

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA Y CITOTÓXICA DE DERIVADOS DE LA
TETRAHIDRO – 1 - BENZOAZEPINA, DIHIDRODIBENZO [c, f] TIAZOLO [3, 2-a]
AZEPIN – 3 - ONA Y TETRAHIDRONAFTO [1, 2-b] AZEPINA CONTRA
Trypanosoma cruzi y *Leishmania* spp**

SANDRA MILENA LEAL PINTO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA**

2010

**ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA Y CITOTÓXICA DE DERIVADOS DE LA
TETRAHIDRO – 1 - BENZOAZEPINA, DIHIDRODIBENZO [c, f] TIAZOLO [3, 2-a]
AZEPIN – 3 - ONA Y TETRAHIDRONAFTO [1, 2-b] AZEPINA CONTRA
Trypanosoma cruzi y *Leishmania* spp**

SANDRA MILENA LEAL PINTO

Tesis de grado presentada como requisito para optar el título de
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS

Directora: PATRICIA ESCOBAR RIVERO, Bacterióloga, M.Sc., Ph.D.

Asesor: ALIRIO PALMA RODRÍGUEZ, Químico, Ph.D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BÁSICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA**

2010

DEDICATORIA

A Dios todopoderoso y a la Virgen María por concederme la sabiduría y salud necesaria para lograr esta meta.

A mi gran amor, esposo y amigo, Fernando por su paciencia, comprensión, apoyo y por sus continuas muestras de amor.

A mis amados padres Gladys y Alberto, fuentes de mi inspiración, agradecimiento motivación, lucha, sacrificio y dedicación.

A mis adorados hermanos Giovanni, Javier y Alex, porque a pesar de la distancia, siempre los llevo en mi corazón, a ellos por todo su apoyo, confianza, comprensión y por su constante amor y cariño.

AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Patricia Escobar Rivero, directora de mi tesis, por su constante apoyo, confianza, disposición, orientación, dedicación y por transmitirme sus conocimientos con amistad y respeto haciendo posible el cumplimiento de esta meta.

A mis compañeros, colegas y amigos del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP), en especial a Indira, Sergio, Wilfredo y Laura por su amistad, aprecio incondicional y por saber escuchar y brindar apoyo cuando lo necesitaba.

Al Doctor Alirio Palma por su contribución a mi formación profesional y por la dirección a sus estudiantes en la obtención de los compuestos sintéticos evaluados en este trabajo.

A la doctora Raquel Ocazonez por su orientación y asesoría en el proceso de aprendizaje en esta maestría.

A los estudiantes del Laboratorio de Síntesis Orgánica de la Universidad Industrial de Santander, por llevar a cabo la síntesis de los compuestos sintéticos.

A los Doctores Mercedes González y Hugo Cerecetto, de la Universidad de la República de Montevideo, Uruguay, por su amable acogida, orientación y colaboración en la realización del curso “Introducción al análisis cuantitativo de relación estructura química biorespuesta (QSAR) y al diseño racional de compuestos bioactivos”.

A la Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas por su contribución a mi formación personal y profesional.

Al instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas” COLCIENCIAS, por la financiación de este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Introduccion	18
1. Marco teorico y estado del arte	21
1.1. Enfermedad de chagas	21
1.1.1. Generalidades: epidemiología y transmisión	21
1.1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i> y su ciclo de vida	22
1.1.3. Manifestaciones clínicas	24
1.1.4. Diagnóstico	25
1.1.5. Tratamiento	26
1.2. Leishmaniasis	30
1.2.1. Generalidades: epidemiología y transmisión	30
1.2.2. <i>Leishmania</i> y su ciclo de vida	31
1.2.3. Manifestaciones clínicas	34
1.2.4. Diagnóstico	37
1.2.5. Tratamiento	37
1.3. Fases del descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos	43
1.3.1. Generalidades	43
1.3.2. Fase exploratoria y ensayos pre-clínicos	45
1.4. Compuestos heterocíclicos utilizados en medicina	49
1.4.1. Generalidades	49
1.4.2. Derivados de las 1-benzoazepinas	50
1.4.3. Derivados dibenzoazepinas	59
1.4.4. Derivados de naftoazepinas	61
2. Objetivos	62

2.1. Objetivo general	62
2.2. Objetivos específicos	62
3. Materiales y métodos	63
3.1. Diseño metodológico	63
3.2. Compuestos y medicamentos de referencia	64
3.3. Propiedades fisicoquímicas	69
3.4. Preparación de soluciones madre y de trabajo	69
3.5. Parásitos y células	69
3.6. Curva de crecimiento	70
3.7. Obtención de tripomastigotes derivados de células (tdc)	70
3.8. Infección con amastigotes intracelulares	70
3.9. Prueba de toxicidad en células de mamífero	71
3.10. Pruebas de actividad contra <i>T. cruzi</i>	71
3.10.1. Ensayos en epimastigotes	71
3.10.2. Ensayos en amastigotes intracelulares	72
3.11. Pruebas de actividad contra leishmania	72
3.11.1. Ensayos en promastigotes	72
3.11.2. Ensayos en amastigotes intracelulares	72
3.12. Análisis de estructura-actividad (sar)	73
3.13. Interpretación y análisis de los resultados	73
4. Resultados	75
4.1. Compuestos sintéticos	75
4.2. Propiedades fisicoquímicas	75
4.3. Modelos experimentales en parásitos	77
4.3.1. Características de crecimiento de las formas extracelulares	77
4.3.2. Características de los parásitos en las formas intracelulares	79

4.4. Los compuestos evaluados presentaron una baja o nula toxicidad para las células Vero y Thp-1	81
4.5. El 48,57% de los compuestos fueron activos contra epimastigotes de <i>T. cruzi</i>	83
4.6. Algunos compuestos fueron activos contra amastigotes intracelulares de <i>T. cruzi</i>	87
4.7. El 42,85% de los compuestos fueron activos contra promastigotes de <i>L. chagasi</i>	89
4.8. Algunos compuestos fueron activos contra amastigotes intracelulares de <i>L. amazonensis</i> y <i>L. panamensis</i>	92
4.9. Análisis estructura-actividad	95
4.9.1. Análisis estructura-actividad contra <i>T. cruzi</i>	95
4.9.2. Análisis estructura-actividad contra <i>L. chagasi</i>	98
5. Discusión	100
6. Conclusiones	111
7. Bibliografía	114
8. Divulgación de resultados	137
8.1. Ponencias en congresos	137
8.1.1. Presentación oral	137
8.1.2. Presentación de poster	137
8.2. Artículos publicados	138
8.2.1. Artículos nacionales	138
8.2.2. Artículos internacionales	138

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Formas parasitarias del <i>T. cruzi</i> .	22
Figura 2. Ciclo de vida del <i>T. cruzi</i> .	24
Figura 3. Medicamentos usados para el tratamiento de la enfermedad de chagas.	28
Figura 4. Formas parasitarias de <i>Leishmania</i> spp.	33
Figura 5. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	34
Figura 6. Medicamentos usados en el tratamiento de la leishmaniasis.	38
Figura 7. Estructuras generales de los sistemas de la tetrahydro-1-benzoazepina(a), dihidrodibenzo[b,e]azepina(b) y tetrahidronafto[1,2-b]azepina(c).	50
Figura 8. Diseño metodológico del estudio.	64
Figura 9. Curva de crecimiento de las formas extracelulares de los parásitos. A: epimastigotes de <i>T. cruzi</i> . B: promastigotes de <i>L. chagasi</i> . Los resultados corresponden al promedio de dos experimentos (n=2).	78
Figura 10. Infección de células vero con amastigotes intracelulares de <i>T. cruzi</i> . A: células vero no infectadas. B: cepa 320i01, c: cepa sylvio-x10	80
Figura 11. Células Thp-1 diferenciadas e infectadas con amastigotes intracelulares de <i>Leishmania</i> spp. A: células thp-1 sin infectar. B: <i>L. chagasi</i> . C: <i>L. panamensis</i> . D: <i>L. amazonensis</i> .	81
Figura 12. Actividad contra epimastigotes de <i>T. cruzi</i> . Se muestran los valores de ci_{50} : barra gris y ci_{90} : barra blanca para cada grupo (a. B. C) de compuestos. Los resultados fueron expresados en $\mu\text{m} \pm$ de y corresponden a un experimento representativo de dos realizados (n=6).	85

- Figura 13. Actividad contra amastigotes intracelulares de *T. cruzi* y toxicidad en células vero. A: actividad (ci_{50} y ci_{90}) en μm contra amastigotes de *T. cruzi*. Los valores corresponden al resultado de un experimento representativo. B: actividad en amastigotes intracelulares de *T. cruzi* (ci_{50}) y toxicidad en células vero (cc_{50}). 88
- Figura 14. Actividad en promastigotes de *L. chagasi*. Se muestran los valores de ci_{50} : barra gris y ci_{90} : barra blanca para cada grupo (a. B. C) de compuestos. Los resultados fueron expresados en $\mu\text{m} \pm$ de y corresponden a un experimento representativo de dos realizados (n=6). 90
- Figura 15. Actividad contra amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* y *L. panamensis*. A: actividad (ci_{50} y ci_{90}) en μm contra amastigotes de *L. amazonensis*. B: actividad en amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* (ci_{50}) y toxicidad en células Thp-1 diferenciadas (cc_{50}). B: actividad (ci_{50} y ci_{90}) en μm contra amstigotes de *L. panamensis*. B: actividad en amastigotes intracelulares de *L. panamensis* (ci_{50}) y toxicidad en células Thp-1 diferenciadas (cc_{50}). Los valores corresponden a un experimento representativo de dos realizados. 93

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica de la <i>Leishmania</i> (familia trypanosomatidae)	32
Tabla 2. Especies de <i>Leishmania</i> causantes de manifestaciones clínicas en humanos.	36
Tabla 3. Fases del descubrimiento de medicamentos.	44
Tabla 4. Actividad farmacológica de derivados de 1-benzazepinas	55
Tabla 5 actividad farmacológica de derivados dibenzoazepinas	60
Tabla 6. Actividad farmacológica de derivados 1-naftoazepinas	61
Tabla 7. Estructuras y nombres de compuestos sintéticos y medicamentos de referencia	65
Tabla 8. Parámetros fisicoquímicos de los compuestos obtenidos mediante análisis quimioinformático	75
Tabla 9. Caracterización de la infectividad de cepas de <i>T. cruzi</i>	79
Tabla 10. Compuestos tóxicos y parcialmente tóxicos en células vero y Thp-1 diferenciadas	82

LISTA DE ABREVIACIONES

CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
CI ₉₀	Concentración inhibitoria 90
CC ₅₀	Concentración citotóxica 50
CC ₉₀	Concentración citotóxica 90
LC	Leishmaniasis cutánea
LCD	Leishmaniasis cutánea difusa
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LV	Leishmaniasis visceral
AmB	Anfotericina B
LogP	Coefficiente de partición octanol/agua
PSA	Área de superficie polar
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro
nOHNH	Número de átomos donadores de puentes de hidrógeno
nON	Número de átomos aceptores de puentes de hidrógeno
DMSO	Dimetil sulfóxido
SBFi	Suero bovino fetal inactivo
LIT	<i>Liver infution tryptosa</i>
PBS	Buffer fosfato salino
PMA	Forbol miristato acetato
IS	Índice de selectividad
SAR	Análisis estructura actividad
QSAR	<i>Cuantitative structure activity relation</i>
TDC	Tripomastigotes derivados de células

RESUMEN

TÍTULO: ACTIVIDAD ANTIPARASITARIA Y CITOTÓXICA DE DERIVADOS DE LA TETRAHIDRO-1-BENZOAZEPINA, TETRAHIDRONAFTO[1,2-*b*]AZEPINA Y DIHIDRODIBENZO[*c,f*]TIAZOLO[3,2-*a*]AZEPIN-3-ONA CONTRA *Trypanosoma cruzi* y *Leishmania spp* *

AUTORES: LEAL PINTO, Sandra Milena; PALMA RODRÍGUEZ, Alirio; ESCOBAR RIVERO, Patricia **

PALABRAS CLAVES: *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, células Vero, células THP-1, actividad antiparasitaria, tetrahidronaftoazepinas, tetrahidro-1-benzazepinas, dibenzotiazoloazepinonas, citotoxicidad.

La leishmaniasis y la enfermedad de Chagas constituyen un problema serio de salud pública en países tropicales y subtropicales endémicos. Las opciones de tratamiento son pocas y presentan limitaciones. Por tanto, la búsqueda de nuevos tratamientos es prioritaria. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antiparasitaria y citotóxica de derivados de la tetrahidro-1-benzoazepina, dihidrodibenzo[*c,f*]tiazolo[3,2-*a*]azepin-3-ona y tetrahidronafto[1,2-*b*]azepina contra *T. cruzi*, *Leishmania* y células de mamífero.

Se evaluaron 35 compuestos sintéticos contra las formas libres e intracelulares de *T. cruzi* y *L. chagasi* y contra células Vero y THP-1 diferenciadas. Los compuestos activos en amastigotes intracelulares y aquellos activos en promastigotes ($CI_{50} < 10 \mu M$), fueron evaluados contra las formas intracelulares de *L. panamensis*, *L. amazonensis* y *T. cruzi* cepa Sylvio-X10. Los resultados de actividad fueron expresados como la concentración inhibitoria o citotóxica 50 y 90 para los parásitos y las células. Se realizó un análisis estructura actividad (SAR) y se determinaron algunas propiedades fisicoquímicas de los compuestos por análisis quimioinformático.

Algunos compuestos presentaron actividades muy interesantes. En *T. cruzi*, diecisiete compuestos fueron activos contra epimastigotes con CI_{50} entre 0,02-48,44 μM y CI_{90} de 0,17-90,10 μM y cuatro contra amastigotes intracelulares con CI_{50} entre 18,42-52,45 μM y CI_{90} 70,27-92,5 μM .

En *L. chagasi*, quince compuestos fueron activos contra promastigotes con CI_{50} de 0,92-46,67 μM y CI_{90} de 8,76-86,15 μM , y tres compuestos fueron activos contra amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* y/o *L. panamensis*. El 97,14% de los compuestos no fueron tóxicos en células de mamífero.

Según el análisis SAR, los aminoalcoholes 8, 10, 33, los cicloaductos 17 y 18 y la dibenzoazepina 28 mostraron actividad contra amastigotes intracelulares de ambos parásitos con baja toxicidad en células de mamífero y propiedades fisicoquímicas óptimas para ser considerados como candidatos a fármacos.

* Tesis de grado. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

** Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. PhD Director de tesis

ABSTRACT

TITLE: ANTIPARASITIC ACTIVITY AND CITOTOXIC OF DERIVATIVES OF TETRAHYDRO-1-BENZAEPINA, DIHYDRODIBENZO[c,f]THIAZOLO[3,2-a]AZEPIN-3-ONA Y TETRAHYDRONAPHTO[1,2-b]AZEPIN AGAINST *Trypanosoma cruzi* AND *Leishmania* spp *

AUTORES: LEAL PINTO, Sandra Milena; PALMA RODRÍGUEZ, Alirio; ESCOBAR RIVERO, Patricia **

KEY WORDS: *Leishmania*, *Trypanosoma cruzi*, Vero cells, macrophages THP-1, antiparasitic activity, tetrahydronaphthoazepine, tetrahydro-1-benzazepine, dibenzothiazoloazepinonas, cytotoxicity.

Chagas disease and leishmaniasis constitute a serious public health problem in tropical and subtropical countries. The options of treatment are few and have limitations. The search for new drug alternatives is imperative. The aim of this study was to evaluate the antiparasitic activity and cytotoxicity of derivatives of tetrahydro-1-benzoazepina, dihidrodibenzo [c, f] thiazole [3,2-a] Azepines-3-one and tetrahidronafto [1,2-b] Azepines against *T. cruzi*, *Leishmania* and mammalian cells.

Thirty five (35) synthetic compounds were evaluated against *T. cruzi*, *L. chagasi* and Vero and THP-1 cells. The active compounds on intracellular amastigotes and those actives against promastigotes ($IC_{50} < 10\mu M$) were tested against intracellular forms of *L. panamensis*, *L. amazonensis* and *T. cruzi* Sylvio-X10 strain. The results were expressed as the concentration to inhibit 50 and 90 percent of parasites (IC_{50} , IC_{90}) and cells (CC_{50} , CC_{90}). Studies of structure activity relationship (SAR) and cheminformatics analyses were performed.

Some compounds showed interesting activities. Seventeen (17) compounds were actives on epimastigotes of *T. cruzi* with IC_{50} 0.02 to 48.44 μM and CI_{90} 0.17 to 90.10 μM and four (4) against intracellular amastigotes of *T. cruzi* with CI_{50} between 18.42 to 52.45 μM and CI_{90} 70.27 to 92.5 μM . Fifteen (15) compounds were active on *L. chagasi* promastigotes with IC_{50} 0.92 to 46.67 μM and CI_{90} of 8.76 to 86.15 μM . Three compounds were active against intracellular amastigotes of *L. amazonensis* and/or *L. panamensis*. The 97.14% of the compounds were not toxic against mammalian cells.

According to the SAR analysis, the amino alcohols 8, 10, 33, the cycloadducts 17 and 18 and the dibenzothiazoloazepinona 28, showed to be good inhibitors of the intracellular forms of both parasites with low toxicity in mammalian cells and presenting optimal physicochemical properties to be considered as drug candidates.

* Thesis of grade of Master in Basic Biomedical Science

** Faculty of Health, Master in Basic Biomedical Science, Thesis director.

INTRODUCCION

La enfermedad de Chagas y la leishmaniasis son enfermedades tropicales que afectan a millones de personas en América Latina (Urbina *et al.*, 2003; Desjeux, 2004). Su panorama actual de tratamiento es desalentador, no existe una vacuna para prevenirlas y los medicamentos utilizados presentan varias limitaciones como toxicidad, altos costos, resistencia, eficacia variable y son utilizados en esquemas prolongados de tratamiento generalmente por vías parenterales (Sereno *et al.*, 2007; Urbina *et al.*, 2003; Murray *et al.*, 2005).

Bajo este escenario, la presente tesis surge de la necesidad de encontrar nuevos y promisorios compuestos que destruyan los agentes causales de estas enfermedades: *T. cruzi* y *Leishmania*, sin ser nocivos para las células de mamífero. Algunos de estos compuestos podrían constituirse en candidatos a fármacos realizando un aporte importante desde la academia al tratamiento de estas enfermedades consideradas olvidadas, que afectan poblaciones de alto nivel de pobreza y poco atractivas para que las farmacéuticas inviertan en investigación y desarrollo.

De esta manera, el laboratorio de quimioterapia del CINTROP y el laboratorio de síntesis orgánica (LSO), ambos de la Universidad Industrial de Santander, han venido realizando desde el año 2006 trabajos colaborativos, en los cuales se ha llevado a cabo la síntesis y evaluación biológica de cerca de 150 compuestos sintéticos cuya estructura base es la azepina. Estos compuestos han sido probados contra *T. cruzi*, *L. chagasi* y células de mamífero, con resultados prometedores. La literatura reporta que compuestos relacionados han demostrado tener propiedades biológicas contra virus, células tumorales, parásitos y se les ha encontrado ser antagonistas o agonistas de receptores presentes en la membrana de células de mamífero (Seto *et al.*, 2004, 2005; Di Fabio *et al.*, 2003; Tahara *et*

al., 2006; Kohfeld *et al.*, 2007; Al-Qawasmeh *et al.*, 2009; Reichwald C, *et al.*, 2008; Grant C, *et al.*, 2004). Asimismo, algunos de los compuestos ensayados en nuestro laboratorio mostraron inhibir los parásitos *T. cruzi* y *L. chagasi* sin ser tóxicos para las células hospederas (Palma *et al.*, 2009).

Bajo estas circunstancias, nuevos derivados azepínicos con estructuras relacionadas a los anteriormente mencionados, fueron sintetizados y enviados a nuestro laboratorio para evaluarles su actividad antiparasitaria y citotóxica.

Treinta y cinco (35) compuestos fueron seleccionados pertenecientes a las series de tetrahydro-1-benzazepina, dihidrodibenzo [c,f]thiazolo[3,2-a]azepin-3-ona y tetrahydronaphto[1,2-b]azepin para ser objeto de este trabajo de tesis.

En este documento se muestra inicialmente una revisión de la literatura acerca de la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis, sus agentes etiológicos, cuadros clínicos, diagnóstico y tratamiento. Se realiza una breve descripción de las fases del desarrollo de medicamentos enfatizando en los estudios preclínicos especialmente en ensayos *in vitro*, dado que este trabajo aporta en esta etapa. Igualmente presenta un estado de arte actualizado sobre trabajos que muestran la actividad farmacológica de compuestos relacionados con las tres series mencionadas anteriormente.

Se presentan los objetivos de este estudio y la metodología utilizada para determinar la susceptibilidad de los compuestos frente a las formas extra y/o intracelulares de *T. cruzi*, *L. chagasi*, *L. amazonensis* y *L. panamensis* empleando métodos de conteo directos y colorimétricos como el MTT/PMS. Así como los ensayos de citotoxicidad en células de mamífero: Vero y THP-1 diferenciadas.

Los resultados de la actividad antiparasitaria y citotóxica de las tres series de compuestos fueron expresados en concentraciones inhibitorias o citotóxicas 50 y 90 indicando la inhibición o muerte del 50 y 90% de los parásitos o células de

mamífero y presentados en forma de gráficas separadas según la serie de compuestos para facilitar la comprensión. Adicionalmente, los IS de cada uno de los compuestos fueron determinados.

El análisis cualitativo de la estructura química versus la actividad antiparasitaria (SAR) se presentan con el fin de mostrar correlaciones entre los diferentes átomos, series de compuestos y su acción inhibitoria contra los parásitos. Finalmente se presentan los resultados del análisis quimioinformático describiendo algunas propiedades fisicoquímicas de los compuestos como lipofilidad, solubilidad, átomos aceptores y donadores de puentes de hidrógeno, peso molecular, entre otros. También se muestran algunos riesgos de toxicidad teóricos como mutagenicidad, teratogenicidad, efecto irritante y efecto reproductivo.

Los resultados encontrados hacen un aporte importante al descubrimiento de nuevas moléculas en esta primera fase del desarrollo de fármacos. Se encuentran compuestos muy promisorios en cada una de las series de compuestos evaluados, los cuales tienen una acción inhibitoria contra el parásito y presentan baja toxicidad para las células de mamífero. Estos compuestos podrían continuar hacia otras etapas del descubrimiento de medicamentos como ensayos in vivo, determinación de mecanismos de acción, pruebas de genotoxicidad y mutagenicidad, entre otras.

1. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

A continuación se expondrán aspectos relevantes de los parásitos *T. cruzi* y *Leishmania* y las enfermedades que producen, su diagnóstico y tratamiento. Posteriormente se mostrará las fases del desarrollo y descubrimiento de medicamentos y se presentará una revisión sobre los compuestos evaluados en este estudio y algunas de sus actividades farmacológicas conocidas.

1.1. ENFERMEDAD DE CHAGAS

1.1.1. Generalidades: epidemiología y transmisión

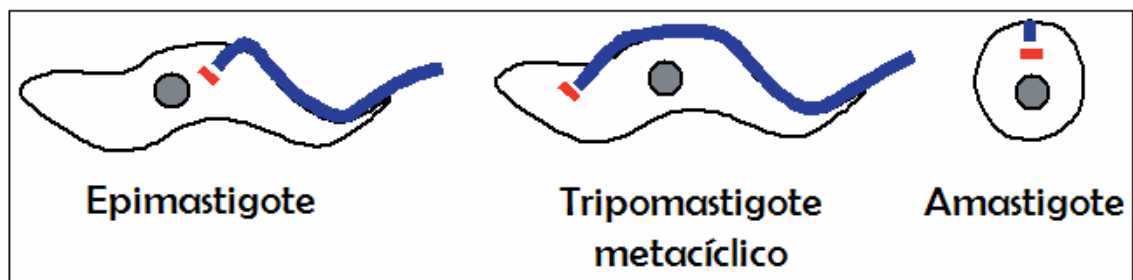
La enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana, está ampliamente distribuida en América Latina, en cerca de 19 países, situados geográficamente entre Suramérica (Chile, Argentina, Bolivia, Perú, Ecuador, Colombia, Brasil y Venezuela), en América central y sureste de Estados Unidos principalmente donde es considerada como un problema de salud pública. Sin embargo, en algunos países Europeos (Alemania, España y Suecia), Australia y Japón la infección por el *T. cruzi* ha sido documentada y se ha atribuido principalmente a los inmigrantes procedentes de países endémicos. (Carod-Artal, 2006; Schmunis, 2007). Se estima que cerca de 100 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad, 16 a 18 millones se encuentran infectadas y cerca de 14000 muertes ocurren cada año en Latinoamérica (WHO. 2007; Stuart *et al.*, 2008). En Colombia, se cree que aproximadamente un millón de personas están infectadas y 3 millones se encuentran en riesgo de contraer la enfermedad. Los departamentos de Santander, Norte de Santander, Cundinamarca, Boyacá, Meta, Casanare, Arauca, Tolima, Huila y Bolívar son considerados los más endémicos (Moncayo & Silveira, 2009; Guías y normas 412 Ministerio de Protección Social, 2007).

El *T. cruzi* puede transmitirse al humano y a otros reservorios mamíferos como los armadillos, zarigüeyas, murciélagos a través de sus insectos vectores, triatomíneos hematófagos, de la familia *Ruduviridae*, donde *Rhodnius prolixus* y *Triatoma dimidiata* son considerados los principales vectores en Colombia (Guhl, 2007). Otras vías de transmisión como transfusiones sanguíneas, trasplante de órganos, ingesta de alimentos contaminados y bebidas, leche materna y transmisión vertical (madre: feto) han sido también documentadas (Guhl, 2007; Stuart *et al.*, 2008; Yoshida, 2009).

1.1.2. *Trypanosoma cruzi* y su ciclo de vida

El *T. cruzi* es un protozoo flagelado perteneciente a la familia Trypanosomatidae. Su variabilidad genética lo ha clasificado en dos grupos (*T. cruzi* I y *T. cruzi* II), siendo *T. cruzi* I el grupo predominante en Colombia (Luna *et al.*, 2009). Se han identificado varias formas parasitarias: epimastigotes, amastigotes intracelulares y tripomastigotes (ver figura 1). Los epimastigotes se encuentran en el intestino del vector (y en medios de cultivo); de aspecto fusiforme, posee un flagelo, una pequeña membrana ondulante y un quinetoplasto en la parte anterior del núcleo y se replica por fisión binaria.

Figura 1. Formas parasitarias del *T. cruzi*.



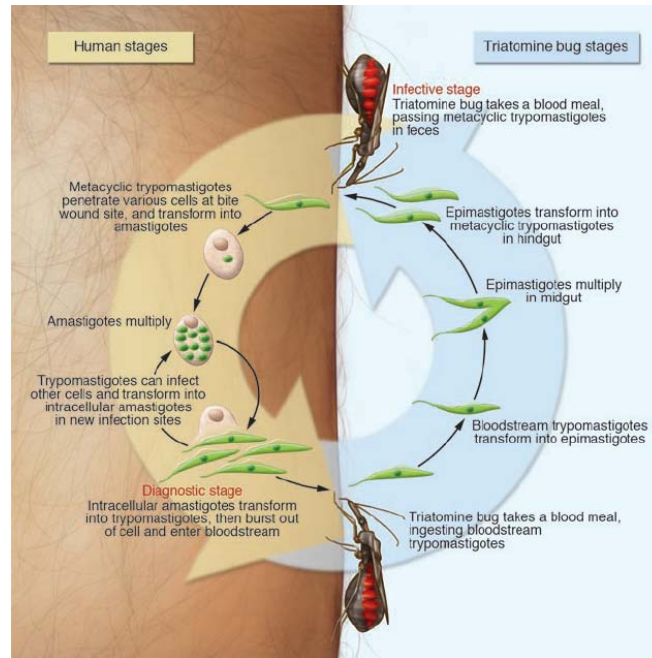
Fuente: Modificado de McConville *et al.*, 2002

El amastigote es la forma intracelular replicativa, de forma redondeada y carente de flagelo libre. Su quinetooplasto se encuentra localizado en la parte anterior al núcleo. El tripomastigote metacíclico es la forma infectante no replicativa. Se caracteriza por tener una forma alargada y un flagelo con membrana ondulante a lo largo del cuerpo del parásito y un quinetooplasto localizado en la parte posterior del núcleo (Gull, 2000; Souza, 1999).

El ciclo de vida del *T. cruzi* en el hospedero mamífero comienza cuando los tripomastigotes metacíclicos ingresan al humano o reservorios e infectan una gran variedad de células nucleadas. Los tripomastigotes presentes en las células escapan de la vacuola parasitófora y llegan al citoplasma donde se transforman en amastigotes. Estos se multiplican por fisión binaria y sufren una metaciclogénesis transformándose nuevamente en tripomastigotes metacíclicos los cuales salen de la célula y llegan a la circulación sanguínea y linfática teniendo la capacidad de infectar nuevas células.

Los triatomíneos cuando se alimentan de sangre adquieren los tripomastigotes metacíclicos los cuales pueden descender al intestino medio del triatomíneo y transformarse en epimastigotes, ellos se multiplican y se convierten en tripomastigotes metacíclicos migrando al recto. Allí son excretados por las heces luego de la picadura. Los parásitos entran al hospedero por el sitio de la picadura o a través de mucosas como la conjuntiva y continúan su ciclo. Ver figura 2 (Naula *et al.*, 2005; De Souza, 2002).

Figura 2. Ciclo de vida del *T. cruzi*.



Fuente: Fotografía tomada de Stuart *et al.*, 2008.

1.1.3. Manifestaciones clínicas

La infección por *T. cruzi* puede presentar tres fases clínicas: una fase aguda, fase indeterminada y una fase crónica.

La fase aguda se caracteriza por un cuadro clínico inespecífico donde los signos y síntomas pueden llegar a pasar desapercibidos acompañándose de un síndrome febril y presencia de parásitos en sangre, sin embargo, en algunas ocasiones, se presenta edema local en el punto de inoculación, acompañado por una lesión cutánea y linfadenopatía conocida como chagoma. Cuando la infección ocurre en los ojos, ocasiona edema periorbital y conjuntivitis conocido como signo de Romaña. Se considera que la tasa de mortalidad en esta fase clínica es de 2-8%

en los casos de miocarditis aguda o meningoencefalitis principalmente en niños (Nicholls *et al.*, 2007; Carod-Artal, 2006; Krishna & Stich, 2005).

La fase indeterminada generalmente es asintomática con una disminución en el número de parásitos sanguíneos. Se considera que esta fase puede durar varios años sin que se presenten lesiones considerables en los pacientes.

La fase crónica es sintomática y puede ocurrir después de varios años de haber contraído la infección inicial en el 15-30% de las personas infectadas. Las manifestaciones clínicas comprometen diferentes órganos especialmente el corazón, tracto gastrointestinal y tracto urinario, reflejadas como cardiomiopatías y mega vísceras principalmente. (Mega esófago, megacolon, mega uréter, entre otros). Se cree que cerca del 30% de las personas infectadas desarrollan lesiones digestivas y cardíacas severas (Carod-Artal, 2006; Krishna & Stich, 2005; Moncayo & Silveira, 2009).

1.1.4. Diagnóstico

Según la guía del Ministerio de Protección Social para la enfermedad de Chagas, el diagnóstico de la infección por *T. cruzi* depende de la fase clínica de la enfermedad.

En la fase aguda la presencia del signo de Romaña es de gran ayuda en el diagnóstico, sin embargo, como esta fase puede confundirse con otras enfermedades debido a la falta de especificidad de sus signos y síntomas, los métodos parasitológicos directos como el examen microscópico en fresco ayudan a visualizar los tripomastigotes en una gota de sangre. En dado caso que resulte negativo, el método de microhematocrito y exámenes serológicos para detección de anticuerpos IgG (ELISA), son de gran utilidad. La confirmación de la infección

debe realizarse por inmunofluorescencia indirecta (IFI). Técnicas efectivas como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el xenodiagnóstico son otras herramientas útiles para el diagnóstico de esta parasitosis.

En la fase indeterminada, el diagnóstico se realiza mediante exámenes serológicos como ELISA y ensayos confirmatorios como IFI. Si las pruebas serológicas resultan positivas, debe procederse a realizar exámenes físicos, electrocardiogramas y radiografía de tórax, entre otros.

En la fase crónica, un examen clínico exhaustivo, exámenes serológicos y la prueba de hemaglutinación son de gran ayuda para detectar la infección.

Otras pruebas como el cultivo de parásitos en medios LIT (Liver-Infusion-Tryptose), NNN (Novy-MacNeal-Nicolle), inoculación en animales como ratones BALB/c principalmente, son efectivos en el diagnóstico tanto de la fase aguda como la fase crónica de la enfermedad de Chagas (Guías y normas 412 Ministerio de Protección Social, 2007)

1.1.5. Tratamiento

El tratamiento actual de la enfermedad de Chagas consiste principalmente en el uso de dos medicamentos: el nifurtimox [3-metil-4-(5'-nitrofurfurilideno-amina) tetrahydro-4*H*-1,4-tiazina 1,1-dioxido, Lampit®) desarrollado por Bayer en 1960 y el benznidazol (N-benzil-2-nitroimidazol acetamida, Rochagan®) desarrollado por Roche en 1974 (figura 3). En Colombia el benznidazol es el único medicamento disponible y registrado ante el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos (INVIMA) (Guías y normas 412 Ministerio de Protección Social, 2007).

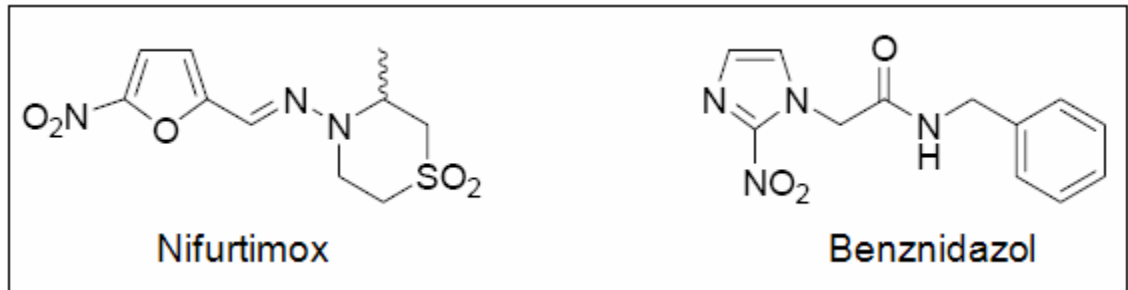
La efectividad del nifurtimox y el benznidazol ha sido demostrada tanto en ensayos experimentales como en ensayos clínicos, mostrando un 80% de cura parasitológica en el tratamiento de pacientes infectados en fase aguda. Sin embargo una gran variabilidad en la respuesta se ha encontrado cuando son evaluados en la fase crónica de la enfermedad (Bock et al., 1969; Cançado, 1999, 2002; Urbina, 2009; Croft *et al.*, 2005). Estudios clínicos realizados en pacientes en fase crónica de la infección mostraron que el tratamiento con benznidazol redujo mejor la parasitemia que el nifurtimox y placebo (Coura *et al.*, 1997).

El mecanismo de acción de estos medicamentos aún no ha sido dilucidado completamente, sin embargo, se conoce que inducen la producción de especies reactivas de oxígeno altamente tóxicas como peróxido de hidrógeno, radicales superóxido e hidroxilo los cuales podrían unirse a macromoléculas celulares como proteínas, lípidos y ADN y ocasionar la muerte del parásito (Urbina & Docampo, 2003; Stuart *et al.*, 2008).

Los esquemas de tratamiento recomendados son de 8-10 mg/Kg/día para el nifurtimox y 5-10mg/Kg/día para el benznidazol dividido en 2-3 dosis por día por aproximadamente 60 días.

En general, estos medicamentos presentan varios inconvenientes como toxicidad, trastornos neurológicos, hepáticos y renales severos. Además son aplicados en protocolos de tratamiento largos y dispendiosos, están limitados prácticamente a la fase aguda de la enfermedad con eficacia variable, son de uso restringido y no están disponibles para todos los pacientes (Coura, 2009; Carod-Artal, 2006).

Figura 3. Medicamentos usados para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.



Fuente: Tomado de Cerecetto, 2010.

1.1.5.1. Otros medicamentos y nuevos compuestos activos. Actualmente varios medicamentos conocidos por su acción en diferentes sistemas biológicos y/o contra microorganismos específicos, son probados en ensayos experimentales y/o clínicos de la enfermedad de Chagas. A continuación se expondrán algunos de estos medicamentos y/o nuevos compuestos químicos, sus mecanismos de acción y algunos resultados experimentales contra el parásito.

El alopurinol (4-hidroxipirazolo [3,4-*d*]-pirimidina) es un análogo de la hipoxantina y utilizado para el tratamiento de la hiperuricemia (gota). Este medicamento ha demostrado ser un excelente inhibidor del *T. cruzi*, utilizando la deficiente biosíntesis *de novo* de purinas del parásito, para incorporarse en su ADN e interferir con la síntesis de proteínas y ARN (Urbina & Docampo, 2003). Su efectividad ha sido demostrada en modelos animales, donde modifica la evolución de la infección aguda, reduciendo la carga parasitaria y disminuyendo las alteraciones electrocardiográficas (Gobbi *et al.*, 2007). Estudios realizados con pacientes crónicos mostraron un 44% de cura parasitológica, y una disminución de los efectos adversos al ser comparado con el nifurtimox y benznidazol. Sin embargo, su actividad biológica en humanos sigue siendo bastante controvertida,

de ahí que se requiera de nuevos estudios para reevaluar la eficacia de este compuesto (Gallerano *et al.*, 1990).

Los azoles como el ketoconazol, itraconazol y fluconazol, utilizados para el tratamiento de enfermedades producidas por hongos han sido activos *in vitro* contra el *T. cruzi*, sin embargo, no han mostrado ser efectivos en infecciones en humanos y animales de experimentación (Urbina, 2002; Urbina & Docampo, 2003; de Castro, 1993; Coura, 2009). La inhibición de la biosíntesis del ergosterol es considerada el mecanismo de acción de estos medicamentos. Otros triazoles (terconazol, saperconazol (R66905), pozoconazol (SCH 56592), ravuconazol (ER 30346), TAK 187, entre otros), están siendo investigados y ya se cuenta con resultados prometedores en las fases experimentales de la enfermedad de Chagas. El pozoconazol actualmente se encuentra en ensayos iniciales en humanos (Urbina *et al.*, 1998, 2000, 2009; Urbina & Docampo, 2003; Coura, 2009).

Compuestos heterocíclicos como las quinuclidinas que actúan como inhibidores de la sintetasa escualelo del *T. cruzi* han sido reportadas. El compuesto E5700 resultó ser activo al ser administrado oralmente en ratones con infección aguda, protegiéndolos de la muerte y evitando el desarrollo de la parasitemia (Urbina, 2004, 2009). De igual manera, compuestos con código BPQ-OH y ER27856 también inhibieron el *T. cruzi* produciendo alteraciones a nivel de la membrana, bolsillo flagelar, vacuola citoplasmática y mitocondria y en el contenido de esteroides endógenos en el parásito (Braga *et al.*, 2004).

El compuesto K-777 de la familia vinil-sulfona ha sido descrito por actuar selectivamente sobre la proteasa cruzipaina, inhibiendo la metaciclologénesis del parásito *in vitro*. En el modelo murino este compuesto ha demostrado una baja toxicidad y una disminución de la parasitemia en la fase aguda y crónica de la

enfermedad (Engel *et al.*, 1998). Sin embargo, al ser probado en perros infectados, no produjo cura parasitológica ni redujo el daño cardíaco (Barr *et al.*, 2005). A pesar de esto, el compuesto fue desarrollado como un potencial fármaco, pero pocos años después fue abolido por inconvenientes en la manufactura y por efectos hepatotóxicos, entre otros.

Algunos nitroheterociclos similares estructuralmente al nifurtimox como derivados N-óxido han sido identificados por su actividad contra el *T. cruzi in vitro* mediante la generación de radicales libres altamente tóxicos contra el parásito (Cerecetto *et al.*, 1999). Por otra parte, estudios *in vivo* de benzimidazoles di-N-óxidos contra el *T. cruzi* demostraron que éstos compuestos fueron capaces de evitar la muerte de ratones infectados y disminuir los anticuerpos anti-*T. cruzi* (Cerecetto *et al.*, 2010). Otros derivados como los 5-nitroindazoles inhibieron el parásito tanto *in vitro* como *in vivo* en el modelo de Chagas agudo al ser administrado oralmente en ratones BALB/c (Rodríguez *et al.*, 2009).

1.2. LEISHMANIASIS

1.2.1. Generalidades: epidemiología y transmisión

La leishmaniasis es una zoonosis distribuida a nivel mundial, principalmente en India, Sur de Asia, África subsahariana, América Latina, el Caribe y una parte del Mediterráneo donde se constituye en un gran problema de salud pública. Se cree que cerca de 12 millones de personas están infectadas y 2 millones de nuevos casos ocurren cada año en el mundo (Desjeux, 2004; Caballi & Bolognesi, 2009). En Colombia la incidencia de casos ha venido aumentando, siendo la leishmaniasis cutánea (LC) la más prevalente (99,4%), seguida de la leishmaniasis mucosa (0,3%) y la leishmaniasis visceral (0,3%). En el departamento de Santander para el año 2002 la tasa de incidencia de LC y LV en 100.000

habitantes fue de 250 a 300 y 4,03, respectivamente (Saravia & Nicholl, 2006; Vélez *et al.*, 2001; Sánchez *et al.*, 2007; Sivigila, 2002).

Este parásito es transmitido al humano y otros reservorios tales como perezosos, zarigüeya, rata silvestre, perros a través de la picadura de mosquitos hembras del género *Lutzomia* en el Nuevo Mundo y *Phlebotomus* en el Viejo Mundo.

1.2.2. *Leishmania* y su ciclo de vida

Los parásitos del género *Leishmania* se clasifican en diferentes complejos de acuerdo a características genéticas, bioquímicas y biológicas (ver tabla 1).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de la *Leishmania* (familia Trypanosomatidae)

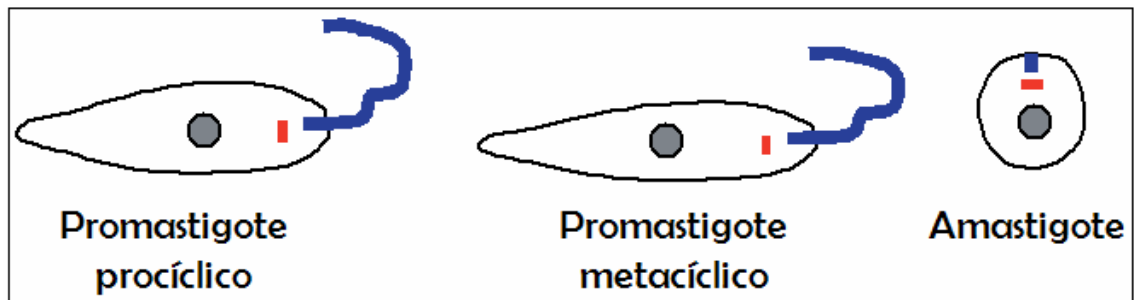
Género	Subgénero	Complejos	Especies		
<i>Leishmania</i>		<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>		
			<i>L. chagasi</i>		
			<i>L. infantum</i>		
			<i>L. archibaldi</i>		
		<i>L. tropica</i>		<i>L. tropica</i>	
				<i>L. killicki</i>	
	<i>Leishmania</i>		<i>L. major</i>	<i>L. major</i>	
				<i>L. aethiopica</i>	<i>L. aethiopica</i>
	<i>Leishmania</i>			<i>L. mexicana</i>	
				<i>L. amazonensis</i>	
				<i>L. mexicana</i>	<i>L. garnhami</i>
					<i>L. pifanoi</i>
				<i>L. venezuelensis</i>	
				<i>Viannia</i>	
<i>L. braziliensis</i>					
<i>L. braziliensis</i>	<i>L. colombiensi</i>				
	<i>L. peruviana</i>				
<i>L. guyanensis</i>			<i>L. guyanensis</i>		
			<i>L. panamensis</i>		

Fuente: Modificado de Chan-Bacab & Peña-Rodríguez, 2001.

Los parásitos *Leishmania* presentan dos formas morfológicas: el promastigote y el amastigote (ver figura 4).

El promastigote se encuentra en el intestino del vector, es móvil y posee flagelo sin membrana ondulante, su quinetooplasto está localizado anterior al núcleo. El amastigote es intracelular, localizado en el hospedero y no posee flagelo libre. Se multiplica por fisión binaria y su quinetooplasto se encuentra en posición posterior al núcleo (Waller & MacConville, 2002; 2007).

Figura 4. Formas parasitarias de *Leishmania* spp.



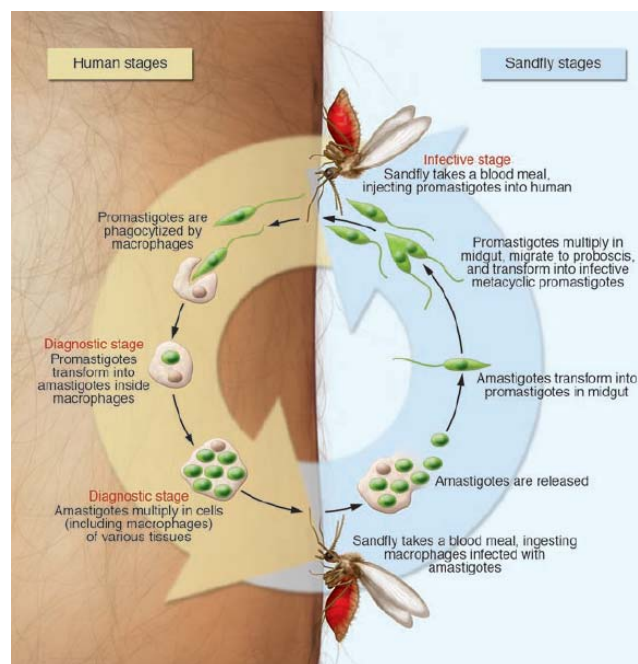
Fuente: Modificado de McConville *et al.*, 2002.

El ciclo de vida en el hospedero vertebrado empieza cuando los promastigotes metacíclicos infectivos son inyectados por el mosquito a través de su picadura. Los promastigotes son fagocitados inmediatamente por las células fagocíticas mononucleares. Dentro de las células se transforman en amastigotes sobreviviendo en la vacuola parasitófora la cual posteriormente se fusiona con los lisosomas (fagolisosoma) donde el parásito se replica. Puede ocasionar la lisis de la célula, liberarse e infectar otras células (células dendríticas, fibroblastos y/o macrófagos).

El mosquito hembra durante su ingesta de sangre toma células infectadas con amastigotes del hospedero vertebrado. Estos se transforman en una forma no infectiva y replicativa llamada promastigote procíclico los cuales migran al intestino medio del vector donde se transforman en una forma metacíclica infectiva que no

se replica denominada promastigote metacíclico los cuales finalmente ascienden a la probóscide del insecto. El ciclo empieza nuevamente cuando el mosquito infectado pica al humano u a otro reservorio. Ver figura 5 (Serenó *et al.*, 2007; Kima, 2007; Reithinger *et al.*, 2007).

Figura 5. Ciclo de vida de *Leishmania* spp.



Fuente: Fotografía tomada de Stuart K., et al, 2008.

1.2.3. Manifestaciones clínicas

La leishmaniasis es un conjunto de manifestaciones clínicas variables que dependen de la especie de *Leishmania* infectante y del estado inmunológico del paciente. Principalmente se presenta la LC, mucocutánea (LMC), cutánea difusa (LCD) y visceral (LV). En la tabla 2 se muestran las diferentes especies de *Leishmania* infectantes y la respectiva manifestación clínica que producen.

Según la guía para la leishmaniasis del Ministerio de Protección Social en Colombia, la LC esta asociada con la aparición de una úlcera indolora redondeada, de bordes elevados, eritematosos con centro granulomatoso limpio, presentándose lesiones únicas o múltiples las cuales pueden curar espontáneamente y acompañarse de linfadenopatías regionales (Reithinger *et al.*, 2007).

La LMC es la consecuencia de la diseminación linfohematógena del parásito y pueden ocurrir simultáneamente o después de haberse contraído la infección. La lesión compromete la mucosa nasal, bucal y faríngea ocasionando lesiones deformantes graves (.Herwaldt, 1999; Sereno *et al.*, 2007)

La LCD ocurre a partir de la lesión primaria en el sitio de infección extendiéndose progresivamente por toda la superficie del cuerpo sin compromiso del sistema inmune ni órganos internos. Las lesiones son parecidas a las de la lepra y no curan espontáneamente (Sereno *et al.*, 2007; Davies *et al.*, 2007; Murray *et al.*, 2005).

La LV es la forma clínica más grave, de evolución crónica afectando órganos reticuloendoteliales y ocasionando hepatomegalia y esplenomegalia principalmente. Puede llegar a ser fatal si no se trata a tiempo. En algunos pacientes luego de la curación, aparecen lesiones granulomatosas en la piel (Herwaldt, 1999; Murray *et al.*, 2005).

Tabla 2. Especies de *Leishmania* causantes de manifestaciones clínicas en humanos.

Especie de <i>Leishmania</i>	Manifestación clínica	Distribución geográfica
<i>L. (V) peruviana</i>		Peru
<i>L. (V) guyanensis</i>		
<i>L. (V) lainsoni</i>		Sur de América
<i>L. (L) pifanoi</i>		
<i>L. (L) garnhami</i>		
<i>L. (V) colombiensis</i>	LC	Norte y Sur de América
<i>L. (L) venezuelensis</i>		
<i>L. (L) killicki</i>		Norte de África
<i>L. (L) major</i>		Norte y Oriente de África, Medio Oriente, Asia Central
<i>L. (L) tropica</i>		Parte del Norte de África, Medio Oriente, Asia central, Sudeste de Asia
<i>L. (L) amazonensis</i>		Sur de América
<i>L. (L) mexicana</i>	LC, LCD	Centro de América, México, USA
<i>L. (L) aethiopica</i>		Kenya y Etiopia
<i>L. (V) braziliensis</i>	LC, LMC	Sur de América, parte de centro de América y México
<i>L. (V) panamensis</i>		Norte y Sur de América y Sur de América Central
<i>L. (L) donovani</i>		África, Asia Central y Sudeste de Asia
<i>L. (L) infantum</i>	LC, LV	
<i>L. (V) chagasi</i>		Europa, Norte de África, Centro y Sur de América

V: Subgénero *Viannia*; L: Subgénero *Leishmania*; LC: Leishmaniasis cutánea; LCD: Leishmaniasis cutánea difusa; LMC: leishmaniasis mucocutánea; LV: Leishmaniasis visceral.

Fuente: Tabla modificada a partir de Reithinger *et al.* 2007.

1.2.4. Diagnóstico

El diagnóstico de la LC, LMC y LCD se realiza mediante la identificación del parásito a partir de las lesiones. Para ello se emplean métodos directos como raspado de la lesión o cortes histológicos de tejidos infectados, los cuales son coloreados con Giemsa con el fin de visualizar los amastigotes intracelulares. Adicionalmente, las biopsias y aspirados de los bordes de la lesión, así como cultivos del material obtenido usando medios como el NNN, Senekje, Schneider entre otros, son de gran utilidad en el diagnóstico.

Las pruebas serológicas para detectar anticuerpos circulantes contra el parásito como IFI y ELISA y la prueba de intradermorreacción o prueba de Montenegro son métodos complementarios en el diagnóstico especialmente en LMC. La PCR basada en el estudio del ADN del parásito es otra alternativa efectiva usada en el diagnóstico de esta patología (Reithinger *et al.*, 2007; Guías y normas 412 Ministerio de Protección Social, 2007).

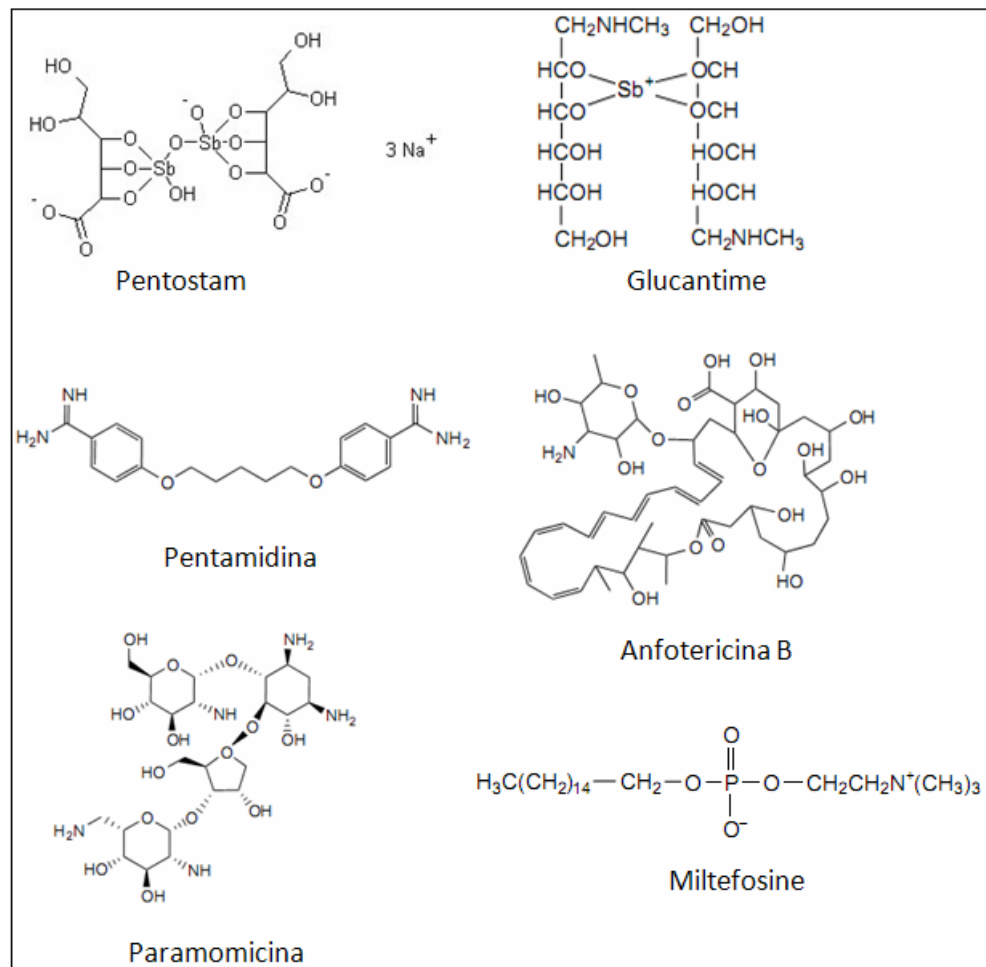
El diagnóstico de la LV se realiza mediante métodos de laboratorio como punción de médula ósea y bazo que ayudan a la observación de los amastigotes. Las pruebas serológicas sirven de apoyo pero presentan reacción cruzada con otras infecciones producidas por protozoos como el *T. cruzi*. Los cultivos y la inoculación en animales de experimentación como ratones, hámster y perros aunque son demorados, permiten la observación del parásito (Stuart *et al.*, 2008; Guías y normas 412 Ministerio de Protección Social, 2007).

1.2.5. Tratamiento

El tratamiento de primera línea para las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis consiste en el uso de antimonios pentavalentes (Sb^V) como el

estibogluconato de sodio (Pentostam[®]) y antimonio de N-metil glucamina (Glucantime[®]). En caso de falla terapéutica, los medicamentos de segunda elección son el isotianato de pentamidina (Pentacarinat[®]), anfotericina B (Fungizone[®]), miltefosine y paramomicina. En la figura 6 se muestran las estructuras de los medicamentos de primera y segunda elección para la leishmaniasis (Guías y normas 412 Ministerio de Protección Social, 2007).

Figura 6. Medicamentos usados en el tratamiento de la leishmaniasis.



Fuente: Modificado de Croft & Coombs, 2003.

Los Sb^V fueron introducidos en 1945. Son activos en la forma de amastigote intracelular pero ineficaces contra el promastigote *in vitro*. Sin embargo, aunque presentan una efectividad del 95% en humanos, la falla terapéutica asociada con la resistencia del parásito en algunos países como la India, ha restringido su uso. Los mecanismos de acción aún no son claros, pero se conoce que dentro de las células, los Sb^V se convierten en su forma tóxica trivalente (Sb^{III}), actuando sobre las enzimas glucolíticas del parásito.

El protocolo de tratamiento para la LC es una dosis diaria de 20 mg/kg/día durante 20 días, para la LV se emplea la misma dosis pero durante 30 días. Estas dosis son administradas parenteralmente ya sea vía intravenosa o intramuscular. La respuesta al tratamiento depende de la especie de *Leishmania* infectante (*L. aethiopica* es resistente a los Sb^V) y el estado inmunológico del paciente puesto que personas coinfectadas con VIH no responden bien al tratamiento. (Guías y normas 412 Ministerio de Protección Social, 2007; Herwaldt, 1999; Reithinger *et al.*, 2007; Croft & Coombs, 2003; Minodier & Parola, 2007).

El isotianato de pentamidina es utilizado en el tratamiento de la leishmaniasis resistente a los Sb^V. Ha demostrado una tasa de curación del 96% en casos de LC con bajos efectos colaterales (Singh & Sivakumar, 2004). Diferencias en la susceptibilidad entre especies ha sido reportada. Aunque su modo de acción no está bien definido, se conoce que inhibe la síntesis de poliaminas y del ADN del quinoplasto en el parásito. Su administración es intramuscular o intravenosa, en los casos de LC se emplean dosis de 4mg/kg en días alternos o 3 veces por semana de 15 a 30 dosis. Para la LV se utilizan 3mg/kg en días alternos por 4 dosis o 2mg/kg por 7 dosis. En protocolos prolongados con altas dosis presenta efectos tóxicos severos como nefrotoxicidad en pacientes infectados con VIH-*Leishmania* (Amato *et al.*, 1996).

La AmB es un antibiótico polieno cuya actividad leishmanicida fue descubierta a finales de 1950. Es usada en casos de resistencia a los Sb^V y es efectiva contra la LV principalmente (Jha *et al.*, 1995). Sin embargo, su uso se ha restringido por sus efectos nefrotóxicos y cardiotóxicos. Nuevas formulaciones menos tóxicas y más eficaces como la AmB liposomal (Ambisome[®]) han sido desarrolladas, mostrando un 90% de cura parasitológica en pacientes con LV en la India (Sundar, 2003). En el modelo de LC, ratones BALB/c infectados con *L. major* redujeron el tamaño de la lesión cuando fue aplicada por vía intravenosa. Desafortunadamente sus altos costos han restringido su uso (Yardley & Croft, 1997; Croft *et al.*, 2005). El mecanismo leishmanicida de la AmB se ha relacionado con la inhibición del ergosterol de la membrana del parásito, deteriorando la integridad de las mismas. El protocolo de tratamiento de la AmB en LV o LMC consiste en dosis de 0,5-1mg/kg aplicado intravenosamente en días alternos o diariamente hasta alcanzar dosis de 20-40 mg/kg (Herwaldt, 1999).

La miltefosine (hexadecilfosfocolina), es un medicamento utilizado inicialmente contra el cáncer y constituye el primer medicamento de uso oral en leishmaniasis. Su actividad *in vitro* e *in vivo* contra la *Leishmania* fue determinada en 1980 (Croft *et al.*, 1987; Kuhlencord *et al.*, 1992). Su efectividad en el tratamiento de la LV fue demostrada al ser utilizada oralmente en la India. En LC fue probada en pacientes en Colombia y en Guatemala mostrando ser activa pero con diferencias en la susceptibilidad entre las especies infectantes involucradas (Croft *et al.*, 2006; Minodier & Parola, 2007). Se sugiere que este medicamento podría alterar el metabolismo de ester-lípidos, la transmisión de señales celulares, y la síntesis de glucosilfosfatidilinositol. En Colombia una efectividad del 91-94% ha sido demostrada empleando esquemas de tratamiento de dosis de 2,0-2,2 mg/Kg/día durante tres a cuatro semanas o 2,5 mg/Kg/ día por 28 días.

La paramomicina o aminosidina es un aminoglucósido que fue introducido en 1960 como agente anti-*Leishmania*, mostrando eficacia en el tratamiento tópico de LC y parenteralmente para la LV. Sin embargo, en Colombia no ha sido recomendada para el tratamiento de la LC causada por *L. panamensis* (Herwaldt, 1999). Adicionalmente, este medicamento en la India ha mostrado tener una acción sinérgica con los Sb^V (Croft et al., 2006; Minodier & Parola, 2007; Herwaldt, 1999). La inhibición de la síntesis de proteínas ha sido el principal mecanismo de acción sugerido. La vía de administración parenteral de la paramomicina sola, utiliza dosis de 14mg/kg/día durante 20 días, este tipo de administración ha mostrado una efectividad clínica del 59% para la LC causada por *L. braziliensis* y *L. mexicana*. La aplicación tópica diaria de la paramomicina sola durante 10 a 30 días ha mostrado también una eficacia clínica variable entre 17-91% dependiendo de la especie de *Leishmania* infectante (Herwaldt, 1999).

Desafortunadamente los tratamientos para las diferentes formas clínicas de la leishmaniasis presentan desventajas o limitaciones como toxicidad, eficacia variable, altos costos, desarrollo de resistencia, protocolos de tratamiento prolongados y la mayoría son de administración parenteral lo cual causa molestias en los pacientes ocasionando que estos abandonen los tratamientos (Herwaldt, 1999; Croft et al., 2006; Minodier & Parola, 2007).

1.2.5.1. Otros tratamientos. A continuación se expondrán algunos medicamentos que han mostrado actividad contra diferentes especies de *Leishmania* en modelos *in vitro*, *in vivo* y en ensayos clínicos.

El imiquimod o [1-(2-metilropil)-1H-imidazol(4,5-c)quinolina-4-amina] demostró actuar sinérgicamente con el glucantime al ser probado en pacientes con LC del Perú y con la paramomicina *in vivo* en ratones BALB/c infectados con *L. major* (Arévalo et al., 2007; El-On et al., 2007). Se conoce que este medicamento actúa

como un inmunomodulador produciendo citoquinas y óxido nítrico (Buates & Matlashewski, 1999).

La sitamaquina es un derivado de la 8-aminoquinolina activa en modelos *in vitro* de LC y LV (Garnier *et al.*, 2006). Aunque presenta una leve toxicidad, ha sido efectiva en el tratamiento de pacientes con LV en Brasil, Kenia e India, con porcentajes de curación hasta del 90% dependiendo de la dosis administrada (Croft *et al.*, 2006). Poco se conoce acerca de su mecanismo de acción, sin embargo se sabe que se metaboliza formando disetil o derivados 4-CH₂OH a los que se les atribuye su actividad.

Los imidazoles como el ketoconazol e itraconazol, al igual que en el *T. cruzi*, han demostrado actividad *in vitro* diferentes especie de *Leishmania*. En ensayos clínicos han mostrado actividad contra infecciones con *L. mexicana* pero no contra *L. braziliensis*. Estos azoles tienen actividad inhibitoria sobre la biosíntesis del ergosterol en el parásito (Croft & Coombs, 2003).

La azitromicina, es un antibiótico que ha mostrado ser efectivo en el modelo *in vitro* contra *L. amazonensis*, *L. braziliensis* y *L. chagasi* y en el modelo *in vivo* en ratones BALB/c infectados con *L. major* (Oliveira *et al.*, 2008). Al ser probada en el modelo hámster no mostró actividad contra *L. amazonensis* sin embargo resultó ser activa contra *L. braziliensis* pero sin eliminar la totalidad de los parásitos en la lesión (Sinagra *et al.*, 2007). En ensayos clínicos, se ha presentado un 85% de cura parasitológica en pacientes infectados con *L. braziliensis* (Krolewiecki *et al.*, 2002). El modo de acción de la azitromicina en *Leishmania* se desconoce, sin embargo puede actuar directamente contra el parásito o indirectamente modulando la respuesta inmune del huésped (Sinagra *et al.*, 2007).

Alternativas terapéuticas como la crioterapia utilizando nitrógeno líquido, termoterapia localizada, laser con dióxido de carbono, fototerapia mediante el uso

de ftalocianinas, entre otras alternativas, están siendo incorporadas progresivamente en el tratamiento de la LC (Murray *et al.*, 2005; Oullette *et al.*, 2004; Croft *et al.*, 2005; Davies *et al.*, 2007; Minodier & Parola, 2007; Escobar *et al.*, 2006).

1.3. FASES DEL DESCUBRIMIENTO Y DESARROLLO DE NUEVOS MEDICAMENTOS

1.3.1. Generalidades

El proceso de investigación y desarrollo de nuevos medicamentos, es un procedimiento altamente regulado, costoso y dispendioso, que dura aproximadamente entre 10 a 15 años. Incluye varias etapas entre las cuales se encuentran la escogencia e identificación de moléculas activas, ensayos *in vitro*, *in vivo*, pruebas de toxicidad y ensayos en humanos, entre otros (Banerjee & Rosfsky, 1997; Tamimi & Ellis, 2009; DiMasi *et al.*, 2003). Estas fases se detallan en la tabla 3

Tabla 3. Fases del descubrimiento de medicamentos. (Morovac J, 2001; Tamimi NAM & Ellis P, 2009)

Fase o etapa	Sub fases	Descripción	Duración
Exploratoria		Identificación del objetivo terapéutico y tamizaje (screening) de varias moléculas, utilizando principalmente la química combinatoria y el diseño racional de moléculas, mediante el uso de sistemas robóticos y automatizados.	NR
Ensayos pre-clínicos		Estudios sobre la toxicidad y actividad <i>in vitro</i> , así como en modelos animales y estudios farmacocinéticos, entre otros.	3,5 años
Estudios clínicos	Fase I	Se trabaja con voluntarios sanos y se evalúa la seguridad, tolerabilidad y farmacocinética del compuesto, al igual que se decide la ruta de administración.	1-2 años
	Fase II	Los estudios se hacen con poblaciones homogéneas y restringidas de pacientes que padecen la enfermedad, se determina la dosis mínima efectiva, la dosis máxima tolerable y los efectos adversos.	2-5 años
	Fase III	Se trabaja con un grupo heterogéneo de pacientes que semejen la población real que utilizará el fármaco. Se evalúa nuevamente la efectividad y efectos adversos del compuesto.	2-4 años

Fase IV	Vigilancia continua de la seguridad del fármaco nuevo en la población general, evaluando posibles efectos adversos a largo plazo o factores de riesgo adicionales que aún no se conocían. También Se lleva a cabo el proceso de fármaco vigilancia para obtener la relación costo-beneficio del tratamiento.	NR
---------	--	----

Fuente: NR: No reportado.

1.3.2. Fase exploratoria y ensayos pre-clínicos

Dado que este trabajo se enfoca en la identificación y evaluación *in vitro* de compuestos químicos potencialmente activos contra el *T. cruzi*, *Leishmania* o tóxicos contra células de mamífero, a continuación se hará una breve descripción del desarrollo de estas dos fases en el presente estudio.

1.3.2.1. Fase exploratoria. Uno de los objetivos de ésta fase (ver tabla 3) es identificar compuestos potencialmente activos contra un objetivo terapéutico. Estos compuestos idealmente deberán ser sencillos de sintetizar, económicos y también ser fisicoquímicamente viables.

Para la identificación y caracterización fisicoquímica de los compuestos, se cuentan con programas quimioinformáticos libres en la internet como molinspiration[®] y OSIRIS[®] entre otros, que permiten la determinación de algunas propiedades fisicoquímicas, como una forma de predecir el potencial uso de estos compuestos como medicamentos.

Bajo este enfoque, las reglas de Lipinski o también llamadas la regla de los 5 ha sido introducida para determinar propiedades fisicoquímicas del compuesto que puedan llegar a tener un efecto sobre la absorción del mismo; teniendo en cuenta

propiedades como la solubilidad, permeabilidad, peso molecular entre otras. (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>; <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).

Estas reglas son fáciles de aplicar, rápidas y su uso no tiene ningún costo (Kerns & Di, 2008). Por tanto, un posible candidato a fármaco debería tener:

1. Menos de cinco (5) donadores de puentes de hidrógeno, expresado como la suma de todos los grupos OH y NH presentes en la molécula;
2. Menos de diez (10) aceptores de puentes de hidrógeno, expresado como la suma de todos los átomos de nitrógeno y oxígeno;
3. Peso molecular menor de quinientos (500);
4. Coeficiente de partición octanol/agua ($\text{Log}P$) menor de cinco (5);
5. Los sustratos para transportadores biológicos, son la excepción.

La respuesta de un compuesto a su blanco biológico o receptor puede estar determinada por varias interacciones tales como hidrofobicidad, fuerzas electrostáticas, puentes de hidrógeno y complejos de aceptores o donadores de electrones (Kerns & Di, 2008). De esta manera, los puentes de hidrógeno y el peso molecular se encuentran asociados con la solubilidad entonces entre más puentes de hidrógeno se formen en la molécula mayor podrá ser su solubilidad. Contrario a lo que ocurre con el peso molecular: a mayor peso molecular, menor podrá ser la solubilidad y absorción del compuesto (Kuhn *et al.*, 2010).

El $\text{Log}P$ es conocido como el coeficiente de partición de un compuesto entre una fase orgánica (octanol) y una fase acuosa (agua) a un pH neutro. Este parámetro se encuentra relacionado con la lipofilidad de un compuesto y su preferencia por un ambiente no polar (hidrofóbico) antes que uno acuoso por tanto, el transporte y distribución de sustancias en sistemas biológicos en gran medida depende de la

lipofilia del compuesto, la cual facilita su entrada a través de la bicapas lipídicas (Fernández *et al.*, 2005).

Los transportadores de membrana tienen la capacidad de aumentar o reducir la absorción de los compuestos, ya sea mediante captación por transporte activo o por salida, respectivamente.

Otro de los parámetros fisicoquímicos a tener en cuenta es el estudio del área de superficie polar (PSA), un importante indicador de la biodisponibilidad oral de una sustancia. Este parámetro fue propuesto por Veber y colaboradores en el 2002, quienes estudiaron propiedades estructurales que incrementaban la biodisponibilidad oral en ratas de cerca de 1100 compuestos candidatos a medicamentos de la farmacéutica GlaxoSmithKline. Ellos encontraron que compuestos con valores de PSA menores a 140Å podrían presentar una mayor biodisponibilidad oral en ratas, además sugirieron que valores reducidos de PSA podrían estar relacionados con una buena permeabilidad del compuesto (Veber *et al.*, 2002).

Estos parámetros fisicoquímicos, son de gran utilidad en los procesos de búsqueda de nuevos medicamentos. Así mismo, cuanto más se aleje un compuesto de estos parámetros, menor será la probabilidad de que pueda superar con éxito las etapas más avanzadas del desarrollo de fármacos (Kerns *et al.*, 2008).

1.3.2.2. Ensayos preclínicos. En los ensayos preclínicos los compuestos deben someterse a diferentes pruebas de evaluación de la actividad biológica, toxicidad, mecanismos de acción, farmacocinética y farmacodinamia principalmente. Para ello se emplean ensayos *in vitro* y/o modelos experimentales *in vivo*. La finalidad

es justificar que un compuesto en estudio pase a una siguiente fase (Croft *et al.*, 2006; Olaya *et al.*, 2006).

Los ensayos *in vitro* se basan en la evaluación de compuestos potencialmente activos contra células, ya sean cepas de microorganismos o líneas celulares de mamífero. Dado que este trabajo se basa en la evaluación antiparasitaria de compuestos sintéticos, la revisión estará dirigida a los ensayos de actividad *in vitro* contra las células objeto de este estudio.

Bajo estas circunstancias, métodos clásicos de conteo directo de células utilizando colorantes vitales como la eosina amarilla, azul de trypan, rojo neutro y cristal violeta, así como métodos colorimétricos utilizando sales de tetrazolio como el 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT), 2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-5[(fenilamino)carbonil]-2H-tetrazolio hidroxido (XTT) y 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) y el azul de alamar, son una ventaja ya que permiten determinar fácilmente la actividad biológica de los compuestos contra parásitos y células de mamífero (Mosman, 1983; Williams *et al.*, 2003; Crof & Yardley, 2006).

Los estudios de toxicidad *in vitro* como las pruebas de mutagenicidad (test de Ames) genotoxicidad (ensayo cometa), teratogenicidad, entre otros, son una herramienta útil que permiten determinar posibles efectos biológicos adversos del compuesto y podrían indicar su continuidad en el proceso de desarrollo de nuevos medicamentos. Sin embargo, estos estudios preclínicos de toxicidad adquieren un valor relativo en cuanto a la extrapolación de los datos, ya que resultados negativos, no estarían garantizando la ausencia de toxicidad en el humano (Olaya *et al.*, 2006; Cabrera *et al.*, 2009).

El uso de software quimioinformáticos predictores de toxicidad, son de gran ayuda para alertar y predecir teóricamente posibles riesgos de toxicidad de un compuesto. Algunos efectos como mutagenicidad, tumorigenicidad, efecto irritante, efecto reproductivo sobre la fertilidad, desarrollo de anomalías, efectos sobre el embrión, feto o recién nacido pueden ser calculados y podrían ofrecer una idea del posible comportamiento de un compuesto a nivel *in vitro* o *in vivo* relacionado con la toxicidad (<http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>).

1.4. COMPUESTOS HETEROCÍCLICOS UTILIZADOS EN MEDICINA

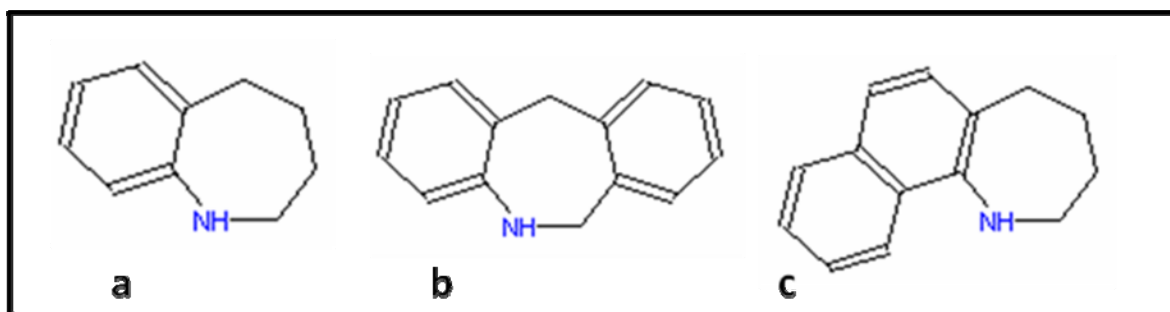
1.4.1. Generalidades

Los compuestos heterocíclicos están formados por un sistema de anillos en cuyas estructuras existe un átomo de oxígeno, nitrógeno, azufre diferente del carbono (Figura 7)

Estos compuestos son importantes en la química farmacéutica ya que han demostrado ser activos contra microorganismos (parásitos, virus, hongos y bacterias) y diferentes sistemas biológicos como el SNC y endocrino, entre otros. Como ejemplos de algunos compuestos heterocíclicos en medicina se tienen los imidazoles cuya unidad estructural ha servido de base para el diseño de varios fármacos antiprotozoarios (metronidazol), antihelmínticos (mebendazol), antifúngicos (clotrimazol, ketoconazol) y antitiroideos (carbimazol), entre otros (Croft & Coombs, 2003; Palma *et al*, 2009).

A continuación se presentará una revisión acerca de algunas actividades farmacológicas de compuestos relacionados estructuralmente a las tres series de derivados sintéticos objeto de este estudio: las 1- benzoazepinas, dibenzoazepinas y 1-naftoazepinas (figura 7).

Figura 7. Estructuras generales de los sistemas de la tetrahydro-1-benzoazepina(a), dihidrodibenzo[b,e]azepina(b) y tetrahidronafto[1,2-b]azepina(c).



Fuente: Autora del Proyecto

1.4.2. Derivados de las 1-benzoazepinas

El sistema heterocíclico nitrogenado de la 1-benzoazepina consiste en un anillo de benceno fusionado a un anillo azepínico (figura 7). Este sistema heterocíclico ha sido bastante estudiado porque muchos de sus derivados presentan una amplia gama de actividades farmacológicas las cuales serán descritas a continuación. En la tabla 4 se muestran los compuestos, sus estructuras y su actividad biológica.

1.4.2.1. Actividad sobre el sistema arginina vasopresina. La arginina vasopresina (AVP) es una hormona que regula funciones renales y cardiovasculares. En el riñón, está involucrada en la reabsorción de líquidos por medio del receptor V_2 y en la homeóstasis cardiovascular por el receptor V_{1a} . Varios autores, han reportado que compuestos relacionados estructuralmente a las benzoazepinas han mostrado ser inhibidores de estos receptores de la arginina vasopresina (AVP). Ejemplo de ello, es el compuesto OPC (7-Cloro-5-hidroxi-1-[2-metil-4-[(2-metilbenzoil)-amino] benzoil]- 2,3,4,5-tetrahidro-1H-1-benzazepina) con código 41061, el cual ha demostrado ser un potente antagonista del receptor V_2

de la AVP en modelos experimentales en ratas. Este hallazgo, sugiere el posible uso de este compuesto en casos de retención de líquidos y mala secreción de la AVP (Kondo *et al.*, 1999).

Por otra parte, estudios realizados en ratas mostraron que el compuesto (2Z)-2-(4,4-difluoro-1-{4-[(3S)-3-metilpirrolidin-1-il]-2-(trifluorometil)benzoil}-1,2,3,4-tetrahidro-5H-1-benzazepin-5-iliden)-N-(2-hidroxi-etil)acetamida tubo un efecto agonista sobre el receptor V_2 de la AVP (Tsukamoto *et al.*, 2009). Este mismo efecto fue reportado por otros autores cuando evaluaron la acción de los compuestos con código OPC-51803 y YM-35278 (Nakamura *et al.*, 2000; Tsukamoto *et al.*, 2008).

Adicionalmente, el compuesto YM-218 ha demostrado ser un antagonista selectivo del receptor V_{1a} de la AVP. Este receptor esta presente en el músculo liso, plaquetas y células mesangiales renales. Por tanto, este compuesto, podría ser considerado como un agente efectivo para tratar la hipertensión, enfermedades hepáticas y renales (Tahara *et al.*, 2006).

1.4.2.2. Actividad sobre el sistema nervioso. El receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) es encontrado en el sistema nervioso central, su sobreexpresión se ha asociado a desórdenes neurológicos agudos y crónicos como epilepsia y enfermedad de Alzheimer entre otras. Algunas benzoazepinas como el 8-cloro-3-hidroxi-1H-1-benzazepina-2,5-diona y ácido (E)-8-cloro-2-oxo-5-fenilcarbamoilmetilen-1,2,3,4-tetrahidro-1H-benzo[*b*]azepina 3-carboxílico, han demostrado actuar como antagonistas en los sitios de glicina del receptor NMDA. Estos compuestos podrían ser útiles en el tratamiento de desórdenes neurodegenerativos asociados con excitotoxicidad (Guzikowski A, *et al.*, 1996; Di Fabio *et al.*, 2003).

1.4.2.3. Actividad antiviral. El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), es una enfermedad crónica producida por la infección con el virus VIH-tipo1. La terapia antirretroviral ha permitido la disminución de la mortalidad, sin embargo, casos de resistencia y toxicidad se han documentado (Pomerantz, 1999; Deeks *et al.*, 1997). La entrada del virus a la célula se ha asociado con el co-receptor CCR5. Por tanto, compuestos antagonistas de este receptor, han demostrado ser excelentes inhibidores del virus. El primer antagonista no peptídico (**compuesto 1**, tabla 4) del co-receptor CCR5 fue descubierto en 1999. A pesar que mostró una pobre absorción oral, sirvió de base para el diseño y desarrollo de otros compuestos como las 1-propil-1-benzazepinas (**compuesto 2**, tabla 4) y 1-isobutil-1-benzazepinas (**compuesto 3**, tabla 4), estas con mejores propiedades farmacocinéticas. Posteriormente, el uso de sustituyentes polares como N-óxido de piridina (**compuesto 4**, tabla 4) y un componente sulfóxido (**compuesto 5**, tabla 4), permitieron encontrar nuevos antagonistas orales de este co-receptor CCR5 (Babba *et al.*, 1999; Shiraishi *et al.*, 2000; Seto *et al.*, 2004, 2005).

Por otra parte, un efecto antiviral contra el virus sincitial respiratorio (VSR) de compuestos relacionados con los derivados de la 1-benzoazepina también ha sido reportado.

El VSR es el agente infeccioso causante de la enfermedad respiratoria aguda, especialmente en niños. Las estrategias de prevención y tratamiento de esta infección son limitados. Sin embargo, el estudio y desarrollo de nuevos compuestos antivirales, han permitido el descubrimiento de nuevos agentes químicos relacionados con las benzoazepinas como el compuesto 6-{4-[(bifenil-2-ilcarbonil)amino]benzoil}-*N*-ciclopropil-5,6-dihidro-4*H*-tieno[3,2 *d*][1]benzazepina-2-carboxamida con código YM-53403, que mostró tener un efecto antiviral contra el VSR, inhibiendo su ciclo de vida cien veces más que la ribavirina, sin ser tóxico para las células HeLa (Sudo *et al.*, 2005).

1.4.2.4. Actividad tumoral. La actividad antiproliferativa de derivados benzoazepínicos en líneas tumorales ha sido reportada. Los compuestos (OC-6-43)-Cloro(dimetil sulfoxido)bis(6-(E)-[(R-picolil-N)-imino-N]-7,12-dihidroindolo[3,2-d][1]benzazepina)ruteniu- (II) Cloruro Sesquihidrato y (OC-6-43)-Bis(9-bromo-6-(E)-[(R-picolil-N)-imino-N]-7,12-dihidroindolo[3,2-d][1]benzazepina)cloro(dimetil sulfoxido)-rutheniu(II) Cloruro sesquihidrato, mostraron tener un efecto citotóxico contra células de cáncer de pulmón, colon y ovario. De igual manera, otro derivado benzoazepínico como el 1-Aril-4,6-dihidropirazolo [4,3-d][1]benzazepin-5(1H)-onas demostró tener el mismo efecto pero contra líneas tumorales de cáncer de pulmón, cáncer de mama y cáncer del SNC con un 32% de inhibición en el crecimiento versus el control (Kohfeld et al., 2007).

1.4.2.5. Actividad sobre el sistema endocrino. El sistema endocrino esta encargado de coordinar y regular diferentes procesos fisiológicos, entre ellos se encuentra la acción de la hormona de crecimiento involucrada en varios procesos metabólicos. El derivado L-692,429, una 1-benzoazepin-2-ona-3-amido sustituida, ha demostrado ser un estimulante de esta hormona en mamíferos. Además, estudios realizados en perros beagle con análogos de este compuesto (benzolactama L-739,943) mostraron una potenciación de la acción estimuladora de esta hormona (DeVita et al., 1998).

1.4.2.6. Actividad antiparasitaria. La actividad antiparasitaria de compuestos relacionados estructuralmente con las benzoazepinas ha sido reportada.

Zuccotto y colaboradores en el 2001 realizaron búsquedas computacionales de compuestos a partir de la base de datos cristalográficos de Cambridge (CDS). Un estudio DOCK 3.5 dirigido contra la enzima dihidrofolato reductasa del parásito *T. cruzi* fue realizado, demostrando que compuestos con código de CDS SUBSUD y FIVREH relacionados estructuralmente con las benzoazepinas, inhibieron el

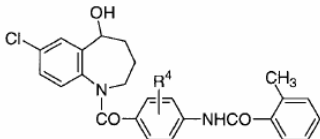
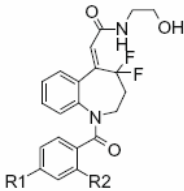
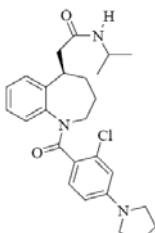
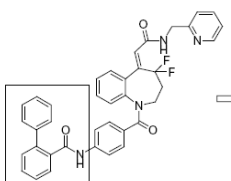
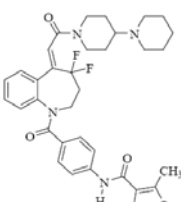
crecimiento de *T. cruzi* in vitro y la actividad de la enzima dihidrofolato reductasa sin presentar toxicidad en células de leucemia promielocítica humana (HL-60) (Zuccotto et al., 2001).

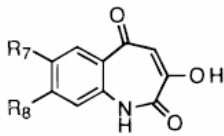
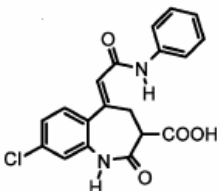
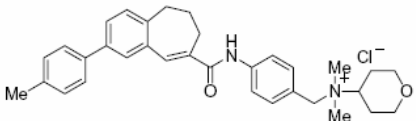
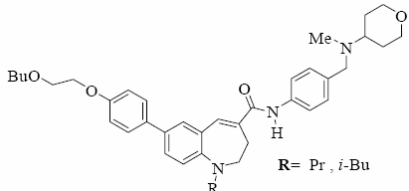
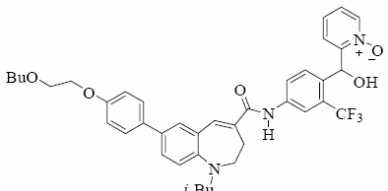
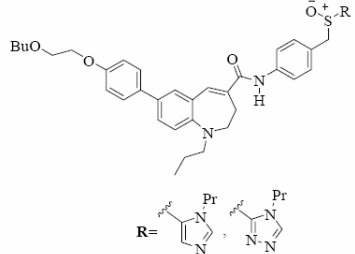


Por otra parte, otro tipo de compuestos heterocíclicos relacionados con las benzoazepinas, como las paulonas, han demostrado ser inhibidoras de quinasas dependientes de ciclinas en protozoos, las cuales están involucradas en la regulación del ciclo celular, dado que su síntesis y degradación ayudan a controlar la progresión o terminación del mismo (Kunick, et al., 2000).

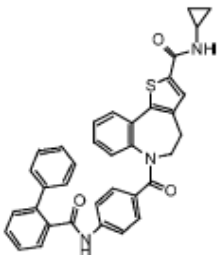
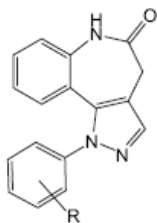
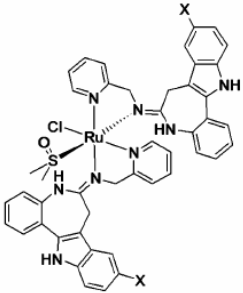
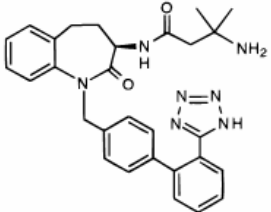
En *Leishmania* por ejemplo, derivados de las paulonas como el compuesto con código 98N217 demostró inhibir la quinasa 3 (CRK3) de *L. donovani* a una IC50 de 69 μM . Este mismo compuesto al ser probado en *L. mexicana*, fue capaz de inhibir macrófagos infectados con el parásito a una CI50 de $>3 \mu\text{M}$; al igual que el compuesto con código 97N610 (CI50 5,77 μM). Estos dos compuestos fueron tóxicos en macrófagos peritoneales murinos (Grant C, et al., 2004).

Otro trabajo realizado con nuevos derivados de las paulonas se demostró la actividad de estos compuestos contra amastigotes axénicos de *L. donovani*. Dos compuestos 6 y 7 (ver tabla 4) inhibieron el 91,2 y 100% del parásito, respectivamente a una concentración de 50 μM ; sin embargo, al ser probados contra amastigotes intracelulares no fueron activos (Reichwald C, et al., 2008).

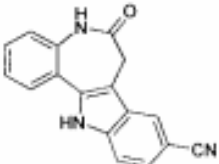
Tabla 4. Actividad farmacológica de derivados de 1-benzazepinas

Compuestos	Actividad biológica	Estructura química
OPC-41061	Antagonista del receptor V2 de AVP	$R_4 = 2CH_3$ 
(2Z)-2-(4,4-difluoro-1-{4-[(3S)-3-metilpirrolidin-1-il]-2-(trifluorometil)benzoi}-1,2,3,4-tetrahidro-5H-1-benzazepin-5-iliden)-N-(2-hidroxietil)acetamida	Agonista del receptor V2 de la angiotensina.	 $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = CF_3$
OPC-51803		
YM-35278		
YM-218	Antagonista del receptor V _{1a} de AVP	

<p>8-cloro-3-hidroxi-1<i>H</i>-1-benzazepina-2,5-diona</p>	<p>Antagonista del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA)</p>	 <p>R₇=H; R₈=Cl</p>
<p>ácido (E)-8-cloro-2-oxo-5-fenilcarbamoilmetilen-1,2,3,4-tetrahidro-1<i>H</i>-benzo[<i>b</i>]azepina-3-carboxílico</p>	<p>Antagonista del receptor N-metil-D-aspartato (NMDA)</p>	
<p>1</p>	<p>Antagonista del co-receptor CCR5 del VIH.</p>	
<p>2, 3</p>		 <p>R= Pr, <i>i</i>-Bu</p>
<p>4</p>		
<p>5</p>		 <p>R= , </p>

<p>YM-53403</p>	<p>Efecto antiviral contra el Virus Sincitial Respiratorio</p>	
<p>Estructura general de derivados 1-Aril-4,6- dihidropirazolo[4,3- d][1]benzoazepina-5(1H)- nona</p>	<p>Efecto antiproliferativo contra las líneas tumoraes de cáncer de pulmón, cáncer de mama y cáncer del SNC</p>	
<p>(OC-6-43)-Cloro(dimetil sulfoxido)bis(6-(E)-[(R-picolil- M)-imino-M]-7,12- dihidroindolo[3,2- d][1]benzazepina)ruteniu- (II) Cloruro Sesquihidrato</p>	<p>Actividad citotóxica de células de carcinoma de colon, ovario y pulmón.</p>	 <p>X=H X=Br</p>
<p>((OC-6-43)-Bis(9-bromo-6-(E)- [(R-picolil-M)-imino-M]-7,12- dihidroindolo[3,2- d][1]benzazepina)cloro(dimetil sulfoxido)-rutheniu(II) Cloruro Sesquihidrato</p>		
<p>derivado L-692,429</p>	<p>Estimulantes de la hormona de crecimiento</p>	

Derivado L-739,943		
Paulonas 2-sustituidas	Inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas	
98N217		
código CSD SUBSUD y FIVREH	Inhibidores de la dihidrofolato reductasa de <i>T. cruzi</i>	
Paulonas (6)	Inhibidores de <i>L. donovanni</i>	
Paulonas (7)		
97N610	Inhibidores de <i>L. mexicana</i>	

98N217		
--------	--	---

Fuente: Autora del Proyecto

1.4.3. Derivados dibenzoazepinas

Las dibenzoazepinas son un sistema de compuestos heterocíclicos constituidos por un anillo azepínico fusionado por diferentes caras con dos anillos de benceno (figura 7). Esta clase de compuestos presentan un amplio rango de actividades biológicas como actividad antitumoral, desfibrilante, anti-convulsiva, ansiolítica entre otras. La tabla 5 muestra algunas actividades farmacológicas de las dibenzoazepinas y sus estructuras.

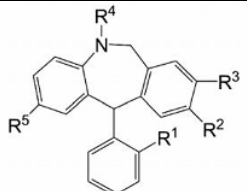
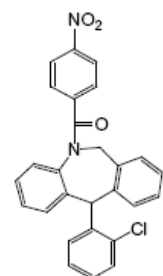
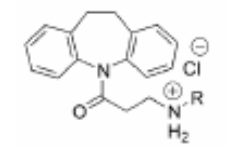
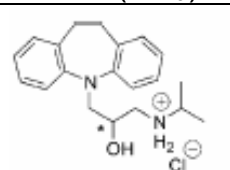
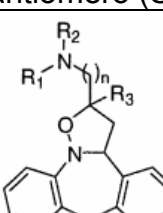
Una serie de derivados de la 11-fenil-dibenzo[b,e]azepina mostraron un efecto antiproliferativo sobre varias líneas tumorales, y uno de ellos, el compuesto 8 (ver tabla 5), además de tener efecto antitumoral contra las células pequeñas de cáncer de pulmón (NCI-60), indujo un arresto del ciclo celular de Go-G1 en células de carcinoma de colon humano, por lo que se le considera como un buen candidato en la terapia contra el cáncer (Al-Qawasmeh et al., 2009).

Dos derivados de la dibenzoazepina (compuestos 9 y 10, tabla 5) mostraron actividad desfibrilante sin inducir cambios en el electrocardiograma cuando fueron administrados en gatos, sugiriendo que podrían usarse para tratar la fibrilación ventricular (Levy et al., 2001).

Estudios in vivo en ratas, revelaron que derivados de 2-(aminoalquil)-2,3,3a,8-tetrahidrodibenzo[c,f]-isoxazolo[2,3-a]azepina actúan como antagonistas del

receptor 5-HT_{2C} del neurotransmisor serotonina, por lo que fueron considerados como potenciales agentes ansiolíticos y antidepresivos (Andrés et al., 2002).

Tabla 5 Actividad farmacológica de derivados dibenzoazepinas

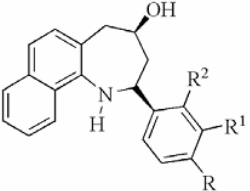
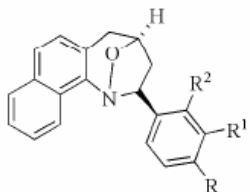
Compuesto	Actividad biológica	Estructura química
Estructura general de derivados 1-Fenil-[b,e]-dibenzazepina		
8	Efecto antitumoral	
9	Actividad antiaritmica y desfibrilante.	 R=CH(CH ₃) ₂
10		 Enantiómero (S)-(-)
Estructura general de derivados de 2-(aminoalkil)-2,3,3a,8-tetrahidrodibenzo[c,f]-isoxazolo[2,3-a]azepine	Antagonista del receptor 5-HT _{2C} de la serotonina.	

Fuente: Autora del Proyecto

1.4.4. Derivados de naftoazepinas

Estos compuestos presentan en su sistema heterocíclico un anillo de naftaleno fusionado a un anillo azepínico (figura 7). Poco se ha estudiado este tipo de compuestos, sin embargo, derivados de la tetrahidronafto[1,2-b]azepina fueron evaluados en nuestro laboratorio contra *T. cruzi*, encontrándose que tres de ellos inhibieron amastigotes intracelulares del parásito con rangos de IC50 9,9-18,4 μM sin que presentaran toxicidad en células Vero. Ninguno de los compuestos evaluados presentó actividad contra *L. chagasi* (Palma et al., 2008). La tabla 6 muestra las estructuras de los compuestos activos.

Tabla 6. Actividad farmacológica de derivados 1-naftoazepinas

Compuesto	Actividad biológica	Estructura química
Estructura general de derivados tetrahidronafto[1,2-b]azepina	Inhibidores de amastigotes intracelulares de <i>T. cruzi</i>	 <p>R=Br; R₁=H; R₂=H</p>
		 <p>R=Cl; R₁=H; R₂=H R=H; R₁=Br; R₂=H</p>

Fuente: Autora del proyecto

2. OBJETIVOS

Con el fin de determinar las características biológicas de los derivados tetrahydro-1-benzoazepina, dihidrodibenzo[*c,f*]tiazolo[3,2-*a*]azepin-3-ona y tetrahidronafto[1,2-*b*]azepina, se plantearon los siguientes objetivos:

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad antiparasitaria y citotóxica de derivados de tetrahydro-1-benzoazepina, dihidrodibenzo[*c,f*]tiazolo[3,2-*a*]azepin-3-ona y tetrahidronafto[1,2-*b*]azepina contra *T. cruzi*, *Leishmania spp* y células de mamífero.

2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la actividad antiparasitaria en las formas extracelulares e intracelulares de *Leishmania spp* y *T. cruzi* de derivados de tetrahydro-1-benzoazepina, dihidrodibenzo[*c,f*]tiazolo[3,2-*a*]azepin-3-ona y tetrahidronafto[1,2-*b*]azepina
- Determinar la toxicidad de derivados de tetrahydro-1-benzoazepina, dihidrodibenzo[*c,f*]tiazolo[3,2-*a*]azepin-3-ona y tetrahidronafto[1,2-*b*]azepina en las células hospederas de los parásitos (Vero y THP-1).
- Realizar un análisis de relación estructura-actividad (SAR).

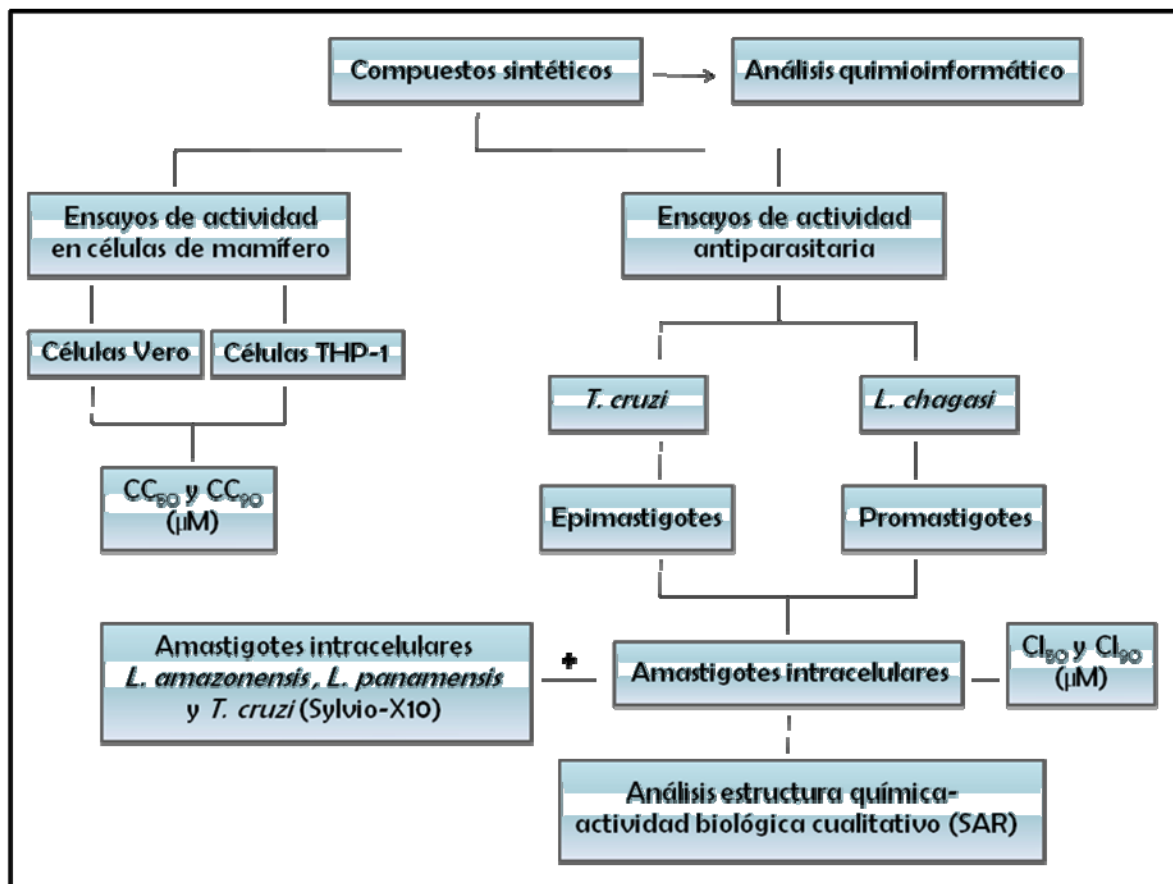
3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. DISEÑO METODOLÓGICO

Este estudio se llevó a cabo siguiendo la secuencia metodológica que se muestra en el diagrama de flujo de la figura 8. Se evaluaron 35 compuestos sintéticos a los cuales se les determinó inicialmente algunas propiedades fisicoquímicas, las cuales se describen en el numeral 3.3. Adicionalmente, se evaluó la toxicidad en células Vero y THP-1, así como la actividad antiparasitaria contra las formas libres e intracelulares de *T. cruzi* (cepa 320I01) y de *L. chagasi*. Aquellos compuestos que fueron activos, se evaluaron contra *T. cruzi* cepa Sylvio-X10, *L. panamensis* y *L. amazonensis*. Posteriormente, el índice de selectividad (IS) de los compuestos fue determinado.

Se realizó un análisis de la estructura química-bioactividad de los compuestos probados contra *T. cruzi* y *L. chagasi* con el fin de determinar algunas correlaciones entre las estructuras, átomos y la actividad antiparasitaria.

Figura 8. Diseño metodológico del estudio.



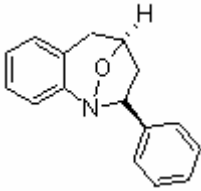
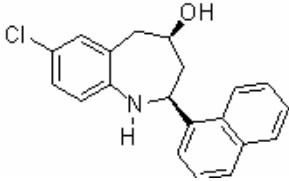
3.2. COMPUESTOS Y MEDICAMENTOS DE REFERENCIA

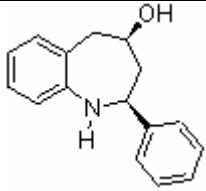
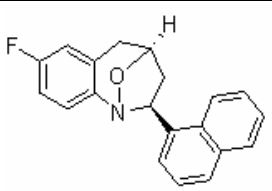
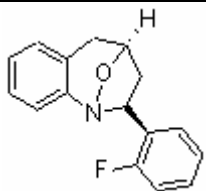
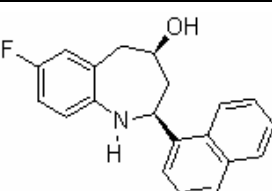
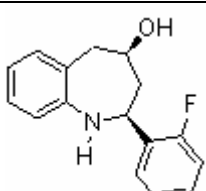
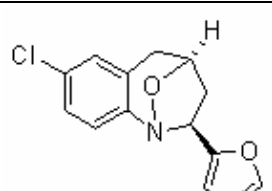
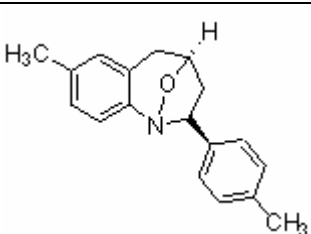
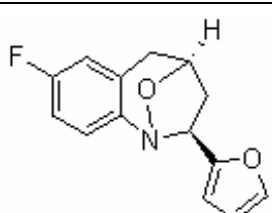
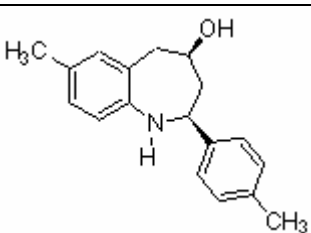
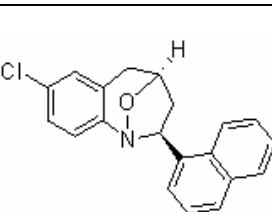
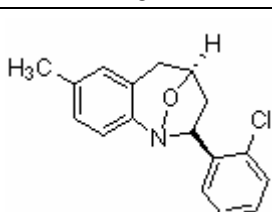
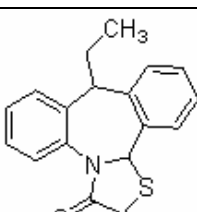
Los compuestos incluidos en este trabajo pertenecen a las series tetrahydro-1-benzoazepina, dihydrobenzo[*c,f*]thiazolo[3,2-*a*]azepin-3-one and tetrahydro-1,2-*b*]azepina. Estos compuestos fueron sintetizados en el Laboratorio de Síntesis Orgánica (LSO) de la Universidad Industrial de Santander bajo la dirección del Doctor Alirio Palma. Se emplearon rutas sintéticas especialmente diseñadas para tales propósitos (Palma *et al.*, 2009).

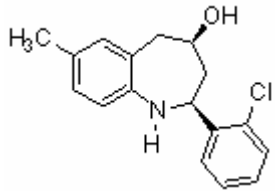
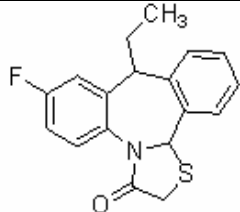
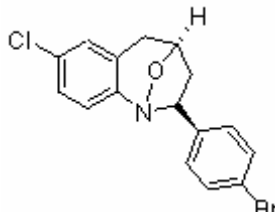
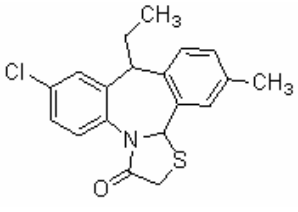
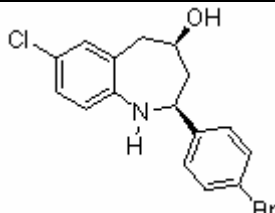
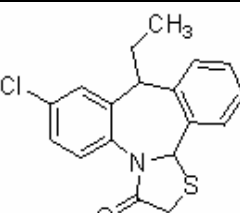
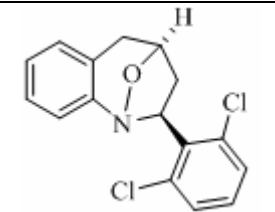
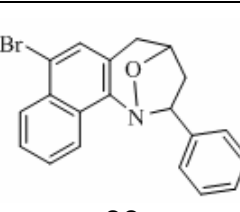
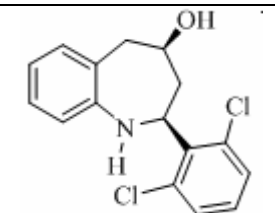
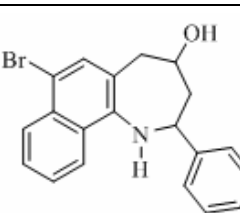
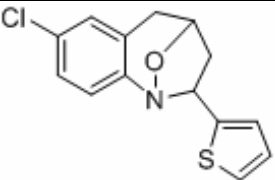
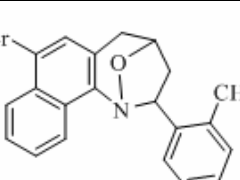
La serie de derivados de la tetrahidro-1-benzoazepina (1-25), clasificada en el grupo 1 de compuestos, fue dividida en cuatro subgrupos de acuerdo con el sustituyente que este presente en la posición C-2 del anillo de benzoazepina: así, el subgrupo 1.1 (1-12) tiene como sustituyente un fenilo, el subgrupo 1.2 (13-19) tiene como sustituyente un anillo de tiofeno, el subgrupo 1.3 (20-22, 25) tiene un anillo de naftaleno como sustituyente, y el subgrupo 1.4 (23 y 24) un anillo de furano. La anterior serie así como las series de dihidrodibenzo[*c*,*f*]tiazolo[3,2-*a*]azepin-3-onas (26-29, grupo 2), y tetrahidronafto[1,2-*b*]azepinas (30-35, grupo 3),

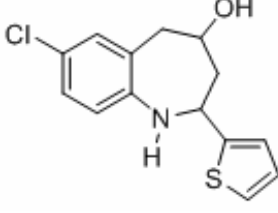
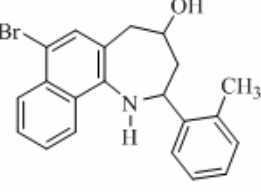
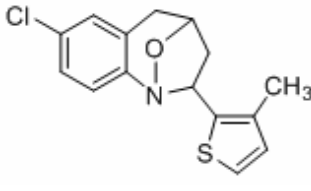
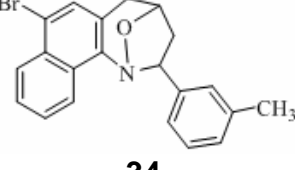
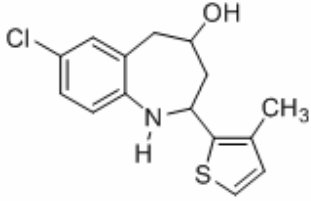
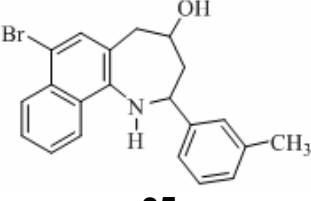
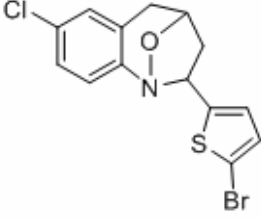
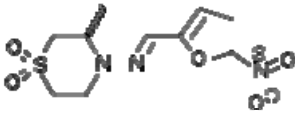
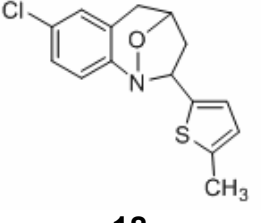
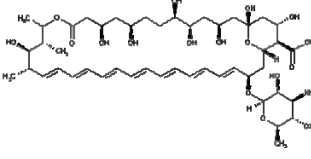
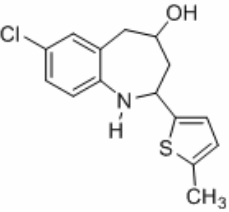
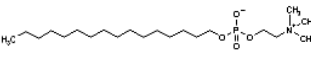
La anfotericina B (Sigma), la miltefosine (Sigma) y el nifurtimox (amablemente donado por el Profesor Simon Croft del London School of Hygiene & Tropical Medicine, London, UK) fueron utilizados como medicamentos de referencia. En la tabla 7 se muestran las estructuras químicas y los nombres de los diferentes compuestos y medicamentos de referencia.

Tabla 7. Estructuras y nombres de compuestos sintéticos y medicamentos de referencia

Nombre y número de compuesto	Estructura química	Nombre y número de compuesto	Estructura química
1,4-epoxi-exo-2-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>]azepina	 <p style="text-align: center;">1</p>	7-cloro-cis-2-(naftalen-1-il)-2,3,4,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>]azepin-4-ol	 <p style="text-align: center;">20</p>

<p>cis-2-fenil- 2,3,4,5- tetraidro-1<i>H</i>- benzo[<i>b</i>]azepin- 4-ol</p>	 <p>2</p>	<p>7-fluor-1,4-epoxi-exo-2- (naftalen-1-il)-2,3,4,5- tetraidro-1<i>H</i>- benzo[<i>b</i>]azepina</p>	 <p>21</p>
<p>1,4-epoxi-exo-2- (2-fluorofenil)- 2,3,4,5- tetraidro-1<i>H</i>- benzo[<i>b</i>]azepina</p>	 <p>3</p>	<p>7-fluor-cis-2-(naftalen-1-il)- 2,3,4,5-tetraidro-1<i>H</i>- benzo[<i>b</i>]azepin-4-ol</p>	 <p>22</p>
<p>cis-2-(2- fluorofenil)- 2,3,4,5- tetraidro-1<i>H</i>- benzo[<i>b</i>]azepin- 4-ol</p>	 <p>4</p>	<p>7-cloro-1,4-epoxi-exo-2- (furan-2-il)-2,3,4,5-tetraidro- 1<i>H</i>-benzo[<i>b</i>]azepina</p>	 <p>23</p>
<p>7-metil-1,4- epoxi-exo-2-(4- metilfenil)- 2,3,4,5- tetraidro-1<i>H</i>- benzo[<i>b</i>]azepina</p>	 <p>5</p>	<p>7-fluor-1,4-epoxi-exo-2- (furan-2-il)-2,3,4,5-tetraidro- 1<i>H</i>-benzo[<i>b</i>]azepina</p>	 <p>24</p>
<p>7-metil-cis-2-(4- metilfenil)- 2,3,4,5- tetraidro-1<i>H</i>- benzo[<i>b</i>]azepin- 4-ol</p>	 <p>6</p>	<p>7-cloro-1,4-epoxi-exo-2-(1- naftalen-1-il)-2,3,4,5- tetraidro-1<i>H</i>- benzo[<i>b</i>]azepina</p>	 <p>25</p>
<p>7-metil-1,4- epoxi-exo-2-(2- clorofenil)- 2,3,4,5- tetraidro-1<i>H</i>- benzo[<i>b</i>]azepina</p>	 <p>7</p>	<p>9-etil-9,13b- dihidrodibenzo[<i>c</i>,<i>f</i>]tiazolo[3,2- <i>a</i>]azepin-3(2<i>H</i>)-ona</p>	 <p>26</p>

7-metil-cis-2-(2-clorofenil)-2,3,4,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>]azepin-4-ol	 <p style="text-align: center;">8</p>	9-etil-7-fluor-9,13b-dihidrodibenzo[<i>c</i> , <i>f</i>]tiazolo[3,2- <i>a</i>]azepin-3(2 <i>H</i>)-ona	 <p style="text-align: center;">27</p>
7-cloro-1,4-epoxi- <i>exo</i> -2-(4-bromofenil)-2,3,4,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>]azepina	 <p style="text-align: center;">9</p>	7-cloro-9-etil-12-metil-9,13b-dihidrodibenzo[<i>c</i> , <i>f</i>]tiazolo[3,2- <i>a</i>]azepin-3(2 <i>H</i>)-ona	 <p style="text-align: center;">28</p>
7-cloro-cis-2-(4-bromofenil)-2,3,4,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>]azepin-4-ol	 <p style="text-align: center;">10</p>	7-cloro-9-etil-9,13b-dihidrodibenzo[<i>c</i> , <i>f</i>]tiazolo[3,2- <i>a</i>]azepin-3(2 <i>H</i>)-ona	 <p style="text-align: center;">29</p>
1,4-epoxi- <i>exo</i> -2-(2,6-diclorofenil)-2,3,4,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>]azepina	 <p style="text-align: center;">11</p>	7-bromo-1,4-epoxi- <i>exo</i> -2-fenil-2,3,4,5-tetrahidronafto[[1,2- <i>b</i>]azepina	 <p style="text-align: center;">30</p>
cis-2-(2,6-diclorofenil)-2,3,4,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>]azepin-4-ol	 <p style="text-align: center;">12</p>	7-bromo-cis-2-fenil-2,3,4,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -nafto[1,2- <i>b</i>]azepin-4-ol	 <p style="text-align: center;">31</p>
7-cloro-1,4-epoxi- <i>exo</i> -2-(tiofen-2-il)-2,3,4,5-tetrahidro-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>]azepina	 <p style="text-align: center;">13</p>	7-bromo-1,4-epoxi- <i>exo</i> -2-(2-metilfenil)-2,3,4,5-tetrahidronafto[[1,2- <i>b</i>]azepina	 <p style="text-align: center;">32</p>

7-cloro-cis-2-(tiofen-2-il)-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzo[b]azepin-4-ol	 14	7-bromo-cis-2-(2-metilfenil)-2,3,4,5-tetrahidro-1H-nafto[1,2-b]azepin-4-ol	 33
7-cloro-1,4-epoxi-exo-2-(3-metiltiofen-2-il)-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzo[b]azepina	 15	7-bromo-1,4-epoxi-exo-2-(3-metilfenil)-2,3,4,5-tetrahidronafto[[1,2-b]azepina	 34
7-cloro-cis-2-(3-metiltiofen-2-il)-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzo[b]azepin-4-ol	 16	7-bromo-cis-2-(3-metilfenil)-2,3,4,5-tetrahidro-1H-nafto[1,2-b]azepin-4-ol	 35
7-cloro-1,4-epoxi-exo-2-(5-bromotiofen-2-il)-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzo[b]azepina	 17	Nifurtimox	
7-cloro-1,4-epoxi-exo-2-(5-metiltiofen-2-il)-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzo[b]azepina	 18	AmB	
7-cloro-cis-2-(5-metiltiofen-2-il)-2,3,4,5-tetrahidro-1H-benzo[b]azepin-4-ol	 19	Miltefosine	

Fuente: Autora del Proyecto

3.3. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Las propiedades fisicoquímicas de cada compuesto fueron calculadas mediante análisis quimioinformático, empleando las páginas web <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo> y <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>. Con ayuda de estos programas se determinaron algunos parámetros fisicoquímicos como coeficiente de partición octanol:agua ($\text{Log}P$), área de superficie polar (TPSA), peso molecular, número de átomos donadores de puentes de hidrógeno (nOHNH) y número de átomos aceptores de puentes de hidrógeno (nON). También se predijeron algunos riesgos de toxicidad de los 35 compuestos como mutagenicidad, tumorigenicidad, efecto irritante y efectos reproductivos.

3.4. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES MADRE Y DE TRABAJO

Las soluciones madre de cada compuesto fueron preparadas disolviendo entre 3 y 10mg del compuesto en 200uL de dimetil sulfóxido (DMSO, Carlo Erba).

Se prepararon soluciones de trabajo con medio de cultivo pocos minutos antes de cada ensayo. Se realizaron diluciones seriadas 1:3 ó 1:10 según el experimento.

3.5. PARÁSITOS Y CÉLULAS

Los epimastigotes de *T. cruzi* (Cepa Tulahuen, Sylvio-X10 (ATCC), 320I01 (Luna *et al.*, 2009) fueron mantenidos en medio Liver infusion tryptosa (LIT) 10% de suero bovino fetal inactivado (SBFi, Gibco), 28°C. Los promastigotes de *L. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75), fueron mantenidos en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con hemina (Sigma), HEPES (Gibco) y 10% de SBFi y los de *L. panamensis* (MHOM/PA/71/LS94) y *L. amazonensis* (MHOM/BR/73/LV78) fueron mantenidos en medio Schneider con 10% de SBFi a 28°C. Las líneas celulares

Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano, ATCC) y THP-1 (monocitos humanos derivados de una leucemia monocítica aguda, ATCC) fueron cultivadas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SBFi respectivamente a 37°C 5% de CO₂ y 95% de humedad. Las células THP-1 fueron transformadas con forbol miristato acetato (PMA, por sus siglas en inglés) a su fenotipo adherente.

3.6. CURVA DE CRECIMIENTO

Los epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. chagasi* (5x10⁵ parásitos/mL) fueron mantenidos en tubos y contados microscópicamente en un hemocitómetro los días 2, 4, 7, 9, 11, 14, 18, 22 y 28 post inóculo para *T. cruzi* y 1, 2, 3, 4, 6 y 7 post inóculo para *L. chagasi*. Los resultados fueron expresados como número de parásitos/mL.

3.7. OBTENCIÓN DE TRIPOMASTIGOTES DERIVADOS DE CÉLULAS (TDC)

Las células Vero fueron infectadas con epimastigotes de las diferentes cepas de *T. cruzi* (Tulahuen, Sylvio-X10 o 320I01) por 48 horas a 37°C 5%CO₂ y 95% de humedad. Fueron lavadas con buffer fosfato salino (PBS, pH 7,2) y el medio fue reemplazado por medio de cultivo nuevo. Los TDC fueron recolectados del sobrenadante de los cultivos de 8-21 días después de la infección inicial.

3.8. INFECCIÓN CON AMASTIGOTES INTRACELULARES

Las células Vero y THP-1 diferenciadas con forbol miristato acetato (PMA, Sigma) fueron cultivadas e infectadas en un radio 1:10 (célula: parásito) con TDC de *T. cruzi* o promastigotes de cada especie de *Leishmania* durante 48 horas a 37°C 5% de CO₂ y 95% de humedad. Las laminillas fueron fijadas con metanol, coloreadas

con Giemsa y el porcentaje de infección fue determinado por microscopía luz en 300 células.

3.9. PRUEBA DE TOXICIDAD EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

Las células Vero y las THP-1 transformadas fueron tratadas con diluciones seriadas 1:3 por triplicado con cada uno de los compuestos sintéticos y la AmB y el nifurtimox durante 72 horas. Células controles fueron mantenidas sin tratamiento. La toxicidad celular fue determinada por el método colorimétrico utilizando la sal de tetrazolio (MTT) a 5mg MTT/mL de PBS durante 4 horas como lo describe Mosmann con algunas modificaciones (Mosmann, 1983). Los cristales de formazan fueron disueltos en DMSO. Las absorbancias se determinaron espectrofotométricamente en un lector de microplacas (Anthos 2020) a una densidad óptica de 580 nm. La intensidad del color fue directamente proporcional a la viabilidad celular. El porcentaje de toxicidad se calculó a través de la fórmula: toxicidad (%)= 100 x (OD grupo control-OD grupo tratado)/ OD grupo control.

3.10. PRUEBAS DE ACTIVIDAD CONTRA *T. cruzi*

3.10.1. Ensayos en epimastigotes

Los epimastigotes de *T. cruzi* (5×10^5 parásitos/mL) en fase exponencial, fueron tratados con los compuestos sintéticos y nifurtimox durante 72 horas a 28°C. Parásitos controles fueron mantenidos sin tratamiento. La inhibición del crecimiento de los parásitos fue determinada realizando recuento microscópico en un hemocitómetro a partir de parásitos diluidos con formalina al 1% y el colorante vital, eosina amarilla.

3.10.2. Ensayos en amastigotes intracelulares

Las células Vero infectadas con tripomastigotes derivados de células (TDC) de *T. cruzi* en un ratio de infección célula: parásito de 1:10 fueron tratadas con los compuestos sintéticos y el nifurtimox por 72 horas a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de humedad. Una segunda dosis de cada concentración del compuesto fue adicionada después de 72 horas. Células infectadas controles fueron mantenidas sin tratamiento. Las placas fueron fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa. Se contaron 300 células y se calculó el porcentaje de células infectadas. Se consideró célula infectada aquella que contenía amastigotes intracelulares.

3.11. PRUEBAS DE ACTIVIDAD CONTRA *Leishmania*

3.11.1. Ensayos en promastigotes

Los promastigotes de *L. chagasi* ($1,5 \times 10^6$ parásitos/mL) en fase exponencial de crecimiento fueron tratados con los compuestos sintéticos y AmB durante 72 horas a 28°C. Parásitos controles fueron mantenidos sin tratamiento. La actividad antiparasitaria fue determinada mediante un método colorimétrico de MTT y fenazina metosulfato (PMS, 0,22 mg/mL MTT, Sigma) el cual se dejó por 4 horas a 37°C 5% de CO₂ y 95% de atmósfera de humedad. La intensidad del color fue determinado en un lector de microplacas Anthos 2020 a una longitud de onda de 580 nm.

3.11.2. Ensayos en amastigotes intracelulares

Las células THP-1 diferenciadas fueron infectadas con promastigotes de *Leishmania* en un ratio de infección célula: parásito de 1:10 y fueron tratadas con los compuestos sintéticos y la AmB por 72 horas a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de

humedad. Una segunda dosis de cada concentración del compuesto fue adicionada después de 72 horas. Las células fueron fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa. Se contaron 300 células y se calculó el porcentaje de células infectadas. Se consideró célula infectada aquella que contenía más de un amastigote intracelularmente.

3.12. ANÁLISIS DE ESTRUCTURA-ACTIVIDAD (SAR)

El análisis estructura-actividad se realizó cualitativamente, correlacionando la estructura general de cada uno de los compuestos pertenecientes a las tres series (tetrahidro-1-benzazepina, dihidrodibenzo [c,f]tiazolo[3,2-a]azepin-3-ona y tetrahidronafto[1,2-b]azepina), sus diferentes sustituyentes versus la presencia o ausencia de actividad contra las formas extracelulares e intracelulares de *T. cruzi* y *L. chagasi*.

3.13. INTERPRETACIÓN Y ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Dado que no existe en la literatura valores de referencia para llevar a cabo una clasificación de la actividad biológica, en este trabajo, se tuvieron en cuenta criterios propios del laboratorio teniendo en cuenta las CI_{50} y CI_{90} y/o CC_{50} y CC_{90} de la siguiente manera:

- Activos y/o Tóxicos: CI_{50} (CC_{50}) < 50 μ M y CI_{90} (CC_{90}) < 100 μ M
- Parcialmente activos y/o parcialmente tóxicos: IC_{50} (CC_{50}) < 50 μ M y CI_{90} (CC_{90}) > 100 μ M
- No activos y/o no tóxicos: CI_{50} (CC_{50}) > 50 μ M y CI_{90} (CC_{90}) > 100 μ M.

Las actividades de los compuestos expresadas como CI_{50} , CI_{90} , CC_{50} y CC_{90} se determinaron por análisis de regresión sigmoïdal de la curva dosis respuesta a partir de los porcentajes de inhibición de cada concentración evaluada del compuesto utilizando el programa *XLfit4*TM (ID Business Solution, Guildford, UK) aplicado a datos en Microsoft Excel.

El índice de selectividad (IS) es expresado numéricamente y determina la relación entre la concentración del compuesto que produce un efecto tóxico y la concentración que produce un efecto terapéutico deseado, constituyéndose en una medida de seguridad del compuesto en estudio. Este parámetro fue calculado dividiendo la actividad citotóxica en células de mamífero sobre la actividad parasitaria (CC_{50}/CI_{50}). En este trabajo, los compuestos con valores de IS >2 fueron considerados selectivos.

El análisis para determinar las diferencias estadísticas entre la actividad de los compuestos y los medicamentos de referencia fue realizado utilizando el análisis de varianza de una vía (ANOVA, por sus siglas en inglés) y el post test de Bonferroni. También se realizó la Prueba t de Student para la comparación entre dos variables, usando el software GraphPad Prism versión 5.03. Valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

4. RESULTADOS

4.1. COMPUESTOS SINTÉTICOS

Se evaluaron 35 compuestos, los cuales fueron divididos en tres grupos tal como se describió en materiales y métodos. Estos fueron solubles en DMSO y en los medios de cultivo utilizados.

4.2. PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Se determinaron algunos parámetros físico-químicos de cada uno de los compuestos sintéticos, los cuales se reportan en la tabla 8.

Tabla 8. Parámetros físicoquímicos de los compuestos obtenidos mediante análisis quimioinformático

Grupo	Comp	LogP	TPSA	nOHNH	nON	PM	N violac	Toxicidad
Grupo 1	1	3,69	12,47	0	2	237,30	0	NR
	2	2,99	32,25	0	2	239,31	0	NR
	3	3,8	12,47	2	2	255,29	0	NR
	4	3,11	32,25	2	2	257,30	0	NR
	5	4,56	12,47	0	2	265,35	0	NR
	6	3,86	32,25	2	2	267,37	0	NR
	7	4,74	12,47	0	2	285,77	0	NR
	8	4,05	32,25	2	2	287,79	0	NR
	9	5,15	12,47	0	2	350,64	1	NR
	10	4,45	32,25	2	2	352,65	0	NR
	11	4,95	12,47	0	2	306,19	0	NR

	12	4,25	32,25	2	2	308,20	0	NR
	13	4,24	12,47	0	2	277,77	0	NR
	14	3,54	32,25	2	2	279,79	0	NR
	15	4,62	12,47	0	2	291,80	0	NR
	16	3,92	32,25	2	2	293,81	0	NR
	17	5,17	12,47	0	2	356,67	1	NR
	18	4,46	12,47	0	2	291,80	0	NR
	19	3,77	32,25	2	2	293,81	0	NR
	20	4,80	32,25	2	2	323,82	0	M
	21	4,99	12,47	0	2	305,35	0	M
	22	4,26	32,25	2	2	307,36	0	M
	23	3,60	25,61	0	3	261,70	0	NR
	24	3,08	25,61	0	3	245,25	0	NR
	25	5,50	12,47	0	2	321,80	1	M
	26	3,90	20,30	0	2	295,40	0	NR
Grupo	27	4,04	20,30	0	2	313,39	0	NR
2	28	4,55	20,30	0	2	343,87	0	NR
	29	4,55	20,30	0	2	329,85	0	NR
	30	5,58	12,47	0	2	366,25	1	NR
	31	4,89	32,25	2	2	368,27	0	NR
Grupo	32	5,98	12,47	0	2	380,28	1	NR
3	33	5,29	32,25	2	2	382,30	1	NR
	34	6,01	12,47	0	2	380,28	1	NR
	35	5,31	32,25	2	2	382,30	1	NR

Comp: compuesto Log*P*: coeficiente de partición octanol/agua. PSA: superficie polar molecular. nOHNH: donadores de puentes de hidrógeno. Non: aceptores de puentes de hidrógeno. PM: peso molecular. Nviolac: número de violaciones a la regla de Lipinski. NR: no riesgo de toxicidad. m: mutagenicidad leve

Fuente: Autora del Proyecto

El análisis quimioinformático indicó que la mayoría de las moléculas cumplen con la regla de Lipinski, a excepción de los compuestos 9, 17, 25, 30, 32-35 que por su alto valor de $\text{Log}P$ no cumplen con una de las reglas.

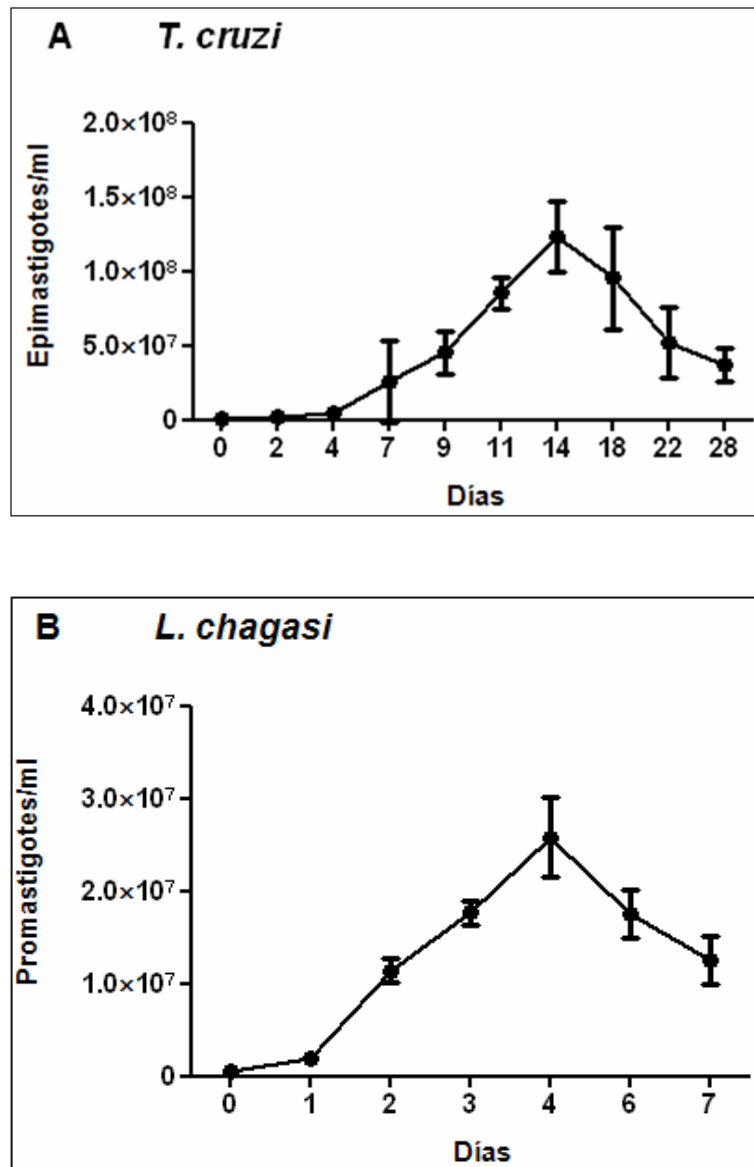
Adicionalmente, teniendo en cuenta los datos obtenidos de la página web <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>, los compuestos 20, 21, 22 y 25 del subgrupo 1.3 mostraron una leve mutagenicidad, mientras que los otros compuestos no resultaron ser ni mutagénicos ni tumorigénicos, ni tienen efectos irritantes ni reproductivos.

4.3. MODELOS EXPERIMENTALES EN PARÁSITOS

4.3.1. Características de crecimiento de las formas extracelulares

Los epimastigotes de *T. cruzi* y promastigotes de *L. chagasi*, alcanzaron un crecimiento máximo de 137.233.325 y 25.800.000 parásitos/mL en los días 14 y 4, respectivamente. La fase de crecimiento logarítmico de los epimastigotes fue más prolongada que la de los promastigotes, mientras al sexto día el crecimiento de los promastigotes descendía, los epimastigotes continuaban en crecimiento exponencial. Ver figura 9.

Figura 9. Curva de crecimiento de las formas extracelulares de los parásitos. A: epimastigotes de *T. cruzi*. B: promastigotes de *L. chagasi*. Los resultados corresponden al promedio de dos experimentos (n=2).



Fuente: Autora del Proyecto

4.3.2. Características de los parásitos en las formas intracelulares

En la tabla 9 se presentan los resultados de infectividad y promedio de producción de TDC de las cepas de *T. cruzi* 320I01, Sylvio-X10 y Tulahuen infectando células Vero. Se observó una diferencia entre el tiempo en producirse los TDC con las cepas de *T. cruzi*. Mientras la cepa 320I01 produjo TDC en 14 días, la cepa Sylvio-X10 los produjo en 6 días post infección. Sin embargo, el promedio de TDC fue muy similar entre las dos cepas, al igual que los porcentajes de infección determinados en 300 células.

Tabla 9. Caracterización de la infectividad de cepas de *T. cruzi*

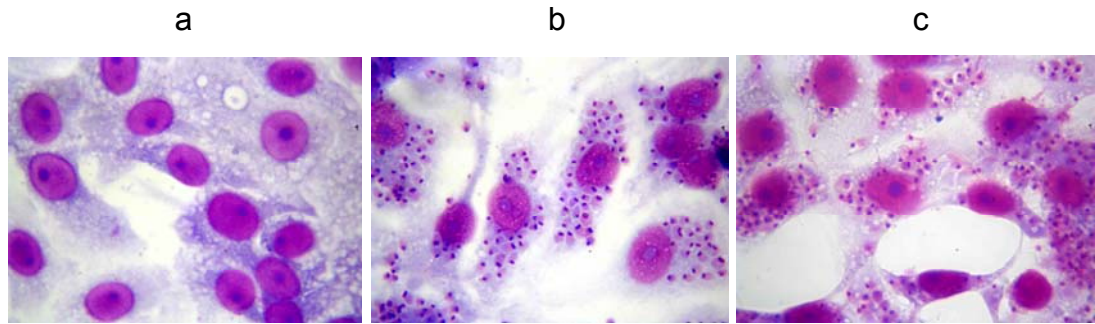
Parásito	Cepa	Tiempo (días)	TDC/ml	%de células infectadas
<i>T. cruzi</i>	320I01	14	3.192.423	>80
	Sylvio-X10	6	3.272.769	>80
	Tulahuen	30	NP	NP

TT: tiempo en obtener trypomastigotes derivados de células (TDC). NP: No se producen TDC en las condiciones de cultivo utilizadas en el laboratorio

Fuente: Autora del Proyecto

No se obtuvieron TDC al infectar células Vero con la cepa de referencia Tulahuen. La figura 10 muestra la infección de células Vero con amastigotes intracelulares donde se observó que la mayoría de las células se encontraban infectadas con más de 5 amastigotes intracelulares en las dos cepas de *T. cruzi*.

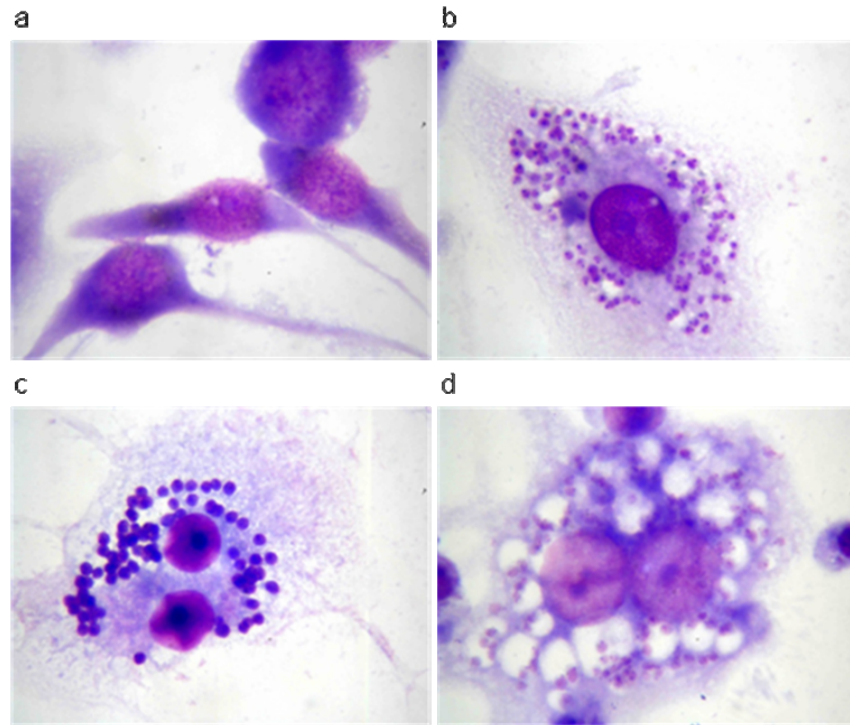
Figura 10. Infección de células Vero con amastigotes intracelulares de *T. cruzi*. a: células Vero no infectadas. b: cepa 320I01, c: cepa Sylvio-X10



Fuente: Autora del Proyecto

En el modelo en amastigotes intracelulares de *Leishmania*, se determinó que el porcentaje de infección de las cepas de *L. chagasi*, *L. panamensis* y *L. amazonensis*, fue en todas mayor al 50% utilizando promastigotes en fase estacionaria de crecimiento. En la figura 11 se observa la infección de células THP-1 diferenciadas con amastigotes intracelulares de las diferentes especies de *Leishmania*. Las células infectadas con *L. amazonensis* presentaron vacuolas en su citoplasma. La mayoría de las células se encontraron infectadas con más de 5 amastigotes intracelulares.

Figura 11. Células THP-1 diferenciadas e infectadas con amastigotes intracelulares de *Leishmania* spp. a: células THP-1 sin infectar. b: *L. chagasi*. c: *L. panamensis*. d: *L. amazonensis*.



Fuente: Autora del Proyecto

4.4. LOS COMPUESTOS EVALUADOS PRESENTARON UNA BAJA O NULA TOXICIDAD PARA LAS CÉLULAS VERO Y THP-1

En la tabla 10 se muestran los resultados de los compuestos tóxicos y parcialmente tóxicos en ambas líneas celulares los cuales corresponden al 14,28% de los compuestos ensayados. Los resultados fueron expresados en μM y corresponden a un experimento representativo de dos realizados (n=6).

Tabla 10. Compuestos tóxicos y parcialmente tóxicos en células Vero y THP-1 diferenciadas

Grupo de compuestos	No. compuesto	Citotoxicidad (μM)			
		Células Vero		Células THP-1	
		CC ₅₀ DS	CC ₉₀ DS	CC ₅₀ DS	CC ₉₀ DS
Grupo 1	20	20,42 \pm 1,03	>300	NT	NT
	28	NT	NT	41,62 \pm 1,48	>300
Grupo 2	29	NT	NT	42,9 \pm 4,52	>300
	31	25,31 \pm 3,79	>300	23,93 \pm 5,82	>300
Grupo 3	35	47,17 \pm 3,04	77,27 \pm 0,64	NT	NT
	Medicamentos de referencia	Nifurtimox	62,82 \pm 1,84	250,47 \pm 11,05	NC
AmB		NC	NC	7,84 \pm 0,53	16,00

AmB: anfotericina B; CC₅₀ y CC₉₀: concentración citotóxica 50 y 90; DS: desviación estándar; NT: No tóxico según los criterios de clasificación de este trabajo; NC: No fue calculado en este estudio.

Fuente: Autora del Proyecto

En células Vero, el compuesto 20 del grupo 1, mostró ser parcialmente tóxico, al igual que el compuesto 31 del grupo 3, mostrando que se necesitan bajas concentraciones para destruir el 50% de las células pero una gran cantidad de compuesto para destruir el 90% de las mismas; de éste último grupo, el compuesto 35 fue tóxico en esta línea celular de mamífero. Ninguno de los compuestos del grupo 2 mostró ser tóxico en células Vero.

En células THP-1 diferenciadas, el compuesto 28 del grupo 2 y el 31 del grupo 3, presentaron una leve toxicidad y fueron considerados parcialmente tóxicos. Los compuestos del grupo 1 no mostraron toxicidad en esta línea celular.

El compuesto 31 fue parcialmente tóxico en las dos líneas celulares, mostrando una toxicidad similar en ambos tipos de células ($p=0,51$).

Los demás compuestos que no se muestran en la tabla 10, no fueron tóxicos en las células de mamífero evaluadas en este estudio, presentando CI_{50} entre 50,23->300 μM y CI_{90} 171,82->300 μM en células Vero y CI_{50} entre 66,75->300 μM y CI_{90} 108,63->300 μM en células THP-1 diferenciadas.

Algunos de los compuestos no se les determinó las CI_{50} y/o CI_{90} a la máxima concentración evaluada de 300 μM . No se pudieron probar a mayores concentraciones dado que algunos presentaron problemas de solubilidad en el medio de cultivo.

4.5. EL 48,57% DE LOS COMPUESTOS FUERON ACTIVOS CONTRA EPIMASTIGOTES DE *T. cruzi*

Los resultados de actividad se observan en la figura 12.

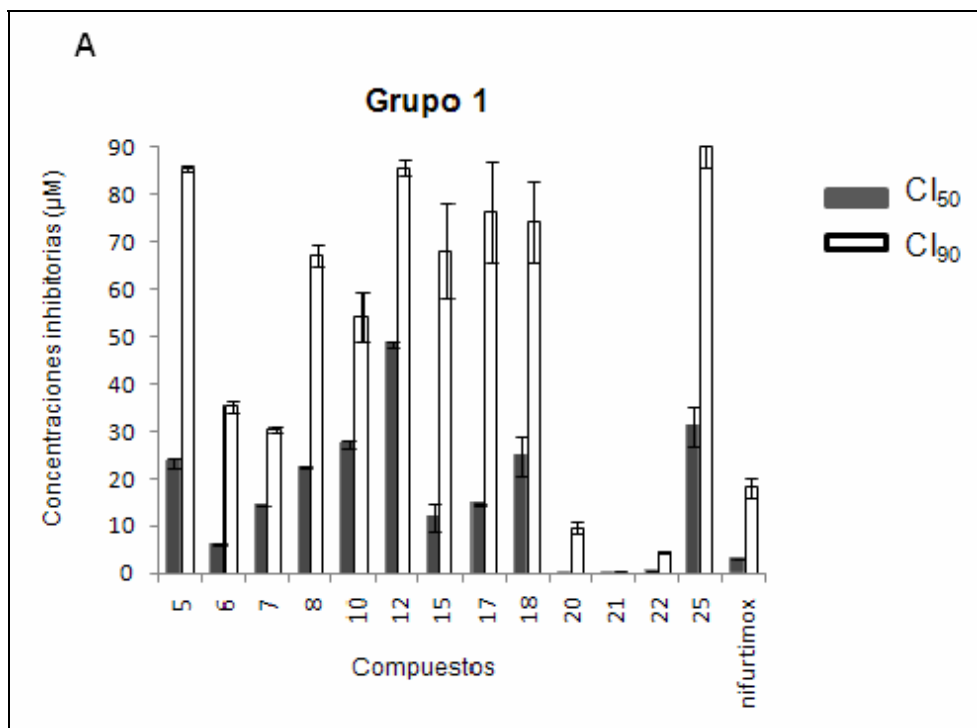
Trece compuestos (5-8, 10, 12, 15, 17, 18, 20, 21, 22 y 25) del grupo 1 fueron activos contra epimastigotes con CI_{50} entre 0,02-48,44 μM y CI_{90} entre 0,17-90,10 μM . Los compuestos 2, 9, 13, 16, 23 y 24 fueron parcialmente activos con CI_{50} entre 25,36-47,85 μM y CI_{90} >100 μM . Ninguno de los compuestos fue tóxico para la células Vero. El compuesto 20 fue parcialmente tóxico sin embargo mostró un IS (diferencia entre la actividad en células Vero y la actividad en parásitos) de 81,68. Los IS de los demás compuestos fueron >2 (datos no mostrados) Los

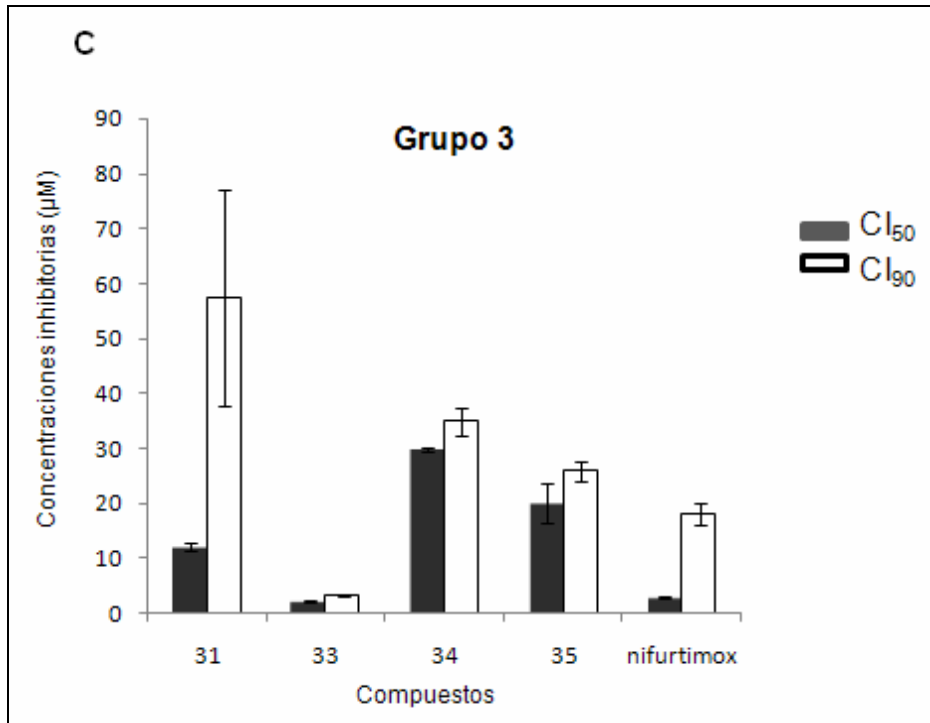
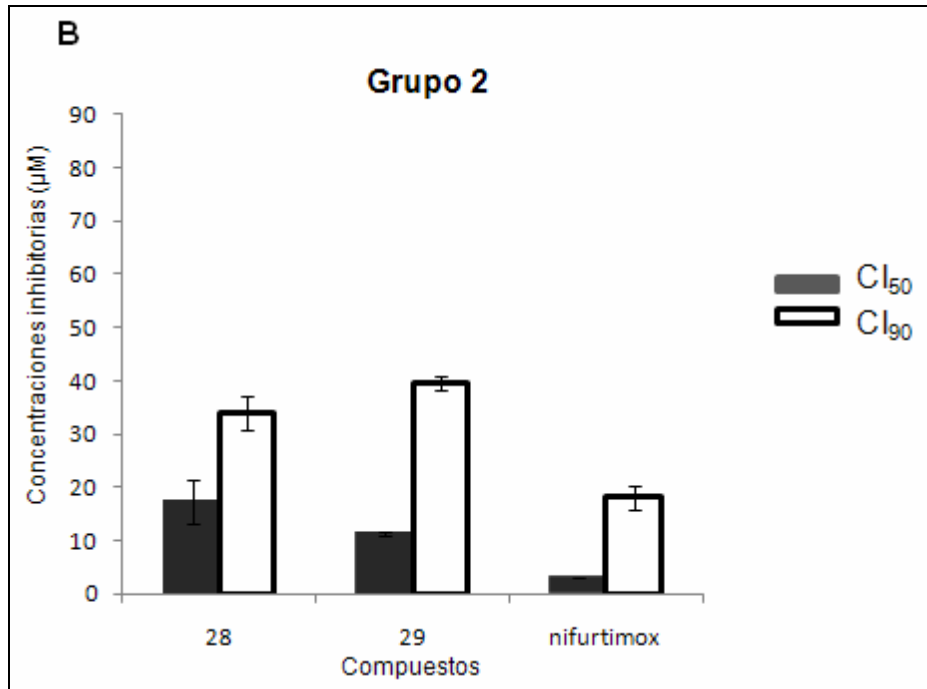
compuestos 20, 21 y 22 fueron más activos que el medicamento de referencia, nifurtimox ($p < 0,05$).

Los compuestos 28 y 29 fueron los compuestos activos del grupo 2 con CI_{50} 17,24 y 11,28 μM y CI_{90} 34,03 y 39,55 μM , respectivamente. Los compuestos 26 y 27 fueron parcialmente activos. Ninguno fue tóxico en células Vero y presentaron IS entre 2,93-15,23.

Los compuestos 31, 33, 34 y 35 del grupo 3 presentaron actividad contra los epimastigotes con CI_{50} entre 2,31-29,86 μM y CI_{90} 3,18-57,39 μM . El compuesto 35 fue tóxico para las células Vero, los demás compuestos fueron parcialmente tóxicos, pero presentaron IS entre 2,08-22,82.

Figura 12. Actividad contra epimastigotes de *T. cruzi*. Se muestran los valores de CI_{50} : barra gris y CI_{90} : barra blanca para cada grupo (A. B. C) de compuestos. Los resultados fueron expresados en $\mu\text{M} \pm \text{DE}$ y corresponden a un experimento representativo de dos realizados ($n=6$).





Fuente: Autora del Proyecto

4.6. ALGUNOS COMPUESTOS FUERON ACTIVOS CONTRA AMASTIGOTES INTRACELULARES DE *T. cruzi*

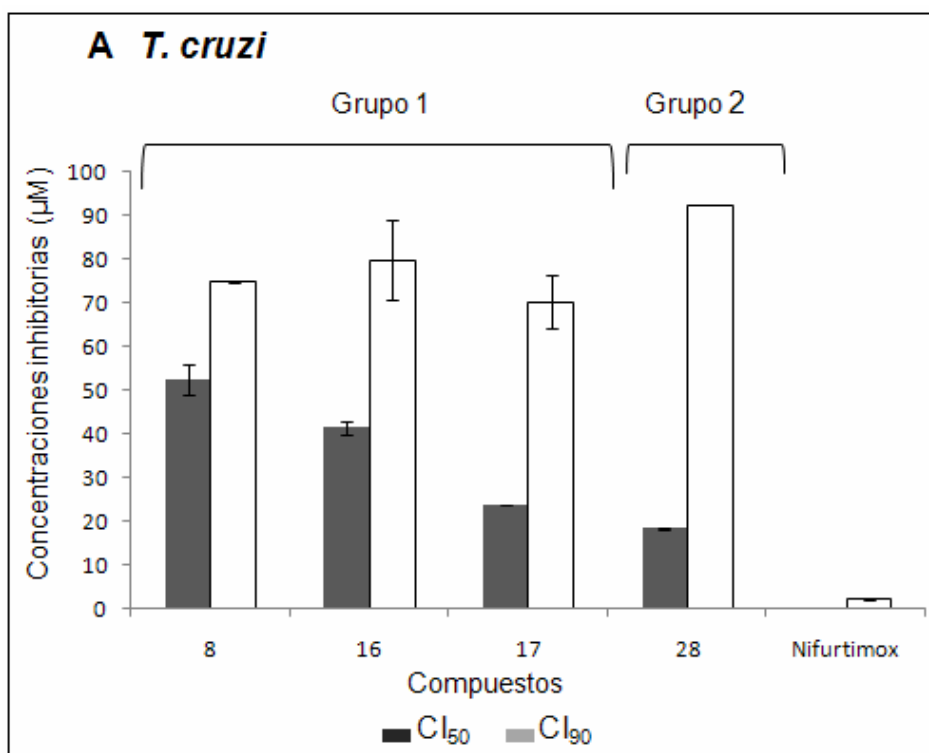
El 11,42% (4 compuestos) fueron activos contra los amastigotes intracelulares de *T. cruzi* infectando células Vero. Los resultados se muestran en la figura 13.

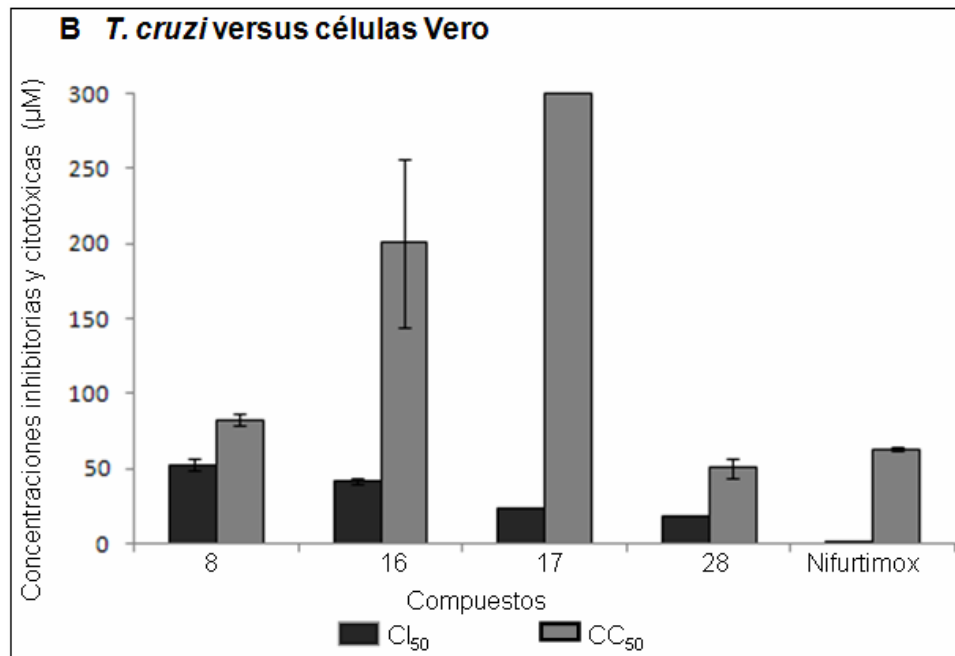
Del grupo 1, los compuestos 8, 16 y 17 fueron activos (CI_{50} 23,87-52,45 μ M y CI_{90} 70,27-79,79 μ M) contra *T. cruzi*, cepa 320I01 (Figura 13a). Ninguno fue activo contra amastigotes de *T. cruzi* cepa Sylvio-X10. Los compuestos 5, 9 y 12 fueron parcialmente activos (CI_{50} entre 40,16-48,61 μ M y CI_{90} >100 μ M). Ninguno de los compuestos fue tóxico para las células Vero, sin embargo el IS del compuesto 8 fue de 1,57 demostrando actividad contra el parásito y la célula hospedera. Los demás compuestos activos presentaron IS >2. En la Figura 13b se muestran las diferencias entre las actividades en parásitos y en célula Vero.

El compuesto 28 del grupo 2 fue activo contra amastigotes de la cepa 320I01 (CI_{50} 18,42 μ M y CI_{90} 92,5 μ M) y parcialmente activo para la cepa Sylvio-X10 (CI_{50} 55,52 μ M y CI_{90} >100 μ M). Los compuestos 26 y 27 fueron parcialmente activos (CI_{50} de 23,62 y 22,86 μ M y CI_{90} >100 μ M). Ninguno presentó toxicidad en células Vero y presentaron IS >2

Ninguno de los compuestos del grupo 3 fue activo.

Figura 13. Actividad contra amastigotes intracelulares de *T. cruzi* y toxicidad en células Vero. A: Actividad (CI₅₀ y CI₉₀) en μM contra amastigotes de *T. cruzi*. Los valores corresponden al resultado de un experimento representativo. B: Actividad en amastigotes intracelulares de *T. cruzi* (CI₅₀) y toxicidad en células Vero (CC₅₀).





Fuente: Autora del Proyecto

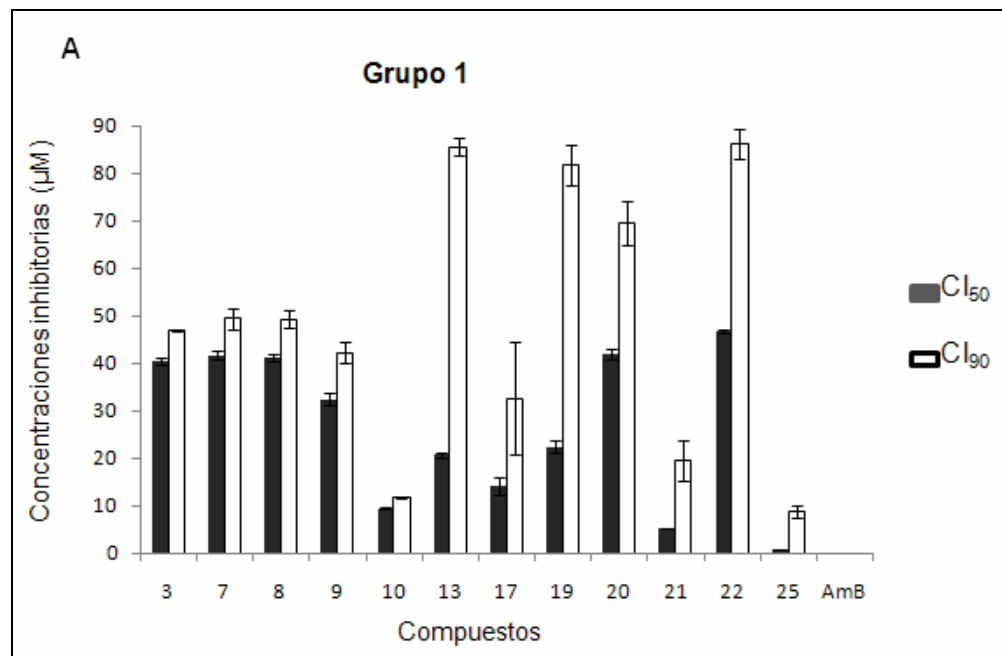
4.7. EL 42,85% DE LOS COMPUESTOS FUERON ACTIVOS CONTRA PROMASTIGOTES DE *L. chagasi*

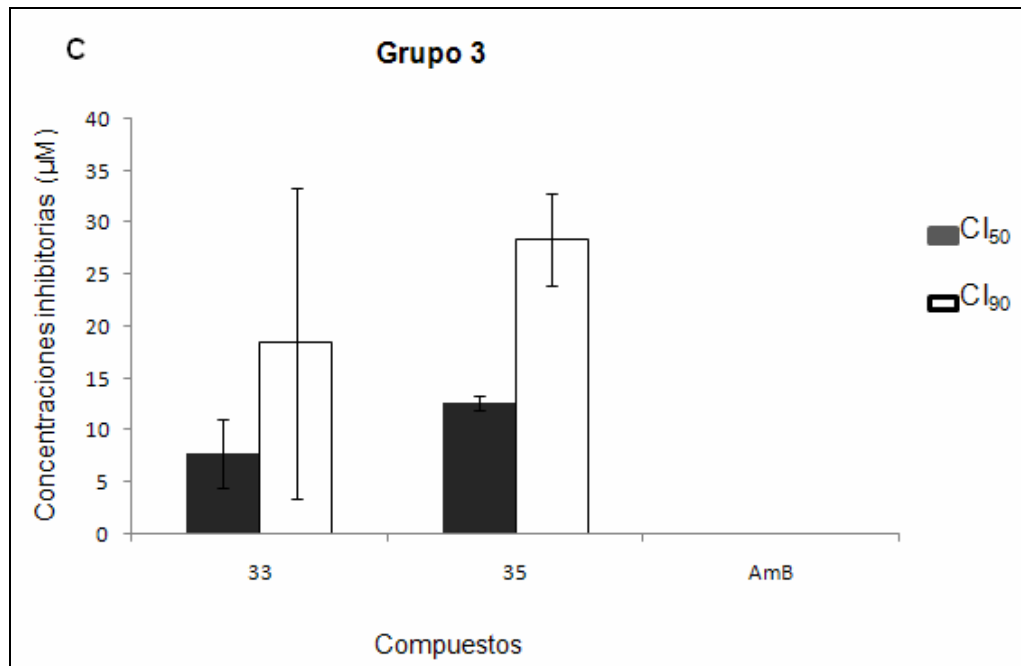
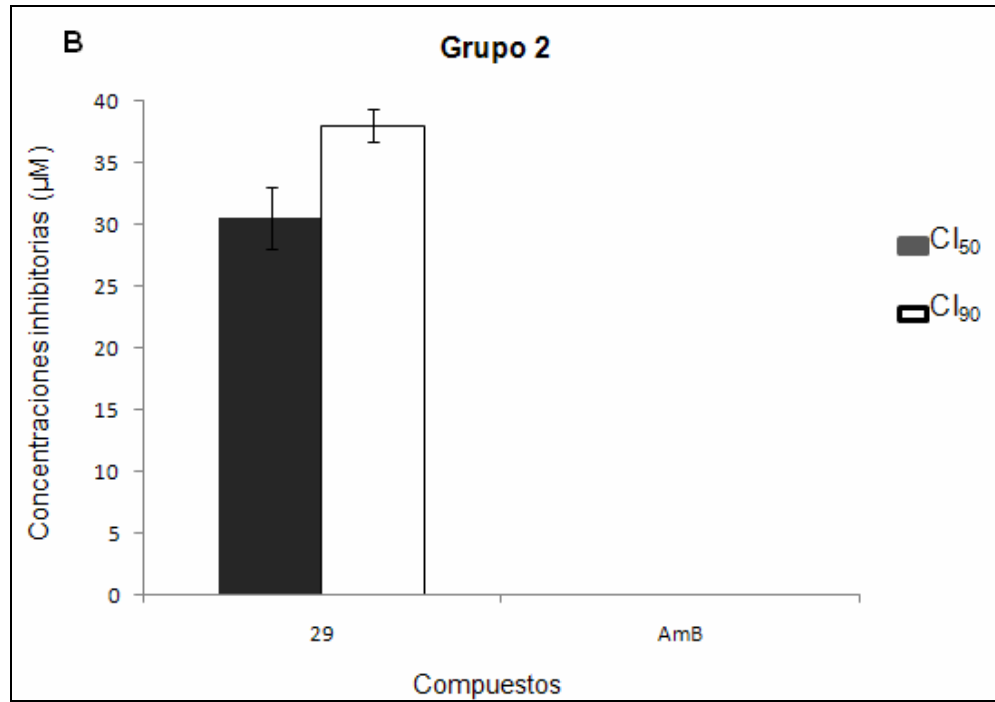
Quince (15) compuestos resultaron activos contra promastigotes de *L. chagasi* (figura 14).

Los compuestos 3, 7-10, 13, 17, 19-22 y 25 del grupo 1 fueron activos (Cl₅₀ entre 0,92-46,67 µM y Cl₉₀ 8,76-86,15 µM) siendo el compuesto 25 el de mayor actividad con Cl₅₀ de 0,92 µM y Cl₉₀ de 8,76 µM ($p < 0,05$). Los compuestos 14, 15, 18 y 23 fueron parcialmente activos (Cl₅₀ 28,78-49,52 µM y Cl₉₀ >100 µM). Ninguno de los compuestos activos fue tóxico en células THP-1 diferenciadas. Los IS fueron entre 4,93->326,08 exceptuando el compuesto 7 que mostró un IS bajo de 1,59

El compuesto 29 del grupo 2 fue activo (CI_{50} de 30,54 μM y CI_{90} de 38,03 μM) y los compuestos 26 y 27 fueron parcialmente activos (CI_{50} de 39,51 y 47,73 μM y $CI_{90} > 100$) para los promastigotes. Los compuestos 28 y 29 fueron parcialmente tóxicos para las células THP-1, El IS para el compuestos 29 fue menor de 2 (IS 1,40).

Figura 14. Actividad en promastigotes de *L. chagasi*. Se muestran los valores de CI_{50} : barra gris y CI_{90} : barra blanca para cada grupo (A. B. C) de compuestos. Los resultados fueron expresados en $\mu\text{M} \pm \text{DE}$ y corresponden a un experimento representativo de dos realizados (n=6).





Fuente: Autora del Proyecto

Los compuestos 33 y 35 fueron activos (CI_{50} de 7,77 y 12,74 μM y CI_{90} de 18,38 y 28,37 μM respectivamente) contra promastigotes. El primero fue parcialmente tóxico en células THP-1 diferenciadas y el compuesto 35 mostró ser tóxico. Todos los compuestos de este grupo presentaron un IS menor que 2.

Del total de compuestos activos, los compuestos 10, 17, 19, 21, 25, 33 y 35 mostraron ser los más activos contra promastigotes de *L. chagasi* ($p < 0,0001$).

4.8. ALGUNOS COMPUESTOS FUERON ACTIVOS CONTRA AMASTIGOTES INTRACELULARES DE *L. amazonensis* Y *L. panamensis*

Ocho compuestos (8, 10, 16, 17, 28, 21, 25 y 33), fueron evaluados contra *L. amazonensis* y *L. panamensis*.

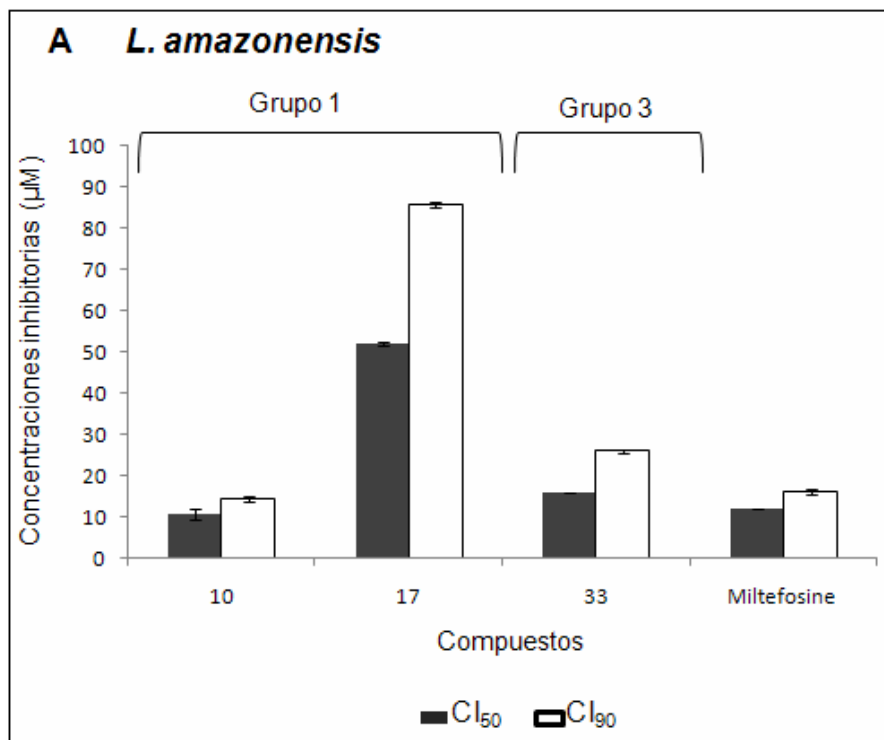
Los compuestos 10, 17 y 33 fueron activos contra la forma intracelular de *L. amazonensis* (CI_{50} 10,53-52,13 μM y CI_{90} 14,52-85,64 μM), sobresaliendo el compuesto 10 que mostró una actividad similar ($p=0,08$) a la del compuesto de referencia miltefosina (figura 15a). Los IS estuvieron entre 5,75-18,75.

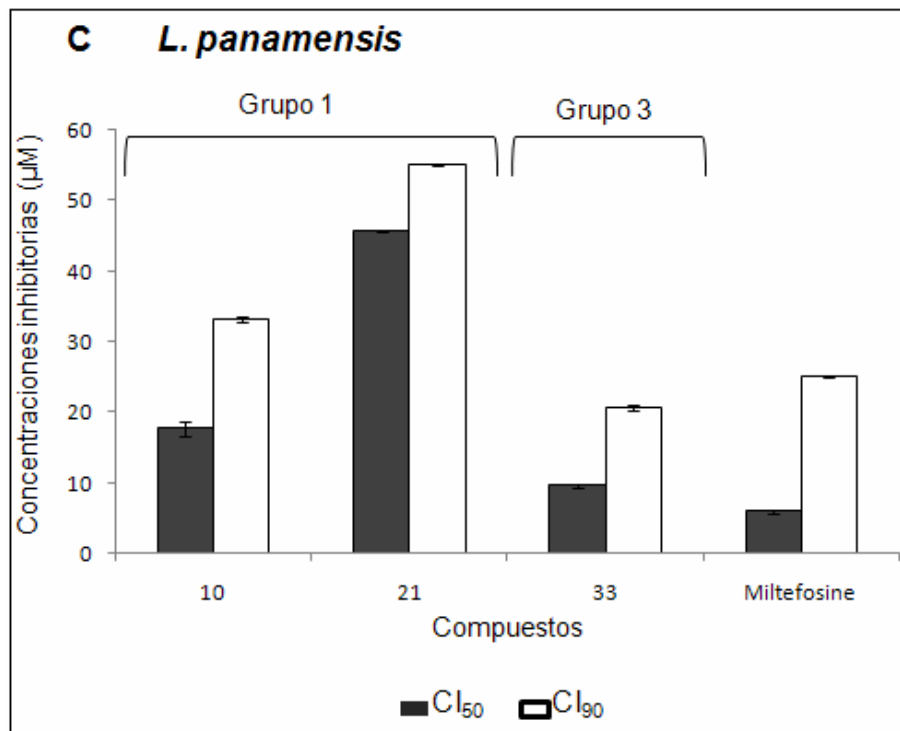
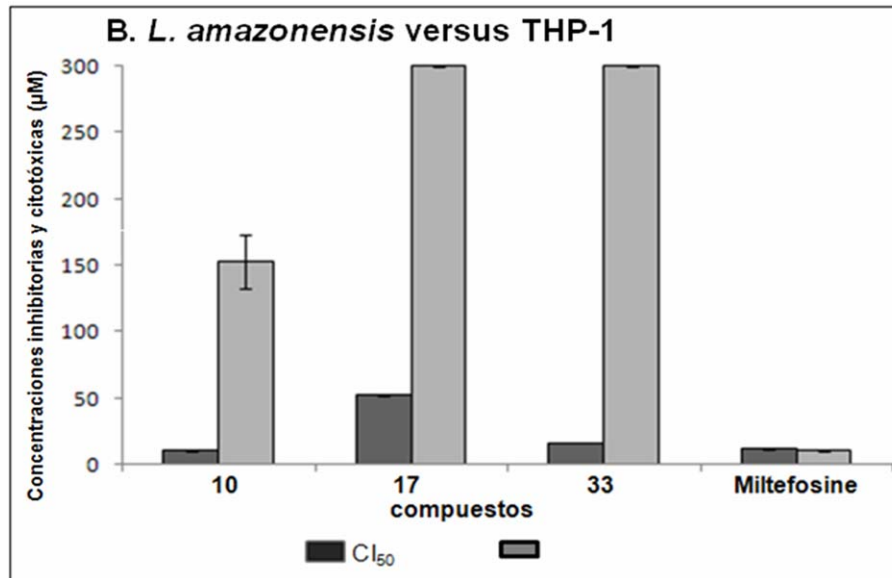
En la figura 15b se muestra las diferencias en cuanto a la actividad inhibitoria contra *L. amazonensis* y la actividad citotóxica en células THP-1 diferenciadas.

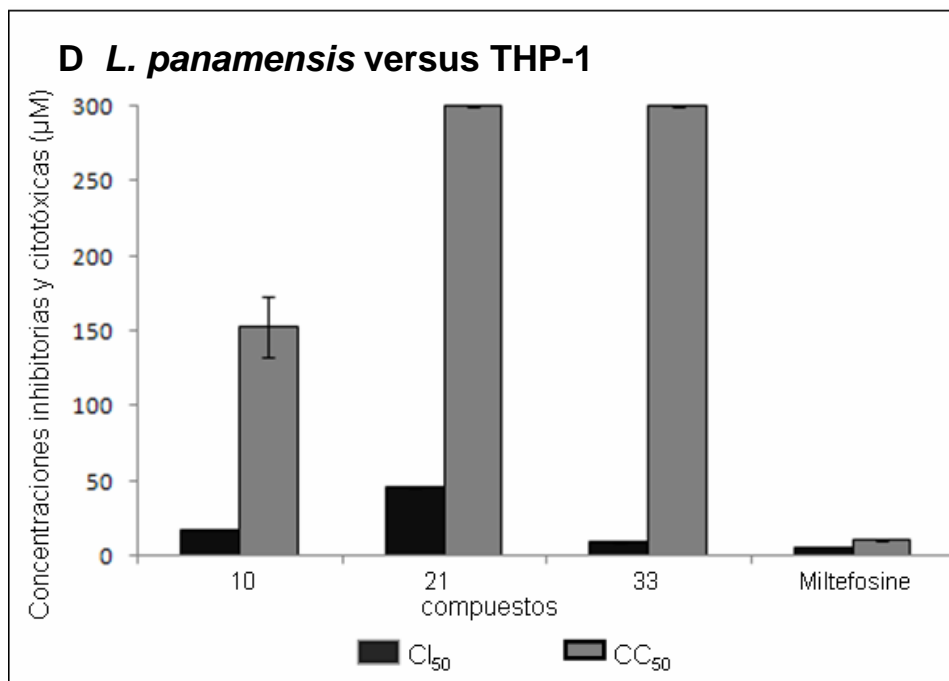
En *L. panamensis* los compuestos 10, 21 y 33 fueron activos contra la forma intracelular (CI_{50} entre 9,53-45,66 μM y CI_{90} entre 20,7-55,12 μM) (figura 15c). Los IS fueron entre 6,57-31,47 (figura 15d).

Ninguno de los compuestos evaluados presentó actividad contra amastigotes intracelulares de *L. chagasi*.

Figura 15. Actividad contra amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* y *L. panamensis*. A: Actividad (CI₅₀ y CI₉₀) en μM contra amastigotes de *L. amazonensis*. B: Actividad en amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* (CI₅₀) y toxicidad en células THP-1 diferenciadas (CC₅₀). B: Actividad (CI₅₀ y CI₉₀) en μM contra amstigotes de *L. panamensis*. B: Actividad en amastigotes intracelulares de *L. panamensis* (CI₅₀) y toxicidad en células THP-1 diferenciadas (CC₅₀). Los valores corresponden a un experimento representativo de dos realizados.







Fuente: Autora del Proyecto

4.9. ANÁLISIS ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

Se realizó un análisis cualitativo de la relación entre la estructura química de los diferentes grupos de compuestos, teniendo en cuenta los sustituyentes de cada compuesto, y la actividad antiparasitaria y citotóxica determinadas en este estudio.

4.9.1. Análisis estructura-actividad contra *T.cruzi*

4.9.1.1. Grupo 1 de compuestos. Tal como se describió en materiales y métodos, los compuestos del grupo 1 fueron divididos en 4 subgrupos de acuerdo con el tipo de sustituyente presente en la posición C-2 del anillo de 1-benzazepina.

La actividad de los compuestos del subgrupo 1.1 contra la forma libre del parásito, se vio afectada positivamente cuando los compuestos estaban sustituidos por un

grupo halógeno o metilo en la posición *para* (C-7) o *para'* (C-4') y *orto* (C-2') o *orto'* (C-6'), ó dos grupos halógeno o metilo en las posiciones *para-orto'*.

De los compuestos de este grupo, sólo el amino-alcohol 8 fue el único que resultó activo contra amastigotes intracelulares, demostrando la importancia de la disustitución *orto-cloro* del anillo de 2-fenilo y el *para*-metilo del anillo 1-benzoazepina; este compuesto también presentó actividad contra epimastigotes, sin mostrar toxicidad en células Vero.

De los compuestos del subgrupo 1.2, el derivado 15 que está sustituido con un grupo metilo en la posición C-3' del anillo de tiofeno, fue el que mayor actividad presentó contra epimastigotes de *T.cruzi*. El amino-alcohol 16, a pesar de no ser activo contra la forma extracelular, mostró actividad en amastigotes intracelulares de *T.cruzi*, sin ser tóxico sobre células de mamífero. La presencia del átomo de bromo en la posición C-5' del anillo de tiofeno (compuesto 17), también fue benéfica para la inhibición de la forma intracelular de *T.cruzi*.

Comparados con la actividad del nifurtimox, los compuestos del subgrupo 1.3 fueron los que presentaron los menores valores de IC₅₀ ($p < 0,05$). Al evaluar el 1,4-epoxi-cicloaducto (25) que está sustituido en la posición C-7 (*para*) del anillo de 1-benzoazepina con un átomo de cloro, éste presentó actividad contra la forma parasitaria libre de *T.cruzi*, sin presentar toxicidad sobre células Vero; sin embargo, cuando se probó su respectivo amino-alcohol (20), la inhibición del parásito fue mayor, aunque fue tóxico sobre células Vero. Este derivado presentó un IS de 81,68.

De resaltar el hecho que tanto el compuesto 21, un 1,4-epoxi-cicloaducto sustituido en la posición C-7 del anillo 1-benzoazepina por un átomo de fluor en lugar de cloro, como su correspondiente amino-alcohol presentaron una marcada

inhibición del parásito. Sin embargo, con este grupo de compuestos no se observó ningún efecto inhibitorio contra amastigotes intracelulares de *T.cruzi*.

El subgrupo 1.4 de compuestos no mostró ningún efecto sobre el crecimiento de epimastigotes y amastigotes intracelulares de *T.cruzi*, pero tampoco reveló toxicidad sobre células de mamífero.

4.9.1.2. Grupo 2 de compuestos. Los resultados obtenidos en la evaluación de la actividad antiparasitaria contra epimastigotes de *T.cruzi* de esta serie de compuestos sugieren que, posiblemente, la presencia de un átomo de cloro en la posición C-7 del sistema tetracíclico de la dihidrodibenzo[*c*,*f*]tiazolo[3,2-*a*]azepin-3-ona, es necesaria para potenciar la actividad contra las formas libre e intracelular de *T.cruzi*. Así lo confirman los valores encontrados para los compuestos (28) y (29), aunque el primero, aun siendo el más activo de los dos, presentó también una leve toxicidad sobre células Vero; la menor actividad del compuesto (29) comparada con la de su análogo (28), pudo deberse a la presencia simultánea del grupo metilo en la posición C-12. Por el contrario y en concordancia con lo encontrado anteriormente, cuando se reemplaza el átomo de cloro por un átomo de fluor o un hidrógeno, se pierde la actividad antiparasitaria contra la forma libre de *T.cruzi*; eso es lo que indican las actividades encontradas para los derivados (26) y (27).

4.9.1.3. Grupo 3 de compuestos. La actividad contra la forma epimastigotes de este grupo de compuestos se evidenció al evaluar inicialmente el amino-alcohol sin ningún sustituyente en el anillo de benceno (31), pero infortunadamente, este derivado también presentó una toxicidad parcial sobre células de mamífero. Al introducirse un grupo metilo en la posición *orto* (*orto*) del anillo de benceno, la actividad se incrementa considerablemente, este es el caso del derivado (33). Los resultados también indican que la actividad antiparasitaria se incrementa aun más

cuando se cambia la posición del grupo metilo de *orto* (*orto*) a la posición *meta*. Este cambio de posición es benéfico tanto para el 1,4-epoxi-cicloaducto como para el correspondiente amino-alcohol, hecho que se confirma con los valores encontrados para el el 1,4-epoxi-cicloaducto (34) y su correspondiente amino-alcohol (35), aunque éste último resultó ser citotóxico.

4.9.2. Análisis estructura-actividad contra *L.chagasi*

4.9.2.1. Grupo 1 de compuestos. Los resultados obtenidos indican que los compuestos del subgrupo 1.1 que contienen halógenos en las posiciones *orto* o *orto'* y *para* o *para'* ven incrementada su actividad contra promastigotes de *L. chagasi*; por el contrario, la ausencia de halógenos en las mencionadas posiciones, como es el caso de los compuestos (1) y (2), conduce a la pérdida de la actividad. Los compuestos con un átomo de fluor o cloro en la posición *orto* (*orto'*), como es el caso de los derivados (3), (7) y (8), presentaron una actividad muy similar entre ellos. Sin embargo, la actividad contra promastigotes se ve incrementada cuando en la posición *para'* se introduce un átomo de bromo, especialmente en el amino- alcohol (10). Por el contrario, la doble sustitución en las posiciones *para-orto'* con grupos metilo (compuestos 5 y 6), y *orto-orto'* con átomos de cloro (compuestos 11 y 12) no es benéfica para la actividad, ya que estos compuestos no inhibieron la forma parasitaria libre de *L. chagasi*.

En general, los compuestos del subgrupo 1.2 presentaron actividad contra promastigotes de *L. chagasi*. Pero la inhibición del parásito se ve incrementada cuando se introduce un átomo de bromo en la posición C-5 del anillo de tiofeno (compuesto 17), y reducida cuando en la misma posición se introduce un grupo metilo (compuesto 19).

De los compuestos del subgrupo 1.3, los 1,4-epoxi-cicloadductos resultaron ser los más activos contra esta forma parasitaria, siendo el *para*-cloro-derivado (25) el que presentó la mejor actividad contra el parásito.

4.9.2.2. Grupo 2 de compuestos. Los valores de la actividad antiparasitaria (CI_{50}) encontrados para los compuestos del grupo 2 sugieren que ésta se incrementa con la presencia de un átomo de cloro en la posición C-7 (compuesto 29), que se disminuye drásticamente cuando hay presencia simultánea de un átomo de cloro en C-7 y un grupo metilo en C-12 (compuesto 28), y que el cambio del átomo de cloro por uno de fluor (compuesto 27) y/o la ausencia de sustituyentes (compuesto 26) conducen a la pérdida de la actividad.

4.7.2.3. Grupo 3 de compuestos. En este grupo de compuestos, la presencia de un grupo metilo en la posición *orto* y/o *meta* del anillo de benceno, es la más relevante para la actividad contra promastigotes, a pesar que en esta última posición el grupo metilo hace que el compuesto sea tóxico sobre células de mamífero y presente un IS <2.

5. DISCUSIÓN

Encontrar compuestos activos *in vitro* contra las formas libres o intracelulares de los parásitos *T. cruzi* y/o *Leishmania* spp y con baja toxicidad sobre células de mamífero, constituye una de las primeras etapas del proceso de descubrimiento de medicamentos. Estos compuestos deben además tener propiedades físico-químicas ideales tales como permeabilidad y solubilidad. Moléculas con estas características podrían considerarse como candidatos para avanzar con otros estudios pre-clínicos como son las pruebas de genotoxicidad, mutagenicidad, ensayos en modelos *in vivo* y mecanismos de acción, entre otros (Kerns & Di, 2008).

Teniendo en cuenta las reglas estipuladas por Lipinski y colaboradores (Kerns & Di, 2008; Lipinski *et al.*, 1997), la mayoría de los compuestos activos encontrados en este trabajo cumplieron con algunas de las propiedades físico-químicas ideales. Así, el 32% de los compuestos activos presentaron valores de $\text{Log}P$ mayores de 5, lo que significa que son altamente lipofílicos o hidrofóbicos, sin embargo, el cumplimiento de al menos 3 de estas reglas, permiten a los compuestos avanzar en las siguientes etapas del proceso de desarrollo de nuevos medicamentos.

El parámetro de lipofilicidad y solubilidad fue analizado previamente también por Kasim y colaboradores, quienes usando valores teóricos de $\text{Log}P$ estimaron la permeabilidad de varios medicamentos orales, teniendo como referencia los valores del metoprolol. Este medicamento es considerado altamente permeable (95% de permeabilidad) y es utilizado en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. Ellos sugirieron que compuestos con valores de $\text{Log}P$ iguales o mayores a los del metoprolol ($\text{Log}P$ 1,72) se considerarían como compuestos altamente permeables. También mostraron que medicamentos como la

carbamazepina eran insolubles y tenían valores de $\text{Log}P$ relativamente altos de 2,93 sugiriendo una alta permeabilidad, condición indispensable para que este medicamento atravesara la barrera hematoencefálica y actuara sobre su blanco terapéutico en el sistema nervioso. Por el contrario, mostraron que compuestos como la cimetidina con un valor de $\text{Log}P$ de 0,79, eran ligeramente solubles y presentaban una baja permeabilidad, condición no indispensable para su actividad ya que tienen una acción directa en el tracto gastrointestinal (Kasim *et al.*, 2004). De la misma manera, se obtuvieron valores teóricos de área de superficie polar (PSA) para hacer algunas predicciones como absorción intestinal que incluyen permeabilidad en células humanas de cáncer de colon (células Caco-2) y penetración a la barrera hematoencefálica (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>; Ertl *et al.*, 2000; Osterberg & Norinder, 2000). Los compuestos estudiados en este trabajo resultaron tener valores de PSA entre 12,47-32,25 que fueron menores a los del nifurtimox (PSA 108,7), pero muy parecidos a los del medicamento diazepam (PSA 32,7), conocido por penetrar la barrera hematoencefálica y actuar sobre el sistema nervioso central (Osterberg & Norinder, 2000).

Tomando en consideración lo anteriormente expuesto, se puede decir que la mayoría de los compuestos evaluados en este estudio poseen propiedades fisicoquímicas óptimas para ser considerados como altamente permeables y, por tanto, capaces de atravesar las membranas biológicas y así lograr su efecto terapéutico. Este resultado es importante dado que *T. cruzi* y *Leishmania* presentan formas intracelulares en el hospedero, razón por la cual los compuestos necesariamente deben ser lipofílicos. Éstos tendrían que ser internalizados por la célula hospedera y acceder al sitio donde se encuentra el parásito intracelularmente, que en el caso de la *Leishmania* es el fagolisosoma y en *T. cruzi*, es el citoplasma (Carvalho *et al.*, 1999).

La gran mayoría (97,14%) de los compuestos evaluados en este estudio no presentaron toxicidad sobre las células hospederas de los parásitos (Vero y THP-1 diferenciadas). Este mismo resultado se obtuvo en un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio usando la misma metodología, pero con compuestos de la serie tetrahidronafto [1,2-*b*] azepina cuya toxicidad sobre células de mamífero fue baja con CC_{50} entre 30,7- \rightarrow 300 μ M en células Vero y CC_{50} entre 36,2- \rightarrow 300 μ M para células THP-1 diferenciadas (Palma et al., 2009). Esta baja toxicidad sobre las células hospederas permite que los compuestos sean sometidos a otros ensayos pre-clínicos como son las pruebas de genotoxicidad, teratogenicidad, mutagenicidad y ensayos en modelos *in vivo*, entre otros (Morovac, 2001).

Este parámetro de toxicidad resulta ser importante también porque ayuda a determinar la relación de selectividad (parásito: célula), que para los compuestos evaluados fue relativamente alta debido a la baja toxicidad que presentaron. Entre mayor sea el IS o índice terapéutico, más selectivo será el compuesto, y su actividad estará dirigida hacia el parásito y no hacia la muerte de la célula hospedera.

La importancia de este resultado radica en que al encontrar compuestos muy activos para los parásitos a bajas concentraciones y poco tóxicos para las células, éstos se convierten en mejores candidatos a fármacos ya que se evitarían reacciones adversas al compuesto y tendrían una amplia ventana terapéutica. Un ejemplo de este tipo de compuestos es la anfotericina B, utilizada en este estudio como medicamento de referencia, la cual presentó un IS de 261,33, siendo altamente tóxica sobre células de mamífero (CC_{50} 7,84 μ M), pero activa contra la *Leishmania* a muy bajas concentraciones (CI_{50} 0,03 μ M). Esto contrasta con el comportamiento de otros medicamentos como la miltefosina que presenta un IS de 1,77. En este trabajo por ejemplo, el compuesto (20), aunque fue relativamente tóxico para la células Vero, fue muy activo contra epimastigotes, por lo que presentó un IS alto de 81,68.

Los compuestos tóxicos para las células, como es el caso del compuesto (35) evaluado en este trabajo, generalmente son descartados. Sin embargo, dependiendo de la actividad biológica, podrían ser tenidos en cuenta para llevar a cabo estudios QSAR los cuales mediante el uso de ecuaciones matemáticas permiten encontrar correlaciones entre la citotoxicidad de los compuestos y su estructura química con el fin de diseñar nuevos compuestos menos tóxicos y más activos; también se podrían realizar estudios en células tumorales o usar transportadores como liposomas o nanopartículas, que ayudan a la internalización o penetración de compuestos en la célula, resultando en una disminución en la toxicidad de los medicamentos.

La AmB por ejemplo, es un medicamento de uso restringido por sus efectos cardiotóxicos y hepatotóxicos, activo en infecciones fúngicas y contra la *Leishmania*. Se ha demostrado que el uso de formulaciones lipídicas, en infecciones fúngicas, ha reducido su toxicidad (Gregoriadis, 1991; Bakker-Woudenberg, 1994). De igual manera, el uso de la AmB liposomal (AmBisome[®]) en LC experimental, fue mas efectivo en ratones BALB/c infectados con *L. major* que la AmB libre. Se observó además, una reducción de los efectos tóxicos y una mejor penetración a los tejidos. Ensayos *in vitro* demostraron, sin embargo, que amastigotes intracelulares de *L. major* fueron más sensible a la AmB libre que a la Ambisome[®] (Yardley & Croft, 1997; Brajtburg & Bolard, 1996). Igualmente, la AmB liposomal mostró tener baja toxicidad y ser altamente efectiva cuando fue usada en ensayos clínicos con pacientes inmunocompetentes con leishmaniasis visceral (Bern *et al.*, 2006).

Aproximadamente la mitad de los compuestos (48,57%) evaluados contra *T. cruzi* fueron activos contra las formas libres (epimastigotes), y algunos inclusive más activos que el nifurtimox. Estos compuestos activos podrían tenerse en cuenta

para ser ensayados contra la forma libre de tripomastigote, lo cual sería importante ya que podrían ser utilizados como profilácticos en las unidades de sangre.

En algunos países como Brasil, Bolivia, Chile, Argentina, Honduras, entre otros, la transmisión del parásito a través de transfusiones sanguíneas es un significativo problema de salud pública (Schmunis, 1999; Schmunis & Cruz, 2005). En Colombia el tamizaje del *T. cruzi* en donadores de sangre se realiza desde 1995. Sin embargo, en un estudio realizado en el 2003, con el fin de determinar la efectividad de las estrategias de control en donantes en Colombia, revelaron que el 0,42% de las unidades de sangre fueron reactivas para el *T. cruzi*; en Casanare por ejemplo, de 1487 donantes, 107 fueron positivos para el parásito. Esto demuestra que aún existe riesgo de contraer la enfermedad por vía transfusional (Beltrán *et al.*, 2003).

Dentro de las estrategias para prevenir la infección del *T. cruzi* en bancos de sangre, se encuentra el desarrollo de encuestas pre-donación para identificar factores de riesgo de los donantes principalmente, sin embargo, estos cuestionarios resultan significantes en áreas no endémicas pero su uso es limitado en zonas de alta prevalencia. Las pruebas serológicas para detectar anticuerpos contra el parásito, aunque eficaces, resultan ser complejas debido a la reactividad cruzada de los antígenos del *T. cruzi* con otros parásitos; Adicionalmente, otra medida de prevención es el uso del violeta de genciana, sobretodo en aquellos lugares donde hay pocos donantes y la posibilidad de unidades de sangre infectadas es alta (Moares-Souza & Bordin, 1996). Se ha reportado que este colorante al ser usado en combinación con el ácido ascórbico y la luz, desactiva el parásito, al igual que cuando se utiliza antes de la transfusión a una concentración de 125 mg/500 ml durante 24 horas a temperatura ambiente (Dias & Brener, 1984; Dias & Schofield, 1994). No obstante, su toxicidad es cuestionable. Por tanto, a pesar de que existen mecanismos de prevención y quimioprofilaxis para evitar la infección del *T. cruzi* vía transfusional, estas herramientas no han sido totalmente

efectivas, haciéndose necesario el desarrollo de nuevos métodos serológicos y compuestos quimioprolácticos (Wendel, 2009).

De los compuestos evaluados sólo 4 (compuestos 8, 16, 17 y 28) fueron activos contra amastigotes intracelulares de *T. cruzi*. Exceptuando el compuesto 16, los otros tres también fueron activos contra las formas de epimastigotes. La actividad que mostró el compuesto 16 resulta interesante, ya que posiblemente no actúa directamente sobre el parásito, sino que podría activar mecanismos intrínsecos de la célula hospedera, que podrían ser los responsables de la muerte del parásito.

El *T. cruzi* vive en una gran variedad de células, especialmente células musculares y macrófagos; se ha reportado que macrófagos activados pueden destruir el *T. cruzi in vitro*. Durante el proceso de eliminación del parásito, la producción de citoquinas como el interferón gama (INF- γ), factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α) e interleuquina 12 (IL-12) ayudan a la activación del macrófago para inducir la muerte intracelular mediante la producción del óxido nítrico (ON) y sus derivados de nitrógeno y radicales de oxígeno. De esta manera, el ON es considerado como la principal molécula efectora involucrada en la muerte de amastigotes intracelulares mediada por el macrófago (James, 1995; Gutierrez *et al.*, 2009; Boveris *et al.*, 1978; Boiani *et al.*, 2008). La miltefosina, ha demostrado ser activa contra *T. cruzi* e inducir la producción de ON y FNT- α en células U937 humanas (Eue *et al.*, 1995), y en macrófagos peritoneales murinos en presencia de lipopolisacárido (LPS) (Zeisig *et al.*, 1995). Una relación entre la producción del anión superóxido (O_2^-) y la muerte del parásito se ha encontrado después del tratamiento con derivados de naftoquinonas como la β -lapachona (Boveris *et al.*, 1978). De igual manera, la actividad antiparasitaria de donadores de ON ha sido reportada. Derivados del benzofuroxano inhibieron el crecimiento de *T. cruzi* y *L. braziliensis* (Boiani *et al.*, 2008), así mismo, el trans-[RuCl([15]aneN(4))NO](2+), ha sido activo *in vitro* contra amastigotes y tripomastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*, al igual que en el modelo murino sin tener efectos tóxicos (Guedes *et al.*,

2010). Bajo estas circunstancias, se considera importante realizar estudios futuros para delucidar un posible mecanismo inmunomodulador involucrado en la actividad del compuesto 16 contra amastigotes intracelulares de *T. cruzi*.

Los cuatro compuestos que resultaron activos contra amastigotes fueron evaluados también en la cepa Sylvio-X10. Ellos mostraron variabilidad en la susceptibilidad a los compuestos en las dos cepas evaluadas (320I01 y Sylvio-X10). La heterogeneidad en la respuesta a los medicamentos en *T. cruzi* ha sido demostrada, pudiendo tener implicaciones en el tratamiento de la enfermedad de Chagas (Luna *et al.*, 2009). Varios autores reportan la existencia de cepas más sensibles o menos sensibles a los medicamentos de referencia dentro de cada grupo genético y entre los linajes *T. cruzi* I y II (Villareal *et al.*, 2004). Por ejemplo, la cepa Y de *T. cruzi* resultó ser más sensible al nifurtimox, benznidazol y violeta de genciana *in vitro* que otras cepas aisladas de diferentes orígenes geográficos y hospederos (Lederkremer *et al.*, 1991). De igual manera, otros autores reportan una variación en la respuesta al benznidazol, en ratones infectados con cepas aisladas de ciclos domésticos y selváticos de áreas endémicas de Brasil (Toledo *et al.*, 1997).

Adicionalmente, diferencias en la susceptibilidad al benznidazol e itraconazol se han reportado entre cepas aisladas de distintos hospederos y áreas geográficas de Latino América, siendo las de *T. cruzi* I altamente resistentes al benznidazol e itraconazol, comparadas con las cepas de *T. cruzi* II que fueron más susceptibles a estos medicamentos en el modelo experimental de Chagas agudo y crónico usando ratones BALB/c (Toledo *et al.*, 2003).

Al igual que lo mostrado contra las formas libres de *T. cruzi*, el 42,85% de los compuestos fueron activos contra promastigotes de *L. chagasi*, sin embargo, no se observó actividad contra la forma de amastigote intracelular. La falta de actividad

en la forma intracelular, podría deberse a las barreras biológicas que debe atravesar el compuesto para alcanzar el sitio donde se encuentra el parásito. En *Leishmania*, una vez el promastigote entra al hospedero mamífero, es fagocitado y se transforma en amastigote, el cual se multiplica dentro del fagolisosoma de la célula hospedera destruyéndola e infectando nuevas células (Sereno *et al.*, 2007; Kima, 2007; Reithinger *et al.*, 2007). Por tanto, el compuesto finalmente para ejercer su acción terapéutica debería atravesar tanto la bicapa lipídica de la célula hospedera, la membrana del fagolisosoma y por último la del parásito, contrario a lo que ocurre con la forma extracelular, donde el compuesto actúa directamente sobre el parásito libre en el medio.

Cuatro compuestos (10, 17, 21 y 33) fueron activos en las formas intracelulares de *L. panamensis* y/o *L. amazonensis*. Estos cuatro compuestos también fueron activos contra promastigotes de *L. chagasi*. Se encontraron variaciones en la susceptibilidad de las especies de *Leishmania* a los compuestos, lo cual podría tener implicaciones en el tratamiento y manifestaciones clínicas de la leishmaniasis, que varían de acuerdo a la especie de *Leishmania* infectante (Escobar *et al.*, 2002; Soto *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 1989; Herwaldt 1999). Esta variación en la susceptibilidad *in vitro* ha sido demostrada previamente con la miltefosine, la cual fue probada en diferentes especies de *Leishmania in vitro*, siendo más activa contra *L. donovani* que contra *L. major*, *L. mexicana*, *L. tropica*, *L. aethiopica* y *L. panamensis* (Escobar *et al.*, 2002); en el modelo de leishmaniasis cutánea fue más efectiva en pacientes infectados con *L. mexicana* que con *L. braziliensis* (Soto *et al.*, 2004). Diferencias entre la sensibilidad *in vitro* de aislados clínicos contra amastigotes intracelulares a la miltefosine en las especies de *L. donovani* y *L. brasiliensis* del estado de Nepal y Perú, respectivamente, también ha sido reportada (Yardley *et al.*, 2005). Adicionalmente, el pentostam (SbV) fue 3-5 veces más activo en amastigotes

intracelulares de *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. panamensis* que en *L. major*, *L. tropica*, y *L. mexicana* (Allen *et al.*, 1989).

En las formas libres de los parásitos, once compuestos (7, 8, 10, 17, 20-22, 25, 29, 33 y 35) fueron activos contra *T. cruzi* y *L. chagasi*. Sin embargo, contra las formas intracelulares de los dos parásitos, sólo el compuesto (17) resultó ser activo en *T. cruzi* y *L. amazonensis*.

Esto se podría explicar por la similitud existente entre ambos parásitos, los cuales son protozoos flagelados que comparten características taxonómicas, biológicas y genéticas similares tales como la presencia de una única mitocondria donde está empaquetado el material genético (kinetoplasto), pertenecen a la misma familia Trypanosomatidae, ambos son transmitidos por insectos vectores, presentan una misma forma aflagelada intracelular en el hospedero, entre otras (Stuart *et al.*, 2008).

Aunque ningún tratamiento para la leishmaniasis se usa para tratar la enfermedad de Chagas, la susceptibilidad de ambos parásitos *in vitro* y en modelos experimentales a un mismo medicamento ha sido demostrada. Los dos parásitos han sido susceptibles *in vitro* a la miltefosine, alopurinol, AmB libre y liposomal (Horvath & Zierdt, 1974; Yardley & Croft, 1999). La miltefosine fue inicialmente utilizada en la terapia contra el cáncer y actualmente contra la leishmaniasis, adicionalmente, estudios *in vitro* demuestran su actividad contra el *T. cruzi* (Wendel, 2009). El alopurinol, aunque ha sido controvertido por su eficacia terapéutica, es activo *in vivo* contra el *T. cruzi* en el modelo de Chagas agudo, y mostró su efectividad en paciente con trasplante renal y con leishmaniasis visceral (Harzallah *et al.*, 2010). La AmB fue reportada también por su actividad contra el *T. cruzi in vitro* e *in vivo*, pero no es usada por sus efectos tóxicos (Horvath & Zierdt, 1974; de Castro *et al.*, 1993); así mismo, la AmB en formulaciones lipídicas como

el Amphocil™ demostró ser activa en amastigotes intracelulares de *T. cruzi*, mientras que la formulación AmBisome® resultó ser la más efectiva en el modelo murino de Chagas agudo con dosis de 25mg/Kg (Yardley & Croft, 1999). Por otra parte, compuestos que se encuentran en ensayos preclínicos como la quinolina 4-metil-8-isopropil-2-(3-piridinil) mostró ser activa *in vitro* tanto en las formas libres e intracelulares de *T. cruzi* y *L. chagasi* (Kousnetzov *et al.*, 2007), al igual que las furamidinas activas contra *T. cruzi* y *L. amazonensis* (Souza *et al.*, 2004).

Aunque en este estudio no se tiene como objetivo la síntesis y caracterización de los compuestos sintéticos, cabe mencionar que ellos fueron sintetizados mediante rutas relativamente sencillas y económicamente viables. También es de resaltar que estos compuestos puros fueron solubles en el solvente orgánico utilizado (DMSO) y en medios de cultivo, característica fundamental en los bioensayos para que no se presenten falsos resultados o datos inespecíficos por la inestabilidad del compuesto en el medio, lo cual terminaría afectando la CI_{50} sobre todo en estos ensayos donde el blanco terapéutico se encuentra dentro de la célula (Kerns & Di, 2008).

Por otra parte, el conocimiento que se tiene sobre la actividad antiparasitaria de las tres series o grupos de compuestos: tetrahydro-1-benzazepina, dihidrodibenzo [c,f]tiazolo[3,2-a]azepin-3-ona y tetrahidronafto[1,2-b]azepina, es muy poco. Sin embargo, en un trabajo anterior, se demostró la actividad antiparasitaria de tres compuestos derivados de tetrahidronafto [1,2-b] azepina (moléculas análogas a las del grupo 3 de compuestos probados en este estudio), contra amastigotes intracelulares de *T. cruzi*, sin ser tóxicos para las células hospederas (Vero y THP-1) (Palma *et al.*, 2009). De esta manera, para establecer una relación estructura actividad entre los compuestos activos evaluados en este estudio y aquellos compuestos estructuralmente similares reportados en la literatura, podría sugerirse que las sustituciones en la estructura del aminoalcohol 33 (único compuesto activo

del grupo 3 en este trabajo contra amastigotes intracelulares de *Leishmania* spp) que presenta un átomo 7-bromo en el anillo de naftaleno y una sustitución del grupo metilo en la posición *orto* (*orto*) del anillo de benceno, fue de gran importancia para que su acción se enfocara contra *L. amazonensis* y *L. panamensis*, a diferencia de los aminoalcoholes reportados por Palma y colaboradores en el 2009 activos contra *T. cruzi* y no contra *L. chagasi*, los cuales no presentan la sustitución 7-bromo en el naftaleno pero si en el anillo de benceno en las posiciones *meta* (*meta*) y *para* (*para*). Los cambios estructurales de los nuevos compuestos no afectaron la toxicidad en células de mamífero. La importancia de estos estudios de relación estructura actividad cualitativa, es que permiten establecer relaciones estructurales y biológicas con el fin de crear un interés en el químico sintético para la generación de nuevos compuestos más activos y menos tóxicos, partiendo de unos preexistentes a los cuales se les conoce su bioactividad (Kerns & Di, 2008).

En consecuencia, para conocer más sobre las propiedades antiparasitarias de este tipo de compuestos, se hace necesario continuar con estudios más avanzados como los ensayos *in vivo*, mecanismos de acción, ensayos de genotoxicidad, estudios QSAR, entre otros, los cuales darían información valiosa que definirían la preclusión de la investigación o el paso a las siguientes etapas del desarrollo de medicamentos.

6. CONCLUSIONES

El presente trabajo de tesis realiza un aporte importante a la ciencia, al desarrollo de fármacos, a la implementación de metodologías, a la formación científica y al fortalecimiento de líneas de investigación.

Aporte al conocimiento científico:

Al contestar la pregunta de investigación sobre “Son los derivados de tetrahydro-1-benzoazepina, dihidrodibenzo [c,f]tiazolo[3,2-a]azepin-3-ona y tetrahidronafto[1,2-b]azepina activos contra *T. cruzi*, *Leishmania* y células de mamífero” se realiza un aporte importante al avance de la ciencia dado que esto no se conocía anteriormente. Al utilizar el método científico en la solución de este problema, los resultados obtenidos brindarán a la comunidad científica nuevas herramientas para orientar y/o sustentar sus resultados y contribuirán al descubrimiento de nuevos y promisorios compuestos sintéticos para la enfermedad de Chagas y la leishmaniasis.

Aporte al desarrollo de fármacos:

Este trabajo contribuye en las etapas iniciales del desarrollo de fármacos, con resultados promisorios de nuevos compuestos bioactivos factibles de sintetizar a partir de materiales asequibles y económicos y con propiedades fisicoquímicas óptimas que los hace excelentes candidatos a fármacos y podrían continuar con las siguientes etapas de los ensayos pre-clínicos en los cuales se incluyen pruebas en modelos *in vivo*, mecanismos de acción, ensayos de toxicidad, estudios de farmacocinética, entre otros.

Los derivados tetrahydro-1-benzoazepina, dihidrodibenzo [c,f]tiazolo[3,2-a]azepin-3-ona y tetrahidronafto[1,2-b]azepina mostraron no ser citotóxicos contra las células de mamífero evaluadas, con índices de selectividad relativamente altos. Este hallazgo resulta ser importante tratándose de microorganismos intracelulares donde la integridad de la célula hospedera debe mantenerse.

Casi la mitad de los compuestos resultaron activos contra promastigotes de *L. chagasi*, pero no inhibieron la forma de amastigote intracelular de este parásito. Sin embargo, algunos compuestos mostraron actividad contra la forma intracelular de otras especies como *L. amazonensis* y *L. panamensis* las cuales están involucradas en LC americana. Esto podría contribuir al desarrollo de fármacos para ser utilizados en esta forma clínica de la enfermedad.

Algunos compuestos activos en *T. cruzi* fueron más efectivos que el nifurtimox. Estos podrían ser candidatos para ser utilizados como profilácticos contra las formas libres de los parásitos como TDC que se encuentran en las unidades de sangre.

El 11,42% de los compuestos fueron activos contra la forma intracelular de *T. cruzi*; encontrándose al igual que en *Leishmania* spp, una heterogeneidad en la susceptibilidad de los compuestos cuando éstos fueron evaluados en dos cepas diferentes de *T. cruzi*.

Los compuestos que resultaron no tóxicos y activos en las diferentes formas parasitarias, especialmente los activos en las formas intracelulares (que fueron los compuestos 8, 10, 18, 17, 28 y 33) son considerados como compuestos prometedores con características fisicoquímicas además que les permite continuar con las siguientes etapas de los estudios pre-clínicos.

Implementación de nuevas metodologías:

En el marco del trabajo de laboratorio, se contribuyó al fortalecimiento de los ensayos *in vitro* aportando con el desarrollo y estandarización de nuevas metodologías que permitieron evaluar un mayor número de compuestos en menos tiempo. Adicionalmente, se establecieron las bases para la implementación de los ensayos en modelos experimentales *in vivo* y otras pruebas de toxicidad como genotoxicidad y mutagenicidad. De esta manera, se escribió una propuesta complementaria que permitirá el avance de los compuestos activos de este trabajo hacia la etapa de modelos *in vivo*.

Aporte a la formación científica y al fortalecimiento de líneas de investigación:

Este trabajo permitió fortalecer la cooperación científica entre grupos nacionales e internacionales favoreciendo el trabajo interdisciplinario y la consolidación de nuevas propuestas complementarias a este estudio. Además ayudó en la formación de estudiantes de pregrado y se contribuyó al fortalecimiento de la línea de investigación de screening de compuestos antiparasitarios en el laboratorio de quimioterapia del CINTROP.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Aguirre G, Boiani L, Cerecetto H, Di Maio R, González M, Porcal W, Denicola A, Möller M, Thomson L, Tórtora V. Benzo[1,2-c]1,2,5-oxadiazole N-oxide derivatives as potential anti trypanosomal drugs. Part3: Substituents-clustering methodology in the search for new active compounds. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2005; 13: 6324–6335.
- ✓ Allen S, Neal RA. The in vitro susceptibility of macrophages infected with amastigotes of *Leishmania* spp. to pentavalent antimonial drugs and other compounds with special relevance to cutaneous isolates. En: Hart DT, ed. *Leishmaniasis*. Plenum Press: New York 1989: p. 711–720.
- ✓ Al-Qawasmeh RA, Lee Y, Cao M, Gu X, Viau S, Lightfoot J, Wright JA, Young AH. 11-Phenyl-[b,e]-dibenzazepine compounds: Novel antitumor agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2009; 19: 104-107.
- ✓ Amato VS, De Paula JG, Imamura R, Amato Neto V, Duarte MI, Boulos M, Nicodemo AC, Mendonca JS. Treatment of American cutaneous leishmaniasis, with lesions in the mucosa, using pentamidine isethionate. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1996; 29: 477-81.
- ✓ Andrés JA, Alcázar J, Alonso JM, Díaz A, Fernández J, Gil P, Iturrino L, Matesanz E, Meert TF, Megens A, Sipido VK. Synthesis and Structure–Activity Relationship of 2-(Aminoalkyl)-2,3,3a,8-tetrahydrodibenzo[c,f]isoxazolo[2,3-a]azepine Derivatives: A Novel Series of 5-HT_{2A/2C} Receptor Antagonists. Part1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2002; 12: 243–248.

- ✓ Arévalo I, Tulliano G, Quispe A, Spaeth G, Matlashewski G, Llanos-Cuentas A, Pollack H. Role of Imiquimod and Parenteral Meglumine Antimoniate in the Initial Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* 2007; 44: 1549–1554.

- ✓ Baba M, Nishimura O, Kanzaki N, Okamoto M, Sawada H, Iizawa Y, Shiraishi M, Aramaki Y, Okonogi K, Ogawa Y, Meguro K, Fujino M. A small-molecule, nonpeptide CCR5 antagonist with highly potent and selective anti-HIV-1 activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999; 96: 5698-6703.

- ✓ Bakker-Woudenberg IAJM, Storm G, Woodle MC. Liposomes in the treatment of infection. *Journal of Drug Targeting* 1994; 2: 363–371.

- ✓ Banerjee P, Rosfsky M. Drug discovery: the quest for innovation and productivity. *Scrip Magazine* 1997; 62: 35-8.

- ✓ Barr SC., Warner KL, Kornreic BG, Piscitelli J, Wolfe A, Benet L, McKerrow JH. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2005; 49: 5160–5161.

- ✓ Beltrán M, Bermúdez MI, Forero MC, Ayala M, Rodríguez MJ. Control of *Trypanosoma cruzi* infection in blood donors in Colombia, 2003. *Biomédica* 2005; 25: 427-432.

- ✓ Bern C, Adler-Moore J, Berenguer J, Boelaert M, den Boer M, Davidson RN. Liposomal Amphotericin B for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* 2006; 43:917–24.

- ✓ Braga MV, Urbina JA, Souza W. Effects of squalene synthase inhibitors on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. International Journal of antimicrobial agents 2004; 24: 72–78.
- ✓ Brajtburg J, Bolard J. Carrier Effects on Biological Activity of Amphotericin B. Clinical Microbiology Reviews 1996; 9: 512–531.
- ✓ Bock M, Gonert R, Hberkom A. Studies with Bay 25-02 on animals. Boletín Chileno de Parasitología 1969; 24: 13-19.
- ✓ Boiani L, Aguirre G, González M, Cerecetto H, Chidichimo A, Cazzulo JJ. Furoxan-, alkylnitrate- derivatives and related compounds as anti-trypanosomatida gents: Mechanism of action studies. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2008; 16: 7900–7907.
- ✓ Boletín epidemiológico 47. Instituto Nacional de Salud. SIVIGILA 2002. <http://www.col.ops-oms.org/sivigila>
- ✓ Boveris A, Stoppani AO, Docampo R, Cruz FS. Superoxide anion production and tripanocidal action of naphthoquinones on *Trypanosoma cruzi*. Comparative Biochemistry and Physiology. C 1978; 61:327-329.
- ✓ Buates S, Matlashewski G. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. The Journal of Infectious Disease 1999; 179: 1485-94.
- ✓ Caballi A, Bolognesi ML. Neglected Tropical Diseases: Multi-Target-Directed Ligands in the Search for Novel Lead Candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. Journal of Medicine and Chemistry 2009; 52: 7339–7359.

- ✓ Cabrera M, Lavaggi ML, Hernández P, Merlino A, Gerpeam A, Porcal W, Boiani M, Ferreirab A, Monge A. Cytotoxic, mutagenic and genotoxic effects of new anti-T. cruzi 5-phenylethenylbenzofuroxans. Contribution of phase I metabolites on the mutagenicity induction. *Toxicology Letters* doi:10.1016/j.toxlet.2009.07.006.

- ✓ Carod-Artal FJ. Enfermedad de Chagas e ictus. *Neurología* 2006; 21: 135-149.

- ✓ Cançado JR. Criteria of Chagas disease cure. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 1999; 94: 331–335.

- ✓ Cançado JR. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease 1121 with benznidazole. *Revista del Instituto de Medicina Tropical Sao Paulo* 2002; 44: 29–37.

- ✓ Carvalho TMU, De Souza W, Coimbra ES. Internalization of Components of the Host Cell Plasma Membrane During Infection by *Trypanosoma cruzi*. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 1999; 94: 143-147.

- ✓ Cerecetto H, Di Maio R, González M, Risso M, Saenz P, Seoane G, Denicola A, Peluffo G, Quijano C, Olea-Azar C. 1,2,5-Oxadiazole N-Oxide Derivatives and Related Compounds as Potential Anti trypanosomal Drugs: Structure Activity Relationships. *Journal Medicinal Chemistry* 1999; 42: 1941-1950.

- ✓ Cerecetto H, González M. Synthetic Medicinal Chemistry in Chagas' Disease: Compounds at The Final Stage of "Hit-To-Lead" Phase. *Pharmaceuticals* 2010; 3: 810-838.

- ✓ Chan-Bacab MJ, Peña-Rodríguez LM. Plan natural with leishmanicidal activity. *Natural Product Reports* 2001; 18: 674-688.

- ✓ Coura JR. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 2009; 104: 549-554.

- ✓ Coura JR, Abreu LL, Willcox HP, Petana W. Comparative controlled study on the use of benznidazole, nifurtimox and placebo, in the chronic form of Chagas disease, in a field area with interrupted transmission. I. Preliminary evaluation. *Revista de la sociedad Brasileira de Medicina Tropical* 1997; 30: 139-144.

- ✓ Croft SL, Barrett MP, Urbina JA. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends Parasitology* 2005; 21: 508-512.

- ✓ Croft SL, Neal RA, Pendergast W, Chan JH. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochemical Pharmacology* 1987; 36 : 2633-2636.

- ✓ Croft SL, Seifert K, Yardley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian Journal of Medical Research* 2006;123:399-410.

- ✓ De Castro SL. The challenge of Chagas disease chemotherapy: an update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica* 1993; 53: 83-98.

- ✓ De Castro SL, Soeiro NM, Higashi KO, Meirelles MN. Differential effect of amphotericin B on the three evolutive stages of *Trypanosoma cruzi* and on the host cell-parasite interaction. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1993; 26: 1219-29.

- ✓ Deeks SG; Smith M.; Holodniy M.; Kahn JO. HIV-1 protease inhibitors. A review for clinicians. *Journal of the American Medical Association* 1997; 277: 145-153.
- ✓ Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 2004; 27: 305–318.
- ✓ Dias JC, Brener S. Chagas disease and blood transfusion. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 1984; 79: 139-147.
- ✓ Dias JC, Schofield CJ. The Evolution of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) Control after 90 Years since Carlos Chagas Discovery. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 1999; 94:103-121.
- ✓ Di Fabio R, Micheli F, Baraldi D, Bertani B, Conti N, Dal Forno G, Feriani A, Donati D, Marchioro C, Messeri T, Missio A, Pasquarello A, Pentassuglia G, Pizzi DA, Provera S, Quaglia AM, Sabbatini FM. Benzoazepine derivative as potent antagonists of the glycine binding site associated to the NMDA receptor. *Farmaco* 2003; 58: 723-738.
- ✓ DiMasi JA. Risk in new drug development: approval success rate for investigational drugs. *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 2001; 69: 297 – 307.
- ✓ DiMasi JA. The value of improving the productivity of the drug development process: faster times and better decisions. *Pharmacoeconomics* 2002; 20: 1–10.

- ✓ DiMasi JA, Hansen RW, Grabowsky HG. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *Journal of Health Economics* 2003; 22: 151–18.

- ✓ De Souza W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design* 2002; 8: 269-285.

- ✓ DeVita RJ, Bochis R, Frontier AJ, Kotliar A, Fisher MH, Schoen WR, Wyratt MJ, Cheng K, Chan WW, Butler B, Jacks TM, Hickey GJ, Schleim KD, Leung K, Chen Z, Chiu SL, Feeney WP, Cunningham PK, Smith RG. A potent, orally bioavailable benzazepinone growth hormone secretagogue. *Journal Medicine Chemistry* 1998; 41: 1716-1728.

- ✓ El-On J, Bazarsky E, Sneir R. Leishmaniamajor: In vitro and in vivo anti-leishmanial activity of paromomycin ointment (Leshcutan) combined with the immunomodulator Imiquimod. *Experimental Parasitology* 2007; 116: 156–162.

- ✓ Engel JC, Doyle PS, Hsieh I, McKerrow JH. Cysteine protease inhibitors cure experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Experimental Medicine* 1998; 188: 725–734.

- ✓ Escobar P, Hernández IP, Rueda CM, Martínez F, Páez E. Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in *Leishmania* promastigotes. *Biomédica* 2006; 26: 49-56.

- ✓ Escobar P, Matu S, Marques C, Croft SL. Sensitivities of *Leishmania* species to Hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH₃(edelfosine) and amphotericin B. *Acta Tropica* 2002; 81: 151–157.

- ✓ Eue I, Zeisig R, Arndt D. Alkylphosphocholine-induced production of nitric oxide and tumor necrosis factor alpha by U937 cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology* 1995; 121: 350–356.
- ✓ Ertl P, Rohde B, Selzer P. Fast Calculation of Molecular Polar Surface Area as a Sum of Fragment-Based Contributions and Its Application to the Prediction of Drug Transport Properties. *Journal Medicinal Chemistry* 2000; 43: 3714-3717.
- ✓ Fernández LA, Santo MR, Reta M, Giacomelli L, Cattana R, Silber JJ, Risso M, Cerecetto H, Gonzalez M, Olea-Azar C. Relationship Between Physicochemical Properties and Herbicidal Activity of 1,2,5-Oxadiazole *N*-Oxide Derivatives. *Molecules* 2005; 10 (9): 1197-208.
- ✓ Gallerano RH, Mar JJ, Sosa RR. Therapeutic efficacy of allupurinol in patients with chronic Chagas disease. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1990; 43: 159-166.
- ✓ Garnier T, Brown MB, Lawrence MJ, Croft SL. In-vitro and in-vivo studies on a topical formulation of sitamaquine dihydrochloride for cutaneous leishmaniasis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2006; 58: 1043-1054.
- ✓ Gilbert IH. Inhibitors of dihydrofolate reductase in leishmania and trypanosomes. *Biochimica et Biophysica Acta* 2002; 1587: 249– 257.
- ✓ Gobbi P, Lo Presti MS, Fernández AR, Enders JE, Fretes R, Gea S, Paglini-Oliva PA, Rivarola HW. Allopurinol is effective to modify the evolution of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Parasitology Research* 2007; 101:1459-1462.

- ✓ Goodall S. Rising to the productivity challenge: a strategic framework for Biopharma. Boston Consulting Group Report 2004. (http://www.bcg.com/publications/files/rising_to_the_productivity_challenge.pdf)

- ✓ Grant K, Dunion M, Yardley V, Skaltsounis A, Marko D, Eisenbrand G, Croft SL, Meijer L, Mottram JC. Inhibitors of *Leishmania mexicana* CRK3 Cyclin-Dependent Kinase: Chemical Library Screen and Antileishmanial Activity. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48: 3033-3042.

- ✓ Gregoriadis G. Overview of liposomes. *Journal Antimicrobial Chemotherapy* 1991; 28(SB):39–48.

- ✓ Guedes PM, Oliveira FS, Gutierrez FR, da Silva GK, Rodrigues GJ, Bendhack LM, Franco DW, Do Valle Matta MA, Zamboni DS, da Silva RS, Silva JS. Nitric oxide donor trans-[RuCl([¹⁵aneN(4))NO](2+) as a possible therapeutic approach for Chagas' disease. *British Journal of Pharmacology* Doi 10.1111/j.1476-5381.2009.00576.

- ✓ Guhl, F. Chagas disease in Andean countries. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 2007; 1: 29-37.

- ✓ Gull K. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. *International Journal of Parasitology* 2000; 31: 443-452.

- ✓ Gutierrez F, Mineo T, Pavanelli W, Guedes P, Silva J. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 2009; 104: 236-245.

- ✓ Guzikowski AP, Cai SX, Espitia SA, Hawkinson JE, Huettner JE, Nogales DF, Tran M, Woodward RM, Weber E, Keana JF. Analogs of 3-Hydroxy-1*H*-1-benzazepine-2,5-dione: Structure-Activity Relationship at *N*-Methyl-D-aspartate Receptor Glycine Sites. *Journal of Medicinal Chemistry* 1996; 39: 4643-4653.

- ✓ Hammarton T, Mottram JC, Doerig C. The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation. *Progress in Cell Cycle Research* 2003; 5: 91-101.

- ✓ Harzallah K, Belhadj R, Jemli B, Haloues M, Berraies M, Gargouri N, Hmida J et al. Leishmaniasis visceral in a renal transplant recipient treated with allopurinol. *Saudi Journal of Kidney Disease and Transplantation* 2010; 21: 105-108.

- ✓ Herwaldt BL. Leishmaniasis. *The Lancet* 1999; 354: 1191–1199.

- ✓ Horvath AE, Zierdt CH. The effect of amphotericin B on *Trypanosoma cruzi* in vitro and in vivo. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1974; 77: 144–149.

- ✓ James SL. Role of nitric oxide in parasites infections. *Microbiological Reviews* 1995; 59: 533-547.

- ✓ Jha TK, Giri YN, Singh TK, Jha S . The use of amphotericin B in drug-resistant cases of visceral leishmaniasis in North Bihar, India. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene* 1995; 52: 536–538.

- ✓ Kasim NA, Whitehouse M, Ramachandran C, Bermejo M, Lennernäs H, Hussain AS, Junginger HE, Stavchansky SA, Midha KK, Shah VP, Amidon GL.

Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Molecular Pharmaceutics* 2004; 1: 85-96.

- ✓ Kerns EH, Di L. Drug-like properties: concepts, structure design and methods. En: Rules for rapid property profiling from structure. ADME to toxicity optimization. Academic press: Elsevier Inc, 2008. p. 37-42.
- ✓ Kerns EH, Di L. Drug-like properties: concepts, structure design and methods. En: Effects of properties on biological assays. ADME to toxicity optimization. Academic press: Elsevier Inc, 2008. p. 439-450.
- ✓ Kima PE. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. *International Journal for Parasitology* 2007; 37: 1087-1096.
- ✓ Kohfeld S, Jones PG, Totzke F, Schächtele C, Kubbutat MH, Kunick C. 1-Aryl-4,6-dihydropyrazolo[4,3-d][1]benzazepin-5(1H)-ones: A new class of antiproliferative agents with selectivity for human leukemia and breast cancer cell lines. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2007; 42: 1317-1324.
- ✓ Kondo K, Ogawa H, Yamashit H, Miyamoto H, Tanaka M, Nakaya K, Kitano K, Yamamura Y, Nakamura S, Onogawa T, Mori T, Tominaga M. 7-Chloro-5-hydroxy-1-[2-methyl-4-(2-methylbenzoyl-amino)benzoyl]-2,3,4,5-tetrahydro-1H-1-benzazepine (OPC-41061): A Potent, Orally Active Nonpeptide Arginine Vasopressin V2 Receptor Antagonist. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 1999; 7: 1743–1754.
- ✓ Krishna S, Stich A. Trypanosomiasis: African and American. *Medicine* 2005; 33: 50-53.

- ✓ Krolewiecki A, León S, Scott P, Abraham D. Activity of azithromycine against *Leishmania major* in vitro and in vivo. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2002; 67:273-277.

- ✓ Kuhlencord A, Maniera T, Eibl H, Unger C. Hexadecylphosphocholine: oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1992; 36 : 1630-1634.

- ✓ Kuhn B, Mohr P, Stahl M. Intramolecular Hydrogen Bonding in Medicinal Chemistry. *Journal Medicinal Chemistry* DOI: 10.1021/jm100087s.

- ✓ Kunick C, Schultz C, Lemcke T, Zaharevitz DW, Gussio R, Jalluri RK, Sausville EA, Leost M, Meijer L. 2-Substituted Paullones: CDK1/Cyclin B-Inhibiting Property and In Vitro Antiproliferative Activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2000; 10: 567-569.

- ✓ Lederkremer RM, Lima C, Ramírez MI. Complete Structure of the Glycan of Lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes. *The Journal of Biological Chemistry* 1991; 266: 23670-23675.

- ✓ Levy O, Erez M, Varon D, Keinan E. A New Class of Antiarrhythmic-Defibrillatory Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2001; 11: 2921–2926.

- ✓ Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development setting. *Advanced Drug Delivery Reviews* 1997; 23: 3-25.

- ✓ Luna KP, Hernández IP, Rueda CM, Zorro MM, Croft SL, Escobar P. In vitro susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole. *Biomédica* 2009; 28: 448-455.

- ✓ Luna KP, Jaramillo CL, Hernández G, Gutiérrez R, Vallejo GA, Angulo VM. ITS-RFLP-and RAPD-based genetic variability of *Trypanosoma cruzi* I, human and vector strains in Santander (Colombia). *Parasitology Research* 2009; 105: 519-528.

- ✓ McConville MJ, Mullin KA, Ilgoutz SC, Teasdale RD. Secretory Pathway of Trypanosomatid Parasites. *Microbiology and Molecular Biology reviews* 2002; 66: 122-154.

- ✓ McConville MJ, Souza D, Saunders E, Likic V, Naderer T. Living in a phagolysosome; metabolism of leishmania amastigotes. *Trends in Parasitology* 2007; 23: 367-375.

- ✓ Ministerio de Protección Social. Guías de promoción de la salud y prevención de enfermedades en la salud pública. Guías y Normas 412. Tomo 3. 2007; 19:38

- ✓ Minodier P, Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Medicine and Infectious Disease* 2007; 5, 150–158.

- ✓ Moares-Souza H, Bordin O. Strategies for prevention of transfusion-associated Chagas' disease. *Transfusion Medicine Reviews* 1996; 10: 161-170.

- ✓ Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 2009; 104: 17-30.
- ✓ Morovac J. Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco. *Revista Médica de Chile* 2001; 129: 99-106.
- ✓ Murray H.W, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005; 366:1561-1577.
- ✓ Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunology Methods* 1983; 65: 55-63.
- ✓ Nakamura, S, Hirano T, Tsujimae K, Aoyama M, Kondo K, Yamamura Y, Mori T, Tominaga M. Antidiuretic effects of a nonpeptide vasopressin V(2)-receptor agonist, OPC-51803, administered orally to rats. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 2000; 3:1005-1011.
- ✓ Naula C, Parsons M, Mottram JC. Protein kinases as drugs targets in Trypanosomes and *Leishmania*. *Biochimica et Biophysica Acta* 2005; 1754: 151-159.
- ✓ Nicholls S, Cucunubá SM, Knudson A, Florez AC, Montilla M, Puerta CJ, Pavía PX. Enfermedad de Chagas aguda en Colombia, una entidad poco sospechada. Informe de 10 casos presentados en el periodo 2002 a 2005. *Biomédica* 2007; 27: 8-17.

- ✓ Olaya E, García RG, Torres N, Ferro D, Torres S. Caracterización del proceso productivo, logístico y regulatorio de los medicamentos. *Vitae* 2006; 13: 69-82.

- ✓ Oliveira S, Morais E, Rabello A. Antileishmanial Activity of Azithromycin Against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *American Journal Tropical Meicine and Hygiene* 2008; 78: 745-749.

- ✓ Osterberg T, Norinder U. Prediction of Polar Surface Area and Drug Transport Processes Using Simple Parameters and PLS Statistics. *Journal of Chemical Information and Computer Science* 2000; 40: 1408-1411.

- ✓ Oullette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates* 2004; 7: 257-266.

- ✓ Palma A, Yepes AF, Leal SM, Coronado CA, Escobar P. Synthesis and in vitro activity of new tetrahydronaphtho[1,2-b]azepine derivatives against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* parasites. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2009; 19: 2360–2363.

- ✓ Pomerantz, R. Primary HIV-1 resistance: a new phase in the epidemic?. *Journal of the American Medical Association* 1999; 282: 1177-1179.

- ✓ Reichwald C, Shimony O, Dunkel U, Sacerdoti-Sierra N, Jaffe C, Kunick C. 2-(3-Aryl-3-oxopropen-1-yl)-9-tert-butyl paullones: A New Antileishmanial Chemotype. *Journal of Medicine Chemistry* 2008; 51: 659–665.

- ✓ Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet Infectious Diseases* 2001; 7: 581-596.
- ✓ Rodríguez J, Gerpe A, Aguirre G, Kemmerling U, Piro OE, Arán VJ, Maya JD, Olea-Azar C, González M, Cerecetto H. Study of 5-nitroindazoles' anti-*Trypanosoma cruzi* mode of action: Electrochemical behaviour and ESR spectroscopic studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2009; 44: 1545–1553
- ✓ Rosa MdS, Mendonça-Filho RR, Bizzo HR, de Almeida I, Soares RM, Souto-Padrón T, Alviano CS, Lopes AH. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2003; 47: 1895-1901.
- ✓ Sanchez CL, Rodríguez LA, Niño ME. Perfil de morbilidad y mortalidad en Santander. *Revista del Observatorio de Salud Pública de Santander* 2007; 2: 3-30.
- ✓ Saravia NG, Nicholls RS. Leishmaniasis: un reto para la salud pública que exige concertación de voluntades y esfuerzos. *Biomédica suplemento editorial enfermedad de Chagas* 2006; 1(26).
- ✓ Sereno D, Cordeiro A, Mathieu-Daude F, Ouaiissi A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitology International* 2007; 56: 3–7.
- ✓ Seto M, Aramaki Y, Okawa T, Miyamoto N, Aikawa K, Kanzaki N, Niwa S, Baba M, Shiraishi M. Orally active CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents: synthesis and biological activity of 1-benzothiepine 1,1-dioxide and 1-benzazepine

derivatives containing a tertiary amine moiety. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2004; 52: 577-590.

- ✓ Seto M, Aramaki Y, Imoto H, Aikawa K, Oda T, Kanzaki N, Baba M, Shiraishi M. Orally active CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents 2: synthesis and biological activities of anilide derivatives containing a pyridine N-oxide moiety. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 2004; 52: 818-829.
- ✓ Seto M, Miyamoto N, Aikawa K, Aramaki Y, Kanzaki N, Iizawa Y, Baba M, Shiraishi M. Orally active CCR5 antagonists as anti-HIV-1 agents. Part 3: Synthesis and biological activities of 1-benzazepine derivatives containing a sulfoxide moiety. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2005; 13: 363-386.
- ✓ Shiraishi M, Aramaki Y, Seto M, Imoto H, Nishikawa Y, Kanzaki N, Okamoto M, Sawada H, Nishimura O, Baba M, Fujino M. Discovery of novel, potent, and selective small-molecule CCR5 antagonists as Anti-HIV-1 agents: Synthesis and biological evaluation of anilide derivatives with a quaternary ammonium moiety. *Journal of Medicinal Chemistry* 2000; 43: 2049-2063.
- ✓ Sinagra A, Luna C, Abraham D, Iannella MC, Riarte A, Krolewiecki AJ. The activity of azithromycin against *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the golden hamster model. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2007; 40: 627-630.
- ✓ Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of Infection and Chemotherapy* 2004; 10: 307-15.
- ✓ Schmunis GA. Prevention of Transfusional *Trypanosoma cruzi* Infection in Latin America. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 1999; 94: 93-101.

- ✓ Schmunis GA, Cruz JR. Safety of the Blood Supply in Latin America. *Clinical Microbiology Reviews* 2005; 8(1): 12-29.

- ✓ Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 2007; 102: 75-85.

- ✓ Souza EM, Lansiaux A, Bailly C, Wilson WD, Hu Q, Boykin DW, Batista MM, Araújo TC, Soeiro MNC. Phenyl substitution of furamidine markedly potentialtes its anti-parasitic Activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. *Biochemical Pharmacology* 2004; 68: 593-600.

- ✓ Soto J, Arana BA, Toledo J, Rizzo N, Vega JC, Diaz A, Luz M, Gutierrez P, Arboleda M, Berman JD, Junge K, Engel J, Sindermann H. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clinical Infectious Diseases* 2004; 38: 1266-72.

- ✓ Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J, Reed S, Tarleton R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of Clinical Investigation* 2008; 118: 1301-1310.

- ✓ Sudo K, Miyazaki Y, Kojima N, Kobayashi M, Suzuki H, Shintani M, Shimizu Y. YM-53403, a unique anti-respiratory syncytial virus agent with a novel mechanism of action. *Antiviral Research* 2005; 65: 125–131.

- ✓ Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Mishra M, Singh VP, Buffels RI. Single-dose liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in India: a multicenter study. *Clinical Infectious Disease* 2003; 37: 800–804.

- ✓ Tahara A, Tsukada J, Tomura Y, Suzuki T, Yatsu T, Shibasaki M. Effect of YM218, a nonpeptide vasopressin V1A receptor-selective antagonist, on rat mesangial cell hyperplasia and hypertrophy. *Vascular Pharmacology* 2007; 46: 463–469.

- ✓ Tamimi NAM, Ellis P. Drug Development: From Concept to Marketing!. *Nephron. Clinical Practice* 2009;113: c125–131.

- ✓ Toledo MJ, Guilherme AL, da Silva JC, de Gasperi MV, Mendes AP, Gomes ML, de Araújo SM. *Trypanosoma cruzi*: chemotherapy with benznidazole in mice inoculated with strains from Paraná state and from different endemic areas of Brazil. *Revista Instituto de Medicina Tropical Sao Paulo* 1997; 39: 283-90.

- ✓ Toledo MJ, Bahia MT, Carneiro CM, Martins-Fhilo OA, Tibayrenc M, Barnabé C et al. Chemotherapy with Benznidazole and Itraconazole for Mice Infected with Different *Trypanosoma cruzi* Clonal Genotypes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003;47: 223–230.

- ✓ Tsukamoto I, Koshio H, Akamatsu S, Kuramochi T, Saitoh C, Yatsu T, Yanai-Inamura H, Kitada C, Yamamoto E, Sakamoto S, Tsukamoto S. Preparation of (4,4-difluoro-1,2,3,4-tetrahydro-5H-1-benzazepin-5-ylidene) acetamide derivatives as novel arginine vasopressin V2 receptor agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2008; 16: 9524–9535.

- ✓ Tsukamoto I, Koshio H, Orita M, Saitoh C, Yanai-Inamura H, Kitada-Nozawa C, Yamamoto E, Yatsu T, Sakamoto S, Tsukamoto S. Optimization of (4,4-difluoro-1,2,3,4-tetrahydro-5H-1-benzazepine-5-ylidene) acetamide derivatives

as arginine vasopressin V2 receptor agonists and discussion of their binding modes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009; 17: 8161–8167.

- ✓ Twombly R. Slow start to Phase 0 as researchers debate value. *Journal of the National Cancer Institute* 2006; 98: 804–806.
- ✓ Urbina JA, Marchan E, Lazard K, Visbal G, Apitz-Castro R, Gil F, Aguirre T, Piras MM, Piras R. Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis and cell proliferation in *Trypanosoma cruzi* by ajoene, an antiplatelet compound isolated from garlic. *Biochemical Pharmacology* 1993; 45: 2381-2387.
- ✓ Urbina JA., Payares G, Contreras LM, Liendo A, Sanoja C, Molina J, Piras M, Perez N, Wincker P, Loebenberg D. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH56592 against *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi*: in vitro and in vivo studies. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 1998; 42: 1771–1777.
- ✓ Urbina JA, Lira, R, Visbal G, Bartrolí J. In vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2000; 44: 2498–2502.
- ✓ Urbina JA. Chemotherapy of Chagas Disease. *Current Pharmaceutical Design* 2002; 8: 287-295.
- ✓ Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends in Parasitology* 2003; 19: 495-501.
- ✓ Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Molina J, Lira R, Brener Z, Romanha AJ. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using

- the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. *International Journal of Antimicrobial Agents* 2003; 21: 39-48.
- ✓ Urbina JA. New chemotherapeutic approaches for the treatment of Chagas disease (American Trypanosomiasis). *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 2003; 13: 661-669.
 - ✓ Urbina JA, Concepcion JL, Caldera A, Payares G, Sanoja C, Otomo T, Hiyoshi H. In vitro and in vivo activities of E5700 and ER-119884, two novel orally active squalene synthase inhibitors, against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2004; 48: 2379-2387.
 - ✓ Urbina JA. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. *Memorias Instituto Oswaldo Cruz* 2009; 104: 311-318.
 - ✓ Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trópica* doi:10.1016/j.actatropica.2009.10.023.
 - ✓ Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of Medicinal Chemistry* 2002; 45: 2615-2623.
 - ✓ Velez ID, Hendrickx E, Robledo SM, Agudelo S. Leishmaniasis cutánea en Colombia y género. *Cadernos Saúde Pública* Rio de Janeiro 2001; 17:171-180.
 - ✓ Villareal D, Bernabé C, Sereno D, Tibayrenc M. Lack of correlation between in vitro susceptibility to Benzimidazole and phylogenetic diversity of *Trypanosoma*

- cruzi*, the agent of Chagas disease. *Experimental Parasitology* 2004; 108: 24-31.
- ✓ Vladimir VV, Vargas LY, Leal SM, Mora U, Coronado CA, Meléndez CM, Romero A, Escobar P. Target-oriented synthesis of antiparasitic 2-Hetaryl substituted quinolines base don imino Diels-Alder reactions. *Letter in Drugs Design & Discovery* 2007; 4: 293-296.
 - ✓ Waller RF, McConville MJ. Development changes in lysosome morphology and function *Leishmania* parasites. *International Journal for Parasitology* 2002; 32: 1435-1445.
 - ✓ Wang J, Urban L. The impact of early ADME profiling on drug discovery and development. *Drug Discovery World* 2004; 73-86.
 - ✓ Wendel S. Transfusion transmitted Chagas disease: Is it really under control?. Doi:10.1016/j.actatropica.2009.12.006.
 - ✓ WHO. Division of Control of Tropical Diseases. Chagas Disease Elimination. Burden and Trends. WHO web page. www.who.int/ctd/html/chagburtre.html.
 - ✓ Williams C, Espinosa OA, Montenegro H, Cubilla L, Capson TL, Ortega-Barría E, Romero LI. Hydrosoluble formazan XTT: its application to natural products drug discovery for *Leishmania*. *Journal of Microbiological Methods* 2003; 55: 813-816.
 - ✓ Yardley V, Croft SL. Activity of Liposomal Amphotericin B against Experimental Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1997; 41: 752–756.

- ✓ Yardley V, Croft SL. In vitro and in vivo activity of amphotericin B-lipid formulations against experimental *Trypanosoma cruzi* infections. The Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1999; 61: 193-197.
- ✓ Yardley V, Croft SL, De Doncker S, Dujardin JC, Koirala S, Rijal S, Miranda C, Llanos-Cuentas A, Chappuis F. The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to miltefosine. The American Journal of Tropical Medicine and Higiene 2005; 73: 272-275.
- ✓ Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. Memorias Instituto Oswaldo Cruz 2009; 104: 101-107.
- ✓ <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>
- ✓ <http://www.organic-chemistry.org/prog/peo/>
- ✓ Zeisig R, Rudolf M, Eue I, Arndt D. Influence of hexadecylphosphorylcholine on the release of tumor necrosis factor and nitroxide from peritoneal macrophages *in vitro*. Journal of Cancer Research and Clinical Oncology 1995; 121:69–75.
- ✓ Zuccotto F, Zvelebil M, Brun R, Chowdhury SF, Di Lucrezia R, Leal I, Maes L, Ruiz-Perez LM, Pacanowska DG, Gilbert IH. Novel inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase. European Journal of Medicinal Chemistry 2001; 36: 395–405.

8. DIVULGACIÓN DE RESULTADOS

Algunos de los resultados presentados en este trabajo de tesis fueron sometidos y/o publicados en una revista nacional e internacional. También fueron presentados en un congreso nacional e internacional en la modalidad de poster y presentación oral. Ver anexos

8.1. PONENCIAS EN CONGRESOS

8.1.1. Presentación oral

Evento: XIII Congreso Colombiano de Parasitología y Medicina Tropical. Medellín 2009.

Título: Actividad antiparasitaria de nuevos derivados de las 1-benzazepinas contra *T. cruzi* y *L. chagasi*.

Autores: Sandra Milena Leal, Andrés Felipe Yépes, Alirio Palma, Patricia Escobar.

8.1.2. Presentación de poster

Evento: 4th World congress on leishmaniasis. Lucknow, India, 2009

Título: Antiparasitic activity of novel tetrahydro-1-benzazepine derivates on *leishmania* and *Trypanosome cruzi* parasites.

Autores: Sandra Milena Leal, Patricia Escobar, Sandra Liliana Gómez and Alirio Palma.

8.2. ARTÍCULOS PUBLICADOS

8.2.1. Artículos nacionales

Autores: Sandra Milena Leal Pinto, Alirio Palma Rodríguez, Ederson Cuberos Jaimes, Nelson Galeano, Patricia Escobar Rivero

Título: Actividad antiparasitaria de nuevas dihidrodibenzo[c,f]tiazolo[3,2-a]azepin-3(2H)-onas contra *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi*.

Revista: Salud UIS 2009; 41(3): 268-274.

8.2.2. Artículos internacionales

Autores: Sandra Gómez-Ayala, Julián A. Castrillón, Alirio Palma, Sandra M. Leal, Patricia Escobar, Alí Bahsas

Título: Synthesis, structural elucidation and in vitro antiparasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* parasites of novel tetrahydro-1-benzazepine derivatives.

Revista: Bioorganic & Medicinal Chemistry 2010; (18): 47214739.