



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI

COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

**“Selección de inhibidores de la enzima triosa fosfato isomerasa de
Mycobacterium tuberculosis”**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA

P R E S E N T A

DAVID HERNÁNDEZ VIVEROS

Mexicali, Baja California

Abril del 2024



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE MEDICINA MEXICALI
COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

**CARTA DE DICTAMEN DE LA EVALUACIÓN DE LA FASE ESCRITA DEL
TRABAJO TERMINAL**

Mexicali, B.C., a 8 de marzo de 2024.

Los abajo firmantes, miembros del Jurado Dictaminador del trabajo terminal titulado “**Selección de inhibidores de la enzima triosa fosfato isomerasa de *Mycobacterium tuberculosis***”, que para obtener el Diploma de **Grado de Maestro en Ciencias en Biomedicina**, presenta el C. **David Hernández Viveros**, una vez concluida la evaluación correspondiente, hemos resuelto **APROBARLO**.

Dr. José Luis Vique Sánchez
Presidente

Dra. Ximena Castillo Tovar
Sinodal

Dr. Octavio Galindo Hernández
Sinodal

Agradecimientos

A mi tutor el D. en C. José Luis Vique Sánchez por su paciencia y constancia, sus consejos fueron útiles para escribir lo que hoy he logrado, Muchas gracias por sus palabras de motivación que fueron una guía para mí.

A mis padres por su apoyo incondicional, en cada etapa de mi vida, pero en especial en este más reciente paso, ya que sin ellos y sin su motivación no sería lo que soy ahora, ni podría convertirme en quien quiero ser. Los amo gracias por estar ahí.

A mi compañero M. en C. Ricardo Delgadillo Valles, por su colaboración y asesorías durante la fase experimental del proyecto, al Dr. Donato Antonio Rechy Iruretagoyena por facilitarme las instalaciones del laboratorio de microbiología de la Facultad, y al Dr. Rafael Martínez Miranda por su apoyo y vinculación con el Laboratorio Dorado. Gracias a los 3 por su ayuda desinteresada.

Dedicatoria

Dedico mi tesis a todos aquellos que creyeron en mí.

Abreviaturas

Ala: Alanina

Arg: Arginina

Asn: Asparagina

Asp: Aspartato

BHE: Barrera hematoencefálica

Gln: Glutamina

Glu: Glutamato

His: Histidina

HsTIM: Triosa Fosfato Isomerasa de *Humano*

Ile: Isoleucina

Leu: Leucina

Lys: Lisina

MDR: multirresistente

MtTIM: Triosa Fosfato Isomerasa de *Mycobacterium tuberculosis*

PDB: Protein Data Bank

Phe: Fenilalanina

Ser: Serina

TB: Tuberculosis

TB-DR: Tuberculosis Drogo resistente

Thr: Treonina

TIM: Triosa Fosfato Isomerasa

Trp: Triptófano

Tyr: Tirosina

Val: Valina

XDR: Extensivamente drogorresistente

Contenido	
Agradecimientos	ii
Dedicatoria	iii
Abreviaturas	iv
Índice de Tablas	vii
Índice de Figuras	vii
Resumen	1
Abstract	2
1 Introducción	3
1.1 Patogenia	3
1.2 Epidemiología	3
1.3 Tratamiento	5
1.3.1 Tratamiento de primera línea	5
1.3.2 Tratamiento TB-DR	5
1.3.3 Mecanismos de acción de fármacos actuales	6
1.3.4 Mecanismos de resistencia contra los principales fármacos actuales	7
1.3.5 Fármacos en desarrollo	8
1.4 Antecedentes	10
1.4.1 La enzima triosa fosfato isomerasa (TIM)	10
1.4.2 La triosa fosfato isomerasa de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MtTIM)	11
1.4.3 La triosa fosfato isomerasa como blanco para el diseño de fármacos	12
1.4.4 MtTIM como blanco terapéutico	13
1.4.5 Acoplamiento molecular: Docking	13
1.4.6 Toxicidad teórica	15
1.5 Justificación	16
1.6 Objetivos	16
1.6.1 Objetivo General	16
1.6.2 Objetivos Específicos	16
2 Materiales y Métodos	17
2.1 Docking molecular en la TIM de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	17
2.2 Cultivos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	18
2.3 Ensayos de inhibición de viabilidad de cultivos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	19
2.4 Análisis estadístico	20

3 Resultados	20
3.1 Interacción de los compuestos T1-T10 y D4 con MtTIM y HsTIM	20
3.2 Ensayos de inhibición de viabilidad de Cultivos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	28
4 Discusión	29
6 BIBLIOGRAFÍA	35
7 Anexos	42

Índice de Tablas

Tabla 1. Grupos de antituberculosos	5
Tabla 2. Mecanismos de resistencia contra los principales fármacos actuales.....	7
Tabla 3. Mecanismos de resistencia contra los principales fármacos en desarrollo.....	9
Tabla 4. Compuestos con mayor probabilidad de interacción en MtTIM.....	22
Tabla 5. Interacción con aminoácidos ensayos In silico.....	23
Tabla 6. Energías de los complejos seleccionados.....	30

Índice de Figuras

Figura 1 Epidemiología de la Tb en México.....	4
Figura 2. Alineamiento de la HsTIM y la MtTIM.....	11
Figura 3. Dímero de la MtTIM.....	12
Figura 4. Representación del proceso de Docking.....	14
Figura 5. Resumen gráfico de las predicciones de la plataforma ADMETlab 2.0.....	15
Figura 6. Representación de los 18 sitios potenciales.....	17
Figura 7. Reporte de laboratorio.....	19
Figura 8. Cultivos de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	19
Figura 9. Distribución de los compuestos en las microplacas.....	20
Figura 10. Los mejores 5 confórmeros de los compuestos T1-T5.....	25
Figura 11. Los mejores 5 confórmeros de los compuestos T6 – T10.....	26
Figura 12. Alineamiento de la HsTIM y la MtTIM.....	27
Figura 13. Gráfica de “huevo cocido”.....	27
Figura 14. Resultados de absorbancia de las placas.....	28

Resumen

La tuberculosis es probablemente la enfermedad infecciosa con mayor prevalencia en el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) cerca de 2000 millones de personas, un tercio de la población mundial, han estado expuestas al patógeno de la tuberculosis. Un problema que se está extendiendo en los últimos años es la detección de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a los antibióticos convencionales, la tuberculosis multirresistente se ha identificado en casi todos los países que usan los tratamientos convencionales. En el año 2012, entre los casos a nivel mundial reportados de tuberculosis pulmonar hubo alrededor de 450,000 casos de tuberculosis multirresistente (casi el 50 % correspondían a India, China y Rusia).

Por lo que desarrollar nuevos tratamientos, es una necesidad a nivel mundial, donde se han propuesto nuevos blancos terapéuticos, como la enzima glucolítica, triosa fosfato isomerasa de *Mycobacterium tuberculosis* (MtTIM), ya que grupos de investigación han demostrado que esta enzima (MtTIM) es necesaria en cultivos *in vitro*, así como *in vivo* (tuberculosis en un modelo murino).

En este proyecto se proponen compuestos para desarrollar un nuevo fármaco contra *Mycobacterium tuberculosis*, usando como blanco terapéutico a la MtTIM, utilizando herramientas de simulaciones de interacciones a nivel molecular (Docking), utilizando la estructura cristalográfica de la MtTIM (PDB:3TA6) y una quimioteca (casi 500,000 compuestos de Chembridge Corp.), para elegir los mejores diez compuestos, mediante una evaluación y descripción *in silico* de la interacción de cada compuesto con la MtTIM, así como la toxicidad teórica y características ADME de cada compuesto.

Abstract

Tuberculosis is probably the most prevalent infectious disease in the world. According to the World Health Organization (WHO), about 2 billion people, a third of the world's population, have been exposed to the tuberculosis pathogen. A problem that is spreading in recent years is the detection of *Mycobacterium tuberculosis* resistant to conventional antibiotics; multidrug-resistant tuberculosis has been identified in almost all countries that use conventional treatments. In 2012, among the reported cases of pulmonary tuberculosis, there were around 450,000 cases of multidrug-resistant tuberculosis (almost 50% corresponded to India, China and Russia). Therefore, developing new treatments is a need worldwide, where new therapeutic targets have been proposed, such as the glycolytic enzyme, triose phosphate isomerase from *Mycobacterium tuberculosis* (MtTIM), since there are reports from other research groups that this enzyme (MtTIM) is required in *in vitro* cultures as well as *in vivo* (tuberculosis in a murine model). This project proposes to develop a new drug against *Mycobacterium tuberculosis*, using MtTIM as a therapeutic target, using molecular-level interaction simulations (Docking) tools, using the crystallographic structure of MtTIM (PDB: 3TA6) and a chem library (nearly 500,000 Chembridge Corp. compounds), to choose the best compounds, later we will develop *in vitro* cytotoxicity tests on *Mycobacterium tuberculosis* cultures, to determine the best compound with cytotoxic effect.

Here we propose compounds to develop a new drug against *Mycobacterium tuberculosis*, using MtTIM as a therapeutic target, using molecular interaction simulation tools (Docking), using the crystallographic structure of MtTIM (PDB:3TA6) and a chemical library (nearly 500,000 compounds from Chembridge Corp.), to choose the best 10 compounds. Through an *in silico* evaluation and description of the interaction between each compound with MtTIM, as well as the theoretical toxicity and ADME characteristics of each compound.

1 Introducción

La Tuberculosis (Tb) es causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis*, es una bacteria aerobia obligada; intracelular facultativa, no formadora de esporas. De crecimiento lento, con un periodo de generación de 15-20 horas, y crecimiento visible de 3 a 8 semanas en medio sólido (Fitzgerald et al., 2015). Es una de las enfermedades más antiguas de las que hay registros, los hallazgos más antiguos fueron encontrados en Alemania en huesos de un joven que padeció tuberculosis vertebral (enfermedad de Pott) en el periodo neolítico 6,000 años A.C.(Bartels, 1907; Berszin & Bock Hensley, 2021)

1.1 Patogenia

La patogenia comienza cuando bacilos tuberculosos son transportadas en microgotas por aire y llegan a los alveolos donde comienzan a multiplicarse. En un hospedero con un sistema inmune competente los linfocitos y monocitos son atraídos hacia el foco por vía hematológica. Los macrófagos ingieren los bacilos liberados desde células en degeneración y son infectados y transportados hacia los ganglios linfáticos regionales. El desarrollo de la inmunidad celular y la hipersensibilidad tisular se desarrolla entre 3-9 semanas de la infección.(Fitzgerald et al., 2015)

1.2 Epidemiología

La tuberculosis es una enfermedad transmisible, una de las primeras 10 causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, y la primera causa de muerte por un solo agente infeccioso. En 2019 unos 10 millones de personas presentaron la enfermedad y 1.4 millones murieron (incluyendo 200,000 muertes de personas VIH positivo, clasificadas oficialmente como muertes causadas por VIH/SIDA) (World Health Organization, 2020). En el 2020 4.8 millones de personas fueron diagnosticadas con Tuberculosis Pulmonar (TP) sin embargo se estima que la incidencia permaneció muy similar a 2019 y que lo que se redujo fueron las notificaciones debido a la contingencia de la Enfermedad por Coronavirus (COVID-19) (World Health Organization, 2021).

En los últimos datos publicados en México la incidencia de TP fue en aumento durante los años 2013-2016 mientras que la mortalidad fue disminuyendo en los años 2012-2015 (Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud et al., 2019). En Baja California la prevalencia de TP ha sido de las mayores del País llegando a un 54.8 por cada 100,000 habitantes en 2010, en 2016

se reportaron 1587 nuevos casos siendo así el 2do estado con mayor incidencia del país, y el primero en mortalidad (Infanzón-Ruiz et al., 2018).

Los datos más actuales (aún no publicados) de CENAPRECE en México destaca una incidencia que se mantiene discretamente en ascenso hasta el año 2020 donde disminuye debido a la baja notificación de la enfermedad por la contingencia de COVID-19, como se muestra en la Figura 1, registrándose un total de 16,287 casos nuevos con un 79.1% de TP para ese año, en 2019 se reportaron 2,198 casos mortalidad por Tb todas sus formas con una tasa nacional de 1.7 (Luna López et al., 2021).

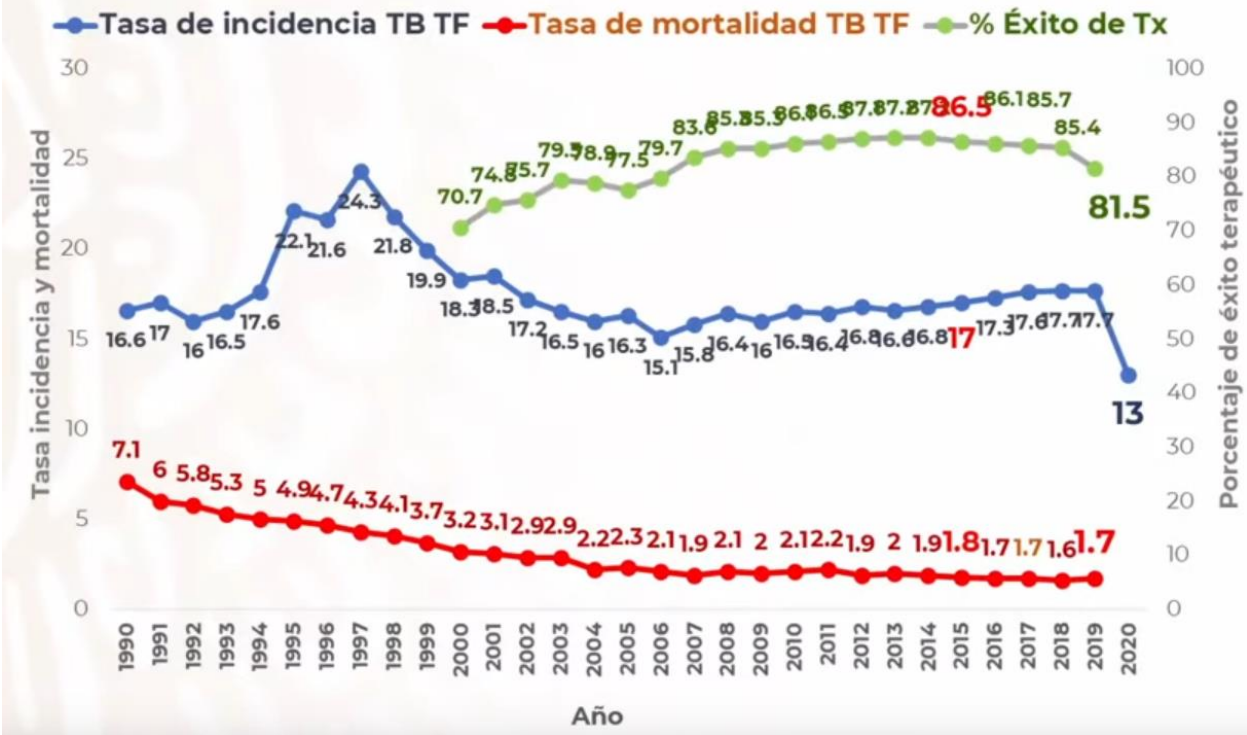


Figura 1. Tomada de (Luna López et al., 2021)

En el 2020 el CENAPRECE registró en Baja California una tasa incidencia de tuberculosis en todas sus formas de 50.7, y una tasa de mortalidad de 7.6 en el 2019, situando nuestro estado en primer lugar muy por encima de las medias nacionales que fueron de 13 y 1.7 respectivamente. (Luna López et al., 2021).

1.3 Tratamiento

Los objetivos del tratamiento antituberculoso son: reducir súbitamente el número de bacilos activos en el paciente (disminuyendo morbilidad y transmisión), erradicar población de bacilos restantes para lograr la cura durable y prevenir la adquisición de resistencia bacteriana. (Nahid et al., 2016)

1.3.1 Tratamiento de primera línea

Los fármacos de primera línea para tuberculosis activa son Isoniazida, una Rifamicina (Rifampicina, rifapentina o rifabutina), Pirazinamida y Etambutol. (Nahid et al., 2016; WHO, 2019)

Tabla 1. Traducida y adaptada de (World Health Organization, 2011)

Grupo	Fármaco
1 Orales de primera línea	Isoniacida, Etambutol, Pirazinamida, Rifampicina.
2 Inyectables de segunda línea	Estreptomina, amikacina, kanamicina, capreomicina.
3 Fluoroquinolonas	Ofloxacino, levofloxacino, moxifloxacino, gatiflaxino.
4 Orales bacteriostáticos de segunda línea	Etionamida, protionamida, cicloserina, ácido para-aminosalicílico.
5 Eficacia poco clara	Clofazimina, amoxicilina/clavulanato, claritromicina, linezolid.

Los fármacos anti-TB eran clasificados tradicionalmente por la OMS en 5 grupos, donde se incluían todos los fármacos, hasta su reclasificación en 2016, donde son 4 grupos (A-D) sólo para medicamentos contra TB-DR. (World Health Organization, 2016)

1.3.2 Tratamiento TB-DR

En caso de presentar alguna contraindicación o resistencia a los fármacos de primera línea se requerirá la sustitución con uno o más fármacos de segunda línea, los cuales deberán ser regímenes de tratamiento individualizados siguiendo estrategias clínicas. (Curry International Tuberculosis Center & California Department of Public Health, 2016; Nahid et al., 2019; WHO, 2019)

1.3.3 Mecanismos de acción de fármacos actuales

-Rifampicina: Inhibe la síntesis de ARN, uniéndose a la subunidad β de la ARN polimerasa dependiente del ADN de Procariotas. (Jane Maslow & Portal-Celhay, 2015)

-Isoniazida: Es un profármaco que requiere la activación por la enzima catalasa reductasa, interfiere con la síntesis del ácido micólico, componente importante de la pared celular micobacteriana, al inhibir la enoyl-ACP reductasa dependiente de NADH. (Almeida Da Silva & Palomino, 2011; Chetty et al., 2017; Wallace Jr. et al., 2015; Y. Zhang et al., 1992)

-Pirazinamida: Se desconoce el mecanismo de acción exacto, parece tener un blanco celular inespecífico, interrumpe la energía de la membrana, el proceso de traducción, acidifica el citoplasma. (Njire et al., 2016; Wallace Jr. et al., 2015)

Es un análogo estructural de nicotinamida, es un profármaco que requiere una hidrólisis se convierte en ácido pirazinoico (forma bioactiva) llevada a cabo por la amidasa bacteriana PncA. Se han sugerido 2 objetivos moleculares la sintasa de ácido graso I (FAS I) y la proteína S1/RpsA de la unidad ribosomal 30S (Gopal et al., 2016).

-Etambutol: inhibe de la síntesis de la pared celular, bloqueando las enzimas arabinosil-transferasa. (Belanger et al., 1996; Wallace Jr. et al., 2015)

-Estreptomina: Se considera un aminoglucósido, aunque a nivel químico es distinta, ya que su mecanismo de acción está estrechamente relacionado. Se une a una región de nucleótidos de la porción del ARN de transferencia inversa 16S en el ARN mensajero de la subunidad 30S de los ribosomas procariotas, reduciendo la fidelidad de la traducción y translocación de los ARN mensajeros, provocando la acumulación de proteínas ineficaces en la bacteria (Leggett, 2016).

-Amikacina: Es un aminoglucósido por lo tanto inhibe síntesis de proteínas eficaces como descrito con la estreptomina.

-Fluoroquinolonas: Inhibe la estructura del ADN

-Ácido paraaminosalicílico: Inhibe la síntesis de precursores del DNA

-Péptidos cíclicos: (Capreomicina y viomicina) Inhibe síntesis de proteínas (NIAID, n.d.)

1.3.4 Mecanismos de resistencia contra los principales fármacos actuales

En la tabla 2 se muestra una revisión de la literatura de los mecanismos moleculares de resistencia de *M. tuberculosis* a los fármacos actuales, el único con relevancia clínica hasta la fecha es *rpoB* ya que mutaciones en este gen tienen muy alta correlación con resistencia a Rifampicina, lo cual se utiliza para elegir fármacos de segunda línea, de forma inicial sin necesidad de esperar los resultados de un cultivo.

Tabla 2 Mecanismos de resistencia contra los principales fármacos actuales		
Fármaco	Mecanismos moleculares	Referencias
Rifampicina	La mayoría de los aislados clínicos resistentes muestran mutaciones en el gen <i>rpoB</i> que codifica la subunidad β de la ARN-Polimerasa.	(Almeida Da Silva & Palomino, 2011; Somoskovi et al., 2001)
Isoniazida	Los principales son mutaciones en los genes <i>katG</i> e <i>inhA</i> que codifican para la síntesis de la enzima catalasa-reductasa y la enoil-ACP reductasa dependiente de NADH respectivamente.	(Almeida Da Silva & Palomino, 2011)
Pirazinamida	Los principales mecanismos de resistencia son mutaciones en <i>pncA</i> , sin embargo, muchas cepas resistentes a este fármaco no presentan mutaciones de <i>pncA</i> .	(Almeida Da Silva & Palomino, 2011)
Etambutol	Cerca del 50% de las cepas resistentes de <i>M. tuberculosis</i> se deben a mutaciones en <i>embB</i> (operón que codifica para la síntesis de arabinosil transferasa), sin embargo, se han encontrado hasta 20% de cepas sensibles que también presentan mutación en estos genes, por lo que son necesarios más estudios.	(Ahmad et al., 2007; Hazbón et al., 2005; Lee et al., 2004; Plinke et al., 2009; Sreevatsan et al., 1997; Telenti et al., 1997)
Estreptomicina	La resistencia se debe principalmente a mutaciones en los genes <i>rrs</i> o <i>rpsL</i> , no obstante, solo se han reportado estas mutaciones en apenas poco más de la mitad de las cepas resistentes .	(Almeida Da Silva & Palomino, 2011)

Amikacina	El mecanismo molecular más asociado es la mutación A1401G en el gen <i>rrs</i> que codifica el ARNr 16S.	(Maus et al., 2005)
Fluoroquinolonas	Las cepas resistentes muestran frecuentemente mutaciones en los genes <i>gyrA</i> y <i>gyrB</i> , sin embargo, hay mutaciones asociadas al gen <i>gyrA</i> que confieren hipersensibilidad a estos fármacos.	(Cheng et al., 2004; Maruri et al., 2012; Sun et al., 2008) (Aubry et al., 2006)
Ácido paraaminosalicílico	Cerca del 40% de las cepas resistentes han tenido la mutación T202A en el gen <i>thyA</i> , otros genes asociados en menor medida son <i>folC</i> (codifica dihidrofolato sintasa) <i>ribD</i> (codifica para riboflavina).	(Dookie et al., 2018; Mathys et al., 2009) (Xiaobing Zhang et al., 2015)
Péptidos cíclicos	Se han reportado mutaciones en el gen <i>tl yA</i> , el cual codifica la síntesis de una metiltransferasa de ARNr, sin embargo, también hay estudios donde cepas resistentes no presentan estas mutaciones.	(Almeida Da Silva & Palomino, 2011; Singh et al., 2020)

1.3.5 Fármacos en desarrollo

En la tabla 3 se muestra un resumen de los fármacos contra *Mycobacterium tuberculosis* que actualmente se encuentran en investigación y sus blancos terapéuticos. Como vemos la mayoría se dirigen a inhibir la síntesis de la pared celular o de la producción de proteínas en alguna de sus fases.

Tabla 3. Traducida y adaptada de (Chetty et al., 2017; Singh et al., 2019)

Fármaco	Proceso celular inhibido	Fase de desarrollo clínico	Blanco farmacológico
Rifabutina	Síntesis de proteína bacteriana	Fase III	rpoB
Rifapentina	Síntesis de proteína bacteriana	Fase III	rpoB
Moxifloxacino/Gatifloxacino	Replicación de DNA	Fase III	Topoisomerasa II (ADN Girasa)
Levofloxacino	Replicación de DNA	Fase II	Topoisomerasa II (ADN Girasa)
Bedaquilina	Homeostasis de ATP	Fase III	atpE
Delamanida	Síntesis de ácido micólico y de proteína	Fase III	5 genes de la coenzima F420: Rv0407, fbiA/B/C, Rv3547(Ddn)
Pretomanida	Síntesis de proteína y de lípidos.	Fase III	Rv3547(Ddn)
BM212	Síntesis de lípidos y de pared celular	Fase II	mmpL3
SQ 109	Síntesis de lípidos y de pared celular	Fase II	mmpL3
Sutezolid	Síntesis de proteína	Fase II	rplC
Delpazolid	Síntesis de proteína	Fase II	ARNr 23S
Contezolid	Síntesis de proteína	Fase I	ARNr 23S
Q203	Síntesis de ATP	Fase II	QcrB
Nitazoxanida	Potencial de membrana u homeostasis del pH	Fase II	Piruvato-ferredoxina oxidoreductasa (PFOR)
Clofazimina	Interfiere con el balance redox y producción de ROS		Rv0678 (mmpR), Rv2535c (pepQ), Rv1979c

TBI-166		Fase I	
Linezolid	Síntesis de proteína	Fase II	Rrl, rplC
AZD5847	Síntesis de proteínas	Fase II	Inhibe subunidad 50S
BTZ-043	Síntesis de pared celular	Fase I	DprE1, DprE2
GSK 3036656	Síntesis de proteínas	Fase I	Leucyl-tRNA sintetasa
OPC-167832	Síntesis de pared celular	Fase I	DprE1
TBA-7371		Fase I	DprE1
MCZ/PBTZ-169		Fase I	D-ribose 20-oxidase

1.4 Antecedentes

1.4.1 La enzima triosa fosfato isomerasa (TIM)

La TIM es una enzima que participa en la glucólisis y en la gluconeogénesis realizando la interconversión entre el gliceraldehído-3-fosfato y la dihidroxiacetona fosfato. (Velanker et al., 1997)

Se ha demostrado que la deficiencia de esta enzima en el ser humano incrementa los niveles de fosfato de hidroxiacetona, causa anemia crónica y debilitamiento neuromuscular en humanos. Además, se considera como un blanco atractivo en el diseño de fármacos contra bacterias y parásitos debido a su importancia en la ruta glucolítica, algunos ejemplos son los parásitos causantes de las enfermedades como la tripanosomiasis y la malaria. Estas enfermedades son muy comunes en las zonas tropicales, especialmente la tripanosomiasis se presenta con frecuencia en el sureste de nuestro país. (Alvarez et al., 2014; Jimenez-Sandoval et al., 2017)

Actualmente se conoce la estructura tridimensional de la TIM de varias especies, corresponden a un homodímero de aproximadamente 240-260 aminoácidos por monómero y 52-54 kDa de masa para el dímero, no requiere ningún ion metálico o cofactor para realizar su función biológica. Las subunidades se asocian a través de interacciones no covalentes. Ambos monómeros tienen un sitio activo completo, localizado cerca de la interfase entre las subunidades, pero se ha reportado que sólo la especie dimérica presenta actividad biológica, lo que podría indicar que los residuos de una subunidad son cruciales para mantener la integridad

o la estabilidad del sitio activo de la otra subunidad. La reacción catalítica de la TIM de varias especies se lleva a cabo a través de un intermediario cis-enediol. En el centro catalítico, tres aminoácidos son particularmente importantes para llevar a cabo la catálisis, ya que fijan al sustrato: Lys11, His95 y Glu165. El Glu165 actúa como el nucleófilo catalítico que atrae el protón del sustrato iniciando la isomerización. Los residuos 166 a 176 (loop 6) forman una especie de tapa que se abre y cierra sobre el sitio activo durante la catálisis, esto con el objeto de mantener un entorno hidrofóbico para el sustrato. Otra característica estructural importante es el loop 3 formado por los residuos 71 a 78 que se extiende desde una subunidad hasta la otra, estableciendo la mayoría de las interacciones no covalentes que mantienen unidos a los monómeros. (Jimenez-Sandoval et al., 2017)

1.4.2 La triosa fosfato isomerasa de *Mycobacterium tuberculosis* (MtTIM).

La triosa fosfato isomerasa de *Mycobacterium tuberculosis* (MtTIM), es una de las enzimas clave de la vía glucolítica, ya que la glucólisis provee la mayoría del requerimiento energético la convierte en un blanco terapéutico atractivo. (Mathur et al., 2006) Las funciones principales de esta enzima (MtTIM) influyen en el proceso de glucólisis y gluconeogénesis, catalizando la conversión de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) a D-gliceraldehído-3-fosfato (D-GAP).

El genoma de *M. tuberculosis* solo tiene un gen de TIM en Rv1438 (Cole et al., 1998; Trujillo et al., 2014b)

La secuencia de aminoácidos de MtTIM tiene un 37% de identidad con HsTIM (Figura 2). MtTIM está conformada por un dímero (Figura 3), como en otras estructuras de TIM conocidas, su estructura secundaria está formada por 12 hélices- α , 4 hélices- 3_{10} y 8 láminas- β (Connor et al., 2011).

TPIS_HUMAN	1	MAPSRKFFVGGNWKMNQRKQSLGELIGTLNAA---KVPADTEVVCAPPTAYIDFARQK--	55
TPIS_MYCTU	1	--MSRKPLIAGNWKMNLNHYEAIALVQKIAFSLPKYYDRVDVAVIPPFDTLRSVQTLVD	58
		*** ::***** :. . *: .: : * .:*. ** :. : .:	
TPIS_HUMAN	56	-LDPKIAVAQAQNCYKVTNGAFTGEISPGMIKDCGATWVVLGHSERRHVFGESEDELIGQKV	114
TPIS_MYCTU	59	GDKLRRLTYGAQDLSPHDSGAYTGDVSGAFLAKLGCSYVVVGHSEERTYHNEDDALVAAKA	118
		. :. : .** : .**:*:*:* . :. . *.:**:*:*:* . :.* * . : . *	
TPIS_HUMAN	115	AHALAEGLGVIACIGEKLDEREAGITEKVVFEQTKV--IADNVKDWKVVLAIEPVWAIG	172
TPIS_MYCTU	119	ATALKHGLTPIVCIGEHLDVREAGNHVAHNIEQLRGSGLAGLLAEQIGSVVIAIEPVWAIG	178
		* ** .** * .**:*:* ** ** :** : . :. : .**:*:*:***	
TPIS_HUMAN	173	TGKTATPQQAQEVHEKLRGWLKSNVSDAVAQSTRIIYGGSVTGATCKELASQPDVDGFLV	232
TPIS_MYCTU	179	TGRVASAADAQEVCAAIRKELASLASPRIADTVRVLYGGSVNAKNVGDIVAQDDVDGGLV	238
		:.*: :** :* * * . * :*:.*:**:**. . :. :.* **** **	
TPIS_HUMAN	233	GGASLKPEFVDIINAKQ-----	249
TPIS_MYCTU	239	GGASLDGEHFATLAAIAAGGPLP	261
		***** . * . : *	

Figura 2. Alineamiento de la HsTIM y la MtTIM,

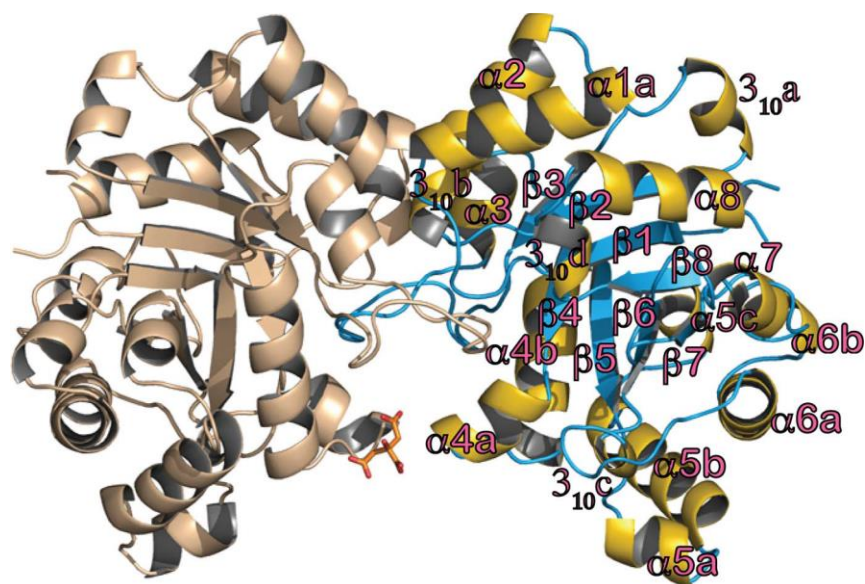


Figura 3. Dímero de la MtTIM, estructura secundaria está formada por 12 hélices- α , 4 hélices- 3_{10} y 8 láminas- β .

1.4.3 La triosa fosfato isomerasa como blanco para el diseño de fármacos.

La estrategia más utilizada en el diseño de inhibidores de la actividad enzimática, es la búsqueda de moléculas que compiten por el sitio activo de la molécula blanco. Sin embargo, en muchas enzimas como la TIM, tienen un alto grado de conservación de amino ácidos en el sitio activo, que representa una dificultad en la selectividad del inhibidor. Por lo tanto, otra estrategia es guiar el diseño de fármacos hacia otras regiones donde haya menor grado de conservación en secuencia y, posiblemente, estructural. En general, las regiones interfaciales de las TIM son menos conservadas en la secuencia de aminoácidos que el sitio activo, por lo que podría mostrar variaciones estructurales entre las enzimas de la bacteria y del portador, proporcionando así una distinción entre las enzimas involucradas.

La TIM ha sido muy estudiada como blanco para el diseño de fármacos. Los primeros estudios de inhibición selectiva de la TIM se realizaron al emplear Cloramina-T, identificando los efectos de oxidación que producían sobre los residuos de Cys y Met de dos especies distintas: conejo y levadura (Gómez-Puyou et al., 1995). Posteriormente, se logró inducir la pérdida de estructura y función de manera selectiva de la TIM de *Trypanosoma brucei*, utilizando metil-metano-tiosulfato, que interacciona con residuos conservados (Cys14 y His86) en la TIM de parásitos

del género de *T. cruzi*, *G lamblia* y *P. falciparum* (Alvarez et al., 2014; Velanker et al., 1997). También se ha empleado el compuesto S-fenil-p-toluentiosulfonato (MePhSO₂-SPh) para inhibir diferencialmente enzimas provenientes de pollo, conejo, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli* y otras. Los conocimientos estructurales y funcionales acerca de la TIM en el desarrollo de moléculas que inhiben la actividad de la enzima de *Trypanosoma cruzi* (TcTIM), por ejemplo, en la región de la interfase de la TcTIM se ha observado que la posición 15 es ocupada por un residuo de Cys, mientras que en el humano el residuo correspondiente a esta posición es una Met. El hecho de que distintos parásitos posean en este sitio un aminoácido diferente al de los humanos ha sido considerado para diseñar moléculas que puedan actuar selectivamente contra la MtTIM (Harikishore et al., 2020; Trujillo et al., 2014a). Además, se evaluará la interacción de un compuesto (D4) reportado y patentado con uso específico contra la TIM de *Tricomonas vaginalis* (Benítez-Cardoza et al., 2022) y efecto amebicida en cultivos *in vitro* de *Entamoeba histolytica* (Vique-Sánchez et al., 2020).

1.4.4 MtTIM como blanco terapéutico

Esta reportado que al disminuir la función de la MtTIM, los resultados de la viabilidad de los cultivos *in vitro*, así como *in vivo* (modelo de ratón de tuberculosis) se atenúan severamente, por lo que la MtTIM es esencial para el crecimiento del patógeno en los pulmones de los ratones (Trujillo et al., 2014a).

Por lo que buscaremos identificar mediante Docking un compuesto líder que inhiba o desestabilice selectivamente a la enzima triosa fosfato isomerasa de *Mycobacterium tuberculosis* (MtTIM), y posteriormente se pueda determinar el efecto citotóxico en cultivos *in vitro* de *M. tuberculosis*.

1.4.5 Acoplamiento molecular: Docking

El “Docking” es un proceso computacional usado para explorar los posibles modos de unión de un ligando a su receptor (Figura 4). Un enfoque racional permite maximizar las posibilidades de encontrar nuevos blancos terapéuticos, apoyándose en los avances genómicos y proteómicos, y de las bibliotecas de compuestos, cada vez más accesibles. Las técnicas de diseño de fármacos asistido por computadora pueden ser efectivas para reducir costos y acelerar el

descubrimiento de fármacos. Esto como resultado de algoritmos más precisos y confiables, uso de estrategias mejor planificadas y equipos con mayor capacidad de procesamiento.

Primero se realiza un cribado virtual para reducir el tamaño de grandes librerías de compuestos, las bibliotecas se “pre-filtran” utilizando una de identificadores fisicoquímicos simples para eliminar compuestos no viables. Análisis de farmacóforos, las redes neuronales, el análisis de similitud, el análisis de andamios, la regla de cinco de Lipinski y los filtros de basura se utilizan para clasificar las moléculas de acuerdo con sus propiedades farmacocinéticas, el enriquecimiento es reducir las moléculas de la biblioteca a aquellas con más probabilidad de unirse al receptor. Los criterios de selección utilizados en el enriquecimiento deben elegirse cuidadosamente (Alonso et al., 2006).

Los compuestos similares se pueden agrupar y organizar en conjuntos más pequeños para ayudar al proceso de selección. El uso de varias quimiotecas pequeñas no solo es un enfoque más rentable, sino que generalmente puede proporcionar una diversidad química más amplia que una sola biblioteca grande. Teniendo la biblioteca óptima, las moléculas se acoplan al receptor blanco para reducir aún más el número de candidatos. En trabajos preliminares con docking, se utilizan funciones de clasificación rápidas, pero no muy precisas, para evaluar la estabilidad relativa de los complejos acoplados. Los candidatos seleccionados, por lo general unos pocos cientos, están sujetos a más experimentos de acoplamiento utilizando funciones de puntuación más sofisticadas (Alonso et al., 2006).

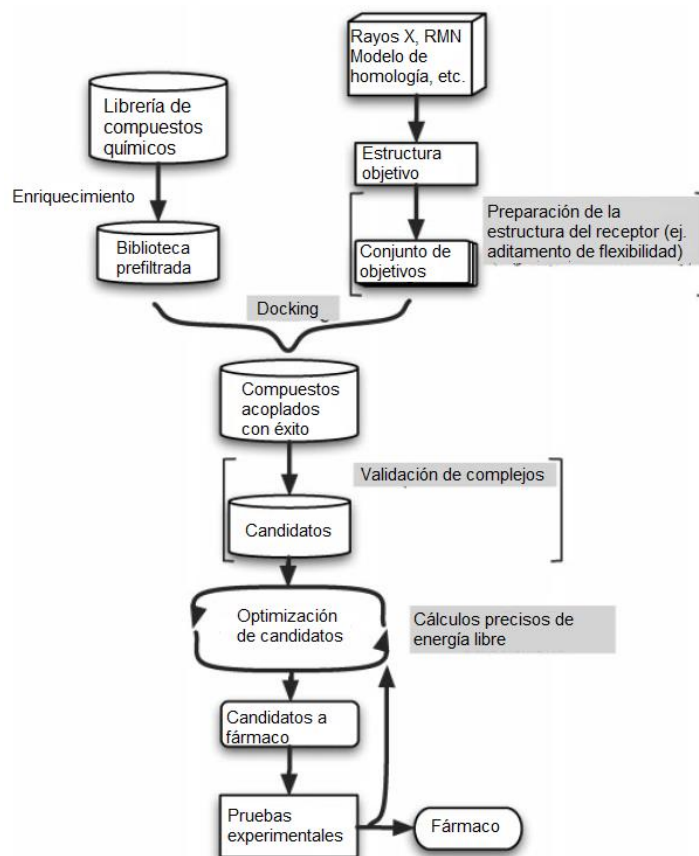


Figura 4. Representación del proceso de Docking.

1.4.6 Toxicidad teórica

En la Figura 5 se muestra un resumen del proceso para la predicciones precisas y completas de las propiedades de Absorción, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicidad por el programa ADMETlab2.0 (Xiong et al., 2021). En el desarrollo de fármacos es importante una buena combinación de selectividad y potencia, así como de una farmacocinética (ADMET) favorable, para que el fármaco llegue a sus fases de pruebas con humanos (Cumming et al., 2013; Hou & Wang, 2008; van de Waterbeemd & Gifford, 2003). Se ha visto que 2 de las principales razones, que suman la mitad, de los fármacos que son rechazados se deben a una pobre farmacocinética y a toxicidad en animales (van de Waterbeemd & Gifford, 2003; Waring et al., 2015). Por lo que estrategias computacionales con modelos matemáticos para predecir estos comportamientos bioquímicos representan un gran nicho de mejora en el costo-beneficio para el desarrollo de fármacos (Hodgson, 2001; Kennedy, 1997; Kola & Landis, 2004; Selick et al., 2002).

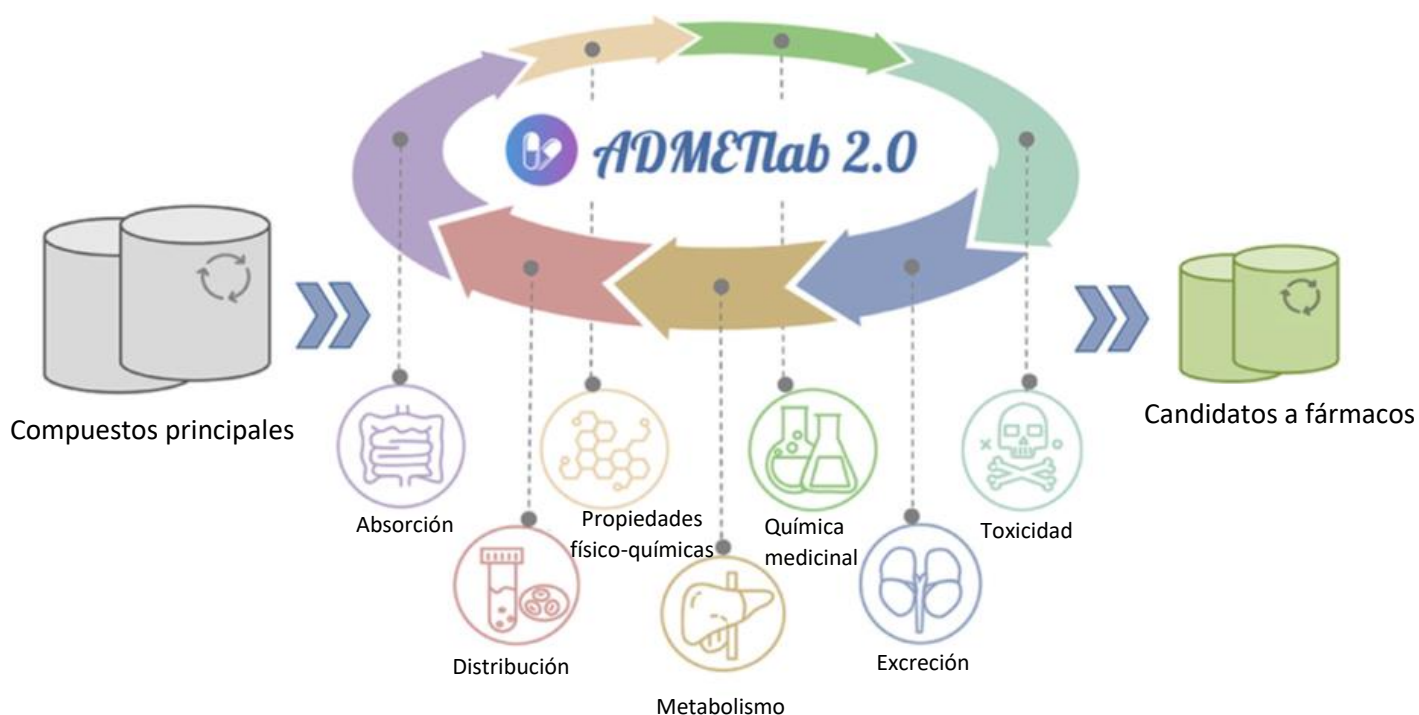


Figura 5. Resumen gráfico de las predicciones de la plataforma ADMETlab 2.0

1.5 Justificación

La tuberculosis es posiblemente la enfermedad infecciosa con mayor prevalencia en el mundo. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) cerca de 2000 millones de personas, un tercio de la población mundial, han estado expuestas al patógeno de la tuberculosis, y un problema que se está extendiendo en los últimos años es la detección de *Mycobacterium tuberculosis* resistente a los antibióticos convencionales. La letalidad por tuberculosis pulmonar sin tratamiento antituberculoso es de aproximadamente 70%, la duración entre el inicio de la enfermedad y la cura o muerte es de aproximadamente 3 años (Tiemersma et al., 2011), Hay entre 5-10 % de casos que presentan resistencia, esto muestra la necesidad de desarrollar nuevas opciones terapéuticas contra esta enfermedad, por lo cual el tener más y mejores opciones terapéuticas, y aumentar su disponibilidad retoma mayor importancia.

En este proyecto se proponen compuestos para desarrollar un nuevo fármaco específico contra *Mycobacterium tuberculosis*, dirigido a una enzima clave en la vía de la glucólisis, la MtTIM, para que este fármaco sea más seguro y tenga mayor efectividad, y/o que actúe como un coadyuvante con los fármacos actuales.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo General

Identificar compuestos potenciales que interaccionen selectivamente con la enzima triosa fosfato isomerasa de *Mycobacterium tuberculosis*, mediante ensayos *in silico*.

1.6.2 Objetivos Específicos

- 1.- Identificar por métodos computacionales (Docking), compuestos con probable interacción en TIM de *Mycobacterium tuberculosis*, usando el PDB:3TA6 (MtTIM) y la quimioteca EXPRESS-Pick de Chembridge corp. (500,000 compuestos).
- 2.- Describir la estructura tridimensional de los mejores complejos compuesto-MtTIM.
- 3.- Evaluar el efecto citotóxico en cultivos de *Mycobacterium tuberculosis*.
- 4.- Evaluar las características ADME y toxicidad mediante pruebas *in silico*.

2 Materiales y Métodos

2.1 Docking molecular en la TIM de *Mycobacterium tuberculosis*.

Simulación de la interacción molecular con las regiones expuestas de la membrana de MtTIM de *Mycobacterium tuberculosis*, usando el PDB:3TA6 MtTIM y la quimioteca EXPRESS-Pick de compuestos con potencial farmacológico de la empresa Chembridge (www.chembridge.com), que contiene más de 500,000 así como la “Bioactives Collection Stock” (Chembridge Corp.-www.hit2lead.com/bioactives.asp.) que consta de 1772 compuestos de moléculas bioactivas. Se determinarán las interacciones moleculares mediante Docking los compuestos en los sitios potenciales que determine la función “Potential site” en MOE. Se realizó minimización de energías, adición de cargas eléctricas e hidrógenos polares. Usando el campo de fuerzas CHARMM27 y la selección de sitios potenciales de unión en MOE para la simulación del acoplamiento molecular (Figura 6) (Alonso et al., 2006) (Tian et al., 2014). El docking molecular se llevó a cabo utilizando las funciones de Scoring, formulada por Ajay y Murcko (Tian et al., 2014). Se eligieron los 10 mejores compuestos que presentaron una alta probabilidad de tener una interacción con los sitios potenciales propuestos (Figura 6), para proponer realizar pruebas *in vitro* (Alonso et al., 2006; Campbell et al., 2014; Minini et al., 2015; Xiaohua Zhang et al., 2014). Para cada compuesto se determinó de forma teórica la toxicidad (Banerjee et al., 2018) y características ADME (Dong et al., 2018) (Daina & Zoete, 2016).

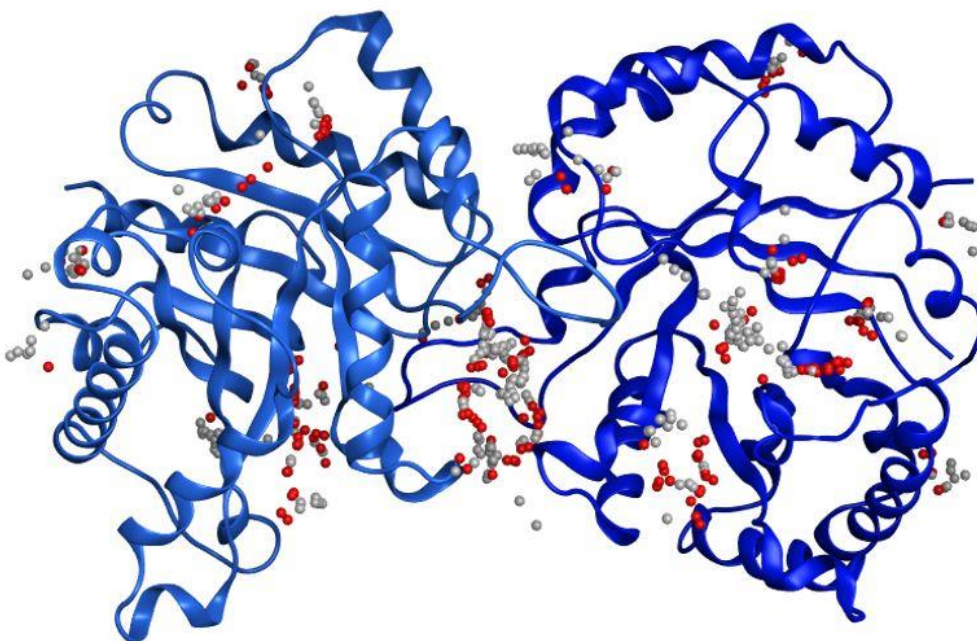


Figura 6. Representación de los 18 sitios potenciales (esferas rojas y blancas) en MtTIM (azul) determinados por “site finder”.

Para seleccionar los 10 mejores compuestos, se analizaron los resultados de hasta 30 confórmeros de cada compuesto, se determinó el promedio de $\Delta G_{\text{binding}}$ (interacción) para cada complejo (ligando proteína) con los resultados de MOE. Posteriormente, se caracterizaron las interacciones de los 5 mejores confórmeros de cada compuesto con la MtTIM.

2.2 Cultivos de *Mycobacterium tuberculosis*

La muestra fue proporcionada por “Laboratorio Dorado” obtenida de esputo de un paciente con baciloscopia positiva, utilizando medios específicos e identificación automática. En la Figura 7 podemos observar el reporte del microorganismo y su sensibilidad. Cultivos de *M. tuberculosis* serán crecidos en presencia de CO₂ al 5 % a 37 ° C en medio Middlebrook 7H9 suplementado con 5 % de albúmina bovina, 2 % de dextrosa, 0.5 % de glicerol, 0,85 % de cloruro de sodio y 0,05 % de Tween 80 y con medio 7H9 suplementado con 10% de BBL, Middlebrook, enriquecimiento OADC (Becton, Dickinson) y 0.05% Tween 80. Para las determinaciones de UFC, todas las cepas se cultivaron en agar base de medio 7H9 (medio Difco 7H9, 0.2 % glicerol, 10% BBL, Middlebrook, enriquecimiento OADC, 1,5 % Bacto agar). Determinando la viabilidad del cultivo siguiendo la metodología reportada (Trujillo et al., 2014b). Se transfirieron colonias del tubo obtenido por el laboratorio a tubos con medio de cultivo 7H9 preparado en el laboratorio según las instrucciones del proveedor (Figura 8) se agregó suficiente inóculo hasta tener una turbidez del tubo de 0.5 McFarland, como lo marca la literatura (Balouiri et al., 2016).



Q.F.B. Martha Dorado del Rio
Céd. Prof. 2032526 (UAG) • Reg. Estatal: 12516-01/02
 Av. Obregón #1500 Esq. Calle "G" • Col. Nueva C.P. 21100
 Mexicali, B.C. • Tel. 552-30-40 • Fax: 552-32-30
 labdorado_1@hotmail.com • labdorado_moi@hotmail.com

AFM-00339-2003
 ARM-00340-2003
 Código: LDR-070 Rev. 1

Página 6/6

PARTICULAR
Paciente: : _____
 Edad : 56 Años Sexo : Masculino
 Fecha Nacimiento: _____
 Dr(a) :

Fecha : 21 ene 2021
 Hora : 08:11:05



1021-0008



Impresión: martes, 20 abr 2021, 14:16

	RESULTADO	INTERVALO BIOLÓGICO DE REFERENCIA
Microorganismo aislado:	Mycobacterium tuberculosis	
	Antibióticos	Interpretación
	Isoniazida	Sensible
	Rifampicina	Sensible
	Etambutol	Sensible
	Estreptomicina	Sensible

Figura 7. Reporte de laboratorio con sensibilidad del microorganismo aislado

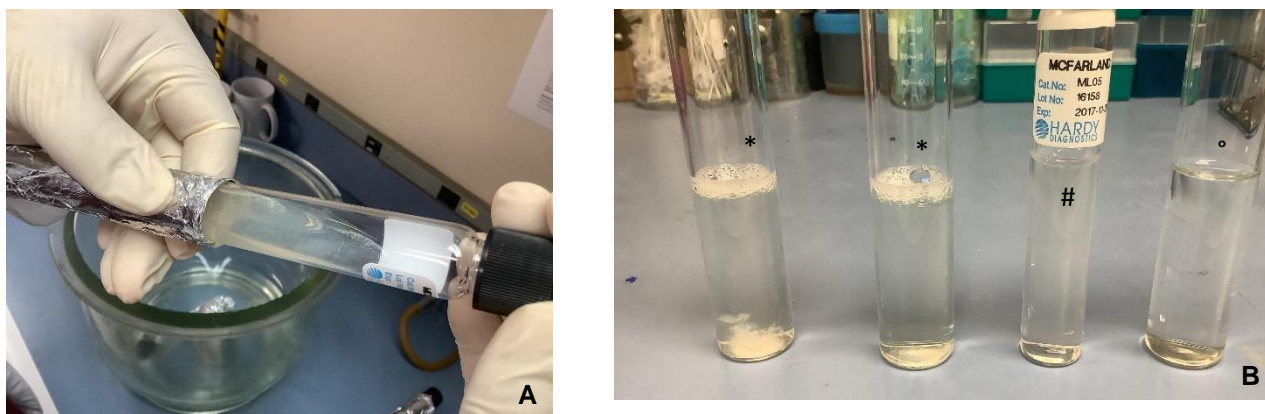


Figura 8. Cultivos de *Mycobacterium tuberculosis*. A: Muestra obtenida del laboratorio. B: Muestras de colonias transferidas al medio de cultivo 7H9, * tubos con medio de cultivo e inóculo bacteriano, # Tubo con 0.5 McFarland, ° Tubo con medio de cultivo

2.3 Ensayos de inhibición de viabilidad de cultivos de *Mycobacterium tuberculosis*

Se utilizaron placas de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*, donde se colocaron los compuestos en concentraciones de 200 μM , incubando la placa a 37 °C por 21 días. En los pozos de los márgenes de la placa se colocó agua bidestilada para mantener la humedad (Figura 9C). Se colocaron por triplicado medio de cultivo, inóculo a 0.5 McFarland y compuesto a una concentración de 200 μM y un cuarto pozo donde se colocó solo el medio de cultivo y el compuesto como control para la medición, además se incluyó un control positivo con un fármaco de primera línea (rifampicina), y por último en 2 pozos lejanos a los compuestos se colocó medio de cultivo (caldo) con y sin bacterias respectivamente. Determinando la viabilidad del cultivo siguiendo la metodología reportada (Figura 8B) (Trujillo et al., 2014b) (Marrero et al., 2010) (de Carvalho et al., 2010). Los experimentos se realizaron en el laboratorio de microbiología de la facultad de medicina Mexicali de la Universidad Autónoma de Baja California, para comprobar el efecto citotóxico en cepas silvestres de *M. tuberculosis* de la ciudad de Mexicali, B.C.).

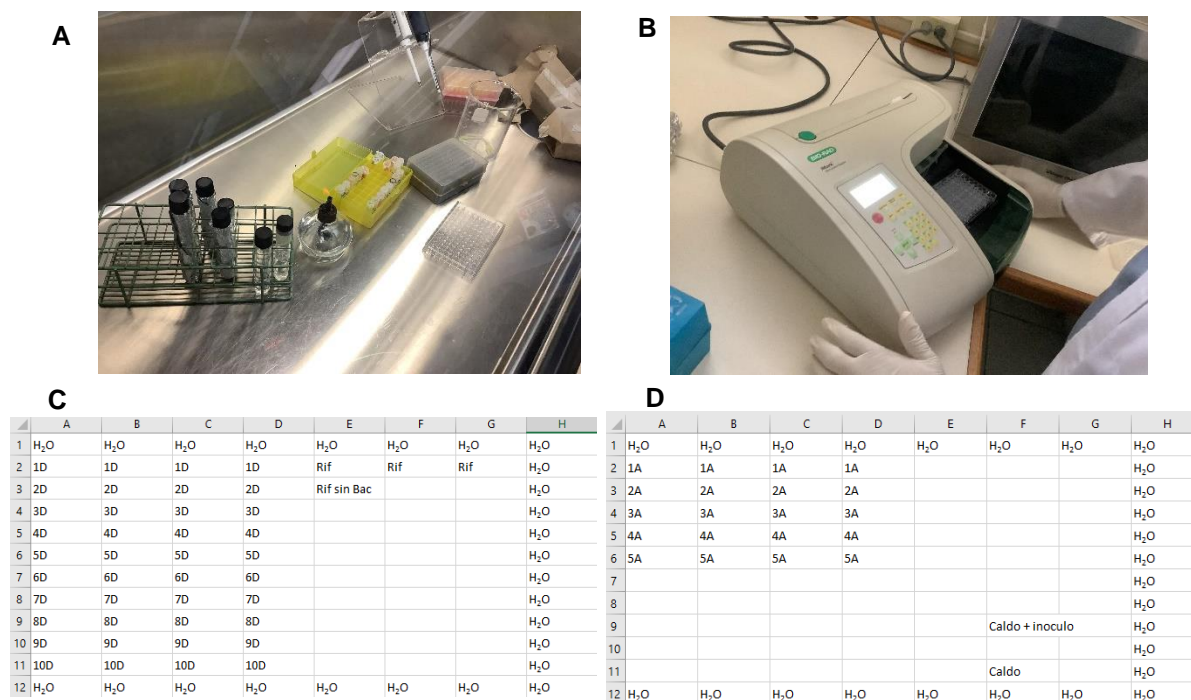


Figura 9. A: imagen con los tubos con inóculo, los compuestos, y las placas de 96 pozos, B: Lector de microplacas, C y D: distribución de los compuestos en las microplacas.

2.4 Análisis estadístico.

Los promedios de ΔG entre MtTIM y cada compuesto, y su desviación estándar de cada uno se determinó usando el software Excel (Microsoft-365).

3 Resultados

Se realizó el Docking molecular (simulaciones de acoplamiento molecular) de cada compuesto en la MtTIM, utilizando la quimioteca de Chembridge Corp., en la que se analizaron los resultados para elegir a los 10 mejores compuestos, utilizando los sitios potenciales determinados por el “Site Finder” en MOE (Figura 6) y seleccionando los 10 mejores compuestos (Tabla 4).

3.1 Interacción de los compuestos T1-T10 y D4 con MtTIM y HsTIM

Para describir las probables interacciones entre cada compuesto (T1-T10) y D4 con MtTIM y HsTIM, se analizaron los mejores cinco conformeros de cada compuesto interactuando con cada TIM (Tabla 5, Figura 10 y 11, Figura S1 – S10).

A partir de los resultados del Docking molecular (Tabla S3 - S14 y analizando todavía), se determinaron los principales aminoácidos para la interacción de los compuestos T1 – T10 y D4 con MtTIM son Lys12, Asn14, Asp33, Arg63, His74, Asp82, Glu102, Arg103, Arg104, Thr105, Tyr106 , Glu109, Asp110, Lys117, Leu136, His147, Glu172, Trp175, Ile177, Gly178, Gly180, Gly216, Asp231 y Gly240, y con HsTim los aminoácidos Lys5, Lys13, Asn15, Asp36, Lys58, Asn65, Tyr67, Lys68, Ala73, Glu77, Trp90, Arg98, Arg99, Val101, Phe102, Gly103, Glu104, Asp106, Glu107, Lys112, Glu133, Val142, Glu145, Ser158, Glu186, Trp191, Lys193, Gly210, Val212, Gln223, Asp225 y Gly232 (Tabla 4, Figura 10 y 11); ambas TIMs han conservado los aminoácidos Lys13, Asn15, Glu97, Arg98, Arg99, Glu104, Lys112, Leu132, Glu166, Trp169, Ile171, Gly172, Gly174, Gly210 y Gly234 (Figura 12); a pesar de ello, los diez compuestos tienen un mejor promedio de $\Delta G_{\text{binding}}$ de interacción con MtTIM, particularmente una mayor interacción con los aminoácidos Asp e His en MtTIM. Los detalles de la interacción de cada TIM con los conformeros de cada compuesto se muestran en el material complementario (Figura S1 - S6, Tabla S3 - S14).

Tabla 4. Compuestos con mayor probabilidad de interacción en MtTIM:

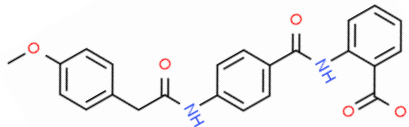
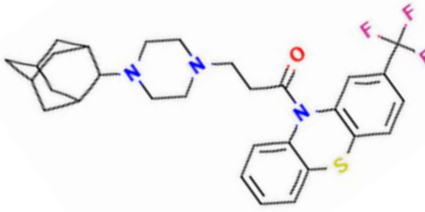
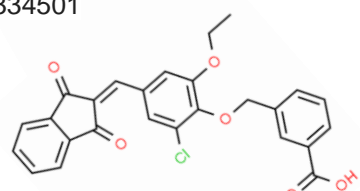

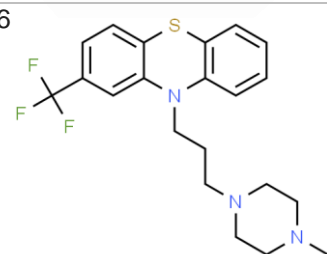
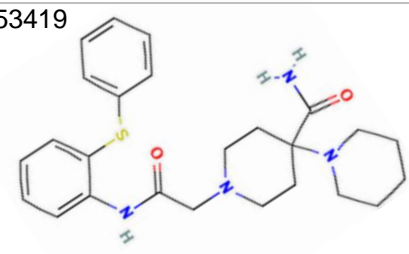
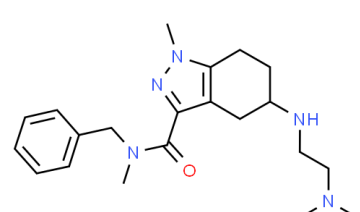
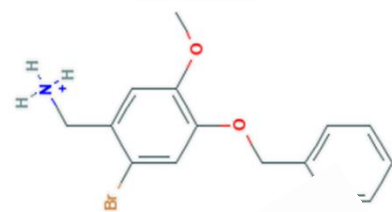
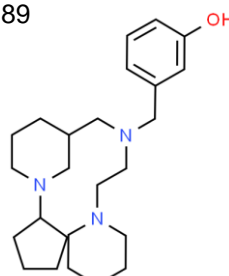
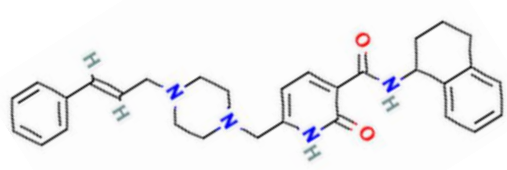
T1.- 1769482 	T6.- 2848534 
T2.- 1334501 	T7.- 1329973 
T3.- 5566 	T8.- 1253419 
T4.- 45159102 	T9.- 7388656 
T5.- 45182189 	T10.- 45224319 

Tabla 5. PubChem CID, Canonical SMILES, Interacción con aminoácidos en MtTIM y HsTIM, Ensayo AMES y cepa utilizada (positiva o negativa) and DL₅₀ (ADMETlab, n.d.) (ProTox-II - Prediction of TOXicity, n.d.).

PubChem CID	SMILES canónico	Interacción con aminoácidos en MtTIM (Tabla S2 – S11).	Interacción con aminoácidos en HsTIM (Table S2 – S11),.	PreADMET Ames test and LD ₅₀ -TA100_10RL -TA100_NA -TA1535_10R -TA1535_NA DL ₅₀ teórica (mg/kg)
T1.- 1769482	<chem>COC1=CC=C(C=C1)CC(=O)NC2=CC=C(C=C2)C(=O)NC3=CC=CC=C3C(=O)[O-]</chem>	His74, Asp82, Arg103, Thr105, Lys117, Leu136, His147, Ile177, Gly178	Lys5, Lys58, Trp90, Arg98, Arg99, Asp106, Ser158	Mutágeno -Negativo -Negativo -Negativo -Positivo 5000 mg/kg
T2.- 1334501	<chem>CCOC1=C(C(=CC(=C1)C=C2C(=O)C3=CC=CC=C3C2=O)C)OCC4=CC(=CC=C4)C(=O)O</chem>	Lys12, Thr105, Leu136, Trp175, Ile177, Gly180	Asn65, Tyr67, Glu77, Arg98	Mutágeno -Negativo -Negativo -Negativo -Negativo 1600 mg/kg
T3.- 5566	<chem>CN1CCN(CC1)CCCN2C3=C C=CC=C3SC4=C2C=C(C=C4)C(F)(F)F</chem>	Asp33 , Tyr106, His107, Asp231	Asp36, Glu107, Val142, Glu145, Glu186, Lys193, Gln223, Asp225	Mutágeno -Negativo -Negativo -Negativo -Negativo 424 mg/kg
T4.- 45159102	<chem>CN1C2=C(CC(CC2)NCCN(C)C)C(=N1)C(=O)N(C)CC3=C C=CC=C3</chem>	Asp33 , Arg63	Arg98, Val101, Phe102, Gly103	Mutágeno -Negativo -Negativo -Negativo -Negativo 300 mg/kg
T5.- 45182189	<chem>C1CCN(CC1)CCN(CC2CCC N(C2)C3CCCC3)CC4=CC(=CC=C4)O</chem>	Asp33 , Arg104, Glu109, Asp110, Asp209	Glu104, Asp106, Glu133, Glu145	Mutágeno -Negativo -Negativo -Positivo -Negativo 410 mg/kg
T6 2848534	<chem>C1CN(CCN1CCC(=O)N2C3=CC=CC=C3SC4=C2C=C(C=C4)C(F)(F)F)C5C6CC7CC(C6)CC5C7.Cl.Cl</chem>	Lys12, Glu102, Gly217, Ser218, Gly240, Ala241	Gly103, Glu133, Val142, Glu145, Glu146	Inmonotoxicidad 450mg/kg
T7 1329973	<chem>CCN1C=C(C(=O)C2=CC(=C(C=C21)N3CCN(CC3)C(=O)C4=CC(=C(C=C4)OC)OC)F)C(=O)O</chem>	Lys12, His135, Gln151	Asn45, Tyr67, Lys68, Arg98, His100, Phe102, Leu108, Lys112, Lys130, Lys141	Mutágeno

				2500 mg/kg
T8 1253419	<chem>C1CCN(CC1)C2(CCN(CC2)CC(=O)NC3=CC=CC=C3SC4=CC=CC=C4)C(=O)N</chem>	Glu19, Asp22, Asp40, Thr210, Arg212,	Glu38, Thr89, Lys159, Ser203	Inactivo
T9 7388656	<chem>COC1=C(C=C(C(=C1)C[NH3+])Br)OCC2=CC=CC=C2Cl</chem>	Lys12, Asn14, Asp60, Asp70, Asp82, Tyr106, Glu109	Glu77, Arg98, Phe102, Gly103, Lys112	500mg/kg Carcinógeno, mutágeno
T10 45224319	<chem>C1CC(C2=CC=CC=C2C1)N C(=O)C3=CC=C(NC3=O)CN 4CCN(CC4)CC=CC5=CC=C C=C5</chem>	Lys4, Asp33, Asp40, His74, Asn108	Lys68, Val101, Phe102, Gly103, Ser105	2000mg/kg Inactivo
D4.- 2928276	<chem>CN1C(=C(C(=O)NC1=S)C(C 2=CC=C(C=C2)[N+](=O)[O-])C3=C(N(C(=S)NC3=O)C)O O</chem>	Lys12, Asn14, Glu102, Glu172, Ile177, Gly216, Gly240	Lys13, Asn15, Lys68, Ala73, Lys112, Trp191, Gly210, Val212, Gly232	680 mg/kg Mutagen -Positive -Negative -Negative 800 mg/kg

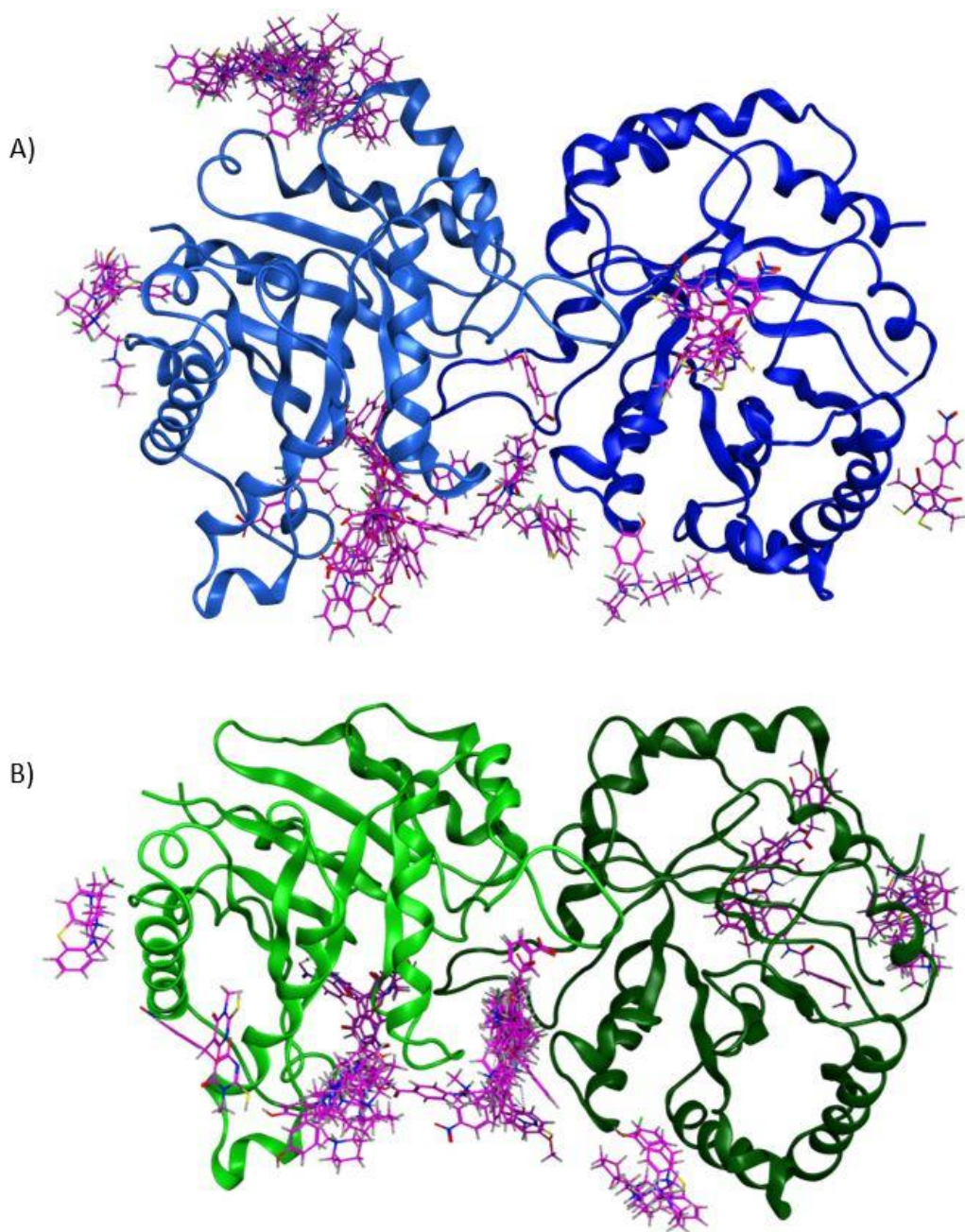


Figura 10. Los mejores 5 conformeros de los compuestos T1 – T5 (Rosa); en total los resultados del Docking indicaron 36 conformeros en su sitio de interacción. A) MtTIM (Azul) and B) HsTIM (Verde).

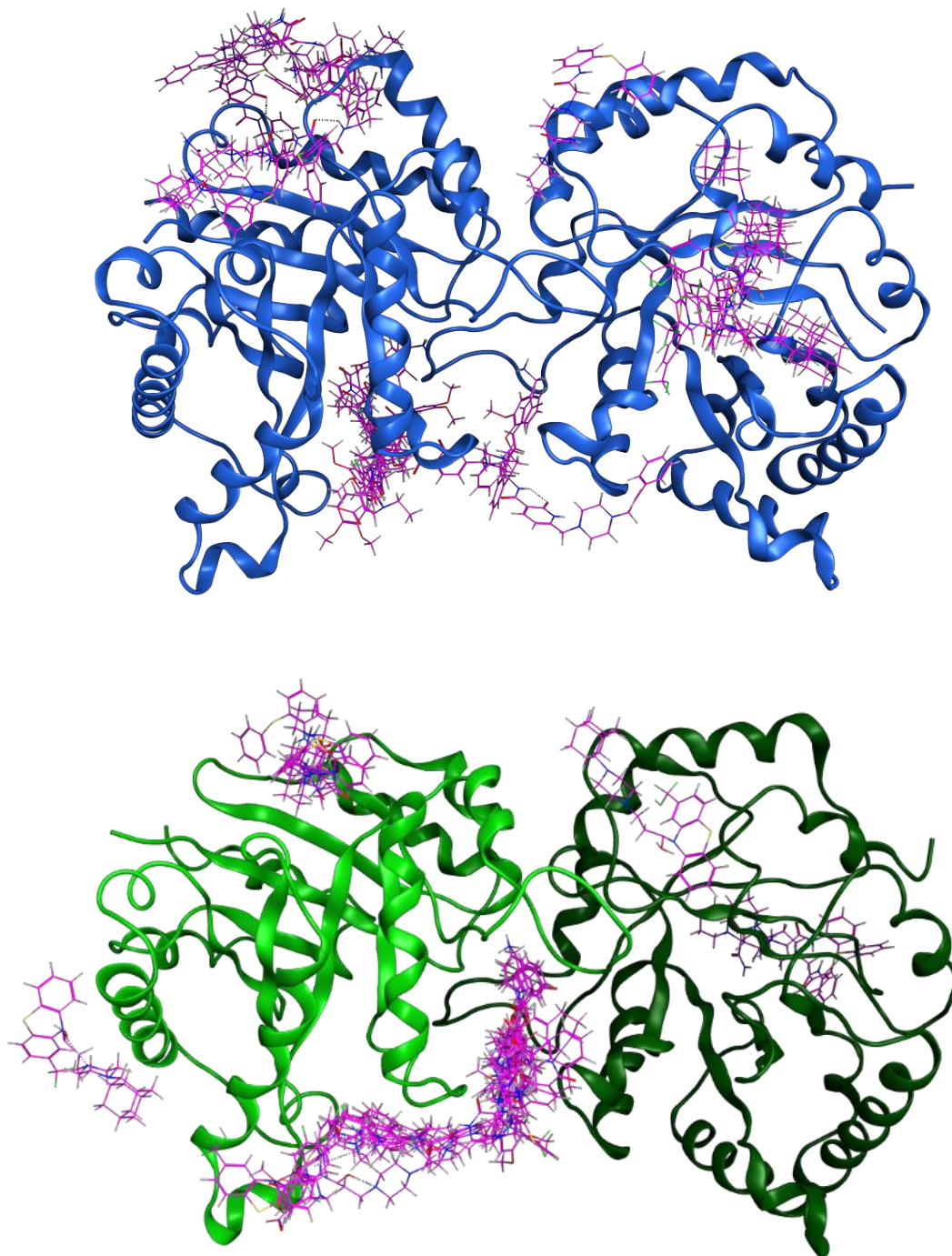


Figura 11. Los mejores 5 conformeros de los compuestos T6 – T10 (Rosa); en total los resultados del Docking indicaron 36 conformeros en su sitio de interacción. A) MtTIM (Azul) and B) HsTIM (Verde).

HsTIM	1	MAPSRKFFVCGNWKMN	GRKQSLGELIGTINAA---	KVPADTEVVCAPETAYIDFARQK--
MtTIM	1	--MSRKPLIAGNWKML	LNHYEAIALVQKIAFSLPKYYDRV	DAVAVIPFTDIRSVQTLVD
HsTIM	56	-LDPKIAVAQAQNCYKVTNGAFTGEIS	PCMIKDCGATVVVIGHSE	RRHVFGESEDELIGQKV
MtTIM	59	GDKLRITYGAQDLSPHDSGAYTGDV	SGAFIAKLCCSYVVVGHSE	RRTYHNEEDALVAARA
HsTIM	115	AHALAEGLGVITACIGEKIDEREAGI	TEKVVFEQTKV--IADNVK	DWSKVVLAYEPVWAIG
MtTIM	119	ATALKHGLTPPIVCIGEHIDVREAGN	HVAHNIQLRGLACLLAEQIGSVV	LAYEPVWAIG
HsTIM	173	TGRTATPQQAQEVHEKLRGWLKSNV	SDAVAQSTRITTYCGSVTCATCKE	IASQPDVDGFLV
MtTIM	179	TERVASAADAQEVCAAIRKELASLAS	PRIADIVRVLYCGSVNAKNGD	IVAQDQDVGGLV
HsTIM	233	GCASLKPEFVDIINAKQ-----		
MtTIM	239	GCASLDGEHFATIAAIAAGGPLP		

Figura 12. Alineamiento de la HsTIM y la MtTIM, con una identidad del 36.12 % entre ambas. Negro: idéntico; gris: similar; verde: aminoácidos importantes para la interacción con los compuestos T1-T10 y D4 en MtTIM; amarillo: aminoácidos conservados en HsTIM.

En la Figura 13 se muestra una gráfica obtenida de SwissADME (SwissADME, n.d.) donde se observan los compuestos T1-5 y T7-T10 dentro del área del “huevo” lo que significa que teóricamente estos compuestos serán absorbidos de forma pasiva en el intestino. Las moléculas en el área amarilla (T3, T4, T5, T9 y T10) presentan alta probabilidad de traspasar barrera hematoencefálica (BHE).

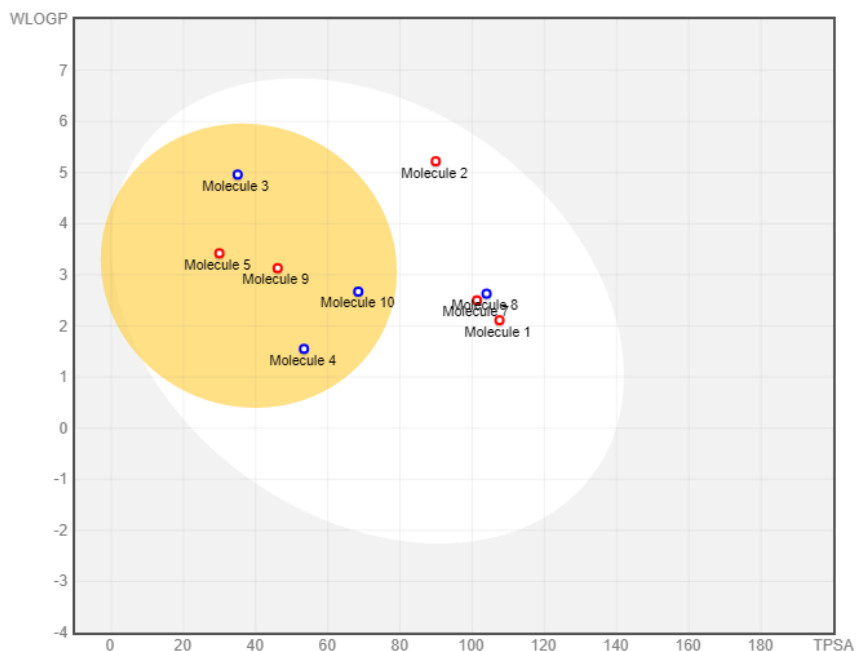


Figura 13. Gráfica de “huevo cocido”. Área blanca: Moléculas previstas para ser absorbidas en tracto GI. Área amarilla: Moléculas previstas para traspasar Barrera hematoencefálica

3.2 Ensayos de inhibición de viabilidad de Cultivos de *Mycobacterium tuberculosis*.

Los resultados de absorbancia reportados por iMark Microplate Reader con un filtro de medición de 595nm se presentan en la figura 14, de acuerdo a la distribución detallada en la figura 9 C y D.

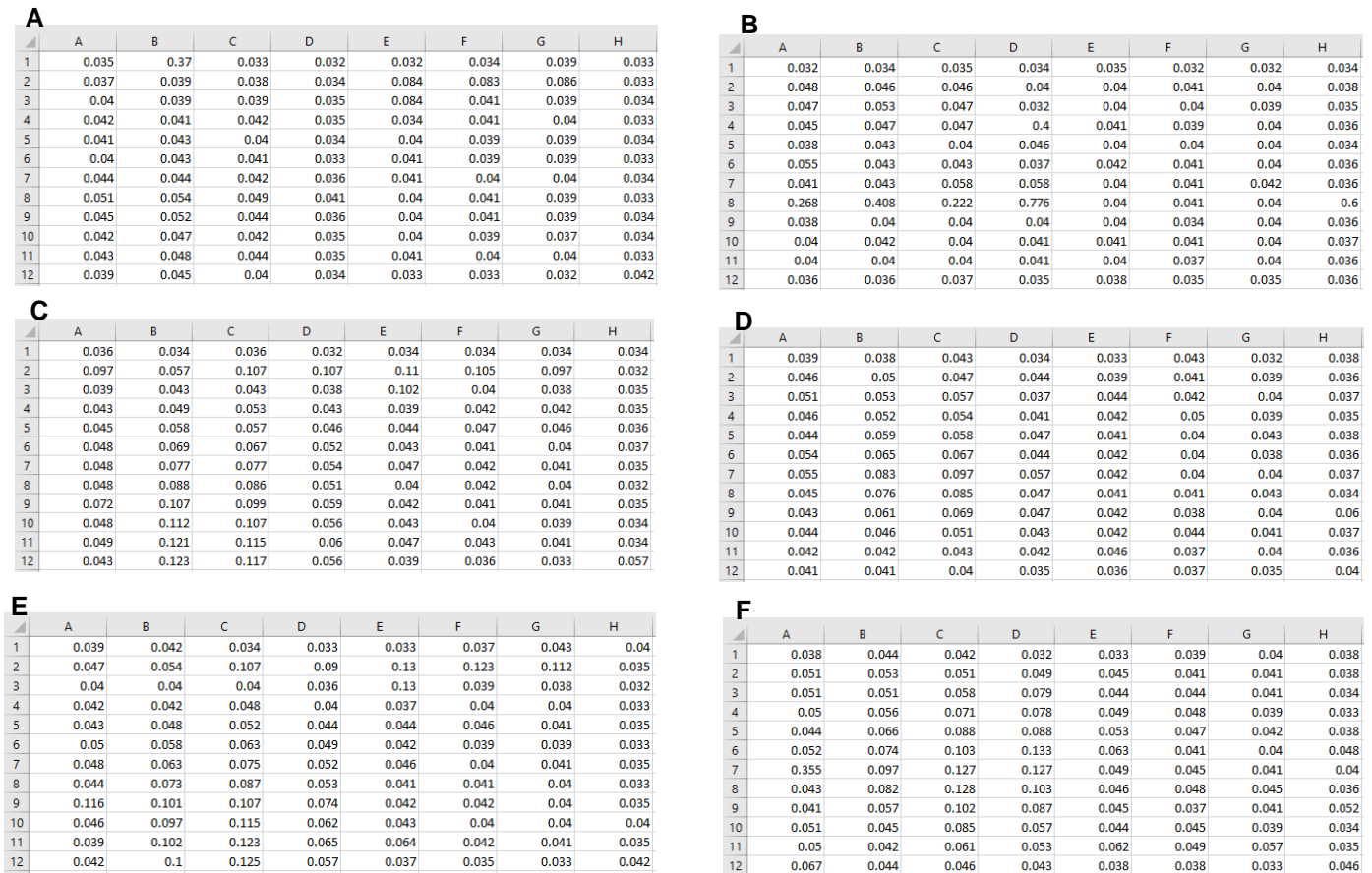


Figura 14. Resultados de absorbancia de las placas A: Placa 1 día 0. B: Placa 2 día 0. C: Placa 1 día 7. D: Placa 2 día 7, E: Placa 1 día 14, F: Placa 2: día 14

Podrías poner que no se pudo estandarizar, por lo que no se cumplió este objetivo?

4 Discusión

Los esfuerzos mundiales continúan para desarrollar nuevos fármacos anti-Tb, debido al aumento de los factores que dificultan el tratamiento de la enfermedad, como la Tb multidrogorresistente (MDR) y la tuberculosis extensivamente drogorresistente. (XDR).(Araujo et al., 2018; Koch & Mizrahi, 2018; Sanou et al., 2015; Senghore et al., 2020) Últimamente la Tb ha cobrado importancia por su asociación a COVID-19 grave como factor de riesgo (Aguilar-León et al., 2020; Chen et al., 2020; Chopra et al., 2020; McQuaid et al., 2020; Motta et al., n.d.; Tadolini et al., 2020; Tapela et al., 2020).

Es fundamental continuar con el desarrollo de nuevos fármacos anti-Tb. En este proyecto proponemos a la MtTIM como blanco terapéutico, ya que hay trabajos usando a la TIM para desarrollar fármacos contra otros organismos, por ejemplo: TIM de *Trichomonas vaginalis* (TvTIM) (Benítez-Cardoza et al., 2022), TIM de *Burkholderia thailandensis* (BtTIM), TIM de *Clostridium perfringens* (CpTIM), TIM de *Nostoc punctiforme* (NpTIM), TIM de *Thermus thermophiles* (TtTIM), TIM de *Streptomyces coelicolor* (ScTIM) y TIM de *Deinococcus radiodurans* (DrTIM)(Benítez-Cardoza, Fernández-Velasco, et al., 2020).

La MtTIM tiene características que podrían ayudar a desarrollar un fármaco inhibidor específico de TIM, ya que existen estudios que proponen aminoácidos que son importantes para generar interacciones y selectividad entre compuestos y TIMs, sin afectar la HsTIM. (Benítez-Cardoza et al., 2020; Vique-Sánchez et al., 2020; Vique Sánchez et al., 2020)

Por lo que proponemos que los diez compuestos podrían interactuar con la MtTIM, estos fueron seleccionados utilizando el acoplamiento molecular contra 18 sitios potenciales (Figura 6), los resultados indican los principales aminoácidos en MtTIM para una probable interacción y selectividad con los compuestos seleccionados (Tabla 5). Proponemos que, debido a que hay más Asp e His en MtTIM, la interacción con los compuestos es mejor (Figura 9), por lo que los promedios de $\Delta G_{binding}$ son más altos en MtTIM (Tabla 6). Para los compuestos (T1 – T10), los principales aminoácidos para interactuar en MtTIM y HsTIM se indican en la Tabla 4 y las Tablas S3 - S14, es importante mencionar, que a pesar de que hay algunos aminoácidos conservados entre MtTIM y HsTIM, es muy probable la selectividad solo para MtTIM, porque previamente se han probado compuestos que en teoría, no serían selectivos con la HsTIM, sin

efectos sobre su actividad glucolítica (Benítez-Cardoza, Jiménez-Pineda, et al., 2020; Benítez-Cardoza et al., 2020; Vique-Sánchez et al., 2020; Vique Sánchez et al., 2020).

Tabla 6. Promedio del ΔG /kcal mol⁻¹ y desviación estándar de los complejos compuesto-TIM seleccionados

Compuesto	MtTIM	HsTIM
T1	-12.02 ± 4.17	-7.30 ± 0.21
T2	-12.21 ± 2.34	-7.69 ± 0.20
T3	-9.83 ± 3.93	-6.31 ± 0.16
T4	-18.70 ± 5.03	-7.90 ± 0.34
T5	-11.84 ± 5.14	-6.71 ± 0.15
T6	-9.13 ± 0.67	-6.95 ± 0.41
T7	-9.77 ± 0.74	-7.96 ± 0.63
T8	-7.59 ± 2.24	-7.16 ± 0.37
T9	-8.69 ± 4.36	-7.67 ± 0.51
T10	-10.43 ± 3.51	-8.35 ± 0.55
D4	-11.64 ± 1.20	-6.83 ± 0.71

Es importante señalar que MtTIM conserva aminoácidos que son importantes en otras TIM (TvTIM, CpTIM, BtTIM, NpTIM, TtTIM, ScTIM, DrTIM y MtTIM), que son inhibidos por compuestos que interactúan con más Asp, Arg, Lys y His. MtTIM tiene aminoácidos Asp33, Arg63, His74, Asp82, Thr105, Tyr106, His107, Asp110, His147, Asp209, Asp231 (Figura 3, Figura S7 – S12), estos aminoácidos con características (cargas positivas y negativas) que aumentan la interacción con las moléculas (Ellington & Cherry, 1996), los cuales son importantes para generar la capacidad de interactuar con los compuestos T1 – T10 y D4, y probablemente estos aminoácidos podrían ayudar a otros compuestos a interactuar con MtTIM. Los principales aminoácidos con los que hacen interacción los compuestos son Asp, Glu, Lys, His que son aminoácidos con capacidad de ceder o tomar electrones (ácidos o básicos) formando enlaces iónicos lo que les confiere probablemente esas fuertes interacciones a los sitios de la proteína que estén configurados en la estructura terciaria de la TIM de que permita a los compuestos embonar con sus cargas parciales en dicha configuración (McKee & McKee, 2020). Las interacciones observadas en HsTIM tienden a ser menos favorables energéticamente que las observadas en MtTIM además de confluir en aminoácidos situados en la interfase, mientras que los aminoácidos con los que interaccionan los compuestos en MtTIM

forman parte de las hélices alfa que rodean al sitio activo, a lo que probablemente se deba su selectividad.

Además, es importante considerar otras consecuencias de que algún compuesto/molécula interactúe con este tipo de aminoácidos, en particular Asp, Arg y Lys, ya que estos aminoácidos podrían influir en la estabilidad conformacional del MtTIM (Meuzelaar et al., 2016).

Como ya se mencionó, existen otras TIMs con reportes de compuestos con algún efecto inhibitorio (Benítez-Cardoza et al., 2020), es posible proponer el uso de los compuestos contra otras TIMs, debido a que la MtTIM tiene un mayor porcentaje de identidad con las TIMs probadas, la MtTIM tiene una identidad de 42,58 % con BtTIM, 40,23 % con CpTIM, 38,68 % con NpTIM, 64,50 % con ScTIM, 45,59 % con DrRTIM y 49,42 % con TmTIM, y menos identidad con HsTIM de 36,12 %. Por otro lado, los aminoácidos Phe46 y Lys230 son importantes para disminuir la actividad glucolítica en los TIMs probados. MtTIM tiene estos aminoácidos, pero en HsTIM no se conservan ambos aminoácidos (Figura S13). Por lo tanto, los compuestos reportados podrían probarse contra otras TIMs, manteniendo la probable seguridad de uso de estos compuestos con la HsTIM, ya que tiene menos identidad con las TIMs probadas.

Finalmente, basándonos en los resultados de la Figura 10 podemos inferir que estos compuestos tienen características para el desarrollo de una presentación farmacéutica de vía oral, los compuestos T6 y D4 presentan con estos modelos alta probabilidad de no ser bien asimilados en el tracto GI por lo que de presentar resultados favorables en la citotoxicidad *in vitro*, deberán hacerse pruebas de farmacocinética y tal vez sea necesario una presentación del fármaco distinta a la vía oral, o alguna modificación para ser asimilado. Además, las moléculas en el área amarilla (T3, T4, T5, T9 y T10) presentan alta probabilidad de traspasar BHE, lo cual podría ser útil para tratar Tb meníngea sin embargo será necesario prestar atención a posibles efectos adversos en SNC.

Actualmente existen muchos desarrollos de fármacos antituberculosos que utilizan otros blancos terapéuticos (Harikishore et al., 2020; Karale et al., 2021; Meuzelaar et al., 2016; Naz et al., 2019; Santos et al., 2020; Šlachtová et al., 2020). La TIM está creciendo como diana terapéutica en diferentes organismos y hay avances en ensayos in vivo, como el compuesto D4 contra *E. histolytica* (Vique-Sánchez et al., 2020). Por lo tanto, MtTIM podría ser otra alternativa

para afectar la viabilidad de *M. tuberculosis* y poder contribuir a los esfuerzos para desarrollar mejores medicamentos anti-Tb.

Los resultados de los experimentos *in vitro* no fueron válidos, debido a que los pozos se deshidrataron (o el líquido en los pozos se evaporó) de forma irregular. Se realizaron ajustes en la incubadora, en la humedad y la concentración de CO² (Figura 9 C y D), sin embargo, a las 2 semanas también hubo evaporación y al ser heterogénea entre los pozos, no se tomaron en cuenta estos resultados. Ya que el tiempo entre mediciones con los cultivos líquidos debe ser de 7, 14 y 21 días, el tiempo para llevar a cabo los experimentos *in vitro* se agotó.

Quedará pendiente la parte microbiológica de este proyecto, ya que no se pudo estandarizar el cultivo de *M. tuberculosis*, como soluciones a los problemas en la experimentación *in vitro* podemos sugerir, llevar a cabo los experimentos en medios sólidos, que requieren más tiempo para los cultivos, con mediciones de crecimiento cualitativas y utilizando una incubadora que permita regular la humedad y el CO² del ambiente, así como buscar alguna colaboración con algún grupo de investigación que ya tenga estandarizado el cultivo y prueba de compuestos experimentales anti-TB.

5 Conclusiones

En este estudio proponemos otro blanco terapéutico en *M. tuberculosis*, la triosa fosfato isomerasa (MtTIM), ya que esta enzima posee aminoácidos similares a otras TIMs que reducen la actividad enzimática con compuestos específicos (Benítez-Cardoza et al., 2020) (Vique-Sánchez et al., 2020), para desarrollar un nuevo fármaco contra *M. tuberculosis*.

Así mismo, proponemos diez compuestos con alta probabilidad de ser selectivos contra MtTIM, debido a que los principales aminoácidos que son importantes para interactuar en MtTIM y estos no se conservan en la HsTIM, estos aminoácidos podrían generar la selectividad para MtTIM, que se ha demostrado en otras TIMs, por lo que estos compuestos deberán probarse mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, que demuestren la interacción específica con la MtTIM y el efecto anti-Tb, para poder proponer un compuesto selectivo con la MtTIM.

Perspectivas

Este enfoque *in silico* nos permite disminuir considerablemente el tiempo para identificar moléculas con un potencial uso como fármaco anti-Tb, dirigiéndolas a un blanco terapéutico específico, y basándonos en la simulación de acoplamiento molecular (docking), nos permite con suficiente rango de certeza, elegir los compuestos con mayor probabilidad de interactuar en la MtTIM, que pudieran provocar un efecto al inhibir su actividad enzimática, o su estabilidad dimérica.

No obstante, es necesario hacer las pruebas *in vitro* en cultivos de *M. tuberculosis*, para demostrar el efecto anti-Tb de los compuestos, así como en cultivos de células humanas para corroborar su baja o nula citotoxicidad.

Contenido de anexos

Figuras S1-S10 Los mejores 5 conformeros de cada complejo interactuando en MtTIM y HsTIM

Tablas S1 y S2 los ΔG de unión de los mejores conformeros para cada compuesto en MtTIM y HsTIM

Tablas S3-S14 Reportes de interacción de los compuestos con MtTIM y HsTIM

Tablas S16-S18 Predicciones de ADMET y propiedades Bioquímicas

Actividades académicas



La Universidad Autónoma de Guerrero y el Instituto Nacional de Medicina Genómica otorgan la presente

CONSTANCIA

A:

David Hernández Viveros

por haber aprobado el curso en línea *Principios de Metodología de la Investigación* realizado del 14 al 25 de febrero, con una duración de 20 horas.

Ciudad de México, 25 de febrero de 2022



Dr. Oscar Ariza Cortés
Director de Estudios e Investigación

Dr. J. Jesús Guzmán Esteban
Director General de Estudios de Posgrado e Investigación

Dra. Teresita Elías Aguirre
Directora General de Planeación e Investigación

Dr. Oscar del Moral Hernández
Director de la Facultad de Ciencias Químicas Biológicas, UAGro

FOJIO:
UAGRO-22-23579



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
Coordinación General de Investigación y Posgrado

OTORGA LA SIGUIENTE CONSTANCIA A:

DAVID HERNÁNDEZ VIVEROS

Por su destacada participación con el cartel:

DESARROLLO DE UN INHIBIDOR DE LA ENZIMA TRIOSA FOSFATO ISOMERASA DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS*.
En el área de: **Medicina y Salud**
Realizado el 28 y 29 Octubre de 2021




COORDINADOR GENERAL
DR. JUAN GUILLERMO VACA RODRIGUEZ

Biointerface Research in Applied Chemistry
Platinum Open Access Journal (ISSN: 2069-5837)

Article
Volume 12, Issue 4, 2022, 5672- 5697
<https://doi.org/10.33263/BRIAC124.56725697>

Triosephosphate Isomerase from *Mycobacterium tuberculosis* as Potential Target to Develop a New Anti-TB Drug

David Hernández-Viveros ¹, Donato A. Rechy-Iruretagoyena ¹, Raúl Díaz-Molina ¹, José Luis Vique-Sánchez ^{1,2*}

¹ Medical School, Campus Mexicali, Autonomous University of Baja California, BC, México
* Correspondence: jvique@uabc.edu.mx (J.L.V.-S.);

Scopus Author ID 57195635710
Received: 1.09.2021; Revised: 15.10.2021; Accepted: 18.10.2021; Published: 21.10.2021

Abstract: Tuberculosis (TB) is possibly the most prevalent infectious disease in the world, reports from the World Health Organization (WHO) indicate that TB is one of the top 10 causes of death and an estimated 10 million people worldwide, in addition, there are increasing the TB resistant to conventional antibiotics, multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) and extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB). Lastly, TB has become more important and requires more attention since it has been proposed as a risk factor for the severity of COVID-19. Therefore, the need to develop new anti-TB drugs. In this study, we propose to use the glycolytic enzyme triosephosphate isomerase from *Mycobacterium tuberculosis* (MtTIM) as a therapeutic target against TB. The triosephosphate isomerase (TIM) is a target used in different proposals to develop new drugs against different organisms. The MtTIM is an extremely attractive drug target due to the characteristics of its amino acids sequence. In addition, it has been determined that this enzyme (MtTIM) is necessary for the viability of *in vitro* and *in vivo* cultures of *Mycobacterium tuberculosis*. In this way, using the MtTIM as a therapeutic target, we propose potential compounds against MtTIM by molecular docking.

Keywords: MtTIM inhibitors; triosephosphate isomerase; docking; *Mycobacterium tuberculosis*.

© 2021 by the authors. This article is an open-access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL CARMEN,
EL IX CONGRESO INTERNACIONAL DE PARASITOLÓGIA NEOTROPICAL
Y LA APHIA OTORGAN LA SIGUIENTE

Constancia

A: David Hernández Viveros y José Luis Vique-Sánchez

Por participar como EXPOSITOR del tema:

DESARROLLO DE UN INHIBIDOR DE LA ENZIMA TRIOSA FOSFATO ISOMERASA DE *Mycobacterium tuberculosis*

Presentado en el IX Congreso Internacional de Parasitología Neotropical, "Ciencia e Investigación en parasitología: Creando redes para la salud". Realizado del 4 al 6 de octubre del 2021, formato virtual en la Universidad Autónoma del Carmen, Ciudad del Carmen, Campeche, México.



Dra. Ma. Amparo Rodríguez Santiago
Presidenta del COPANEO 2021

Dr. José Alberto Irujo-Olivier
Vicepresidente del COPANEO 2021

6 BIBLIOGRAFÍA

ADMETlab. (n.d.).

- Aguilar-León, P., Cotrina-Castañeda, J., & Zavala-Flores, E. (2020). Infección por SARS-CoV-2 y tuberculosis pulmonar: análisis de la situación en el Perú. *Cadernos de Saúde Pública*, 36(11).
<https://doi.org/10.1590/0102-311x00094520>
- Ahmad, S., Jaber, A.-A., & Mokaddas, E. (2007). Frequency of embB codon 306 mutations in ethambutol-susceptible and -resistant clinical Mycobacterium tuberculosis isolates in Kuwait. *Tuberculosis*, 87(2), 123–129. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2006.05.004>
- Almeida Da Silva, P. E., & Palomino, J. C. (2011). Molecular basis and mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: classical and new drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 66, 1417–1430. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr173>
- Alonso, H., Bliznyuk, A. A., & Greedy, J. E. (2006). Combining docking and molecular dynamic simulations in drug design. *Medicinal Research Reviews*, 26(5), 531–568. <https://doi.org/10.1002/med.20067>
- Alvarez, G., Martínez, J., Aguirre-López, B., Cabrera, N., Pérez-Díaz, L., Gómez-Puyou, M. T. de, Gómez-Puyou, A., Pérez-Montfort, R., Garat, B., Merlino, A., González, M., & Cerecetto, H. (2014). New chemotypes as Trypanosoma cruzi triosephosphate isomerase inhibitors: a deeper insight into the mechanism of inhibition. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 29(2), 198–204.
<https://doi.org/10.3109/14756366.2013.765415>
- Araujo, Z., Macias-Segura, N., Lopez-Ramos, J. E., De Waard, J. H., Vanegas, M., Patarroyo, M. A., Salgado, A., & Enciso-Moreno, J. A. (2018). Diagnostic accuracy of combinations of serological biomarkers for identifying clinical tuberculosis. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 12(06), 429–441.
<https://doi.org/10.3855/jidc.9554>
- Aubry, A., Veziris, N., Cambau, E., Truffot-Pernot, C., Jarlier, V., & Fisher, L. M. (2006). Novel Gyrase Mutations in Quinolone-Resistant and -Hypersusceptible Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis : Functional Analysis of Mutant Enzymes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(1), 104–112.
<https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.104-112.2006>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity : A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Banerjee, P., Eckert, A. O., Schrey, A. K., & Preissner, R. (2018). ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W257–W263. <https://doi.org/10.1093/nar/gky318>
- Bartels, P. (1907). Tuberkulose (Wirbelkaries) in der jüngeren Steinzeit. *Archiv Für Anthropologie*, 243–255.
- Belanger, A. E., Besra, G. S., Ford, M. E., Mikusová, K., Belisle, J. T., Brennan, P. J., & Inamine, J. M. (1996). The embAB genes of Mycobacterium avium encode an arabinosyl transferase involved in cell wall arabinan biosynthesis that is the target for the antimycobacterial drug ethambutol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(21), 11919–11924.
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11919>
- Benítez-Cardoza, C. G., Fernández-Velasco, D. A., & Vique-Sánchez, J. L. (2020). Triosephosphate Isomerase Inhibitors as Potential Drugs against Clostridium perfringens. *ChemistrySelect*, 5(7), 2365–2370.
<https://doi.org/10.1002/slct.201904632>
- Benítez-Cardoza, C. G., Jiménez-Pineda, A., Angles-Falconi, S. I., Fernández-Velasco, D. A., & Vique-Sánchez, J. L. (2020). Potential Site to Direct Selective Compounds in the Triosephosphate Isomerase for the Development of New Drugs. *Chemistry Select*, 5, 4866–4878.
<https://doi.org/10.1002/slct.202000820>
- Benítez-Cardoza, C. G., Brieba, L. G., Arroyo, R., Rojo-Domínguez, A., & Vique-Sánchez, J. L. (2022). Synergistic effect of compounds directed to triosephosphate isomerase, a combination to develop drug against trichomoniasis. *Archiv Der Pharmazie*. <https://doi.org/10.1002/ardp.202200046>
- Benítez-Cardoza, C. G., Jiménez-Pineda, A., Angles-Falconi, S. I., Fernández-Velasco, D. A., & Vique-Sánchez, J. L.

- (2020). Potential Site to Direct Selective Compounds in the Triosephosphate Isomerase for the Development of New Drugs. *ChemistrySelect*, 5(16), 4866–4874. <https://doi.org/10.1002/slct.202000820>
- Berszin, C., & Bock Hensley, O. (2021). Tuberkulose-Museum Heidelberg. *Epidemiologisches Bulletin*, 11, 17–19. <https://doi.org/10.25646/7990>
- Campbell, A. J., Lamb, M. L., & Joseph-McCarthy, D. (2014). Ensemble-based docking using biased molecular dynamics. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 54(7), 2127–2138. <https://doi.org/10.1021/ci400729j>
- Chen, Y., Wang, Y., Fleming, J., Yu, Y., Gu, Y., Liu, C., Fan, L., Wang, X., Cheng, M., Bi, L., & Liu, Y. (2020). Active or latent tuberculosis increases susceptibility to COVID-19 and disease severity. *MedRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.03.10.20033795>
- Cheng, A. F. B., Yew, W. W., Chan, E. W. C., Chin, M. L., Hui, M. M. M., & Chan, R. C. Y. (2004). Multiplex PCR Amplimer Conformation Analysis for Rapid Detection of gyrA Mutations in Fluoroquinolone-Resistant Mycobacterium tuberculosis Clinical Isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(2), 596–601. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.2.596-601.2004>
- Chetty, S., Ramesh, M., Singh-Pillay, A., & Soliman, M. E. S. (2017). Recent advancements in the development of anti-tuberculosis drugs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27(3), 370–386. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2016.11.084>
- Chopra, K. K., Arora, V. K., & Singh, S. (2020). COVID 19 and tuberculosis. *Indian Journal of Tuberculosis*, 67(2), 149–151. <https://doi.org/10.1016/j.ijtb.2020.06.001>
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry, C. E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D., Chillingworth, T., Connor, R., Davies, R., Devlin, K., Feltwell, T., ... Barrell, B. G. (1998). Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. *Nature*, 393(6685), 537–544. <https://doi.org/10.1038/31159>
- Connor, S. E., Capodagli, G. C., Deaton, M. K., & Pegan, S. D. (2011). Structural and functional characterization of Mycobacterium tuberculosis triosephosphate isomerase. *Acta Crystallographica Section D Biological Crystallography*, 67(12), 1017–1022. <https://doi.org/10.1107/S0907444911042971>
- Cumming, J. G., Davis, A. M., Muresan, S., Haeberlein, M., & Chen, H. (2013). Chemical predictive modelling to improve compound quality. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(12), 948–962. <https://doi.org/10.1038/nrd4128>
- Curry International Tuberculosis Center, & California Department of Public Health. (2016). *Drug-Resistant Tuberculosis: A Survival Guide for Clinicians* (Third Edit).
- Daina, A., & Zoete, V. (2016). Cover Picture: A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules (ChemMedChem 11/2016). *ChemMedChem*, 11(11), 1109–1109. <https://doi.org/10.1002/cmdc.201600254>
- de Carvalho, L. P. S., Fischer, S. M., Marrero, J., Nathan, C., Ehrt, S., & Rhee, K. Y. (2010). Metabolomics of Mycobacterium tuberculosis Reveals Compartmentalized Co-Catabolism of Carbon Substrates. *Chemistry & Biology*, 17(10), 1122–1131. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.08.009>
- Dong, J., Wang, N.-N., Yao, Z.-J., Zhang, L., Cheng, Y., Ouyang, D., Lu, A.-P., & Cao, D.-S. (2018). ADMETlab: a platform for systematic ADMET evaluation based on a comprehensively collected ADMET database. *Journal of Cheminformatics*, 10(1), 29. <https://doi.org/10.1186/s13321-018-0283-x>
- Dookie, N., Rambaran, S., Padayatchi, N., Mahomed, S., & Naidoo, K. (2018). Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: a review on the molecular determinants of resistance and implications for personalized care. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1138–1151. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx506>
- Ellington, A., & Cherry, J. M. (1996). Characteristics of Amino Acids. *Current Protocols in Molecular Biology*, 33(1). <https://doi.org/10.1002/0471142727.mba01cs33>
- Fitzgerald, D. W., Sterling, T. R., & Haas, D. W. (2015). Mycobacterium tuberculosis. In Elsevier (Ed.), *Mandell, Douglas y Bennett Enfermedades Infecciosas Principios y Práctica* (Octava, pp. 2943–2978).

- Gómez-Puyou, A., Saavedra-Lira, E., Becker, I., Zubillaga, R. A., Rojo-Domínguez, A., & Perez-Montfort, R. (1995). Using evolutionary changes to achieve species-specific inhibition of enzyme action — studies with triosephosphate isomerase. *Chemistry & Biology*, 2(12), 847–855. [https://doi.org/10.1016/1074-5521\(95\)90091-8](https://doi.org/10.1016/1074-5521(95)90091-8)
- Gopal, P., Yee, M., Sarathy, J., Low, J. L., Sarathy, J. P., Kaya, F., Dartois, V., Gengenbacher, M., & Dick, T. (2016). Pyrazinamide Resistance Is Caused by Two Distinct Mechanisms: Prevention of Coenzyme A Depletion and Loss of Virulence Factor Synthesis. *ACS Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.6b00070>
- Harikishore, A., Chong, S. S. M., Ragunathan, P., Bates, R. W., & Grüber, G. (2020). Targeting the menaquinol binding loop of mycobacterial cytochrome bd oxidase. *Molecular Diversity*. <https://doi.org/10.1007/s11030-020-10034-0>
- Hazbón, M. H., Bobadilla del Valle, M., Guerrero, M. I., Varma-Basil, M., Filliol, I., Cavatore, M., Colangeli, R., Safi, H., Billman-Jacobe, H., Lavender, C., Fyfe, J., García-García, L., Davidow, A., Brimacombe, M., León, C. I., Porras, T., Bose, M., Chaves, F., Eisenach, K. D., ... Alland, D. (2005). Role of embB Codon 306 Mutations in Mycobacterium tuberculosis Revisited: a Novel Association with Broad Drug Resistance and IS 6110 Clustering Rather than Ethambutol Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(9), 3794–3802. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.9.3794-3802.2005>
- Hodgson, J. (2001). ADMET—turning chemicals into drugs. *Nature Biotechnology*, 19(8), 722–726. <https://doi.org/10.1038/90761>
- Hou, T., & Wang, J. (2008). Structure – ADME relationship: still a long way to go? *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4(6), 759–770. <https://doi.org/10.1517/17425255.4.6.759>
- Infanzón-Ruiz, R., Melo-Santiesteban, G., Aguirre-Del Barrio, M. F., & Siliceo-Benitez, J. (2018). Prevalencia de la mortalidad por Tuberculosis en el estado de Veracruz, México entre 2010 y 2017. *Rev Mex Med Forense*, 3(1), 68–74. <https://www.medigraphic.com/pdfs/forense/mmf-2018/mmf181h.pdf>
- Jane Maslow, M., & Portal-Celhay, C. (2015). Rifamicinas. In Elsevier (Ed.), *Mandell, Douglas y Bennett Enfermedades Infecciosas Principios y Práctica* (Octava, pp. 363–375).
- Jimenez-Sandoval, P., Vique-Sanchez, J. L., Hidalgo, M. L., Velazquez-Juarez, G., Diaz-Quezada, C., Arroyo-Navarro, L. F., Moran, G. M., Fattori, J., Jessica Diaz-Salazar, A., Rudiño-Pinera, E., Sotelo-Mundo, R., Figueira, A. C. M., Lara-Gonzalez, S., Benítez-Cardoza, C. G., & Brieba, L. G. (2017). A competent catalytic active site is necessary for substrate induced dimer assembly in triosephosphate isomerase. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1865(11), 1423–1432. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2017.07.014>
- Karale, U. B., Shinde, A. U., Babar, D. A., Sangu, K. G., Vagolu, S. K., Eruva, V. K., Jadav, S. S., Misra, S., Dharmarajan, S., & Rode, H. B. (2021). 3-Aryl-substituted imidazo[1,2-a]pyridines as antituberculosis agents. *Archiv Der Pharmazie*. <https://doi.org/10.1002/ardp.202000419>
- Kennedy, T. (1997). Managing the drug discovery/development interface. *Drug Discovery Today*, 2(10), 436–444. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(97\)01099-4](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(97)01099-4)
- Koch, A., & Mizrahi, V. (2018). Mycobacterium tuberculosis. *Trends in Microbiology*, 26(6), 555–556. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.02.012>
- Kola, I., & Landis, J. (2004). Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nature Reviews Drug Discovery*, 3(8), 711–716. <https://doi.org/10.1038/nrd1470>
- Lee, A. S. G., Othman, S. N. K., Ho, Y. M., & Wong, S. Y. (2004). Novel Mutations within the embB Gene in Ethambutol-Susceptible Clinical Isolates of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(11), 4447–4449. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.11.4447-4449.2004>
- Leggett, J. E. (2016). Aminoglucósidos. In Elsevier (Ed.), *ENFERMEDADES INFECCIOSAS Principios y práctica* (Octava, pp. 335–336).
- Luna López, F. L., Divulgare ECS UABC, & Programa de Micobacteriosis Secretaría de Salud CDMX. (2021). *Sesión 1 del 2do. Foro Virtual Internacional de Tuberculosis*. <https://youtu.be/ygjMLDOjImo>
- Marrero, J., Rhee, K. Y., Schnappinger, D., Pethe, K., & Ehrh, S. (2010). Gluconeogenic carbon flow of tricarboxylic

- acid cycle intermediates is critical for Mycobacterium tuberculosis to establish and maintain infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(21), 9819–9824.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1000715107>
- Maruri, F., Sterling, T. R., Kaiga, A. W., Blackman, A., van der Heijden, Y. F., Mayer, C., Cambau, E., & Aubry, A. (2012). A systematic review of gyrase mutations associated with fluoroquinolone-resistant Mycobacterium tuberculosis and a proposed gyrase numbering system. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(4), 819–831. <https://doi.org/10.1093/jac/dkr566>
- Mathur, D., Malik, G., & Garg, L. C. (2006). Biochemical and functional characterization of triosephosphate isomerase from Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *FEMS Microbiology Letters*, 263(2), 229–235.
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00420.x>
- Mathys, V., Wintjens, R., Lefevre, P., Bertout, J., Singhal, A., Kiass, M., Kurepina, N., Wang, X.-M., Mathema, B., Baulard, A., Kreiswirth, B. N., & Bifani, P. (2009). Molecular Genetics of para -Aminosalicylic Acid Resistance in Clinical Isolates and Spontaneous Mutants of Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(5), 2100–2109. <https://doi.org/10.1128/AAC.01197-08>
- Maus, C. E., Plikaytis, B. B., & Shinnick, T. M. (2005). Molecular Analysis of Cross-Resistance to Capreomycin, Kanamycin, Amikacin, and Viomycin in Mycobacterium tuberculosis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(8), 3192–3197. <https://doi.org/10.1128/AAC.49.8.3192-3197.2005>
- McKee, T., & McKee, J. R. (2020). Aminoácidos, péptidos y proteínas. In *Bioquímica. Las bases moleculares de la vida*, 7e. McGraw-Hill Education. <http://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?aid=1177256228>
- McQuaid, C. F., McCreesh, N., Read, J. M., Sumner, T., Houben, R. M. G. J., White, R. G., & Harris, R. C. (2020). The potential impact of COVID-19-related disruption on tuberculosis burden. *European Respiratory Journal*, 56(2), 2001718. <https://doi.org/10.1183/13993003.01718-2020>
- Meuzelaar, H., Vreede, J., & Woutersen, S. (2016). Influence of Glu/Arg, Asp/Arg, and Glu/Lys Salt Bridges on α -Helical Stability and Folding Kinetics. *Biophysical Journal*, 110(11), 2328–2341.
<https://doi.org/10.1016/j.bpj.2016.04.015>
- Minini, L., Álvarez, G., González, M., Cerecetto, H., & Merlino, A. (2015). Molecular docking and molecular dynamics simulation studies of Trypanosoma cruzi triosephosphate isomerase inhibitors. Insights into the inhibition mechanism and selectivity. *Journal of Molecular Graphics & Modelling*, 58, 40–49.
<https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2015.02.002>
- Motta, I., Centis, R., D’Ambrosio, L., García-García, J.-M., Goletti, D., Gualano, G., Lipani, F., Palmieri, F., Sánchez-Montalvá, A., Pontali, E., Sotgiu, G., Spanevello, A., Stochino, C., Taberner, E., Tadolini, M., van den Boom, M., Villa, S., Visca, D., & Migliori, G. B. (n.d.). Tuberculosis, COVID-19 and migrants: Preliminary analysis of deaths occurring in 69 patients from two cohorts. *Pulmonology*, 26(4), 233–240.
<https://doi.org/10.1016/j.pulmoe.2020.05.002>
- Nahid, P., Dorman, S. E., Alipanah, N., Barry, P. M., Brozek, J. L., Cattamanchi, A., Chaisson, L. H., Chaisson, R. E., Daley, C. L., Grzemska, M., Higashi, J. M., Ho, C. S., Hopewell, P. C., Keshavjee, S. A., Lienhardt, C., Menzies, R., Merrifield, C., Narita, M., O’Brien, R., ... Vernon, A. (2016). Official American Thoracic Society/Centers for Disease Control and Prevention/Infectious Diseases Society of America Clinical Practice Guidelines: Treatment of Drug-Susceptible Tuberculosis. *Clinical Infectious Diseases*, 63(7), e147–e195.
<https://doi.org/10.1093/cid/ciw376>
- Nahid, P., Mase, S. R., Migliori, G. B., Sotgiu, G., Bothamley, G. H., Brozek, J. L., Cattamanchi, A., Cegielski, J. P., Chen, L., Daley, C. L., Dalton, T. L., Duarte, R., Fregonese, F., Horsburgh, C. R., Ahmad Khan, F., Kheir, F., Lan, Z., Lardizabal, A., Lauzardo, M., ... Seaworth, B. (2019). Treatment of Drug-Resistant Tuberculosis. An Official ATS/CDC/ERS/IDSA Clinical Practice Guideline. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 200(10), e93–e142. <https://doi.org/10.1164/rccm.201909-1874ST>
- Naz, S., Farooq, U., Ali, S., Sarwar, R., Khan, S., & Abagyan, R. (2019). Identification of new benzamide inhibitor against α -subunit of tryptophan synthase from Mycobacterium tuberculosis through structure-based virtual screening, anti-tuberculosis activity and molecular dynamics simulations. *Journal of Biomolecular*

- Structure and Dynamics*, 37(4), 1043–1053. <https://doi.org/10.1080/07391102.2018.1448303>
- NIAID. (n.d.). *Tuberculosis Drugs and Mechanisms of Action*. <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/tbdrugs>
- Njire, M., Tan, Y., Mugweru, J., Wang, C., Guo, J., Yew, W., Tan, S., & Zhang, T. (2016). Pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Review and update. *Advances in Medical Sciences*, 61(1), 63–71. <https://doi.org/10.1016/j.advms.2015.09.007>
- Plinke, C., Cox, H. S., Kalon, S., Doshetov, D., Rüscher-Gerdes, S., & Niemann, S. (2009). Tuberculosis ethambutol resistance: Concordance between phenotypic and genotypic test results. *Tuberculosis*, 89(6), 448–452. <https://doi.org/10.1016/j.tube.2009.09.001>
- ProTox-II - Prediction of TOXicity*. (n.d.).
- Sanou, A., Bañuls, A.-L., Van Anh, N. T., & Godreuil, S. (2015). *Mycobacterium tuberculosis*: ecology and evolution of a human bacterium. *Journal of Medical Microbiology*, 64(11), 1261–1269. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000171>
- Santos, P., Lopez-Vallejo, F., Ramírez, D., Caballero, J., Mata Espinosa, D., Hernández-Pando, R., & Soto, C. Y. (2020). Identification of *Mycobacterium tuberculosis* CtpF as a target for designing new antituberculous compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 28(3), 115256. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2019.115256>
- Selick, H. E., Beresford, A. P., & Tarbit, M. H. (2002). The emerging importance of predictive ADME simulation in drug discovery. *Drug Discovery Today*, 7(2), 109–116. [https://doi.org/10.1016/S1359-6446\(01\)02100-6](https://doi.org/10.1016/S1359-6446(01)02100-6)
- Senghore, M., Diarra, B., Gehre, F., Otu, J., Worwui, A., Muhammad, A. K., Kwambana-Adams, B., Kay, G. L., Sanogo, M., Baya, B., Orsega, S., Doumbia, S., Diallo, S., de Jong, B. C., Pallen, M. J., & Antonio, M. (2020). Evolution of *Mycobacterium tuberculosis* complex lineages and their role in an emerging threat of multidrug resistant tuberculosis in Bamako, Mali. *Scientific Reports*, 10(1), 327. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-56001-0>
- Singh, R., Dwivedi, S. P., Gaharwar, U. S., Meena, R., Rajamani, P., & Prasad, T. (2019). Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Applied Microbiology, Who 2018*. <https://doi.org/10.1111/jam.14478>
- Singh, R., Dwivedi, S. P., Gaharwar, U. S., Meena, R., Rajamani, P., & Prasad, T. (2020). Recent updates on drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Applied Microbiology*, 128(6), 1547–1567. <https://doi.org/10.1111/jam.14478>
- Šlachťová, V., Šebela, M., Torfs, E., Oorts, L., Cappoen, D., Berka, K., Bazgier, V., & Brulíková, L. (2020). Novel thiazolidinedione-hydroxamates as inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* virulence factor Zmp1. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 185, 111812. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111812>
- Somskovi, A., Parsons, L. M., & Salfinger, M. (2001). The molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. *Respiratory Research*, 2(3), 164–168. <https://doi.org/10.1186/rr54>
- Sreevatsan, S., Stockbauer, K. E., Pan, X., Kreiswirth, B. N., Moghazeh, S. L., Jacobs, W. R., Telenti, A., & Musser, J. M. (1997). Ethambutol resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: critical role of embB mutations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(8), 1677–1681. <https://doi.org/10.1128/AAC.41.8.1677>
- Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud, Dirección General de Epidemiología, & Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos “Dr. Manuel Martínez Báez.” (2019). *Lineamientos para la Vigilancia Epidemiológica por Laboratorio de la Tuberculosis*.
- Sun, Z., Zhang, J., Zhang, X., Wang, S., Zhang, Y., & Li, C. (2008). Comparison of gyrA gene mutations between laboratory-selected ofloxacin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains and clinical isolates. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 31(2), 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.10.014>
- SwissADME*. (n.d.). <http://www.swissadme.ch/>
- Tadolini, M., Codecasa, L. R., García-García, J.-M., Blanc, F.-X., Borisov, S., Alffenaar, J.-W., Andréjak, C., Bachez, P., Bart, P.-A., Belilovski, E., Cardoso-Landivar, J., Centis, R., D’Ambrosio, L., Luiza De Souza-Galvão, M.-,

- Dominguez-Castellano, A., Dourmane, S., Fréchet Jachym, M., Froissart, A., Giacomet, V., ... Migliori, G. B. (2020). Active tuberculosis, sequelae and COVID-19 co-infection: first cohort of 49 cases. *European Respiratory Journal*, 56(1), 2001398. <https://doi.org/10.1183/13993003.01398-2020>
- Tapela, K., Ochieng' Olwal, C., & Quaye, O. (2020). Parallels in the pathogenesis of SARS-CoV-2 and M. tuberculosis : a synergistic or antagonistic alliance? *Future Microbiology*, 15(18), 1691–1695. <https://doi.org/10.2217/fmb-2020-0179>
- Telenti, A., Philipp, W. J., Sreevatsan, S., Bernasconi, C., Stockbauer, K. E., Wieles, B., Musser, J. M., & Jacobs, W. R. (1997). The emb operon, a gene cluster of Mycobacterium tuberculosis involved in resistance to ethambutol. *Nature Medicine*, 3(5), 567–570. <https://doi.org/10.1038/nm0597-567>
- Tian, S., Sun, H., Pan, P., Li, D., Zhen, X., Li, Y., & Hou, T. (2014). Assessing ensemble docking-based virtual screening strategy for kinase targets by considering protein flexibility. *Journal of Chemical Information and Modeling*.
- Tiemersma, E. W., van der Werf, M. J., Borgdorff, M. W., Williams, B. G., & Nagelkerke, N. J. D. (2011). Natural history of tuberculosis: Duration and fatality of untreated pulmonary tuberculosis in HIV negative patients: A systematic review. *PLoS ONE*, 6(4), e17601. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017601>
- Trujillo, C., Blumenthal, A., Marrero, J., Rhee, K. Y., Schnappinger, D., & Ehrt, S. (2014a). Triosephosphate isomerase is Dispensable in vitro yet Essential for Mycobacterium tuberculosis to establish infection. *MBio*, 5(2), 1–11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00085-14>
- Trujillo, C., Blumenthal, A., Marrero, J., Rhee, K. Y., Schnappinger, D., & Ehrt, S. (2014b). Triosephosphate Isomerase Is Dispensable In Vitro yet Essential for Mycobacterium tuberculosis To Establish Infection. *MBio*, 5(2). <https://doi.org/10.1128/mBio.00085-14>
- van de Waterbeemd, H., & Gifford, E. (2003). ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(3), 192–204. <https://doi.org/10.1038/nrd1032>
- Velanker, S. S., Ray, S. S., Gokhale, R. S., Suma, S., Balaram, H., Balaram, P., & Murthy, M. R. (1997). Triosephosphate isomerase from Plasmodium falciparum: the crystal structure provides insights into antimalarial drug design. *Structure (London, England : 1993)*, 5(6), 751–761.
- Vique-Sánchez, J. L., Caro-Gómez, L. A., Brieba, L. G., & Benítez-Cardoza, C. G. (2020). Developing a new drug against trichomoniasis, new inhibitory compounds of the protein triosephosphate isomerase. *Parasitology International*, 102086. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102086>
- Vique-Sánchez, J. L., Jiménez-Pineda, A., & Benítez-Cardoza, C. G. (2020). Amoebicidal effect of 5,5'-[(4-nitrophenyl)methylene]bis-6-hydroxy-2-mercapto-3-methyl-4(3H)-pyrimidinone, a new drug against Entamoeba histolytica. *Archiv Der Pharmazie*. <https://doi.org/10.1002/ardp.202000263>
- Vique Sánchez, J. L., Jiménez Pineda, A., & Benítez Cardoza, C. G. (2020). Amoebicidal effect of 5,5'-[(4-nitrophenyl)methylene]bis-6-hydroxy-2-mercapto-3-methyl-4(3H)-pyrimidinone, a new drug against Entamoeba histolytica. *Archiv Der Pharmazie*, 16 September 2020, 1–7. <https://doi.org/10.1002/ardp.202000263>
- Wallace Jr., R. J., Philey, J. V., & Griffith, D. E. (2015). Antimicobacterianos. In Elsevier (Ed.), *Mandell, Douglas y Bennett Enfermedades Infecciosas Principios y Práctica* (Octava, pp. 493–509).
- Waring, M. J., Arrowsmith, J., Leach, A. R., Leeson, P. D., Mandrell, S., Owen, R. M., Pairaudeau, G., Pennie, W. D., Pickett, S. D., Wang, J., Wallace, O., & Weir, A. (2015). An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(7), 475–486. <https://doi.org/10.1038/nrd4609>
- WHO. (2019). Consolidated Guidelines on Tuberculosis Treatment. In *Who*.
- World Health Organization. (2011). *Companion handbook to the WHO guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis*.
- World Health Organization. (2016). *WHO treatment guidelines for drug-resistant tuberculosis 2016* (Issue October).

- World Health Organization. (2020). *Global Tuberculosis Report 2020*.
- World Health Organization. (2021). *Global Tuberculosis Report 2021*.
- Xiong, G., Wu, Z., Yi, J., Fu, L., Yang, Z., Hsieh, C., Yin, M., Zeng, X., Wu, C., Lu, A., Chen, X., Hou, T., & Cao, D. (2021). ADMETlab 2.0: an integrated online platform for accurate and comprehensive predictions of ADMET properties. *Nucleic Acids Research*, *49*(W1), W5–W14. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab255>
- Zhang, Xiaobing, Liu, L., Zhang, Y., Dai, G., Huang, H., & Jin, Q. (2015). Genetic Determinants Involved in p - Aminosalicylic Acid Resistance in Clinical Isolates from Tuberculosis Patients in Northern China from 2006 to 2012. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *59*(2), 1320–1324. <https://doi.org/10.1128/AAC.03695-14>
- Zhang, Xiaohua, Wong, S. E., & Lightstone, F. C. (2014). Toward fully automated high performance computing drug discovery: A massively parallel virtual screening pipeline for docking and molecular mechanics/generalized born surface area rescoring to improve enrichment. *Journal of Chemical Information and Modeling*, *54*(1), 324–337. <https://doi.org/10.1021/ci4005145>
- Zhang, Y., Heym, B., Allen, B., Young, D., & Cole, S. (1992). The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature*, *358*, 591–592. <https://doi.org/10.1038/358591a0>

V.º B.º

Dr. Jose Luis Vique Sánchez
Profesor Tiempo Completo - Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Baja California

7 Anexos

Expositor en el IX congreso de parasitología neotropical, Oct 2021



Cartel en el 8vo encuentro estatal de jóvenes investigadores, Oct 2021



Material suplementario

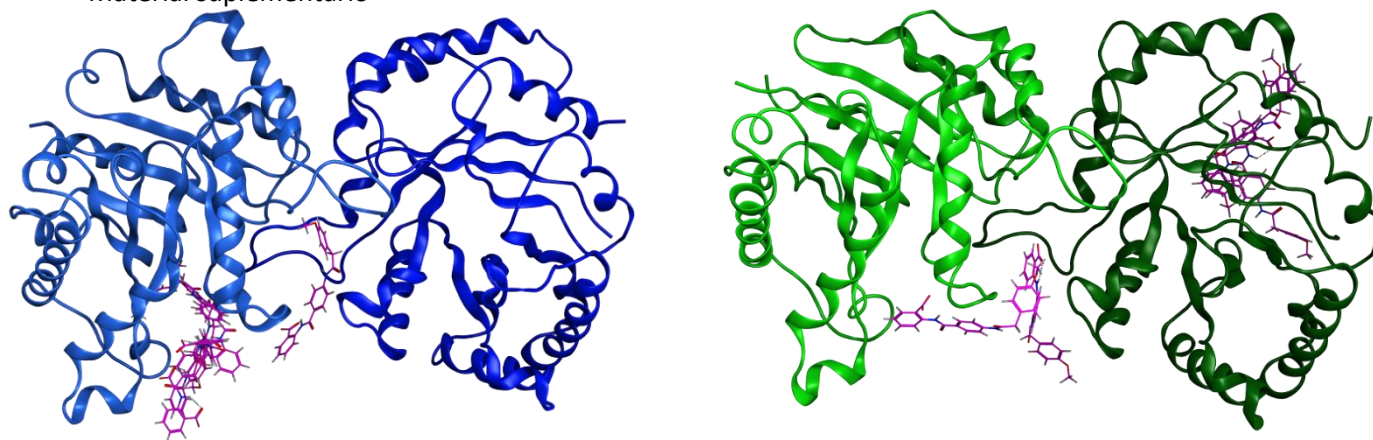


Figure S1. From docking results, the best five conformers of T1 compound (Pink) interacting in MtTIM (Blue) and HsTIM (Green).

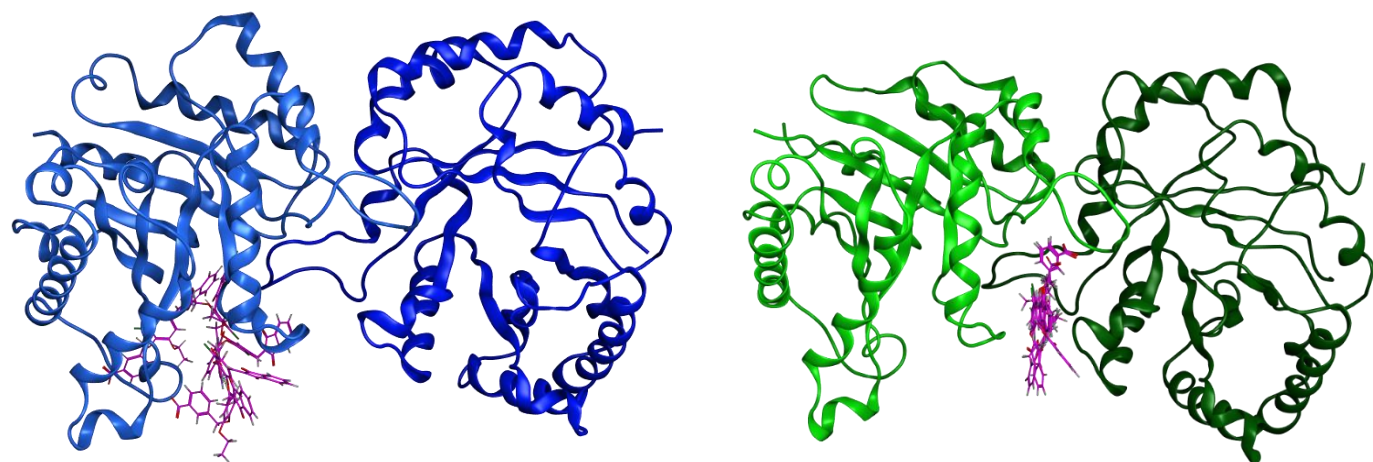


Figure S2. From docking results, the best five conformers of T2 compound (Pink) interacting in MtTIM (Blue) and HsTIM (Green).

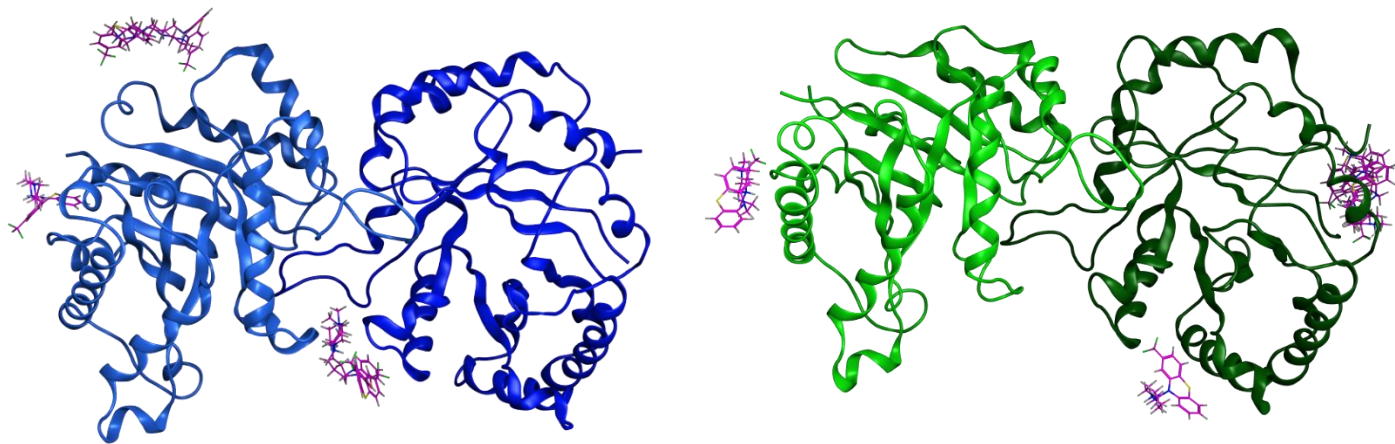


Figure S3. From docking results, the best five conformers of T3 compound (Pink) interacting in MtTIM (Blue) and HsTIM (Green).

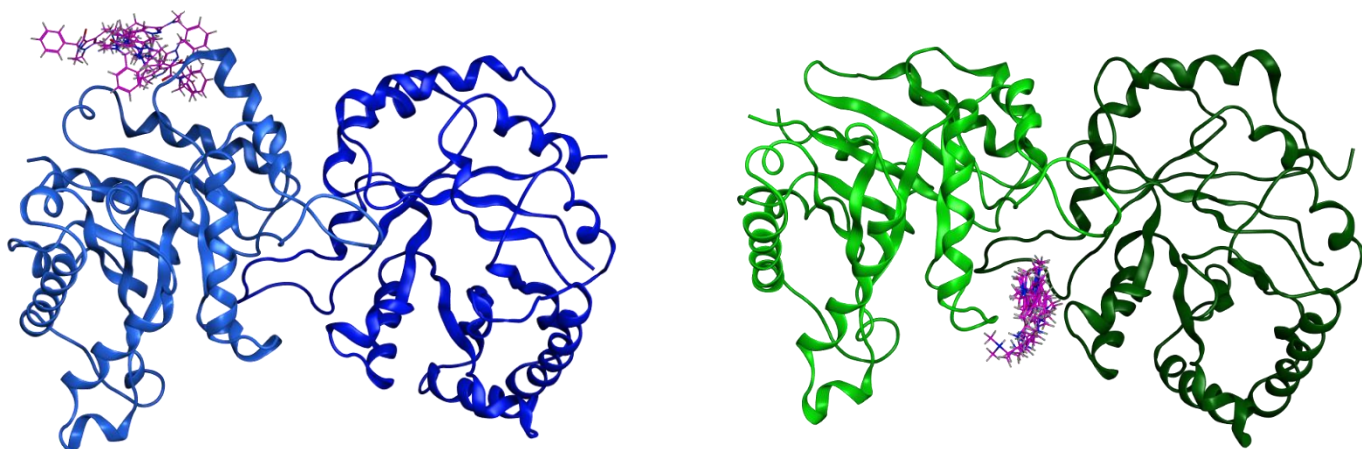


Figure S4. From docking results, the best five conformers of T4 compound (Pink) interacting in MtTIM (Blue) and HsTIM (Green).

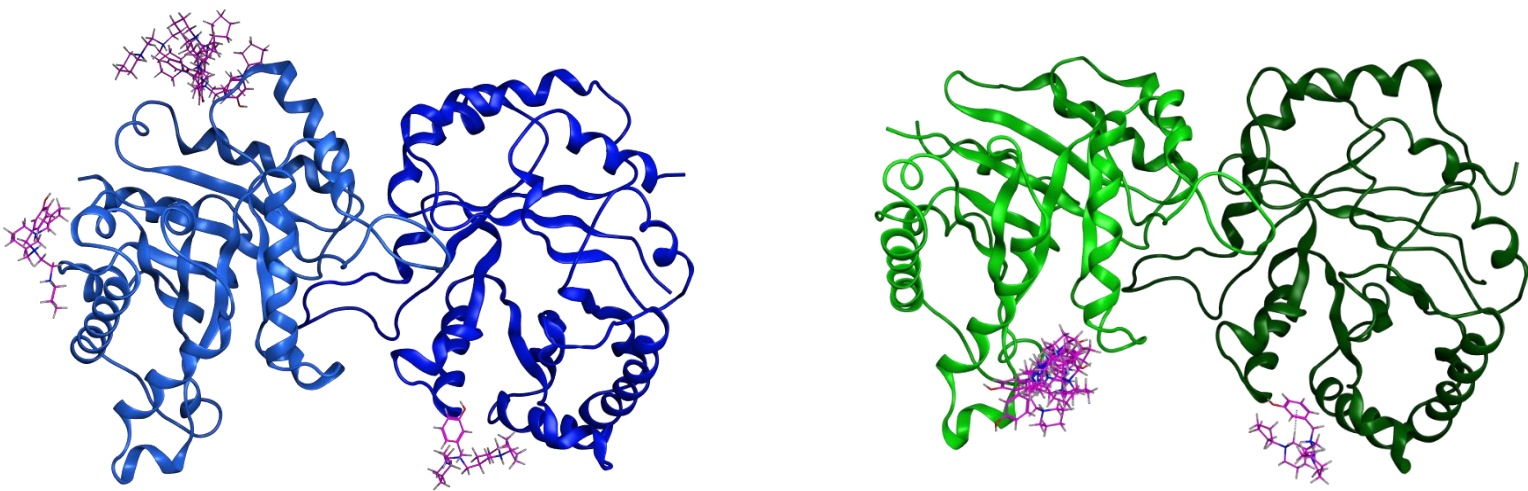


Figure S5. From docking results, the best five conformers of T5 compound (Pink) interacting in MtTIM (Blue) and HsTIM (Green).

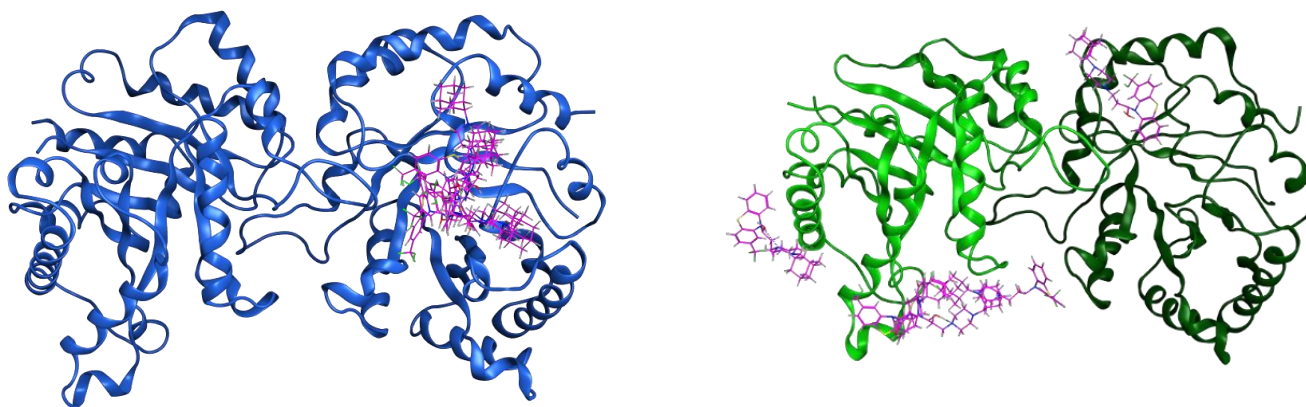


Figure S6. From docking results, the best five conformers of T6 compound (Pink) interacting in MtTIM (Blue) and HsTIM (Green).

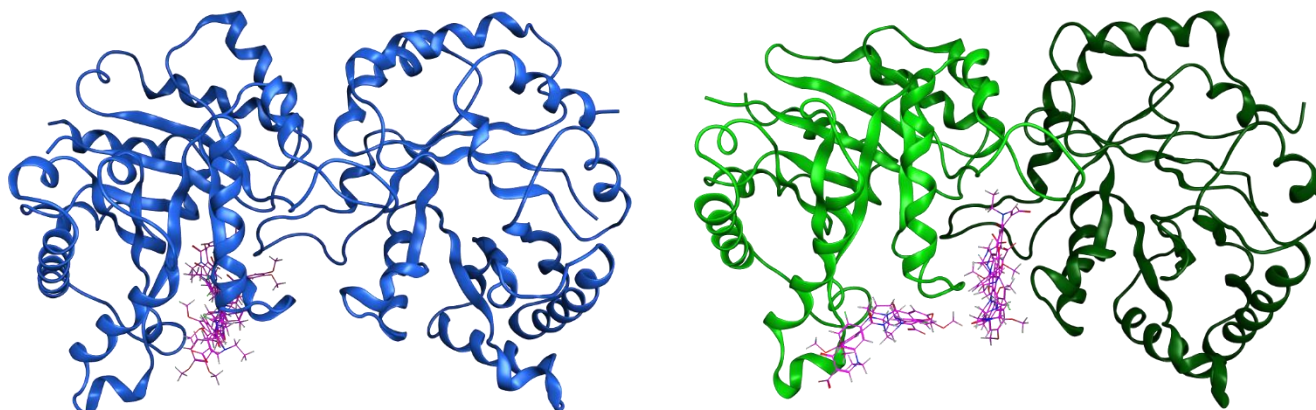


Figure S7. From docking results, the best five conformers of T7 compound (Pink) interacting in MtTIM (Blue) and HsTIM (Green).

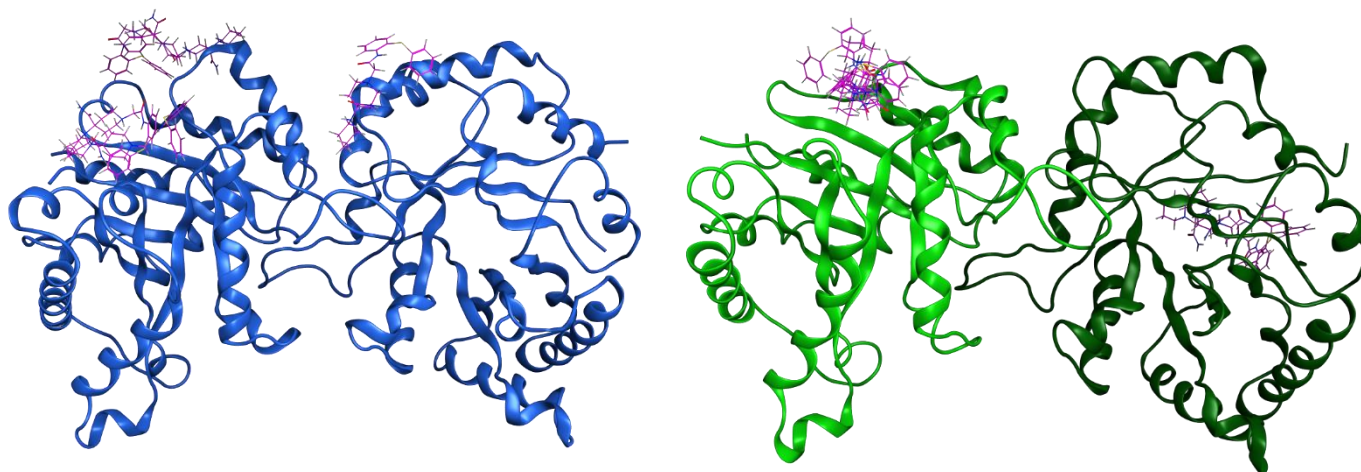


Figure S8. From docking results, the best five conformers of T8 compound (Pink) interacting in MtTIM (Blue) and HsTIM (Green).

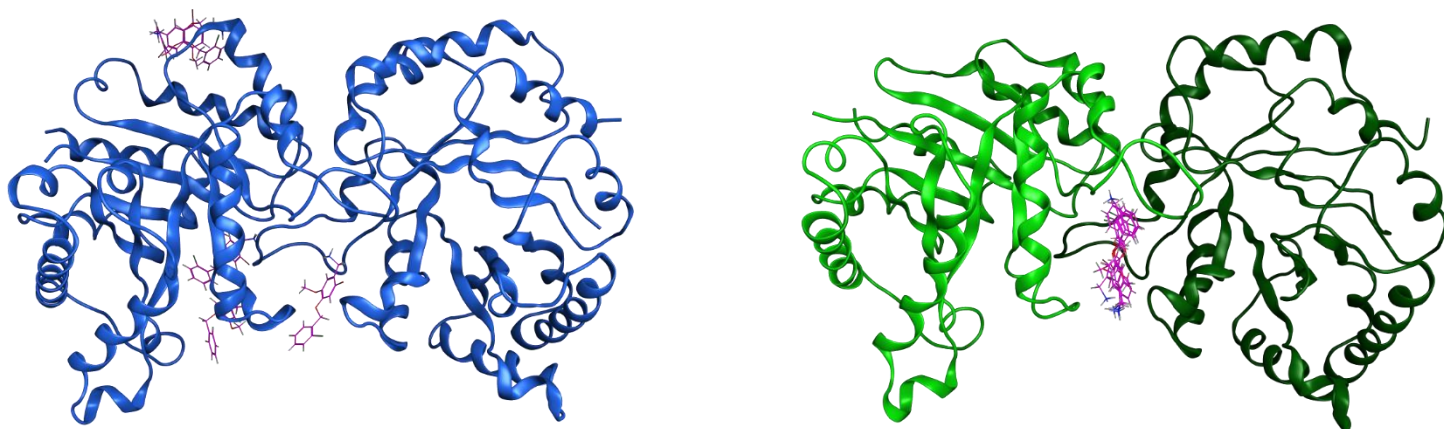


Figure S9. From docking results, the best five conformers of T9 compound (Pink) interacting in MtTIM (Blue) and HsTIM (Green).

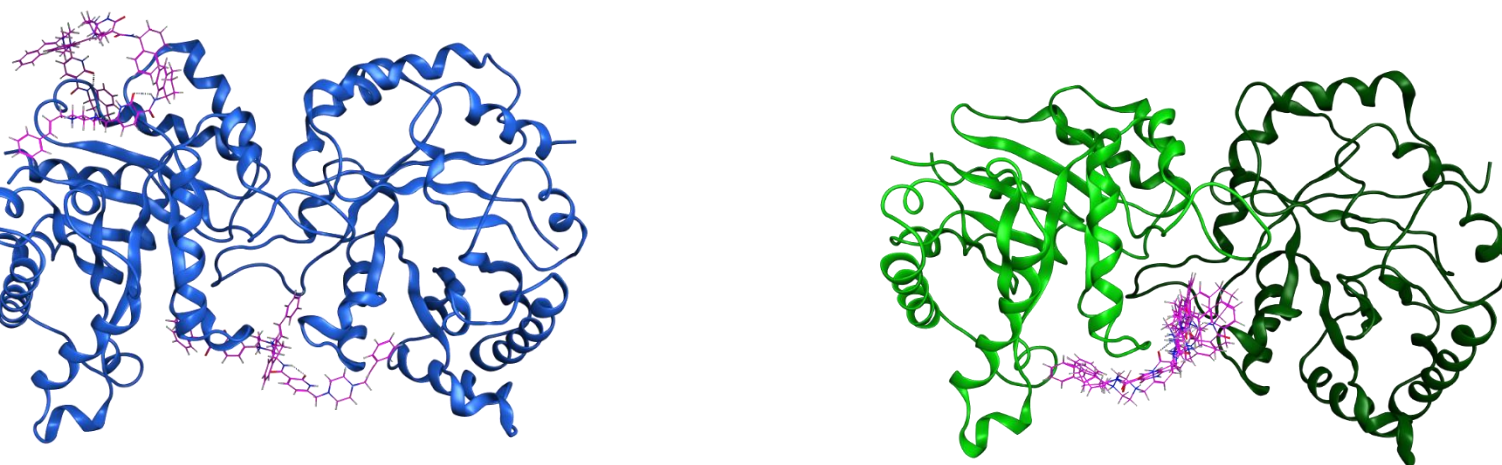


Figure S10. From docking results, the best five conformers of T10 compound (Pink) interacting in MtTIM (Blue) and HsTIM (Green).

Table S1. $\Delta G_{\text{binding}}$ of 21 to 30 conformers from each compound, average $\Delta G_{\text{binding}}$ and SD for MtTIM.		
Compound	Conformer	$\Delta G_{\text{binding}}$
T1	1	-19.348755
T1	2	-11.571745
T1	3	-9.7634153
T1	4	-9.736414
T1	5	-9.7051849
T1	6	-9.6517811
T1	7	-9.3762941
T1	8	-8.7816877
T1	9	-8.6600494
T1	10	-8.5193396
T1	11	-8.4768028
T1	12	-8.4182835
T1	13	-7.9478245
T1	14	-7.7077098
T1	15	-7.5816722
T1	16	-7.5145373
T1	17	-7.3756046
T1	18	-7.3566918
T1	19	-7.2295027
T1	20	-7.1804833
T1	21	-7.1161585
T1	22	-6.8189993
T1	23	-6.4268341
T1	24	-6.3229618
T1	25	-6.2017331
T1	26	-6.1079049
T1	27	-5.7765675

T1	28	-5.6680088
T1	29	-5.6583171
T1	30	-5.3566537
T2	1	-15.537114
T2	2	-13.553677
T2	3	-11.770159
T2	4	-10.279182
T2	5	-9.9367619
T2	6	-9.8412666
T2	7	-9.2330456
T2	8	-8.8120222
T2	9	-7.979362
T2	10	-7.7080684
T2	11	-7.6696777
T2	12	-7.6442399
T2	13	-7.5763412
T2	14	-7.4826231
T2	15	-7.2848735
T2	16	-7.0824809
T2	17	-6.7282276
T2	18	-6.7118812
T2	19	-6.6992998
T2	20	-6.6481018
T2	21	-6.5618019
T2	22	-6.4962931
T2	23	-6.4591956
T2	24	-6.3704786

T2	25	-6.3360152
T2	26	-6.3225875
T2	27	-6.3079095
T2	28	-6.1934919
T2	29	-6.1128836
T2	30	-5.3612046
T3	1	-15.116655
T3	2	-13.008216
T3	3	-7.0577545
T3	4	-7.0203171
T3	5	-6.9499674
T3	6	-6.8818908
T3	7	-6.8359346
T3	8	-6.7382536
T3	9	-6.3743525
T3	10	-6.0799451
T3	11	-6.0681424
T3	12	-6.0644059
T3	13	-5.9516473
T3	14	-5.8327732
T3	15	-5.5505624
T3	16	-5.4287672
T3	17	-5.4237223
T3	18	-5.4153743
T3	19	-5.2977958
T3	20	-5.0905232
T3	21	-4.6928897

T3	22	-4.2618294
T3	23	-4.1460981
T3	24	-4.1179452
T4	1	-24.330847
T4	2	-23.882708
T4	3	-16.255596
T4	4	-15.581671
T4	5	-13.486635
T4	6	-8.3607273
T4	7	-7.1885114
T4	8	-6.9169402
T4	9	-6.888463
T4	10	-6.8775702
T4	11	-6.7225504
T4	12	-6.651176
T4	13	-6.648479
T4	14	-6.5183239
T4	15	-6.1678424
T4	16	-5.8116722
T4	17	-5.6924958
T4	18	-5.0737009
T4	19	-4.9741526
T4	20	-4.9722543
T4	21	-4.9010634
T4	22	-4.8302636
T4	23	-4.7352643
T4	24	-4.6384964

T4	25	-3.9685273
T4	26	-3.8633578
T4	27	-3.4467297
T5	1	-17.860346
T5	2	-15.663527
T5	3	-12.467755
T5	4	-6.9478664
T5	5	-6.2957191
T5	6	-5.6617556
T5	7	-5.6608129
T5	8	-5.639112
T5	9	-5.4046063
T5	10	-5.0869069
T5	11	-5.0007954
T5	12	-4.8458681
T5	13	-4.5041757
T5	14	-4.4739423
T5	15	-4.4557891
T5	16	-4.3064985
T5	17	-4.2176781
T5	18	-3.9669673
T5	19	-3.5289178
T5	20	-3.3479142
T5	21	-3.1974645
T5	22	-3.058063
D4	1	-12.990515

D4	2	-12.301793
D4	3	-12.146478
D4	4	-10.714886
D4	5	-10.083652
D4	6	-9.6891546
D4	7	-9.5278368
D4	8	-7.8773251
D4	9	-7.6345749
D4	10	-7.2739491
D4	11	-7.1685681
D4	12	-6.9002981
D4	13	-6.7073278
D4	14	-6.6391988
D4	15	-6.279294
D4	16	-6.0771179
D4	17	-6.0020676
D4	18	-5.822444
D4	19	-5.2859912
D4	20	-4.7035975
D4	21	-4.4125037

Table S2. $\Delta G_{\text{binding}}$ of 25 to 29 conformers from each compound, average $\Delta G_{\text{binding}}$ and SD for HsTIM.		
Compound	Conformer	$\Delta G_{\text{binding}}$
T1	1	-7.7168059
T1	2	-7.360672
T1	3	-7.2650509
T1	4	-7.2606478
T1	5	-7.1813784
T1	6	-7.179544
T1	7	-7.0657287
T1	8	-6.9319258
T1	9	-6.76088
T1	10	-6.6002774
T1	11	-6.5789924
T1	12	-6.565639
T1	13	-6.5065255
T1	14	-6.5045161
T1	15	-6.4828606
T1	16	-6.445879
T1	17	-6.4457469
T1	18	-6.3822765
T1	19	-6.3690825
T1	20	-6.3519197
T1	21	-6.2274313
T1	22	-6.1355376
T1	23	-6.1147327
T1	24	-6.0977507
T1	25	-6.0827899
T1	26	-6.0152578
T1	27	-5.7975535

T1	28	-5.7748508
T1	29	-5.7234125
T2	1	-7.9971185
T2	2	-7.7562976
T2	3	-7.6788526
T2	4	-7.591114
T2	5	-7.4447231
T2	6	-7.3959584
T2	7	-7.3230925
T2	8	-7.304625
T2	9	-7.1931901
T2	10	-7.0935645
T2	11	-7.0325017
T2	12	-6.989707
T2	13	-6.9020367
T2	14	-6.8814683
T2	15	-6.8244319
T2	16	-6.7677431
T2	17	-6.7304602
T2	18	-6.5045209
T2	19	-6.2630115
T2	20	-6.0394382
T2	21	-5.9408007
T2	22	-5.8978119
T2	23	-5.887135
T2	24	-5.8579259
T2	25	-5.3863916

T2	26	-5.3284125
T2	27	-5.2395229
T2	28	-5.0759993
T2	29	-2.8577199
T3	1	-6.5749302
T3	2	-6.3824253
T3	3	-6.2241406
T3	4	-6.2208524
T3	5	-6.1575103
T3	6	-5.9685321
T3	7	-5.8002906
T3	8	-5.6772218
T3	9	-5.6754823
T3	10	-5.6222467
T3	11	-5.5276299
T3	12	-5.4636011
T3	13	-5.4501634
T3	14	-5.3239136
T3	15	-5.2912912
T3	16	-5.26686
T3	17	-5.2463126
T3	18	-5.2417669
T3	19	-5.226068
T3	20	-5.2058945
T3	21	-5.172924
T3	22	-5.0544639
T3	23	-4.6577363

T3	24	-4.6173983
T3	25	-4.4684453
T3	26	-4.3001547
T3	27	-4.2011528
T4	1	-8.3689117
T4	2	-8.1757193
T4	3	-7.764658
T4	4	-7.6395993
T4	5	-7.582962
T4	6	-7.4218984
T4	7	-7.0887237
T4	8	-6.987906
T4	9	-6.8171511
T4	10	-6.7192264
T4	11	-6.6646791
T4	12	-6.561758
T4	13	-6.5300455
T4	14	-6.3378372
T4	15	-6.3233337
T4	16	-6.2640481
T4	17	-6.181746
T4	18	-6.1525826
T4	19	-6.0715342
T4	20	-5.7689247
T4	21	-5.7037458
T4	22	-5.5879264
T4	23	-5.5096035

T4	24	-5.4134665
T4	25	-5.3651433
T4	26	-4.5676293
T4	27	-4.4412456
T4	28	-4.4044247
T4	29	-3.9639657
T4	30	-3.6974566
T5	1	-6.8720546
T5	2	-6.8253832
T5	3	-6.7739153
T5	4	-6.5734506
T5	5	-6.5388331
T5	6	-6.4891763
T5	7	-6.4298067
T5	8	-6.3848505
T5	9	-6.3394074
T5	10	-6.2334661
T5	11	-6.131846
T5	12	-5.9663172
T5	13	-5.9041052
T5	14	-5.8545771
T5	15	-5.8322792
T5	16	-5.5169511
T5	17	-5.4954123
T5	18	-5.4517694
T5	19	-5.3147964
T5	20	-5.2868881

T5	21	-5.2818365
T5	22	-5.237505
T5	23	-5.1515322
T5	24	-5.1090546
T5	25	-5.0306735
T5	26	-5.0156164
T5	27	-4.693058
T5	28	-4.6785226
T5	29	-4.4189272
D4	1	-7.9663849
D4	2	-7.0733962
D4	3	-6.6277122
D4	4	-6.2691174
D4	5	-6.2620864
D4	6	-6.2564354
D4	7	-6.1517792
D4	8	-6.1448488
D4	9	-6.1111188
D4	10	-6.0154591
D4	11	-5.7929511
D4	12	-5.6190715
D4	13	-5.570888
D4	14	-5.4607539
D4	15	-5.3625689
D4	16	-5.3184571
D4	17	-5.311152
D4	18	-5.297945

D4	19	-5.1712837
D4	20	-5.1551957
D4	21	-4.9263911
D4	22	-4.856832
D4	23	-4.7874279
D4	24	-4.7247987
D4	25	-4.7180524

Table S3. Interaction report of each conformer of T1 compound. Number of conformer, Atom of compound, Amino acid in MtTIM, Type of interaction and Distance in angstroms.

Conformer	Ligand	Residues in MtTIM		Interaction	Distance
1	O	LEU	136	H-acceptor	2.98
	6-ring	ILE	177	pi-H	4.49
2	6-ring	THR	105	pi-H	3.67
3	O	LEU	136	H-acceptor	3.43
4	O	HIS	147	H-acceptor	3.22
	6-ring	GLY	178	pi-H	4.02
5	N	ASP	82	H-donor	2.78
	O	HIS	74	H-acceptor	3.07
	O	LYS	117	H-acceptor	2.77
	6-ring	ARG	103	pi-cation	4.66

Table S4. Interaction report of each conformer of T2 compound. Number of conformer, Atom of compound, Amino acid in MtTIM, Type of interaction and Distance in angstroms.

Conformer	Ligand	Residues in MtTIM		Interaction	Distance
1	O	LEU	136	H-acceptor	3.45
	O	LEU	136	H-acceptor	3.25
	O	TRP	175	H-acceptor	3.38
2	CL	THR	105	H-donor	3.12
3	O	LYS	12	H-acceptor	3.17
	6-ring	ILE	177	pi-H	4.11
	6-ring	GLY	180	pi-H	3.52

Table S5. Interaction report of each conformer of T3 compound. Number of conformer, Atom of compound, Amino acid in MtTIM, Type of interaction and Distance in angstroms.

Conformer	Ligand	Residues in MtTIM		Interaction	Distance
1	C	ASP	33	H-donor	3.64
2	N	ASP	33	H-donor	3
	C	ASP	33	H-donor	3.32
	N	ASP	33	ionic	3
	N	ASP	33	ionic	3.75
3	C	ASP	231	H-donor	3.37
4	C	TYR	106	H-pi	4.27
5	C	TYR	106	H-pi	4.9
	C	HIS	107	H-pi	4.64

Table S6. Interaction report of each conformer of T4 compound. Number of conformer, Atom of compound, Amino acid in MtTIM, Type of interaction and Distance in angstroms.

Conformer	Ligand	Residues in MtTIM		Interaction	Distance
1	N	ASP	33	H-donor	2.74
	N	ASP	33	H-donor	2.99
	N	ASP	33	ionic	2.74
	N	ASP	33	ionic	2.99
2	N	ASP	33	H-donor	2.88
	N	ASP	33	H-donor	3.35
	N	ASP	33	ionic	2.88
	N	ASP	33	ionic	3.35
3	N	ASP	33	H-donor	2.7
	N	ASP	33	ionic	3
	N	ASP	33	ionic	2.7
4	N	ASP	33	ionic	2.87
	N	ASP	33	ionic	3.38
	6-ring	ARG	63	pi-cation	3.86
5	N	ASP	33	H-donor	2.74
	N	ASP	33	ionic	2.74
	N	ASP	33	ionic	3.82

Table S7. Interaction report of each conformer of T5 compound. Number of conformer, Atom of compound, Amino acid in MtTIM, Type of interaction and Distance in angstroms.

Conformer	Ligand	Residues in MtTIM		Interaction	Distance
1	N	ASP	33	ionic	3.63
2	N	ASP	33	H-donor	2.81
	C	ASP	33	H-donor	3.37
	N	ASP	33	ionic	2.81
3	N	ASP	209	H-donor	3.28
	N	ASP	209	ionic	3.98
	N	ASP	209	ionic	3.28
4	O	GLU	109	H-donor	3.24
	O	ARG	104	H-acceptor	3.24
	N	ASP	110	ionic	3.66

Table S8. Interaction report of each conformer of D4 compound. Number of conformer, Atom of compound, Amino acid in MtTIM, Type of interaction and Distance in angstroms.					
Conformer	Ligand	Residues in MtTIM		Interaction	Distance
1	S	GLU	172	H-donor	2.95
	O	LYS	12	H-acceptor	2.94
	O	LYS	12	ionic	2.94
2	O	LYS	12	H-acceptor	2.91
	O	LYS	12	ionic	2.91
	6-ring	GLY	240	pi-H	3.55
3	S	GLU	172	H-donor	3.46
	S	GLY	216	H-donor	3.2
	S	ASN	14	H-donor	3.79
	O	GLY	240	H-acceptor	2.96
4	S	GLU	102	H-donor	3.91
	O	LYS	12	H-acceptor	2.89
	O	LYS	12	ionic	2.89
	6-ring	ILE	177	pi-H	4.46

Table S9. Interaction report of each conformer of T1 compound. Number of conformer, Atom of compound, Amino acid in HsTIM, Type of interaction and Distance in angstroms.					
Conformer	Ligand	Residues in HsTIM		Interaction	Distance
1	N	LYS	58	H-donor	3.06
	O	TRP	90	H-acceptor	2.96
	O	LYS	5	H-acceptor	3.19
2	N	SER	158	H-donor	3.28
	O	LYS	5	H-acceptor	2.9
	O	LYS	5	ionic	2.9
	O	LYS	5	ionic	2.98
3	O	TRP	90	H-acceptor	3.03
4	O	ARG	98	H-acceptor	2.96
	O	ARG	98	H-acceptor	3.27
	O	ARG	98	H-acceptor	3.07
	O	ARG	98	ionic	2.96
	O	ARG	98	ionic	3.27
	O	ARG	98	ionic	3.07
	O	ARG	98	ionic	3.82
	O	ARG	98	ionic	3.63
5	O	ASP	106	H-acceptor	3.52
	O	ARG	99	ionic	2.87

Table S10. Interaction report of each conformer of T2 compound. Number of conformer, Atom of compound, Amino acid in HsTIM, Type of interaction and Distance in angstroms.

Conformer	Ligand	Residues in AXL		Interaction	Distance
1	CL	GLU	77	H-donor	3.66
	O	ARG	98	H-acceptor	2.88
	O	ARG	98	ionic	2.88
	O	ARG	98	ionic	3.99
2	O	ASN	65	H-acceptor	3.39
3	O	TYR	67	H-acceptor	3.3
4	CL	GLU	77	H-donor	3.05
	O	ASN	65	H-acceptor	3.4

Table S11. Interaction report of each conformer of T3 compound. Number of conformer, Atom of compound, Amino acid in HsTIM, Type of interaction and Distance in angstroms.					
Conformer	Ligand	Residues in HsTIM		Interaction	Distance
1	C	GLN	223	H-donor	3.33
2	S	ASP	36	H-donor	3.18
	6-ring	ASP	36	pi-H	4.73
3	C	ASP	225	H-donor	3.49
	C	ASP	225	H-donor	3.45
	C	GLU	186	H-donor	3.49
	N	ASP	225	ionic	3.79
	N	ASP	225	ionic	3.67
	6-ring	LYS	193	pi-cation	3.96
	6-ring	LYS	193	pi-cation	4.35
4	S	GLU	145	H-donor	3.47
	N	GLU	145	H-donor	2.8
	C	GLU	107	H-donor	3.35
	N	GLU	145	ionic	3.86
	N	GLU	107	ionic	3.99
	N	GLU	145	ionic	2.8
	6-ring	VAL	142	pi-H	4.56
5	N	ASP	36	H-donor	2.78
	N	ASP	36	ionic	3.99
	N	ASP	36	ionic	2.78

Table S12. Interaction report of each conformer of T4 compound. Number of conformer, Atom of compound, Amino acid in HsTIM, Type of interaction and Distance in angstroms.					
Conformer	Ligand	Residues in HsTIM		Interaction	Distance
1	N	VAL	101	H-donor	3.02
	C	GLY	103	H-donor	3.46
	5-ring	ARG	98	pi-cation	4.01
	5-ring	ARG	98	pi-cation	4.05
2	N	GLY	103	H-donor	3.18
	N	VAL	101	H-donor	3.16
	N	ARG	98	H-acceptor	3.21
	5-ring	ARG	98	pi-cation	4.42
3	N	VAL	101	H-donor	2.93
	C	GLY	103	H-donor	3.46
	5-ring	ARG	98	pi-cation	4.15
4	C	VAL	101	H-donor	3.33
	N	ARG	98	H-acceptor	3.08
	5-ring	ARG	98	pi-cation	4.31

Table S13. Interaction report of each conformer of T5 compound. Number of conformer, Atom of compound, Amino acid in HsTIM, Type of interaction and Distance in angstroms.					
Conformer	Ligand	Residues in HsTIM		Interaction	Distance
1	N	GLU	133	H-donor	2.83
	C	ASP	106	H-donor	3.5
	C	ASP	106	H-donor	3.49
	N	ASP	106	ionic	3.94
	N	GLU	133	ionic	2.83
2	C	ASP	106	H-donor	3.32
	O	GLU	104	H-donor	3.02
	N	ASP	106	ionic	3.96
3	N	GLU	145	ionic	3.9
4	N	ASP	106	ionic	3.3
5	N	GLU	133	H-donor	2.84
	N	ASP	106	ionic	3.75
	N	GLU	145	ionic	3.86
	N	GLU	133	ionic	2.84
	N	GLU	133	ionic	3.82

Table S14. Interaction report of each conformer of D4 compound. Number of conformer, Atom of compound, Amino acid in HsTIM, Type of interaction and Distance in angstroms.					
Conformer	Ligand	Residues in HsTIM		Interaction	Distance
1	S	GLY	210	H-donor	2.94
	S	VAL	212	H-donor	3.68
	O	LYS	13	H-acceptor	2.86
	O	LYS	13	ionic	2.86
2	S	GLY	210	H-donor	2.96
	S	VAL	212	H-donor	3.9
	O	LYS	13	H-acceptor	2.86
	O	LYS	13	ionic	2.86
	6-ring	GLY	232	pi-H	4.16
	6-ring	ALA	73	pi-H	4.67
3	S	ASN	15	H-donor	3.55
	O	LYS	13	H-acceptor	2.95
	O	LYS	13	ionic	2.97
	6-ring	ALA	73	pi-H	4.38
4	O	LYS	68	H-acceptor	3.28
	S	LYS	112	H-acceptor	3.51
	O	LYS	68	ionic	3.09
5	O	TRP	191	H-acceptor	3.21

Table S15: Toxicity – PreADMET | Prediction of ADME/Tox of compounds T1–T5 and D4

<p>T1.-</p> <p>algae_at 0.0451961</p> <p>Ames_test mutagen</p> <p>Carcino_Mouse negative</p> <p>Carcino_Rat positive</p> <p>daphnia_at 0.127897</p> <p>hERG_inhibition high_risk</p> <p>medaka_at 0.0335621</p> <p>minnow_at 0.0280155</p> <p>TA100_10RLI negative</p> <p>TA100_NA negative</p> <p>TA1535_10RLI negative</p> <p>TA1535_NA positive</p>	<p>T2.-</p> <p>algae_at 0.00554922</p> <p>Ames_test mutagen</p> <p>Carcino_Mouse negative</p> <p>Carcino_Rat negative</p> <p>daphnia_at 0.00650143</p> <p>hERG_inhibition medium_risk</p> <p>medaka_at 0.000116801</p> <p>minnow_at 0.000129914</p> <p>TA100_10RLI negative</p> <p>TA100_NA negative</p> <p>TA1535_10RLI negative</p> <p>TA1535_NA negative</p>
<p>T3.-</p> <p>algae_at 0.00859781</p> <p>Ames_test mutagen</p> <p>Carcino_Mouse negative</p> <p>Carcino_Rat negative</p> <p>daphnia_at 0.0154404</p> <p>hERG_inhibition medium_risk</p> <p>medaka_at 0.000516688</p> <p>minnow_at 0.000664616</p> <p>TA100_10RLI negative</p> <p>TA100_NA negative</p> <p>TA1535_10RLI negative</p> <p>TA1535_NA negative</p>	<p>T4.-</p> <p>algae_at 0.0318207</p> <p>Ames_test mutagen</p> <p>Carcino_Mouse negative</p> <p>Carcino_Rat negative</p> <p>daphnia_at 0.179538</p> <p>hERG_inhibition medium_risk</p> <p>medaka_at 0.05414</p> <p>minnow_at 0.0876528</p> <p>TA100_10RLI negative</p> <p>TA100_NA negative</p> <p>TA1535_10RLI negative</p> <p>TA1535_NA negative</p>
<p>T5.-</p> <p>algae_at 0.00416684</p> <p>Ames_test mutagen</p> <p>Carcino_Mouse negative</p> <p>Carcino_Rat positive</p> <p>daphnia_at 0.0219124</p> <p>hERG_inhibition medium_risk</p> <p>medaka_at 0.000884984</p>	<p>D4.-</p> <p>algae_at 0.0162351</p> <p>Ames_test mutagen</p> <p>Carcino_Mouse negative</p> <p>Carcino_Rat negative</p> <p>daphnia_at 0.0261622</p> <p>hERG_inhibition ambiguous</p> <p>medaka_at 0.00190628</p>

minnow_at	0.00121519	minnow_at	0.00152966
TA100_10RLI	negative	TA100_10RLI	positive
TA100_NA	negative	TA100_NA	negative
TA1535_10RLI	positive	TA1535_10RLI	negative
TA1535_NA	negative	TA1535_NA	negative

Table S16: ADME - PreADMET | Prediction of ADME/Tox of compounds T1–T5 and D4

T1.-		T2.-	
BBB	0.0139453	BBB	0.0215146

Buffer_solubility_mg_L	874.844**	Buffer_solubility_mg_L	0.0485304
Caco2	21.0136	Caco2	21.4132
CYP_2C19_inhibition	Non	CYP_2C19_inhibition	Inhibitor
CYP_2C9_inhibitionNon		CYP_2C9_inhibitionInhibitor	
CYP_2D6_inhibitionNon		CYP_2D6_inhibitionNon	
CYP_2D6_substrate	Non	CYP_2D6_substrate	Non
CYP_3A4_inhibitionNon		CYP_3A4_inhibitionNon	
CYP_3A4_substrate	Non	CYP_3A4_substrate	Weakly
HIA	95.124084	HIA	98.49618
MDCK	9.16919	MDCK	0.0589242
Pgp_inhibition	Non	Pgp_inhibition	Inhibitor
Plasma_Protein_Binding	92.872463	Plasma_Protein_Binding	94.136555
Pure_water_solubility_mg_L	7.12722	Pure_water_solubility_mg_L	0.00538287
Skin_Permeability	-2.95411	Skin_Permeability	-2.34608
SKlogD_value	2.2739	SKlogD_value	4.41304
SKlogP_value	2.2739	SKlogP_value	5.66104
SKlogS_buffer	-2.663820**	SKlogS_buffer	-6.97946
SKlogS_pure	-4.75283	SKlogS_pure	-7.93446

T3.-

BBB	0.384245
Buffer_solubility_mg_L	221.745
Caco2	25.9121
CYP_2C19_inhibition	Non
CYP_2C9_inhibitionNon	
CYP_2D6_inhibitionInhibitor	
CYP_2D6_substrate	Substrate
CYP_3A4_inhibitionNon	
CYP_3A4_substrate	Weakly
HIA	98.766413
MDCK	0.0499068
Pgp_inhibition	Inhibitor
Plasma_Protein_Binding	83.498175
Pure_water_solubility_mg_L	3.17069
Skin_Permeability	-2.14204
SKlogD_value	3.48853
SKlogP_value	5.05299

T4.-

BBB	0.0268428
Buffer_solubility_mg_L	68065.1
Caco2	54.4744
CYP_2C19_inhibition	Inhibitor
CYP_2C9_inhibitionNon	
CYP_2D6_inhibitionNon	
CYP_2D6_substrate	Substrate
CYP_3A4_inhibitionNon	
CYP_3A4_substrate	Substrate
HIA	96.023819
MDCK	57.2976
Pgp_inhibition	Non
Plasma_Protein_Binding	49.658153
Pure_water_solubility_mg_L	11991.8
Skin_Permeability	-3.72035
SKlogD_value	0.682080
SKlogP_value	2.02606

SKlogS_buffer -3.26427
SKlogS_pure -5.10897

SKlogS_buffer -0.7347
SKlogS_pure -1.48874

T5.-

BBB 9.45103
Buffer_solubility_mg_L 112.703
Caco2 56.4024
CYP_2C19_inhibition Inhibitor
CYP_2C9_inhibitionNon
CYP_2D6_inhibitionInhibitor
CYP_2D6_substrate Substrate
CYP_3A4_inhibitionNon
CYP_3A4_substrate Weakly
HIA 97.105389
MDCK 0.872546
Pgp_inhibition Inhibitor
Plasma_Protein_Binding 64.300766
Pure_water_solubility_mg_L 383.156
Skin_Permeability -3.25132
SKlogD_value 1.3476
SKlogP_value 4.47652
SKlogS_buffer -3.54971
SKlogS_pure -3.01827

D4.-

BBB 0.0349711
Buffer_solubility_mg_L 0.34811
Caco2 19.32
CYP_2C19_inhibition Non
CYP_2C9_inhibitionNon
CYP_2D6_inhibitionNon
CYP_2D6_substrate Non
CYP_3A4_inhibitionInhibitor
CYP_3A4_substrate Weakly
HIA 40.443246
MDCK 1.68617
Pgp_inhibition Inhibitor
Plasma_Protein_Binding 94.330258
Pure_water_solubility_mg_L 0.0804723
Skin_Permeability -3.79902
SKlogD_value 1.85403
SKlogP_value 1.85403
SKlogS_buffer -6.11097
SKlogS_pure -6.74704

Table S17: Properties predicted by PhysChem - ACD/Labs of compounds T1–T5 and D4

T1.-	T2.-
Density:	Density: 1.4±0.1 g/cm ³
Boiling Point: 615.5±55.0 °C at 760 mmHg	Boiling Point: 706.8±60.0 °C at 760 mmHg
Vapour Pressure: 0.0±1.9 mmHg at 25°C	Vapour Pressure: 0.0±2.4 mmHg at 25°C
Enthalpy of Vaporization: 96.0±3.0 kJ/mol	Enthalpy of Vaporization: 108.6±3.0 kJ/mol
Flash Point: 326.0±31.5 °C	Flash Point: 381.2±32.9 °C
Index of Refraction:	Index of Refraction: 1.675
Molar Refractivity:	Molar Refractivity: 123.6±0.3 cm ³
#H bond acceptors: 7	#H bond acceptors: 6
#H bond donors: 3	#H bond donors: 1
#Freely Rotating Bonds: 7	#Freely Rotating Bonds: 7
#Rule of 5 Violations: 0	#Rule of 5 Violations: 1
ACD/LogP: 4.16	ACD/LogP: 6.42
ACD/LogD (pH 5.5):2.24	ACD/LogD (pH 5.5):4.16
ACD/BCF (pH 5.5): 9.04	ACD/BCF (pH 5.5): 399.19
ACD/KOC (pH 5.5): 41.47	ACD/KOC (pH 5.5): 1019.71
ACD/LogD (pH 7.4):1.27	ACD/LogD (pH 7.4):2.64
ACD/BCF (pH 7.4): 1.00	ACD/BCF (pH 7.4): 12.08
ACD/KOC (pH 7.4): 4.53	ACD/KOC (pH 7.4): 30.85
Polar Surface Area: 108 Å ²	Polar Surface Area: 90 Å ²
Polarizability:	Polarizability: 49.0±0.5 10 ⁻²⁴ cm ³
Surface Tension:	Surface Tension: 63.7±3.0 dyne/cm
Molar Volume:	Molar Volume: 329.0±3.0 cm ³
T3.-	T4.-
Density: 1.2±0.1 g/cm ³	Density: 1.2±0.1 g/cm ³
Boiling Point: 506.0±50.0 °C at 760 mmHg	Boiling Point: 575.7±50.0 °C at 760 mmHg
Vapour Pressure: 0.0±1.3 mmHg at 25°C	Vapour Pressure: 0.0±1.6 mmHg at 25°C
Enthalpy of Vaporization: 77.6±3.0 kJ/mol	Enthalpy of Vaporization: 86.2±3.0 kJ/mol
Flash Point: 259.8±30.1 °C	Flash Point: 302.0±30.1 °C
Index of Refraction: 1.572	Index of Refraction: 1.601
Molar Refractivity: 108.2±0.3 cm ³	Molar Refractivity: 109.8±0.5 cm ³
#H bond acceptors: 3	#H bond acceptors: 6
#H bond donors: 0	#H bond donors: 1
#Freely Rotating Bonds: 5	#Freely Rotating Bonds: 7

#Rule of 5 Violations: 1

ACD/LogP: 5.11

ACD/LogD (pH 5.5): 2.63

ACD/BCF (pH 5.5): 16.20

ACD/KOC (pH 5.5): 56.14

ACD/LogD (pH 7.4): 4.34

ACD/BCF (pH 7.4): 835.29

ACD/KOC (pH 7.4): 2894.38

Polar Surface Area: 35 Å²

Polarizability: 42.9±0.5 10⁻²⁴cm³

Surface Tension: 40.4±3.0 dyne/cm

Molar Volume: 328.8±3.0 cm³

#Rule of 5 Violations: 0

ACD/LogP: 0.17

ACD/LogD (pH 5.5): -2.11

ACD/BCF (pH 5.5): 1.00

ACD/KOC (pH 5.5): 1.00

ACD/LogD (pH 7.4): -0.62

ACD/BCF (pH 7.4): 1.00

ACD/KOC (pH 7.4): 1.00

Polar Surface Area: 53 Å²

Polarizability: 43.5±0.5 10⁻²⁴cm³

Surface Tension: 42.4±7.0 dyne/cm

Molar Volume: 320.6±7.0 cm³

T5.-

Density: 1.1±0.1 g/cm³

Boiling Point: 530.8±35.0 °C at 760 mmHg

Vapour Pressure: 0.0±1.5 mmHg at 25°C

Enthalpy of Vaporization: 83.6±3.0 kJ/mol

Flash Point: 246.3±24.6 °C

Index of Refraction: 1.567

Molar Refractivity: 121.0±0.3 cm³

#H bond acceptors: 4

#H bond donors: 1

#Freely Rotating Bonds: 8

#Rule of 5 Violations: 0

ACD/LogP: 4.71

ACD/LogD (pH 5.5): -0.42

ACD/BCF (pH 5.5): 1.00

ACD/KOC (pH 5.5): 1.00

ACD/LogD (pH 7.4): 0.51

ACD/BCF (pH 7.4): 1.00

ACD/KOC (pH 7.4): 1.00

Polar Surface Area: 30 Å²

Polarizability: 48.0±0.5 10⁻²⁴cm³

Surface Tension: 46.4±3.0 dyne/cm

Molar Volume: 370.4±3.0 cm³

D4.-

Density: 1.7±0.1 g/cm³

Boiling Point: 648.7±65.0 °C at 760 mmHg

Vapour Pressure: 0.0±2.0 mmHg at 25°C

Enthalpy of Vaporization: 100.5±3.0 kJ/mol

Flash Point: 346.1±34.3 °C

Index of Refraction: 1.788

Molar Refractivity: 110.6±0.5 cm³

#H bond acceptors: 11

#H bond donors: 2

#Freely Rotating Bonds: 4

#Rule of 5 Violations: 1

ACD/LogP: 1.57

ACD/LogD (pH 5.5): -3.25

ACD/BCF (pH 5.5): 1.00

ACD/KOC (pH 5.5): 1.00

ACD/LogD (pH 7.4): -4.12

ACD/BCF (pH 7.4): 1.00

ACD/KOC (pH 7.4): 1.00

Polar Surface Area: 229 Å²

Polarizability: 43.9±0.5 10⁻²⁴cm³

Surface Tension: 73.0±7.0 dyne/cm

Molar Volume: 261.7±7.0 cm³

Table S18: ADME - SwissADME | Prediction of ADME/druglike nature and medicinal chemistry friendliness T1-T10

T1.-

Lipophilicity

Consensus Log P_{ow} 2.75

Water Solubility

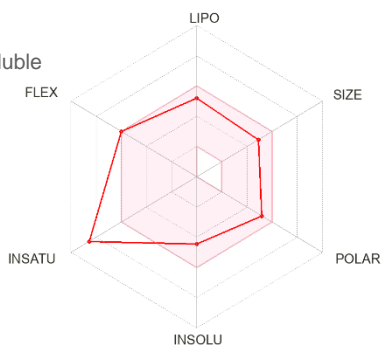
Poorly soluble- Moderately soluble

Pharmacokinetics

GI absorption High

BBB permeant NO
 P-gp substrate NO
 CYP1A2 inhibitor NO
 CYP2C19 inhibitor YES
 CYP2C9 inhibitor NO
 CYP2D6 inhibitor YES
 CYP3A4 inhibitor NO

Log K_p (skin permeation) -6.22 cm/s



Druglikeness

Lipinski Yes; 0 violation
 Ghose Yes
 Veber Yes
 Egan Yes
 Muegge Yes
 Bioavailability Score 0.56

Medicinal Chemistry

PAINS 0 alert
 Brenk 0 alert
 Leadlikeness No; 3 violations: MW>350, Rotors>7, XLOGP3>3.5
 Synthetic accessibility 2.39

T2.-

Lipophilicity

Consensus Log P_{ow} 4.60

Water Solubility

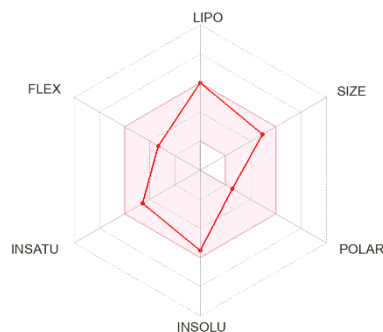
Poorly soluble

Pharmacokinetics

GI absorption High

BBB permeant NO
 P-gp substrate NO
 CYP1A2 inhibitor YES
 CYP2C19 inhibitor YES
 CYP2C9 inhibitor YES
 CYP2D6 inhibitor NO
 CYP3A4 inhibitor YES

Log K_p (skin permeation) -5.25 cm/s



Druglikeness

Lipinski Yes; 0 violation
 Ghose Yes
 Veber Yes
 Egan Yes
 Muegge No; 1 violation: XLOGP3>5
 Bioavailability Score 0.56

Medicinal Chemistry

PAINS 1 alert: ene_five_one_A
 Brenk 2 alerts: michael_acceptor_1, michael_acceptor_4
 Leadlikeness No; 2 violations: MW>350, XLOGP3>3.5
 Synthetic accessibility 3.53

T3.-

Lipophilicity

T4.-

Consensus Log $P_{o/w}$ 4.47

Water Solubility

Poorly soluble - Moderately soluble

Pharmacokinetics

GI absorption High

BBB permeant YES

P-gp substrate YES

CYP1A2 inhibitor YES

CYP2C19 inhibitor NO

CYP2C9 inhibitor NO

CYP2D6 inhibitor YES

CYP3A4 inhibitor NO

Log K_p (skin permeation) -5.21 cm/s

Druglikeness

Lipinski Yes; 1 violation: MLOGP>4.15

Ghose Yes

Veber Yes

Egan Yes

Muegge No; 1 violation: XLOGP3>5

Bioavailability Score 0.55

Medicinal Chemistry

PAINS 0 alert

Brenk 0 alert

Leadlikeness No; 2 violations: MW>350, XLOGP3>3.5

Synthetic accessibility 3.47

Pharmacokinetics

GI absorption High

BBB permeant YES

T5.-

Pharmacokinetics

GI absorption High

BBB permeant YES

D4.-

T6.-**Lipophilicity**Consensus Log $P_{o/w}$ 5.37**Water Solubility**

Poorly soluble

Pharmacokinetics

GI absorption LOW

BBB permeant NO

P-gp substrate YES

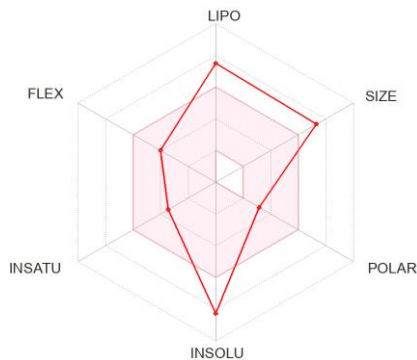
CYP1A2 inhibitor NO

CYP2C19 inhibitor NO

CYP2C9 inhibitor NO

CYP2D6 inhibitor NO

CYP3A4 inhibitor YES

Log K_p (skin permeation) -4.62 cm/s**T7.-****Lipophilicity**Consensus Log $P_{o/w}$ 2.57**Water Solubility**

Moderately soluble

Pharmacokinetics

GI absorption HIGH

BBB permeant NO

P-gp substrate NO

CYP1A2 inhibitor NO

CYP2C19 inhibitor YES

CYP2C9 inhibitor YES

CYP2D6 inhibitor YES

CYP3A4 inhibitor YES

Log K_p (skin permeation) -7.28 cm/s**Druglikeness**

Lipinski No; 2 violations: MW>500, MLOGP>4.15

Ghose No; 4 violations: MW>480, WLOGP>5.6, MR>130, #atoms>70

Veber Yes

Egan No; 1 violation: WLOGP>5.88

Muegge No; 2 violations: MW>600, XLOGP3>5

Bioavailability Score 0.17

Medicinal Chemistry

PAINS 0 alert

Brenk 0 alert

Leadlikeness No; 2 violations: MW>350, XLOGP3>3.5

Synthetic accessibility 6.53

Druglikeness

Lipinski Yes; 0 violation

Ghose No; 2 violations: MW>480, MR>130

Veber Yes

Egan Yes

Muegge Yes

Bioavailability Score 0.56

Medicinal Chemistry

PAINS 0 alert

Brenk 0 alert

Leadlikeness No; 1 violation: MW>350

Synthetic accessibility 3.27

T8.-**T9.-**

Lipophilicity

Consensus Log $P_{o/w}$ 2.93

Water Solubility

Poorly soluble- Moderately soluble

Pharmacokinetics

GI absorption HIGH

BBB permeant NO

P-gp substrate YES

CYP1A2 inhibitor NO

CYP2C19 inhibitor YES

CYP2C9 inhibitor NO

CYP2D6 inhibitor YES

CYP3A4 inhibitor YES

Log K_p (skin permeation) -6.64 cm/s

Druglikeness

Lipinski Yes; 0 violation

Ghose No; 1 violation: MR>130

Veber Yes

Egan Yes

Muegge Yes

Bioavailability Score 0.55

Medicinal Chemistry

PAINS 0 alert

Brenk 0 alert

Leadlikeness No; 2 violations: MW>350, Rotors>7

Synthetic accessibility 3.26

T10.-

Lipophilicity

Consensus Log $P_{o/w}$ 3.88

Water Solubility

Lipophilicity

Consensus Log $P_{o/w}$ 2.81

Water Solubility

Poorly soluble- Moderately soluble

Pharmacokinetics

GI absorption HIGH

BBB permeant YES

P-gp substrate NO

CYP1A2 inhibitor YES

CYP2C19 inhibitor NO

CYP2C9 inhibitor YES

CYP2D6 inhibitor NO

CYP3A4 inhibitor NO

Log K_p (skin permeation) -5.97 cm/s

Druglikeness

Lipinski Yes; 0 violation

Ghose Yes

Veber Yes

Egan Yes

Bioavailability Score 0.55

Medicinal Chemistry

PAINS 0 alert

Brenk 0 alert

Leadlikeness No; 2 violations: MW>350, XLOGP3>3.5

Synthetic accessibility 2.43

Poorly soluble- Moderately soluble

Pharmacokinetics

GI Absorption HIGH

BBB permeant YES

P-gp substrate YES

CYP1A2 inhibitor NO

CYP2C19 inhibitor YES

CYP2C9 inhibitor YES

CYP2D6 inhibitor YES

CYP3A4 inhibitor YES

Log K_p (skin permeation) -6.57 cm/s

Druglikeness

Lipinski Yes; 0 violation

Ghose No; 2 violations: MW>480, MR>130

Veber Yes

Egan Yes

Bioavailability Score 0.55

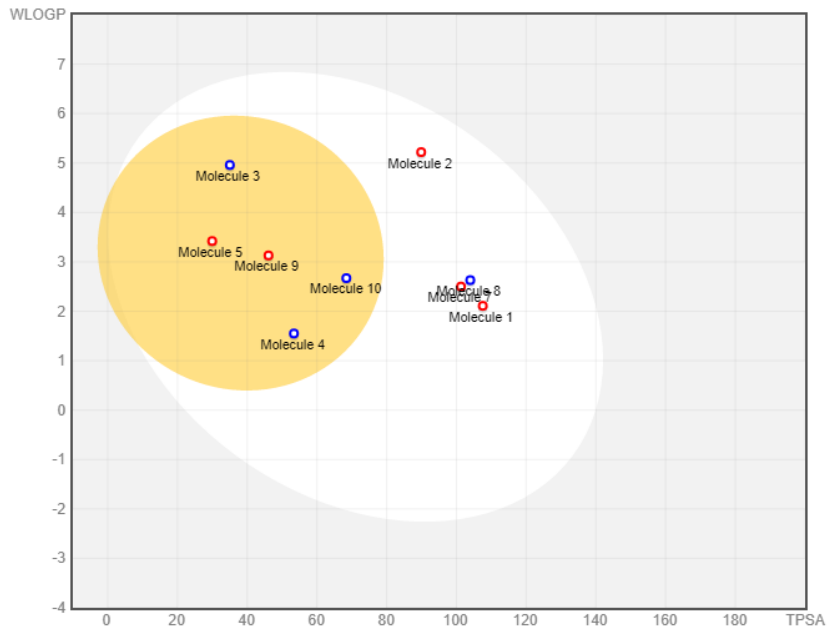
Medicinal Chemistry

PAINS 0 alert

Brenk 0 alert

Leadlikeness No; 3 violations: MW>350, Rotors>7, XLOGP3>3.5

Synthetic accessibility 4.25



Actions

Show Molecules Name

Legends

- BBB
- HIA
- PGP+
- PGP-

Remarks

2 molecules out of range!