superior a la del extracto bruto ($CI_{50} = 87,2$ µg/mL). En cuanto a la composición de las mismas, F1 presenta una mezcla de *trans*-cariofileno (29,5%), germacreno D (15,5%) y β-selineno (8,8%), mientras que F4 está compuesta en un 35,7% por acetato de crisantenilo y F8 en más de un 60% por butirato de 3-hexenilo asociado en un 27% con el alcanfor y otros compuestos en menor porcentaje (**Tabla 12**). Debido al carácter citotóxico en células de mamífero que mostró F4, se procedió a analizar tan sólo la actividad tricomonocida de dos de los principales componentes del extracto puro y de las fracciones que resultaron activas. El *trans*-cariofileno, componente mayoritario de F1 y del extracto puro junto con el *cis*-crisantenol resultaron más activos que las fracciones. En resumen, la actividad de F8 a concentraciones altas podría atribuirse al efecto tricomonocida del *cis*-crisantenol, mientras que la actividad de F1 podría ser debida al efecto tricomonocida del *trans*-cariofileno ($CI_{50} = 68,7$ µg/mL) (Martínez-Díaz *et al.*, 2015).

3,3'-Diindolilmetano (DIM)

DIM es un nutraceutico aislado de plantas crucíferas y activo *in vitro* frente a *Leishmania*. Su mecanismo de acción se relaciona con la inducción de fenómenos de apoptosis. Actualmente está siendo objeto de estudio en ensayos clínicos de Fase II en pacientes con cáncer de próstata y mama gracias a su potencial actividad como quimiopreventivo. Nuestro trabajo se ha realizado en colaboración con Laboratorios Bioresponse LLC (Boulder, CO, USA). Este laboratorio ha desarrollado una formulación tópica de liberación sostenida denominada BR-DIM-VC, que ha mostrado resultados excelentes en los estudios de tolerancia en conejos tras una administración de 2 semanas a concentraciones del 2% (80 mM DIM) y 4% (160 mM DIM).

Este compuesto fitoquímico mostró una actividad tricomonocida superior al 75% a partir de 150 µM en los aislados sensible y resistente al MTZ (**Tabla 32**). En la actualidad, no

existen terapias combinadas con MTZ que permitan una alternativa para tratar a los pacientes que desencadenen efectos iatrogénicos, desarrollen resistencia o muestren hipersensibilidad al fármaco. Con este objetivo, se coadministraron distintas concentraciones de DIM junto con dos dosis fijas de MTZ. Los resultados mostraron una reducción significativa del efecto citotóxico inespecífico del DIM al combinarlo con el MTZ, potenciando el efecto tricomonocida del mismo con un incremento de dos puntos del índice de selectividad (IS). El efecto sinérgico incipiente que parece producirse entre los dos compuestos podría permitir el desarrollo de un fármaco en el que se combinase una dosis oral de MTZ y una aplicación tópica de BR-DIM-VC para hacer frente a los casos de resistencia o en pacientes que presentasen efectos adversos al tratamiento de referencia. Las concentraciones activas de DIM que se reflejan en nuestros resultados fueron menores a las que se alcanzan en vagina con las formulaciones tópicas. La **figura 74** muestra los resultados de actividad tricomonocida en el tratamiento combinado de MTZ y DIM. Se alcanza un 100% de dicha actividad tras añadir a los cultivo de forma conjunta MTZ a una concentración de 1,58 μM y 0,9 μM (concentraciones equivalentes a la CI_{50} y CI_{25} del MTZ respectivamente, en el aislado JH31A4). En definitiva, las concentraciones activas de 200 y 300 μM DIM en combinación con MTZ fueron entre 250 a 400 veces menores a la concentración de DIM que se alcanza en la vagina tras una aplicación tópica de BR-DIM-VC del 2%. El uso combinado (MTZ+DIM) podría ser una alternativa terapéutica al tratamiento de referencia y podría, tras una evaluación clínica previa, proponerse como segunda línea de tratamiento en mujeres que no logran erradicar la infección o bien no toleran las dosis de MTZ prescritas.

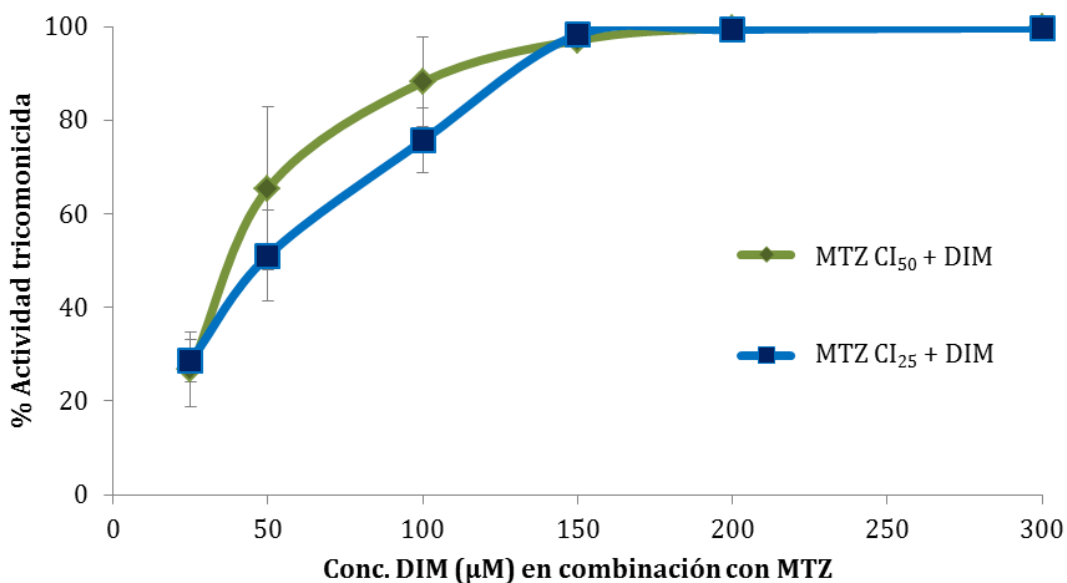


Figura 74: Efecto tricomonocida de la coadministración de distintas concentraciones de DIM (eje de abscisas) junto con una concentración constante de MTZ de 1,58 μM (línea verde) y 0,9 μM (línea azul). Cada punto refleja la media \pm D.S. de tres experimentos independientes.

Serie VATR

De un total de 148 compuestos de esta serie, 12 moléculas (**94**, **117-119**, **124**, **131**, **132**, **134**, **137**, **138**, **144** y **145**) mostraron una actividad notable frente al aislado JH31A4 ($\text{CI}_{50} < 20 \mu\text{M}$). Las series más destacables en cuanto a actividad tricomonocida han sido la IIIB,

la IVB y especialmente la V, donde se encuentra el compuesto más activo (**145**; $CI_{50} = 0,5 \mu M$). En la **figura 75** se puede apreciar como las series IIIB y V cuentan, respectivamente, con un radical bencilo en las posiciones 2 o 1 del anillo de indazol, y un grupo alcoxi en posición 3. Los compuestos de la serie IVB son 3-(alquilamino)indazoles cuya estructura concreta no se puede representar por motivos de confidencialidad, al estar en proceso de patente.

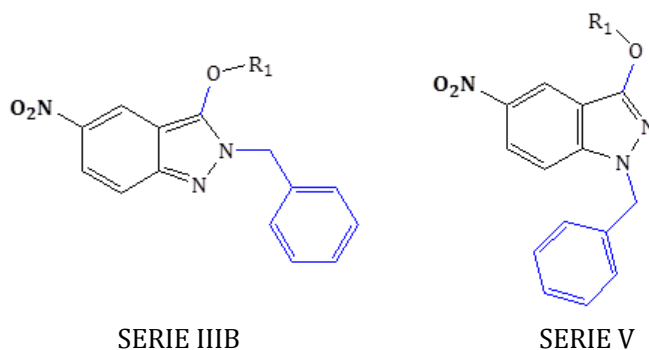


Figura 75: Estructura general de las series III y V de la familia química VATR.

En cuanto a la relación estructura-actividad, es evidente que las 5-nitroindazolinonas 1,2-disustituidas de las series IA, II y IIIA presentan, en general, escasa actividad tricomonocida, independientemente de los sustituyentes en posiciones 1 [grupos alquilo sencillos (**1-19**, **40-78**) o complejos (**80-113**)] y 2 [grupos alquilo (**1-4**), arilo (**6-8**), arilalquilo (**9-19**, **40-67**), etc.]; únicamente la 2-bencil-1-(2-hidroxietyl)indazolinona **VATR 94** ($CI_{50} = 17,9 \mu M$) presenta una buena actividad, seguida, a bastante distancia, por la *N,N*-dimetilbutiramida **VATR 90** ($CI_{50} = 48,9 \mu M$).

Por otra parte, dentro de los 2-alquil-3-alcoxiindazoles, no presentan actividad destacable los compuestos con grupos alquilo sencillos en la posición O_3 (serie IC; **25-39**); en cambio, sí son activos algunos con grupos alquilo ω -sustituidos en la mencionada posición (serie IIIB, **114-124**), destacando el 2-hidroxietyl derivado (**118**) así como los 3-hidroxi- (**119**), 3-bromo- (**117**) y 3-aminopropoxi (**124**) derivados ($CI_{50} = 5,5-18,6 \mu M$).

Los 3-alcoxi-1-alquil- y 1-arilindazoles conteniendo grupos sencillos es posición O_3 (serie IB; **20-24**) no presentan actividad destacable; en cambio, la introducción de grupos ω -aminoalcoxi en dicha posición del esqueleto de 1-bencil-5-nitroindazol (serie V; **137-146**) conduce a algunos compuestos muy interesantes (**137**, **138** y **144**; $CI_{50} = 4,2-16,3 \mu M$), entre los que se encuentra el 5-(metilamino)pentiloxi derivado **145** ($CI_{50} = 2,5 \mu M$), el más activo de todos los derivados de indazol estudiados; también merecen ser mencionados los 3-(alquilamino)-5-nitroindazoles de la serie IVB, destacando los compuestos **131**, **132** y **134** ($CI_{50} = 8,5-15,7 \mu M$).














La actividad tricomonocida de algunos 3-alcoxi-1-(ω -aminoalquil)-5-nitroindazoles (Arán *et al.*, 2005), isómeros de los compuestos **137-146** con los sustituyentes en posiciones 1 y 3 intercambiados, así como la de ciertos indazol-3-oles 1-sustituidos, 3-alcoxiindazoles e indazolin-3-onas 2-sustituidas (Marrero-Ponce *et al.*, 2005, 2006) ha sido estudiada previamente por el grupo de investigación. Todos estos compuestos han sido incluidos en la BD, por lo que han formado parte del diseño de los modelos *in silico* presentados en esta Tesis, así como de su posterior validación externa mediante la SP.

Entre los 12 derivados de 5-nitroindazol comentados, los compuestos **VATR 119, 124 y 145** destacan por mantener la actividad tricomonocida ($CI_{50} < 10 \mu M$) frente al aislado resistente IR78 (**Tabla 64**). De todos ellos, el derivado **145** es más activo ($CI_{50} = 0,5 \mu M$) que el propio fármaco de referencia ($CI_{50 \text{ MTZ}} = 4,2 \mu M$) frente al aislado resistente, siendo asimismo su actividad en este último superior a la que muestra frente al aislado sensible al MTZ ($CI_{50} = 2,5 \mu M$).

En relación con el mecanismo de acción, la mayor actividad de la 5-nitroindazolinona **VATR 9** respecto a su análogo estructural sin grupo NO_2 **VATR 10** (**Tabla 34**), parece resaltar el papel fundamental de este sustituyente en la actividad tricomonocida de los miembros de estas series. De hecho, este efecto también ha sido observado en estudios previos llevados a cabo con 1-alkil-5-nitroindazol-3-oles (Marrero-Ponce *et al.*, 2006). Es muy posible que los 5-nitroindazoles sean reducidos por el metabolismo hidrogenosomal a través de intermedios y especies reactivas de nitrógeno capaces de interactuar con diferentes moléculas esenciales de los parásitos, provocando su inactivación. De hecho, el papel fundamental del grupo NO_2 en la actividad tripanocida de algunos derivados de 5-nitroindazol ha sido estudiado previamente por miembros de nuestro equipo de investigación (Folch-Cano *et al.*, 2010).

Como se ha expuesto en los resultados, se determinó la biodisponibilidad oral de los compuestos con cierta actividad a través del cálculo bioinformático de parámetros farmacocinéticos en función de la estructura química. Las propiedades farmacocinéticas fueron excelentes en todos los compuestos evaluados, con estimaciones del porcentaje de absorción intestinal superiores a la estimada para el MTZ, por encima del 80% en todos los casos.

Tabla 64: Resultados de los doce 5-nitroindazoles más activos pertenecientes a la serie química VATR.

Serie	VATR	CI_{50}		CC_{50}	IS	%Abs oral	Toxicidad
		JH31A4	IR78				
III	94	17,9	ND	> 300	> 16,8	83,49	
	117	18,6	39,1	> 300	> 16,1	97,90	
	118	9,8	49,8	> 300	> 30,6	83,48	
	119	7,3	9,1	> 300	> 41,1	84,50	
	124	5,5	8,5	104,1	18,8	78,87	
IV	131	15,7	34,8	> 300	> 19,1	77,86	
	132	8,5	49,2	> 300	> 35,2	85,43	
	134	10,0	11,0	> 300	> 29,9	85,43	
V	137	10,5	14,3	> 300	> 28,6	77,86	
	138	16,3	74,7	171,3	10,5	84,43	
	144	4,2	59,1	57,7	13,7	80,88	
	145	2,5	0,5	24,0	9,6	87,44	
	MTZ	1,4	4,2	> 600	> 100	76,75	

En lo que respecta a los resultados de toxicidad virtual, las moléculas más activas de la serie III, poseen una estructura con riesgo de producir efectos mutagénicos y

tumorigénicos, a excepción del derivado **VATR 94** que no muestra ningún riesgo. Además, en el caso de los derivados **117** y **119** también hay riesgo elevado de ocasionar efectos perjudiciales a nivel reproductivo (**117**) e irritación (**119**). Todos los compuestos de la serie IV podrían ser mutagénicos, mientras que las estructuras de la serie V (1-bencil-3-alcoxi-5-nitroindazoles) no muestran ninguna toxicidad *a priori* coincidiendo con los resultados de ausencia de citotoxicidad inespecífica frente a células Vero. Con el fin de facilitar la exposición y discusión de los resultados de esta serie, a continuación se muestra una tabla resumen de los compuestos más activos de la serie de 5-nitroindazoles.

El análisis de los resultados del cribado *in vivo* muestra una reducción de las lesiones de los animales tratados oralmente con los compuestos **117** y **134** del 41% y el 47,3% respectivamente. Sin embargo a pesar de que el compuesto **132** fue uno de los candidatos más activos *in vitro* (**Tabla 64**) en el modelo animal no fue eficaz registrándose la muerte de uno de los animales del lote tratado a los 9 días p.i. (**Figura 48**).

La actividad significativa de los derivados **119**, **124**, **134** y **145** sugiere que estas estructuras podrían ser utilizadas para el diseño de “cabezas de serie” nuevas con el fin de mejorar la actividad tricomonocida específica pero sin perder sus buenas propiedades farmacocinéticas ni su inocuidad en células de mamífero.

Serie FR

Esta segunda familia de compuestos heterocíclicos está formada por 21 derivados con estructuras generales de 7-nitroquinoxalin-2-ona (**FR 6-17**) y 6-nitroquinoxalin-2,3-diona (**FR 26-35**).

La mayoría de las quinoxalin-2-onas, especialmente los 4-[ω -(dialquilamino)alquil] derivados **FR 6-9**, **FR 13** y **FR 14** ($IC_{50} < 40 \mu M$) (**Tabla 65**) mostraron una actividad tricomonocida moderada. El compuesto **FR 9**, con un grupo 3-piperidinopropilo en posición N_4 del anillo de quinoxalina, mostró la mejor actividad frente al parásito ($CI_{50} = 18,2 \mu M$). La toxicidad inespecífica de estos compuestos es baja, por lo que poseen una razonable selectividad.

Las actividades frente a *T. vaginalis* de algunas 4-[5-(dialquilamino)pentil]quinoxalin-2-onas relacionadas han sido publicadas previamente por el equipo de investigación (Ribera-Borroto *et al.*, 2009; Martins Alho *et al.*, 2014); no obstante, no es posible llevar a cabo una comparación directa con los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral debido a la diferente metodología utilizada en ambos trabajos para definir la actividad tricomonocida. Sin embargo, en los 5-(dialquilamino)pentil análogos descritos, los 1-metil derivados eran más activos que los respectivos productos sin sustituyente en dicha posición, efecto que no se ha observado en los productos estudiados en esta Tesis. Por otra parte, en relación con las cadenas alquílicas ω -sustituidas en posición 4, no parece posible establecer una clara relación estructura-actividad en estos compuestos, pero parece que las cadenas pentílicas de los productos descritos previamente conducen a mejores actividades que los restos de etilo o propilo utilizados en esta Tesis. Por otra parte, la escasa toxicidad inespecífica de los derivados de 7-nitroquinoxalin-2-ona ha sido observada previamente en algunos 4-[ω -(dialquilamino)pentil] (Ribera-Borroto *et al.*, 2009; Martins Alho *et al.*, 2014) y 4-(ω -halogenoalquil) derivados estudiados por el grupo de investigación (Meneses-Marcel *et al.*, 2005; Marrero-Ponce *et al.*, 2008).

Por otra parte, las 6-nitroquinoxalin-2,3-dionas (**FR 26-35**) muestran, en general, una escasa actividad tricomonocida, destacando únicamente el compuesto **FR 35** ($IC_{50} = 25,4 \mu\text{M}$ en el aislado sensible a metronidazol). En relación con las correspondientes 4-(ω -halogenoalquil)quinoxalin-2-onas análogas que también han sido estudiados anteriormente por el grupo de investigación (Meneses-Marcel *et al.*, 2005; Marrero-Ponce *et al.*, 2008), no es posible correlacionar directamente los resultados por los motivos comentados anteriormente, pero se observa una clara reducción de la actividad tricomonocida en las quinoxalin-2,3-diona estudiadas en esta Tesis Doctoral. Es muy posible que la introducción de un segundo grupo CO en el anillo de quinoxalinona modifique la basicidad de N_1 y el potencial de reducción del grupo NO_2 en posición 6, que parece fundamental para la actividad antiparasitaria (Aguilera-Venegas *et al.*, 2011).

Todas las moléculas de esta serie FR mostraron una propiedades fisicoquímicas que en teoría favorecerían una biodisponibilidad oral excelente, con porcentajes de absorción superiores al 75%, según el criterio de Zhao *et al.* (2002). Tan sólo las quinoxalin-2,3-dionas **FR 26-34** presentaron un valor del 74,3%. Las nitroquinoxalinonas **FR 12-15** mostraron los valores de absorción más altos (83,9%) y los valores de TPSA más bajos (72,609), tal y como cabría esperar al tratarse de un descriptor molecular relacionado con el transporte a través de membrana (Erlt *et al.*, 2000). Valores bajos de TPSA están relacionados con fenómenos de absorción intestinal alta (Palm *et al.*, 1997).

Tabla 65: Resultados de las nitroquinoxalinonas más activas pertenecientes a la serie química FR.

COMPUESTO	CI_{50}		CC_{50}	IS	%Abs oral	Toxicidad
	JH31A4	IR78				
FR 6	36,7	ND	> 300	> 8,2	79,98	
FR 7	38,3	39,1	> 300	> 7,8	83,00	
FR 8	30,6	49,8	> 300	> 9,8	82,85	
FR 9	18,2	9,1	> 300	> 16,5	83,86	
FR 12	50,7	8,5	648,4	12,2	86,55	
FR 13	32,4	34,8	1235,1	38,1	89,56	
FR 14	29,8	49,2	> 300	> 10,1	89,42	
FR 17	41,8	14,3	> 300	> 7,2	78,90	
FR 35	25,4	74,7	> 300	> 11,8	90,95	
MTZ	1,4	4,2	> 600	> 100	76,75	

El compuesto más activo de esta serie (**FR 9**) se ensayó *in vivo* a dos dosis (50 mg/kg y 100 mg/kg) administrándose por vía oral durante 7 días consecutivos. Los resultados mostraron una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) del índice de patogenicidad con respecto al grupo control de infección (46,1% y 50,7% respectivamente; **Figura 49**). Esta reducción similar en ambos grupos podría deberse a que se ha alcanzado el umbral de máxima actividad o bien a una saturación en la absorción del compuesto. En el segundo caso, su confirmación requeriría estudios farmacocinéticos posteriores. Ningún animal murió durante el ensayo tal y como cabría esperar tras los estudios de citotoxicidad *in vitro* y predicción de toxicidad mediante OSIRIS realizados previamente (**Tabla 65**).

Aunque se desconoce el mecanismo de acción de las nitroquinoxalinas, la actividad frente a *T. vaginalis* podría deberse a la presencia del grupo nitro siguiendo el modelo de los nitroimidazoles. En este caso el compuesto actuaría sobre el metabolismo hidrogenosomal. Los compuestos reducirían al grupo nitro mediante transferencia de electrones (Dunne *et al.*, 2003) y producirían intermediarios y especies reactivas de nitrógeno altamente reactivas y citotóxicas. Estos radicales son capaces de romper la cadena de ADN (Edwards y Mathison, 1970) y formar aductos con proteínas parasitarias (Leitsch *et al.*, 2011). La producción de estrés oxidativo y la formación de radicales nitro ha sido corroborada electroquímicamente y a través de estudios de resonancia de espín electrónico (ESR) en 4-[5-(dialquilamino)pentil]-7-nitroquinoxalin-2-onas (Aguilera-Venegas *et al.*, 2011). Asimismo, los estudios de Rivera *et al.* (2013) han demostrado la capacidad de inducir daños en el ADN de 7-nitroquinoxalinonas similares a las estudiadas por nosotros.

II. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLADOS DE *Trichomonas vaginalis*

La amplia variabilidad en el perfil clínico asociado a la tricomonosis ocasionada por diferentes aislados, es uno de los aspectos más difíciles de explicar por los expertos en este campo. El ambiente hostil y cambiante en el que tiene que sobrevivir el parásito, le ha obligado a desarrollar innumerables mecanismos de supervivencia para lograr la colonización del nicho genitourinario y la evasión de la respuesta inmunitaria, adaptándose a los cambios constantes del medio.

A continuación, se muestra una tabla con los resultados obtenidos en el segundo capítulo de caracterización de aislados. La clasificación en relación a los estudios moleculares se ha simplificado agrupando a los aislados en Tipo I o Tipo II en función de si presentaron alguna diferencia en el tamaño de al menos un MS y según los resultados mostrados en el tanglegrama tras el estudio de los SNP de los genes GP63a y PMS1.

Tabla 66: Cuadro resumen de los resultados de caracterización biológica y molecular de los 10 aislados de *T. vaginalis*.

Aislado	Origen geo.	Sint.	Sens.	Citoadh	Citotox	TVV	Mh	IP	H	Sens. SC	MS	SNP
JH31A4	EEUU	-	5-NI _S	A	M	+	-	B	2,9	M	I	I
C-1:NIH	EEUU	Sint.	5-NI _S	A	B	+	-	A	16,9	A	I	I
1807	España	Sint.	5-NI _S	B	A	+	-	B	2,9	A	I	I
1232	España	Asint.	5-NI _S	B	A	-	-	M	1,7	B	II	II
11	España	Asint.	5-NI _S	M	A	+	-	B	3,4	M	I	I
IR78	Austria	Sint.	5-NI _R	M	B	-	-	M	11,6	A	II	II
S019	España	Sint.	5-NI _S	M	M	+	-	A	14,9	B	II	II
S760	España	Sint.	5-NI _S	M	M	+	+	A	11,2	A	I	I
S351	España	Sint.	5-NI _S	B	A	-	+	M	11,5	A	I	I
S852	España	Sint.	5-NI _S	M	B	-	-	A	9,6	M	II	II

Sint.: Sintomatología; *Asint.:* Asintomática; *5-NI_S:* Sensible a 5-NI; *5-NI_R:* Resistente a 5-NI; *Citoadh:* Citoadherencia; *Citotox:* Citotoxicidad; *Mh:* *Mycoplasma hominis*; *SC:* Sistema del Complemento; *H:* Lesión hepática; *Resist.:* Resistente; *A:* Alto; *M:* Medio; *B:* Bajo

Los resultados de los ensayos de caracterización biológica realizados en esta Tesis han mostrado una gran heterogeneidad de nuestros aislados (**Tabla 66**) corroborando la complejidad que muestra este parásito en lo referente al estudio de su patogenia. A pesar del estudio de siete características biológicas ligadas a fenómenos relacionados con la virulencia parasitaria como la citotoxicidad, la citoadherencia, la presencia de otros patógenos o el comportamiento tras inocularlo en un modelo murino, no se ha encontrado una correlación clara y estadísticamente significativa entre las propiedades biológicas.

En el caso de la sensibilidad a los 5-NI, el aislado IR78 procedente de Austria, mostró una CML frente al MTZ de 512 µg/mL (2991 µM) y de 64 µg/mL (259 µM) al tratarlo con TDZ. La clasificación de los aislados en sensibles o resistentes se ha hecho siguiendo el criterio de Kirkcaldy *et al.* (2012) que define como aislado sensible a los 5-NI a aquel que muestre una concentración mínima letal (CML) ≤ 25 µg/mL. El resto de aislados se catalogan como

resistentes, agrupándolos en resistencia baja (CML = 50-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), moderada (CML = 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o alta (CML \geq 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Siguiendo esta clasificación, todos los aislados fueron sensibles a ambos fármacos a excepción de IR78 que resultó ser de resistencia baja al TDZ y alta al fármaco de referencia. El TDZ, debido a su mayor potencial redox, va a sufrir una reoxidación menor en un ambiente microaerófilo que el MTZ, lo que justifica su uso como tratamiento alternativo en los casos de resistencia clínica. En este sentido, se explica que el aislado IR78 posea una CML superior frente al MTZ que frente al TDZ. Es por ello recomendable estudiar la susceptibilidad de los aislados frente a los dos fármacos y no únicamente frente al MTZ, ya que es común el desarrollo de resistencias cruzadas a otros fármacos de la misma familia de 5-NI (Wright *et al.*, 2010) tal y como se ha confirmado en nuestro aislado resistente.

Además de la necesidad de buscar alternativas farmacológicas para el tratamiento de los pacientes con resistencia a los 5-NI, otra preocupación relacionada con la tricomonosis es el riesgo de adquirir y transmitir otras enfermedades. Redón-Maldonado *et al.* (2003) demostró la unión e internalización de partículas de VIH-1 a través de vesículas endocíticas por parte de *T. vaginalis*, aunque, tras un máximo de 48 h, el propio parásito degrada las vacuolas impidiendo su replicación interna. Es evidente el papel que *T. vaginalis* juega como vector de virus humanos como VIH-1, VHS y reovirus capaces de sobrevivir en el protozoo hasta seis y nueve días (Pindak *et al.*, 1989; Redón-Maldonado *et al.*, 2003). Las dudas que se pueden plantear a continuación son variadas: ¿existirán otros patógenos que empleen este protozoo como transportador pasivo o vector? ¿los trofozoítos infectados por TVV son más susceptibles a la infección por virus humanos? y ¿qué modificaciones se producen en el protozoo cuando incorpora estos patógenos que pudieran ser útiles para su identificación? Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, resulta evidente la importancia de la determinación de la presencia de virus y bacterias en los aislados de *T. vaginalis* así como la búsqueda de métodos de fenotipado rápido para catalogar las infecciones no sólo por la sintomatología, sino también por el riesgo de albergar otros organismos que puedan ser transmitidos o influir en la virulencia del parásito. Los estudios de presencia de virus en aislados de *T. vaginalis* destacan por la gran variabilidad existente no sólo de forma intraespecífica como refleja la **tabla 66**, sino también en una misma población. Aquellas que resultaron ser TVV+, mostraron una gran heterogeneidad en el porcentaje de infección por el virus. En nuestras observaciones no todos los trofozoítos del mismo aislado se encontraban infectados (**Figura 57**). Aunque el virus se libera al medio y puede potencialmente infectar a otro trofozoíto por endocitosis mediada por receptor, se desconocen qué factores hacen más susceptibles a unos individuos que a otros dentro de la misma población. Asimismo, a pesar de que Wang *et al.* (1987) publicaron que los aislados TVV+ cultivados durante periodos prolongados en el laboratorio sufrían la pérdida del virus a largo plazo, nuestros aislados de laboratorio JH31A4, C-1:NIH y 1807 no corroboran esta hipótesis (**Figura 57**). Los tres muestran la presencia de virus coincidiendo con lo publicado por Alderete *et al.* (1986), que estudiaron la heterogeneidad de los aislados de *T. vaginalis* TVV+, mantenidos en el laboratorio y aislados frescos tras marcarlos con el Ac monoclonal C20A3. Este equipo detecta fenotipos TVV+ tras varios días de cultivo *in vitro*. Es de destacar que los tres aislados de la ATCC caracterizados en esta Tesis (JH31A4, C-1:NIH e IR78) también fueron estudiados por otros grupos de investigación (Alderete *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1987; Tai y Ip, 1995) quienes obtuvieron los mismos resultados tras el estudio de la presencia de virus. Los dos

primeros (JH31A4 y C-1:NIH) resultaron TVV+ mientras que IR78 no presentó P270 en la superficie, siendo por tanto TVV- (**Figura 56**). Tal y como refleja la **figura 57**, JH31A4 es una población heterogénea compuesta por dos subpoblaciones equivalentes, una alberga TVV y otra no. Esta proporción es la misma que la publicada por Wang *et al.* en 1987, lo que parece indicar que los aislados, a pesar del tiempo, tienden a mantener de forma estable las dos subpoblaciones en una proporción constante. Aunque esta caracterización se ha llevado a cabo determinando la presencia en la superficie de una proteína inmunogénica (García *et al.*, 2003), es probable que existan otras proteínas, por el momento desconocidas, que puedan sufrir alteraciones en su expresión en aquellos parásitos TVV+. En cualquier caso, aún queda mucho que estudiar acerca de la influencia de TVV en la patogenia de *T. vaginalis*.

Además de albergar virus, este parásito también puede ser vector de procariotas. La implicación biológica o cambios en la expresión de determinados genes es desconocida. Por ello otro de los estudios de caracterización planteados en esta Tesis fue la presencia/ausencia de *Mycoplasma hominis* en los aislados. Esta bacteria causa infecciones urinarias y genitales en el hombre y la mujer, así como complicaciones durante el embarazo y en neonatos. La interacción de este microorganismo con *T. vaginalis*, al igual que TVV, tiene como beneficio la protección en el interior del parásito de un ambiente hostil, la presión farmacológica y el sistema inmune del hospedador. Asimismo, se ha demostrado *in vitro* la capacidad de *T. vaginalis* para transmitir la infección bacteriana a células epiteliales de origen cervical (Rappelli *et al.*, 2001). No obstante, aún no se ha esclarecido la razón por la cual *T. vaginalis* se ha convertido en *caballo de Troya* de estos dos patógenos. Los últimos estudios realizados en el sur de Brasil por da Luz Becker *et al.* (2015) muestran una prevalencia elevada de ambos patógenos en las muestras, de las cuales un 13,3% también resultaron resistentes al MTZ. A pesar de que no encuentran una asociación estadísticamente significativa consideran que la presencia de ambos patógenos en *T. vaginalis* debe conferirle cierto nivel de resistencia al fármaco. Esta misma hipótesis también fue propuesta por Xiao *et al.* (2006) al estudiar la resistencia a MTZ y la presencia de *Mycoplasma* en aislados de *T. vaginalis*. En ese trabajo, secuenciaron la región de los espaciadores internos ITS1-5.8 ARNr-ITS2, detectando una única mutación puntual en cinco de los 28 aislados estudiados, clasificando a las muestras en dos grupos. La correlación entre los estudios biológicos y genéticos no resulta del todo clara. Sin embargo, los autores mencionan la existencia de una cierta influencia entre la resistencia al MTZ y la presencia de *Mycoplasma*. Si se analizan nuestros resultados, el único aislado resistente a los 5-NI fue IR78, el cual no presentó TVV, ni *M. hominis*, ni mutaciones en el nucleótido 66 del ITS1, a diferencia de lo observado por Xiao *et al.* (2006). Para poder corroborar la hipótesis propuesta por estos dos grupos, sería indispensable aumentar el número de aislados totales y especialmente los resistentes al fármaco de referencia.

Como se ha mencionado en capítulos anteriores, la patogenia provocada por el parásito, está relacionada con factores tanto dependientes como independientes del contacto. Con el fin de comprobar si la patogenia experimental en ratón tiene alguna correlación con los procesos de citoadherencia y citotoxicidad, se han evaluado estas características fenotípicas en un modelo *in vitro* empleando células HeLa. En el primer caso, la metodología se basó en el empleo de un colorante fluorescente capaz de ser internalizado por las células viables. Este método, empleado en el estudio de la citoadherencia

parasitaria, requiere una manipulación menor que la determinación de citotoxicidad, basado en una técnica de tinción con cristal violeta adaptado a las condiciones de nuestro laboratorio, a partir de lo publicado por Alderete y Pearlman (1984). Para la puesta a punto de la técnica de citotoxicidad celular, se estudiaron cuatro ratios parásito:célula y se midió la actividad citotóxica tras mantener a los trofozoítos en contacto con las células durante 2, 4, 6 y 8 h. Los resultados revelaron como a los tiempos más elevados, la citotoxicidad era prácticamente idéntica en todos los aislados, llegando a observarse un número muy bajo de células HeLa adheridas al pocillo, y en consecuencia, valores de absorbancia mínimos. El ratio que permitió ver diferencias mayores entre aislados fue el de mayor proporción de parásito por célula. Por esta razón, la técnica se estandarizó tras un tiempo fijo de contacto *T. vaginalis*:HeLa de 4 h y un ratio de 2:1. Este estudio permite comparar el comportamiento de los aislados en un momento dado para las condiciones propuestas (**Figura 55**). A pesar de la estandarización de la técnica, este método requiere una manipulación constante por parte del investigador, convirtiéndose en una técnica tediosa y con riesgo de mostrar variaciones en las réplicas.

De entre los distintos estudios de caracterización biológica también se ha llevado a cabo el estudio de la patogenicidad de los aislados en ratón. La caracterización de aislados de *T. vaginalis* mediante diferentes modelos murinos de patogenicidad experimental se ha utilizado frecuentemente en el laboratorio como criterio de clasificación. Entre los publicados, el modelo de inoculación subcutánea ha mostrado una correlación positiva entre la patogenicidad experimental y la clínica (Honigberg *et al.*, 1966; Kulda *et al.*, 1970); cuando ésta se circunscribe a las manifestaciones vulvo-vaginales. No obstante, este modelo presenta una dificultad técnica significativa porque el grado de patogenicidad experimental depende del tamaño de las lesiones subcutáneas o abscesos producidos en el ratón. La dificultad en la medición de las lesiones y la recomendación por parte de los expertos de evaluar al menos 30 abscesos intactos para obtener datos reproducibles, desaconsejaron este modelo. Por el contrario, siguiendo la experiencia de nuestro equipo, en esta Tesis se ha seleccionado el modelo murino de inoculación intraperitoneal para la caracterización de heterogeneidad intraespecífica de *T. vaginalis*, que presenta la ventaja de la sencillez técnica y la reproducibilidad en condiciones controladas. Este modelo se ha utilizado en los trabajos de Reardon *et al.* (1961), Teras y Roigas (1966) y Cavier *et al.* (1972), entre otros. Respecto a la correlación entre la patogenicidad clínica y experimental utilizando este modelo, la mayoría de los autores coinciden en que la dificultad mayor estriba en la valoración clínica de la sintomatología de los pacientes. A pesar de que no existe una correlación perfecta entre ambos aspectos, Kulda (1990) afirma que los aislados con una virulencia alta en los modelos murinos de infección intraperitoneal proceden de pacientes con una presentación clínica aguda o subaguda mayoritariamente. El modelo murino de infección intraperitoneal para la caracterización intraespecífica de aislados de *T. vaginalis* (Toyos, 1974; Escario, 1985; Nogal-Ruiz, 1999) permite evaluar en un mismo ensayo, la mortalidad y las lesiones abdominales siguiendo siempre el mismo baremo (**Tabla 22**). Si bien la mayoría de los autores coinciden en que la mortalidad experimental es el parámetro menos informativo para discriminar el comportamiento clínico de los aislados, supone una información valiosa que se añade a la cuantificación de las lesiones, según su número y extensión en los diferentes órganos. Por su parte, las lesiones hepáticas en la cara visceral son las más informativas sobre la virulencia de los aislados y la caracterización intraespecífica, según un Análisis Discriminante de los parámetros del

baremo (Nogal-Ruiz, 1999). Por esta razón una de las características tenidas en cuenta en la comparación entre aislados, ha sido la puntuación de las lesiones hepáticas. Asimismo, la mortalidad, valorada con puntuaciones elevadas si se produce en los primeros días, también está influenciada por aspectos dependientes del propio animal como su sistema inmune, siendo difícil correlacionar de forma directa este factor con la virulencia del parásito. La cepa C-1:NIH se ha utilizado como cepa de referencia de virulencia alta en modelos murinos intraperitoneales de patogenia (Reardon *et al.*, 1961). Este aislado procede de una paciente que acudió al hospital con una vaginitis aguda grave. Los resultados del ensayo de patogenia experimental revelan que los aislados S019, S760, S852, pertenecientes a una prospección epidemiológica reciente en el Centro Sanitario Sandoval (Madrid, España), muestran unos índices de patogenia superiores al de la cepa de referencia. Los aislados S760 y S019 proceden de prostitutas de nacionalidad latinoamericana de más de 40 años con flora de transición y con serología negativa excepto S019 que resultó estar co-infectada por *Treponema pallidum*. En cambio el aislado S852 de alta patogenia en ratón se tomó de una paciente española de 35 años, que indicó haber tenido menos de 5 parejas en el último año. En todos los casos las pacientes acudieron con síntomas al centro de salud. Los aislados 11 y 1232, procedentes de pacientes asintomáticas de la prospección epidemiológica de la Comunidad de Madrid del periodo 1994-96, han mostrado índices de patogenia bajos en el modelo intraperitoneal. Los resultados recientes coinciden con los que se obtuvieron tras su aislamiento y axenización (Gómez-Barrio *et al.*, 2002). Sin embargo, el aislado 1807, procedente de una paciente sintomática con ardor vaginal, que se consideró de patogenia alta en el mismo estudio (IP = $69,8 \pm 14,9$); en los ensayos presentados en esta Memoria se ha mostrado como de patogenia baja (IP = $2,8 \pm 2,0$). Esto puede ser debido a problemas en el mantenimiento y/o conservación del mismo.

La proporción de aislados de patogenia alta (40%), media (30%) y baja (30%) es similar a la obtenida por Nogal-Ruiz (1999), lo que demuestra que los aislados de laboratorio pueden recuperar la patogenia en el modelo murino, convirtiéndose en una característica relevante para la caracterización de aislados no sólo frescos, sino también aquellos que procedan de colecciones de laboratorio y del que se desconozcan el número de pases *in vitro*. En los resultados presentados, se puede observar como los dos aislados procedentes de pacientes asintomáticas (1232 y 11) mostraron las puntuaciones de lesión hepática (H) más bajas junto con los aislados JH31A4 y 1807. Por un lado, JH31A4 fue aislado de una paciente en el hospital John Hopkins en 1963 y se desconoce el cuadro clínico de la paciente, mientras que, como se ha mencionado anteriormente, 1807 procedente de una paciente con síntomas severos, inicialmente mostró patogenia en los primeros ensayos de caracterización en modelo murino (Gómez-Barrio *et al.*, 2002).

En concordancia con otros autores, se puede señalar que los ensayos murinos de patogenia intraperitoneal reflejan propiedades biológicas intrínsecas de los aislados de *T. vaginalis*, que podrían ser consideradas de importancia para el estudio de la patogenia clínica. Es lógico pensar que si un determinado aislado es altamente invasivo, esta misma capacidad la desarrollará al encontrarse en la cavidad intraperitoneal del ratón, causando una mayor lesión no sólo en el entorno intraperitoneal sino también llegando a órganos más alejados como el hígado. Por un lado las lesiones hepáticas que produce el aislado van a deberse a la capacidad invasiva del mismo, mientras que el daño en peritoneo y demás

órganos (bazo, estómago o páncreas) se circunscribe a una capacidad mayor o menor de diseminación del parásito en el interior de la cavidad intraperitoneal donde ha sido inoculado. Para lograr la instauración de focos necróticos e incluso comprometer el diafragma o el hígado, el parásito debe escapar de la cavidad intraperitoneal y desencadenar procesos de adhesión y citotoxicidad en dichas regiones. Escario *et al.* (1995) observó una correlación clara entre la patogenia experimental en el modelo murino intraperitoneal y la citoadherencia del aislado en células HeLa. No obstante, esta misma relación no la encontró con los resultados de citotoxicidad. En este sentido, la evaluación de la patogenia experimental en los aislados estudiados en esta Tesis, no parecen tener correlación en términos generales con los resultados de citoadherencia y citotoxicidad realizados. La causa podría deberse a que de los 10 aislados, tan sólo cuatro de ellos (S019, S760, S351 y S852) son frescos. Es otras palabras, la caracterización biológica se realizó tras su aislamiento del paciente, habiendo sufrido menos de ocho pases *in vitro* en el laboratorio. Mientras que los seis aislados restantes, pertenecen a la colección del Departamento y se han mantenido *in vitro* durante más tiempo, pudiendo afectar a su comportamiento inicial. Se conoce bien que el mantenimiento por tiempo prolongado en medio TYM en presencia de concentraciones de antibióticos altas puede provocar la pérdida de la virulencia inicial, por lo que determinados estudios no serían adecuados para la caracterización de aislados que hubieran sido cultivados en el laboratorio.

Uno de los objetivos planteados en este segundo capítulo ha sido la caracterización biomolecular de aislados frescos y de laboratorio. Gracias a estos estudios hemos comprobado como algunas propiedades fenotípicas como la patogenia o la presencia de TVV son estables a pesar de que el aislado se mantenga durante periodos largos, de incluso años, en cultivo, convirtiéndose en características excelentes para su estudio y agrupación. En lo que respecta a los estudios de *Mycoplasma*, no se conocen datos sobre la posible pérdida de la bacteria tras periodos largos de cultivo *in vitro*. En lo que respecta a nuestros resultados, tan sólo los aislados frescos S760 y S351 fueron *Mycoplasma+*. No obstante, la capacidad de adhesión y citotoxicidad, no parecen resultar adecuadas para la caracterización de aislados de laboratorio. Asimismo, los marcadores genéticos empleados (MS y SNP) también resultan estables (Conrad *et al.*, 2011, 2012) permitiendo junto con los estudios biológicos citados, el estudio de todo tipo de aislados de *T. vaginalis*.

En relación con la supervivencia del parásito y en consecuencia, con la posibilidad de colonizar y multiplicarse, *T. vaginalis* tiene que hacer frente a los mecanismos de defensa del hospedador. Por ello, otra característica evaluada ha sido la sensibilidad al suero humano. Este patógeno sobrevive en el tracto genitourinario de la mujer en el que el sistema del complemento (SC) es uno de los principales factores inmunológicos al que tiene que sobrevivir. Uno de las proteínas más importantes presente en las células del hospedador para evadir la lisis del SC en células autólogas es la CD59. Esta molécula se expresa en numerosas superficies celulares como el endotelio y el epitelio del tracto reproductivo femenino (Oglesby *et al.*, 1996), el tejido prostático (Simpson y Holmes, 1994) y glóbulos rojos (Kooyman *et al.*, 1995). Aunque *T. vaginalis* sintetiza CP capaces de lisar C3 (Alderete *et al.*, 1995), no resultaría extraño que el parásito hubiese desarrollado más de un mecanismo de evasión. En un intento por identificar factores permiten a *T. vaginalis* evadir la acción del SC, se corroboró la capacidad del parásito para secuestrar la

CD59 de la superficie de las células del hospedador e incorporarla a su superficie (Ibáñez-Escribano *et al.*, 2015a). *T. vaginalis* no posee ninguna secuencia nucleotídica homóloga a CD59 y es conocida su capacidad para secuestrar proteínas del hospedador (Peterson y Alderete, 1982; 1984 a,b,c; Mundodi *et al.*, 2008; Lama *et al.*, 2009). Por ello, en primer lugar, se confirmó la ausencia de CD59 en la superficie de dos aislados de *T. vaginalis* (C-1:NIH e IR78) cultivados *in vitro* en condiciones axénicas (**Figura 62**). El propio aislado C-1:NIH fue posteriormente inoculado intraperitonealmente en ratón y 15 días más tarde se analizaron de nuevo los trofozoítos recuperados de líquido ascítico. Los resultados de microscopía confocal (**Figura 63**) revelaron una señal intensa para el Ac monoclonal frente a CD59, confirmando la hipótesis propuesta. Estos resultados parecen indicar que el parásito adquiere la proteína y la emplea como mecanismo de protección frente al complemento del hospedador (Ibáñez-Escribano *et al.*, 2015b). Se pueden encontrar en la literatura trabajos que confirman como bacterias, virus y parásitos han sido capaces de evadir el complemento a través de mecanismos diferentes: lisis directa de las proteínas del complemento, adquisición de moléculas protectoras del hospedador o a través del mimetismo molecular (Albrecht *et al.*, 1992; Würzner, 1999). Algunos patógenos como *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli* evaden la lisis del SC a través de la transferencia de CD59 de células de la superficie del hospedador a la membrana bacteriana (Rautemaa *et al.*, 2001). Este mismo fenómeno ya fue descrito por Kooyman *et al.* (1995) entre eritrocitos y endotelio de ratón. Por ello, se estudió si el parásito era capaz de secuestrar las moléculas de CD59 de eritrocitos. El ensayo de inmunofluorescencia tras el cultivo *in vitro* con eritrocitos de ratón de los dos aislados empleados en estos estudios, confirmó la presencia de CD59 en la superficie parasitaria (**Figura 65**). La capacidad hemolítica de *T. vaginalis* no sólo va a proporcionar nutrientes al parásito sino que también va a servir como mecanismo de evasión inmune. Aunque se desconoce por el momento el mecanismo por el cual *T. vaginalis* adquiere la CD59 del hospedador, esta proteína se une a la superficie de las células a través de puentes GPI (Kooyman *et al.*, 1995; Meri *et al.*, 1996). Aunque se ha detectado CD59 soluble en fluidos humanos, el estudio publicado por Meri *et al.* (1996) corroboró la necesidad del puente GPI para que CD59 resultara funcionalmente activa. Las imágenes obtenidas en el marcaje confocal de los trofozoítos aislados de ratón, muestra una co-localización de la CD59 y de la proteína parasitaria AP65, pudiendo estar dicha proteína implicada en la captación de la CD59. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis, es necesario realizar más estudios con el fin de determinar cómo *T. vaginalis* secuestra la CD59 y posteriormente la ancla a su superficie.

En resumen, la capacidad del parásito no sólo le permite evadir la lisis del CAM sino que de forma concomitante, el secuestro de CD59 de la célula hospedadora hace más vulnerable a dicho tejido a la acción del complemento. La lisis de células hospedadoras y eritrocitos proporciona nutrientes al parásito como lípidos o hierro (Peterson y Alderete, 1984 a,b,c; Lehker *et al.*, 1990; Lehker y Alderete, 1992). La lisis del complemento de estas células que han quedado desprotegidas por el secuestro de la CD59, también van a suponer una fuente de nutrientes para *T. vaginalis* y un método de citotoxicidad contacto-independiente. Esta caracterización nos indica que determinados aislados son capaces de sobrevivir durante más tiempo frente a la presencia de SC, pero no tiene por qué ser más patógena. En los ensayos de patogenia en el modelo murino, la evaluación de las lesiones se produce tras 15 días de la infección, no resultando tiempo suficiente para poder encontrar una posible

asociación entre los resultados de sensibilidad al complemento y la patogenia en el modelo murino.

Si CD59 protege a las células del hospedador de ser lisadas por el complemento, los trofozoítos que adquieran dicha proteína resultarán menos vulnerables al CAM. En un primer ensayo, se sometieron a los aislados C-1:NIH e IR78 co-cultivados en presencia y ausencia de glóbulos rojos de ratón a distintos volúmenes de suero humano. La concentración de C3 fue previamente determinada. Los resultados de susceptibilidad muestran que para ambos aislados los trofozoítos cultivados en presencia de eritrocitos son menos susceptibles al SC (**Figura 66**). Asimismo dicha susceptibilidad va aumentando proporcionalmente a la concentración de C3c añadida al medio. Demes *et al.* (1988a) detectaron una disminución del número de trofozoítos durante la menstruación, especialmente en el primer y segundo día del ciclo. Esta observación puede estar relacionada con el aumento de la presencia del complemento a nivel genitourinario durante la menstruación. También observan la existencia de subpoblaciones en los aislados con cierta resistencia al SC. Una de las características evaluadas en nuestros aislados, ha sido la susceptibilidad al complemento presente en SH. Los diez aislados analizados han mostrado distintos grados de sensibilidad al SC (**Tabla 66**), confirmando lo observado por Demes *et al.* (1988 a,b) y Alderete *et al.* (1995b). Asimismo también indicaron la pérdida de la resistencia al complemento tras mantener a los trofozoítos cultivados *in vitro* (Demes *et al.*, 1988 a,b; Alderete *et al.*, 1995b). Esta apreciación podría explicarse de la siguiente forma: al no sintetizar *T. vaginalis* CD59 y no tener en los cultivos *in vitro* ninguna fuente de dicha proteína, la multiplicación del parásito va a dar lugar a sucesivas generaciones sin CD59 en su superficie, convirtiéndolas tras un tiempo de cultivo en aislados más susceptibles al SC.

Una alternativa al estudio y clasificación de los aislados de *T. vaginalis* puede ser el estudio de marcadores moleculares potenciales presentes en el genoma del parásito. Distintos autores han tratado de buscar loci capaces de agrupar las muestras en función de su patogenia, la presencia de TVV, la sensibilidad al MTZ o el origen geográfico. Sin embargo, los resultados obtenidos tras la aplicación de las técnicas como RAPD (Vanacova *et al.*, 1997; Snipes *et al.*, 2000; Hampl *et al.*, 2001; Kaul *et al.*, 2004; Rojas *et al.*, 2004) y RFLP (Stiles *et al.*, 2000; Meade *et al.*, 2009) han sido contradictorios.

En un esfuerzo por buscar nuevas regiones del genoma como potenciales marcadores genéticos, se escogió la secuenciación de la región ITS1-5.8S ARNr-ITS2 debido a distintos criterios. Las regiones ITS han demostrado ser excelentes marcadores de variabilidad inter e intraespecífica en otros protozoos (Van Herwerden *et al.*, 1998; Fernandes *et al.*, 1999; Som *et al.*, 2000; Lew *et al.*, 2003; Kulhs *et al.*, 2005; Niu *et al.*, 2009). Estas regiones han permitido detectar polimorfismos en los alineamientos tanto en el tamaño de amplicones como en las diferencias nucleotídicas. El grupo de Bart *et al.* (2008) caracterizó con éxito al parabasálico *Dientamoeba fragilis* empleando la región ITS1. Asimismo, *T. vaginalis* se caracteriza por ser uno de los protozoos con el genoma más grande, repetitivo, y con mayor número de copias de ARNr (Carlton *et al.*, 2007). Todo parecía indicar que estos loci resultarían útiles para agrupar a los aislados. Sin embargo nuestros resultados mostraron una homología por encima del 99%. De las 6 mutaciones puntuales detectadas, tan sólo la transversión C→T localizada en la posición 66 del ITS1 se identificó en nueve de los 40 aislados comparados (Snipes *et al.*, 2000; Xiao *et al.*, 2006;

Rivera *et al.*, 2009; Matini *et al.*, 2012). No obstante, ninguno de nuestros diez aislados presentó dicha mutación. Si se revisan los trabajos de estos equipos, todos los aislados que presentaron esta SNP tenían un origen asiático (Filipinas, China e Irán), mientras que los diez aislados analizados en esta Tesis se aislaron de mujeres con nacionalidad europea o latinoamericana (**Tabla 66**).

Este polimorfismo tan bajo en el locus estudiado se correlaciona con los hallazgos encontrados en otras familias génicas de *T. vaginalis* (Carlton *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2011). En los últimos años algunos científicos han defendido una expansión reciente del genoma de *T. vaginalis*. Este fenómeno génico podría haber coincidido con la colonización del hábitat genitourinario (Woehle *et al.*, 2014) lo que explicaría un genoma tan repetitivo, con un número elevado de pseudogenes y elementos transponibles y al mismo tiempo tan poco polimórfico. Una similitud tan elevada en una región tan hipervariable, a diferencia de otros protozoos que poseen genomas más pequeños y menos repetitivos, podría justificar esta teoría. La incógnita que se plantea es: ¿cuál es la razón de mantener genes duplicados con el enorme gasto energético que supone la multiplicación y regulación de un genoma tan grande? Carlton *et al.* (2007) sugirieron que la expansión de algunas familias génicas no tendría por qué haberse dado al azar. Conforme a esta misma teoría, Gould *et al.* (2013) estudiaron la expresión génica del parásito en condiciones de estrés por presencia de oxígeno. Este grupo observó cómo algunos genes de una misma familia génica se regulaban de forma distinta en función del estímulo mientras que otras familias de copias parálogas respondían de igual manera a los cambios ambientales. Se pone así de manifiesto la importancia en el estudio y entendimiento del comportamiento de este parásito, resultado necesario el estudio de varias características biológicas y moleculares.

Además de los ITS, se han explorado dos marcadores genéticos adicionales: los MS y el estudio de SNP en genes conservados de copia única (SCG). Los estudios agrupan a los diez aislados en dos *clusters* en base a la existencia o no de algún MS con un tamaño de amplicón distinto (**Figura 70**). Asimismo la secuenciación de los dos genes GP63a y PMS1 catalogaron de igual forma y en dos grupos claramente diferenciados a los aislados (**Figura 73**). Si se comparan ambas clasificaciones, la agrupación empleando los dos métodos fue idéntica (**Tabla 66**), confirmando la idoneidad de los marcadores escogidos.

Los resultados de la caracterización molecular por los marcadores genéticos seleccionados, se compararon con las caracterizaciones biológicas. De los 6 aislados clasificados como de Tipo I destaca que el 83% (5/6) fueron TVV+ y tan sólo S351 fue negativo, mientras que de los cuatro aislados de Tipo II, 1232, IR78 y S852 (3/4) fueron TVV-. Esta correlación fue observada por Conrad *et al.* (2012). El análisis de 235 aislados comparando 21 MS y 6 SNP agrupó a los aislados en dos tipos, según estudios bioinformáticos. Los de Tipo I que mostraron presencia de TVV (TVV+) en un 73% y resultaron sensibles al MTZ, mientras que los agrupados como Tipo II fueron TVV- en un 97,5% y mostraron valores de sensibilidad más bajos.

Es importante reseñar que los dos tipos de marcadores escogidos, son marcadores robustos que permiten la monitorización de aislados de laboratorio, no sufriendo modificaciones a lo largo del tiempo a pesar de mantenerse en cultivo durante largos periodos de tiempo (Conrad *et al.*, 2011). Esta propiedad permite realizar comparaciones

fiabiles entre los resultados genéticos y propiedades fenotípicas antes descritas como la colonización del hígado en el modelo murino y la presencia de TVV.

Teniendo en cuenta las diez propiedades analizadas, tanto biológicas como moleculares, los aislados JH31A4, 1807 y 11 mostraron las mismas características a excepción del origen geográfico y la citoadherencia. De igual forma S760 y S852 se encuentran en los mismos grupos a excepción de la presencia de TVV.

En términos generales empleando los MS y los SNP como marcadores genéticos, podemos agrupar de forma fiable a los aislados de *T. vaginalis* en dos tipos:

- ⇒ **Tipo I:** aislados más sensibles al MTZ y más propensos a presentar virus (TVV+)
- ⇒ **Tipo II:** aislados más resistentes al MTZ y en su mayoría TVV–

Conrad *et al.* (2012) especularon sobre si los aislados Tipo II podrían haber divergido de la población de Tipo I gracias a la adquisición de algunas ventajas evolutivas como la resistencia al MTZ. El ser poblaciones menos antiguas desde el punto de vista evolutivo explicaría su localización en las ramas más alejadas de los árboles filogenéticos. Esta misma localización es la que se observa en nuestros dendrogramas tras analizar las mutaciones en los dos SCG (**Figuras 71 y 72**) lo que corrobora la hipótesis de Conrad *et al.* (2012).

En definitiva, los resultados obtenidos tras la caracterización biomoleculares de los aislados muestran una correlación clara entre resistencia, TVV y los cinco marcadores moleculares estudiados. Asimismo también se ha confirmado la relación que existe entre el desarrollo de lesiones hepáticas y la sintomatología clínica en las pacientes. No obstante, resultaría necesaria la realización de estudios con un mayor número de aislados para corroborar esa observación.

Los estudios de citoadherencia y citotoxicidad no han mostrado una correlación directa con ninguna otra característica estudiada, probablemente porque ambas propiedades se han medido de forma individual y no se tratan de características exclusiva que permitan conocer la patogenia del aislado sino que el comportamiento del mismo va a verse influido por otros factores más complejos entre los que se incluye las del propio hospedador que va a condiciones el comportamiento del parásito.

VII. Conclusiones / Conclusions

Conclusiones

I. PROCEDIMIENTO SECUENCIAL DE CRIBADO FARMACOLÓGICO FRENTE A *Trichomonas vaginalis*

1. El punto crítico en el diseño de modelos virtuales QSAR-ADL se sustenta en la diversidad estructural de los compuestos que integran la BD.
2. La creación de modelos QSAR-ADL a partir de índices lineales parece insuficiente para integrar el filtro in silico en el procedimiento secuencial de búsqueda de nuevos agentes tricomonocidas. La incorporación de modelos basados en índices cuadráticos y bilineales podrían consolidar la robustez del método de predicción in silico diseñado.
3. El sistema multclasificador DSDE es una herramienta eficaz en la selección y ensamblaje de los mejores modelos de predicción virtual diseñados por el programa TOMOCOMD-CARDD v.2.
4. El método de cribado in vitro mediante el revelado fluorimétrico con resazurina muestra una excelente correlación con el método de recuento al microscopio. La sensibilidad, fiabilidad, reproducibilidad y bajo coste de esta técnica propuesta lo convierte en una alternativa adecuada para el estudio in vitro de agentes tricomonocidas sustituyendo al método clásico.
5. El derivado VATR 145 con estructura 1-bencil-3[5-(metilamino)pentiloxi]-5-nitroindazol destaca por mostrar una actividad tricomonocida frente al aislado resistente superior a la del fármaco de referencia. Asimismo, el compuesto VATR 137, con estructura de 3-aminoindazol, mostró una notable actividad in vivo. La actividad de estas estructuras sugiere el empleo de los 1-bencil-5-nitroindazoles derivados con radicales 3-aminoalcoxilo como “cabezas de serie” para la síntesis y evaluación de nuevos agentes tricomonocidas.
6. El procedimiento de cribado secuencial se presenta herramienta útil para la selección de nuevos agentes tricomonocidas durante los estudios preclínicos.

II. CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE AISLADOS DE *Trichomonas vaginalis*

1. La caracterización biológica de los aislados de *T. vaginalis* demuestra la variabilidad intraespecífica y la heterogeneidad en el comportamiento de las poblaciones tanto a nivel de patogenicidad experimental como de otros factores fenotípicos tales como la citoadherencia y la citotoxicidad.
2. Se confirma la capacidad de *T. vaginalis* para incorporar la molécula CD59 (protectina) del hospedador, inhibiendo el complejo de ataque a la membrana del sistema del complemento activado, lo que le convierte en un excelente mecanismo de evasión inmunológico.
3. La caracterización molecular de *T. vaginalis* mediante la secuenciación de la región ITS1-5,8S ARNr-ITS2 no permite la diferenciación intraespecífica.
4. La caracterización genómica de los aislados de *T. vaginalis* estudiados, empleando tres marcadores microsatélites (MS: 006, 129 y 184) y la secuenciación de los SNP de dos genes de copia única (SCG: GP63a y PMS1), permiten la agrupación intraespecífica en dos tipos: Tipo I y II.
5. Entre los aislados de *T. vaginalis* estudiados, se confirma una correlación entre la presencia de TVV, la sensibilidad a 5-nitroimidazoles y el agrupamiento resultante de la caracterización genómica en dos tipos (Tipo I y Tipo II).
6. La presencia de TVV, la patogenicidad en el modelo experimental y el panel de los 5 marcadores moleculares se consolidan como marcadores biomoleculares adecuados para la caracterización de aislados frescos y de laboratorio.

Conclusions

I. SEQUENTIAL PRODEDURE OF PHARMACOLOGICAL SCREENING AGAINST *Trichomonas vaginalis*

1. The critical step for the development of accurate ADL-QSAR models is the design of a database with a wide variability of chemical structures to assure an adequate extrapolation power.
2. The ADL-QSAR models based on linear indices are insufficient for the correct prediction of novel trichomonacidal compounds. The design and incorporation of quadratic and bilinear indices could increase the correct identification of active agents.
3. The use of the multiclassifier software DSDE is an efficacy tool for the selection of the best virtual models designed by TOMOCOMD-CARDD software.
4. The fluorimetric *in vitro* screening assay shows an excellent correlation with the microscopic count method. The resazurin method proposed is less-time consuming and sensitive, and could easily be automated in substitution of the classical procedure.
5. The 1-bencil-3-[5-(methylamino)pentyl-5-nitroindazole VATR 145 has achieved a high trichomonacidal activity against the resistant isolate, being more active than the reference drug. In addition, the 3-aminoindazole VATR 137 also displayed a remarkable activity *in vitro*. These results suggest the use of 1-bencil-5-nitroindazole derivatives with 3-aminoalcoxy substituents as scaffolds for the synthesis and evaluation of potential trichomonacidal agents.
6. The sequential procedure proposed is a useful tool for the identification of novel trichomonacidal agents in preclinical studies.

II. BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF *Trichomonas vaginalis* ISOLATES

1. The biological characterization of *T. vaginalis* isolates corroborates the intraspecific variability of the parasitic population in a holistic fashion (experimental pathogenicity and other phenotypic factors like cytoadherence and cytotoxicity).
2. *T. vaginalis* has the ability to acquire host CD59. The procurement of this protein appears to be by an alternative mechanism to evade complement-mediated lysis.
3. The molecular characterization of *T. vaginalis* using ITS1-5.8 rRNA-ITS2 region is not suitable for intra-species differentiation.
4. The use of three microsatellites (MS: 006, 129 and 184) and single nucleotide polymorphisms of GP63a and PMS1 genes, are useful genetic markers to classify *T. vaginalis* isolates in two clusters: Type I and Type II.
5. A correlation between the genetic aggrupation in both clusters and presence of TVV, and MTZ sensitivity was observed.
6. Identification of TVV, pathogenicity in mouse model and the 5 molecular loci are consolidated as biomolecular markers for the classification of both fresh and long-term cultured isolates.

VIII. Propuestas futuras / Proposals for future research

Propuestas futuras

1. Retroalimentar la BD con nuevas estructuras químicas entre las que se incluyen las 168 moléculas ensayadas en esta Tesis e implementar el sistema de cribado *in silico* propuesto con modelos nuevos empleando índices cuadráticos y bilineales. Corroborar experimentalmente la validez del sistema de cribado secuencial propuesto mediante el estudio de BD y farmacopeas compuestas por cientos de moléculas como DrugBank, Spectrum Collection o incluso farmacopeas cuyas estructuras estén disponibles.
2. Continuar con los estudios de sinergias empleando distintas combinaciones de DIM y otros 5-NI, con el objetivo de buscar una alternativa terapéutica formada por el uso combinado DIM+5-NI, en colaboración con el laboratorio BioResponse S.L. El dispositivo estaría compuesto por una dosis de DIM de administración tópica y una dosis oral de 5-NI. El tratamiento podría suponer una alternativa terapéutica para mujeres que hayan mostrado resistencia al tratamiento monodosis de MTZ.
3. Realizar la caracterización biológica y molecular de aislados nuevos y frescos procedentes de orígenes geográficos distintos para corroborar la eficacia de los marcadores presentados en esta Tesis. Resulta de gran importancia incluir en estudios futuros aislados resistentes, de pacientes asintomáticos y de varones infectados.
4. Corroborar si la mutación estable encontrada en la región ITS1 en posición 66, está asociada a una determinada población de origen asiático, mediante la secuenciación de nuevos aislados de origen geográfico conocido.
5. Continuar con la investigación iniciada en esta Tesis sobre la evasión de *T. vaginalis* al sistema del complemento. Por un lado, con el fin de conocer cómo CD59 es anclado a la superficie parasitaria, se deberían realizar estudios de co-localización de CD59 y AP65 mediante inmunohistoquímica. Otras determinaciones incluirían la manipulación de la superficie parasitaria con el tratamiento con tripsina, proteasas y en condiciones de alta y baja concentración de hierro para estudiar los posibles cambios.
6. Determinar si existen otros factores de evasión que al igual que la CD59, puedan ser incorporados a la superficie del flagelado para evadir el ataque inmunológico del hospedador o bien sean sintetizados por el propio parásito. En caso de que existiera algún caso de mimetismo molecular, mediante el empleo de las técnicas aprendidas durante la estancia científica en el Instituto de Ciencias Biomédicas de la UNAM (México DF), se estudiaría la funcionalidad de la proteína. Durante la estancia científica se adquirieron los conocimientos necesarios para caracterizar proteínas mediante la generación de mutantes y la posterior expresión y purificación de proteínas recombinantes con el fin de estudiar su funcionalidad en el propio parásito así como su interacción con otras proteínas. La implementación de estas técnicas podría resultar de gran utilidad para el estudio más pormenorizado de los

mecanismos de expresión génica de determinados genes así como la funcionalidad de las proteínas traducidas. De forma paralela, estudiar el papel del Zn en la expresión de genes así como en la acción sobre el propio parásito. Aunque se conoce que el Zn es uno de los principales responsables del bajo desarrollo de síntomas en el hombre, poco se sabe acerca de cómo actúa sobre el parásito.

7. En el campo de la caracterización genómica, aunque se han encontrado 5 marcadores que han mostrado una buena capacidad de clasificación de los aislados en dos grupos, continuar con la búsqueda de nuevos marcadores capaces de caracterizar intraespecíficamente y de forma sencilla a los aislados según cualquiera de sus características biológicas como la sintomatología, la resistencia o la presencia de otros microorganismos.

Proposals for future research

1. Database feedback with new structures, including the 168 compounds evaluated in this Thesis. In addition, increased the robustness of the QSAR models proposed with the implementation of novel models using quadratic and bilinear index. Validate the proposed system of sequential screening by studying data base and pharmacopoeia composed of hundreds of molecules as DrugBank, Spectrum Collection pharmacopoeia (*drug repurposing*).
2. Study the potential synergies using different combinations of DIM and another 5-NI, with the aim of finding an alternative therapy composed by the combined use of DIM + 5-NI, in collaboration with the laboratory BioResponse SL. The device would consist of a dose of DIM for topical administration and an oral dose of 5-NI. The treatment could be a therapeutic alternative for women who have shown resistance to single-dose treatment of MTZ or have developed side effects.
3. Perform biological and molecular characterization of new isolates from different geographic origins to corroborate the effectiveness of the markers presented in this Thesis. Inclusion of new fresh and resistant isolates is needed in future studies for this corroboration. Also the obtention of samples from asymptomatic men and women would be necessary.
4. Verify whether the stable mutation found in ITS1 (nucleotide 66) is associated with Asian population, by sequencing new isolates of known geographical origin.
5. Continue with the investigation initiated in this thesis on the avoidance of *T. vaginalis* to complement system. On the one hand, in order to know how CD59 is anchored to the parasite surface, studies should investigate the co-localization of CD59 and AP65 by immunohistochemistry. Other findings include the handling of the parasitic surface treatment with trypsin, proteases and under high and low iron conditions.
6. Determine if there are other factors as the CD59 that can be incorporated into the surface of the parasite to evade the host immune attack or are synthesized by *T. vaginalis*. In case of molecular mimicry, the functionality of the protein could be explored by using the techniques learned during the scientific stay at the Institute of Biomedical Sciences at UNAM (Mexico City). During the stay I acquire the scientific knowledge to characterize proteins by generating mutants and subsequent expression and purification of recombinant proteins. The implementation of these techniques in our laboratory could be useful for further studies related with the mechanisms of gene expression of certain genes and functionality and localization of the translated proteins as well as its interaction with other proteins. In addition, another important goal is role that plays the presence of Zn in gene expression as well as the mode of action on the parasite itself. Although it is known that Zn is one of the main causes of under development of symptoms in men population, little is known about how it acts on the parasite.

7. In the field of genomic characterization, although we have found 5 markers that have shown a remarkable capacity to classify isolates into two groups, we could continue the search for new markers. The new loci should be able to characterize easily the new isolates intraspecifically based on any of their biological characteristics as the symptoms, the resistance to 5-NI or the presence of other microorganisms.

IX. Referencias bibliográficas

Referencias bibliográficas

Abraham, M.C., Desjardins, M., Filion, L.G., Garber, G.E., 1996. Inducible immunity to *Trichomonas vaginalis* in a mouse model of vaginal infection. *Infect Immun* 64, 3571-3575.

Adagu, I.S., Nolder, D., Warhurst, D.C., Rossignol, J.F., 2002. In vitro activity of nitazoxanide and related compounds against isolates of *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *J Antimicrob Chemoth* 49, 103-111.

Adams, C.P., Brantner, V.V. 2010. Spending on new drug development. *Health economics* 19: 130-141.

Addis, M.F., Rappelli, P., Cappuccinelli, P., Fiori, P.L., 1997. Extracellular release by *Trichomonas vaginalis* of a NADP(+) dependent malic enzyme involved in pathogenicity. *Microb Pathogenesis* 23, 55-61.

Adl, S.M., Leander, B.S., Simpson, A.G., Archibald, J.M., Anderson, O.R., Bass, D., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Farmer, M.A., Karpov, S., Kolisko, M., Lane, C.E., Lodge, D.J., Mann, D.G., Meisterfeld, R., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S.E., Smirnov, A.V., Spiegel, F., 2007. Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Syst Biol* 56, 684-689.

Adl, S.M., Simpson, A.G., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C.E., Lewis, L.A., Lodge, J., Lynn, D.H., Mann, D.G., McCourt, R.M., Mendoza, L., Moestrup, O., Mozley-Standridge, S.E., Nerad, T.A., Shearer, C.A., Smirnov, A.V., Spiegel, F.W., Taylor, M.F., 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of eukaryotic microbiology* 52, 399-451.

Afzan, M.Y., Suresh, K., 2012. Pseudocyst forms of *Trichomonas vaginalis* from cervical neoplasia. *Parasitol Res* 111, 371-381.

Aggarwal, A., Shier, R.M., 2008. Recalcitrant *Trichomonas vaginalis* infections successfully treated with vaginal acidification. *J Obstet Gynaecol Can* 30, 55-58.

Aguilera-Venegas, B., Olea-Azar, C., Norambuena, E., Arán, V. J., Mendizábal, F., Lapier, M., Maya, J.D., Kemmerling, U., López-Muñoz, R. 2011. ESR, electrochemical, molecular modeling and biological evaluation of 4-substituted and 1, 4-disubstituted 7-nitroquinoxalin-2-ones as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78(3), 1004-1012.

Aguirre, G., Boiani, M., Cerecetto, H., Gerpe, A., González, M., Sainz, Y. F., Denicola, A., Ochoa de Ocariz, C., Nogal, J.J., Montero, D., Escario, J. A. 2004. Novel Antiprotozoal Products: Imidazole and Benzimidazole N-Oxide Derivatives and Related Compounds. *Archiv der Pharmazie* 337, 259-270.

Alderete, J.F., 1999. Iron modulates phenotypic variation and phosphorylation of P270 in double-stranded RNA virus-infected *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 67, 4298-4302.

Alderete, J.F., Engbring, J., Lauriano, C.M., O'Brien, J.L., 1998. Only two of the *Trichomonas vaginalis* triplet AP51 adhesins are regulated by iron. *Microb Pathogenesis* 24, 1-16.

Alderete, J.F., Kasmala, L., Metcalfe, E.D., Garza, G.E. 1986. Phenotypic variation and diversity among *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation of phenotype with trichomonal virulence determinants. *Infection and immunity*, 53: 285-293.

Alderete, J.F., Millsap, K.W., Lehker, M.W., Benchimol, M., 2001. Enzymes on microbial pathogens and *Trichomonas vaginalis*: molecular mimicry and functional diversity. *Cell Microbiol* 3, 359-370.

Alderete, J.F., Neace, C.J., 2013. Identification, characterization, and synthesis of peptide epitopes and a recombinant six-epitope protein for *Trichomonas vaginalis* serodiagnosis. *Immuno Targ and Ther* 2, 1-13.

- Alderete, J.F., O'Brien, J.L., Arroyo, R., Engbring, J.A., Musatovova, O., Lopez, O., Lauriano, C., Nguyen, J., 1995a. Cloning and molecular characterization of 2 genes encoding adhesion proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Mol Microbiol* 17, 69-83.
- Alderete, J.F., Provenzano, D., Leherker, M.W., 1995b. Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. *Microb Pathogenesis* 19, 93-103.
- Alexander, E.R., 1973. Possible etiologies of cancer of the cervix other than herpesvirus. *Cancer Res* 33, 1485-1490.
- Allsworth, J.E., Ratner, J.A., Peipert, J.F., 2009. Trichomoniasis and other sexually transmitted infections: results from the 2001-2004 National Health and Nutrition Examination Surveys. *Sex Transm Dis* 36, 738-744.
- Alvarez-Sanchez, M.E., Avila-Gonzalez, L., Becerril-Garcia, C., Fattel-Facenda, L.V., Ortega-Lopez, J., Arroyo, R., 2000. A novel cysteine proteinase (CP65) of *Trichomonas vaginalis* involved in cytotoxicity. *Microb Pathogenesis* 28, 193-202.
- Alvarez-Sanchez, M.E., Carvajal-Gamez, B.I., Solano-González, E., Martínez-Benitez, M., García, A.F., Alderte, J.F., Arroyo, R. 2008. Polyamine depletion down-regulates expression of the *Trichomonas vaginalis* CP65. A 65-KDa cysteine proteinase involved in cellular damage. *The international journal of biochemistry & cell biology* 40, 2442-2451.
- Alvarez-Sanchez, M.E., Solano-Gonzalez, E., Yanez-Gomez, C., Arroyo, R., 2007. Negative iron regulation of the CP65 cysteine proteinase cytotoxicity in *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect* 9, 1597-1605.
- Andrea, S.B., Chapin, K.C., 2011. Comparison of Aptima *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification assay and BD affirm VPIII for detection of *T. vaginalis* in symptomatic women: performance parameters and epidemiological implications. *J Clin Microbiol* 49, 866-869.
- Andrews, K.T., Fisher, G., Skinner-Adams, T.S. 2014. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 4: 95-111.
- Andrzejewska, M., Yepez-Mulia, L., Tapia, A., Cedillo-Rivera, R., Laudy, A.E., Starosciak, B.J., Kazmierczuk, Z., 2004. Synthesis, and antiprotozoal and antibacterial activities of S-substituted 4,6-dibromo- and 4,6-dichloro-2-mercaptopbenzimidazoles. *Eur J Pharm Sci* 21, 323-329.
- Anthony, J-P., Fyfe, L., Smith, H., 2005. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? *TRENDS Parasitol* 21, 462-468.
- Applied Biosystems Chemistry Guide, 2009. DNA sequencing by capillary electrophoresis. Second Edition.
- Arán, V.J., Ochoa, C., Boiani, L., Buccino, P., Cerecetto, H., Gerpe, A., González, M., Montero, D., Nogal, J.J., Gómez-Barrio, A., Azqueta, A., López de Cerain, A., Piro, O.E., Castellano, E.E., 2005. Synthesis and biological properties of new 5-nitroindazole derivatives. *Bioorg Med Chem* 13, 3197-3207.
- Ardalan, S., Lee, B.C., Garber, G.E., 2009. *Trichomonas vaginalis*: The adhesins AP51 and AP65 bind heme and hemoglobin. *Exp Parasitol* 121, 300-306.
- Arroyo, R., Alderete, J.F., 1989. *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infect Immun* 57, 2991-2997.
- Arroyo, R., Cárdenas-Guerra, R. E., Figueroa-Angulo, E. E., Puente-Rivera, J., Zamudio-Prieto, O., & Ortega-López, J., 2015. *Trichomonas vaginalis* Cysteine Proteinases: Iron Response in Gene Expression and Proteolytic Activity. *BioMed Research International*. doi:10.1155/2015/946787
- Arroyo, R., González-Robles, A., Martínez-Palomo, A., Alderete, J.F., 1993. Signalling of *Trichomonas vaginalis* for amoeboid transformation and adhesin synthesis follows cytoadherence. *Mol Microbiol* 7, 299-309.
- Aselton, P., Jick, H., Milunsky, A., Hunter, J.R., Stergachis, A., 1985. First-trimester drug use and congenital disorders. *Obstet Gynecol* 65, 451-455.
- Ashburn, T.T., Thor, K.B., 2004. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nat Rev Drug Discov* 3, 673-683.

- Azevedo, A., Cunha, V., Teixeira, A.L., Medeiros, R., 2011. IL-6/IL-6R as a potential key signaling pathway in prostate cancer development. *World J Clin Oncol* 2, 384-396.
- Bachmann, L.H., Hobbs, M.M., Sena, A.C., Sobel, J.D., Schwebke, J.R., Krieger, J.N., McClelland, R.S., Workowski, K.A., 2011. *Trichomonas vaginalis* genital infections: progress and challenges. *Clin Infect Dis* 53 Suppl 3, S160-172.
- Back, S.A., Khan, R., Gan, X., Rosenberg, P.A., Volpe, J.J. 1999. A new Alamar Blue viability assay to rapidly quantify oligodendrocyte death. *Journal of Neuroscience Methods* 91, 47-54.
- Baeten, J.M., Nyange, P.M., Richardson, B.A., Lavreys, L., Chohan B., Martin, H.L., Mandaliya, K., Ndinya-Achola, J.O., Bwayo, J.J., Kreiss, J.K. 2001. Hormonal contraception and risk of sexually transmitted disease acquisition: Results from a prospective study. *Am J Obstet Gynecol*, 185(2), 380-385.
- Bakken, G.A., Jurs, P.C., 2000. Classification of multidrug-resistance reversal agents using structure-based descriptors and linear discriminant analysis. *J Med Chem* 43, 4534-4541.
- Baldi, P., Brunak, S., Chauvin, Y., Andersen, C.A.F., Nielsen, H. 2000. Assessing the accuracy of prediction algorithms for classification: an overview. *Bioinformatics review* 16,412-424.
- Barbier, M. 1979. Biologie de *Trichomonas vaginalis*. *La Revue de Médecine*, 1-2: 35-38.
- Bart, A., van der Heijden, H. M., Greve, S., Speijer, D., Landman, W. J., & van Gool, T. 2008. Intragenomic variation in the internal transcribed spacer 1 region of *Dientamoeba fragilis* as a molecular epidemiological marker. *J Clin Microbiol* 46,3270-3275.
- Bastida-Corcuera, F.D., Okumura, C.Y., Colocoussi, A., Johnson, P.J., 2005. *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan mutants have reduced adherence and cytotoxicity to human ectocervical cells. *Eukaryot Cell* 4, 1951-1958.
- Bellanger, A. P., Cabaret, O., Costa, J. M., Foulet, F., Bretagne, S., & Botterel, F. (2008). Two unusual occurrences of trichomoniasis: rapid species identification by PCR. *J Clin Microbiol* 46, 3159-3161.
- Benchimol, M. 2009. Hydrogenosomes under microscopy. *Tissue and Cell*,41, 151-168.
- Benchimol, M., Chang, T.H., Alderete, J.F., 2002a. Visualization of new virus-like-particles in *Trichomonas vaginalis*. *Tissue Cell* 34, 406-415.
- Benchimol, M., Monteiro, S.P., Chang, T.H., Alderete, J.F., 2002b. Virus in *Trichomonas* - an ultrastructural study. *Parasitol Int* 51, 293-298.
- Benchimol, M., Pereira-Neves, A., 2007. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biol Cell* 99, 87-101.
- Bendesky, A., Menendez, D., Ostrosky-Wegman, P., 2002. Is metronidazole carcinogenic? *Mutat Res* 511, 133-144.
- Bessarab, I.N., Liu, H.W., Ip, C.F., Tai, J.H., 2000. The complete cDNA sequence of a type II *Trichomonas vaginalis* virus. *Virology* 267, 350-359.
- Bessarab, I.N., Nakajima, R., Liu, H.W., Tai, J.H., 2011. Identification and characterization of a type III *Trichomonas vaginalis* virus in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Arch Virol* 156, 285-294.
- Bhatt, R., Pandit, D., Deodhar, L., Bhise, R., Chatterjee, D.K., 1993. Comparative pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* isolated from symptomatic and asymptomatic cases. *J Postgrad Med* 39, 187-189.
- Bilbao-Ramos, P., Sifontes-Rodríguez, S., Dea-Ayela, M.A., Bolás-Fernández, F. 2012. A fluorometric method for evaluation of pharmacological activity against intracellular *Leishmania amastigotes*. *Journal of Microbiological methods*, 89: 8-11.
- Blaha, C., Duchêne, M., Aspöck, H., Walochnik, J., 2006. In vitro activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against metronidazole-resistant and-susceptible strains of *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Antimicrob Chem* 57, 273-278.

Bonilha, V.L., Ciavaglia, M.D., de Souza, W., Silva, F.C.E., 1995. The involvement of terminal carbohydrates of the mammalian-cell surface in the cytoadhesion of trichomonads. *Parasitol Res* 81, 121-126.

Borchardt, K.A., Zhang, M.Z., Shing, H., Flink, K., 1997. A comparison of the sensitivity of the InPouch TV, Diamond's, and Trichosel media for detection of *Trichomonas vaginalis*. *Genitourin Med* 73, 297-298.

Borra, R.C., Lotufo, M.A., Gagiotti, S.M., Barros Fde, M., Andrade, P.M., 2009. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Braz Oral Res* 23, 255-262.

Briganti, A., Capitanio, U., Suardi, N., Gallina, A., Salonia, A., Bianchi, M., Tutolo, M., Di Girolamo, V., Rigatti, P., Montorsi, F., 2009. Benign prostatic hyperplasia and its aetiologies. *Eur Urol* 8, 865-871.

Burtin, P., Taddio, A., Ariburnu, O., Einarson, T.R., Koren, G., 1995. Safety of metronidazole in pregnancy: a meta-analysis. *Am J Obstet Gynecol* 172, 525-529.

Campbell, W.C., 2001. A historic photomicrograph of a parasite (*Trichomonas vaginalis*). *Trends Parasitol* 17, 499-500.

Campos Aldrete, M.E., Salgado-Zamora, H., Luna, J., Melendez, E., Meraz-Rios, M.A., 2005. A high-throughput colorimetric and fluorometric microassay for the evaluation of nitroimidazole derivatives anti-trichomonas activity. *Toxicol in Vitro* 19, 1045-1050.

Camuzat-Dedenis, B., Provot, O., Cointeaux, L., Perroux, V., Berrien, J.F., Bories, C., Loiseau, P.M., Mayrargue, J.L., 2001. Synthesis and in vitro trichomonocidal activities of some new dialkylperoxides and 1,2,4-trioxanes. *Eur J Med Chem* 36, 837-842.

Cappuccinelli, P., Lattes, C., Cagliani, I., Negro, P.A., 1974. Features of intravaginal *Trichomonas vaginalis* infection in the mouse and the effect of oestrogen treatment and immunodepression. *G Bacteriol Virol Immunol* 67, 31.

Carlton, J.M., Hirt, R.P., Silva, J.C., Delcher, A.L., Schatz, M., Zhao, Q., Wortman, J.R., Bidwell, S.L., Alsmark, U.C.M., Besteiro, S., Sicheritz-Ponten, T., Noel, C.J., Dacks, J.B., Foster, P.G., Simillion, C., Van de Peer, Y., Miranda-Saavedra, D., Barton, G.J., Westrop, G.D., Muller, S., Dessi, D., Fiori, P.L., Ren, Q.H., Paulsen, I., Zhang, H.B., Bastida-Corcuera, F.D., Simoes-Barbosa, A., Brown, M.T., Hayes, R.D., Mukherjee, M., Okumura, C.Y., Schneider, R., Smith, A.J., Vanacova, S., Villalvazo, M., Haas, B.J., Pertea, M., Feldblyum, T.V., Utterback, T.R., Shu, C.L., Osoegawa, K., de Jong, P.J., Hrdy, I., Horvathova, L., Zubacova, Z., Dolezal, P., Malik, S.B., Logsdon, J.M., Henze, K., Gupta, A., Wang, C.C., Dunne, R.L., Upcroft, J.A., Upcroft, P., White, O., Salzberg, S.L., Tang, P., Chiu, C.H., Lee, Y.S., Embley, T.M., Coombs, G.H., Mottram, J.C., Tachezy, J., Fraser-Liggett, C.M., Johnson, P.J., 2007. Draft genome sequence of the sexually transmitted pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Science* 315, 207-212.

Carneiro Borra, R., Adreade Lotufo, M., Gagiotti, S.M., de Mesquita Barros, F., Andrade P.M. 2009. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. *Brazilian Oral Research*, 23: 255-262.

Caro-Paton, T., Carvajal, A., Martin de Diego, I., Martin-Arias, L.H., Alvarez Requejo, A., Rodriguez Pinilla, E., 1997. Is metronidazole teratogenic? A meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol* 44, 179-182.

Carta, A., Loriga, M., Paglietti, G., Mattana, A., Fiori, P.L., Mollicotti, P., Sechi, L., Zanetti, S., 2004. Synthesis, anti-mycobacterial, anti-trichomonas and anti-candida in vitro activities of 2-substituted-6,7-difluoro-3-methylquinoxaline 1,4-dioxides. *Eur J Med Chem* 39, 195-203.

Carvajal, A., Sanchez, A., Hurtarte, G., 1995. Metronidazole during pregnancy. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics* 48, 323-324.

Casrouge, A., Zhang, S. Y., Eidenschenk, C., Jouanguy, E., Puel, A., Yang, K., Alcais, A., Picar, C., Mahfoufi, N., Nicolas, N., Lorenzo, L., Plancoullaine, S., Sénéchal, B., Geissman, F., Tabeta, K., Hoebe, K., Du, X., Miller, R.L., Héron, B., Mingot, C., de Villemeur, T.B. Lebon, P., Dulac, O., Rozenberg, F., Beutler, B., Tardieu, T., Abel, L., Casanova, J. L. 2006. Herpes simplex virus encephalitis in human UNC-93B deficiency. *Science*, 314, 308-312.

Castillo-Garit, J.A., Vega, M.C., Rolón, M., Marrero-Ponce, Y., Gómez-Barrio, A., Escario, J.A., Alvarez Bello, A., Montero, A., Torrens, F., Pérez-Giménez, F., Arán V.J., Abad, C. 2011. Ligand-based

discovery of novel trypanosomicidal drug-like compounds: In silico identification and experimental support. *Eur J Med Chem* 46, 3324-3330.

Castillo-Garit, J.A., del Toro-Cortés, O., Kouznetsov, V.V., Ocha Puentes, C., Romero Bohórquez, A.R., Vega, M.C., Rolón, M., Escario, J.A., Gómez-Barrio, A., Marrero-Ponce, Y., Torrens, F., Abad, C., 2012. Identification in silico and in vitro of novel trypanosomicidal drug-like compounds. *Chem Biol Drug Des* 80, 38-45.

Cavaliere, A., Bacci, M., Amorosi, A., Del Gaudio, M., Vitali, R., 1983. Induction of lung tumors and lymphomas in BALB/c mice by metronidazole. *Tumori* 69, 379-382.

Cavalier-Smith, T., 2003. The excavate protozoan phyla Metamonada Grasse emend. (Anaeromonadea, Parabasalia, Carpediemonas, Eopharyngia) and Loukozoa emend. (Jakobea, Malawimonas): their evolutionary affinities and new higher taxa. *Int J Syst Evol Micr* 53, 1741-1758.

Cavier, R., Gobert, J.G., Savel, J., 1972. Application of a method of peritoneal infection of mouse by *Trichomonas vaginalis* to pharmacologic study of trichomonocides. *Ann Pharm Fr* 30, 637-642.

Cedillo-Rivera, R., Chavez, B., Gonzalez-Robles, A., Tapia, A., Yopez-Mulia, L., 2002. In vitro effect of nitazoxanide against *Entamoeba histolytica*, *Giardia intestinalis* and *Trichomonas vaginalis* trophozoites, *J Eukaryot Microbiol* 49, 201-208.

Cepicka, I., Hampl, V., Kulda, J., 2010. Critical taxonomic revision of Parabasalids with description of one new genus and three new species. *Protist* 161, 400-433.

Cepicka, I., Hampl, V., Kulda, J., Flegr, J., 2006. New evolutionary lineages, unexpected diversity, and host specificity in the parabasalid genus *Tetratrichomonas*. *Mol Phylogenet Evol* 39, 542-551.

Chavalitshewinkoon-Petmitr, P., Ramdja, M., Kajorndechakiat, S., Ralph, R.K., Denny, W.A., Wilairat, P., 2003. In vitro susceptibility of *Trichomonas vaginalis* to AT-specific minor groove binding drugs. *J Antimicrobial Chem* 52, 287-289.

Cheikh-Ali, Z., Adiko, M., Bouttier, S., Bories, C., Okpekon, T., Poupon, E., & Champy, P., 2011. Composition, and antimicrobial and remarkable antiprotozoal activities of the essential oil of rhizomes of *Aframomum sceptrum* K. Schum. (Zingiberaceae). *Chem & biodiv*, 8, 658-667.

Cherpes, T.L., Wiesenfeld, H.C., Melan, M.A., Kant, J.A., Cosentino, L.A., Meyn, L.A., Hillier, S.L., 2006. The associations between pelvic inflammatory disease, *Trichomonas vaginalis* infection, and positive herpes simplex virus type 2 serology. *Sex Transm Dis* 33, 747-752.

Chong, C.R., Sullivan, D.J., Jr., 2007. New uses for old drugs. *Nature* 448, 645-646.

Cobo, E.R., Eckmann, L., Corbeil, L.B., 2011. Murine models of vaginal trichomonad infections. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 85, 667-673.

Coelho, D.D., 1997. Metronidazole resistant trichomoniasis successfully treated with paromomycin. *Genitourin Med* 73, 397-398.

Connor, T.H., Stoeckel, M., Evrard, J., Legator, M.S., 1977. The contribution of metronidazole and two metabolites to the mutagenic activity detected in urine of treated humans and mice. *Cancer Res* 37, 629-633.

Coombs, G.H., Mottram, J.C., 2001. Trifluoromethionine, a prodrug designed against methionine gamma-lyase-containing pathogens, has efficacy in vitro and in vivo against *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 1743-1745.

Cornelius, D.C., Ashley Robinson, D., Mzny, C.A., Mena, L.A., Aanensen, D.M., Lushbaugh, W.B., Meade, J.C., 2012. Genetic characterization of *Trichomonas vaginalis* isolates by use of multilocus sequence typing. *J Clin Microbiol*, 50, 3293-3300.

Coro, J., Pérez, R., Rodríguez, H., Suarez, M., Vega, C., Rolón, M., Montero, D., Nogal, J.J., Gómez-Barrio, A., 2005. Synthesis and antiprotozoan evaluation of new alkyl-linked bis(2-thioxo-[1,3,5]thiadiazinan-3-yl) carboxylic acids. *Bioorgan Med Chem* 13, 3413-3421.

Cotch, M.F., Pastorek, J.G., 2nd, Nugent, R.P., Hillier, S.L., Gibbs, R.S., Martin, D.H., Eschenbach, D.A., Edelman, R., Carey, J.C., Regan, J.A., Krohn, M.A., Klebanoff, M.A., Rao, A.V., Rhoads, G.G., 1997a.

Trichomonas vaginalis associated with low birth weight and preterm delivery. The Vaginal Infections and Prematurity Study Group. *Sex Transm Dis* 24, 353-360.

Cotch, M.F., Pastorek, J.G., Nugent, R.P., Hillier, S.L., Gibbs, R.S., Martin, D.H., Eschenbach, D.A., Edelman, R., Carey, J.C., Regan, J.A., Krohn, M.A., Klebanoff, M.A., Rao, A.V., Rhoads, G.G., Yaffe, S.J., Catz, C.S., McNellis, D., Berendes, H.W., Blackwelder, W.C., Kaslow, R.A., Reed, G.F., Greenberg, E.M., Williams, S., Rettig, P.J., 1997b. *Trichomonas vaginalis* associated with low birth weight and preterm delivery. *Sex Transm Dis* 24, 353-360.

Crosby, R., DiClemente, R.J., Wingood, G.M., Harrington, K., Davies, S.L., Hook, E.W., Oh, M.K., 2002. Predictors of infection with *Trichomonas vaginalis*: a prospective study of low income African-American adolescent females. *Sex Transm Infect* 78, 360-364.

Crouch, M.L., Alderete, J.F., 1999. *Trichomonas vaginalis* interactions with fibronectin and laminin. *Microbiol-Sgm* 145, 2835-2843.

Crouch, M.L., Benchimol, M., Alderete, J.F., 2001. Binding of fibronectin by *Trichomonas vaginalis* is influenced by iron and calcium. *Microb Pathogenesis* 31, 131-144.

Crouch, M.V., Alderete, J.F., 2001. *Trichomonas vaginalis* has two fibronectin-like iron-regulated genes. *Arch Med Res* 32, 102-107.

Crozet, M.D., Botta, C., Gasquet, M., Curti, C., Rémusat, V., Hutter, S., Chapelle, O., Azas, N., De Méo, M., Vanelle, P., 2009. Lowering of 5-nitroimidazole's mutagenicity: Towards optimal antiparasitic pharmacophore. *Eur J Med Chem* 44, 653-659.

Cudmore, S.L., Delgaty, K.L., Hayward-McClelland, S.F., Petrin, D.P., Garber, G.E., 2004. Treatment of infections caused by metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev* 17, 783-793.

Cwikel, J.G., Lazer, T., Press, F., Lazer, S., 2008. Sexually transmissible infection among female sex workers: an international review with an emphasis on hard-to-access populations. *Sex Health* 5, 9-16.

Czeizel, A.E., Rockenbauer, M., 1998. A population based case-control teratologic study of oral metronidazole treatment during pregnancy. *Brit J Obstet Gynaec* 105, 322-327.

Da Luz Becker, D., dos Santos, O., Piccoli Frasson, A., DE Vargas Rigo, G., Macedo, A.J., Tasca, T., 2015. High rates of double-stranded RNA viruses and *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* clinical isolates in South Brazil. *Infection, Genetics and Evolution*, 34: 181-187.

Dailey, D.C., Chang, T.H., Alderete, J.F., 1990. Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Parasitology* 101 Pt 2, 171-175.

De Marzo, A.M., Platz, E.A., Sutcliffe, S., Xu, J., Gronberg, H., Drake, C.G., Nakai, Y., Isaacs, W.B., Nelson, W.G., 2007. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 7, 256-269.

De Villiers, B. J., Van Vuuren, S. F., Van Zyl, R. L., & Van Wyk, B. E. 2010. Antimicrobial and antimalarial activity of *Cussonia* species (Araliaceae). *J Ethnopharm* 129, 189-196.

Delmas, F., Di Giorgio, C., Robin, M., Azas, N., Gasquet, M., Detang, C., Costa, M., Timon-David, P., Galy, J.P., 2002. In vitro activities of position 2 substitution-bearing 6-nitro- and 6-amino-benzothiazoles and their corresponding anthranilic acid derivatives against *Leishmania infantum* and *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 46, 2588-2594.

Demes, P., Gombosová, A., Valent, M., Fabusová, H., Janoska, A., 1988. Fewer *Trichomonas vaginalis* organisms in vaginas of infected women during menstruation. *Genitourinary Medicine*, 64: 22-24.

Demes, P., Gombosová, A., Valent, M., Janoska, A., Fabusová, H., Petrenko, M. 1988. Differential susceptibility of fresh *Trichomonas vaginalis* isolates to complement in menstrual blood and cervical mucus. *Genitourinary Medicine*, 64: 176-179.

Depuydt, C.E., Leuridan, E., Van Damme, P., Bogers, J., Vereecken, A.J., Donders, G.G., 2010. Epidemiology of *Trichomonas vaginalis* and human papillomavirus infection detected by real-time PCR in Flanders. *Gynecol Obstet Inves* 70, 273-280.

- Dessi, D., Rappelli, P., Diaz, N., Cappuccinelli, P., Fiori, P.L., 2006. *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis*: a unique case of symbiotic relationship between two obligate human parasites. *Front Biosci* 11, 2028-2034.
- Donders, G.G.G., Depuydt, C.E., Bogers, J.P., Vereecken, A.J., 2013. Association of *Trichomonas vaginalis* and cytological abnormalities of the cervix in low risk women. *PLoS One* 8, e86266.
- Dorlo, T. P., Balasegaram, M., Beijnen, J. H., & de Vries, P. J. 2012. Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chem* 67, 2576-2597.
- Dornbush, P.J., Cho, C., Chang, E.S., Xu, L., Russu, W.A., Wrischnik, L.A., Land, K.M., 2010. Preliminary studies of 3,4-dichloroaniline amides as antiparasitic agents: Structure-activity analysis of a compound library in vitro against *Trichomonas vaginalis*. *Bioorg Med Chem Lett* 20, 5299-5301.
- Draper, D., Donohoe, W., Mortimer, L., Heine, R.P., 1998. Cysteine proteases of *Trichomonas vaginalis* degrade secretory leukocyte protease inhibitor. *J Infect Dis* 178, 815-819.
- Duarte, M., Giordani, R.B., De Carli, G.A., Zuanazzi, J.A., Macedo, A.J., Tasca, T., 2009. A quantitative resazurin assay to determinate the viability of *Trichomonas vaginalis* and the cytotoxicity of organic solvents and surfactant agents. *Exp Parasitol* 123, 195-198.
- duBouchet, L., Spence, M.R., Rein, M.F., Danzig, M.R., McCormack, W.M., 1997. Multicenter comparison of clotrimazole vaginal tablets, oral metronidazole, and vaginal suppositories containing sulfanilamide, aminacrine hydrochloride, and allantoin in the treatment of symptomatic trichomoniasis. *Sex Transm Dis* 24, 156-160.
- Dunkelberger, J.R., Song, W.C., 2010. Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* 20, 34-50.
- Dunne, R.L., Dunn, L.A., Upcroft, P., O'Donoghue, P.J., Upcroft, J.A., 2003. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell Res* 13, 239-249.
- Durel, P., Roiron, V., Siboulet, A., Borel, L.J., 1960. Systemic treatment of human trichomoniasis with a derivative of nitro-imidazole, 8823 RP. *The British journal of venereal diseases* 36, 21-26.
- Dwivedi, S. P., Husain, N., Singh, R. B., Malla, N., 2012. 18S ribosomal DNA based PCR diagnostic assay for *Trichomonas vaginalis* infection in symptomatic and asymptomatic women in India. *Asian Pacific J Trop Dis* 2, 133-138.
- Edwards, D.I., 1980. Mechanisms of selective toxicity of metronidazole and other nitroimidazole drugs. *The British journal of venereal diseases* 56, 285-290.
- el-Nahas, A.F., el-Ashmawy, I.M., 2004. Reproductive and cytogenetic toxicity of metronidazole in male mice. *Basic Clin Pharmacol* 94, 226-231.
- Embley, T.M., Hirt, R.P., 1998. Early branching eukaryotes?. *Curr Opin Genet Dev* 8, 624-629.
- Engbring, J.A., Alderete, J.F., 1998. Three genes encode distinct AP33 proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Mol Microbiol* 28, 305-313.
- Engbring, J.A., OBrien, J.L., Alderete, J.F., 1996. *Trichomonas vaginalis* adhesin proteins display molecular mimicry to metabolic enzymes. *Toward Anti-Adhesion Therapy for Microbial Diseases* 408, 207-223.
- Erickson, S.H., Oppenheim, G.L., Smith, G.H., 1981. Metronidazole in breast milk. *Obstet Gynecol* 57, 48-50.
- Escalona, J.C., Carrasco, R., Padrón, J.A., 2003. Introducción al diseño de Fármacos. Folleto para la Docencia de la Asignatura de Farmacia, Universidad de Oriente.
- Escario, J.A. 1985. Actividad antiprozoaria de moléculas de nueva síntesis. Tesis Doctoral. Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, UCM.
- Eschenbach, D. A., Thwin, S. S., Patton, D. L., Hooton, T. M., Stapleton, A. E., Agnew, K., Winter, C., Meier, A., Stamm, W. E. 2000. Influence of the normal menstrual cycle on vaginal tissue, discharge, and microflora. *Clin Inf Dis* 30, 901-907.

- Evans, S.M., Casartelli, A., Herreros, E., Minnick, D.T., Day, C., George, E., Westmoreland, C., 2001. Development of a high throughput in vitro toxicity screen predictive of high acute in vivo toxic potential. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 15, 579-584.
- Felleisen, R.S.J., 1997. Comparative sequence analysis of 5· 8S rRNA genes and internal transcribed spacer (ITS) regions of trichomonadid protozoa. *Parasitol* 115, 111-119.
- Fichorova, R.N., Trifonova, R.T., Gilbert, R.O., Costello, C.E., Hayes, G.R., Lucas, J.J., Singh, B.N., 2006. *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan triggers a selective upregulation of cytokines by human female reproductive tract epithelial cells. *Infect Immun* 74, 5773-5779.
- Figueroa-Angulo, E.E., Rendon-Gandarilla, F.J., Puente-Rivera, J., Calla-Choque, J.S., Cardenas-Guerra, R.E., Ortega-Lopez, J., Quintas-Granados, L.I., Alvarez-Sanchez, M.E., Arroyo, R., 2012. The effects of environmental factors on the virulence of *Trichomonas vaginalis*. *Microbes Infect* 14, 1411-1427.
- Fiori, P.L., Rappelli, P., Addis, M.F., 1999. The flagellated parasite *Trichomonas vaginalis*: new insights into cytopathogenicity mechanisms. *Microbes Infect* 1, 149-156.
- Fiori, P.L., Rappelli, P., Addis, M.F., Sechi, A., Cappuccinelli, P., 1996. *Trichomonas vaginalis* haemolysis: pH regulates a contact-independent mechanism based on pore-forming proteins. *Microb Pathogenesis* 20, 109-118.
- Folch-Cano, C., Olea-Azar, C., Arán, V. J., & Diaz-Urrutia, C. 2010. ESR and electrochemical study of 1, 2-disubstituted 5-nitroindazolin-3-ones and 2-substituted 3-alkoxy-5-nitro-2H-indazoles: Reactivity and free radical production capacity in the presence of biological systems. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 75, 375-380.
- Ford, A.F., Vardo-Zalik, A.M., Schall, J.J., 2010. Relative clonal density of malaria parasites in mixed-genotype infections: validation of a technique using microsatellite markers for *Plasmodium falciparum* and *P. mexicanum*. *J Parasitol* 96, 908-913.
- Ford, L.C., Hammill, H.A., DeLange, R.J., Bruckner, D.A., Suzuki-Chavez, F., Mickus, K.L., Lebherz, T.B., 1987. Determination of estrogen and androgen receptors in *Trichomonas vaginalis* and the effects of antihormones. *Am J Obstet Gynecol* 156, 1119-1121.
- Fraga, J., Rojas, L., Sariego, I., Fernandez-Calienes, A., 2005. Double-stranded RNA viral infection in Cuban *Trichomonas vaginalis* isolates. *Braz J Infect Dis* 9, 521-524.
- Fraga, J., Rojas, L., Sariego, I., Fernandez-Calienes, A., Nunez, F.A., 2007. Double-stranded RNA viral infection of *Trichomonas vaginalis* and association with clinical presentation. *Acta Protozool* 46, 93-98.
- Garber, G.E., Lemchuk-Favel, L.T., Rousseau, G., 1991. Effect of beta-estradiol on production of the cell-detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 29, 1847-1849.
- Garcia, A. F., Benchimol, M., & Alderete, J. F. 2005. *Trichomonas vaginalis* polyamine metabolism is linked to host cell adherence and cytotoxicity. *Infect Imm* 73, 2602-2610.
- Garcia, A.F., Alderete, J.F., 2007. Characterization of the *Trichomonas vaginalis* surface-associated AP65 and binding domain interacting with trichomonads and host cells. *Bmc Microbiol* 7.
- Garcia, A.F., Chang, T.H., Benchimol, M., Klumpp, D.J., Lehker, M.W., Alderete, J.F., 2003. Iron and contact with host cells induce expression of adhesins on surface of *Trichomonas vaginalis*. *Mol Microbiol* 47, 1207-1224.
- Gardner, W.A., Jr., Culberson, D.E., Bennett, B.D., 1986. *Trichomonas vaginalis* in the prostate gland. *Arch Pathol Lab Med* 110, 430-432.
- Gatski, M., Kissinger, P., 2010. Observation of probable persistent, undetected *Trichomonas vaginalis* infection among HIV-positive women. *Clin Infect Dis* 51, 114-115.
- Gilani, A. U. H., & Janbaz, K. H. 1995. Preventive and curative effects of *Artemisia absinthium* on acetaminophen and CCl 4-induced hepatotoxicity. *Gen Pharm: Vasc System* 26, 309-315.

- Giordani, R.B., Araujo, D.P., Duarte, M., Zuanazzi, J.A., Tasca, T., De Almeida, M.V., 2011. Anti-protozoal activity of diamine derivatives. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 65, 60-62.
- Giordani, R.B., De Almeida, M.V., Fernandes, E., Franca da Costa, C., De Carli, G.A., Tasca, T., Zuanazzi, J.A., 2009. Anti-Trichomonas vaginalis activity of synthetic lipophilic diamine and amino alcohol derivatives. *Biomed Pharmacother* 63, 613-617.
- Gómez-Barrio, A., Martínez-Grueiro, M.M., Montero, D., Nogal, J. J., Escario, J. A., Muelas, S., Fernández, C., Vega, C., Rolón, M., Martínez-Fernández, A.R., Solis, P.N., Gupta, M. P. 2004. In vitro antiparasitic activity of plant extracts from Panama. *Pharm Biol* 42, 332-337.
- Gómez-Barrio, A., Montero-Pereira, D., Nogal-Ruiz, J.J., Escario, J.A., Muelas-Serrano, S., Kouznetsov, V.V., Mendez, L.Y.V., González, J.M.U., Ochoa, C., 2006. Antiparasitic properties of homoallylamines and related compounds. *Acta Parasitol* 51, 73-78.
- Gómez-Barrio, A., Nogal-Ruiz, J.J., Montero, D., Rodríguez-Gallego, E., Romero-Fernández, E., Escario, J.A. 2002. Biological variability in clinical isolates of Trichomonas vaginalis. *Mèmorias do Insituito Oswaldo Cruz*, 97: 893-896.
- Gonzalez, R.J., Tarloff, J.B., 2001. Evaluation of hepatic subcellular fractions for Alamar blue and MTT reductase activity. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 15, 257-259.
- Gonzalez-Coloma, A., Bailen, M., Diaz, C. E., Fraga, B. M., Martínez-Díaz, R., Zuñiga, G. E., Contreras, R.A., Cabrera, P., Burillo, J. 2012. Major components of Spanish cultivated Artemisia absinthium populations: Antifeedant, antiparasitic, and antioxidant effects. *Industrial Crops Prod*, 37, 401-407.
- Gopalkrishnan, K., Hinduja, I.N., Kumar, T.C., 1990. Semen characteristics of asymptomatic males affected by Trichomonas vaginalis. *J In Vitro Fert Embryo Transf* 7, 165-167.
- Gould, S.B., Wohele, C., Kusdian G., Lndan, G., Tachezy, J., Zimorski, V., Martin, W.F. 2013. Deep sequencing of Trichomonas vaginalis during the early infection of vaginal epithelial cells and amoeboid transition. *Int J Parasitol* 43, 707-719
- Grodstein, F., Goldman, M.B., Cramer, D.W., 1993. Relation of tubal infertility to history of sexually transmitted diseases. *Am J Epidemiol* 137, 577-584.
- Guenther, P.C., Secor, W.E., Dezzutti, C.S., 2005. Trichomonas vaginalis-induced epithelial monolayer disruption and human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) replication: Implications for the sexual transmission of HIV-1. *Infect Immun* 73, 4155-4160.
- Hegazy, M. M., El-Tantawy, N. L., Soliman, M. M., El-Sadeek, E. S., & El-Nagar, H. S. 2012. Performance of rapid immunochromatographic assay in the diagnosis of Trichomoniasis vaginalis. *Diagnostic Microbiol & Infect Dis* 74, 49-53.
- Hamid, R., Rotshteyn, Y., Rabadi, L., Parikh, R., Bullock, P., 2004. Comparison of alamar blue and MTT assays for high through-put screening. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA* 18, 703-710.
- Hampl, V., Cepicka, I., Flegr, J., Tachezy, J., Kulda, J., 2004. Critical analysis of the topology and rooting of the parabasalian 16S rRNA tree. *Mol Phylogenet Evol* 32, 711-723.
- Han, I.H., Park, S.J., Ahn, M.H., Ryu, J.S., 2012. Involvement of mast cells in inflammation induced by Trichomonas vaginalis via crosstalk with vaginal epithelial cells. *Parasite Immunol* 34, 8-14.
- Hardick, J., Yang, S., Lin, S., Duncan, D., & Gaydos, C. 2003. Use of the Roche LightCycler instrument in a real-time PCR for Trichomonas vaginalis in urine samples from females and males. *J Clin Microbiol* 41, 5619-5622.
- Harp, D.F., Chowdhury, I., 2011. Trichomoniasis: evaluation to execution. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 157, 3-9.
- Hayward-McClelland, S.F., Delgaty, K.L., Garber, G.E., 1999. Animal models of Trichomonas vaginalis infection with special emphasis on the intravaginal mouse model. *Handbook of Animal Models of Infection*, Academic Press Chapter 100, 839-850.

- Hegazy, M.M., El-Tantawy, N.L., Soliman, M.M., El-Sadeek, E.S., El-Nagar, H.S., 2012. Performance of rapid immunochromatographic assay in the diagnosis of Trichomoniasis vaginalis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 74, 49-53.
- Heisterberg, L., 1984. Placental transfer of metronidazole in the first trimester of pregnancy. *J Perinat Med* 12, 43-45.
- Helms, D.J., Mosure, D.J., Metcalf, C.A., Douglas, J.M., Malotte, C.K., Paul, S.M., Peterman, T.A., 2008a. Risk factors for prevalent and incident *Trichomonas vaginalis* among women attending three sexually transmitted disease clinics. *Sex Transm Dis* 35, 484-488.
- Helms, D.J., Mosure, D.J., Secor, W.E., Workowski, K.A., 2008b. Management of *Trichomonas vaginalis* in women with suspected metronidazole hypersensitivity. *Am J Obstet Gynecol* 198.
- Hernández-Gutiérrez, R., Avila-González, L., Ortega-López, J., Cruz-Talonia, F., Gómez-Gutierrez, G., Arroyo, R., 2004. *Trichomonas vaginalis*: characterization of a 39-kDa cysteine proteinase found in patient vaginal secretions. *Exp Parasitol* 107, 125-135.
- Hernández-Núñez, E., Tlahuext, H., Moo-Puc, R., Torres-Gomez, H., Reyes-Martinez, R., Cedillo-Rivera, R., Nava-Zuazo, C., Navarrete-Vazquez, G., 2009. Synthesis and in vitro trichomonocidal, giardicidal and amebicidal activity of N-acetamide(sulfonamide)-2-methyl-4-nitro-1H-imidazoles. *Eur J Med Chem* 44, 2975-2984.
- Hirt, R.P. 2013. *Trichomonas vaginalis* virulence factors: an integrative overview. *Sex Transm Infect*; 89: 439-443.
- Hobbs, M.M., Kazembe, P., Reed, A.W., Miller, W.C., Nkata, E., Zimba, D., Daly, C.C., Chakraborty, H., Cohen, M.S., Hoffman, I., 1999. *Trichomonas vaginalis* as a cause of urethritis in Malawian men. *Sex Transm Dis* 26, 381-387.
- Hobbs, M.M., Lapple, D.M., Lawing, L.F., Schwebke, J.R., Cohen, M.S., Swygard, H., Atashili, J., Leone, P.A., Miller, W.C., Sena, A.C., 2006. Methods for detection of *Trichomonas vaginalis* in the male partners of infected women: Implications for control of trichomoniasis. *J Clin Microbiol* 44, 3994-3999.
- Hobbs, M.M., Sena, A.C., 2013. Modern diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection. *Sex Transm Infect* 89, 434-438.
- Honigberg, B.M., Livingston, M.C., Frost, J.K., 1966. Pathogenicity of fresh isolates of *Trichomonas vaginalis*: "the mouse assay" versus clinical and pathologic findings. *Acta Cytol* 10, 353-361.
- Horváthová, L., Safarilová, L., Basler, M., Hrdý, I., Campo, N. B., Shin, J-W., Huang, K-Y., Huang, P-J., Lin, R., Tang, P., Tachezy, J., 2012. Transcriptomic identification of iron-regulated and iron-independent gene copies within the heavily duplicated *Trichomonas vaginalis* genome. *Genome Biol Evol* 4, 1017-1029.
- Hotez, P.J., 2008. Neglected Infections of Poverty in the United States of America. *Plos Neglect Trop D* 2.
- Hotez, P.J., Gurwith, M., 2011. Europe's neglected infections of poverty. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 15, e611-619.
- Hui, X., Desrivot, J., Bories, C., Loiseau, P.M., Franck, X., Hocquemiller, R., Figadère, B., 2006. Synthesis and antiprotozoal activity of some new synthetic substituted quinoxalines. *Bioorg Med Chem Lett* 16, 815-820.
- Huppert, J.S., Batteiger, B.E., Braslins, P., Feldman, J.A., Hobbs, M.M., Sankey, H.Z., Sena, A.C., Wendel, K.A., 2005. Use of an immunochromatographic assay for rapid detection of *Trichomonas vaginalis* in vaginal specimens. *J Clin Microbiol* 43, 684-687.
- Huppert, J.S., Mortensen, J.E., Reed, J.L., Kahn, J.A., Rich, K.D., Miller, W.C., Hobbs, M.M., 2007. Rapid antigen testing compares favorably with transcription-mediated amplification assay for the detection of *Trichomonas vaginalis* in young women. *Clinical Infectious Diseases* 45, 194-198.

- Ibáñez-Escribano, A., Meneses Marcel, A., Machado Tugores, Y., Nogal Ruiz, J.J., Arán Redó, V. J., Escario García-Trevijano, J.A., Gómez Barrio, A., 2012. Validation of a modified fluorimetric assay for the screening of trichomonacidal drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107, 637-643.
- Ibáñez-Escribano, A., Meneses-Marcel, A., Marrero-Ponce, Y., Nogal-Ruiz, J.J., Arán, V.J., Gómez-Barrio, A., Escario, J.A., 2014a. A sequential procedure for rapid and accurate identification of putative trichomonacidal agents. *J Microb Meth* 105, 162-167.
- Ibáñez-Escribano, A., Nogal-Ruiz, J.J., Arán, V.J., Escario, J.A., Gómez-Barrio, A., Alderete, J.F., 2014b. Determination of internal transcribed spacer regions (ITS) in *Trichomonas vaginalis* isolates and differentiation among *Trichomonas* species. *Parasitol Int* 63, 427-431.
- Ibáñez-Escribano, A., Nogal-Ruiz, J.J., Delclaux, M., Martínez-Nevado, E., Ponce-Gordo, F., 2013. Morphological and molecular identification of *Tetratrichomonas* flagellates from the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*). *Res Vet Sci* 95, 176-181.
- Ibáñez-Escribano, A., Nogal-Ruiz, J.J., Pérez-Serrano, J., Gómez-Barrio, A., Escario, J.A., Alderete, J.F., 2015a. Sequestration of Host-CD59 as Potential Immune Evasion Strategy of *Trichomonas vaginalis*. *Acta Trop* 149, 1-7
- Ibáñez-Escribano, A., Reviriego, F., Nogal-Ruiz, J.J., Meneses-Marcel, A., Gómez-Barrio, A., Escario, J.A., Arán, V.J., 2015b. Synthesis and in vitro and in vivo biological evaluation of substituted nitroquinoxalin-2-ones and 2, 3-diones as novel trichomonacidal agents. *Eur J Med Chem* 94, 276-283.
- Ings, R.M., McFadzean, J.A., Ormerod, W.E., 1974. The mode of action of metronidazole in *Trichomonas vaginalis* and other micro-organisms. *Biochem Pharmacol* 23, 1421-1429.
- Iturrino, L., Navarro, P., Rodríguez-Franco, M.I., Contreras, M., Escario, J.A., Martínez, A., Parto, M.R., 1987. Synthesis, cytostatic and trichomonacide activities of 3,5-(bis)halomethylpyrazoles. *Eur J Med Chem* 22, 445-451.
- Jayarao, P., Gogate, A., Deodhar, L., 1991. Murine pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* & its susceptibility to metronidazole. *The Indian journal of medical research* 93, 90-94.
- Johnston, V.J., Mabley, D.C., 2008. Global epidemiology and control of *Trichomonas vaginalis*. *Curr Opin Infect Dis* 21, 56-64.
- Jones, H. E., Lippman, S. A., Caiaffa-Filho, H. H., Young, T., & van de Wijgert, J. H. (2013). Performance of a rapid self-test for detection of *Trichomonas vaginalis* in South Africa and Brazil. *Journal of clinical microbiology*, 51(3), 1037-1039.
- Jongwutiwes, S., Silachamroon, U., Putaporntip, C., 2000. *Pentatrichomonas hominis* in empyema thoracis. *Royal Society Trop Med & Hyg* 94, 185-186.
- Kang, J.H., Song, H.O., Ryu, J.S., Shin, M.H., Kim, J.M., Cho, Y.S., Alderete, J.F., Ahn, M.H., Min, D.Y., 2006. *Trichomonas vaginalis* promotes apoptosis of human neutrophils by activating caspase-3 and reducing Mcl-1 expression. *Parasite Immunol* 28, 439-446.
- Karhunen, M., 1984. Placental transfer of metronidazole and tinidazole in early human pregnancy after a single infusion. *Br J Clin Pharmacol* 18, 254-257.
- Katiyar, S.K., Visvesvara, G.S., Edlind, T.D., 1995. Comparisons of Ribosomal-RNA sequences from amitochondrial protozoa - Implications for processing, mRNA binding and paromomycin susceptibility. *Gene* 152, 27-33.
- Kelder, J., Grootenhuis, P.D., Bayada, D.M., Delbressine, L.P., Ploemen, J.P., 1999. Polar molecular surface as a dominating determinant for oral absorption and brain penetration of drugs. *Pharm Res* 16, 1514-1519.
- Khoshnan, A., Alderete, J.F., 1993. Multiple double-stranded RNA segments are associated with virus-particles infecting *Trichomonas vaginalis*. *J Virol* 67, 6950-6955.
- Khoshnan, A., Alderete, J.F., 1994. *Trichomonas vaginalis* with a double-stranded-RNA virus has up-regulated levels of phenotypically variable immunogen mRNA. *J Virol* 68, 4035-4038.
- Kim, Y.S., Song, H.O., Choi, I.H., Park, S.J., Ryu, J.S., 2006. Hydrogenosomal activity of *Trichomonas vaginalis* cultivated under different iron conditions. *Korean J Parasitol* 44, 373-378.

- Kingston, M.A., Bansal, D., Carlin, E.M., 2003. 'Shelf life' of *Trichomonas vaginalis*. *Int J Std Aids* 14, 28-29.
- Kirkcaldy, R.D., Augostini, P., Asbel, L.E., Bernstein, K.T., Kerani, R.P., Mettenbricnk, C.J., Pathela, P., Schwebke, J.R., Secor, W.E., Workowski, K.A., Davis, D., Braxton, J-. Weinstock, H.S. 2012. *Trichomonas vaginalis* antimicrobial drug resistance in G US Cities, STD Surveillance Network, 2009-2010. *Emerg Infect Dis* 18, 939-943.
- Kissinger, P., Adamski, A., 2013. Trichomoniasis and HIV interactions: a review. *Sex Transm Infect* 89, 426-433.
- Kissinger, P., Amedee, A., Clark, R.A., Dumestre, J., Theall, K.P., Myers, L., Hagensee, M.E., Farley, T.A., Martin, D.H., 2009. *Trichomonas vaginalis* treatment reduces vaginal HIV-1 shedding. *Sex Transm Dis* 36, 11-16.
- Kissinger, P., Secor, W.E., Leichter, J.S., Clark, R.A., Schmidt, N., Curtin, E., Martin, D.H., 2008. Early repeated infections with *Trichomonas vaginalis* among HIV-positive and HIV-negative women. *Clinical Infectious Diseases* 46, 994-999.
- Klebanoff, M.A., Carey, J.C., Hauth, J.C., Hillier, S.L., Nugent, R.P., Thom, E.A., Ernest, J.M., Heine, R.P., Wapner, R.J., Trout, W., Moawad, A., Leveno, K.J., Miodovnik, M., Sibai, B.M., Van Dorsten, J.P., Dombrowski, M.P., O'Sullivan, M.J., Varner, M., Langer, O., McNellis, D., Roberts, J.M., 2001. Failure of metronidazole to prevent preterm delivery among pregnant women with asymptomatic *Trichomonas vaginalis* infection. *The New England journal of medicine* 345, 487-493.
- Kleina, P., Bettim-Bandinelli, J., Bonatto, S.L., Benchimol, M., & Bogo, M.R., 2004. Molecular phylogeny of *Trichomonadidae* family inferred from ITS-1, 5.8 S rRNA and ITS-2 sequences. *Int J Parasitol* 34, 963-970.
- Knox, R.J., Knight, R.C., Edwards, D.I., 1981. Interaction of nitroimidazole drugs with DNA in vitro: structure-activity relationships. *Br J Cancer* 44, 741-745.
- Kouznetsov, V. V., Vargas Méndez, L. Y., Tibaduiza, B., Ochoa, C., Montero Pereira, D., Nogal Ruiz, J. J., Fernández Portillo, C., Muelas Serrano, S., Gómez Barrio, A., Bahsas, A., Amaro-Luis, J. 2004. 4-Aryl (benzyl) amino-4-heteroarylbut-1-enes as Building Blocks in Heterocyclic Synthesis. 4.1 Synthesis of 4, 6-Dimethyl-5-nitro (amino)-2-pyridylquinolines and their Antiparasitic Activities. *Archiv der Pharmazie* 337, 127-132.
- Kouznetsov, V.V., Rivero Castro, J., Ochoa Puentes, C., Stashenko, E.E., Martinez, J.R., Ochoa, C., Montero Pereira, D., Nogal Ruiz, J.J., Portillo, C.F., Muelas Serrano, S., Gómez Barrio, A., Bahsas, A., Amaro-Luis, J., 2005. Synthesis and antiparasitic properties of new 4-N-benzylamino-4-hetarylbut-1-enes. *Arch Pharm* 338, 32-37.
- Krieger, J.N., Poisson, M.A., Rein, M.F., 1981. Identification of beta-hemolytic activity in *Trichomonas vaginalis* which correlates with virulence. *Clin Res* 29, A836-A836.
- Krieger, J.N., Rein, M.F., 1982. Zinc sensitivity of *Trichomonas vaginalis* - In vitro studies and clinical implications. *J Infect Dis* 146, 341-345.
- Kucknoor, A.S., Mundodi, V., Alderete, J.F., 2007. The proteins secreted by *Trichomonas vaginalis* and vaginal epithelial cell response to secreted and episomally expressed AP65. *Cell Microbiol* 9, 2586-2597.
- Kuczynska, K., Choromanski, L., Honigberg, B.M., 1984. Comparison of virulence of clones of two *Trichomonas vaginalis* strains by the subcutaneous mouse assay. *Zeitschrift fur Parasitenkunde* 70, 141-146.
- Kulda, J., 1990. Employment of experimental animals in studies of *Trichomonas vaginalis* infection. In *Trichomonads Parasitic in Humans*. Honigberg B.M. Ed., Springer-Verlag, New York, 246-273.
- Kulda, J., Hrdy, I., 2008. Hydrogenosome: The site of 5-nitroimidazole activation and resistance. In: *Hydrogenosomes and mitosomes: Mitochondria of anaerobic eukaryotes*. Editor: Han Tachezy. *Microbiology Monographs*. Ed: Springer., 179-200.
- Kulda, J., Tachezy, J., Cerkasovova, A., 1993. In vitro induced anaerobic resistance to metronidazole in *Trichomonas vaginalis*. *J Eukaryot Microbiol* 40, 262-269.

- Kumar, L., Jain, A., Lal, N., Sarswat, A., Jangir, S., Kumar, S., Singh, V., Shah, P., Jain, S.K., Maikhuri, J.P., Siddiqi, M.I., Gupta, G., Sharma, V.L., 2012a. Potentiating metronidazole scaffold against resistant *Trichomonas*: Design, synthesis, biology and 3D-QSAR analysis. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 3, 83-87.
- Kumar, L., Jain, A., Lal, N., Sarswat, A., Jangir, S., Singh, V., Shah, P., Jain, S.K., Maikhuri, J.P., Siddiqi, M.I., Gupta, G., Sharma, V.L., 2012b. Potentiating metronidazole scaffold against resistant *Trichomonas*: Design, synthesis, biology and 3D-QSAR analysis. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 3, 83-87.
- Kummer, S., Hayes, G.R., Gilbert, R.O., Beach, D.H., Lucas, J.J., Singh, B.N., 2008. Induction of human host cell apoptosis by *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases is modulated by parasite exposure to iron. *Microb Pathog* 44, 197-203.
- Laga, M., Manoka, A., Kivuvu, M., Malele, B., Tuliza, M., Nzila, N., Goeman, J., Behets, F., Batter, V., Alary, M., et al., 1993. Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *Aids* 7, 95-102.
- Land, K.M., Delgadillo-Correa, M.G., Tachezy, J., Vanacova, S., Hsieh, C.L., Sutak, R., Johnson, P.J., 2004. Targeted gene replacement of a ferredoxin gene in *Trichomonas vaginalis* does not lead to metronidazole resistance. *Mol Microbiol* 51, 115-122.
- Lawing, L.F., Hedges, S.R., Schwebke, J.R., 2000. Detection of trichomonosis in vaginal and urine specimens from women by culture and PCR. *J Clin Microbiol* 38, 3585-3588.
- Lazenby, G.B., Taylor, P.T., Badman, B.S., McHaki, E., Korte, J.E., Soper, D.E., Young Pierce, J., 2014. An association between *Trichomonas vaginalis* and high-risk human papillomavirus in rural Tanzanian women undergoing cervical cancer screening. *Clin Ther* 36, 38-45.
- Lee, J.J., Moon, H.S., Lee, T.C., Hwang, H.S., Ahn, M.-H., Ryu, J.-S., 2012. PCR for diagnosis of male *Trichomonas vaginalis* infection with chronic prostatitis and urethritis. *Korean journal of parasitology* 50, 157-159.
- Leeson, P.D., Springthorpe, B., 2007. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nat Rev Drug Discov* 6, 881-890.
- Lehker, M.W., Alderete, J.F., 1992. Iron regulates growth of *Trichomonas vaginalis* and the expression of immunogenic trichomonad proteins. *Mol Microbiol* 6, 123-132.
- Lehker, M.W., Arroyo, R., Alderete, J.F., 1991. The regulation by iron of the synthesis of adhesins and cytoadherence levels in the protozoan *Trichomonas vaginalis*. *J Exp Med* 174, 311-318.
- Lehker, M.W., Chang, T.H., Dailey, D.C., Alderete, J.F., 1990. Specific erythrocyte binding is an additional nutrient acquisition system for *Trichomonas vaginalis*. *J Exp Med* 171, 2165-2170.
- Lehker, M.W., Sweeney, D., 1999. Trichomonad invasion of the mucous layer requires adhesins, mucinases, and motility. *Sex Transm Infect* 75, 231-238.
- Leitsch, D., Kolarich, D., Binder, M., Stadlmann, J., Altmann, F., Duchene, M., 2009. *Trichomonas vaginalis*: metronidazole and other nitroimidazole drugs are reduced by the flavin enzyme thioredoxin reductase and disrupt the cellular redox system. Implications for nitroimidazole toxicity and resistance. *Mol Microbiol* 72, 518-536.
- Leitsch, D., Kolarich, D., Duchene, M., 2010. The flavin inhibitor diphenyleneiodonium renders *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole, inhibits thioredoxin reductase and flavin reductase, and shuts off hydrogenosomal enzymatic pathways. *Mol Biochem Parasitol* 171, 17-24.
- Lennox Thorburn, A., 1974. Alfred François Donné, 1801-1878, discoverer of *Trichomonas vaginalis* and of leukaemia.
- Leterrier, M., Morio, F., Renard, B., Poirier, A.S., Miegerville, M., Chambreuil, G., 2012. Trichomonads in pleural effusion: case report, literature review and utility of PCR for species identification. *Microbiologia-Quarterly J Microbiol Sciences* 35, 83.
- Lewis, D., 2014. Trichomoniasis. *Medicine* 42.
- Lindmark, D.G., Muller, M., 1976. Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. *Antimicrob Agents Chemother* 10, 476-482.

- Lipinski, C. A. (2004). Lead-and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1(4), 337-341.
- Lipinski, C.A., Lombardo, F., Dominy, B.W., Feeney, P.J., 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev* 46, 3-26.
- Liu, H.W., Chu, Y.D., Tai, J.H., 1998. Characterization of *Trichomonas vaginalis* virus proteins in the pathogenic protozoan *T. vaginalis*. *Arch Virol* 143, 963-970.
- López-Escamilla, E., Sanchez-Aguillon, F., Alatorre-Fernandez, C.P., Aguilar-Zapata, D., Arroyo-Escalante, S., Arellano, T., Mocada-Barron, D., Romero-Valdovinos, M., Martinez-Hernandez, F., Rodriguez-Zulueta, P., Maravilla, P., 2013. New *Tetratrichomonas* species in two patients with pleural empyema. *J Clin Microbiol* 51, 3143-3146.
- Lu, Y., Cai, Z., Galson, D.L., Xiao, G., Liu, Y., George, D.E., Melhem, M.F., Yao, Z., Zhang, J., 2006. Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) acts as a paracrine and autocrine factor for prostate cancer growth and invasion. *The Prostate* 66, 1311-1318.
- Lubick, K.J., Burgess, D.E., 2004. Purification and analysis of a phospholipase A2-like lytic factor of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 72, 1284-1290.
- Lushbaugh, W.B., Blossom, A.C., Shah, P.H., Banga, A.K., Jaynes, J.M., Cleary, J.D., Finley, R.W., 2000. Use of intravaginal microbicides to prevent acquisition of *Trichomonas vaginalis* infection in *Lactobacillus*-pretreated, estrogenized young mice. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 63, 284-289.
- Alho, M. A. M., Marrero-Ponce, Y., Barigye, S. J., Meneses-Marcel, A., Machado Tugores, Y., Montero-Torres, A., Gómez-Barrio, A., Nogal-Ruiz, J.J., García Sánchez, R.N., Vega, M.C.M Rolón, M., Martínez-Fernández, A.R., Escario, J.A., Pérez-Giménez, F., García-Domenech, R., Rivera, N., Mondragón, R., Ibarra-Velarde, F., Lopez-Arencibia, A., Martín-Navarro, C., Lorenzo-Morales, J., Cabrera-Serra, M.G., Piñero, J., Ttgat, J., Chicharro, R., Arán, V. J. 2014. Antiprotozoan lead discovery by aligning dry and wet screening: Prediction, synthesis, and biological assay of novel quinoxalinones. *Bioorg Med Chem* 22, 1568-1585.
- MacNeill, C., Umstead, T.M., Phelps, D.S., Lin, Z., Floros, J., Shearer, D.A., Weisz, J., 2004. Surfactant protein A, an innate immune factor, is expressed in the vaginal mucosa and is present in vaginal lavage fluid. *Immunology* 111, 91-99.
- Malagoli, M., Rossi, T., Baggio, A., Zandomenighi, G., Zanca, A., Casolari, C., Castelli, M., 2002. 'In vitro' study of chemotherapeutic activity of sulphimidazole on some sensitive and metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* strains. *Pharmacol Res* 46, 469-472.
- Malik, S. B., Pightling, A. W., Stefaniak, L. M., Schurko, A. M., & Logsdon Jr, J. M. 2008. An expanded inventory of conserved meiotic genes provides evidence for sex in *Trichomonas vaginalis*. *PloS one*, 3, e2879-e2879.
- Mannisto, P., Karhunen, M., Mattila, J., Koskela, O., Suikkari, A.M., Heinonen, P., Tuimala, R., Haataja, H., 1984. Concentrations of metronidazole and tinidazole in female reproductive organs after a single intravenous infusion and after repeated oral administration. *Infection* 12, 197-201.
- Mantini, C., Souppart, L., Noël, C., Duong, T. H., Mornet, M., Carroger, G., Dupont, P., Masseret, E., Goustille, J., Capron, M., Duboucher, C., Dei-Cas, E., Viscogliosi, E., 2009. Molecular characterization of a new *Tetratrichomonas* species in a patient with empyema. *J Clin Microbiol* 47, 2336-2339.
- Marrero-Ponce, Y., Meneses-Marcel, A., Rivera-Borroto, O.M., García-Domenech, R., de Julián-Ortiz, J.V., Montero, A., Escario, J.A., Gómez Barrio, A., Montero Pereira, D., Nogal, J.J., Grau, R., Torrens, F., Vogel, C., Arán, V.J., 2008. Bond-based linear indices in QSAR: computational discovery of novel anti-trichomonal compounds, *J. Comput.-Aided Mol. Des.* 22, 523-540.
- Marrero-Ponce, Y., Castillo-Garit, J. A., Torrens, F., Zaldivar, V. R., & Castro, E. A. 2004. Atom, atom-type, and total linear indices of the "molecular pseudograph's atom adjacency matrix": application to QSPR/QSAR studies of organic compounds. *Molecules* 9, 1100-1123.
- Marrero-Ponce, Y., Meneses-Marcel, A., Castillo-Garit, J.A., Machado-Tugores, Y., Escario, J.A., Gómez Barrio, A., Montero Pereira, D., Nogal-Ruiz, J.J., Arán, V.J., Martínez-Fernández, A.R., Torrens,

- F., Rotondo, R., Ibarra-Velarde, F., Alvarado, Y.J. 2006. Predicting antitrichomonal activity: a computational screening using atom-based bilinear indices and experimental proofs. *Bioorg Med Chem* 14, 6502–6524.
- Marrero-Ponce, Y., Valdés Martini, J.R., Silveira Vaz'd Almeida, Y., 2012. TOMOCOMD (TOpological Molecular COMputer Design) for Windows. Universidad Central de las Villas Version 2.0.
- Marrero-Ponce, Y., Machado-Tugores, Y., Montero-Pereira, D., Escario, J.A., Gómez Barrio, A., Nogal, J.J., Ochoa, C., Arán, V.J., Martínez-Fernández, A.R., García Sánchez, R.N., Montero-Torres, A., Torrens, F., Meneses-Marcel, A., 2005. A computer-based approach to the rational discovery of new trichomonacidal drugs by atom-type linear indices. *Curr. Drug Discov. Technol.* 2, 245–265.
- Martínez-Grueiro, M., Giménez-Pardo, C., Gómez-Barrio, A., Franck, X., Fournet, A., Hocquemiller, R., Figadere, B., Casado-Escribano, N., 2005. Nematocidal and trichomonacidal activities of 2-substituted quinolines. *Il Farmaco* 60, 219-224.
- Martínez-Grueiro, M.M., Montero-Pereira, D., Giménez-Pardo, C., Nogal-Ruiz, J.J., Escario, J.A., Gómez-Barrio, A. 2003. *Trichomonas vaginalis*: Determination of acid phosphatase activity as a pharmacological screening procedure. *J Parasitol* 89, 1076-1077.
- Mayta, H., R. H. Gilman, et al. 2000. 18S ribosomal DNA-based PCR for diagnosis of *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 38, 2683-2687.
- McClelland, R. S. 2008. *Trichomonas vaginalis* infection: can we afford to do nothing?. *J Infect Dis* 197, 487-489.
- McClelland, R.S., Sangare, L., Hassan, W.M., Lavreys, L., Mandaliya, K., Kiarie, J., Ndinya-Achola, J., Jaoko, W., Baeten, J.M., 2007. Infection with *Trichomonas vaginalis* increases the risk of HIV-1 acquisition. *J Infect Dis* 195, 698-702.
- McGrory, T., Garber, G.E., 1992. Mouse intravaginal infection with *Trichomonas vaginalis* and role of *Lactobacillus acidophilus* in sustaining infection. *Infect Immun* 60, 2375-2379.
- Meade, J.C., de Mestral, J., Stiles, J.K., Secor, W.E., Finley, R.W., Cleary, J.D., Lushbaugh, W.B., 2009. Genetic Diversity of *Trichomonas vaginalis* Clinical Isolates Determined by EcoRI Restriction Fragment Length Polymorphism of Heat-Shock Protein 70 Genes. *Am J Trop Med Hyg* 80, 245-251.
- Meingassner, J.G., Georgopoulos, A., Patoschka, M., 1975. [Intravaginal infection of the rat with *Trichomonas vaginalis* and *Candida albicans*. An experimental model for chemotherapy (author's transl)]. *Tropenmed Parasitol* 26, 395-398.
- Meingassner, J.G., Havelec, L., Mieth, H., 1978. Studies on strain sensitivity of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole. *Br J Vener Dis* 54, 72-76.
- Meingassner, J.G., Thurner, J., 1979. Strain of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole and other 5-nitroimidazoles. *Antimicrob Agents Chemother* 15, 254-257.
- Mendoza-Lopez, M.R., Becerril-Garcia, C., Fattel-Facenda, L.V., Avila-Gonzalez, L., Ruiz-Tachiquin, M.E., Ortega-Lopez, J., Arroyo, R., 2000. CP30, a cysteine proteinase involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Infect Immun* 68, 4907-4912.
- Meneses Gómez, M., Cedré Gutiérrez, D. 2013. Ambiente para la búsqueda de combinaciones de modelos bases en multclasificadores de Quimio-Bioinformática. Trabajo de Licenciatura en Ciencias de la Computación. Universidad Central "Marta Abre" de las Villas.
- Meneses Marcel, A. 2006. Identificación in silico y experimental de nuevas entidades moleculares activas frente a *Trichomonas vaginalis*. TESIS DOCTORAL. Universidad Complutense de Madrid.
- Meneses-Marcel, A., Rivera-Borroto, O.M., Marrero-Ponce, Y., Montero, A., Machado Tugores, Y., Escario, J. A., Gómez Barrio, A., Montero Pereira, D., Nogal Ruiz, J.J., Koznetsov, V.V., Ochoa Puentes, C., Bohorquez, A.R., Grau, R., Torrens, F., Ibarra.Velarde, F., Arán, V. J., 2008. New antitrichomonal drug-like chemicals selected by bond (edge)-based TOMOCOMD-CARDD descriptors. *J Biomol Screen* 13, 785-794.

- Meneses-Marcel, A., Rivera-Borroto, O.M., Marrero-Ponce, Y., Montero, A., Machado Tugores, Y., Escario, J.A., Gomez Barrio, A., Montero Pereira, D., Nogal, J.J., Kouznetsov, V.V., Ochoa Puentes, C., Bohorquez, A.R., Grau, R., Torrens, F., Ibarra-Velarde, F., Aran, V.J., 2008. New antitrichomonal drug-like chemicals selected by bond (edge)-based TOMOCOMD-CARDD descriptors. *J Biomol Screen* 13, 785-794.
- Meri, S., Lehto, T., Sutton, C.W., Tyynela, J., Buamann, M. 1996. Structural composition and functional characterization of soluble CD59: heterogeneity of the oligosaccharide and glycoposphoinositol (GPI) anchor revealed by laser-desorption mass spectrometric analysis. *Biochemical journal*, 316: 923-935.
- Meri, T., Jokiranta, T.S., Suhonen, L., Meri, S., 2000. Resistance of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole: Report of the first three cases from Finland and optimization of in vitro susceptibility testing under various oxygen concentrations. *J Clin Microbiol* 38, 763-767.
- Mestecky, J., Fultz, P.N., 1999. Mucosal immune system of the human genital tract. *The Journal of infectious diseases* 179 Suppl 3, S470-474.
- Meysick, K.C., Dimock, K., Garber, G.E., 1996. Molecular characterization and expression of a N-acetylneuraminidase lyase gene from *Trichomonas vaginalis*. *Mol Biochem Parasitol* 76, 289-292.
- Meysick, K.C., Garber, G.E., 1992. Interactions between *Trichomonas vaginalis* and vaginal flora in a mouse model. *The Journal of parasitology* 78, 157-160.
- Midlej, V., Benchimol, M., 2010. *Trichomonas vaginalis* kills and eats--evidence for phagocytic activity as a cytopathic effect. *Parasitology* 137, 65-76.
- Miller, W.C., Swygard, H., Hobbs, M.M., Ford, C.A., Handcock, M.S., Morris, M., Schmitz, J.L., Cohen, M.S., Harris, K.M., Udry, J.R., 2005. The prevalence of trichomoniasis in young adults in the United States. *Sex Transm Dis* 32, 593-598.
- Mitteregger, D., Aberle, S.W., Makristathis, A., Walochnik, J., Brozek, W., Marberger, M., Kramer, G., 2012. High detection rate of *Trichomonas vaginalis* in benign hyperplastic prostatic tissue. *Med Microbiol Immunol* 201, 113-116.
- Mo, C., Yamagata, R., Pan, A., Reddy, J., Hazari, N., Duke, D. 2008. Development of a high-throughput Alamar blue assay for the determination of influenza virus infectious dose, serum antiviral neutralization titer and virus *ca/ts* phenotype. *Journal of virological methods*. 150: 63-69.
- Moodley, P., Wilkinson, D., Connolly, C., Moodley, J., Sturm, A.W., 2002. *Trichomonas vaginalis* is associated with pelvic inflammatory disease in women infected with human immunodeficiency virus. *Clinical Infectious Diseases* 34, 519-522.
- Moon, T., Chai, M.H., Kim, D-H., Yoon C.N., Choi, Y-S., 2000. Quantitative structure-activity relationships (WSAR) study of flavonoid derivatives for inhibition of cytochrome P450 1A2. *Mol Informatics* 19, 257-263.
- Morada, M., Manzur, M., Lam, B., Tan, C., Tachezy, J., Rappelli, P., Dessi, D., Fiori, P.L. Tachezy, J., Yarlett, N. 2010. Arginine metabolism in *Trichomonas vaginalis* infected with *Mycoplasma hominis*. *Microbiol* 156, 3734-3743.
- Moreno, S.N., Docampo, R., 1985. Mechanism of toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of trichomoniasis. *Environ Health Persp* 64, 199-208.
- Moreno-Brito, V., Yanez-Gomez, C., Meza-Cervantez, P., Avila-Gonzalez, L., Rodriguez, M.A., Ortega-Lopez, J., Gonzalez-Robles, A., Arroyo, R., 2005. A *Trichomonas vaginalis* 120 kDa protein with identity to hydrogenosome pyruvate : ferredoxin oxidoreductase is a surface adhesin induced by iron. *Cell Microbiol* 7, 245-258.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63.
- Muelas-Serrano, S., Nogal, J. J., Martinez-Diaz, R. A., Escario, J. A., Martinez-Fernández, A. R., Gómez-Barrio, A. 2000. In vitro screening of American plant extracts on *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. *J Ethnopharm* 71, 101-107.
- Muller, M., Lossick, J.G., Gorrel, T., 1988. In vitro susceptibility of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole and treatment outcome in vaginal trichomoniasis. *Sex Transm Dis* 15, 17-24.

Muller, M., Lindmark, D.G., 1976. Uptake of metronidazole and its effect on viability in trichomonads and *Entamoeba invadens* under anaerobic and aerobic conditions. *Antimicrob Agents Chemother* 9, 696-700.

Müller, M., Mentel, M., van Hellemond, J.J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S.B., Yu, R.-Y., van der Giezen, M., Tielens, A.G.M., Martin, W.F. 2012. Biochemistry and evolution of anaerobic energy metabolism in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 76, 444-495.

Narcisi, E.M., Secor, W.E., 1996. In vitro effect of tinidazole and furazolidone on metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Antimicrob Agents Chemother* 40, 1121-1125.

Natto, M.J., Savioli, F., Quashie, N.B., Dardonville, C., Rodenko, B., de Koning, H.P., 2012. Validation of novel fluorescence assays for the routine screening of drug susceptibilities of *Trichomonas vaginalis*. *J Antimicrob Chemother* 67, 933-943.

Navarrete-Vazquez, G., Chavez-Silva, F., Argotte-Ramos, R., Rodriguez-Gutierrez, M.C., Chan-Bacab, M.J., Cedillo-Rivera, R., Moo-Puc, R., Hernandez-Nunez, E., 2011. Synthesis of benzologues of Nitazoxanide and Tizoxanide: a comparative study of their in vitro broad-spectrum antiprotozoal activity. *Bioorg Med Chem Lett* 21, 3168-3171.

Navarrete-Vazquez, G., Yopez, L., Hernandez-Campos, A., Tapia, A., Hernandez-Luis, F., Cedillo, R., Gonzalez, J., Martinez-Fernandez, A., Martinez-Grueiro, M., Castillo, R., 2003. Synthesis and antiparasitic activity of albendazole and mebendazole analogues. *Bioorgan Med Chem* 11, 4615-4622.

Nava-Zuazo, C., Estrada-Soto, S., Guerrero-Álvarez, J., León-Rivera, I., Molina-Salinas, G.M., Said-Fernández, S., Chan-Bacab, M.J., Cedillo-Rivera, R., Moo-Puc, R., Mirón-López, G., Navarrete-Vazquez, G., 2010. Design, synthesis, and in vitro antiprotozoal, antimycobacterial activities of N-{2-[(7-chloroquinolin-4-yl)amino]ethyl}ureas. *Bioorgan Med Chem* 18, 6398-6403.

Neace, C.J., Alderete, J.F., 2013. Epitopes of the highly immunogenic *Trichomonas vaginalis* alpha-actinin are serodiagnostic targets for both women and men. *J Clin Microbiol* 51, 2483-2490.

Neale, K.A., Alderete, J.F., 1990. Analysis of the proteinases of representative *Trichomonas vaginalis* isolates. *Infect Immun* 58, 157-162.

Nelson, W.G., De Marzo, A.M., DeWeese, T.L., Isaacs, W.B., 2004. The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. *The Journal of urology* 172, S6-11; discussion S11-12.

Newton, W.L., Reardon, L.V., Deleva, A.M., 1960. A comparative study of the subcutaneous inoculation of germfree and conventional guinea pigs with two strains of *Trichomonas vaginalis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 9, 56-61.

Nöel, J.C., Fayt, I., Romero Munoz, M.R., Simon, P., Engohan-Aloghe, C., 2010. High prevalence of high-risk human papillomavirus infection among women with *Trichomonas vaginalis* infection on monolayer cytology. *Arch Gynecol Obstet* 282, 503-505.

Nogal-Ruiz, J.J., Escario, J.A., Martínez-Díaz, R.A., Gómez-Barrio, A., 1997. Evaluation of a murine model of experimental trichomoniasis. *Parasite* 4, 127-132.

Nogal-Ruiz, J.J., Gómez-Barrio, A., Escario, J.A., Martínez-Fernández, A.R., 2003a. Effect of Anapso in a murine model of experimental trichomoniasis. *Parasite* 10, 303-308.

Nogal-Ruiz, J.J., Gómez-Barrio, A., Escario, J.A., Martínez-Fernández, A.R., 2003b. Modulation by *Polypodium leucotomos* extract of cytokine patterns in experimental trichomoniasis model. *Parasite* 10, 73-78.

Nye, M.B., Schwebke, J.R., Body, B.A., 2009. Comparison of APTIMA *Trichomonas vaginalis* transcription-mediated amplification to wet mount microscopy, culture, and polymerase chain reaction for diagnosis of trichomoniasis in men and women. *Am J Obstet Gynecol* 200.

Nyirjesy, P., Gilbert, J., Mulcahy, L.J., 2011. Resistant trichomoniasis: successful treatment with combination therapy. *Sex Transm Dis* 38, 962-963.

Rivera-Borroto, O.M., Marrero-Ponce, Y., Meneses-Marcel, A., Escario, J.A., Gomez Barrio, A., Arán, V.J., Martins Alho, M., Montero Pereira, D., Nogal, J.J., Torrens, F., Ibarra-Velarde, F., Montenegro, Y.V., Huesca-Guillen, Y., Rivera, N., Vogel, C. 2009. Discovery of novel trichomonacids

using LDA-driven QSAR models and bond-based bilinear indices as molecular descriptors, QSAR Comb. Sci. 28 9-26.

O'Brien, J.L., Lauriano, C.M., Alderete, J.F., 1996. Molecular characterization of a third malic enzyme-like AP65 adhesin gene of *Trichomonas vaginalis*. *Microb Pathogenesis* 20, 335-349.

O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T., Pognan, F., 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *European journal of biochemistry / FEBS* 267, 5421-5426.

Oetting, W.S., Lee, H.K., Flanders, D. J., Wiesner, G.L., Sellers, T.A., King, R.A., 1995. Linkage analysis with multiplexed short tandem repeat polymorphisms using infrared fluorescence and M13 tailed primers. *Genomics* 30, 450-458.

Okumura, C.Y., Baum, L.G., Johnson, P.J., 2008. Galectin-1 on cervical epithelial cells is a receptor for the sexually transmitted human parasite *Trichomonas vaginalis*. *Cell Microbiol* 10, 2078-2090.

OMS, 2005a. Guías para el tratamiento de las infecciones de transmisión sexual. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza.

Ouellette, M., Drummelsmith, J., Papadopoulou, B., 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* 7, 257-266.

Owusu-Edusei, K., Jr., Chesson, H.W., Gift, T.L., Tao, G., Mahajan, R., Ocfemia, M.C., Kent, C.K., 2013. The estimated direct medical cost of selected sexually transmitted infections in the United States, 2008. *Sex Transm Dis* 40, 197-201.

Padilla-Vaca, F., Anaya-Velázquez, F., 1997. Biochemical properties of a neuraminidase of *Trichomonas vaginalis*. *J Parasitol* 83, 1001-1006.

Pal, D., Banerjee, S., Cui, J., Schwartz, A., Ghosh, S.K., Samuelson, J., 2009. Giardia, Entamoeba, and Trichomonas enzymes activate metronidazole (nitroreductases) and inactivate metronidazole (nitroimidazole reductases). *Antimicrob Agents Chemother* 53, 458-464.

Palomino, J. C., Martin, A., Camacho, M., Guerra, H., Swings, J., & Portaels, F. (2002). Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 46(8), 2720-2722.

Pastorek, J.G., 2nd, Cotch, M.F., Martin, D.H., Eschenbach, D.A., 1996. Clinical and microbiological correlates of vaginal trichomoniasis during pregnancy. The vaginal infections and prematurity study group. *Clin Infect Dis* 23, 1075-1080.

Pereira-Neves, A., Benchimol, M., 2007. Phagocytosis by *Trichomonas vaginalis*: new insights. *Biol Cell* 99, 87-101.

Pereira-Neves, A., Ribeiro, K.C., Benchimol, M., 2003. Pseudocysts in Trichomonads – New insights. *Protist* 154, 313-329.

Perez, S., Fernandez-Verdugo, A., Perez, F., Vazquez, F., 2001. Prevalence of 5-nitroimidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* in Oviedo, Spain. *Sex Transm Dis* 28, 115-116.

Perez-Villanueva, J., Santos, R., Hernandez-Campos, A., Giulianotti, M.A., Castillo, R., Medina-Franco, J.L., 2010. Towards a systematic characterization of the antiprotozoal activity landscape of benzimidazole derivatives. *Bioorgan Med Chem* 18, 7380-7391.

Peterson, K.M., Alderete, J.F., 1982. Host plasma proteins on the surface of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 37, 755-762.

Peterson, K.M., Alderete, J.F., 1983. Acquisition of alpha 1-Antitrypsin by a pathogenic strain of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 40, 640-646.

Petrin, D., Delgaty, K., Bhatt, R., Garber, G., 1998. Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin Microbiol Rev* 11, 300-317.

Pillay, A., Lewis, J., Ballard, R.C., 2004. Evaluation of Xenostrip-Tv, a rapid diagnostic test for *Trichomonas vaginalis* infection. *J Clin Microbiol* 42, 3853-3856.

Pillay, D.G., Hoosen, A.A., Vezi, B., Moodley, C., 1994. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* in male urethritis. *Trop Geogr Med* 46, 44-45.

- Pindak, F.F., Depindak, M.M., Hyde, B.M., Gardner, W.A., 1989. Acquisition and retention of viruses by *Trichomonas vaginalis*. *Genitourin Med* 65, 366-371.
- Pink, R., Hudson, A., Mouriès, M-A., Bendig, M. 2005. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature Rev Drug Dis* 4, 727-740.
- Piper, J.M., Mitchel, E.F., Ray, W.A., 1993. Prenatal use of metronidazole and birth defects: no association. *Obstet Gynecol* 82, 348-352.
- Piskin, G., Mekkes, J.R., 2006. Stevens-Johnson syndrome from metronidazole. *Contact Dermatitis* 55, 192-193.
- Poole, D.N., McClelland, R.S., 2013. Global epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. *Sex Transm Infect* 89, 418-422.
- Price, M.A., Zimba, D., Hoffman, I.F., Kaydos-Daniels, S.C., Miller, W.C., Martinson, F., Chilongozi, D., Kip, E., Msowoya, E., Hobbs, M.M., Kazembe, P.N., Cohen, M.S., 2003. Addition of treatment for trichomoniasis to syndromic management of urethritis in Malawi: A randomized clinical trial. *Sex Transm Dis* 30, 516-522.
- Provenzano, D., Alderete, J.F., 1995. Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 63, 3388-3395.
- Provenzano, D., Khoshnan, A., Alderete, J.F., 1997. Involvement of dsRNA virus in the protein composition and growth kinetics of host *Trichomonas vaginalis*. *Arch Virol* 142, 939-952.
- Quinlivan, E.B., Patel, S.N., Grodensky, C.A., Golin, C.E., Tien, H.C., Hobbs, M.M., 2012. Modeling the impact of *Trichomonas vaginalis* infection on HIV transmission in HIV-infected individuals in medical care. *Sex Transm Dis* 39, 671-677.
- Quon, D.V., d'Oliveira, C.E., Johnson, P.J., 1992. Reduced transcription of the ferredoxin gene in metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *P Natl Acad Sci USA* 89, 4402-4406.
- Radonjic, I.V., Dzamic, A.M., Mitrovic, S.M., Arsic Arsenijevic, V.S., Popadic, D.M., Kranjcic Zec, I.F., 2006. Diagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection: The sensitivities and specificities of microscopy, culture and PCR assay. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 126, 116-120.
- Rappelli, P., Carta, F., Delogu, G., Addis, M.F., Dessi, D., Cappuccinelli, P., Fiori, P.L., 2001. *Mycoplasma hominis* and *Trichomonas vaginalis* symbiosis: multiplicity of infection and transmissibility of M-hominis to human cells. *Arch Microbiol* 175, 70-74.
- Rasoloson, D., Tomkova, E., Cammack, R., Kulda, J., Tachezy, J., 2001. Metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis* display increased susceptibility to oxygen. *Parasitology* 123, 45-56.
- Rathelot, P., Azas, N., El-Kashef, H., Delmas, F., Di Giorgio, C., Timon-David, P., Maldonado, J., Vanelle, P., 2002. 1,3-Diphenylpyrazoles: synthesis and antiparasitic activities of azomethine derivatives. *Eur J Med Chem* 37, 671-679.
- Rendon-Maldonado, J., Espinosa-Cantellano, M., Soler, C., Torres, J.V., Martinez-Palomo, A., 2003. *Trichomonas vaginalis*: In vitro attachment and internalization of HIV-1 and HIV-1-infected lymphocytes. *J Eukaryot Microbiol* 50, 43-48.
- Rendon-Maldonado, J.G., Espinosa-Cantellano, M., Gonzalez-Robles, A., Martinez-Palomo, A., 1998. *Trichomonas vaginalis*: In vitro phagocytosis of lactobacilli, vaginal epithelial cells, leukocytes, and erythrocytes. *Exp Parasitol* 89, 241-250.
- Reynolds, M., Wilson, J., 1996. Is *Trichomonas vaginalis* still a marker for other sexually transmitted infections in women? *Int J Std Aids* 7, 131-132.
- Robinson, S.C., 1962. Trichomonal vaginitis resistant to metranidazole. *Can Med Assoc J* 86, 665.
- Rocha, D. A. S., de Andrade Rosa, I., de Souza, W., & Benchimol, M. (2014). Evaluation of the effect of miltefosine on *Trichomonas vaginalis*. *Par Res* 113 , 1041-1047.
- Rodin, P., Hass, G., 1966. Metronidazole and pregnancy. *The British journal of venereal diseases* 42, 210-212.

- Rodriguez Gallego, M.e. (1996) Primeros datos sobre la prevalencia de la tricomonosis en Madrid. Tesis de Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid. Madrid
- Roe, F.J., 1977. Metronidazole: review of uses and toxicity. *J Antimicrob Chemother* 3, 205-212.
- Rogers, S.M., Turner, C.F., Hobbs, M., Miller, W.C., Tan, S., Roman, A.M., Eggleston, E., Villarroel, M.A., Ganapathi, L., Chromy, J.R., Erbeling, E., 2014. Epidemiology of undiagnosed trichomoniasis in a probability sample of urban young adults. *PLoS One* 9, e90548.
- Rojas, L., Fraga, J., Sariego, I., 2004a. Genetic variability between *Trichomonas vaginalis* isolates and correlation with clinical presentation. *Infect Genet Evol* 4, 53-58.
- Rojas, L., Sariego, I., Sarría, C., Fraga, J., 2004b. Comportamiento "in vivo" de aislamientos de *Trichomonas vaginalis*, utilizando ratones NMRI como modelo experimental. *Rev Chil Infectol* 21, 179-185.
- Rosa, F.W., Baum, C., Shaw, M., 1987. Pregnancy outcomes after first-trimester vaginitis drug therapy. *Obstet Gynecol* 69, 751-755.
- Rosset, I., Tasca, T., Tessele, P.M., De Carli, G.A., 2002. Scanning electron microscopy in the investigation of the in vitro hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol Res* 88, 356-359.
- Rustia, M., Shubik, P., 1972. Induction of lung tumors and malignant lymphomas in mice by metronidazole. *J Natl Cancer I* 48, 721-729.
- Ryu, J.S., Kang, J.H., Jung, S.Y., Shin, M.H., Kim, J.M., Park, H., Min, D.Y., 2004. Production of interleukin-8 by human neutrophils stimulated with *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 72, 1326-1332.
- Ryu, J.S., Lee, M.H., Park, H., Kang, J.H., Min, D.Y., 2002. Survival of *Trichomonas vaginalis* exposed on various environmental conditions. *Korean journal of infectious diseases* 34, 373-379.
- Ryu, J.S., Min, D.Y., 2006. *Trichomonas vaginalis* and trichomoniasis in the Republic of Korea. *Korean J Parasitol* 44, 101-116.
- Sarker, S. D., Nahar, L., & Kumarasamy, Y. 2007. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42, 321-324.
- Satterwhite, C.L., Torrone, E., Meites, E., Dunne, E.F., Mahajan, R., Ocfemia, M.C., Su, J., Xu, F., Weinstock, H., 2013. Sexually transmitted infections among US women and men: prevalence and incidence estimates, 2008. *Sex Transm Dis* 40, 187-193.
- Sayed el-Ahl, S.A., Maklad, K.M., Gamil, M.A., Hammouda, M.H., Abdel Naby, S.B., 1999. A study on the potential role of *Trichomonas vaginalis* in transmission of Herpes simplex virus type II. *J Egypt Soc Parasitol* 29, 561-573.
- Schmid, A., Schmid, H., 1999. Pharmacotoxicological mode of action of antimicrobial 5-nitroimidazole derivatives. *Zentralbl Veterinarmed A* 46, 517-522.
- Schuster, D., Laggner, C., Langer, T., 2005. Why drugs fail--a study on side effects in new chemical entities. *Curr Pharm Design* 11, 3545-3559.
- Schwebke, J.R., Barrientes, F.J., 2006. Prevalence of *Trichomonas vaginalis* isolates with resistance to metronidazole and tinidazole. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 4209-4210.
- Schwebke, J.R., Burgess, D., 2004. Trichomoniasis. *Clin Microbiol Rev* 17, 794-+.
- Schwebke, J.R., Hook, E.W., 2003. High rates of *Trichomonas vaginalis* among men attending a sexually transmitted diseases clinic: Implications for screening and urethritis management. *J Infect Dis* 188, 465-468.
- Schwebke, J.R., Lensing, S.Y., Sobel, J., 2013. Intravaginal metronidazole/tinidazole for the treatment of vaginal trichomoniasis. *Sex Transm Dis* 40, 710-714.
- Scott Gray, M., Kane, P.O., Squires, S., 1961. Further observations on metronidazole (Flagyl)*. *Brit J Vener Dis* 37, 278-279.

- Secor, W.E., 2012. *Trichomonas vaginalis*: treatment questions and challenges. *Expert Rev Anti-Infe* 10, 107-109.
- Seña, A.C., Miller, W.C., Hobbs, M.M., Schwebke, J.R., Leone, P.A., Swygard, H., Atashili, J., Cohen, M.S., 2007. *Trichomonas vaginalis* infection in male sexual partners: Implications for diagnosis, treatment, and prevention. *Clinical Infectious Diseases* 44, 13-22.
- Shafir, S.C., Sorvillo, F.J., Smith, L., 2009. Current issues and considerations regarding trichomoniasis and Human Immunodeficiency Virus in African-Americans. *Clin Microbiol Rev* 22, 37-45.
- Shaio, M.F., Lin, P.R., 1995. Leucotriene B4 levels in the vaginal discharges from cases of trichomoniasis. *Ann Trop Med Parasit* 89, 85-88.
- Shaio, M.F., Lin, P.R., Lee, C.S., Hou, S.C., Tang, P., Yang, K.D., 1992. A novel neutrophil-activating factor released by *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun* 60, 4475-4482.
- Sharma, R., Pickering, J., McCormack, W.M., 1997. Trichomoniasis in a postmenopausal woman cured after discontinuation of estrogen replacement therapy. *Sex Transm Dis* 24, 543-545.
- Sherrard, J., Ison, C., Moody, J., Wainwright, E., Wilson, J., Sullivan, A., 2014. United Kingdom National Guideline on the Management of *Trichomonas vaginalis* 2014. *Int J Std Aids* 25, 541-549.
- Simoes-Barbosa, A., Lobo, T.T., Xavier, J., Carvalho, S.E., Leornadecz, E., 2005. *Trichomonas vaginalis*: intrastrain polymorphisms within the ribosomal intergenic spacer do not correlate with clinical presentation. *Exp Parasitol* 110, 108-113.
- Simpson, K. L., Holmes, C. H. 1994. Differential expression of complement regulatory proteins decay-accelerating factor (CD55), membrane cofactor protein (CD46) and CD59 during human spermatogenesis. *Immunology*, 81(3), 452.
- Singh, B.N., Hayes, G.R., Lucas, J.J., Sommer, U., Viseux, N., Mirgorodskaya, E., Trifonova, R.T., Sassi, R.R., Costello, C.E., Fichorova, R.N., 2009. Structural details and composition of *Trichomonas vaginalis* lipophosphoglycan in relevance to the epithelial immune function. *Glycoconjugate J* 26, 3-17.
- Singh, P.P., Jain, A., 2007. Trichomoniasis: chemotherapy, drug-resistance and new targets. *Journal of Parasitic Diseases* 31, 79-91.
- Skold, M., Gnarpe, H., Hillstrom, L., 1977. Ornidazole: a new antiprotozoal compound for treatment of *Trichomonas vaginalis* infection. *The British journal of venereal diseases* 53, 44-48.
- Smith, L.M., Wang, M., Zangwill, K., Yeh, S., 2002. *Trichomonas vaginalis* infection in a premature newborn. *Journal of Perinatology* 22, 502-503.
- Snipes, L.J., Gamard, P.M., Narcisi, E.M., Beard, C.B., Lehmann, T., Secor, W.E., 2000. Molecular epidemiology of metronidazole resistance in a population of *Trichomonas vaginalis* clinical isolates. *J Clin Microbiol* 38, 3004-3009.
- Sommer, U., Costello, C.E., Hayes, G.R., Beach, D.H., Gilbert, R.O., Lucas, J.J., Singh, B.N., 2005. Identification of *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases that induce apoptosis in human vaginal epithelial cells. *J Biol Chem* 280, 23853-23860.
- Sood, S., Kapil, A., 2008. An update on *Trichomonas vaginalis*. *Indian J Sex Transm Dis* 29, 7-14.
- Sood, S., Mohanty, S., Kapil, A., Tolosa, J., Mittal, S., 2007. InPouch TV culture for detection of *Trichomonas vaginalis*. *Indian J Med Res* 125, 567-571.
- Soper, D., 2004. Trichomoniasis: Under control or undercontrolled? *Am J Obstet Gynecol* 190, 281-290.
- Sorvillo, F., Smith, L., Kerndt, P., Ash, L., 2001. *Trichomonas vaginalis*, HIV, and African-Americans. *Emerg Infect Dis* 7, 927-932.
- Stiles, J.K., Shah, P.H., Xue, L., Meade, J.C., Lushbaugh, W.B., Cleary, J.D., Finley, R.W., 2000. Molecular typing of *Trichomonas vaginalis* isolates by HSP70 restriction fragment length polymorphism. *Am J Trop Med Hyg* 62, 441-445.

- Stoner, K.A., Rabe, L.K., Meyn, L.A., Hillier, S.L., 2013. Survival of *Trichomonas vaginalis* in wet preparation and on wet mount. *Sex Transm Infect* 89, 485-488.
- Street, D.A., Taylor-Robinson, D., Hetherington, C.M., 1983. Infection of female squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) with *trichomonas vaginalis* as a model of trichomoniasis in women. *The British journal of venereal diseases* 59, 249-254.
- Sutcliffe, S., Giovannucci, E., Alderete, J.F., Chang, T.H., Gaydos, C.A., Zenilman, J.M., de Marzo, A.M., Willett, W.C., Platz, E.A., 2006. Plasma antibodies against *Trichomonas vaginalis* and subsequent risk of prostate cancer. *Cancer Epidem Biomar* 15, 939-945.
- Sutcliffe, S., Neace, C., Magnuson, N.S., Reeves, R., Alderete, J.F., 2012. Trichomonosis, a common curable STI, and prostate carcinogenesis-a proposed molecular mechanism. *Plos Pathog* 8, e1002801.
- Sutcliffe, S., Newman, S.B., Hardick, A., Gaydos, C.A., 2010. Prevalence and Correlates of *Trichomonas vaginalis* Infection Among Female US Federal Prison Inmates. *Sex Transm Dis* 37, 585-590.
- Sutton, M., Sternberg, M., Koumans, E.H., McQuillan, G., Berman, S., Markowitz, L., 2007. The prevalence of *Trichomonas vaginalis* infection among reproductive-age women in the United States, 2001-2004. *Clinical Infectious Diseases* 45, 1319-1326.
- Sutton, M.Y., Sternberg, M., Nsuami, M., Behets, F., Nelson, A.M., St Louis, M.E., 1999. Trichomoniasis in pregnant human immunodeficiency virus-infected and human immunodeficiency virus-uninfected Congolese women: Prevalence, risk factors, and association with low birth weight. *Am J Obstet Gynecol* 181, 656-662.
- Syvänen, A-C., 2001. Accessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nature Rev*, 2. 930-942.
- Tai, J.H., Ip, C.F., 1995. The cDNA sequence of *Trichomonas vaginalis* Virus-T1 double-stranded RNA. *Virology* 206, 773-776.
- Tai, J.H., Su, H.M., Tsai, J., Shaio, M.F., Wang, C.C., 1993. The divergence of *Trichomonas vaginalis* Virus RNAs among various isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Exp Parasitol* 76, 278-286.
- Talevi, A., Bruno-Blanch, L.E., 2010. Screening virtual: una herramienta eficaz en el desarrollo de nuevos fármacos en Latinoamérica. *Lat Am J Pharm* 28, 141-150.
- Teras, J., Roigas, E., 1966. Characteristics of the patho-morphological reaction in cases of experimental infection with *Trichomonas vaginalis*. *Wiad Parazytol* 12, 161-172.
- Thapa, P.B., Whitlock, J.A., Brockman Worrell, K.G., Gideon, P., Mitchel, E.F., Jr., Roberson, P., Pais, R., Ray, W.A., 1998. Prenatal exposure to metronidazole and risk of childhood cancer: a retrospective cohort study of children younger than 5 years. *Cancer* 83, 1461-1468.
- Thomason, J.L., Gelbart, S.M., Sobun, J.F., Schulien, M.B., Hamilton, P.R., 1988. Comparison of four methods to detect *Trichomonas vaginalis*. *J Clin Microbiol* 26, 1869-1870.
- Thurman, A.R., Doncel, G.F., 2011. Innate immunity and inflammatory response to *Trichomonas vaginalis* and bacterial vaginosis: relationship to HIV acquisition. *Am J Reprod Immunol* 65, 89-98.
- Torres-Gomez, H., Hernández-Núñez, E., León-Rivera, I., Guerrero-Alvarez, J., Cedillo-Rivera, R., Moo-Puc, R., Argotte-Ramos, R., Rodríguez-Gutiérrez, M.C., Chan-Bacab, M.J., Navarrete-Vazquez, G., 2008. Design, synthesis and in vitro antiprotozoal activity of benzimidazole-pentamidine hybrids. *Bioorg Med Chem Lett* 18, 3147-3151.
- Torres-Machorro, A.L., Hernández, R., Alderete, J.F., López-Villaseñor, I., 2009. Comparative analyses among the *Trichomonas vaginalis*, *Trichomonas tenax*, and *Tritrichomonas foetus* 5S ribosomal RNA genes. *Curr Genet* 55, 199-210.
- Toyos, J.M., 1974. Patogenia experimental de *Trichomonas vaginalis* Donné 1836 en el ratón (*Mus musculus*). *Anales de la Facultad de Veterinaria de León* 20, 551-558.
- Tsai, C.D., Liu, H.W., Tai, J.H., 2002. Characterization of an iron-responsive promoter in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*. *J Biol Chem* 277, 5153-5162.

- Tuttle, J.P., Holbrook, T.W., Derrick, F.C., 1977. Interference of human spermatozoal motility by *Trichomonas vaginalis*. *The Journal of urology* 118, 1024-1025.
- Valdez-Padilla, D., Rodriguez-Morales, S., Hernandez-Campos, A., Hernandez-Luis, F., Yepez-Mulia, L., Tapia-Contreras, A., Castillo, R., 2009. Synthesis and antiprotozoal activity of novel 1-methylbenzimidazole derivatives. *Bioorgan Med Chem* 17, 1724-1730.
- Van Der Pol, B., 2007. *Trichomonas vaginalis* infection. The most prevalent nonviral sexually transmitted infection receives the least public health attention. *Clin Infect Dis* 44, 23-25.
- Van Der Pol, B., Kraft, C.S., Williams, J.A., 2006. Use of an adaptation of a commercially available PCR assay aimed at diagnosis of chlamydia and gonorrhoea to detect *Trichomona vaginalis* in urogenital specimens. *J Clin Microbiol* 44, 366-373.
- Van Der Pol, B., Kwok, C., Pierre-Louis, B., Rinaldi, A., Salata, R.A., Chen, P.L., van de Wijgert, J., Mmiro, F., Mugerwa, R., Chipato, T., Morrison, C.S., 2008. *Trichomonas vaginalis* infection and human immunodeficiency virus acquisition in African women. *J Infect Dis* 197, 548-554.
- Van Der Pol, B., Williams, J.A., Orr, D.P., Batteiger, B.E., Fortenberry, J.D., 2005. Prevalence, incidence, natural history, and response to treatment of *Trichomonas vaginalis* infection among adolescent women. *J Infect Dis* 192, 2039-2044.
- Van Herwerden, L., Blair, D., & Agatsuma, T. (1998). Intra-and inter-specific variation in nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 of the *Schistosoma japonicum* species complex. *Parasitology*, 116(04), 311-317.
- Vanacova, S., Tachezy, J., Kulda, J., Flegr, J., 1997. Characterization of trichomonad species and strains by PCR fingerprinting. *J Eukaryot Microbiol* 44, 545-552.
- Vargas-Villarreal, J., Mata-Cardenas, B.D., Palacios-Corona, R., Gonzalez-Salazar, F., Cortes-Gutierrez, E.I., Martinez-Rodriguez, H.G., Said-Fernandez, S., 2005. *Trichomonas vaginalis*: identification of soluble and membrane-associated phospholipase A1 and A2 activities with direct and indirect hemolytic effects. *The Journal of parasitology* 91, 5-11.
- Vazquez, F., Garcia, M.J., Perez, F., Palacio, V., 2001. *Trichomonas vaginalis*: treatment and resistance to nitroimidazoles. *Enferm Infec Micr Cl* 19, 114-124.
- Vega M.C., Montero-Torres, A., Marrero-Ponce, Y., Rolon, M., Gomez-Barrio, A., Escario, J.A., Aran, V.J., Nogal, J.J., Meneses-Marcel, A., Torrens, F., 2006. New ligandbased approach for the discovery of antitrypanosomal compounds, *Bioorg.Med. Chem. Lett.* 16 1898-1904.
- Verma, J., Khedkar, V.M., Coutinho, E.C., 2010. 3D-QSAR in drug design--a review. *Curr Top Med Chem* 10, 95-115.
- Vidakovic, M., Crossnoe, C.R., Neidre, C., Kim, K., Krause, K.L., Germanas, J.P., 2003. Reactivity of reduced [2Fe-2S] ferredoxins parallels host susceptibility to nitroimidazoles. *Antimicrob Agents Chemother* 47, 302-308.
- Viikki, M., Pukkala, E., Nieminen, P., Hakama, M., 2000. Gynaecological infections as risk determinants of subsequent cervical neoplasia. *Acta Oncol* 39, 71-75.
- Viscogliosi, E., Edgcomb, V. P., Gerbod, D., Noël, C., Delgado-Viscogliosi, P., 1999. Molecular evolution inferred from small subunit rRNA sequences: what does it tell us about phylogenetic relationships and taxonomy of the parabasalids?. *Parasite* 6, 279-291.
- Vital, P. G., & Rivera, W. L. 2011. Antimicrobial activity, cytotoxicity, and phytochemical screening of *Voacanga globosa* (Blanco) Merr. leaf extract (Apocynaceae). *Asian Pacific J Trop Med* 4, 824-828.
- Voogd, C.E., Van der Stel, J.J., Jacobs, J.J., 1974. The mutagenic action of nitroimidazoles. I. Metronidazole, nimorazole, dimetridazole and ronidazole. *Mutat Res* 26, 483-490.
- Walker, R.L., Hayes, D.C., Sawyer, S.J., Nordhausen, R.W., Van Hoosear, K.A., BonDurant, R.H., 2003. Comparison of the 5.8 S rRNA gene and internal transcribed spacer regions of trichomonadid protozoa recovered from the bovine preputial cavity. *J Vet Diagn Invest* 15, 14-20.
- Wang, A., Wang, C.C., Alderete, J.F., 1987. *Trichomonas vaginalis* phenotypic variation occurs only among trichomonads infected with the double-stranded-RNA virus. *J Exp Med* 166, 142-150.

- Waugh, D.J., Wilson, C., 2008. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 14, 6735-6741.
- Wendel, K.A., 2003. Trichomoniasis: What's New? *Curr Infect Dis Rep* 5, 129-134.
- Whaley, L., 1999. Preventing the high-risk sexual behaviour of adolescents: focus on HIV/AIDS transmission, unintended pregnancy, or both? *J Adolesc Health* 24, 376-382.
- WHO, 2001. Global Prevalence and Incidence of Selected Curable Sexually Transmitted Infections: Overview and Estimates. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- WHO, 2006. The selection and use of essential medicines Report of the WHO Expert Committee, 2005 (including the 14th Model List of Essential Medicines) 933.
- WHO, 2011. Prevalence and incidence of selected sexually transmitted infections, Chlamydia trachomatis, Neisseria gonorrhoeae, syphilis and Trichomonas vaginalis: methods and results used by WHO to generate 2005 estimates. World Health Organization.
- WHO, 2012. Global incidence and prevalence of selected curable sexually transmitted diseases - 2008. World Health Organization, Geneva, Geneva, Switzerland.
- Wilkinson, D., Ramjee, G., Tholandi, M., Rutherford, G., 2002. Nonoxynol-9 for preventing vaginal acquisition of sexually transmitted infections by women from men. The Cochrane database of systematic reviews, CD003939.
- Willett, P., 2006. Similarity-based virtual screening using 2D fingerprints. *Drug Discov Today* 11, 1046-1053.
- Willett, P., Barnard, J.M., Downs, G.M., 1998. Chemical similarity searching. *J Chem Inf Comput Sci* 38, 983-996.
- Woehle, C., Kusdian, G., Radine, C., Graur, D., Landan, G., Gould, S.B. 2014. The parasite *Trichomonas vaginalis* expresses thousands of pseudogenes and long non-coding RNAs independently from functional neighbouring genes. *BMC Genomics*, 15:906.
- Workowski, K.A., Berman, S., 2010. Sexually transmitted diseases treatment guidelines, 2010. *MMWR Recomm Rep* 59, 1-110.
- Wright, J.M., Dunn, L.A., Kazimierczuk, Z., Burgess, A.G., Krauer, K.G., Upcroft, P., Upcroft, J.A., 2010. Susceptibility in vitro of clinically metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis* to nitazoxanide, toyocamycin, and 2-fluoro-2'-deoxyadenosine. *Parasitol Res*, 107, 847-853.
- Xiao, J.C., Xie, L.F., Fang, S.L., Gao, M.Y., Zhu, Y., Song, L.Y., Zhong, H.M., Lun, Z.R., 2006. Symbiosis of *Mycoplasma hominis* in *Trichomonas vaginalis* may link metronidazole resistance in vitro. *Parasitol Res* 100, 123-130.
- Xiao, J.C., Xie, L.F., Zhao, L., Fang, S.L., Lun, Z.R., 2008. The presence of *Mycoplasma hominis* in isolates of *Trichomonas vaginalis* impacts significantly on DNA fingerprinting results. *Parasitol Res* 102, 613-619.
- Yaeger, R.G. (1988). Long term cryopreservation of the amastigotes stages of haemoflagellates. *J. Protozool.*, 35 (1): 114-115.
- Zhang, Q., Muegge, I., 2006. Scaffold hopping through virtual screening using 2D and 3D similarity descriptors: ranking, voting, and consensus scoring. *J Med Chem* 49, 1536-1548.
- Zhao, Y. H., Abraham, M.H., Le, J., Hersey, A., Luscombe, C.N., Beck, G., Sherborne, B., Cooper, I., 2002. Rate-limited steps of human oral absorption and QSAR studies. *Pharm Res* 19, 1446-1457.
- Zubacova, Z., Cimburek, Z., Tachezy, J., 2008. Comparative analysis of trichomonad genome sizes and karyotypes. *Mol Biochem Parasitol* 161, 49-54.

X. Lista de Figuras

Figuras

Figura 1: Esquema morfológico de un tricomonádido en el que se observa: *Complejo cinetosomal*, compuesto por los cuatro cinetosomas de los flagelos anteriores y el quinto del flagelo recurrente (FR). La *costa* (coloreada de marrón), cuyo origen comienza en los cinetosomas 2 y 5, y ejerce de soporte de la membrana ondulante (Mo). El *aparato parabasal*, formado por los filamentos parabasales que conectan el complejo cinetosomal con el complejo de Golgi (Go). *Complejo pelta-axostilar* (de color amarillo), constituido por la pelta que soporta el canal periflagelar de donde emergen los flagelos y el axostilo. En color gris se representan los hidrogenosomas (H), con localización fundamentalmente paraxostilar y paracostal.

Figura 2: Ruta de la glicolisis y la descarboxilación oxidativa en *T. vaginalis*. Esquema modificado a partir de los publicados por Benchimol (2009), Horváthová *et al.* (2012) y Müller *et al.* (2012).

Figura 3: Trofozoíto en criptopleuromitosis. En la región anterior se observan los dos penachos flagelares, los complejos cinetosomales duplicados y los núcleos.

Figura 4: Incidencia total de las cuatro I.T.S. curables más importantes (clamidiasis, gonorrea, sífilis y tricomonosis) y de tricomonosis en el mundo. Datos publicados por la OMS en sus dos últimos informes.

Figura 5: Test de hibridación de ADN BD Affirm™ VPIII. Las imágenes han sido tomadas de www.moleculardiagnosis.bd.com

Figura 6: Procedimiento para el diagnóstico de *T. vaginalis* mediante el test rápido OSOM® Trichomonas Rapid Test (Genzyme Diagnostics). Imagen tomada del Testing Handbook provisto con el test.

Figura 7: Estructura química del metronidazol.

Figura 8: Estructura química del tinidazol.

Figura 9: Proceso de descarboxilación oxidativa llevada a cabo en el hidrogenosoma de *T. vaginalis*.

Figura 10: (A) Activación del MTZ por transferencia electrónica de la Fd al grupo nitro. (B) Reducción secuencial del radical nitro mediante transferencia electrónica.

Figura 11: Ciclo fútil de reoxidación del radical aniónico en presencia de oxígeno.

Figura 12: Activación alternativa del MTZ a través de la ruta de la descarboxilación oxidativa del malato. *EM: Enzima mállica o malato deshidrogenasa*

Figura 13: Estructura química de otros fármacos tricomonocidas.

Figura 14: Esquema representativo de los factores principales que influyen en la patogenia y colonización por *T. vaginalis*.

Figura 15: Niveles de estrógenos y progesterona durante el ciclo de una mujer fértil no embarazada.

Figura 16: Resumen gráfico de las dos teorías que reflejan la influencia de los niveles de hormonas sexuales femeninas en el asentamiento de *T. vaginalis* a nivel genitourinario.

Figura 17: Esquema representativo de la interacción entre *T. vaginalis* y la célula diana del hospedador con la generación de pequeños huecos entre ambas membranas que permiten al parásito controlar distintos factores como el pH o la concentración de iones. Esquema modificado a partir del publicado por Fiori *et al.* (1999).

Figura 18: Representación gráfica del mecanismo de interacción entre *T. vaginalis* y la célula del hospedador a través de AP propuesto por García y Alderete, 2007.

Figura 19: Esquema de la estructura del LPG de *T. vaginalis* propuesto por Singh *et al.* (2009).

Figura 20: Esquema de la región genómica codificante de los ARN ribosomales 18S, 5.8S y 28S. **A.** Esquema de una unidad transcripcional en la que cada ARNr se separa por un espaciador interno no codificante (ITS). **B.** Representación de dos unidades transcripcionales separadas por el espaciador intergénico (IGS).

Figura 21: Disposición nucleotídica en tándem de los genes que codifican el ARNr 5S en *T. vaginalis*, separados por una secuencia intergénica (IGS) no codificante.

Figura 22: Comparación de la secuenciación de Sanger mediante el método enzimático empleando geles de poliacrilamida y revelando mediante marcaje radiactivo (A) y la secuenciación automática empleando fluorocromos (B).

Figura 23: Representación de una región microsatélite (SSR) de 2 nucleótidos repetidos en tándem flanqueando a un intermicrosatélite (ISSR). Los cebadores siguen el modelo diseñado por Zietkiewicz *et al.* (1994).

Figura 24: Ejemplo de polimorfismo de nucleótido simple o SNP.

Figura 25: Esquema de los principales métodos de CV desarrollados para el cribado *in silico* de nuevos fármacos.

Figura 26: Metabolismo de la resazurina. El colorante redox, inicialmente azul y no fluorescente se reduce rápidamente a resorufina (rosa y fluorescente). Si la reducción continúa puede convertirse en dihidroresorufina (rosa palo y sin fluorescencia).

Figura 27: Estructuras químicas de los compuestos químicos ensayados durante la puesta a punto del método de cribado fluorimétrico frente a *T. vaginalis*.

Figura 28: Estructura química del nutracéutico DIM.

Figura 29: Estructura general de las series IA, IB y IC de la familia VATR.

Figura 30: Estructura química de los derivados de 5-nitroindazol-3-ona con sustituyentes en el grupo 2-bencilo y pertenecientes a la serie II de la familia VATR. La serie IIA se caracteriza por presentar un sustituyente metilo en posición 1 mientras que la serie IIB presenta otros radicales alifáticos (R¹).

Figura 31: Diseño esquemático del método de cribado secuencial frente a *T. vaginalis*.

Figura 32: Diseño de la distribución en una placa de microtitulación para el cribado *in vitro* frente a *T. vaginalis* de 3 compuestos.

Figura 33: Cribado *in vitro* mediante el método fluorimétrico con resazurina.

Figura 34: Metodología del cribado *in vivo* en el modelo intraperitoneal de tricomonosis en ratón.

Figura 35: Gel de agarosa obtenido durante la estandarización del protocolo. Los carriles 1 y 2 corresponden a controles negativos a los que no sólo se les ha añadido el control interno. Los carriles 3 y 4 son controles +. Contienen 4 y 2 μL del control positivo incluido en el *kit*.

Figura 36: Resultado de la IDR tras incubar 24 h un volumen de 5 μL de SH en el pocillo del kit ESAY RID para determinar la concentración de C3c.

Figura 37: Distribución de las placas para el revelado de la susceptibilidad al suero de los dos aislados cultivados en presencia y ausencia de glóbulos rojos (GR).

Figura 38: Diseño rotulado de la placa de titulación de 96 pocillos para el revelado del ensayo de sensibilidad de aislados de *T. vaginalis* al sistema del complemento.

Figura 39: Esquema del protocolo de extracción de ADN mediante kit comercial.

Figura 40: Esquema de la determinación de polimorfismos mediante MS empleando marcadores fluorescentes anclados a secuencias constantes.

Figura 41: Diagrama esquemático sobre el proceso de generación de las series de entrenamiento (SE) y predicción (SP). La base de datos inicial de 592 compuestos (260 activos + 332 inactivos) se clasifica en grupos mediante análisis de conglomerados (*k*-MCA). Un 25% de las moléculas pasa a formar parte de la SP y el 75% restante conforman la SE.

Figura 42: Representación gráfica de los parámetros de exactitud (Q) y razón de falsa alarma (RFA) mediante barras y líneas respectivamente. Cada sub-modelo se genera tras retirar todos los compuestos que conforman la SE en proporciones del 5%, 10%, 15%, 20% y 25%. Este método de validación interna denominado validación cruzada (VC) se llevó a cabo en los tres modelos (M22, 26 y 45) seleccionados por los sistemas multclasificadores.

Figura 43: Resultados de validación interna mediante el proceso de aleatorización de la variable respuesta para los tres modelos individuales seleccionados mediante el ensamblaje.

Figura 44: Gráfico comparativo de la intensidad de fluorescencia detectada en presencia (primer grupo de barras) y ausencia de parásitos (segundo y tercer grupo de barras) en dos condiciones: sustituyendo el medio de cultivo por PBS/glucosa (barras azules) y sin sustituir (barras moradas). En el extremo superior derecho del diagrama de barras se observa una foto tomada tras la incubación del sustrato durante 1 h con distintos blancos: medio TYM fresco (A), PBS-glucosa (B) y TYM modificado sin L-cisteína ni ácido ascórbico (C). La gráfica muestra la media y la desviación estándar de al menos tres experimentos independientes.

Figura 45: Resultados de las curvas de crecimiento de *T. vaginalis* en presencia de cuatro concentraciones distintas del colorante redox. A. Los resultados para cada punto corresponden a la media \pm desviación estándar (D.S.) de 6 experimentos realizados de forma independiente. B. Fluorescencia registrada en los estudios de estandarización del inóculo y la concentración de resazurina tras incubar las placas 1 h a 37 °C.

Figura 46: Resultados obtenidos tras la incubación con resazurina (3 mM) de concentraciones crecientes del parásito a distintos tiempos (30 min hasta 6 h). A) Gráfica representativa de la fluorescencia registrada a los distintos tiempos. B) Tabla resumen con

los parámetros obtenidos para cada curva de crecimiento. Los resultados se han obtenido a partir de 6 experimentos independientes.

Figura 47: Representación gráfica de la citotoxicidad inespecífica media frente a macrófagos murinos J774, del aceite esencial ICA11 y de las dos fracciones más activas F1 y F4.

Figura 48: Actividad *in vivo* de los 5-nitroindazoles (**117**, **132** y **134**). Las fracciones coloreadas del diagrama de barras representan las puntuaciones obtenidas en función de las lesiones abdominales y la mortalidad.

Figura 49: Actividad tricomonida *in vivo* del compuesto **FR 9**. Las fracciones coloreadas del diagrama de barras representan las puntuaciones obtenidas en función de las lesiones y la mortalidad. La patogenia se expresada como IP (índice de patogenia) a partir de la media \pm desviación estándar de las puntuaciones obtenidas para cada ratón.

Figura 50: Representación gráfica de los valores de CI₅₀ tras someter a los 10 aislados a concentraciones crecientes de MTZ (barras claras) y TDZ (barras oscuras).

Figura 51: Porcentaje de citoadherencia obtenido para cada aislado tras 30 min de contacto con un cultivo de células HeLa.

Figura 52: Determinación espectrofotométrica del número de células cultivadas en placas de 96 pocillos tras la tinción con cristal violeta.

Figura 53: Porcentaje de citotoxicidad en células HeLa de los aislados JH31A4 y 1807 en función del tiempo de contacto (2, 4, 6 y 8 h) y del ratio parásito:célula.

Figura 54: Porcentaje de citotoxicidad registrado tras mantener en contacto a los diez aislados con 50000 células HeLa en proporciones parásito:célula 2:1 durante 4 h.

Figura 55: Porcentaje de citotoxicidad registrado tras mantener en contacto a los diez aislados con 50000 células HeLa en proporciones parásito:célula 1:1 durante 4 h.

Figura 56: Imagen de los dos tipos poblacionales identificados mediante IFI empleando el Ac monoclonal C230 (anti-P270). **A.** Tipo I TVV-. **B.** Tipo II TVV+.

Figura 57: Diagrama de barras acumulado indicativo de los porcentajes de flagelados que expresan o no en su superficie la proteína inmunogénica P270 (P270s). Los resultados mostrados en la tabla proceden del recuento de seis campos.

Figura 58: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% teñidos con bromuro de etidio. Los tres geles muestran los resultados de la amplificación de los 10 aislados empleando los cebadores de la región constante del ARNr 16S de *Mycoplasma*. Todos los ensayos incluyen un control positivo (carriles 1A, 2B y 5C de los tres geles, respectivamente), un control negativo empleando agua como muestra de amplificación (carriles 8A, 3B y 6C) y un control interno que se revela como una banda a 270 pb en las muestras negativas.

Figura 59: Representación gráfica mediante diagrama de barras de la patogenia experimental (IP) de los aislados de *T. vaginalis* en el modelo murino.

Figura 60: Porcentaje de mortalidad de los ratones infectados con los aislados de *T. vaginalis*.

Figura 61: Puntuaciones obtenidas tras la evaluación de las lesiones generadas por los aislados en el modelo murino intraperitoneal.

Figura 62: Inmunofluorescencia de los aislados C-1:NIH (Panel I) e IR78 (panel II) mostrando la ausencia de CD59 en cultivos *in vitro*. Los trofozoítos son marcados con el Ac monoclonal 12G4 (A) mientras que la CD59 no es detectable (B). La detección de AP65 en combinación con DAPI se refleja en las columnas C y D (campo claro).

Figura 63: Detección en la superficie de *T. vaginalis* aislados de ratón (A) de CD59 (B). Los experimentos de microscopía confocal emplearon un Ac monoclonal frente a CD59 murino (B) así como frente a AP65 (C). El panel D muestra la combinación de ambas fluorescencias. Las muestras también se revelaron con el Ac secundario anti-ratón marcado con FITC (ventanas en apartados B y C), confirmando los resultados obtenidos con el conjugado marcado con Alexa. Escala: 25 μ m.

Figura 64: Confirmación de la presencia de CD59 en la superficie de glóbulos rojos de ratón.

Figura 65: Microfotografías de microscopía confocal que muestran la adquisición de CD59 por los aislados de *T. vaginalis* C-1:NIH (I) e IR78 (II) cultivados en presencia de eritrocitos murinos. Los tricomonádidos muestran en su superficie AP65 (A), así como CD59 tras cultivarse con glóbulos rojos (B). La presencia e integridad de los parásitos se observa tras combinar los planos de fluorescencia para AP65 y CD59 en campo claro junto con el colorante DAPI (C). Escala: 10 μ m.

Figura 66: Viabilidad de los aislados C-1:NIH e IR78 cultivados en ausencia y presencia (barras rojas) de glóbulos rojos.

Figura 67: Porcentaje de supervivencia de los diez aislados. Se expresa la media y D.S. de tres experimentos independientes.

Figura 68: Electroforesis en gel de agarosa 1,5 % de los productos de PCR purificados del locus ITS1 -5.8S ARNr - ITS2 de aislados de *T. vaginalis*.

Figura 69: Tamaño de los amplicones del panel de microsatélites estudiados (MS006, MS129 y MS184). Imagen obtenida al evaluar los resultados del aislado JH31A4.

Figura 70: Tamaño de los fragmentos de PCR tras la amplificación de los microsatélites MS006, MS129 y MS184 de las 10 muestras de *T. vaginalis*. La gráfica destaca las divergencias observadas en el tamaño de los fragmentos de los tres MS para cada aislado.

Figura 71: Dendrograma obtenido mediante NJ a partir de las secuencias del gen GP63a.

Figura 72: Dendrograma obtenido mediante NJ a partir de las secuencias del gen PMS1.

Figura 73: Tanglegrama comparativo entre las secuencias de los 10 aislados para los genes PMS1 y GP63a.

Figura 74: Efecto tricomonocida de la coadministración de distintas concentraciones de DIM (eje de abscisas) junto con una concentración constante de MTZ de 1,58 μ M (línea verde) y 0,9 μ M (línea azul). Cada punto refleja la media \pm D.S. de tres experimentos independientes.

Figura 75: Estructura general de las series III y V de la familia química VATR.

XI. Lista de Tablas

Tablas

- Tabla 1:** Signos y síntomas clínicos de la tricomonosis urogenital en hombres y mujeres.
- Tabla 2:** Porcentajes de sensibilidad (Sens.) y especificidad (Esp.) de las distintas técnicas diagnósticas descritas para identificar *T. vaginalis*.
- Tabla 3:** Régimen posológico descrito por la OMS (2005a).
- Tabla 4:** Catalogación de la resistencia aeróbica de aislados en función de la concentración mínima letal detectada en presencia de MTZ o TDZ.
- Tabla 5:** Actividad tricomonocida de las especies naturales más relevantes obtenidas de la literatura científica. En la tabla se especifica la especie, denominación común, actividad tricomonocida, uso tradicional de los extractos de la planta y la composición mayoritaria del extracto estudiado.
- Tabla 6:** Fármacos empleados como alternativa terapéutica para el tratamiento de la tricomonosis.
- Tabla 7:** Proteínas reguladas por la acción del hierro (Figueroa-Angulo *et al.*, 2012; Arroyo *et al.*, 2015).
- Tabla 8:** Actividad enzimática descrita de cuatro de las cinco adhesinas descritas hasta el momento en *T. vaginalis*.
- Tabla 9:** Función y regulación de las CP descritas.
- Tabla 10:** Propiedades fisicoquímicas estimadas por la R05 para que una molécula presente una buena biodisponibilidad oral y permeabilidad intestinal.
- Tabla 11:** Propiedades fisicoquímicas necesarias para lograr una buena permeabilidad a través de la BHE.
- Tabla 12:** Composición del aceite esencial y de las nueve fracciones del cultivo de *Artemisia absinthium* tras el análisis espectrográfico mediante GC-MS.
- Tabla 13:** Estructura química de las 39 moléculas pertenecientes al primer grupo de 5-nitroindazoles ensayados frente a *T. vaginalis*.
- Tabla 14:** Estructura química de las 40 estructuras pertenecientes al segundo grupo de 5-nitroindazoles ensayados frente a *T. vaginalis*.
- Tabla 15:** Estructura química general de las moléculas que integran las series IIIA (A) y IIIB (B) de la familia VATR.
- Tabla 16:** Estructura general de los compuestos de la serie IVA con estructura de 6-nitro-4-oxoquinazolina.
- Tabla 17:** Estructura química de los 3-alcoxi-1-bencil-5-nitroindazoles pertenecientes a la serie V.
- Tabla 18:** Estructura química de las dos series de nitroquinoxalinas ensayadas frente a *T. vaginalis*. : A) Estructura general de las 7-nitroquinoxalin-2-onas 1,4 disustituidas (FR 6-FR 16). B) el derivado 8-nitrooxacino[3,2-*a*]quinoxalin-5-ona (FR 17), formado por ciclación de FR 10. C) Estructura química general de la serie de las 6-nitroquinoxalin-2,3-dionas 1,4 disustituidas (FR 26-FR 35).

Tabla 19: Código numérico empleado para la clasificación de las moléculas que componen la BD.

Tabla 20: Variables calculadas por el programa TOMOCOMD-CARDD® v.2. para la obtención de los modelos QSAR-ADL.

Tabla 21: Definición y cálculo matemático de los parámetros estadísticos calculados para determinar la calidad y robustez de los modelos virtuales.

Tabla 22: Valoración de la mortalidad y las lesiones observadas en los ratones tras la inoculación intraperitoneal de aislados axénicos de *T. vaginalis*.

Tabla 23: Cebadores empleados en la caracterización genómica.

Tabla 24: Características de los tres MS y los dos SCG escogidos para la caracterización de los aislados de *T. vaginalis*.

Tabla 25: Programas de PCR empleados para la amplificación de los diferentes *loci*.

Tabla 26: Número de moléculas que integran cada uno de los *clusters* obtenidos tras el análisis de conglomerados. A continuación se muestra el número de compuestos que conforman la SP y la SE tanto en el grupo de activos como de inactivos.

Tabla 27: Parámetros estadísticos de cada uno de los 45 modelos QSAR/LDA basados en relaciones a átomos.

Tabla 28: Coeficiente de correlación de Matthews (*C*), porcentajes de exactitud (*Q*) y razón de falsa alarma (RFA) obtenidos para las combinaciones de 2 a 5 modelos mediante distintos métodos de ensamblaje implementados en el software multclasificador DSDE.

Tabla 29: Comparación de la actividad tricomonocida de tres fármacos evaluados mediante el método fluorimétrico revelado con resazurina frente al recuento hemocitométrico en el microscopio.

Tabla 30: Comparación de la actividad tricomonocida de varios compuestos de síntesis mediante el método fluorimétrico revelado con resazurina frente al recuento hemocitométrico en el microscopio.

Tabla 31: Porcentaje de actividad tricomonocida del aceite esencial puro ICA11, las 9 fracciones (F1-F9) y los dos compuestos químicos (cariofileno y crisantenol). También se indica la CI_{50} y los límites de confianza tras el análisis Probit.

Tabla 32: Inhibición de crecimiento de *T. vaginalis* (actividad tricomonocida) y de células Vero (citotoxicidad inespecífica) tras 24 h de contacto con distintas concentraciones de DIM.

Tabla 33: Porcentaje de actividad tricomonocida y citotoxicidad inespecífica tras someter a los cultivos a una combinación de DIM y MTZ.

Tabla 34: Actividad tricomonocida de la serie IA (**VATR 1-VATR 19**) (indazolinonas 1,2-disustituidas), y de las series IB (**VATR 20-VATR 24**) y IC (**VATR 25-VATR 39**) (3-alcoxiindazoles sustituidos en posiciones 1 y 2, respectivamente).

Tabla 35: Determinación *in silico* de las propiedades farmacocinéticas asociadas a una buena biodisponibilidad oral y permeabilidad intestinal empleando el software Molinspiration.

Tabla 36: Resultados de la evaluación *in silico* del riesgo mutagénico (Mut.), carcinogénico (Tum.), irritativo (Irrit.), efectos nocivos reproductivos (Efect. Rep.) y valores de *Drug*

score de los compuestos más activos del grupo I de la familia química de 5-nitroindazoles empleando el software OSIRIS *Property Explorer*.

Tabla 37: Actividad tricomonida (% IC) de los derivados de 1-metil-5-nitroindazol-3-ona (VATR 40-VATR 69) de la serie IIA con un periodo de incubación de 24 h.

Tabla 38: Actividad *in vitro* de las series IIB (70-74, 79) y IIC (75-78) de la familia VATR de 5-nitroindazoles.

Tabla 39: Propiedades farmacocinéticas calculadas mediante la aplicación informática Molinspiration de los dos derivados más activos del grupo de las 1-metil-5-nitroindazol-3-onas y del derivado 79 (2-picolil-3-propoxi-5-nitroindazol).

Tabla 40: Parámetros de toxicidad y de las estructuras VATR 53, 68 y 79 pertenecientes a la serie II de la familia de 5-nitroindazoles.

Tabla 41: Actividad tricomonida y citotóxica de los 34 derivados con sustituyentes en 1,2 que conforman la serie IIIA de la familia de 5-nitroindazoles VATR.

Tabla 42: Actividad tricomonida de los once 2-bencil-3-alcoxi-5-nitroindazol de la serie IIIB.

Tabla 43: Propiedades fisicoquímicas calculadas con el software Molinspiration de los compuestos de la tercera serie de VATR que mostraron actividad en los ensayos *in vitro*.

Tabla 44: Estimación de la toxicidad de los compuestos más activos de las series IIIA (80-113) y IIIB (114-124) de 5-nitroindazoles.

Tabla 45: Actividad tricomonidas (CI₅₀) y citotoxicidad inespecífica (CC₅₀) del grupo de las 6-nitro-4-oxoquinazolininas (125-129) y de los 2-bencil-3-(ω-hidroxiálquilamino) indazoles (130-134). En la tabla también se muestra el índice de selectividad (IS) y la relación de actividad entre el compuesto VATR con respecto al fármaco de referencia.

Tabla 46: Propiedades farmacocinéticas de los 6-nitro-4-oxoquinazolininas y los 2-bencil-3-amino-5-nitroindazoles con actividad tricomonida.

Tabla 47: Determinación de los posibles riesgos mutagénicos, carcinogénicos, irritativos o durante la reproducción de las estructuras químicas más activas de la serie IV. El valor de *drug score* se calcula con el software OSIRIS *Property Explorer*.

Tabla 48: Actividad tricomonida (CI₅₀), citotoxicidad inespecífica (CC₅₀), toxicidad selectiva (IS) y relación de actividad con respecto al fármaco de referencia de los 14 compuestos de la serie V de los 5-nitroindazoles.

Tabla 49: Principales propiedades farmacocinéticas evaluadas mediante softwares con el fin de estimar una buena biodisponibilidad oral en función de la estructura de los compuestos de la serie V que mostraron actividad tricomonida.

Tabla 50: Efecto tóxico de las cinco moléculas con estructura de 3-alcoxi-1-bencil-5-nitroindazol con una actividad tricomonida mayor evaluado mediante el software OSIRIS.

Tabla 51: Actividad tricomonida (CI₅₀) frente al aislado IR78 de *T. vaginalis* de los 5-nitroindazoles seleccionados previamente por su actividad tricomonida en JH31A4.

Tabla 52: Resultados de la actividad tricomonida (CI₅₀) frente al aislado sensible JH31A4 y la toxicidad inespecífica (CC₅₀) de los derivados de 7-nitroquinoxalin-2-ona (FR 6 - FR 17) y de 6-nitroquinoxalin-2,3-diona (FR 26 - FR 45).

Tabla 53: Propiedades fisicoquímicas relacionadas con la biodisponibilidad oral de nitroquinoxalinonas.

Tabla 54: Efectos tóxicos (mutagénesis, carcinogénesis, irritación y efectos nocivos durante el embarazo) y *Drug score* de los compuestos derivados de nitroquinoxalinona determinados por el programa virtual OSIRIS.

Tabla 55: Inhibición de crecimiento registrado tras mantener en contacto 24 h distintas diluciones de los compuestos con el aislado metronidazol-resistente.

Tabla 56: Cribado virtual de las 169 estructuras químicas ensayadas *in vitro*. A) Parámetros estadísticos tras la predicción del modelo ensamblado, B) Resultados tras la predicción de los 4 modelos (22, 26, 45 y ensamblado).

Tabla 57: Cribado virtual de las series I a V de compuestos VATR y la serie FR.

Tabla 58: La concentración mínima letal (CML) y la inhibición del crecimiento del 50% (CI₅₀) expresadas en µg/mL (µM) de los diez aislados.

Tabla 59: Valores de significación estadística tras el análisis no paramétrico U de Mann Whitney para muestras independientes 2 a 2.

Tabla 60: Valores de significación estadística tras el análisis no paramétrico U de Mann Whitney para muestras independientes 2 a 2.

Tabla 61: Resultados de la caracterización biológica de los aislados de *T. vaginalis*

Tabla 62: Tamaño de los fragmentos de los tres MS estudiados en los 10 aislados. El análisis de la señal fluorescente se realizó con el programa PeakScanner v 1.0.

Tabla 63: Robustez de los mejores modelos seleccionados mediante el sistema multclasificador (22, 26 y 45) así como del modelo nuevo generado a partir de los tres anteriores (Ensamble).

Tabla 64: Resultados de los doce 5-nitroindazoles más activos pertenecientes a la serie química VATR.

Tabla 65: Resultados de las nitroquinoxalinonas más activas pertenecientes a la serie química FR.

Tabla 66: Cuadro resumen de los resultados de caracterización biológica y molecular de los 10 aislados de *T. vaginalis*.

XII. Anexos

Anexos

ANEXO I: Distribución y significación de las variables calculadas en la generación de los 45 modelos QSAR/ADL.

ANEXO II: Parámetros estadísticos de las validaciones cruzadas (VC) llevadas a cabo en los tres modelos seleccionados tras el ensamblaje.

ANEXO III: Parámetros estadísticos tras la proceso de aleatorización de la variable respuesta en los tres modelos seleccionados por los modelos multclasificadores.

ANEXO IV: Primera hoja de las publicaciones científicas relacionadas con los resultados presentados en eseta Tesis Doctoral.

ANEXO I: Distribución y significación de las variables calculadas en la generación de los 45 modelos QSAR/ADL.

Mod	Inicio	Fin	Base a átomo		Total	Aceptor de enlaces de H		C en cadena alifática		Donador de enlaces de H		Halógenos		Grupo Metilo Terminal		Átomo de C en aromáticos		Heteroátomos				
<u>1</u>	1	128	IL NS	MA	Con H	1	16	17	32	33	48	49	64	65	80	81	96	97	112	113	128	
	129	256			Sin H	129	144	145	160	161	176	177	192	193	208	209	224	225	240	241	256	
<u>2</u>	257	384		P	Con H	257	272	273	288	289	304	305	320	321	336	337	352	353	368	369	384	
	385	512			Sin H	385	400	401	416	417	432	433	448	449	464	465	480	481	496	497	512	
<u>3</u>	513	640		E	Con H	513	528	529	544	545	560	561	576	577	592	593	608	609	624	625	640	
	641	768			Sin H	641	656	657	672	673	688	689	704	705	720	721	736	737	752	753	768	
<u>4</u>	769	896		VdW	Con H	769	784	785	800	801	816	817	832	833	848	849	864	865	880	881	896	
	897	1024			Sin H	897	912	913	928	929	944	945	960	961	976	977	992	993	1008	1009	1024	
<u>5</u>	1025	1152		ClogP	Con H	1025	1040	1041	1056	1057	1072	1073	1088	1089	1104	1105	1120	1121	1136	1137	1152	
	1153	1280			Sin H	1153	1168	1169	1184	1185	1200	1201	1216	1217	1232	1233	1248	1249	1264	1265	1280	
<u>6</u>	1281	1408		C	Con H	1281	1296	1297	1312	1313	1328	1329	1344	1345	1360	1361	1376	1377	1392	1393	1408	
	1409	1536			Sin H	1409	1424	1425	1440	1441	1456	1457	1472	1473	1488	1489	1504	1505	1520	1521	1536	
<u>7</u>	1537	1664		D	Con H	1537	1552	1553	1568	1569	1584	1585	1600	1601	1616	1617	1632	1633	1648	1649	1664	
	1665	1792			Sin H	1665	1680	1681	1696	1697	1712	1713	1728	1729	1744	1745	1760	1761	1776	1777	1792	
<u>8</u>	1793	1920		SP	Con H	1793	1808	1809	1824	1825	1840	1841	1856	1857	1872	1873	1888	1889	1904	1905	1920	
	1921	2048			Sin H	1921	1936	1937	1952	1953	1968	1969	1984	1985	2000	2001	2016	2017	2032	2033	2048	
<u>9</u>	2049	2176		R	Con H	2049	2064	2065	2080	2081	2096	2097	2112	2113	2128	2129	2144	2145	2160	2161	2176	
	2177	2304			Sin H	2177	2192	2193	2208	2209	2224	2225	2240	2241	2256	2257	2272	2273	2288	2289	2304	
<u>10</u>	2305	2432		S	Con H	2305	2320	2321	2336	2337	2352	2353	2368	2369	2384	2385	2400	2401	2416	2417	2432	
	2433	2560			Sin H	2433	2448	2449	2464	2465	2480	2481	2496	2497	2512	2513	2528	2529	2544	2545	2560	
<u>11</u>				GEN																		

Mod	Inicio	Fin	Base a átomo		Total		Aceptor de enlaces de H		C en cadena alifática		Donador de enlaces de H		Halógenos		Grupo Metilo Terminal		Átomo de C en aromáticos		Heteroátomos	
12	2561	2688	MA	Con H	2561	2576	2577	2592	2593	2608	2609	2624	2625	2640	2641	2656	2657	2672	2673	2688
	2689	2816		Sin H	2689	2704	2705	2720	2721	2736	2737	2752	2753	2768	2769	2784	2785	2800	2801	2816
13	2817	2944	P	Con H	2817	2832	2833	2848	2849	2864	2865	2880	2881	2896	2897	2912	2913	2928	2929	2944
	2945	3072		Sin H	2945	2960	2961	2976	2977	2992	2993	3008	3009	3024	3025	3040	3041	3056	3057	3072
14	3073	3200	E	Con H	3073	3088	3089	3104	3105	3120	3121	3136	3137	3152	3153	3168	3169	3184	3185	3200
	3201	3328		Sin H	3201	3216	3217	3232	3233	3248	3249	3264	3265	3280	3281	3296	3297	3312	3313	3328
15	3329	3456	VdW	Con H	3329	3344	3345	3360	3361	3376	3377	3392	3393	3408	3409	3424	3425	3440	3441	3456
	3457	3584		Sin H	3457	3472	3473	3488	3489	3504	3505	3520	3521	3536	3537	3552	3553	3568	3569	3584
16	3585	3712	ClogP	Con H	3585	3600	3601	3616	3617	3632	3633	3648	3649	3664	3665	3680	3681	3696	3697	3712
	3713	3840		Sin H	3713	3728	3729	3744	3745	3760	3761	3776	3777	3792	3793	3808	3809	3824	3825	3840
17	3841	3968	C	Con H	3841	3856	3857	3872	3873	3888	3889	3904	3905	3920	3921	3936	3937	3952	3953	3968
	3969	4096		Sin H	3969	3984	3985	4000	4001	4016	4017	4032	4033	4048	4049	4064	4065	4080	4081	4096
18	4097	4224	D	Con H	4097	4112	4113	4128	4129	4144	4145	4160	4161	4176	4177	4192	4193	4208	4209	4224
	4225	4352		Sin H	4225	4240	4241	4256	4257	4272	4273	4288	4289	4304	4305	4320	4321	4336	4337	4352
19	4353	4480	SP	Con H	4353	4368	4369	4384	4385	4400	4401	4416	4417	4432	4433	4448	4449	4464	4465	4480
	4481	4608		Sin H	4481	4496	4497	4512	4513	4528	4529	4544	4545	4560	4561	4576	4577	4592	4593	4608
20	4609	4736	R	Con H	4609	4624	4625	4640	4641	4656	4657	4672	4673	4688	4689	4704	4705	4720	4721	4736
	4737	4864		Sin H	4737	4752	4753	4768	4769	4784	4785	4800	4801	4816	4817	4832	4833	4848	4849	4864
21	4865	4992	S	Con H	4865	4880	4881	4896	4897	4912	4913	4928	4929	4944	4945	4960	4961	4976	4977	4992
	4993	5120		Sin H	4993	5008	5009	5024	5025	5040	5041	5056	5057	5072	5073	5088	5089	5104	5105	5120
22			GEN																	

Mod	Inicio	Fin	Base a átomo		Total	Aceptor de		C en		Donador		Halógenos		Grupo		Átomo de C		Heteroátomos		
						enlaces de H		cadena alifática		de enlaces de H				Metilo Terminal		en aromáticos				
23	5121	5248	MA	Con H	5121	5136	5137	5152	5153	5168	5169	5184	5185	5200	5201	5216	5217	5232	5233	5248
	5249	5376		Sin H	5249	5264	5265	5280	5281	5296	5297	5312	5313	5328	5329	5344	5345	5360	5361	5376
24	5377	5504	P	Con H	5377	5392	5393	5408	5409	5424	5425	5440	5441	5456	5457	5472	5473	5488	5489	5504
	5505	5632		Sin H	5505	5520	5521	5536	5537	5552	5553	5568	5569	5584	5585	5600	5601	5616	5617	5632
25	5633	5760	E	Con H	5633	5648	5649	5664	5665	5680	5681	5696	5697	5712	5713	5728	5729	5744	5745	5760
	5761	5888		Sin H	5761	5776	5777	5792	5793	5808	5809	5824	5825	5840	5841	5856	5857	5872	5873	5888
26	5889	6016	VdW	Con H	5889	5904	5905	5920	5921	5936	5937	5952	5953	5968	5969	5984	5985	6000	6001	6016
	6017	6144		Sin H	6017	6032	6033	6048	6049	6064	6065	6080	6081	6096	6097	6112	6113	6128	6129	6144
27	6145	6272	ClogP	Con H	6145	6160	6161	6176	6177	6192	6193	6208	6209	6224	6225	6240	6241	6256	6257	6272
	6273	6400		Sin H	6273	6288	6289	6304	6305	6320	6321	6336	6337	6352	6353	6368	6369	6384	6385	6400
28	6401	6528	C	Con H	6401	6416	6417	6432	6433	6448	6449	6464	6465	6480	6481	6496	6497	6512	6513	6528
	6529	6656		Sin H	6529	6544	6545	6560	6561	6576	6577	6592	6593	6608	6609	6624	6625	6640	6641	6656
29	6657	6784	D	Con H	6657	6672	6673	6688	6689	6704	6705	6720	6721	6736	6737	6752	6753	6768	6769	6784
	6785	6912		Sin H	6785	6800	6801	6816	6817	6832	6833	6848	6849	6864	6865	6880	6881	6896	6897	6912
30	6913	7040	SP	Con H	6913	6928	6929	6944	6945	6960	6961	6976	6977	6992	6993	7008	7009	7024	7025	7040
	7041	7168		Sin H	7041	7056	7057	7072	7073	7088	7089	7104	7105	7120	7121	7136	7137	7152	7153	7168
31	7169	7296	R	Con H	7169	7184	7185	7200	7201	7216	7217	7232	7233	7248	7249	7264	7265	7280	7281	7296
	7297	7424		Sin H	7297	7312	7313	7328	7329	7344	7345	7360	7361	7376	7377	7392	7393	7408	7409	7424
32	7425	7552	S	Con H	7425	7440	7441	7456	7457	7472	7473	7488	7489	7504	7505	7520	7521	7536	7537	7552
	7553	7680		Sin H	7553	7568	7569	7584	7585	7600	7601	7616	7617	7632	7633	7648	7649	7664	7665	7680
33			GEN																	

Mod	Inicio	Fin	Base a átomo		Total	Aceptor de enlaces de H		C en cadena alifática		Donador de enlaces de H		Halógenos		Grupo Metilo Terminal		Átomo de C en aromáticos		Heteroátomos			
34	7553	7680	IL PM	MA	Sin H	7681	7696	7697	7712	7713	7728	7729	7744	7745	7760	7761	7776	7777	7792	7793	7808
35	7681	7808		P	Sin H	7809	7824	7825	7840	7841	7856	7857	7872	7873	7888	7889	7904	7905	7920	7921	7936
36	7809	7936		E	Sin H	7937	7952	7953	7968	7969	7984	7985	8000	8001	8016	8017	8032	8033	8048	8049	8064
37	7937	8064		VdW	Sin H	8065	8080	8081	8096	8097	8112	8113	8128	8129	8144	8145	8160	8161	8176	8177	8192
38	8065	8192		ClogP	Sin H	8193	8208	8209	8224	8225	8240	8241	8256	8257	8272	8273	8288	8289	8304	8305	8320
39	8193	8320		C	Sin H	8321	8336	8337	8352	8353	8368	8369	8384	8385	8400	8401	8416	8417	8432	8433	8448
40	8321	8448		D	Sin H	8449	8464	8465	8480	8481	8496	8497	8512	8513	8528	8529	8544	8545	8560	8561	8576
41	8449	8576		SP	Sin H	8577	8592	8593	8608	8609	8624	8625	8640	8641	8656	8657	8672	8673	8688	8689	8704
42	8577	8704		R	Sin H	8705	8720	8721	8736	8737	8752	8753	8768	8769	8784	8785	8800	8801	8816	8817	8832
43	8705	8832		S	Sin H	8833	8848	8849	8864	8865	8880	8881	8896	8897	8912	8913	8928	8929	8944	8945	8960
44			GEN																		
45	GENERAL IL NS +SS+DS+PM																				

ANEXO II: Parámetros estadísticos de las validaciones cruzadas (VC) llevadas a cabo en los tres modelos seleccionados tras el ensamblaje.

VC	MODELO 22						MODELO 26						MODELO 45					
	Modelos	C	Q	Sens.	Esp.	FAR	Modelos	C	Q	Sens.	Esp.	FAR	Modelos	C	Q	Sens.	Esp.	FAR
5%	1	0,85	92,584	91,80	91,30	6,81	1	0,85	92,584	91,80	91,30	6,81	1	0,91	95,455	95,63	94,09	4,68
	2	0,83	91,866	89,62	91,62	6,38	2	0,85	92,823	92,90	90,91	7,23	2	0,91	95,455	95,63	94,09	4,68
	3	0,85	92,584	90,16	92,70	5,53	3	0,84	92,105	91,26	90,76	7,23	3	0,91	95,455	95,63	94,09	4,68
	4	0,84	92,124	90,76	91,26	6,81	4	0,85	92,840	91,30	92,31	5,96	4	0,91	95,465	96,20	93,65	5,11
	5	0,84	92,345	89,62	92,66	5,53	5	0,84	92,345	91,26	91,26	6,81	5	0,91	95,455	95,63	94,09	4,68
	6	0,84	92,105	89,62	92,13	5,96	6	0,84	92,105	90,16	91,67	6,38	6	0,91	95,455	95,63	94,09	4,68
	7	0,84	92,105	90,16	91,67	6,38	7	0,86	93,062	90,16	93,75	4,68	7	0,91	95,455	96,17	93,62	5,11
	8	0,85	92,584	90,16	92,70	5,53	8	0,85	92,584	90,71	92,22	5,96	8	0,91	95,455	95,08	94,57	4,26
	9	0,85	92,584	90,71	92,22	5,96	9	0,85	92,823	90,16	93,22	5,11	9	0,90	95,215	95,63	93,58	5,11
	10	0,84	92,105	89,62	92,13	5,96	10	0,87	93,541	91,26	93,82	4,68	10	0,91	95,694	95,63	94,59	4,26
	11	0,84	91,866	91,26	90,27	7,66	11	0,85	92,823	89,62	93,71	4,68	11	0,91	95,455	95,63	94,09	4,68
	12	0,85	92,823	90,16	93,22	5,11	12	0,87	93,780	93,99	91,98	6,38	12	0,91	95,694	96,17	94,12	4,68
	13	0,84	92,105	89,62	92,13	5,96	13	0,87	93,541	92,90	92,39	5,96	13	0,91	95,694	95,63	94,59	4,26
	14	0,84	92,086	90,16	91,67	6,41	14	0,86	93,046	91,80	92,31	5,98	14	0,91	95,444	95,63	94,09	4,70
	15	0,84	92,105	90,76	91,26	6,84	15	0,85	92,584	89,67	93,22	5,13	15	0,90	95,215	95,65	93,62	5,13
	16	0,85	92,584	92,39	90,91	7,26	16	0,85	92,823	89,13	94,25	4,27	16	0,90	95,215	94,57	94,57	4,27
	17	0,85	92,584	92,39	90,91	7,26	17	0,86	93,301	90,76	93,82	4,70	17	0,92	95,933	96,74	94,18	4,70
	18	0,85	92,584	92,39	90,91	7,26	18	0,86	93,062	89,67	94,29	4,27	18	0,91	95,455	96,20	93,65	5,13
	19	0,84	92,345	89,13	93,18	5,13	19	0,85	92,345	88,04	94,19	4,27	19	0,90	95,215	95,65	93,62	5,13
	20	0,84	92,105	90,22	91,71	6,41	20	0,86	93,062	91,30	92,82	5,56	20	0,90	95,215	94,57	94,57	4,27

10%	1	0,85	92,677	90,80	92,40	5,86	1	0,85	92,424	91,38	91,38	6,76	1	0,89	94,697	94,83	93,22	5,41
	2	0,83	91,667	90,80	90,29	7,66	2	0,85	92,424	91,38	91,38	6,76	2	0,91	95,707	95,98	94,35	4,50
	3	0,86	93,182	90,23	94,01	4,50	3	0,85	92,424	90,23	92,35	5,86	3	0,90	94,949	94,83	93,75	4,95
	4	0,84	92,172	89,08	92,81	5,41	4	0,84	92,172	89,08	92,81	5,41	4	0,90	95,202	95,40	93,79	4,95
	5	0,84	91,919	89,66	91,76	6,31	5	0,85	92,424	89,66	92,86	5,41	5	0,92	95,960	95,98	94,89	4,05
	6	0,85	92,677	90,80	92,40	5,86	6	0,87	93,434	90,80	94,05	4,50	6	0,91	95,455	95,40	94,32	4,50
	7	0,84	92,172	90,23	91,81	6,31	7	0,87	93,687	91,38	94,08	4,50	7	0,89	94,697	95,40	92,74	5,86
	8	0,84	92,172	90,17	91,76	6,28	8	0,86	93,182	91,33	92,94	5,38	8	0,92	95,960	96,53	94,35	4,48
	9	0,85	92,424	90,75	91,81	6,28	9	0,84	92,172	89,60	92,26	5,83	9	0,91	95,455	95,95	93,79	4,93
	10	0,85	92,677	90,17	92,86	5,38	10	0,88	93,939	91,91	94,08	4,48	10	0,91	95,707	94,22	95,88	3,14
15%	1	0,84	92,021	90,24	91,36	6,60	1	0,86	93,351	90,85	93,71	4,72	1	0,91	95,479	96,95	92,98	5,66
	2	0,83	91,489	88,41	91,77	6,13	2	0,84	92,287	91,46	90,91	7,08	2	0,90	94,947	95,73	92,90	5,66
	3	0,88	93,883	92,07	93,79	4,72	3	0,87	93,617	93,90	91,67	6,60	3	0,92	96,011	96,34	94,61	4,25
	4	0,87	93,617	90,85	94,30	4,25	4	0,87	93,351	93,90	91,12	7,08	4	0,94	96,809	96,95	95,78	3,30
	5	0,85	92,553	89,63	93,04	5,19	5	0,86	93,085	92,07	92,07	6,13	5	0,90	95,213	96,34	92,94	5,66
	6	0,84	92,287	90,24	91,93	6,13	6	0,86	93,351	90,85	93,71	4,72	6	0,89	94,681	95,12	92,86	5,66
	7	0,84	92,188	89,66	92,86	5,71	7	0,86	93,229	90,80	94,05	4,76	7	0,90	95,052	95,40	93,79	5,24
20%	1	0,86	93,201	91,61	92,81	5,56	1	0,87	93,484	94,19	91,25	7,07	1	0,92	96,034	96,77	94,34	4,55
	2	0,85	92,635	90,32	92,72	5,56	2	0,86	92,918	90,32	93,33	5,05	2	0,90	95,184	96,13	93,13	5,56
	3	0,85	92,614	90,91	92,11	6,06	3	0,86	93,182	92,21	92,21	6,06	3	0,90	94,886	94,81	93,59	5,05
	4	0,83	91,738	91,56	89,81	8,12	4	0,86	93,162	93,51	91,14	7,11	4	0,93	96,581	98,05	94,38	4,57
	5	0,85	92,593	89,61	93,24	5,08	5	0,86	92,877	91,56	92,16	6,09	5	0,91	95,442	96,10	93,67	5,08
25%	1	0,83	91,818	87,59	93,38	4,86	1	0,83	91,818	90,34	90,97	7,03	1	0,88	94,242	94,48	92,57	5,95
	2	0,85	92,424	91,03	91,67	6,49	2	0,89	94,545	93,10	94,41	4,32	2	0,91	95,455	95,86	93,92	4,86
	3	0,85	92,727	91,03	92,31	5,95	3	0,87	93,636	93,10	92,47	5,95	3	0,93	96,667	97,24	95,27	3,78
	4	0,85	92,424	90,97	91,61	6,45	4	0,84	92,121	87,50	94,03	4,30	4	0,91	95,455	95,14	94,48	4,30

ANEXO III: Parámetros estadísticos tras la proceso de aleatorización de la variable respuesta en los tres modelos seleccionados por los modelos multclasificadores.

Modelo	Intercambio	C	Q	Sens.	Esp.	FAR
22	I15%	0,78	89,318	87,56	88,02	9,312
	I10%	0,74	87,045	83,94	86,17	10,526
	I20%	0,53	77,045	67,88	77,06	15,789
	I30%	0,41	71,136	58,55	70,63	19,028
	I40%	0,19	61,136	40,41	58,21	22,672
	I50%	0,13	58,636	35,23	54,40	23,077
26	I15%	0,79	89,773	88,08	88,54	8,907
	I10%	0,71	85,682	82,90	84,21	12,146
	I20%	0,47	74,091	62,18	74,53	16,599
	I30%	0,35	68,636	50,78	69,50	17,409
	I40%	0,17	60,455	34,20	58,41	19,028
	I50%	0,19	60,909	44,56	56,95	26,316
45	I15%	0,85	92,500	93,26	90,00	8,097
	I10%	0,75	87,500	86,01	85,57	11,336
	I20%	0,59	79,773	73,06	79,21	14,980
	I30%	0,43	72,045	66,84	68,62	23,887
	I40%	0,22	62,273	47,15	58,71	25,911
	I50%	0,15	59,318	40,93	54,86	26,316

Validation of a modified fluorimetric assay for the screening of trichomonacidal drugs

Alexandra Ibáñez Escribano^{1/+}, Alfredo Meneses Marcel², Yanetsy Machado Tugores², Juan José Nogal Ruiz¹, Vicente J Arán Redó³, José Antonio Escario García-Trevijano¹, Alicia Gómez Barrio¹

¹Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia ³Instituto de Química Médica, Moncloa Campus of International Excellence, Universidad Complutense de Madrid, Universidad Politécnica de Madrid, Centro Superior de Investigaciones Científicas, Madrid, España

²Department of Parasitology, Chemical Bioactive Center, Central University of Las Villas, Villa Clara, Cuba

A fluorimetric microassay that uses a redox dye to determine the viability of the flagellate Trichomonas vaginalis has been optimised to provide a more sensitive method to evaluate potential trichomonacidal compounds. Resazurin has been used in recent years to test drugs against different parasites, including trichomonadid protozoa; however, the reproducibility of these resazurin-based methods in our laboratory has been limited because the flagellate culture medium spontaneously reduces the resazurin. The objective of this work was to refine the fluorimetric microassay method previously developed by other research groups to reduce the fluorescence background generated by the media and increase the sensitivity of the screening assay. The experimental conditions, time of incubation, resazurin concentration and media used in the microtitre plates were adjusted. Different drug sensitivity studies against T. vaginalis were developed using the 5-nitroimidazole reference drugs, new 5-nitroindazolinones and 5-nitroindazole synthetic derivatives. Haemocytometer count results were compared with the resazurin assay using a 10% solution of 3 mM resazurin dissolved in phosphate buffered saline with glucose (1 mg/mL). The fluorimetric assay and the haemocytometer counts resulted in similar percentages of trichomonacidal activity in all the experiments, demonstrating that the fluorimetric microtitre assay has the necessary accuracy for high-throughput screening of new drugs against T. vaginalis.

Key words: *Trichomonas vaginalis* - antitrichomonal agents - drug screening assay - resazurin - high-throughput screening assays

Trichomoniasis is one of the most common sexually transmitted diseases, with a prevalence of 180 million infections worldwide per year, which is higher than the number of reported cases of syphilis, chlamydia and gonorrhoea (Aggarwal & Shier 2008). This cosmopolitan parasite can cause a wide range of clinical symptoms in the genitourinary tract, including vaginitis, cervicitis, endometritis and vulvitis in women and urethritis and prostatitis in men (Ali & Nozaki 2007). However, the infection in males is generally asymptomatic and they are typically considered silent carriers of the disease (Cudmore et al. 2004).

Metronidazole and related 5-nitroimidazole derivatives are potent drugs used to treat infections caused by anaerobic or microaerophilic protozoa and bacteria, although resistance to these drugs has been demonstrated both in *Trichomonas vaginalis* isolates sampled from patients refractory to treatment (Wendel & Workowski 2007, Aggarwal & Shier 2008, Kissinger et al. 2008) and in laboratory-developed resistant isolates (Dunne et al. 2003). When the trichomonacide metronidazole was first introduced in 1959, its reported cure rate was approximately 95%, but within two years of its introduction, the first

case of metronidazole resistance was reported in Canada (Lossick 1990). Clinical resistance has now been reported in most areas of the world (Dunne et al. 2003, Wendel & Workowski 2007). Metronidazole is classified by the Food and Drug Administration as pregnancy category B, therefore some clinicians have used clotrimazole as an alternative treatment for trichomoniasis in pregnant women concerned about the possible foetal damage caused by trichomoniasis (Swygard et al. 2004).

Recently, our group developed a quantitative structure-activity relationship model for the *in silico* prediction of new trichomonacidal products. However, experimental corroboration *in vitro* relies on the haemocytometer count (Marrero-Ponce et al. 2009), which is a laborious, time consuming, insensitive and subjective procedure.

Alamar Blue[®] has been used as a rapid, efficient and sensitive method for the antibacterial screening of new compounds against *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus* spp and *Staphylococcus* spp (Barrow et al. 2007, Daryae et al. 2009, Flemming et al. 2009), the determination of antifungal activity (*Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*) (Bowman et al. 2002, Repp et al. 2007), the screening of antiviral compounds (influenza virus) (Mo et al. 2008) and the screening of antiprotozoal drugs (*T. vaginalis*, *Giardia duodenalis*, *Trypanosoma brucei*, *Leishmania* spp, *Acanthamoeba* spp) (Raz et al. 1997, Mikus & Steverding 2000, Campos Aldrete et al. 2005, McBride et al. 2005).

Alamar Blue[®] and its major component, resazurin, are blue and non-fluorescent dyes that become pink and fluorescent (resorufin) due to the chemical reduction of oxidoreductases present in viable cells (O'Brien et al. 2000).

Financial support: AECID (A/030156/10), MICINN (SAF2009-10399), CEI-Campus Moncloa

+ Corresponding author: alexandraibanez@pdi.ucm.es

Received 21 December 2011

Accepted 19 March 2012



A sequential procedure for rapid and accurate identification of putative trichomonacidal agents



Alexandra Ibáñez-Escribano^{a,b,*}, Alfredo Meneses-Marcel^c, Yovani Marrero-Ponce^d, Juan José Nogal-Ruiz^{a,b}, Vicente J. Arán^{a,e}, Alicia Gómez-Barrio^{a,b}, José Antonio Escario^{a,b}

^a Campus of International Excellence Moncloa, Madrid, Spain

^b Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Pza. Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

^c Departamento de Parasitología, Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, 54830 Villa Clara, Cuba

^d Unit of Computer-Aided Molecular "Biosilico" Discovery and Bioinformatic Research (CAMD-BIR Unit), Faculty of Chemistry-Pharmacy, Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, 54830 Villa Clara, Cuba

^e Instituto de Química Médica (IQM), CSIC, C/ Juan de la Cierva n° 3, 28006 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 March 2014

Received in revised form 17 June 2014

Accepted 24 July 2014

Available online 6 August 2014

Keywords:

In vitro

In vivo

QSAR

Trichomonas vaginalis

TOMOCOMD-CARDD

Virtual screening

ABSTRACT

In the current report, a sequential step-wise methodology based on *in silico*, *in vitro* and *in vivo* experimental procedures for the prompt detection of potential trichomonacidal drugs is proposed. A combinatorial of 12 QSAR (Quantitative Structure–Activity Relationship) models based on Linear Discrimination Analysis (LDA) are suggested for the rational identification of new trichomonacidal drugs from virtual screening of *in house* chemical libraries and drug databases. Subsequently, compounds selected as potential anti-trichomonas are screened *in vitro* against *Trichomonas vaginalis*. Finally, molecules with specific trichomonacidal activity are evaluated *in vivo*. Herein, different molecules were exposed to the proposed methodology. Firstly, the agents were virtually screened and two of the eight molecules (G-1 and dimetridazole) were classified as trichomonacidal by the 12 models. Subsequently both drugs were proved *in vitro* and *in vivo* following the workflow procedure. Although a remarkable *in vitro* activity was observed in both cases, dimetridazole achieved higher MIC₁₀₀ activity than metronidazole against the resistant isolate. Furthermore, the *in vivo* models showed a remarkable reduction of lesions of more than 55% in both compounds. These observations support the current flowchart screening and suggest the use of dimetridazole as a promising drug-like scaffold for novel therapeutic alternatives against *T. vaginalis* resistant infections.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Trichomonas vaginalis is the causative agent of trichomonosis (or trichomoniasis), one of the most important sexually transmitted infections (STI) in terms of prevalence and association with other STI (WHO, 2012). This parasitic disease is one of the main causes of vaginitis in women and nongonococcal urethritis in men (Krieger et al., 1993). In addition, *T. vaginalis* infection has been associated with diverse health problems, including an increased risk of acquiring HIV-1 (McClelland et al., 2007) and development of cervical neoplasia and prostate cancer (Sutcliffe et al., 2012; Viikki, 2000).

In 1960, metronidazole (MTZ) was introduced for the treatment of trichomonosis (Durel et al., 1960). Although the cure rates were about

95% with systemic treatment during the first years of its introduction, multiple MTZ-resistant cases have been described worldwide (Wendel and Workowski, 2007). It is estimated that between 2.5% and 10% of all clinical cases of trichomonosis are caused by *T. vaginalis* resistant strains (Wendel and Workowski, 2007). Furthermore, the iatrogenic side effects of nitroimidazoles and the absence of efficient therapeutic alternatives make critical the identification of novel putative trichomonacidal agents.

In this sense, the development of virtual tools and optimized high-throughput screening procedures with a considerably reduction in costs, efforts and time could facilitate the obtention of alternative treatments for this sexually transmitted "neglected infection" (Hotez, 2009). Recent advances in drug discovery have led to a large number of synthetic molecules and natural compounds stored in commercial and chemical libraries available for *in vitro* tests. Moreover, many investigators have orientated their studies in screening new scaffolds in order to search natural and chemical drugs against this protozoon. The virtual screening (VS) of small molecular libraries renders an important aspect of a sophisticated approach to drug discovery. The development of VS methods expands the possibilities of screening molecules that can be easily obtained through the purchase of chemical catalogs. Also as a

* Corresponding author at: Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Pza. Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 394 18 17; fax: +34 91 394 18 15.

E-mail addresses: alexandraibanez@ucm.es (A. Ibáñez-Escribano), ameneses@uclv.edu.cu (A. Meneses-Marcel), yovanimp@uclv.edu.cu (Y. Marrero-Ponce), jnagal@yahoo.es (J.J. Nogal-Ruiz), vjaran@iqm.csic.es (V.J. Arán), agbarrio@ucm.es (A. Gómez-Barrio), escario@ucm.es (J.A. Escario).

Trypanocidal, trichomonacidal and cytotoxic components of cultivated *Artemisia absinthium* Linnaeus (Asteraceae) essential oil

Rafael Alberto Martínez-Díaz^{1/+}, Alexandra Ibáñez-Escribano², Jesús Burillo³, Lorena de las Heras¹, Gema del Prado¹, M Teresa Agulló-Ortuño⁴, Luis F Julio⁵, Azucena González-Coloma⁵

¹Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Preventiva, Salud Pública y Microbiología, Madrid, Spain ²Universidad Complutense de Madrid, Campus de Excelencia Internacional Moncloa, Facultad de Farmacia, Departamento de Parasitología, Madrid, Spain ³Gobierno de Aragón, Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria, Madrid, Spain ⁴Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Translational Oncology, Madrid, Spain ⁵Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Instituto de Ciencias Agrarias, Madrid, Spain

Artemisia absinthium is an aromatic and medicinal plant of ethnopharmacological interest and it has been widely studied. The use of *A. absinthium* based on the collection of wild populations can result in variable compositions of the extracts and essential oils (EOs). The aim of this paper is the identification of the active components of the vapour pressure (VP) EO from a selected and cultivated *A. absinthium* Spanish population (T2-11) against two parasitic protozoa with different metabolic pathways: *Trypanosoma cruzi* and *Trichomonas vaginalis*. VP showed activity on both parasites at the highest concentrations. The chromatographic fractionation of the VP T2-11 resulted in nine fractions (VLC1-9). The chemical composition of the fractions and the antiparasitic effects of fractions and their main compounds suggest that the activity of the VP is related with the presence of trans-caryophyllene and dihydrochamazulene (main components of fractions VLC1 and VLC2 respectively). Additionally, the cytotoxicity of VP and fractions has been tested on several tumour and no tumour human cell lines. Fractions VLC1 and VLC2 were not cytotoxic against the nontumoural cell line HS5, suggesting selective antiparasitic activity for these two fractions. The VP and fractions inhibited the growth of human tumour cell lines in a dose-dependent manner.

Key words: *Artemisia absinthium* - essential oil - activity - *Trypanosoma cruzi* - *Trichomonas vaginalis* - cytotoxicity

The *Artemisia* genus belongs to the family Compositae (Asteraceae) and consists of about 500 species distributed through the world. *Artemisia absinthium* L. is an aromatic and medicinal plant of ethnopharmacological interest (Bora & Sharma 2010, Lachenmeier 2010). The composition and biological effects of the essential oil (EO) and the extracts of *A. absinthium* have been widely studied. Different researches have demonstrated its antimicrobial and antiprotozoal effects against *Leishmania aethiopica*, *Leishmania donovani*, *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi* (Juteau et al. 2003, Tariku et al. 2011, Erel et al. 2012, Nasrabadi et al. 2012, Bailén et al. 2013, Bachrouh et al. 2015).

Among the major *A. absinthium* EO components reported are α and β -thujone, myrcene, trans-sabinyl acetate, β -pinene, 1,8-cineole, camphor, cis-epoxyocimene, chrysanthenyl acetate, sabinene, myrtenol, bornyl acetate, artemisiaketone, linalool, hydrocarbon monoterpenes, sesquiterpene lactones (Pino et al. 1997, Jaenson

et al. 2005, Kordali et al. 2005, Geszprych et al. 2010, Martín et al. 2011, Erel et al. 2012, Judzentiene et al. 2012, Sharopov et al. 2012, Tehrani et al. 2012, Umpiérrez et al. 2012) and mixtures of some of these components, depending on the plant origin (Chialva et al. 1983, Carnat et al. 1992, Geszprych et al. 2010, Bailén et al. 2013). In fact, the use of *A. absinthium* based on the collection of wild populations can result in variable compositions of the extracts and EOs.

A. absinthium is abundant in the mountains of the Iberian Peninsula, where seven chemotypes have been described (Ariño et al. 1999). Two Spanish populations of wormwood have been domesticated for experimental cultivation in the field and under controlled conditions (Burillo 2009, Martín et al. 2011, González-Coloma et al. 2012a). Based on these results, a long-term field cultivation of selected *A. absinthium* plants has been established for further valorisation of its extracts.

The aim of the present paper is the identification of the active components of the vapour pressure (VP) EO from a selected and cultivated *A. absinthium* Spanish population against two parasitic protozoa with different metabolic pathways, *T. cruzi* and *Trichomonas vaginalis*.

T. cruzi is the aetiologic agent of Chagas disease, a frequently fatal illness affecting the heart and gastrointestinal systems. An estimated eight million people in Latin America are infected with this pathogen and it is also spreading to the United States of America, Canada and many parts of Europe and the Western Pacific as a result of migratory flows (Rassi Jr et al. 2010). Only two drugs, nifurtimox (NFX) and benznidazole are in use

doi: 10.1590/0074-02760140129

Financial support: MICINN (CTQ2012-38219-C03-01), JAE-CSIC (predoctoral fellowship to LFJ), CEI Moncloa (PICATA predoctoral fellowship to AI-E)

+ Corresponding author: rafael.martinez@uam.es

Received 27 March 2015

Accepted 3 June 2015



Original article

Synthesis and *in vitro* and *in vivo* biological evaluation of substituted nitroquinoxalin-2-ones and 2,3-diones as novel trichomonacidal agents



Alexandra Ibáñez-Escribano^{a, b}, Felipe Reviriego^{a, c}, Juan José Nogal-Ruiz^{a, b},
Alfredo Meneses-Marcel^d, Alicia Gómez-Barrio^{a, b}, José Antonio Escario^{a, b, **},
Vicente J. Arán^{a, c, *}

^a Moncloa Campus of International Excellence (UCM-UPM & CSIC), Spain

^b Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

^c Instituto de Química Médica (IQM), CSIC, c/Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain

^d Centro de Bioactivos Químicos, Universidad Central de Las Villas, 54830 Santa Clara, Villa Clara, Cuba

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 November 2014

Received in revised form

16 February 2015

Accepted 1 March 2015

Available online 3 March 2015

Dedicated to our dear friend and colleague Prof. José Elguero (IQM, CSIC, Madrid) for his outstanding contribution to heterocyclic chemistry, on the occasion of his 80th birthday.

Keywords:

Antiprotozoal drugs

Nitroheterocycles

Trichomonas vaginalis

Quinoxaline

Lipinski's rule

ABSTRACT

Two series of ten novel 7-nitroquinoxalin-2-ones and ten 6-nitroquinoxaline-2,3-diones with diverse substituents at positions 1 and 4 were synthesized and evaluated against the sexually transmitted parasite *Trichomonas vaginalis*. Furthermore, diverse molecular and drug-likeness properties were analyzed to predict the oral bioavailability following the Lipinski's "rule of five". 7-Nitroquinoxalin-2-one derivatives displayed moderate to high *in vitro* activity while the efficiency of most nitroquinoxaline-2,3-diones was rather low; both kinds of compounds did not show cytotoxic effects in mammalian cells. 7-Nitro-4-(3-piperidinopropyl)quinoxalin-2-one **9** achieved the highest trichomonacidal activity (IC₅₀ = 18.26 μM) and was subsequently assayed *in vivo* in a murine model of trichomonosis. A 46.13% and a 50.70% reduction of pathogenic injuries were observed in the experimental groups treated orally during 7 days with 50 mg/kg and 100 mg/kg doses. The results obtained in the biological assays against *T. vaginalis* indicate that compounds with ω-(dialkylamino)alkyl substituents and a keto group at positions 4 and 2 of quinoxaline ring, respectively, provide interesting structural cores to develop novel prototypes to enhance the nitroquinoxalinones activity as trichomonacidal agents with interesting ADME properties according to virtual screening analysis.

© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Trichomonas vaginalis is a microaerophilic flagellate responsible of one of the most important sexually transmitted infections (STI) with an incidence of more than 276 million cases per year in individuals between the ages of 15–49 [1]. Trichomonosis is associated with adverse reproductive health outcomes [2], pelvic inflammatory disease [3] and development of prostate [4,5] and

cervical neoplasia [6,7]. Furthermore, *T. vaginalis* infection increases risk of transmission and acquisition of human immunodeficiency virus (HIV-1) [8]. Therefore, prevention and control of this STI is one of the main Millennium Development Goals towards to prevent and reduce HIV infections [9]. Although nearly one million people is infected by a sexually transmitted pathogen every day [9], trichomonosis continues being one of the "neglected diseases of poverty" [10] and the STI with the lowest public health attention in relation to other bacterial or viral STI [11]. Metronidazole and tinidazole (5-nitroimidazole derivatives) are the only drugs approved by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of trichomonosis [12] since the early 60s. Metronidazole presents a good pharmacokinetic profile [13] and high percentage of cure rates have been reported [14]; however, the development of resistance cases [15] and iatrogenic side effects [16] make necessary the search for

* Corresponding author. Instituto de Química Médica (IQM), CSIC, c/Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain.

** Corresponding author. Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain.

E-mail addresses: escario@ucm.es (J.A. Escario), vjaran@iqm.csic.es (V.J. Arán).

Estudios preliminares sobre la interacción de CD59 y *Trichomonas vaginalis*

Miguel de Górgolas Fernández-Chacón. Pablo Escario Gómez.

Grado en Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
mdegorgo@ucm.es

Tutores

Alexandra Ibáñez Escribano. José Antonio Escario.

Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia. UCM. CEI Moncloa.
alexandraibanez@ucm.es escario@ucm.es

Resumen: CD59, molécula que se encuentra en la superficie de muchas células de mamíferos, tiene la función de proteger de la lisis producida por el sistema del complemento, parte esencial en el sistema inmunitario de los Mamíferos. Esta propiedad es aprovechada por muchos organismos patógenos con el ánimo de escapar de la acción del sistema del complemento. Para ello algunos microorganismos han desarrollado la capacidad de expresar en su superficie análogos de esta molécula o bien, secuestrarla de las células del hospedador. En estudios previos llevados a cabo en el departamento de Parasitología, se ha observado por primera vez la capacidad del protozoo humano *Trichomonas vaginalis* de sustraer dicha molécula de los glóbulos rojos. En base a estos hallazgos, en el presente trabajo se han llevado a cabo distintos ensayos de lisis poniendo en contacto dos aislados distintos de *T. vaginalis* con suero bovino no descomplementado. Los resultados obtenidos en los estudios de fluorimetría determinan de manera preliminar el papel protector que CD59 ejerce sobre estos protozoos después de haber sido cocultivados con glóbulos rojos murinos.

Palabras clave: Complemento, CD59, Evasión, *Trichomonas vaginalis*.

INTRODUCCIÓN

Trichomonas vaginalis es el parásito urogenital humano causante de unas de las infecciones de transmisión sexual (ITS) más importantes del mundo, con una incidencia anual de 276 millones de casos ⁽¹⁾. *T. vaginalis* parasita los conductos genitourinarios, habiendo desarrollado diversos mecanismos para sobrevivir en un ambiente hostil expuesto a continuos cambios hormonales y de pH asociados a los ciclos menstruales de la mujer ⁽²⁾.



Sequestration of host-CD59 as potential immune evasion strategy of *Trichomonas vaginalis*



Alexandra Ibáñez-Escribano^{a,b,*}, Juan José Nogal-Ruiz^{a,b}, Jorge Pérez-Serrano^c, Alicia Gómez-Barrio^{a,b}, J. Antonio Escario^{a,b,1}, J.F. Alderete^{d,1}

^a CEI Campus Moncloa, UCM-UPM and CSIC, Madrid, Spain

^b Department of Parasitology, Faculty of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Spain

^c Department of Biomedicine and Biotechnology, School of Pharmacy, University of Alcalá de Henares, Madrid, Spain

^d School of Molecular Bioscience, College of Veterinary Medicine, Washington State University, Pullman, WA, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 December 2014

Received in revised form 20 April 2015

Accepted 4 May 2015

Available online 11 May 2015

Keywords:

Ascites
CD59
Complement
Erythrocytes
Fluorescence
Human sera
Immune evasion
Trichomonas vaginalis

ABSTRACT

Trichomonas vaginalis is known to evade complement-mediated lysis. Because the genome of *T. vaginalis* does not possess DNA sequence with homology to human protectin (CD59), a complement lysis restricting factor, we tested the hypothesis that host CD59 acquisition by *T. vaginalis* organisms mediates resistance to complement killing. This hypothesis was based on the fact that trichomonads are known to associate with host proteins. No CD59 was detected on the surface of *T. vaginalis* grown in serum-based medium using as probe anti-CD59 monoclonal antibody (MAb). We, therefore, infected mice intraperitoneally with live *T. vaginalis*, and trichomonads harvested from ascites were tested for binding of CD59. Immunofluorescence showed that parasites had surface CD59. Furthermore, as mouse erythrocytes (RBCs) possess membrane-associated CD59, and trichomonads use RBCs as a nutrient source, organisms were co-cultured with murine RBCs for one week. Parasites were shown to have detectable surface CD59. Importantly, live *T. vaginalis* with bound CD59 were compared with batch-grown parasites without surface-associated CD59 for sensitivity to complement in human serum. Trichomonads without surface-bound CD59 had a higher level of killing by complement than did parasites with surface CD59. These data show that host CD59 acquired onto the surface by live *T. vaginalis* may be an alternative mechanism for complement evasion. We describe a novel strategy by *T. vaginalis* consistent with host protein procurement by this parasite to evade the lytic action of complement.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

It is well appreciated that *Trichomonas vaginalis* is the causative agent for a major sexually transmitted infection (STI) worldwide, and this STI causes significant adverse health outcomes for both women and men (Harp and Chowdhury, 2011; WHO, 2012). A great deal is known about the complex host-parasite interrelationship and the many aspects of host pathogenesis mediated by trichomonad virulence factors (Figueroa-Angulo et al., 2012). For example, some of the many proteases synthesized by *T. vaginalis* that are regulated by iron are known to be important in

numerous aspects of the biology of the organism and are essential for host infection and survival (Alderete et al., 1992, 1995; Provenzano and Alderete, 1995; Figueroa-Angulo et al., 2012). It is known that trichomonads are sensitive to complement-mediated lysis, and high-iron-regulated cysteine proteases protect the organism from complement (Demes et al., 1988; Lehker and Alderete, 1992; Alderete et al., 1995; Figueroa-Angulo et al., 2012).

It is plausible for *T. vaginalis*, and perhaps other pathogens, to possess redundant mechanisms for immune evasion, such as for protection against complement. Thus, it is conceivable that trichomonads bind host factors important for resistance to complement. For example, membrane attack complex (MAC) lysis on autologous cells is aborted by the presence of the protein called protectin (CD59) (Meri et al., 1996; Zipfel and Skerka, 2009; Sarma and Ward, 2011). This protein is a glycosyl-phosphatidylinositol (GPI)-linked membrane protein expressed on diverse cells, including RBCs and endothelial and epithelial cells of the urogenital tract (Daniels, 1999; Farkas et al., 2002). It is known that CD59 prevents

* Corresponding author at: Department of Parasitology, Faculty of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Pza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 394 1817; fax: +34 91 394 1815.

E-mail address: alexandraibanez@ucm.es (A. Ibáñez-Escribano).

¹ These authors contributed equally to this research.



Short communication

Determination of internal transcribed spacer regions (ITS) in *Trichomonas vaginalis* isolates and differentiation among *Trichomonas* species



Alexandra Ibáñez-Escribano ^{a,b,*}, Juan José Nogal-Ruiz ^{a,b}, Vicente J. Arán ^{a,c}, José Antonio Escario ^{a,b}, Alicia Gómez-Barrio ^{a,b}, J.F. Alderete ^d

^a CEI Campus Moncloa, UCM-UPM and CSIC, Madrid, Spain

^b Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

^c Instituto de Química Médica (IQM), Spanish National Research Council (CSIC), C/Juan de la Cierva no 3, 28006 Madrid, Spain

^d School of Molecular Bioscience, College of Veterinary Medicine, Washington State University, Pullman WA, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 April 2013

Received in revised form 22 December 2013

Accepted 23 December 2013

Available online 9 January 2014

Keywords:

Trichomonas vaginalis

rDNA

Internal transcribed spacers (ITS)

Protozoa

Phylogenetic study

Clades

ABSTRACT

The nucleotide sequence of the 5.8S rRNA gene and the flanked internal transcribed spacer (ITS) regions of six *Trichomonas vaginalis* isolates with different metronidazole sensitivity and geographic origin were genotyped. A multiple sequence alignment was performed with different sequences of other isolates available at the GenBank/EMBL/DBJ databases, which revealed 5 different sequence patterns. Although a stable mutation in position 66 of the ITS1 (C66T) was observed in 26% (9/34) of the *T. vaginalis* sequences analyzed, there was 99.7% ITS nucleotide sequence identity among isolates for this sequence. The nucleotide sequence variation among other species of the genus *Trichomonas* ranged from 3.4% to 9.1%. Surprisingly, the % identity between *T. vaginalis* and *Pentatrichomonas hominis* was ~83%. There was >40% divergence in the ITS sequence between *T. vaginalis* and *Tritrichomonas* spp., including *Tritrichomonas augusta*, *Tritrichomonas muris*, and *Tritrichomonas nonconforma* and with *Tetratrichomonas prowazeki*. Dendrograms grouped the trichomonadid sequences in robust clades according to their genera. The absence of nucleotide divergence in the hypervariable ITS regions between *T. vaginalis* isolates suggests the early divergence of the parasite. Importantly, these data show this ITS1-5.8S rRNA-ITS2 region suitable for inter-species differentiation.

© 2014 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Trichomonas vaginalis is the causative agent of trichomonosis, the number one, nonviral sexually transmitted infection (STI) worldwide with an annual incidence of more than 170 million cases [1]. Infection by this protist produces a wide range of adverse clinical outcomes, such as cervical [2] and prostate cancer [3], and infertility or atypical pelvic inflammatory disease [4]. Additionally, trichomonosis also increases the predisposition to HIV [5,6]. In pregnant women, this STI is significantly associated with premature labor, low-birth-weight infants and premature rupture of the placental membranes [7].

The *T. vaginalis* isolate G3 has a genome of ~160 Mb with 65% of repeated and transposable elements as well as different proteins with domains homologous with those of bacteria, viruses, and protozoa [8]. The ribosomal genes, in particular the DNA region encoding for the 18S ribosomal RNA gene (18S rRNA), are considered one of the main genetic markers used for phylogenetic analysis due to its slow evolution and conserved nature. The rRNA genes are essential for protein synthesis

and ribosome generation and are more conserved within species than the non-transcribed spacers [9]. Internal transcribed spacers (ITS) are more variable and, therefore, may have utility for species differentiation [10,11] or even for isolate differentiation among some parasites [12,13] as ITS regions are removed via splicing during transcript processing [9]. ITS1 separates 18S rRNA from 5.8S rRNA, while ITS2 separates 5.8S rRNA from 28S rRNA. Many reports have been focused on improving the sensitivity of diagnostic methods targeting the 18S rRNA gene of *T. vaginalis* [14]. Some reports have analyzed the nucleotide sequences of the ITS1-5.8S rRNA-ITS2 to characterize phylogenetically the parabasalids [14–16]. Nonetheless, few studies have been conducted to determine the utility of the ITS region as a molecular tool for *T. vaginalis* inter- and intra-species differentiation. There is a paucity of reports studying the ITS1 region to search the intragenomic variation of parabasalid protozoa like *T. vaginalis*, as evidenced by a report on *Dientamoeba fragilis* [17].

As there have been few studies overall on the *T. vaginalis* ITS loci, we felt it to be important to determine whether the ITS1-5.8S rRNA-ITS2 genomic region is a useful tool for differentiation among *T. vaginalis* isolates themselves and for distinguishing *T. vaginalis* from other *Trichomonas* species. We, therefore, conducted a comparative analysis of the nucleotide sequences obtained from *T. vaginalis* isolates with those of other related species obtained from the GenBank/EMBL/DBJ

* Corresponding author at: Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 394 1818; fax: +34 91 394 1815.

E-mail address: alexandraibanez@ucm.es (A. Ibáñez-Escribano).



Morphological and molecular identification of *Tetratrichomonas* flagellates from the giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*)

A. Ibañez-Escribano^{a,b,*}, J.J. Nogal-Ruiz^{a,b}, M. Delclaux^c, E. Martínez-Navado^c, F. Ponce-Gordo^{a,b}

^a CEI Campus Moncloa UCM-UPM, Madrid, Spain

^b Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

^c Zoo Aquarium de Madrid, Casa de Campo s/n, 28011 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 September 2012

Accepted 20 January 2013

Keywords:

Trichomonads

Tetratrichomonas sp.

Morphological characterization

Genetic analysis

Myrmecophaga tridactyla

ABSTRACT

A tetratrichomonad flagellate found in the diarrhoeic faeces of a 5 years-old male giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) was characterised by morphological and genetic analysis. This protozoan presents four anterior flagella of unequal length and a recurrent flagellum attached to the undulating membrane without a free end portion, and a broad axostyle projection. Numerous vacuoles of different sizes containing bacteria and digestion products were found. The complete sequence of the DNA coding for the 16S rRNA-ITS1-5.8S rRNA-ITS2 region was also obtained in order to compare this isolate with other tetratrichomonad species. The sequence obtained was identical to others previously obtained by other researchers from bovines and turtles (*Geochelone* sp.). It is not easily explainable how the same organism could be found in such different hosts and locations; however these results indicate that some tetratrichomonad species could have a wide host range and could survive in a wide range of environmental conditions.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The flagellated protozoa of the genus *Tetratrichomonas* are intestinal parasites of a broad range of vertebrates (including humans) and some invertebrate hosts, such as leeches and slugs (Alexeieff, 1910, 1912; Hegner and Ratcliffe, 1927; Kozloff, 1945; Wenrich and Saxe, 1950; Andersen et al., 1962; Honigberg, 1951, 1963; Andersen and Reilly, 1965; Castella et al., 1997; Kutisova et al., 2005; Cepicka et al., 2006; Rivera et al., 2008; Mantini et al., 2009). This genus belongs to the Phylum Parabasalia (Cepicka et al., 2010), which includes unicellular eukaryotes without mitochondria and with a parabasal apparatus composed by the Golgi complex and parabasal filaments (Benchimol et al., 2001). Parabasalids do not form cysts. *Tetratrichomonas* is classified in the family Trichomonadidae, this been characterised by a non-microtubular striated fibers (costa) of the so-called type B (Honigberg et al., 1971) which underlays a lamelliform undulating membrane. In this genus, as well as in other trichomonads, the criteria commonly used for describing species has been the morphological features of

the trophozoites (size, shape, number of anterior flagella, type of undulating membrane, recurrent flagellum, the projecting part of the axostyle, location of hydrogenosomes, parabasal apparatus or nucleus) and the host species (Cepicka et al., 2006; Rivera et al., 2008). However, the unexpected diversity of this genus (Cepicka et al., 2006), the questionable characterization of some species (Walker et al., 2003; Dufernez et al., 2007; Rivera et al., 2008), the morphological similarity within species (Hibler et al., 1960; Castella et al., 1997; Cobo et al., 2003; Walker et al., 2003; Cepicka et al., 2005; Dufernez et al., 2007), and the possible existence of synonyms between some of the proposed species of *Tetratrichomonas* (Rivera et al., 2008) make it difficult to correctly identify the trichomonads found in new samples. The species that are now considered valid (Cepicka et al., 2010) are shown in Table 1.

In an outgoing study of the parasites of the animals held at the Zoo-Aquarium of Madrid, we have found trichomonads in a sample of diarrhoeic faeces collected from a 5 years old adult male giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*). The animal was received in 2007 from the Phoenix Zoo and had a history of diarrhoeic episodes treated with metronidazole and other drugs; flagellated protozoa were previously found in the diarrhoeic faeces (Martínez-Navado, unpublished).

The giant anteater is a mammal included in the order Xenarthra. It is considered a distinctive member of the Neotropical fauna and it is a threatened species (International Union for Conservation of Nature and Natural Resources (IUCN), 2012). The data of parasites

* Corresponding author at: Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, CEI Campus Moncloa (UCM-UPM), Plaza Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain. Tel.: +34 91 394 18 18; fax: +34 91 394 18 15.

E-mail addresses: alexandraibanez@pdi.ucm.es, alexandra-ibanez@hotmail.com (A. Ibañez-Escribano).