



UNIVERSIDAD MICHUACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

SÍNTESIS Y EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTITRIPANOSOMA Y ANTILEISHMANIA DE ANÁLOGOS DE NICARDIPINA CARENTES DE EFECTO BLOQUEADOR DE CANALES DE CALCIO

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADO DE :

MAESTRA EN CIENCIAS
EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

Q.F.B. SUSANA ALEJANDRA DAMIÁN MOSQUEDA

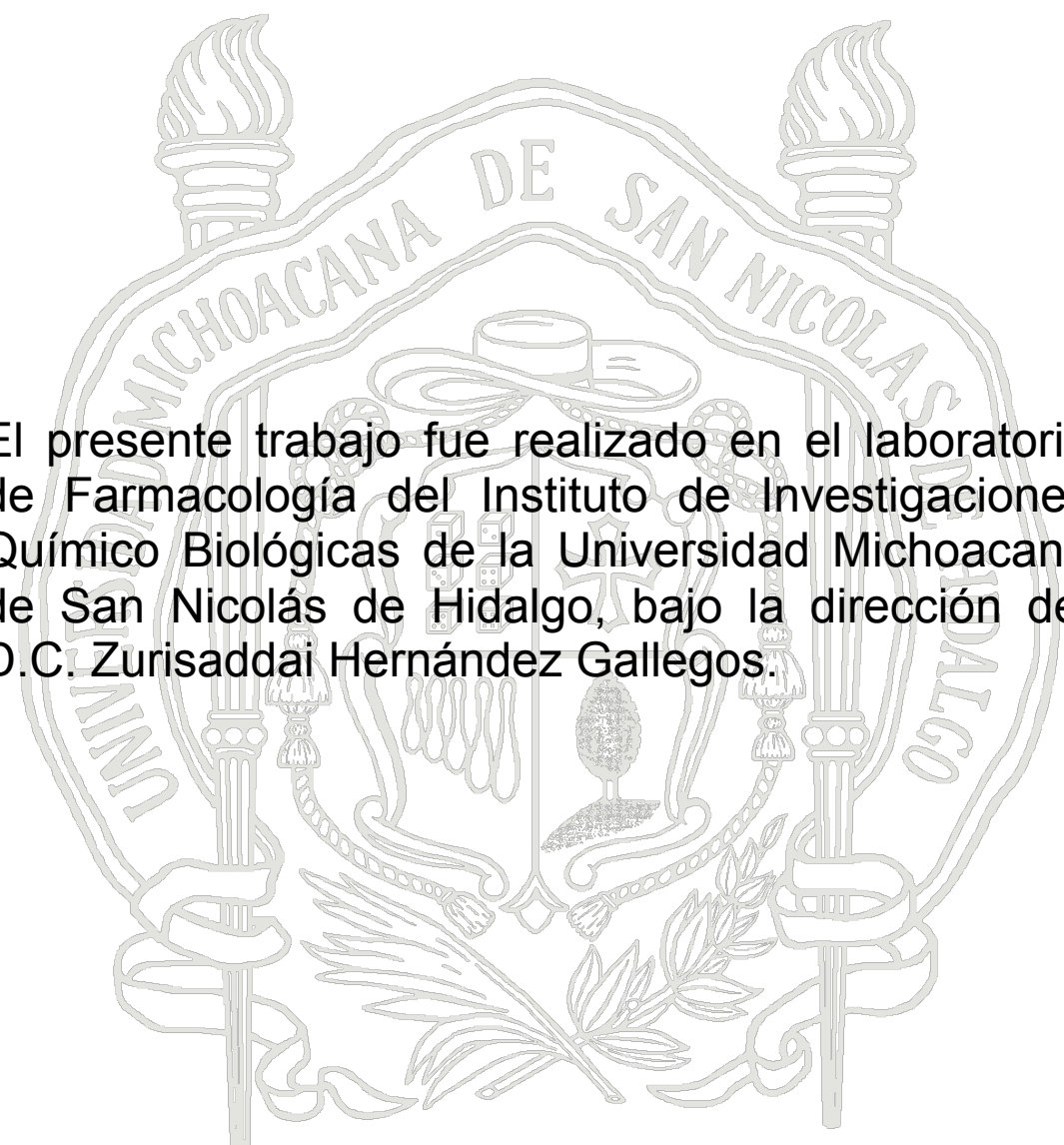
DIRECTORES:

DC. ZURISADDAI HERNÁNDEZ GALLEGOS

DC. BENJAMÍN NOGUEDA TORRES

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO.

FEBRERO 2013.

The background features a large, faint watermark of the seal of the University of Michoacán. The seal is circular and contains the text "UNIVERSIDAD MICHOCACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO" around its perimeter. In the center, there is a shield with various symbols, including a book, a quill, and a plant. Two torches are positioned on either side of the shield, and a banner is at the bottom.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Farmacología del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, bajo la dirección del D.C. Zurisaddai Hernández Gallegos.

DEDICATORIA

A mi familia por el amor y apoyo incondicional.

“Cuando se es muy joven y se sabe un poco, las montañas son montañas, el agua es agua y los árboles son árboles. Cuando se ha estudiado y se ha leído, las montañas ya no son montañas, el agua ya no es agua y los árboles ya no son árboles. Cuando se es sabio, nuevamente las montañas son montañas, el agua es agua y los árboles son árboles”.

Antiguo refrán del budismo Zen.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a **Dios** por darme el regalo de la vida y estar conmigo en cada paso que doy, por fortalecer mi corazón e iluminar mi mente y por haber puesto en mi camino a todas aquellas personas que han sido mi soporte y compañía durante todo el periodo de estudio, por darme a la maravillosa familia que tengo, por haberme dado salud para lograr mis objetivos y por ponerme siempre en el camino indicado.

A mis padres, mi mamá Rosa Mosqueda y a mi papá José Luis Damián mis grandes fortalezas, amigos y ejemplos a seguir por darme la dicha de ser su hija, por sus consejos, valores y motivación constante que me han permitido ser una persona de bien, pero más que nada, por su amor y apoyo incondicional.

A mi hermano, Juan Luis por ser el mejor hermano del mundo, por estar siempre a mi lado y por su apoyo en cada momento, te quiero.

A mi asesor, el **D.C. Zurisaddai Hernández Gallegos**, le agradezco por brindarme la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, por compartirme sus conocimientos, por su dedicación, interés y apoyo en todo momento así como por la paciencia y los recursos brindados para la realización de este trabajo.

Al D.C. Benjamín Noguera Torres y a la **D.C. Luvia Sánchez** por abrirme las puertas de su laboratorio, por la hospitalidad, amabilidad, enseñanza, paciencia y ayuda.

A los miembros de mi comité, el D.C. Daniel Godínez Hernández, al D.C. Mauro Martínez Pacheco y al D.C. Rafael Herrera Bucio, por acceder amablemente a formar parte de mi comité, por su interés en este proyecto pero sobre todo por sus comentarios y sugerencias en la revisión de este trabajo.

A los miembros del laboratorio de farmacología, a la M.C. Blanquita y a Sandy por su apoyo y amistad brindada.

A los miembros del departamento de química del IIQB, al D.C. Mario, al M.C. Juan Pablo, al M.C. José Luis y al Q.F.B. Manuel por sus consejos y ayuda, en especial al D.C. Mario y al M.C. Juan Pablo por compartirme sus conocimientos y sugerencias hacia mi trabajo.

A los miembros del laboratorio de helmintología del IPN a Rocio, Juan Carlos, Benjamín, al “ese”, a la M.C. Rosa por su compañía, apoyo, hospitalidad y enseñanza.

A mis compañeros del posgrado Deya, Ami, Nancy, Chio, Pao, Perla, Rafita, Chava, Mau, Omar, Eliseo y Dani por su compañía, compañerismo y cariño, en especial al M.C. Omar por su amistad incondicional y por todo el apoyo y consejos brindados tanto personales como profesionales.

A mis amigos que me apoyaron en todo momento en esta etapa de mi vida a Santiago, Daniel, Lin, Cesar y Clau por su amistad, hospitalidad, apoyo, consejos y por estar siempre conmigo pase lo que pase sobre todo a Daniel por su compañía y ayuda y por demostrarme lo grande que puede ser una amistad.

A Juan Carlos y Dulce por su apoyo y amistad, sobre todo a Juan Carlos ya que mas que mi compañero fue como un hermano para mí y despertó mi interés por la ciencia.

Al M.C. Javier Raya González por su amistad, apoyo y cariño brindado sobre todo por su ayuda para la realización de mi trabajo escrito.

A mis amigos de México Roger, Zeltzin y Andy por su compañía, hospitalidad y amistad.

A mis tios Salvador Zarate, fam Damián Delgadillo, mis tias Nene y Graciela Mosqueda García por su cariño, consejos y apoyo en cada momento sobre todo a Graciela que más que mi tía la considero como una segunda madre.

Al apoyo brindado por **Conacyt** y **Santander** ya que sin estos apoyos este trabajo no podría ser realizado.

INDICE DE CONTENIDO.....	i
INDICE DE FIGURAS.....	v
INDICE DE TABLAS.....	viii
INDICE DE ABREVIATURAS.....	ix
RESUMEN.....	xii
1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Enfermedad de Chagas.....	1
1.1.1 Formas de transmisión.....	2
1.1.2 Fases clínicas de la enfermedad.....	4
1.1.3 Agente etiológico: <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
1.1.3.1 Características morfológicas.....	8
1.1.3.2 Taxonomía.....	10
1.1.3.3 Ciclo de vida.....	10
1.1.4 Diagnóstico.....	12
1.1.5 Tratamiento.....	13
1.1.5.1 Nifurtimox (Nfx).....	13
1.1.5.2 Benznidazol (Bnz).....	15
1.2 Leishmaniosis.....	16
1.2.1 Formas de transmisión.....	16
1.2.2 Formas clínicas de la enfermedad.....	17
1.2.3 Agente etiológico.....	19
1.2.3.1 Características morfológicas.....	19
1.2.3.2 Taxonomía.....	20

1.2.3.3 Ciclo de vida.....	21
1.2.4 Diagnóstico.....	22
1.2.5 Tratamiento.....	22
1.2.5.1 Antimoniales pentavalentes.....	22
1.2.5.2 Terapia alterna.....	23
1.3 Búsqueda de nuevos compuestos anti-tripanosomatidos.....	24
1.4 Dihidropiridinas.....	24
2. JUSTIFICACIÓN.....	26
3. HIPÓTESIS.....	26
4. OBJETIVOS.....	26
4.1 Objetivo general.....	26
4.2 Objetivos particulares.....	26
5. MATERIALES.....	27
5.1 Materiales para la síntesis de DHPs	27
5.2 Materiales para determinar el efecto bloqueador de canales de calcio.....	27
5.2.1 Ratas.....	27
5.2.2 Solución de Krebs (normal)	27
5.2.3 Solución de Krebs alto en potasio sin calcio.....	28
5.2.4 Compuestos.....	28
5.2.5 Equipo para órgano aislado.....	28
5.3 Materiales para los ensayos del efecto tripanocida.....	28
5.3.1 Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	28

5.3.2 Ratones.....	29
5.3.3 Compuestos.....	29
5.4 Materiales para los ensayos del efecto leishmanicida.....	29
5.4.1 Cepa de <i>Leishmania mexicana</i>	29
5.4.2 Medio RPMI.....	30
5.4.3 Amortiguador de fosfatos salina (PBS)	30
5.4.4 Compuestos.....	30
5.5 Materiales para los ensayos de citotoxicidad.....	31
5.5.1 Línea celular.....	31
5.5.2 Medio mínimo esencial Eagle (MEM)	31
5.5.3 Solución de tripsina al 0.25%.....	31
5.5.4 Medio de MTT.....	32
5.5.5 Solución SDS-ácido clorhídrico.....	32
5.5.6 Amortiguador de fosfatos salina (PBS).....	32
5.5.7 Compuestos.....	32
6. METODOLOGIA.....	33
6.1 Diseño y síntesis de las DHPs.....	33
6.1.1 Síntesis del acetoacetato de N-bencil-N-metil-2-aminoetilo (3)	34
6.1.2 Síntesis general de las dihidropiridinas.....	34
6.1.3 Caracterización química.....	38
6.2 Evaluación biológica de las dihidropiridinas.....	38
6.2.1 Determinación del efecto relajante muscular.....	38

6.2.2 Evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de las dihidropiridinas sobre <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
6.2.3 Evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de las dihidropiridinas sobre <i>Leishmania mexicana</i> (MNYC/BZ/62/M379).....	41
6.2.4 Determinación de la citotoxicidad en células Vero.....	42
6.2.5. Análisis estadístico.....	43
7. RESULTADOS.....	44
7.1 Diseño y síntesis de DHPs.....	44
7.2 Elección de otras dihidropiridinas.....	46
7.3 Actividad biológica.....	68
7.3.1 Efecto relajante de las DHPs análogas a la nicardipina...68	
7.3.2 Efecto tripanocida <i>in vitro</i>	71
7.3.3 Efecto leishmanicida <i>in vitro</i>	75
7.3.4 Efecto citotóxico en células de mamífero.....	78
8. DISCUSION.....	81
8.1 Diseño y síntesis de las DHPs.....	81
8.2 Actividad biológica.....	84
8.2.1 Efecto relajante de las dihidropiridinas análogas a la nicardipina.....	84
8.2.2 Efecto tripanocida <i>in vitro</i>	86
8.2.3 Efecto leishmanicida <i>in vitro</i>	89
8.2.4 Efecto citotóxico en células de mamífero.....	90
9. CONCLUSIONES.....	92
10. REFERENCIAS.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Signos presentados en la fase aguda de la enfermedad de Chagas.	5
Figura 2. Aneurisma apical.....	6
Figura 3. Alteraciones fisiológicas en el esófago, provocadas por la enfermedad de Chagas. Megaesófago del I al IV.....	7
Figura 4. Fase de amastigote de <i>T. cruzi</i>	8
Figura 5. Fase de epimastigote de <i>T. cruzi</i>	9
Figura 6. Fase de tripomastigote de <i>T. cruzi</i>	9
Figura 7. Fases que presenta <i>T. cruzi</i> durante su ciclo de vida a nivel huésped y hospedero.....	11
Figura 8. Estructura química del nifurtimox.....	14
Figura 9. Estructura química del benznidazol.....	15
Figura 10. Distribución de leishmaniosis en México, del 2000 al 2009.....	17
Figura 11. Ulceración de leishmaniosis cutánea.....	18
Figura 12. Promastigotes de <i>Leishmania</i>	19
Figura 13. Macrófago parasitado con amastigotes de <i>Leishmania</i>	20
Figura 14. Ciclo de vida de <i>Leishmania spp</i>	21
Figura 15. Preparación de acetoacetato de N-benzil-N-metil-2-aminoetilo....	34
Figura 16. Procedimiento general para la preparación de las 1,4-dihidropiridinas.....	35
Figura 17. Espectro de RMN ¹ H del acetoacetato de etilo (3).....	47
Figura 18. Espectro de masas del acetoacetato de etilo (3).....	47
Figura 19. Espectro de RMN ¹ H del compuesto SAD1	51
Figura 20. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto SAD1	51

Figura 21. Análisis HETCOR del compuesto SAD1	52
Figura 22. Análisis DEPT del compuesto SAD1	52
Figura 23. Análisis COSY del compuesto SAD1	53
Figura 24. Espectro de masas del compuesto SAD1	53
Figura 25. Espectro de RMN ^1H del compuesto SAD2	54
Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto SAD2	54
Figura 27. Análisis HETCOR del compuesto SAD2	55
Figura 28. Espectro de masas del compuesto SAD2	55
Figura 29. Espectro de RMN ^1H del compuesto SAD3	56
Figura 30. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto SAD3	56
Figura 31. Análisis HETCOR del compuesto SAD3	57
Figura 32. Análisis DEPT del compuesto SAD3	57
Figura 33. Análisis COSY del compuesto SAD3	58
Figura 34. Espectro de masas del compuesto SAD3	58
Figura 35. Espectro de RMN ^1H del compuesto SAD4	59
Figura 36. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto SAD4	59
Figura 37. Análisis HETCOR del compuesto SAD4	60
Figura 38. Análisis DEPT del compuesto SAD4	60
Figura 39. Análisis COSY del compuesto SAD4	61
Figura 40. Espectro de masas del compuesto SAD4	61
Figura 41. Espectro de RMN ^1H del compuesto SAD5	62
Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto SAD5	62
Figura 43. Análisis HETCOR del compuesto SAD5	63

Figura 44. Análisis DEPT del compuesto SAD5	63
Figura 45. Análisis COSY del compuesto SAD5	64
Figura 46. Espectro de masas del compuesto SAD5	64
Figura 47. Espectro de RMN ¹ H del compuesto SAD6	65
Figura 48. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto SAD6	65
Figura 49. Análisis HETCOR del compuesto SAD6	66
Figura 50. Análisis COSY del compuesto SAD6	66
Figura 51. Espectro de masas del compuesto SAD6	67
Figura 52. Efecto de la serie SAD sobre anillos de aorta de rata.....	69
Figura 53. Efecto de la serie SMV sobre anillos de aorta de rata.....	69
Figura 54. Actividad tripanocida de la serie SAD sobre la cepa NINOA.....	72
Figura 55. Actividad tripanocida de la serie SMV sobre la cepa NINOA.....	72
Figura 56. Actividad tripanocida de la serie SAD sobre la cepa INC5.....	73
Figura 57. Actividad tripanocida de la serie SMV sobre la cepa INC5.....	73
Figura 58. Actividad leishmanicida <i>in vitro</i> de la serie SAD contra promastigotes de <i>L. mexicana</i>	76
Figura 59. Actividad leishmanicida <i>in vitro</i> de la serie SMV contra promastigotes de <i>L. mexicana</i>	76
Figura 60. Determinación de la citotoxicidad de la serie SAD.....	79
Figura 61. Determinación de la citotoxicidad de la serie SMV.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructura y rendimientos de las DHPs de la serie SAD.....	48
Tabla 2. Señales de RMN ¹ H de las DHPs sintetizadas.....	49
Tabla 3. Señales de RMN ¹³ C de las DHPs sintetizadas.....	50
Tabla 4. Estructura y pesos moleculares de las DHPs de la serie SMV.....	67
Tabla 5. Potencia relajante de las DHPs.....	70
Tabla 6. Actividad tripanocida <i>in vitro</i> de los derivados de nicardipina y fármacos de referencia contra dos cepas de <i>T. cruzi</i> (NINOA e INC5).....	74
Tabla 7. Efecto leishmanicida que presentan los análogos de la nicardipina contra <i>Leishmania mexicana</i> (MNYC/BZ/62/M379).....	77
Tabla 8. Efecto citotóxico de los análogos de la nicardipina y los compuestos de referencia.....	80

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

μL.....	Microlitros
μg/mL.....	Microgramos por mililitro
ANF.....	Anfotericina B
AA.....	Colorante Azul Alamar
ADN.....	Ácido desoxirribonucleico
BEC.....	Bloqueadores de la entrada de calcio
Bnz	Benznidazol
CI ₅₀	Concentración molar requerida para inhibir la contracción un 50%
CC ₅₀	Concentración a la cual se logra la toxicidad del 50% de las células en comparación al control negativo
CCF.....	Cromatografía en capa fina
COSY.....	Correlación espectroscópica (CORrelation SpectroscopY)
DHPs.....	1,4-dihidropiridinas
DMSO.....	Dimetilsulfóxido
DO.....	Densidad óptica
DEPT.....	Distorsionless Enhancement by Polarization Transfer
EM.....	Espectrometría de masas
ENCB.....	Escuela nacional de ciencias biológicas
ELISA.....	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
HETCOR....	Correlación heteronuclear (HETeronuclear CORrelation)
HPLC.....	Cromatografía líquida de alta eficacia

hr.....Horas

IPN..... Instituto Politécnico Nacional.

IFI.....Inmunofluorescencia indirecta

L. mexicana..*Leishmania mexicana*

MTT.....3-[4,5-dime- thylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)

MEM.....Medio esencial mínimo

mM.....Milimoles

M.....Moles

MHz.....Megahercio

Nfx.....Nifurtimox

NIC.....Nicardipina

NIT.....Nitrendipina

nm.....Nanómetros

OMS.....Organización Mundial de la Salud

PCR.....Reacción en Cadena de la Polimerasa.

PBS.....Amortiguador de fosfatos salina

RMN ¹H.....Resonancia magnética nuclear de hidrógeno

RMN ¹³C.....Resonancia magnética nuclear de carbono

rpm.....Revoluciones por minuto

SAD1.....D,L-2,6-dimetil-3-(N-bencil-N-metil-2-aminoethoxycarbonil)-4-(4-nitrofenil)-5-metoxycarbonil-1,4-dihidropiridina.

SAD2.....D,L-2,6-dimetil-3-(N-bencil-N-metil-2-aminoethoxycarbonil)-4-(4-tolual)-5-metoxycarbonil-1,4-dihidropiridina.

SAD3.....D,L-2,6-dimetil-3-(N-bencil-N-metil-2-aminoethoxycarbonil)-4-(4-fluorofenil)-5-metoxycarbonil-1,4-dihidropiridina.

SAD4.....D,L-2,6-dimetil-3-(N-bencil-N-metil-2-aminoethoxycarbonil)-4-(4-clorofenil)-5-metoxycarbonil-1,4-dihidropiridina.

SAD5.....D,L-2,6-dimetil-3-(N-bencil-N-metil-2-aminoethoxycarbonil)-4-(4-bromofenil)-5-metoxycarbonil-1,4-dihidropiridina.

SAD6.....D,L-2,6-dimetil-3-(N-bencil-N-metil-2-aminoethoxycarbonil)-4-fenil-5-metoxycarbonil-1,4-dihidropiridina.

SMV1.....Bis(2-(benzil(metil)amino)etil)-2,6-dimetil-4-(m-nitrofenil)-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato

SMV2.....Bis(2-(benzil(metil)amino)etil)-2,6-dimetil-4-(m-tolualdehido)-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato

SMV3.....Bis(2-(benzil(metil)amino)etil)-2,6-dimetil-4-(m-fluorofenil)-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato

SMV4.....Bis(2-(benzil(metil)amino)etil)-2,6-dimetil-4-(m-clorofenil)-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato

SMV5.....Bis(2-(benzil(metil)amino)etil)-2,6-dimetil-4-(m-bromofenil)-1,4-dihidropiridina-3,5-dicarboxilato

SMV6.....Bis(2-(benzil(metil)amino)etil)-2,6-dimetil-4-(fenil)-1,4-dihidropiridina-3,5 dicarboxilato

SFB.....Suero fetal bobino

SIDA.....Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida

T. cruzi.....*Tripanosoma cruzi*

TMS.....Tetrametilsilano

VIH.....Virus de la inmunodeficiencia humana

WB.....Western blot

RESUMEN

En el presente trabajo se sintetizaron seis análogos de la nicardipina con sustituyente (NO₂, CH₃, F, Cl, Br, ó H) en posición para del anillo 4-fenilo (serie SAD). Estas DHPs, junto con otra serie de seis análogos de nicardipina que presentaban los mismos sustituyentes en la posición meta del anillo 4-fenilo y con cadenas básicas en los esteres de las posiciones 3 y 5 del anillo 1,4-dihidropiridina (serie SMV), fueron evaluadas para determinar su efecto relajante en músculo liso vascular, su efecto tripanocida y leishmanicida, así como su citotoxicidad.

Los resultados obtenidos en la evaluación del efecto relajante de las DHPs de las series SAD y SMV muestran que las DHPs de ambas series son poco potentes o prácticamente inactivas, esto en comparación a los fármacos de referencias nicardipina y nitrendipina. En el caso de las DHPs de la serie SAD, los análogos con sustituyente de tamaño pequeño (H o F) fueron los únicos que presentaron actividad relajante. Lo que pone manifiesto los estrictos requerimientos estéricos del sitio de unión en el canal de calcio para acomodar los sustituyentes en la posición para del anillo 4-fenilo de las DHPs. Para las DHPs de la serie SMV, la baja o nula potencia relajante observada para todos los análogos podría estar más bien relacionada con cuestiones hidrofóbicas que restringen el acceso de este tipo de DHPs a su sitio de unión en el canal de calcio.

Los resultados de la evaluación in vitro en las cepas NINOA e INC5 de *T. cruzi*, indican claramente que varias de las DHPs ensayadas presentaron efecto tripanocida de interés. En la cepa NINOA, la nicardipina y ocho de sus análogos evaluados tuvieron un efecto tripanocida mayor que la del fármaco de referencia benznidazol, siendo los análogos de la serie SAD con NO₂, CH₃, los más potentes. En tanto que en la cepa INC5, los resultados fueron lo opuesto, teniendo el benznidazol una actividad tripanocida mayor al de la nicardipina y sus análogos ensayados. Los resultados de la evaluación del efecto tripanocida indican que las dos cepas de *T. cruzi* usadas (NINOA e INC5) difieren entre sí en cuanto a su respuesta (susceptibilidad) tanto a las DHPs como al benznidazol.

Los resultados obtenidos en la determinación del efecto leishmanicida (en la cepa MNYC/BZ/62/M379 de *L. mexicana*) indican que ninguno de los análogos de nicardipina ensayados fue más potente que la nicardipina, si bien en la mayoría de los casos tuvieron una potencia leishmanicida similar a la nicardipina. En la comparación con el fármaco de referencia anfotericina B, los resultados muestran que la nicardipina y sus análogos, aunque fueron menos potentes que la anfotericina, poseen una eficacia similar a ésta.

El uso de DHPs con bajo o nulo efecto relajante, permitió corroborar en forma definitiva la propuesta de que el efecto anti-tripanosoma y anti-leishmania de las DHPs no está relacionado con su efecto bloqueador de canales de calcio. A la vez que confirman la posibilidad de obtener DHPs que carezcan de actividad como BECs, pero que presenten efecto importante contra *T. cruzi* y *Leishmania*.

El ensayo del efecto citotóxico en células Vero reveló que las transformaciones estructurales de la nicardipina, presentes en las DHPs de las series SAD y SMV, resultó en la mayoría de los casos en la obtención de compuestos menos citotóxicos en comparación a la misma nicardipina y a la anfotericina B. Lo que representa una ventaja desde el punto de vista de seguridad farmacológica.

Los resultados de este estudio nos indican que el efecto tripanocida y leishmanicida, así como el potencial citotóxico de la mayoría de las DHPs estudiadas son de interés para continuar con sus estudios posteriores en el modelo murino *in vivo*.

1.- INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas y la leishmaniosis son causadas por parásitos protistas de la familia Trypanosomatidae, y son transmitidas a través de vector (El-Sayed *et al.*, 2005b; De Souza, 2002). Estas patologías se encuentran dentro de las 17 enfermedades desatendidas, según la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Kemmerling *et al.*, 2010; Rojas-Aguirre *et al.*, 2012). Estas enfermedades tienen gran importancia médica y veterinaria a nivel mundial debido a la mortalidad, morbilidad e impacto económico que causan (De Souza, 2002, De Souza *et al.*, 2010; Tripodi *et al.*, 2011; Quijano-Hernández y Dumonteil, 2011). En décadas pasadas, se creía que estas enfermedades eran solo de países pobres, sin embargo, debido a la constante migración de la población, actualmente también se encuentran presentes en países desarrollados (El-Sayed *et al.*, 2005a).

El genoma de los agentes causales de la enfermedad de Chagas y la tripanosomiasis ya está secuenciado, sin embargo aún no se cuenta con vacunas para estas enfermedades (Ivens, 2005; El-Sayed *et al.*, 2005a; Quijano-Hernández y Dumonteil, 2011). Por ello, el tratamiento actual para combatirlas es a través de medicamentos, varios de los cuales llevan más de 40 años en el mercado y son ineficaces en muchos casos debido a que varias cepas de los parásitos han desarrollado resistencia a ellos. Además, el tratamiento con base en los fármacos existentes es prolongado y es frecuente que se presenten efectos secundarios severos (De Castro *et al.*, 2011; Fidalgo y Gille, 2011; Polanco-Hernández *et al.*, 2012).

1.1 Enfermedad de Chagas

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana fue descrita por primera vez por el médico brasileño Carlos Chagas en 1909, quien descubrió la enfermedad, el agente causal y el vector que la transmite (Chagas, 1909; Lannes-Vieira *et al.*, 2010; Ramos *et al.*, 2011). Esta enfermedad es causada por un protozoo flagelado llamado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), el cual es transmitido principalmente por un vector hematófago de la subfamilia Triatominae, conocido comúnmente en México como chinche besucona (Kemmerling *et al.*, 2010; Roca *et al.*, 2011). La

enfermedad de Chagas era considerada endémica de América latina. Sin embargo, debido a la migración poblacional actual, se convirtió en una enfermedad emergente en otros países del mundo, reportándose casos en España, EUA, Canadá y Australia, entre otros. (Lannes-Vieira *et al.*, 2010; Kemmerling *et al.*, 2010; Rassi Jr *et al.*, 2010; Soeiro, 2011).

En la actualidad se considera que a nivel mundial 16 millones de personas se encuentran infectadas con la enfermedad de Chagas y de 25 a 90 millones están en riesgo de adquirirla (Hotez, 2008; OMS, 2010; Díaz-Chiguer *et al.*, 2011). Cada año se reportan aproximadamente 50,000 nuevos casos (Soares *et al.*, 2012), con un índice de mortalidad del 20 al 40% de los pacientes infectados (Quijano-Hernández, 2011).

En México existen regiones endémicas como son los estados de: Morelos, Michoacán, Oaxaca, Jalisco, Hidalgo, Nayarit, Yucatán y Chiapas. En este último, se han reportado comunidades con hasta el 30% de la población infectada (Vidal-Acosta *et al.*, 2000; Lozano *et al.*, 2008).

1.1.1 Formas de transmisión

Las personas pueden adquirir la enfermedad de Chagas mediante diferentes mecanismos de transmisión, entre los que se tienen:

- Transmisión por vector. Esta es llevada a cabo por varias especies de triatomos hematófagos y es considerada la principal forma de transmisión en países endémicos (90%). Se conocen más de 100 especies de triatomos, de las cuales 34 están ampliamente distribuidas en el territorio mexicano y 19 de éstas se han encontrado naturalmente infectadas con el parásito *T. cruzi* (Prata, 2001; Rodríguez-Bataz *et al.*, 2011). Considerándose a *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus*, y *Triatoma dimidiata* como las tres especies más importantes en la transmisión de *T. cruzi* (Rassi *et al.*, 2010; Wilkinson *et al.*, 2008; Soeiro y De Castro, 2011).
- Transmisión por transfusión sanguínea. El riesgo de adquirir esta infección por esta vía es del 10 al 20 %, debido a que depende de diversos factores, como son: la concentración de parásitos en la sangre contaminada, la cepa del parásito y el componente de sangre transfundido (existe un mayor riesgo

en transfusión de plaquetas en comparación a otros componentes sanguíneos). Esta forma de transmisión es considerada la principal en países no endémicos. Debido al aumento en el número de infecciones por esta forma de transmisión, a partir de 1993 se exigió el tamizaje para *T. cruzi* en las unidades para transfusiones sanguíneas (NOM-003-SSA2-1993; Prata, 2001; Bern *et al.*, 2007; Roca *et al.*, 2011).

- Transmisión congénita o vertical. En este caso la infección resulta de la transmisión de parásitos vivos de una mujer embarazada infectada a su producto, persistiendo ésta después del nacimiento. La transmisión se puede dar en la fase aguda y crónica de la infección en la madre. En zonas endémicas, la transmisión de la enfermedad ocurre entre 1 al 21% de las mujeres embarazadas que se encuentran en la fase crónica. Se estima que cada año se diagnostican de 5,000 a 18,000 casos nuevos de infecciones por esta vía (Vidal-Acosta *et al.*, 2000; Prata, 2001; Secretaría de Salud, 2008; De Castro *et al.*, 2011). La definición de infección congénita debe cumplir con los siguientes criterios: que la madre serológicamente reactiva no debió haber recibido transfusiones sanguíneas y que el recién nacido debe ser serológicamente positivo, manteniéndose así más allá de los seis meses de vida (OPS, 2005).
- Transmisión por trasplante de órganos. La infección se da por el trasplante de órganos entre un donante chagásico y un receptor seronegativo. Cuando existe el conocimiento que el donante padece la enfermedad, se intenta una prevención (primaria) a través de la quimioprofilaxis, suministrando fármaco por diez días antes del acto quirúrgico al donante y por los diez días subsiguientes al receptor (Kemmerling *et al.*, 2010; Roca *et al.*, 2011; Carlier *et al.*, 2012).
- Accidentes en el laboratorio. La transmisión por esta vía se da cuando ocurren accidentes por el mal manejo del vector infectado o de muestras sanguíneas infectadas con el parásito (Vaidian *et al.*, 2004; Wilkinson, 2008; De Castro *et al.*, 2011).
- Ingestión de bebidas y comida contaminada. Esta vía está generalmente asociada al consumo de bebidas y comida contaminada con heces de chinches infectadas, resultando en una enfermedad aguda severa y de alta

mortalidad (Blum *et al.*, 2008; Rassi *et al.*, 2010).

- Otras. Por leche, coito o transmisión nosocomial (Wilkinson *et al.*, 2008).

1.1.2 Fases clínicas de la enfermedad

La infección con *Trypanosoma cruzi* tiene un período de incubación de 4 a 10 días, generalmente sin síntomas y posteriormente pueden presentar las siguientes fases clínicas:

- **Fase aguda:** Esta fase suele durar de 4 a 8 semanas y es generalmente asintomática. Sólo se presentan síntomas en el 5% de los casos, los cuales aparecen entre la primera y la segunda semana después de que la persona se infecta (Rassi *et al.*, 2010). En esta fase se presenta una parasitemia relativamente alta, fiebre prolongada, malestar, náuseas, edema en las extremidades y cara, agrandamiento del hígado, bazo y ganglios linfáticos, adenopatía generalizada, esplenomegalia moderada y afección en el sistema nervioso, principalmente en niños. En el caso particular de transmisión vectorial, la fase aguda se caracteriza por la aparición del chagoma (llaga en la piel sobre el sitio de entrada del parásito) o del signo de Romaña (edema ocular unilateral que se produce cuando el parásito entra por la conjuntiva) (**figura 1**) (Dumonteil, 1999; Rassi *et al.*, 2010).

La mortalidad durante esta fase es del 5 al 10% de los casos sintomáticos, como resultado de la miocarditis, la meningoencefalitis grave, o de ambas (De Souza, 2002). La mortalidad en esta etapa parece depender hasta cierto punto de la cepa particular del parásito. En la mayoría de los enfermos los síntomas desaparecen y se produce una aparente recuperación de la miocarditis.



Figura 1. Signos presentados en la fase aguda de la enfermedad de Chagas. a) signo de Romaña, b) chagoma. (Tomada de Rassi *et al.*, 2010).

- **Fase crónica.** Esta fase generalmente inicia con un periodo prolongado de latencia clínica, llamada forma indeterminada, la cual es asintomática. Posteriormente los pacientes pueden pasar a un periodo sintomático, en donde se presentan manifestaciones que comprometen ciertos órganos, como son, el corazón, el esófago, el colon y el sistema nervioso central. Esta última etapa es grave y causa muerte prematura (Prata, 2001).
- **Fase latente o crónica indeterminada.** Esta fase persiste durante largos periodos (10 a 30 años, e incluso toda la vida) y la presentan del 60 al 80% de los individuos infectados (Bern *et al.*, 2007; Roca *et al.*, 2011). En la fase latente el parásito está contenido en el sistema inmune del huésped o secuestrado en el espacio intracelular, protegido de la destrucción. Esta fase se caracteriza por la ausencia de síntomas; la respuesta inmune celular y el electrocardiograma, así como los exámenes radiológicos del corazón, el esófago y el colon son normales. A pesar de ello, las pruebas serológicas (hemoaglutinación directa o indirecta, reacción de fijación de complemento, ELISA, PCR) arrojan resultados positivos, indicando la presencia de infección y ayudando al diagnóstico en esta fase (Prata, 2001; Vaidian *et al.*, 2004). En la fase latente se presenta baja morbilidad y los pacientes infectados son capaces de realizar cualquier tipo de actividad (Vaidian *et al.*, 2004).

- **Fase crónica sintomática.** Esta fase ocurre de 10 a 30 años posteriores al inicio de la infección y la presentan del 30 al 40% de las personas infectadas. En esta fase el paciente presenta daño en los tejidos, principalmente de los órganos huecos como el corazón (cardiomiopatía) y el intestino (megaesófago, megacolon o una combinación de ambas) dificultando el tránsito de heces (Rassi *et al.*, 2010). También se han descrito dilatación de esófago, hepatomegalia y crecimiento anormal de la vejiga, así como afección de glándulas suprarrenales, árbol bronquial y sistema nervioso central (Dumonteil, 1999; De Souza, 2002; OPS, 2005; Kemmerling *et al.*, 2010). Durante esta fase se pueden presentar las siguientes afecciones:

Miocardopatía chagásica crónica. Es la manifestación más seria y frecuente de la enfermedad de Chagas y se desarrolla en 20 al 30% de los individuos infectados. Esta cardiopatía se caracteriza por insuficiencia del corazón (miocardopatía dilatada), anomalías en el sistema de conducción (bradicardias y taquicardia) y frecuentemente se presenta aneurisma apical con o sin trombos (**figura 2**). La sintomatología que se presenta incluye la disnea de esfuerzo, las palpitaciones, dolor torácico y cuadros sincopales. Los pacientes pueden presentar paro cardíaco, tromboembolia, bloqueo atrioventricular, arritmias complejas y graves, que pueden desencadenar en la muerte súbita (Rassi *et al.*, 2007; Kemmerling *et al.*, 2010; Lannes-Vieira *et al.*, 2010).

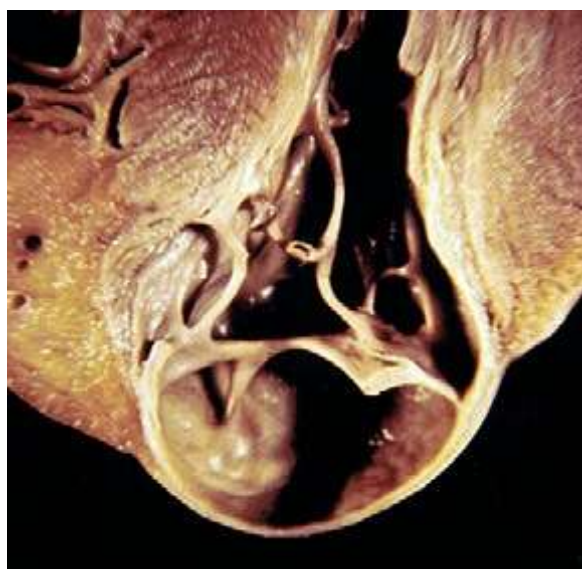


Figura 2. Aneurisma apical. Tomada de Rassi *et al.*, 2010.

Alteraciones en el aparato digestivo. Estas son causadas por la destrucción de ganglios y se presentan en el 15 al 20% de pacientes chagásicos, afectándose la motilidad, secreción, forma, así como la absorción en el tracto digestivo, (Prata, 2001; OPS, 2005). Los cambios en la motilidad originan primeramente con tránsito lento y dificultad en el vaciado, seguido por aumento del calibre del órgano y el aumento de dificultad para vaciar, dando así lugar a la presencia de megaesófago (grado I a IV) o megacolon (**figura 3**).

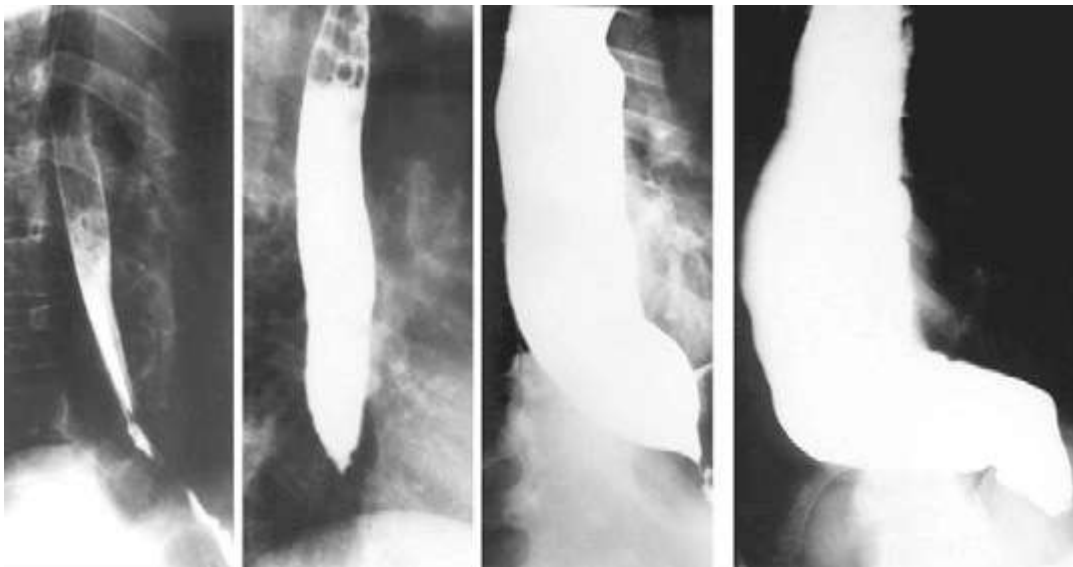


Figura 3. Alteraciones fisiológicas en el esófago, provocadas por la enfermedad de Chagas. Megaesófago del I al IV. Tomada de Rassi *et al.*, 2010.

Alteraciones a nivel del sistema nervioso. La enfermedad de Chagas produce alteraciones a nivel de sistema nervioso autónomo en 10 al 15% de los pacientes infectados crónicos, lo cual se demuestra por la presencia de lesiones, denervación y desordenes funcionales. Dando como resultado síntomas inespecíficos, entre ellos: disfagia, pirosis por reflujo, dispepsia por vaciamiento gástrico retardado, constipación, vólvulo intestinal o el fecaloma (OPS, 2005). También ocurren alteraciones en el equilibrio homeostático, manifestándose en desordenes metabólicos (relacionados a desordenes en el metabolismo de carbohidratos, lípidos y agua-sal) (Prata, 2001).

Reactivación de la enfermedad. Las sustancias o condiciones que llevan a una inmunodepresión pueden provocar una reactivación de la enfermedad.

Esto conduce a un aumento de la parasitemia y replicación intracelular del parásito, causando lesiones necróticas en el cerebro hasta de un 75% de los casos, así como también puede intensificarse la miocarditis existente. La reactivación de la enfermedad de Chagas ocurre de manera frecuente cuando hay coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), la presencia de otras enfermedades como leucemia, se realiza trasplante de órganos o se administran drogas inmunosupresoras (Vaidian *et al.*, 2004; OPS, 2005 y De Castro, 2011). Los síntomas de reactivación incluyen fiebre, miocarditis, meningoencefalitis, nódulos subcutáneos y debilidad (Blum *et al.*, 2008).

1.1.3 Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*

1.1.3.1 Características morfológicas

Trypanosoma cruzi cambia de morfología dependiendo del medio ambiente en donde se encuentre. Este parásito posee una sola mitocondria (cinetoplasto), que se extiende a través de todo el cuerpo celular y que está compuesta por esteroides principalmente (De Souza, 2002). *T. cruzi* presenta tres estados morfológicos caracterizados por la posición relativa del flagelo, del cinetoplasto y del núcleo (Kemmerling *et al.*, 2010).

Amastigote. Esta forma se encuentra en los huéspedes mamíferos, es redondeada u ovalada; mide entre 2 y 7 μm . El amastigote presenta un cinetoplasto excéntrico en forma de bastoncillo y mediante análisis por microscopía electrónica se puede observar un corto e inconspicuo flagelo. Los amastigotes se multiplican intracelularmente en las células del mamífero huésped y se pueden obtener *in vitro* en cultivos de células musculares, fibroblastos y macrófagos (De Souza *et al.*, 2010, Bero *et al.*, 2011).

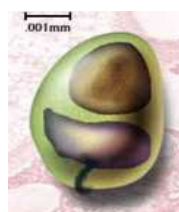


Figura 4. Fase de amastigote de *T. cruzi*. www.uta.edu

Epimastigote. Esta forma de *T. cruzi* es fusiforme y mide entre 20 y 40 μm . El epimastigote se caracteriza porque el cinetoplasto y el receptáculo flagelar se encuentran en una posición anterior al núcleo y fusiforme, además de presentar un flagelo y una membrana ondulante cortos. El epimastigote es la fase multiplicativa que se halla en el intestino anterior de los triatomíneos y es la forma predominante en cultivos axénicos de *T. cruzi* (De Souza, 2002; Kemmerling *et al.*, 2010).

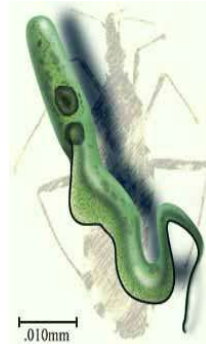


Figura 5. Fase de epimastigote de *T. cruzi*. www.uta.edu

Tripomastigote. La forma de tripomastigote es la fase infecciosa no multiplicativa del parásito, tiene forma de C, U o S, y mide entre 15 y 20 μm de longitud. En el tripomastigote el cinetoplasto se localiza en el extremo posterior de parásito después del núcleo y el flagelo emerge del receptáculo flagelar (el cual se encuentra cerca del cinetoplasto). Esta forma también presenta una membrana ondulante a todo lo largo de la célula. Los tripomastigotes pueden ser de dos tipos: los tripomastigotes metacíclicos, los cuales se establecen en la luz del recto de los triatomíneos y son excretados en sus heces y orina, y los tripomastigotes sanguíneos, los cuales se encuentran en la sangre del huésped vertebrado (De Souza, 2002; Kemmerling *et al.*, 2010).



Figura 6. Fase de tripomastigote de *T. cruzi*. www.uta.edu

1.1.3.2 Taxonomía

La clasificación taxonómica de *T. cruzi* es la siguiente (Wilkinson, *et al.*, 2008):

Subreino: Protozoa.

Tipo: Sarcomastigophora.

Subtipo: Mastigophora.

Clase: Zoomastigophorea.

Orden: Kinetoplastida.

Suborden: Trypanosomatina.

Familia: Trypanosomatidae.

Género: *Trypanosoma*.

Subgénero: *Schizotrypanum*.

Especie: *cruzi*.

1.1.3.3 Ciclo de vida

El ciclo de vida de *T. cruzi* es complejo, presentando varios estados de desarrollo tanto en el vector como en el huésped. El ciclo biológico del *T. cruzi* inicia cuando insectos hematófagos de la familia Reduviidae (subfamilia Triatominae) se alimentan de un mamífero infectado succionando la sangre contaminada con tripomastigotes. Una vez ingeridos, la mayoría de los tripomastigotes se lisan en el estómago del insecto. Los tripomastigotes sobrevivientes llegan al intestino, en donde se transforman en epimastigotes y se dividen repetidamente por medio de fisión binaria. Posteriormente (3 ó 4 días de la ingestión de la sangre), los parásitos llegan al intestino medio posterior del vector en donde se transforman de epimastigotes no infectivos a tripomastigotes metacíclicos (fase del parásito altamente infectiva para el humano). Estos son eliminados en sus heces y orina; la duración de esta parte del ciclo es de 6-15 días, dependiendo del estado y de la temperatura del vector. Cuando el vector se alimenta de un mamífero sano, también deposita sobre él sus heces y orina y así el parásito puede entrar a través de

mucosas (oculares, nasales o bucales) o piel dañadas. Dentro del mamífero los parásitos son fagocitados por macrófagos y leucocitos (Bern *et al.*, 2007; Quijano-Hernández y Dumonteil, 2011). En los macrófagos, los tripomastigotes metacíclicos se transforman en amastigotes, los cuales permanecen quiescentes de 24 a 35 horas y después se dividen por fisión binaria. Los amastigotes se transforman en tripomastigotes dentro del macrófago, forma en la que abandonan la célula en pocos minutos lisando el macrófago y liberándose a la circulación sanguínea. Una parte de los tripomastigotes circulante invaden tejidos (como el miocardio, el músculo esquelético, el músculo liso visceral, las células gliales del sistema nervioso y la placenta) donde adquieren nuevamente la forma de amastigotes, formando en esos tejidos los llamados pseudoquistes. Por otro lado, los tripomastigotes que quedaron en la circulación, pueden ser absorbidos por otro triatomino, infectado o no, para ser llevados posteriormente a su intestino, y de esa manera completar el ciclo (**figura 7**) (De Souza *et al.*, 2010; Soeiro, 2011).

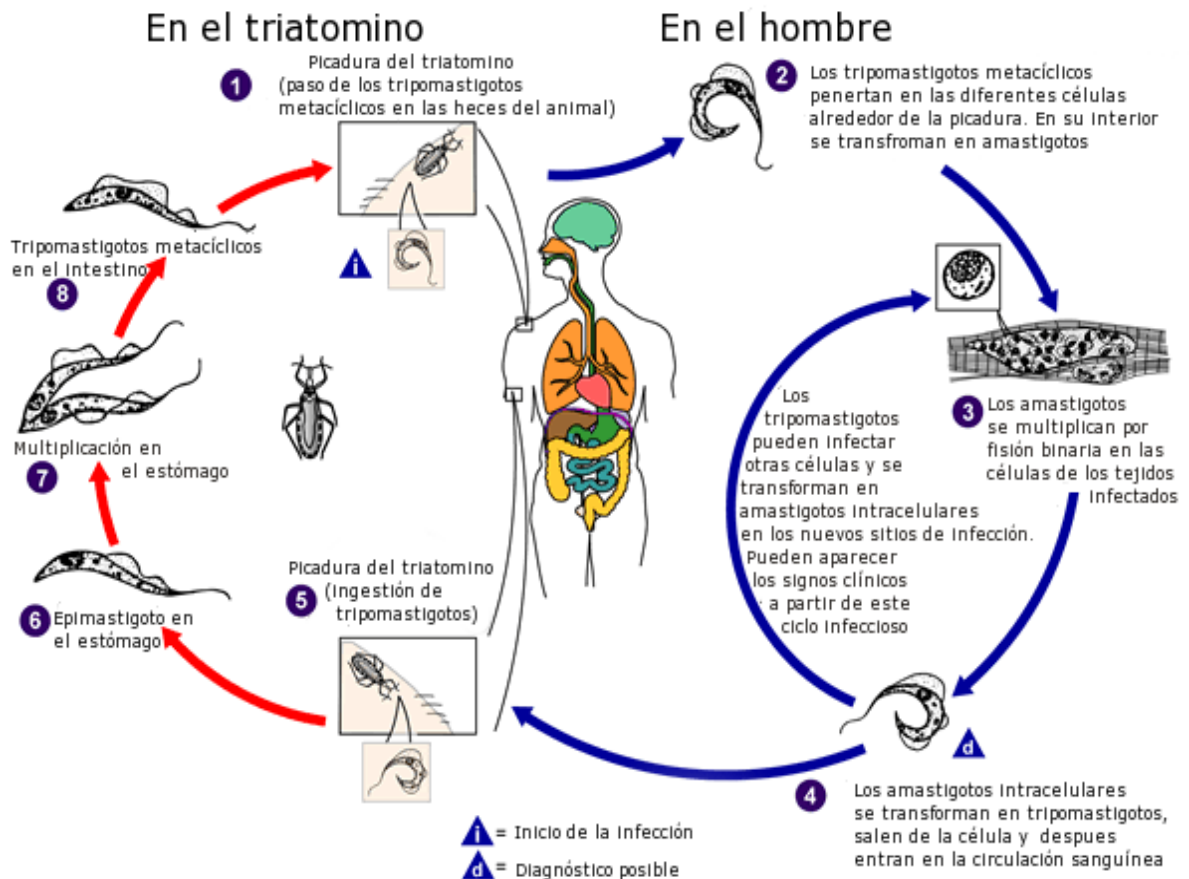


Figura 7. Fases que presenta *T. cruzi* durante su ciclo de vida a nivel huésped y hospedero. Tomada de CDC, 2004.

1.1.4 Diagnóstico

El diagnóstico etiológico de la enfermedad de Chagas se basa en el trípole: clínica, epidemiología y laboratorio. El diagnóstico de la infección aguda está basado en la detección microscópica de tripomastigotes de *T. cruzi* en sangre periférica. Este es un método 100 % específico, pero de baja sensibilidad, arrojando un gran número de falsos negativos, ya que la observación de los tripomastigotes depende del tamaño de la gota y la cantidad de parásitos circulantes, además de que la parasitemia disminuye dentro de los 90 días de la infección, incluso sin tratamiento. Este examen es el más recomendado en el caso de infección congénita durante el primer mes de vida del infante (Bern *et al.*, 2007). Otros métodos comúnmente usados para diagnosticar la enfermedad son:

El método de Strout: la sangre a examinar es sometida a centrifugación para concentrar los elementos parasitarios presentes en la muestra. La especificidad es del 100% y la sensibilidad del 95%.

Microhematocrito: este método es recomendado en los recién nacidos, de los cuales se sospecha infección congénita, por la escasa cantidad de sangre utilizada. La sangre es extraída por capilaridad, mediante punción digital o plantar en tubos de microhematocrito, para ser centrifugado posteriormente. Su sensibilidad es del 95 % y la especificidad del 100%.

Hemocultivo: consiste en la siembra de sangre venosa en un medio apropiado, en busca de crecimiento parasitario.

Xenodiagnóstico: consiste en alimentar triatominos (chinches) de laboratorio (no infectadas) con sangre del paciente, para posteriormente examinar al microscopio el contenido intestinal de los triatominos en búsqueda de parásitos. Este método tiene una sensibilidad del 92%.

Serología: es el método más usado para el diagnóstico en la fase crónica de la enfermedad, en donde se pone de manifiesto la presencia de anticuerpos IgG (generados por la respuesta inmune humoral específica frente a *T. cruzi*) a través de su interacción con antígenos. Las técnicas más usadas son: ELISA (Enzymed Linked Inmuno Sorbent Assay), actualmente es la técnica de diagnóstico más difundida debido a su alta sensibilidad; y la

inmunofluorescencia indirecta (IFI) que presenta una sensibilidad de 100 % en la etapa crónica de la enfermedad y su especificidad es cercana al 100 %.

Hemaglutinación indirecta o directa: se considera una técnica sencilla con limitaciones operativas, pero de adecuada sensibilidad y especificidad; PCR (polimerase chain reaction): en este procedimiento se amplifica el ADN del parásito. A pesar de que esta técnica no es comúnmente usada por su elevado costo, presenta una mayor sensibilidad en comparación con otros métodos parasitológicos, además de que puede ser útil para el diagnóstico de la enfermedad en cualquiera de sus etapas (OPS 2005; Carlier *et al.*, 2012).

1.1.5 Tratamiento

A pesar de que el genoma de *T. cruzi* ya está secuenciado, no existe a la fecha una vacuna contra el agente causal de la enfermedad de Chagas y la única terapia utilizada para su tratamiento antiparasitario se basa en dos fármacos nitro derivados: el nifurtimox (Nfx, [3-metil-4-(5'-nitro-furfurylideneamine) tetrahidro-4H-1,4-tiazine-1,1-dioxide]) y el benznidazol (Bzn, N-benzil-2-nitroimidazol acetamida) desarrollados hace más de cuatro décadas por Bayer y Roche, respectivamente (Lannes-Vieira *et al.*, 2010; De Castro *et al.*, 2011; Díaz-Chiguer *et al.*, 2011). Estos dos fármacos presentan una actividad significativa en la fase aguda de la enfermedad, con una cura parasitológica del 60 al 85% de los pacientes tratados y en más del 90% en niños infectados congénitamente, tratados durante el primer año de vida (Fidalgo y Gille, 2011). Esta terapia farmacológica está lejos de ser ideal debido a sus múltiples efectos secundarios, a su eficacia limitada contra diferentes cepas del parásito, a lo prolongado del tratamiento, y a que presentan una actividad pobre en la fase crónica de la enfermedad (De Castro *et al.*, 2011).

1.1.5.1 Nifurtimox (Nfx)

El nifurtimox (Lampit, Bayer 2502), fue introducido al mercado en 1965 y es activo contra tripomastigotes y amastigotes de *T. cruzi*. El mecanismo de acción de este fármaco implica la reducción de su grupo nitro, dando lugar a radicales inestables, nitroaniones, los cuales reaccionan con oxígeno para

producir metabolitos altamente tóxicos (anión superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo). Se sabe que *T. cruzi* es deficiente en mecanismos de detoxificación para especies reactivas de oxígeno, particularmente peróxido de hidrógeno, lo que hace que sea sensible al estrés oxidativo inducido por el Nfx (Díaz de Toranzo *et al.*, 1988). Este daño oxidativo provoca alteraciones celulares en el parásito, daño al ADN, peroxidación de lípidos y oxidación en los grupos tiol de sus proteínas (Wilkinson *et al.*, 2008).

El Nfx es rápidamente absorbido en el tracto gastrointestinal, pasando al hígado donde es metabolizado por el sistema de citocromo P450 (nitroreducción) y posteriormente se excreta principalmente por vía renal. La concentración máxima del Nfx en sangre se detecta una hora posterior a la toma y los niveles empiezan a disminuir a las 3 horas, siendo no detectables después de un día. Por lo que es necesario administrarlo cada 6 horas para mantener niveles adecuados del Nfx en sangre.

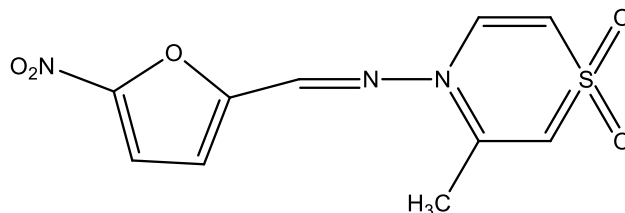


Figura 8. Estructura química del nifurtimox.

El Nfx no está disponible en la mayoría de los países por sus graves efectos secundarios que forzan aproximadamente a la mitad de los pacientes a abandonar el tratamiento (Pinto-Dias, 2003). A nivel del tracto gastrointestinal los efectos secundarios son: anorexia, pérdida de peso, náuseas, vómito y dolor abdominal. La toxicidad en el sistema nervioso central incluye: daño neurológico, inquietud, neuropatía periférica, temblores, insomnio, irritabilidad, mialgias, desorientación y convulsiones. Además, el Nfx también puede causar daño testicular y ovárico, así como anemia hemolítica en individuos deficientes en glucosa 6P. Los efectos secundarios del Nfx frecuentemente desaparecen cuando se suspende el tratamiento (Bern *et al.*, 2007).

1.1.5.2 Benznidazol (Bnz)

El benznidazol (Radanil, Rochagan, Roche 7-1051) es un derivado nitroimidazol, introducido en 1971. Este fármaco actúa contra las formas tripomastigote y amastigote de *T. cruzi*. Su mecanismo de acción es a través de provocar estrés reductivo, el cual se lleva a cabo cuando el parásito biotransforma el benznidazol a metabolitos reactivos, los cuales se unen covalentemente a su ADN, proteínas y lípidos, causando su muerte.

Este fármaco es rápidamente absorbido en el tracto gastrointestinal y metabolizado en el hígado por enzimas microsomales. La vida media del Bnz es de aproximadamente 12 horas y su eliminación es primordialmente por vía renal y sólo el 22 % de su excreción es fecal.

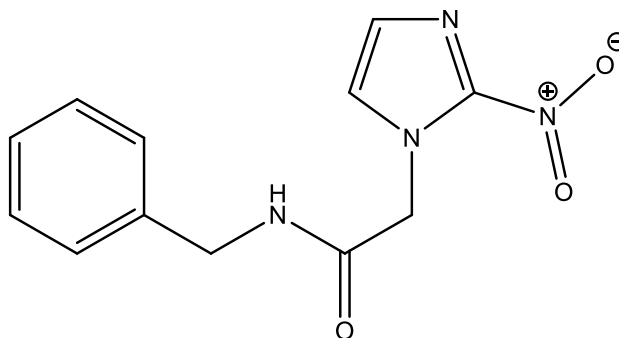


Figura 9. Estructura química del benznidazol.

El Bnz provoca efectos secundarios más leves que el Nfx. El Bnz induce efectos dermatológicos (hipersensibilidad, comezón, dermatitis, etc.) en aproximadamente el 30% de los pacientes que lo reciben. Otros efectos colaterales que produce son: leucopenia, plaquetopenia, agranulocitosis, fiebre, edema generalizado, infarto ganglionar, dolores musculares y en las articulaciones. Además, también puede presentarse depleción de la médula ósea (neutropenia y purpura trombocitopenia) y polineuropatía periférica (OPS, 2005; Bern *et al.*, 2007; Soeiro y De Castro 2011).

A los efectos secundarios particulares señalados para el Nfx y el Bzn, se suma que ambos son mutagénicos, se piensa que incrementan el riesgo de linfomas (Díaz-Chiguer *et al.*, 2011; Fidalgo y Gille, 2011) y el tratamiento es prolongado y costoso (aproximadamente 1,000 dólares por año) (Quijano-Hernández y Dumonteil, 2011).

1.2 Leishmaniosis

La leishmaniosis es la segunda enfermedad parasitaria que más muertes ocasiona a nivel mundial. Esta enfermedad es causada por más de 30 especies del género *Leishmania*, de las cuales al menos 20 están implicadas en la transmisión al ser humano (Noel *et al.*, 2011). La leishmaniosis es transmitida por más de 70 especies de moscas hembras de los géneros *Lutzomyia* (en América) y *Phlebotomous* (en Europa, Asia y parte de África), conocidas comúnmente como moscas de arena (Osorio *et al.*, 2005; Piscopo, 2006; Arjona-Jiménez *et al.*, 2011; Horta *et al.*, 2012).

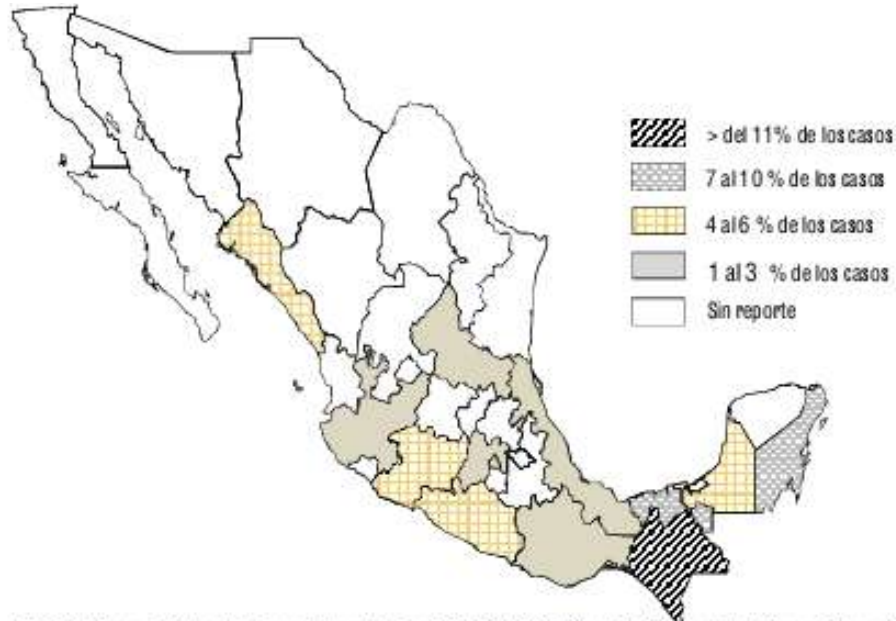
La leishmaniosis es endémica en 88 países de áreas tropicales y subtropicales alrededor del mundo (Ivens, 2005). Hoy en día se estima que 12 millones de personas padecen esta enfermedad y 350 millones están en riesgo de adquirirla. Cada año se reportan oficialmente 600,000 casos nuevos de leishmaniosis (Arjona-Jiménez *et al.*, 2012; Bero *et al.*, 2011; OMS, 2007); algunos autores consideran que los datos oficiales están subestimados, ya que un número considerable de casos no son registrados en algunos países (García-Almagro, 2005; Oliveira dos Santos *et al.*, 2011).

En México, la leishmaniosis está ampliamente distribuida (**figura 10**). Se han reportado casos de esta enfermedad en 22 estados y se considera altamente endémica en el sureste de nuestro país (Campeche, Chiapas, Yucatán, Oaxaca, Quintana Roo, Tabasco y Veracruz, en donde comúnmente se le denomina como “úlceras de los chicleros”), poniendo en riesgo a una población de más de nueve millones de habitantes de 149 municipios (Arjona-Jiménez *et al.*, 2012; Secretaría de Salud, 2011).

1.2.1 Formas de transmisión

La principal forma de transmisión de la leishmaniosis en los países endémicos es a través de la picadura de la mosca de arena. Aunque se han reportado casos por transmisión accidental (aplastamiento de moscas infectadas contra la piel), por contacto sexual, por transfusión sanguínea y trasplante de órganos, así como por transmisión congénita y por compartir agujas infectadas entre drogadictos (mecanismo relativamente reciente y de

gran trascendencia en la coinfección *Leishmania/VIH*) (García-Almagro, 2005). En los países no endémicos, la principal forma de transmisión es por los perros (hasta 84 % de los casos en humanos en esos países).



FUENTE: Base e Datos de Egresos Hospitalarios 2000-2009, Dirección General de Información en Salud, (DGIS) México.

Figura 10. Distribución de leishmaniasis en México, del 2000 al 2009. Tomada de Secretaría de Salud, 2011

1.2.2 Formas clínicas de la enfermedad

La leishmaniasis en el humano puede presentarse en cuatro formas diferentes (García-Almagro, 2005):

- **Leishmaniasis cutánea:** esta forma es el resultado de la multiplicación de los parásitos en los fagocitos de la piel. Inicialmente comienza como una pápula en el lugar de la picadura de la mosca, que posteriormente aumenta en tamaño y eventualmente se ulcera (**figura 11**). Las lesiones aparecen de los 2 a los 78 días después de la infección y duran de 3 a 18 meses. Más del 90% de los pacientes suelen curarse de manera espontánea (Monzote *et al.*, 2010; Bero *et al.*, 2011; Khademvatan *et al.*, 2011).



Figura 11. Ulceración de leishmaniosis cutánea. Tomada de García-Almagro, 2005.

- **Leishmaniosis mucocutánea o espundia:** esta infección se da en las mucosas de la nariz o la boca. La infección se da inicialmente en la mucosa nasal y después puede extenderse a la orofaringe y laringe, dando lugar a terribles desfiguraciones (García-Almagro, 2005; Bero *et al.*, 2011; Fidalgo *et al.*, 2011). Las lesiones en las mucosas evolucionan lentamente y no se curan espontáneamente (Berman, 1997).
- **Leishmaniosis visceral, kala-azar o fiebre negra (por la característica pigmentación en la piel):** esta forma resulta de la multiplicación de los parásitos dentro de los fagocitos mononucleares. Es la forma más grave de la enfermedad, con una mortalidad del 75 al 100 %, si no se trata. El periodo de incubación es de 10 días a 34 meses y los signos y síntomas que a continuación se presentan son: fiebre, hepatoesplenomegalia y pancitopenia (Piscopo *et al.*, 2006; Bero *et al.*, 2011; Khademvatan *et al.*, 2011). Cada año se registran 500,000 nuevos casos de esta forma de leishmaniosis, causando más de 50,000 muertes en el mismo periodo (Chattopadhyay y Jafurulla, 2011).
- **Leishmaniosis oportunista:** se presenta principalmente en individuos con VIH, reportando en 1998 la OMS 1,700 casos de esta forma de la enfermedad en 33 países.

1.2.3 Agente etiológico

La *Leishmania* es un protozoo flagelado que contiene material genético en dos sitios diferentes de la célula, uno nuclear y el otro en el cinetoplasto (García-Almagro, 2005).

1.2.3.1 Características morfológicas

La *Leishmania* se encuentra principalmente en dos estados morfológicos: promastigote (en el vector) y amastigote (en el huésped mamífero).

Promastigotes. Es la forma infectante, la cual se encuentra en el tracto digestivo del vector. Esta forma mide de 10 a 20 μm (sin flagelo), presenta un gran núcleo central, ribosomas, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, vesículas y una mitocondria (**Figura 12**) (Fidalgo *et al.*, 2011; Horta *et al.*, 2012). El cinetoplasto aparece como una banda granular electrodensa dentro de la mitocondria. A través de un proceso llamado metacicloogénesis, los promastigotes poco infectivos (procíclicos) se transforman en promastigotes altamente infectivos (metacíclicos). Esto ocurre en la naturaleza dentro del vector, pero también se da en cultivos axénicos de promastigotes cuando se pasa de la fase logarítmica a la fase estacionaria. Este proceso de diferenciación es llamado metacicloogénesis y es vital para la supervivencia del parásito (Araujo *et al.*, 2011).



Figura 12. Promastigotes de *Leishmania*. www.telmeds.org

Amastigotes. Es la forma intracelular del parásito que se multiplica dentro de los fagocitos mononucleares del huésped (**figura 13**) (Laskay *et al.*, 2003, Pereira *et al.*, 2011). Los amastigotes no presentan flagelo y tienen un tamaño que oscila entre los 2 y 4 μm . Con tinción de Giemsa, en los promastigotes se observa un núcleo y un cinetoplasto (subestructura mitocondrial) (CDC, 2009).

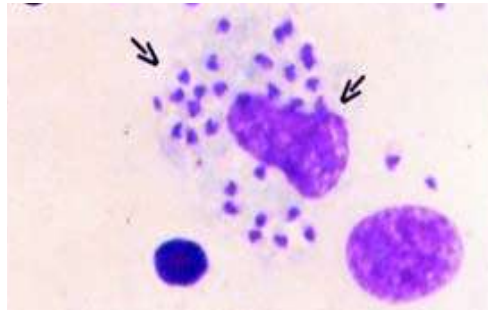


Figura 13. Macrófago parasitado con amastigotes de *Leishmania*. (Gontijo, 2003).

1.2.3.2 Taxonomía

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Filo: Sarcomastigophora

Subfilo: Mastigophora

Clase: Zoomastigophorea

Orden: Kinetoplastida

Sub-orden: Trypanosomatina

Familia: Trypanosomatidae

Género: *Leishmania*

Especies: existen más de 30 especies.

En México se han encontrado tres especies: *Leishmania mexicana*, que produce la forma cutánea y es la principal especie causal; *Leishmania donovani chagasi*, que produce la forma grave o visceral; *Leishmania braziliensis*, que produce las formas cutáneas y mucocutánea (Secretaría de Salud, 2001; García-Almagro, 2005; Gontijo y Ribeiro de Carvalho, 2003).

1.2.3.3 Ciclo de vida

En el ciclo de vida se presentan las dos morfologías (amastigote intracelular en el huésped mamífero y promastigote en el vector) (Gontijo, 2003; Wheeler, 2011). La mosca al alimentarse de un mamífero infectado succiona al parásito en su forma de amastigote intracelular, el cual después pasa al tracto intestinal del insecto, en donde se diferencia a promastigotes para multiplicarse. En la trompa del vector los promastigotes no infectivos se convierten en promastigotes metacíclicos infecciosos no replicativos (Saraiva *et al.*, 2005; Ivens, 2005). Los promastigotes metacíclicos entran al huésped vertebrado cuando la mosca hembra se alimenta de un vertebrado sano, inyectando de 10 a 200 promastigotes metacíclicos por picadura. En el mamífero algunos de los promastigotes son destruidos por los leucocitos polinucleares y eosinófilos del mamífero, mientras que otros se adhieren a los receptores de superficie de los macrófagos y son fagocitados. En el macrófago los promastigotes se diferencian en amastigotes, que vivirán en los fagolisosomas o en las vacuolas parasitóforas; en estas estructuras los amastigotes sobreviven y se multiplican por división binaria. Cuando el macrófago está repleto de amastigotes, es lisado y los parásitos pasan al espacio extracelular. El ciclo se completa cuando las moscas se alimentan de este huésped infectado (García-Almagro, 2005; Horta *et al.*, 2012).

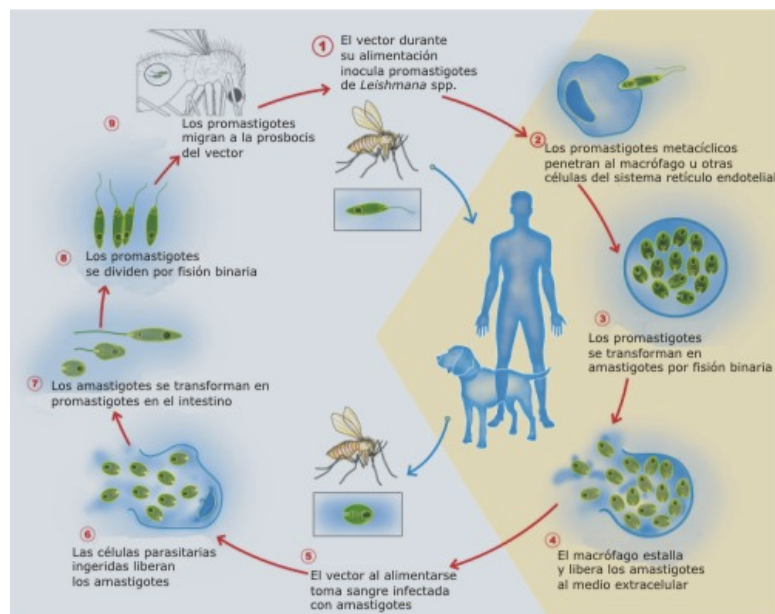


Figura 14. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Tomado de http://bvs.sld.cu/revistas/mtr/v64n2_12/mtr02212.htm, 2012

1.2.4 Diagnóstico

El diagnóstico de la leishmaniosis se puede realizar por detección al microscopio de los amastigotes o por medio de frotis teñidos con Giemsa, a partir de muestras de tejidos o aspiraciones de biopsias (Piscopo *et al.*, 2006; Arjona-Jiménez *et al.*, 2012). Sin embargo, el diagnóstico generalmente se realiza al detectar anticuerpos presentes en el suero de algunos pacientes por medio de ensayos inmunológicos como ELISA, aglutinación directa, inmunofluorescencia indirecta, Western blot o técnicas moleculares (como PCR) (Bero *et al.*, 2011).

1.2.5 Tratamiento

El tratamiento de leishmaniosis está basado principalmente en el uso de antimoniales pentavalentes, aunque en cepas resistentes a estos se utiliza terapia alternativa empleando fármacos de distinta naturaleza química.

1.2.5.1 Antimoniales pentavalentes

Los antimoniales pentavalentes son usados desde 1940 y son los fármacos de primera elección para tratar esta enfermedad (Berman, 1997; Soto y Soto, 2006; Chattopadhyay *et al.*, 2011). Estos compuestos son considerados pro-fármacos ya que es necesaria su reducción a su estado trivalente, forma en la cual son altamente tóxicos para los amastigotes y promastigotes (Fernández *et al.*, 2011). Entre estos fármacos se tiene al pentostam y al glucantime, los cuales inhiben enzimas glicolíticas y la oxidación de los ácidos grasos. También inhiben la acción de la topoisomerasa I de *Leishmania*, afectando así procesos como el superenrollamiento y desenrollamiento del ADN necesario en el proceso de replicación (Mesa *et al.*, 2008; Rojas-Aguirre *et al.*, 2012). Los antimoniales son efectivos en más del 90% de los casos cuando se emplean en dosis y tiempo recomendados. La efectividad del tratamiento con base en esos fármacos también depende de la especie y de la cepa del parásito (Oliveira dos Santos *et al.*, 2011).

Este tratamiento con antimoniales pentavalentes es muy costoso ya que requiere supervisión médica para su administración (por vía parenteral).

El tratamiento es prolongado (generalmente de 30 días) y provoca efectos secundarios graves (Oliveira dos Santos *et al.*, 2011; Noel *et al.*, 2011). Entre el 35% al 60% de los pacientes presentan reacciones adversas gastrointestinales y del 10% al 20% se les elevan las transaminasas y la creatinina (Soto y Soto, 2006). Además, se presenta pancreatitis y dolor musculoesquelético en la mitad de los pacientes que reciben el tratamiento. Los antimoniales también pueden provocar citopenia y cardiotoxicidad, causando la muerte súbita en algunos casos (Berman, 1997).

1.2.5.2 Terapia alterna

Anfotericina B. Este medicamento compite con los antimoniales pentavalentes como terapia de primera elección. Actúa formando poros en las membranas celulares modificando así su permeabilidad, lo que lleva a la muerte de los parásitos (Chattopadhyay, 2011; Fernández *et al.*, 2011). El uso de anfotericina B es limitado, debido a que causa nefrotoxicidad, insuficiencia renal, escalofríos, dolor de huesos y paro cardíaco. A pesar de sus efectos colaterales severos, la anfotericina B es administrada a niños y mujeres embarazadas (Berman, 1997).

Pentamidina. Este fármaco actúa sustituyendo las poliaminas en sus sitios de unión a ácidos nucleicos, lo cual produce la inhibición de la replicación y la transcripción del ADN (Fernández *et al.*, 2011). Este fármaco causa mialgias, dolor en el sitio de inyección, náuseas, dolor de cabeza, sensación de ardor, entumecimiento e hipotensión (Osorio *et al.*, 2005). Las especies de *Leishmania* que causan la forma cutánea de esta enfermedad son generalmente resistentes a los antimoniales y a la pentamidina.

Paromomicina. Este fármaco generalmente es administrado en combinación con antimoniales u otro fármaco anti-leishmania, debido a que la paromomicina es poco potente y cuando se usa a altas concentraciones es tóxica para el riñón y el octavo nervio craneal.

Otros. Para el tratamiento de la leishmaniosis también se utilizan el alopurinol, (Fernández *et al.*, 2011), la miltefosina (Noel *et al.*, 2011) y la mefloquina (Osorio *et al.*, 2005).

1.3 Búsqueda de nuevos compuestos anti-tripanosomatidos

En la actualidad no se cuenta con vacunas para la enfermedad de Chagas o la leishmaniosis (Quijano-Hernández y Dumonteil, 2011), es por ello que el tratamiento para combatirlas es a través de medicamentos, que llevan ya más de 40 años en el mercado, que no son eficientes en todos los casos y que presentan severos efectos secundarios, (Osorio *et al.*, 2005; Fidalgo y Gille, 2011; De Castro *et al.*, 2011; Polanco-Hernández *et al.*, 2012). Esto lleva a la necesidad de encontrar nuevas terapias alternativas para combatir estas enfermedades. Sin embargo, existe un bajo interés por parte de las industrias farmacéuticas, justificado en una baja retribución económica. Es por ello, que esta responsabilidad ha recaído en las universidades e institutos de investigación (Pinto-Dias, 2003; Fidalgo *et al.*, 2011).

A la fecha se han evaluado diversos tipos de compuestos, tanto de origen natural como sintéticos, con el fin de encontrar nuevos fármacos con actividad anti-tripanosomatida. Entre estos compuestos tenemos a las 1,4-dihidropiridinas (Soeiro *et al.*, 2011; Rojas-Aguirre *et al.*, 2012).

1.4 Dihidropiridinas

Los compuestos de tipo 1,4-dihidropiridina (DHP) son conocidos desde que Arthur Hantzsch las utilizó como intermediarios en síntesis de piridinas. A pesar de su accesibilidad química (y de la participación de compuestos de tipo 1,3-dihidropiridina como coenzimas de varias deshidrogenasas), fueron de poco interés farmacológico hasta hace 50 años, cuando se descubrió la propiedad vasodilatadora de algunas de ellas. Las DHPs, forman parte de los fármacos conocidos como bloqueadores de la entrada de calcio (BEC), los cuales bloquean los canales de calcio tipo L dependientes de voltaje. Este tipo de fármacos actúan principalmente sobre el músculo liso y músculo cardiaco, inhibiendo la entrada de calcio a las células. Es por ello, que varias DHPs son utilizadas clínicamente para el tratamiento de la hipertensión, la insuficiencia cardiaca congestiva, la angina de pecho, la isquemia y otras enfermedades vasculares a nivel periférico o cerebral (Sica, 2005). Además de su acción como BEC, se ha encontrado que las DHPs también ejercen

otros efectos farmacológicos interesantes, entre los que tenemos su actividad contra tripanosomatidos.

El primer reporte del efecto anti-tripanosoma de las DHPs fue el de Nuñez-Vergara *et al.* en 1997, quienes evaluaron el efecto sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi* de una serie amplia de BECs, encontrando que algunos BECs de tipo DHP presentaban actividad contra este parásito, destacando la nicardipina como el de mayor potencia entre los compuestos probados (CI_{50} de 70 μ M). Más tarde, Hirota *et al.* 2004, al realizar un análisis del efecto de diferentes BECs sobre la tasa de infección por tripanosomas en células HeLa, así como el número de amastigotes por célula infectada, encontraron que solo los tratamientos con nicardipina amlodipina o nimodipina provocaban una reducción en la tasa de infección similar a la del benznidazol. En un trabajo más recientemente (Reimão *et al.*, 2010), se encontró que varios compuestos de tipo DHP presentan actividad no sólo contra tripanosoma, sino también contra leishmania.

A la fecha no se sabe cuál es el mecanismo de acción por el que la nicardipina y otras DHPs logran su efecto tripanosomicida, pero se ha sugerido que éste sea independiente del bloqueo de canales de calcio, efecto característico de esta clase de compuestos, ya que DHPs como la nifedipina, que presenta un buen efecto como BEC, no presentan efecto anti-tripanosoma (Ambriz-Peña *et al.*, 2007), lo mismo ocurre con otro tipo de bloqueadores de canales de calcio como son el verapamil y el diltiazem (Nuñez-Vergara *et al.*, 1997).

Considerando que el efecto sobre canales de calcio parece no estar relacionado con el efecto tripanosomicida de las DHPs y que el efecto cardiovascular de éstas puede ser considerado como un efecto colateral si se pretende utilizarlas para tratar este tipo de enfermedades, en la presente tesis se realizó el diseño, la síntesis y la evaluación del efecto tripanocida y leishmanicida, así como la actividad citotóxica de nuevas DHPs que presentan baja o nula actividad bloqueadora de canales de calcio.

2. JUSTIFICACIÓN

El arsenal terapéutico para el tratamiento de la enfermedad de Chagas y la leishmaniosis es muy limitado. Por una parte, los fármacos autorizados para uso clínico son pocos y presentan severos efectos colaterales, y por otra, existen cepas de *T. cruzi* y *Leishmania* que son resistentes a estos fármacos. Por ello es imprescindible buscar nuevas alternativas farmacológicas para su tratamiento, siendo los análogos de la nicardipina, carentes de efecto bloqueador de canales de calcio, una buena opción para encontrar fármacos con este propósito.

3. HIPÓTESIS

Análogos de nicardipina carentes de efecto bloqueador de canales de calcio tienen efecto antitripanosoma y antileishmania

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar nuevas 1,4-dihidropiridinas análogas de la nicardipina, carentes de efecto bloqueador de canales de calcio, con actividad antitripanosoma y antileishmania.

4.2 Objetivos particulares

1. Diseñar y sintetizar DHPs análogas de la nicardipina carentes de efecto bloqueador de canales de calcio.
2. Evaluar la carencia del efecto bloqueador de canales de calcio de los análogos de nicardipina obtenidos.
3. Ensayar el efecto antitripanosoma y antileishmania *in vitro* de las DHPs carentes de efecto bloqueador de canales de calcio.
4. Determinar la toxicidad de las DHPs sintetizadas.

5. MATERIALES

5.1 Materiales para la síntesis de DHPs

Todos los reactivos y solventes utilizados en este trabajo fueron grado analítico o HPLC obtenidos de Aldrich (Milwaukee, WI, USA), Baker (Xalostoc, Edo. De México, México) o Sigma (St. Louis, MO, USA).

El reactivo acetato de N-bencil-N-metil-2-aminoetilo, no disponible comercialmente, fue sintetizado en el laboratorio y su caracterización química fue realizada a través de sus espectros de RMN ^1H y de masas.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN ^1H) y de carbono (RMN ^{13}C), así como los espectros de los análisis HETCOR, Cosy y DEPT fueron realizados en el laboratorio de resonancia magnética nuclear del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, utilizando un espectrómetro Varian Mercuri plus de 200 y/o 400 MHz, usando como estándar interno TMS y como disolvente cloroformo deuterado.

Los espectros de masas se determinaron en un equipo Hewlett Packard modelo 5989B, acoplado a un cromatógrafo de gases Hewlett Packard modelo 5809-serie plus, utilizando acetona para disolver la muestra.

5.2 Materiales para determinar el efecto bloqueador de canales de calcio

5.2.1 Ratas

Se utilizaron ratas macho Wistar de aproximadamente 300 g de peso, obtenidas del bioterio del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Los animales de experimentación fueron tratados de acuerdo a la NOM-062-ZOO-1999

5.2.2 Solución de Krebs (normal)

La composición (milimolar) de la solución de Krebs fue la siguiente: NaCl, 118; NaHCO_3 , 25; glucosa, 11.6; KCl, 4.7; MgSO_4 , 1.17; KH_2PO_4 , 1.17; EDTA, 0.026; CaCl, 2.5.

5.2.3 Solución de Krebs alto en potasio sin calcio

Esta solución tuvo la misma composición (milimolar) que la solución de Krebs normal, excepto: NaCl, 42.7; KCl; 80; CaCl₂, 0.

5.2.4 Compuestos

Las 12 DHPs evaluadas (6 de la serie SAD y 6 de la serie SMV) fueron sintetizadas en nuestro laboratorio. La nicardipina y la nitrendipina (empleados como controles) fueron obtenida de Aldrich (Milwaukee, WI, USA) y de Bayer (México, D.F.), respectivamente. Todos los compuestos fueron disueltos para su uso en DMSO-agua, a una concentración final de DMSO en la cámara de órgano aislado que nunca excedió del 0.5%.

5.2.5 Equipo para órgano aislado

Este equipo constó de transductores de tensión (Grass FT03 force displacement transducer; Astro-Med, Inc. West Warwick, RI, USA), acoplados a un sistema de adquisición de datos MP100 (Biopac Systems Inc. Santa Barbara, CA, USA), controlado por el programa de computo AcqKnowledge v. 3.9.0 (Biopac Systems Inc. Santa Barbara, CA, USA).

5.3 Materiales para los ensayos del efecto tripanocida

5.3.1 Cepas de *Trypanosoma cruzi*

El efecto tripanocida de las DHPs fue determinado en las cepas NINOA e INC-5 de *T. cruzi*. Estas cepas fueron proporcionadas por el Dr. en C. Benjamín Noguera Torres del Laboratorio de Helminología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

Cepa NINOA: aislada por xenodiagnóstico en el año de 1986 a partir de una paciente de 8 años de edad en etapa aguda de la enfermedad de Chagas. La paciente adquirió la infección en el Estado de Oaxaca, México.

Cepa INC5: aislada en el año de 1997 a partir de una paciente de 58 años de edad, con cuadro crónico de la enfermedad. La paciente era procedente de la localidad de Congregación del estado de Guanajuato, México. Aislada por

concentración en capilar y posterior siembra en medio de cultivo celular (Díaz-Chiguer *et al.*, 2011).

Ambas cepas se mantienen por pase ratón-*Triatoma logipennis*-ratón en el laboratorio con el fin de preservar lo más posible sus características biológicas.

5.3.2 Ratones

Se utilizaron ratones hembras BALB/c entre 18 y 20 g de peso proporcionados por el bioterio de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

5.3.3 Compuestos

Las 12 DHPs probadas en este ensayo fueron las mismas que en el ensayo anterior y fueron disueltas para su uso en DMSO-agua, a una concentración final de DMSO que nunca excedió del 2.5% (concentración no tóxica para *T.cruzi*). En este ensayo se utilizó benznidazol (Rochagan[®], Roche, lote 110878) como fármaco de referencia, mismo que fue disuelto para su uso en forma similar que las DHPs probadas.

5.4 Materiales para los ensayos del efecto leishmanicida

5.4.1 Cepa de *Leishmania mexicana*

El efecto leishmanicida fue determinado en promastigotes de *L. mexicana* (cepa MNYC/BZ/62/M379), los cuales fueron aislados de un ratón BALB/c infectado. Esta cepa fue proporcionada por la DC. Luvia Enid Sánchez Torres del Laboratorio de Inmunología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

Los parásitos fueron mantenidos en cultivo en la fase log a 25°C en medio RPMI suplementado con 10% SFB, 100 U o µg/mL de penicilina-estreptomomicina.

5.4.2 Medio RPMI

Este medio de cultivo tuvo la siguiente composición (por cada 500 mL): RPMI (Sigma-Aldrich) con L-glutamina, 5.2 g; NaHCO_3 (7.5%), 9.2 mL; vitaminas (Sigma), 5 mL; piruvato (Gibco), 5 mL; antibiótico-antimicótico (Gibco), 5 mL; aminoácidos no esenciales (Gibco) 5 mL; L-glutamina 200mM (si es que se requiere), 5 mL. El medio se aforó con agua destilada a 500 mL, se ajustó el pH a 7.2 y a continuación se agregaron 50 mL de suero fetal bovino descomplementado (a 56°C por 45 minutos).

El medio se esterilizó mediante filtración (MCE 0.22 μm 1/pkg) y se realizó una prueba de esterilidad, dejándola en incubación a 37°C al menos un día.

5.4.3 Amortiguador de fosfatos salina (PBS)

Esta solución tuvo la siguiente composición (por cada 1000 mL): NaCl, 9.5 g; K_2HPO_4 , 3.7 g; KH_2PO_4 , 1.1 g.

5.4.4 Compuestos

Las 12 DHPs probadas en este ensayo fueron las mismas que en los ensayos anteriores, las cuales fueron disueltas en DMSO-agua. La concentración final del DMSO nunca excedió de 1%, una concentración no tóxica para parásitos. Como compuesto de referencia se utilizó la anfotericina B que se diluyó igual que las DHPs probadas.

El colorante azul de alamar fue obtenido de Sigma (St. Louis, MO, USA). El azul de tripano fue disuelto para su uso con PBS (en una relación 1:9).

5.5 Materiales para los ensayos de citotoxicidad

5.5.1 Línea celular

El ensayo de la citotoxicidad de las DHPs fue realizado en la línea celular Vero. Esta línea fue proporcionada por el Laboratorio de Virología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional.

La línea celular Vero fue establecida a partir de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) en 1962 por Yasumura y Kawakita, de la Universidad de Chiba, Japón (Wilkinson S.R, *et al.*, 2008). La línea celular se mantiene en un medio de cultivo MEM suplementado con 10% suero bovino fetal y antibiótico-antimicótico.

5.5.2 Medio mínimo esencial Eagle (MEM)

El medio MEM tuvo la siguiente composición (por cada 500 mL): MEM (Sigma-Aldrich) con sales de Earle y L-glutamina, 4.75 g; NaHCO₃ (7.5%), 10 mL; vitaminas (Sigma), 5 mL; piruvato (Gibco), 5 mL; antibiótico-antimicótico (Gibco), 5 mL; aminoácidos no esenciales (Gibco), 5 mL. El medio se aforó con agua destilada a 500 mL y a continuación se agrega 50 mL de suero fetal bovino descomplementado (a 56°C por 45 minutos).

El medio se esterilizó mediante filtración (MCE 0.22 µm 1/pkg) y se realizó una prueba de esterilidad, dejándola en incubación a 37°C al menos un día.

5.5.3 Solución de tripsina al 0.25%

La solución de tripsina tuvo la siguiente composición (por cada 100 mL): Dextrosa, 100 mg; Rojo de fenol al 0.5%, 20 µL; Solución EDTA al 0.25 M, 410 µL; tripsina, 0.25 g. La solución se lleva a un volumen final de 100 mL con PBS 1X.

5.5.4 Medio de MTT

Este medio fue obtenido de Sigma (St. Louis, MO, USA). Para su uso el medio de MTT se preparó a una concentración de 1mg/mL en PBS.

5.5.5 Solución SDS-ácido clorhídrico

El SDS fue obtenido de HYCEL-Reactivos Quin lote 245619 y se pesó de manera que lo tuviéramos al 10% en una solución con ácido clorhídrico 0.01N.

5.5.6 Amortiguador de fosfatos salina (PBS)

Esta solución fue preparada como se describe en la sección 5.4.3.

5.5.7 Compuestos

Las 12 DHPs evaluadas, así como los fármacos de referencia (Bnz, y Anf) fueron los mismas que se usaron en los ensayos anteriores. Todos los compuestos probados fueron disueltos para su uso en DMSO-agua.

6. METODOLOGIA

6.1 Diseño y síntesis de las DHPs

Las DHPs de la serie SAD fueron diseñadas tomando como base la molécula de nicardipina, ya que como se mostró en los antecedentes, la nicardipina fue la mejor (o una de las mejores) DHP con actividad tanto contra *T. cruzi* como contra *Leishmania*. La modificación estructural a la molécula de la nicardipina fue propuesta con base en varios estudios de relación estructura-actividad que se han publicado para este tipo de compuestos (Coburn *et al.*, 1988; Janis *et al.*, 1987; Meguro *et al.*, 1985; Suzuki *et al.*, 1989), así como en trabajos en los cuales ya se han sintetizado y evaluado DHPs con alguna las características estructurales que se propone sean importantes para modular el efecto bloqueador de canales de calcio de las DHPs (Coburn *et al.*, 1988; Iwanami *et al.*, 1979). Los estudios de relación estructura-actividad indican que las siguientes características estructurales afectan en forma negativa la actividad como BEC de las DHPs: la oxidación del anillo dihidropiridina a piridina, la sustitución del nitrógeno del anillo dihidropiridina, la presencia de un sustituyente en la posición *para* del anillo aromático. En particular, en el presente estudio se optó por sintetizar DHPs con esta última característica estructural, ya que su preparación implica menor número de reacciones.

El procedimiento utilizado para la síntesis de los compuestos se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Iwanami *et al.*, 1979 y Noyola *et al.*, 2003b, que es semejante a la utilizada en nuestro laboratorio para síntesis de otras DHPs (Contreras-Paredes, 2008, Manríquez-Villalobos, 2012). Para sintetizar las DHPs fue necesario preparar en el laboratorio el acetoacetato de N-benzil-N-metil-2-aminoetilo, ya que no está disponible comercialmente. A continuación se describe el procedimiento correspondiente.

6.1.1 Síntesis del acetoacetato de N-bencil-N-metil-2-aminoetilo (3)

En un matraz bola de tres bocas de 100 ml se adicionó el N-metil-N-bencil-2-aminoetanol (27.5 ml, 0.17 moles) (1) y tetrahidrofurano (20 mL) como disolvente. La reacción se calentó a 70°C con agitación constante y a continuación se adicionó la dicetena (16.3 ml, 0.19 moles) (2) gota a gota, manteniendo una temperatura de reacción de 70 a 80°C. Una vez agregada toda la dicetena se mantuvo la agitación y la temperatura por tres horas más. Terminada la reacción el solvente fue evaporado con ayuda de un rotavapor para obtener el producto deseado, mismo que fue utilizado en reacciones posteriores sin previa purificación.

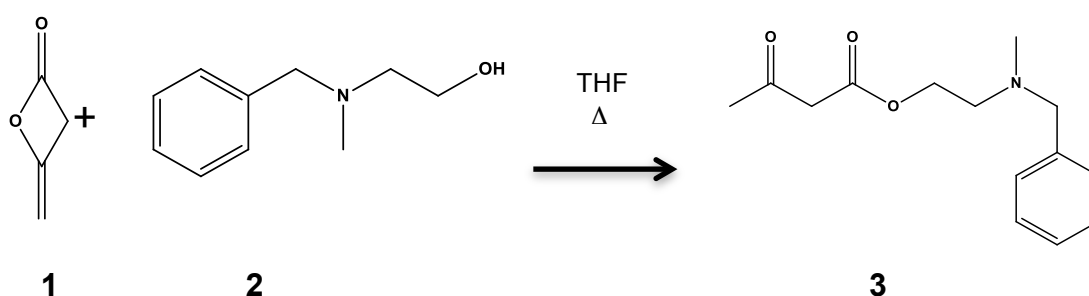


Figura 15. Preparación de acetoacetato de N-bencil-N-metil-2-aminoetilo (3).

6.1.2 Síntesis general de las dihidropiridinas

En un matraz bola de 50 ml, se mezcló una solución del acetoacetato (0.1 mol) (3), 3-aminocrotonato de metilo (0.1 mol) (4), y del benzaldehído sustituido (0.1 mol) (5), utilizando isopropanol (10 mL) como disolvente para obtener la DHP correspondiente (6). La reacción se mantuvo a reflujo y con agitación magnética por 12 a 15 horas. El avance de la reacción se siguió por cromatografía en capa fina (CCF), utilizando como eluyente una mezcla de cloroformo/acetona (1:1). Al término de la reacción se evaporó el disolvente con ayuda del rotavapor y el producto obtenido fue purificado por cromatografía en columna con gel de sílice (20-400 malla) usando como eluyente inicial hexano y posteriormente varias mezclas de acetato de etilo/hexano, en orden creciente de polaridad. Cada fracción obtenida se checó por CCF y se juntaron aquellas que contenían el producto deseado y

se evaporó el solvente. La purificación por cromatografía en columna se realizó varias veces hasta lograr obtener los compuestos totalmente puros.

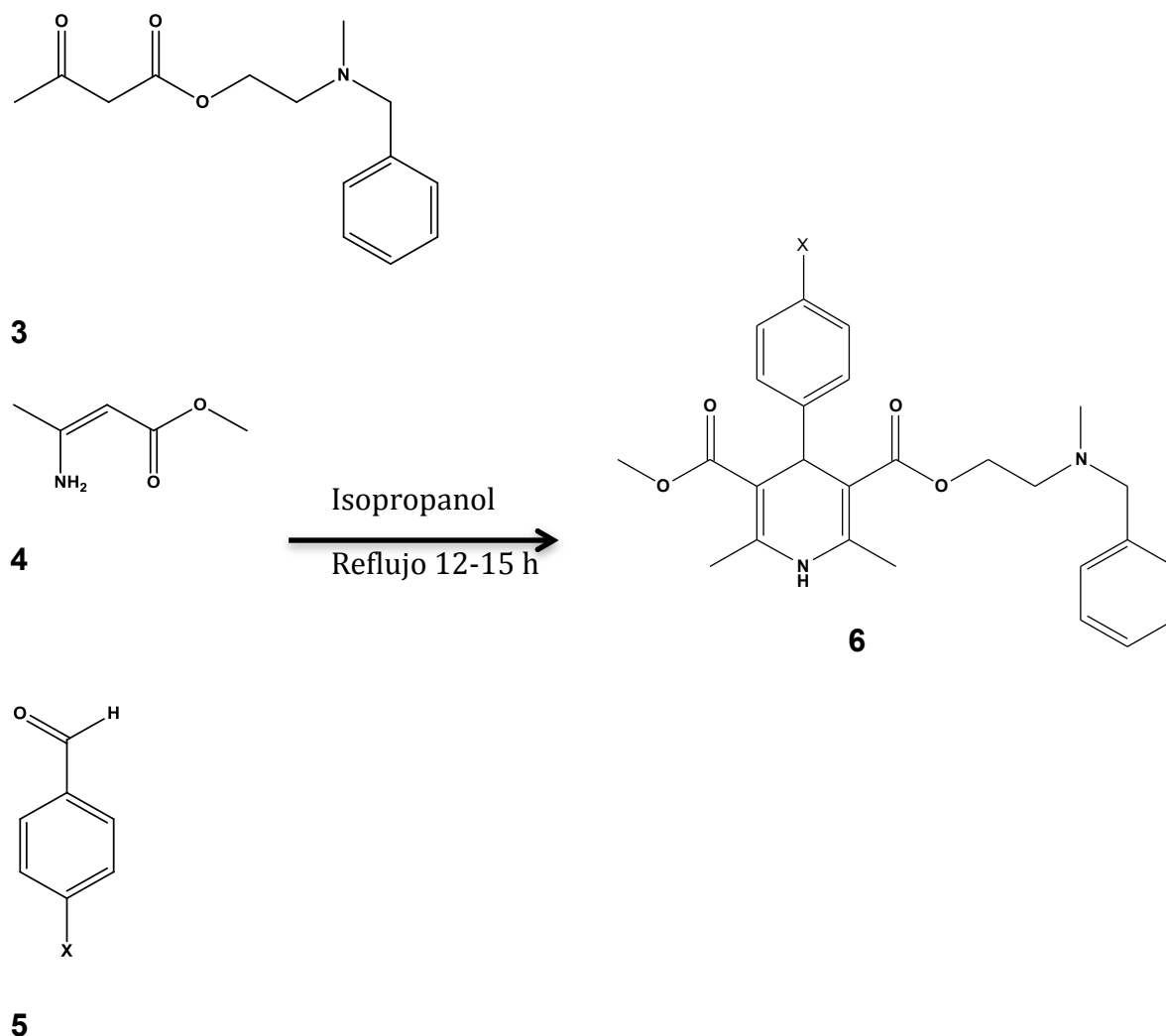


Figura 16. Procedimiento general para la preparación de las 1,4-dihidropiridinas (6). Al mezclar, Acetoacetato de N-bencil-N-metil-2-aminoetilo (3), 3-aminocrotonato de metilo (4) y Benzaldehído *para*-sustituido (5).

D,L-2,6-dimetil-3-(N-bencil-N-metil-2-aminoethoxycarbonil)-4-(4-nitrofenil)-5-metoxycarbonil-1,4-dihidropiridina. (SAD1)

Una solución de 4-nitrobenzaldehído (1.5 g, 9.92 mmol), 3-aminocrotonato de metilo (1.14 g, 9.92 mmol) y acetoacetato de N-bencil-N-metil-2-aminoetilo (2.72 mL, 9.92 mmol) en isopropanol (10 mL) fue calentada con reflujo y agitación magnética por 13 horas. Al terminar la reacción el producto obtenido fue purificado por cromatografía en columna de gel de

sílice usando como eluente inicial hexano y posteriormente las siguientes proporciones de acetato de etilo/hexano: 20:80 (60 mL), 50:50 (50 mL), 60:40 (120 mL) y 70:30 (300 mL), cada fracción se analizó por CCF bajo luz UV. En total se obtuvieron 0.71 g de producto puro.

D,L-2,6-dimetil-3-(N-bencil-N-metil-2-aminoethoxycarbonil)-4-(4-tolual)-5-metoxycarbonil-1,4-dihidropiridina. (SAD2)

Una solución de 4-tolualdehído (1.5 mL, 12.7 mmol), 3 aminocrotonato de metilo (1.46 gr, 12.7 mmol) y acetoacetato de N-benzil-N-metil-2-aminoetilo (3.48 mL, 12.7 mmol) en isopropanol (10 mL) fue sometida a reflujo por 12 horas. El producto de la reacción se purificó en cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluente inicial hexano y posteriormente las siguientes proporciones de acetato de etilo/hexano: 20:80 (20 mL), 50:50 (30 mL), 60:40 (50 mL), 70:30 (50 mL), 80:20 (180 mL). La purificación en columna se realizó dos veces más. En total se obtuvieron 0.29 g de producto puro.

D,L-2,6-dimetil-3-(N-bencil-N-metil-2-aminoethoxycarbonil)-4-(4-fluorofenil) -5-metoxycarbonil-1,4-dihidropiridina. (SAD3)

Una solución de 4-fluorobenzaldehído (1.5 mL, 14.2 mmol), 3-aminocrotonato de metilo (1.63 gr, 14.2 mmol) y acetoacetato de N-benzil-N-metil-2-aminoetilo (3.88 mL, 14.2 mmol) en isopropanol (10 mL) fue calentada a reflujo por 14 horas. El producto de reacción fue purificado por cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluente inicial hexano y posteriormente las siguientes proporciones de acetato de etilo/hexano: 20:80 (20 mL), 50:50 (30 mL), 60:40 (50 mL), 70:30 (170 mL). El proceso de purificación en columna se realizó dos veces más usando las mismas concentraciones de fase móvil anteriormente mencionadas, excepto que al final se agregó acetato de etilo/hexano en una proporción de 85:15 (140 mL). En total se obtuvieron 0.52 g de producto puro.

D,L-2,6-dimetil-3-(N-bencil-N-metil-2-aminoethoxycarbonil)-4-(4-clorofenil)-5-metoxycarbonil-1,4-dihidropiridina. (SAD4)

Una solución de 4-clorobenzaldehído (1.5 g, 10.67 mmol), 3-aminocrotonato de metilo (1.23 gr, 10.67 mmol) y acetoacetato de N-benzil-N-metil-2-aminoetilo (2.92 mL, 10.67 mmol) en isopropanol (10 mL) fue sometida a reflujo por 15 horas. El producto de la reacción fue purificado por cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente inicial hexano y posteriormente las siguientes proporciones de acetato de etilo/hexano: 20:80 (30 mL), 50:50 (50 mL), 60:40 (40 mL), 70:30 (80 mL), 80:20 (130 mL). El proceso de purificación en columna se realizó dos veces más, pero utilizando las siguientes proporciones de acetato de etilo/hexano: 20:80 (10 mL), 50:50 (30 mL), 60:40 (20 mL), 70:30 (50 mL), 85:15 (130 mL). En total se obtuvieron 0.77 g de producto puro.

D,L-2,6-dimetil-3-(N-bencil-N-metil-2-aminoethoxycarbonil)-4-(4-bromofenil) -5-metoxycarbonil-1,4-dihidropiridina. (SAD5)

Una solución de 4-bromobenzaldehído (1.5 g, 8.1 mmol), 3-aminocrotonato de metilo (0.933 gr, 8.1 mmol) y acetoacetato de N-benzil-N-metil-2-aminoetilo (2.22 mL, 8.1 mmol) en isopropanol (10 mL) fue mantenida en reflujo por 12 horas. El producto obtenido de la reacción fue purificado por cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente inicial hexano y posteriormente las siguientes proporciones de acetato de etilo/hexano: 30:80 (20 mL), 50:50 (20 mL), 60:40 (30 mL), 70:30 (120 mL). El proceso de purificación se realizó dos veces más usando las mismas concentraciones de fase móvil anteriormente mencionadas, excepto que al final de cada proceso se agregó acetato de etilo-hexano: 85:20 (50 mL) y 90:10 (90 mL). En total se obtuvieron 0.35 g de producto puro.

D,L-2,6-dimetil-3-(N-bencil-N-metil-2-aminoethoxycarbonil)-4-fenil-5-metoxycarbonil-1,4-dihidropiridina. (SAD6)

Una solución de benzaldehído (1.5 mL, 14.8 mmol), 3-aminocrotonato de metilo (1.7 gr, 14.8 mmol) y acetoacetato de N-benzil-N-metil-2-aminoetilo (4.0 mL, 14.8 mmol) en isopropanol (10 mL) fue mantenida en reflujo por 13

hrs. El producto de la reacción se purificó en cromatografía en columna de gel de sílice usando como eluyente inicial hexano y posteriormente las siguientes proporciones de acetato de etilo/hexano: 20:80 (20 mL), 50:50 (30 mL), 60:40 (50 mL), 70:30 (50 mL), 80:20 (180 mL). En total se obtuvieron 1.3 g de producto puro.

6.1.3 Caracterización química

Los compuestos sintetizados puros fueron caracterizados por sus espectros de resonancia magnética nuclear de ^1H y de ^{13}C , así como HECTOR, Cosy, DEPT y espectrometría de masas acoplada a gases.

6.2 Evaluación biológica de las dihidropiridinas

6.2.1 Determinación del efecto relajante muscular

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación e inmediatamente la aorta torácica fue extirpada, limpiada de tejido graso y retirado el endotelio (para que no influyera en el ensayo). A continuación la aorta fue cortada en anillos de aproximadamente 5 mm, los cuales fueron montados por medio de ganchos de Nichrom en cámaras de órgano aislado de 10 mL, que contenían solución de Krebs aerada constantemente con una mezcla de O_2 - CO_2 (95:5). Uno de los ganchos se fijó al fondo de la cámara y el otro se ató a un transductor de tensión, acoplado a un polígrafo.

Los anillos se sometieron a una tensión inicial de 4 gramos. Después de un período de estabilización de 30 minutos se probó la funcionalidad e integridad del músculo por su respuesta contráctil a noradrenalina (10^{-7} M, concentración final). Para esto, los anillos se expusieron a la noradrenalina hasta que desarrollaron la tensión máxima, lavándose a continuación con solución de Krebs. Este procedimiento se repitió por 2 veces más, cada 30 minutos. Después de contraer por tercera vez los anillos, y antes del lavado, éstos fueron expuestos a la carbacol (10^{-8} M, concentración final) para asegurarnos que no tienen endotelio. Al término de un nuevo período de estabilización de 30 minutos, la preparación se lavó con Krebs alto en potasio sin calcio por cuatro veces dejando un período de estabilización de 10 minutos entre

cada lavado. Después del último lavado se le agregó cloruro de calcio (2.5 mM, concentración final), lo que inició la contracción muscular. Cuando el anillo desarrolló su tensión máxima, se adicionaron 100 μ L de la solución de concentración adecuada de alguna de las DHPs o de los compuestos de referencia (NIC y NIT) para lograr concentraciones finales en la cámara de órgano aislado en un rango de 1×10^{-9} a $3.16 \times 10^{-5.5}$ M. También se evaluó un control del solvente utilizado (agua-DMSO).

El porcentaje de relajación muscular provocado por cada concentración de DHP fue determinado de los registros obtenidos, tomando como 100 % de relajación los gramos equivalentes a la contracción obtenida al adicionar el cloruro de calcio. Para cada compuesto se realizó un total de 6 experimentos independientes y los resultados obtenidos en ellos fueron promediados y graficados (con la ayuda del Sigma Plot 11.0). El efecto relajante de cada DHP fue calculado a partir de su correspondiente gráfica concentración vs. % de relajación (ajustando los datos a una función sigmoidea), y fue expresado en términos de la concentración molar requerida para inhibir la contracción un 50% (CI_{50}).

6.2.2 Evaluación de la actividad *in vitro* de las dihidropiridinas sobre *Trypanosoma cruzi*.

El efecto de las DHPs sobre *T. cruzi* se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Oliveira *et al.*, 2003. Esta técnica consiste en la detección de lisis de parásitos (en fase de tripomastigote sanguíneo, obtenidos a partir de sangre infectada de ratón) que provocan los compuestos. El procedimiento fue el siguiente:

Se parasitaron ratones con 0.2 mL de sangre que contenían 1×10^6 tripomastigotes/mL de las cepas NINOA e INC5. El grado de parasitemia provocado en los ratones se evaluó diariamente y cuando este se encontró en el pico máximo (más de 4×10^6 parásitos/mL), se obtuvo sangre infectada de los ratones por medio de punción cardiaca, utilizando heparina como anticoagulante. La sangre obtenida fue diluida con solución salina fisiológica

(NaCl, 0.85%) estéril hasta obtener una concentración final de 1×10^6 tripomastigotes sanguíneos/mL.

En placas de 96 pozos se colocaron 90 μ L de la sangre con una concentración 1×10^6 tripomastigotes/mL y 10 μ L de la solución del compuesto de prueba capaz de lograr concentraciones finales en pozo de: 5, 10, 50 y 100 mg/mL). Además de las DHPs y del compuesto de referencia Bnz, también se evaluaron los siguientes controles: un control del solvente (DMSO al 2.5% en agua), un control positivo de la lisis de los tripomastigotes (cristal violeta, 1mg/mL) y un testigo (100 μ L de sangre sin recibir tratamiento alguno). Cada concentración se probó por triplicado en la misma placa.

Una vez adicionados los compuestos a evaluar, se homogenizó el contenido de los pozos y las placas se incubaron a 4°C durante 24 hr. Transcurrido el tiempo de incubación se contaron los tripomastigotes viables a 40x utilizando el método de Brener complementado con el de Pizzi (Filardi y Brener *et al.*, 1984; Pizzi *et al.*, 1957); la técnica de conteo consistió en coleccionar 5 μ L del contenido del pozo, mismos que fueron puestos sobre un portaobjetos y distribuidos uniformemente en el área con un cubreobjetos, para contar los parásitos viables en 25 campos microscópicos utilizando el objetivo de 40x, sacando un promedio del experimento realizado por triplicado.

El cálculo del efecto sobre el porcentaje de sobrevivencia de cada compuesto probado se realizó, tomando como referencia (100 %) el número de tripomastigotes viables que se tuvo en el control con DMSO. El porcentaje de lisis fue calculado de acuerdo a la fórmula:

$$\% \text{ de lisis} = 100 \% - \% \text{ de sobrevivencia}$$

Los resultados obtenidos de los experimentos (3 para la cepa NINOA y 6 para la cepa INC5) fueron promediados y graficados (con el programa Sigma Plot 11.0). El efecto tripanocida de cada DHP fue calculado a partir de su correspondiente gráfica concentración vs. % lisis (ajustando los datos a una función sigmoidea), y fue expresado en términos de la concentración molar requerida para causar la lisis del 50% de los parásitos (CI_{50}).

6.2.3 Evaluación de la actividad *in vitro* de las dihidropiridinas sobre *Leishmania mexicana* (MNYC/BZ/62/M379)

El efecto leishmanicida de las DHPs fue determinado mediante el micrométodo de Azul Alamar (Shimony y Jaffe, 2008), y se uso como fármaco de referencia a la anfotericina B.

Los parásitos fueron obtenidos de la pata inflamada de un ratón previamente infectado con *Leishmania mexicana* (que se le inoculó en la misma pata de la cual se tomó la muestra) y pasados a medio de cultivo. Una vez que esta el parásito adaptado al medio de cultivo adquirió su forma de promastigote, se puso un inóculo de 1×10^6 Leishmanias en 5 mL de medio RPMI suplementado. El nuevo cultivo se monitorizó diariamente contando los parásitos en cámara de Neubauer (utilizando azul de tripano como colorante de exclusión), hasta que el cultivo se encontró en la fase estacionaria donde los parásitos están en estado metacíclico. Posteriormente, se procedió a montar el experimento de la siguiente manera:

Un inóculo obtenido del cultivo de parásitos se lavó centrifugándolo a 2500 rpm/15 min. Se decantó el medio y el precipitado se lavó con PBS 1X tres veces, centrifugando a 2500 rpm/15 min cada lavado. Se ajusta el número de parásitos a una concentración final de 5×10^5 *Leishmanias*/mL. En placas de 96 pozos se colocaron 90 μ L del medio con la concentración adecuada de parásitos y se adicionan 10 μ L de la solución del compuesto de prueba capaz de lograr concentraciones finales en pozo de: 5, 10, 50 y 100 μ g/mL. En este ensayo se tuvieron los siguientes controles: un control con parásitos (sin ningún tratamiento) y un control de solvente (parásitos y DMSO al 1 % en agua).

El contenido de los pozos se homogeneizó y se incubó la placa por 24 hrs a temperatura ambiente. Después de la incubación se agregaron 10 μ L de azul de alamar a cada uno de los pozos y se vuelve a incubar por 21 horas más. La placa se leyó en un fluorómetro a 544 nm excitación y 590 nm emisión. Cada concentración de compuesto fue ensayada 3 veces (3 experimentos independientes), por triplicado. Los resultados de cada experimento fueron promediados y se determinó el porcentaje de inhibición metabólica de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inhibición metabólica} = [1 - (\text{D.O. tratamiento}/\text{D.O. control DMSO})] \times 100$$

donde D.O. tratamiento y D.O control DMSO es la densidad óptica del tratamiento (en el que se adicionó la DHP o la ANF) y la del control del solvente, respectivamente.

El efecto leishmanicida de cada DHP y de la ANF fue calculado a partir de su correspondiente gráfica: concentración vs. % inhibición metabólica (ajustando los datos a una función sigmoidea y fue expresado en términos de la concentración molar requerida para inhibir el metabolismo en el 50% de los parásitos (CI_{50}).

6.2.4 Determinación de la citotoxicidad en células Vero

La citotoxicidad de las DHPs y de los compuestos de referencia (Bnz y ANF) fue determinada en células Vero de acuerdo a una modificación de la metodología propuesta por Denizot, 1986, que utiliza el colorante MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio). Este es un método colorimétrico que midió la reducción del MTT en cristales de formazan por la acción de enzimas mitocondriales (Khademvatan *et al.*, 2011). El procedimiento fue el siguiente:

Una suspensión de células Vero es obtenida a partir de un frasco (t-25) con 100 % de confluencia celular. Para lograr esto el contenido del frasco fue lavado con PBS 1X y tripsinizado (tripsina al 25 %), adicionando al final medio de cultivo MEM con 10% SBF (Díaz-Chiguer *et al.*, 2011). En una microplaca de 96 pozos se colocaron 100 μ L de la suspensión celular y la microplaca se incubó a 37°C con una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ durante 48 horas. Después de la incubación se quitó el medio viejo de los pozos y se les agregó 90 μ L de medio nuevo y 10 μ L de la solución del compuesto de prueba capaz de lograr concentraciones finales en pozo de: 5, 10, 50 y 100 μ g/ml. La placa se incubó por 24 horas más. En este ensayo se tuvieron los siguientes controles: un control con células (sin ningún tratamiento) y un control de solvente (parásitos y DMSO al 2.5 % en agua).

Al concluir la incubación se colocó en cada pozo 50 μ L de la solución de MTT y las placas se incubaron nuevamente 4 horas más. Posteriormente,

se adicionó a cada pozo 100 μ L de la solución SDS-HCl, se homogenizó el contenido de los pozos y la placa se incubó a temperatura ambiente toda la noche. La microplaca fue leída en un lector de ELISA a una longitud de onda de 540 nm.

Cada concentración de compuesto fue ensayada 4 veces por triplicado. Los resultados de cada experimento fueron promediados y se determinó el porcentaje de muerte celular de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Muerte celular} = [1 - (\text{D.O. tratamiento}/\text{D.O. control DMSO})] \times 100$$

donde D.O. tratamiento y D.O control DMSO son la densidad óptica del tratamiento (en el que se adicionó la DHP o la Anf) y la del control del solvente, respectivamente.

El efecto citotóxico de cada DHP y de los compuestos de referencia fue calculado a partir de su correspondiente gráfica: concentración vs. % de muerte (ajustando los datos a una función sigmoidea, y fue expresado en términos de la concentración molar que fue citotóxica para el 50% de los parásitos (CC_{50}).

6.2.5. Análisis estadístico

Los resultados de las determinaciones biológicas fueron analizados estadísticamente mediante un ANOVA, seguido de la prueba de comparación múltiple de Tukey, utilizando un nivel de significancia (p) de 0.05.

7. RESULTADOS

7.1 Diseño y síntesis de DHPs

Las DHPs diseñadas (serie SAD) fueron análogos de nicardipina que tuvieron como característica estructural el poseer un sustituyente en la posición *para* del anillo aromático. Estudios de relación estructura-actividad indican que esta característica resultará en la disminución o pérdida del efecto BEC de las DHPs, lo que es apoyado sólidamente por estudios en los que se ha evaluado DHPs con esta característica estructural y que reportan que las DHPs sustituidas en la posición *para* del anillo aromático del centro quiral, presentan un efecto bloqueador de canales de calcio muy bajo (prácticamente nulo).

La síntesis de las DHPs inició con la preparación del acetato de de N-benzil-N-metil-2-aminoetilo (3), reactivo necesario para la síntesis de las DHPs propuestas y que no puede ser adquirido comercialmente. Este fue sintetizado de acuerdo al procedimiento propuesto, obteniéndose la cantidad suficiente para preparar las 6 DHPs de la serie SAD que están incluidas en este estudio. La estructura de este reactivo fue plenamente confirmada por su espectro de RMN ^1H (**figura 17**), así como por su espectro de masas (**figura 18**). En el caso del espectro de resonancia pueden ser observadas las señales correspondientes a los protones presentes en la estructura del acetato de N-benzil-N-metil-2-aminoetilo (3); tanto el desplazamiento como la multiplicidad de las señales concuerdan con el tipo de hidrógenos del producto esperado. Con respecto al análisis por masas, el valor del ión molecular obtenido (249 m/z) corresponde al peso molecular del acetato de de N-benzil-N-metil-2-aminoetilo (3), lo que corrobora la identidad del producto obtenido.

En este trabajo se sintetizaron en total 6 DHPs (serie SAD), cuyas estructuras son mostradas en la **tabla 1**. Las DHPs obtenidas son análogos de nicardipina que presentan sustitución en la posición *para* del anillo aromático; la nicardipina tiene la misma estructura que **SAD6**, excepto que posee un grupo nitro en lugar del hidrógeno en la posición *meta*. Las DHPs

sintetizadas son moléculas asimétricas (quirales) y fueron obtenidas (y evaluadas) como racematos.

La DHPs sintetizadas se diferencian entre sí por el sustituyente que presentan en el fenilo del centro quiral. Como se puede observar en la **tabla 1**, se tienen sustituyentes de diferente naturaleza. Por ejemplo, se tienen sustituyentes de tamaño pequeño como el hidrógeno (presente en **SAD6**) y de tamaño grande como el bromo (presente en **SAD5**). Asimismo, se tienen sustituyentes electroattractores como son los halógenos y grupo nitro (presentes en **SAD1**, **SAD3-SAD5**), y uno electrodonador como es el metilo (presente en **SAD2**). También se tienen un sustituyentes de carácter hidrofílico (como es el grupo nitro) y de carácter hidrofóbico (como son los halógenos y el metilo).

Los rendimientos obtenidos en la síntesis de las DHPs fueron del 5 al 27% aproximadamente, lográndose obtener entre 0.3 a 1.3 g de cada compuesto. El bajo rendimiento obtenido para varias de las DHPs puede deberse en parte a la exhaustiva purificación que se realizó de los productos, como se mencionó en el apartado de métodos. Cabe señalar que los rendimientos fueron calculados con base en el compuesto ya purificado.

Las DHPs sintetizadas fueron obtenidas en su forma de base libre; se intento obtener sus clorhidratos, pero esto no fue posible. Las DHPs ya purificadas tuvieron una consistencia semisólida (“miel”), razón por la cual no se pudo determinar (y reportar) su punto de fusión.

La caracterización química de cada una de las DHPs sintetizadas fue realizada por medio de sus correspondientes espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C y de masas, así como por los experimentos tipo HETCOR, DEPT y COSY, en algunos casos, obteniendo resultados positivos para todas las DHPs (**figuras 19-51**).

Los espectros de RMN ^1H , RMN ^{13}C y masas indican que los productos obtenidos y analizados corresponden en estructura a las DHPs que se deseaba sintetizar. Para todas las DHPs, el análisis de sus espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C indican que tanto el desplazamiento químico, la multiplicidad y

la integración de las señales (**tablas 2 y 3**) concuerdan con el tipo de hidrógenos y carbonos del producto esperado.

En los espectros de masas de las DHPs (**figuras 24, 28, 34, 40, 46 y 51**) se puede observar señales que corresponden a la abundancia relativa de los diversos fragmentos moleculares, que resultaron al someter a los compuestos a este tipo de análisis. Dentro de estos espectros están indicadas las señales del pico base (que corresponde al ión más abundante) y el ión molecular (cuya masa debe corresponder al peso molecular del compuesto analizado). En cuatro de las DHPs (**SAD1, SAD2, SAD3 y SAD6**) la masa del ión molecular fue equivalente a su peso molecular, mientras que en los otros dos (**SAD4 y SAD5**) hubo una diferencia de una unidad entre ellos.

7.2 Elección de otras dihidropiridinas

Con el fin de ampliar la serie de estudio, se incluyeron otros seis análogos de nicardipina previamente sintetizados por nuestro grupo de investigación (Manríquez-Villalobos, 2012). Estas DHPs adicionales (serie SMV, **tabla 4**) tienen un sustituyente en la posición *meta* del anillo aromático y poseen cadenas básicas en los esteres de las posiciones 3 y 5 del anillo 1,4-dihidropiridinico. Las DHPs de la serie SMV también fueron diseñadas con el propósito de que tuvieran bajo efecto bloqueador de canales de calcio, basados en el trabajo de Iwanami *et al.*, 1979, en donde sintetizaron también el análogo **SMV1** y encontraron que su potencia vasodilatadora es 20 veces menor a la de la nicardipina.

Las DHPs de la serie SMV, a diferencia de las de la serie SAD, son simétricas (no quirales). En cuanto a la sustitución en el anillo aromático del centro simétrico, ambas series presentan el mismo conjunto de sustituyentes, solo que en diferente posición (en la serie SAD la sustitución es en *para*, en tanto que en la serie SMV la sustitución es en *meta*).

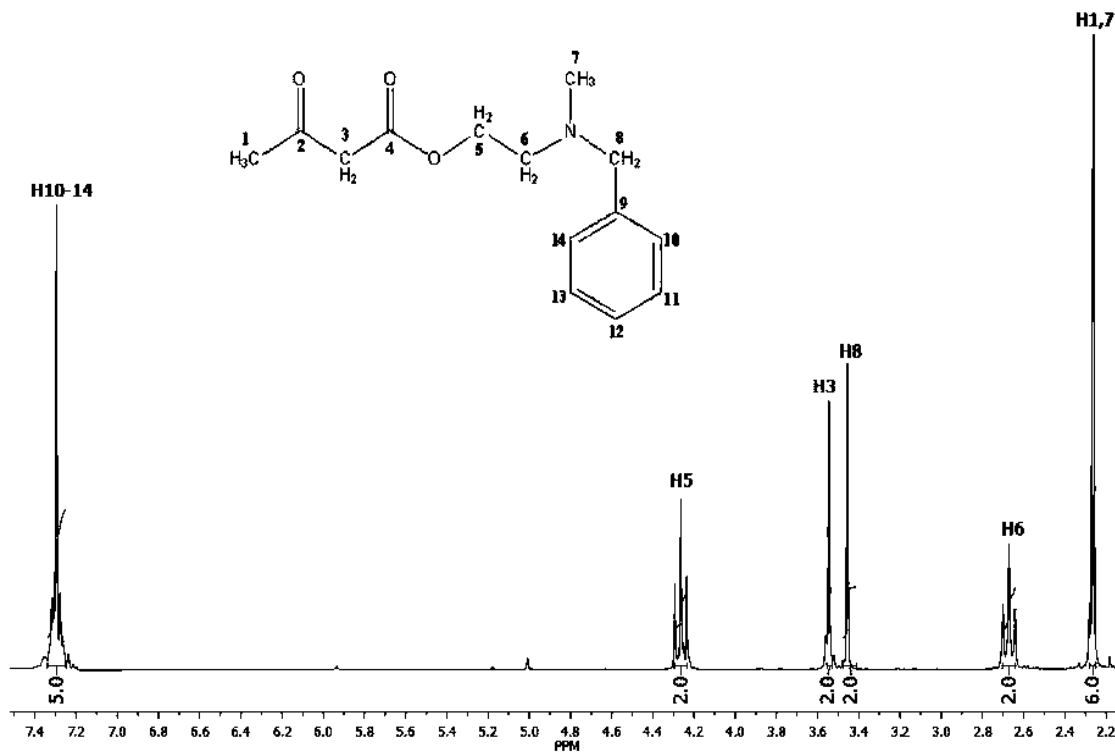


Figura 17. Espectro de RMN ¹H del acetoacetato de etilo (3).

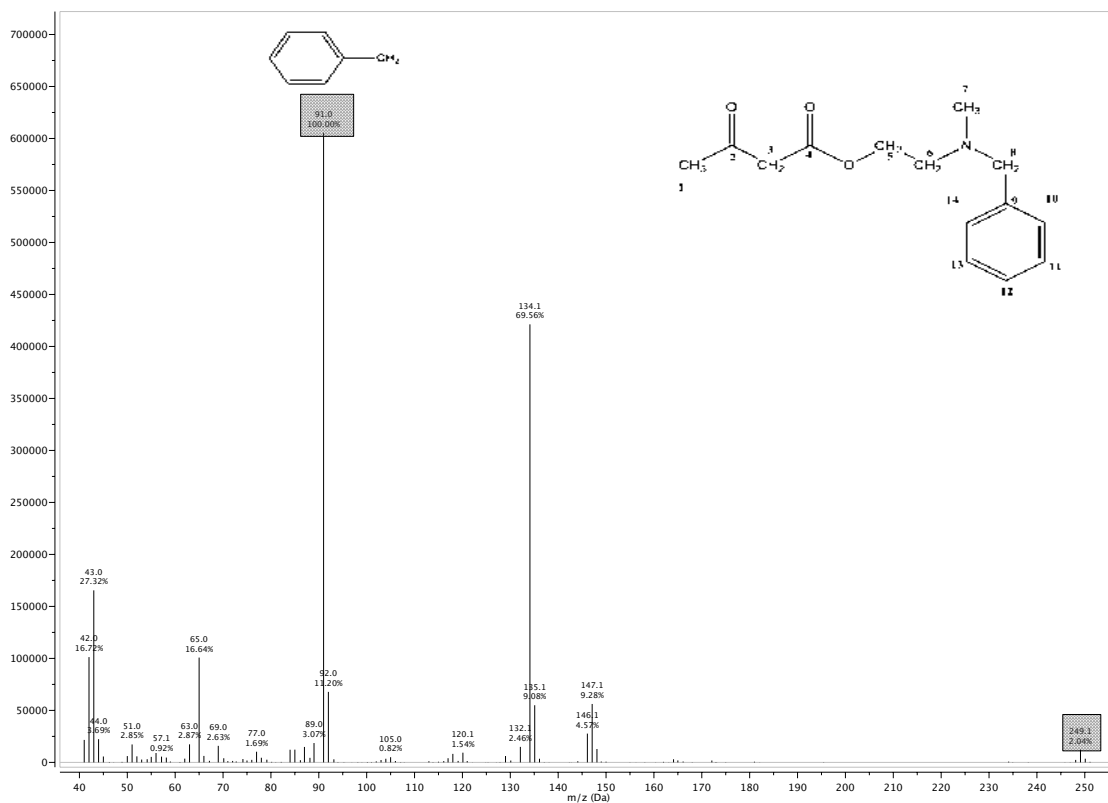
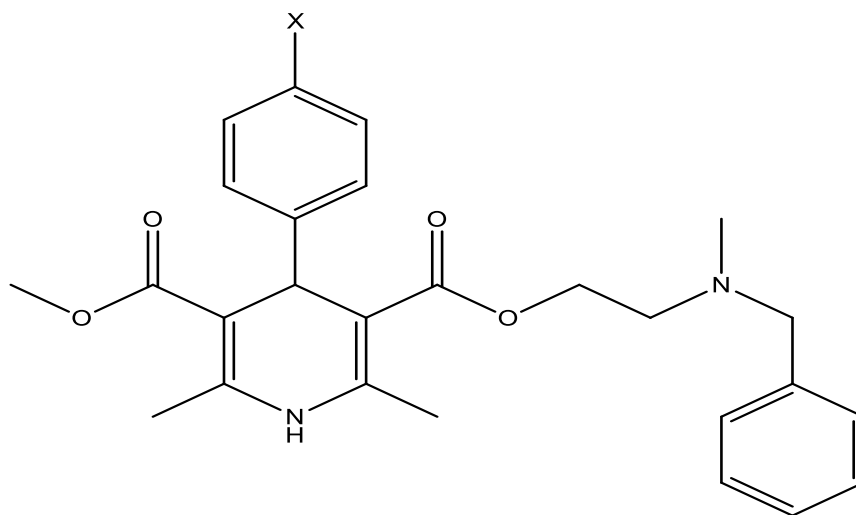


Figura 18. Espectro de masas del acetoacetato de etilo (3).

Tabla 1. Estructura y rendimientos de las DHPs de la serie SAD.

DHP	X	Formula molecular	PM ^a	Rendimiento ^b (%)
SAD1	NO ₂	C ₂₆ H ₂₉ N ₃ O ₆	479	26.9
SAD2	CH ₃	C ₂₇ H ₃₂ N ₂ O ₄	448	5.1
SAD3	F	C ₂₆ H ₂₉ FN ₂ O ₄	452	5.5
SAD4	Cl	C ₂₆ H ₂₉ ClN ₂ O ₄	469	10.5
SAD5	Br	C ₂₆ H ₂₉ BrN ₂ O ₄	513	18.4
SAD6	H	C ₂₆ H ₃₀ N ₂ O ₄	434	20.2

^aCalculado mediante masas. ^bObtenido después de purificación en columna.

Tabla 2. Señales de RMN ^1H de las DHPs sintetizadas.

DHP	MHz	RMN ^1H (δ , ppm) ^a
SAD1	200	8.04 (2H, d, $J = 8.9$ Hz, H10,14), 7.44 (2H,d, $J = 8.9$ Hz, H11, H13), 7.28 (5H, m, $J = 8.8$ Hz, H21-25), 5.71 (1H, s, H1), 5.12 (1H, s, H4), 4.17 (2H, t, $J = 5.9$ Hz, H16), 3.64 (3H, s, H8), 3.51 (2H, s, H19), 2.62 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H17), 2.36 (6H, d, $J = 5.5$ Hz, H2', H6'), 2.20 (3H, s, H18).
SAD2	400	7.30 – 7.27 (4H, m, $J = 4.5$ Hz, H21,H22,H24,H25), 7.26 (1H, s, 23H), 7.16 (2H, d, $J = 8.1$ Hz, H10,H14), 6.99 (2H, d, $J = 7.8$ Hz, H11,H13), 5.66 (1H, s, H1), 4.98 (1H, s, H4), 4.20 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H16), 3.63 (3H, s, H18), 3.53 (2H, s, H19), 2.69 (2H, t, $J = 7.0$ Hz, H17), 2.33 (6H, s, H2',H6'), 2.25 (3H,s, H26), 2.22 (3H, s, H18).
SAD3	200	5.67 (1H, s, H1), 4.99 (1H, s, H4), 4.18 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H16), 3.63 (3H, s, $J = 2.3$ Hz, H8), 3.51 (2H, s, H19), 2.64 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H17), 2.33 (6H, s, $J = 6.2$ Hz, H2', H6'), 2.21 (3H, s, $J = 4.0$ Hz, H18).
SAD4	200	7.39 – 7.02 (9H, m, H10, H11, H11, H13, H21-25), 5.64 (1H, s, H1), 4.99 (1H, s, H4), 4.17 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H16), 3.63 (3H, s, $J = 9.6$ Hz, H8), 3.51 (2H, s, H19), 2.63 (2H, t, $J = 6.1$ Hz, H17), 2.33 (6H, s, H2', H6'), 2.21 (3H, s, H18).
SAD5	200	7.34 – 7.22 (7H, m, H10, H14, H21-25), 7.15 (2H, d, $J = 8.5$ Hz, H11, H13), 5.66 (1H, s, H1), 4.97 (1H, s, H4), 4.17 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H16), 3.63 (3H, s, H8), 3.51 (2H, s, H19), 2.63 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H17), 2.33 (6H, s, $J = 1.6$ Hz, H2', 6'), 2.21 (3H, s, H18).
SAD6	200	7.44 – 7.02 (9H, m, H10, 11, 13, 14, 21-25), 5.70 (1H, s, H1), 5.02 (1H, s, H4), 4.18 (2H, t, $J = 6.0$ Hz, H16), 3.63 (3H, s, H8), 3.51 (2H, s, H19), 2.65 (2H, t, $J = 5.3$ Hz, H17), 2.33 (6H, s, H2', H6'), 2.20 (3H, s, H18).

^aDesplazamiento químico (δ) de las señales en ppm, con respecto al TMS, s = singulete, d = doblete, t = triplete, m = multiplete.

Tabla 3. Señales de RMN ^{13}C de las DHPs sintetizadas.

DHP	MHz	RMN ^{13}C (δ , ppm) ^a
SAD1	50	167.42 (s, C15), 166.91 (s, C7), 154.71 (s, C9), 146.29 (s, C12), 144.91 (d, $J = 5.0$ Hz, C2, C6), 138.58 (s, C20), 128.88 (s, C21, 25), 128.68 (s, C11, 13), 128.22 (s, C22, 24), 127.07 (s, C23), 123.36 (s, C10, 14), 102.96 (s, C3, C5), 77.63 (s, CDCl_3), 76.99 (s, CDCl_3), 76.35 (s, CDCl_3), 62.47 (s, C19), 61.71 (s, C16), 55.42 (s, C17), 51.13 (s, C8), 42.25 (s, C18), 39.80 (s, C4), 19.66 (d, $J = 2.2$ Hz, C2', C6').
SAD2	100	167.99 (s, C15), 167.46 (s, C7), 147.38 (s, C9), 144.17 (d, $J = 4.1$ Hz, C2, C6), 138.90 (s, C20), 130.45 – 122.03 (m, C10, 11, 13, 14, 21-25), 116.87 (s, C12), 103.92 (s, C3, 5), 77.62 (s, CDCl_3), 76.99 (s, CDCl_3), 76.35 (s, CDCl_3), 62.48 (s, C19), 61.65 (s, C16), 55.55 (s, C17), 50.94 (s, C8), 42.26 (s, C18), 39.26 (s, C4), 19.60 (d, $J = 3.4$ Hz, C2', C6').
SAD3	50	167.88 (s, C15), 167.35 (s, C7), 158.91 (s, C12), 144.09 (d, $J = 7.3$ Hz, C2, C6), 143.29 (s, C9), 138.78 (s, C20), 129.22 (d, $J = 7.9$ Hz, C11, 13), 128.91 (s, C21, 25), 128.20 (s, C22, 24), 127.00 (s, C23), 114.61 (d, $J = 21.0$ Hz, C10, 14), 103.95 (s, C3, C5), 62.49 (s, C19), 61.63 (s, C16), 55.53 (s, C17), 50.98 (s, C8), 42.26 (s, C18), 38.71 (s, C4), 19.63 (d, $J = 2.8$ Hz, C2', C6').
SAD4	50	167.77 (s, C15), 167.25 (s, C7), 145.95 (s, C9), 144.21 (d, $J = 4.8$ Hz, C2, C6), 138.86 (s, C20), 131.72 (s, C12), 129.19 (s, C21, 25), 128.89 (s, C11, 13), 128.20 (s, C22, 24), 128.03 (s, C10, 14), 126.97 (s, C23), 103.68 (s, C3, C5), 77.62 (s, CDCl_3), 76.99 (s, CDCl_3), 76.35 (s, CDCl_3), 62.50 (s, C19), 61.68 (s, C16), 55.53 (s, C17), 51.01 (s, C8), 42.29 (s, C18), 38.93 (s, C4), 19.65 (d, $J = 2.7$ Hz, C2', 6').
SAD5	50	167.75 (s, C15), 167.23 (s, C7), 146.46 (s, C9), 144.25 (d, $J = 4.9$ Hz, C2, C6), 138.85 (s, C20), 131.65 – 127.61 (m, C11, 13, 21, 22, 24, 25), 126.98 (s, C10, 14), 119.92 (s, C 23), 116.88 (s, C12), 103.59 (s, C3, C5), 62.51 (s, C19), 61.68 (s, C16), 55.52 (s, C17), 51.02 (s, C8), 42.29 (s, C18), 39.01 (s, C4), 19.65 (d, $J = 2.7$ Hz, C2', C6').
SAD6	50	167.99 (s, C15), 167.46 (s, C7), 147.38 (s, C9), 144.17 (d, $J = 4.1$ Hz, C2, 6), 138.90 (s, C20), 130.45 – 122.03 (m, C10, 11, 13, 14, 21-25), 116.87 (s, C12), 103.92 (s, C3,5), 77.62 (s, CDCl_3), 76.99 (s, CDCl_3), 76.35 (s, CDCl_3), 62.48 (s, C19), 61.65 (s, C16), 55.55 (s, C17), 50.94 (s, C8), 42.26 (s, C18), 39.26 (s, C4), 19.60 (d, $J = 3.4$ Hz, C2', C6').

^aDesplazamiento químico (δ) de las señales en ppm, con respecto al TMS, s = singulete, d = doblete, t = triplete, m = multiplete.

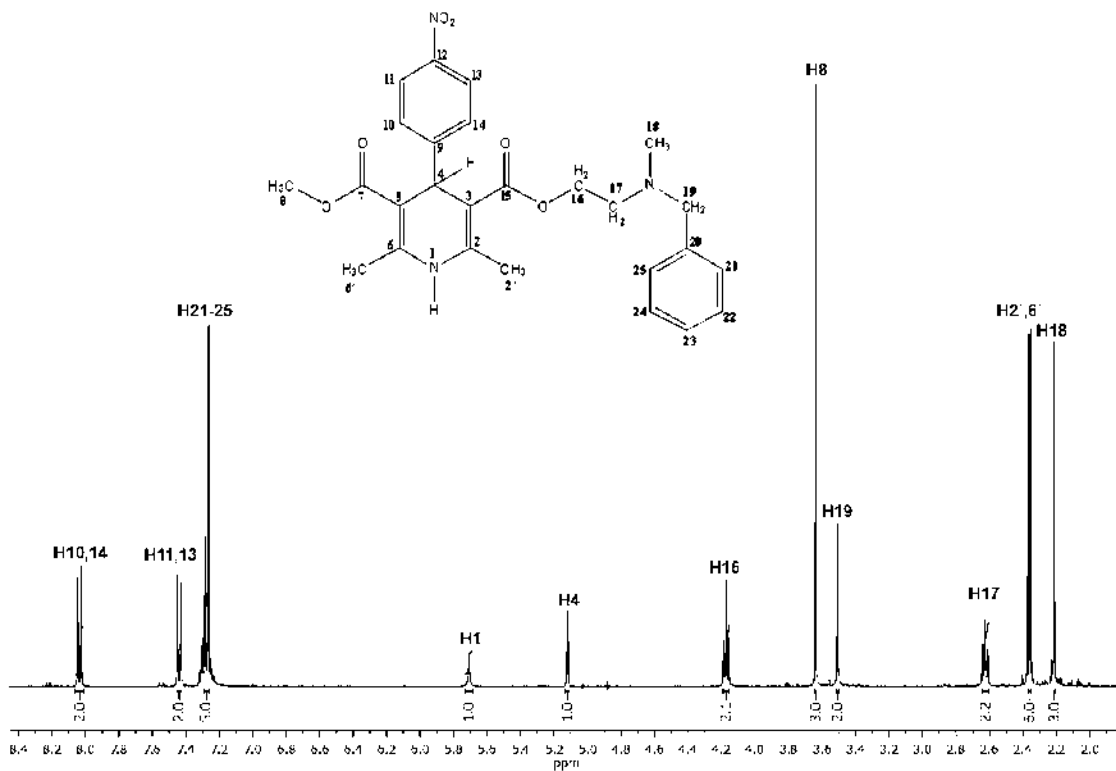


Figura 19. Espectro de RMN ¹H del compuesto SAD1

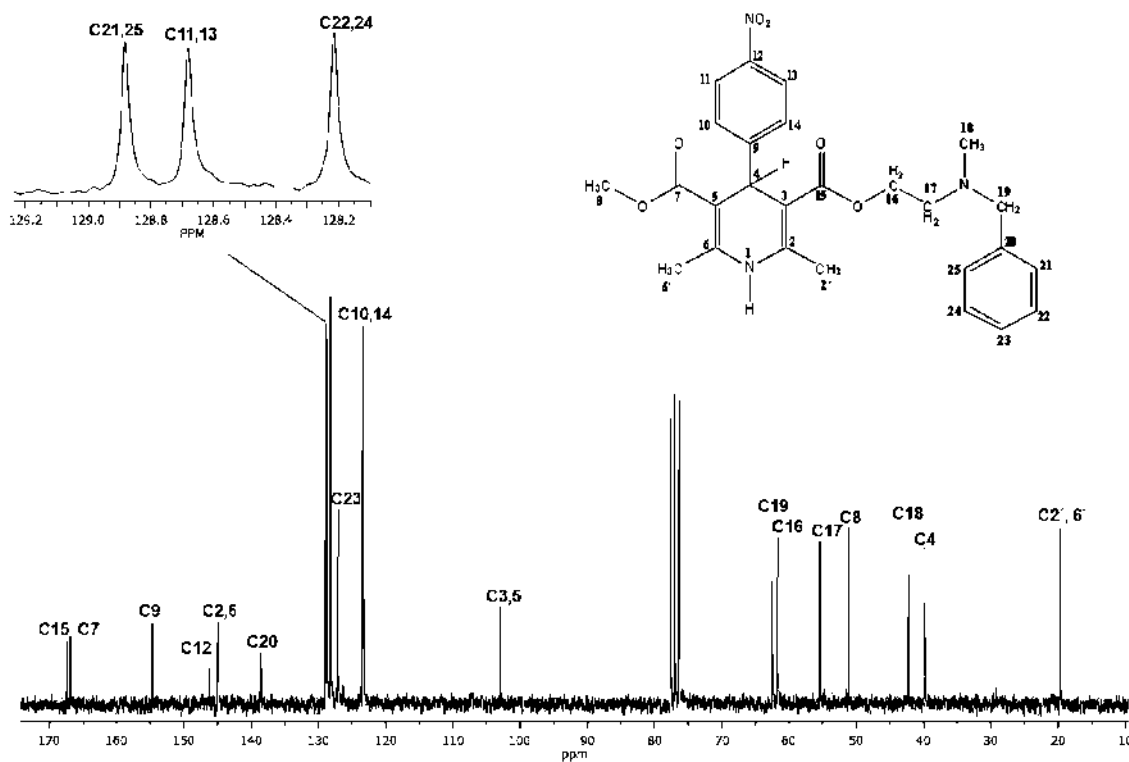


Figura 20. Espectro de RMN ¹³C del compuesto SAD1

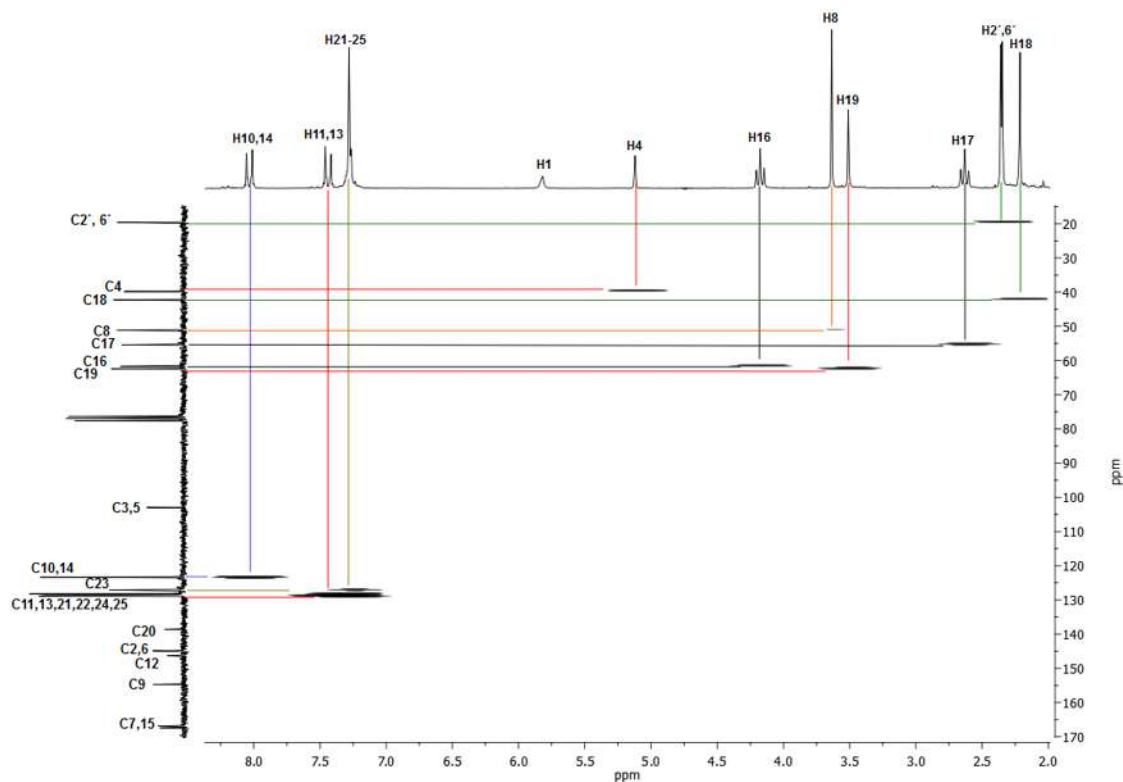


Figura 21. Análisis HETCOR del compuesto SAD1

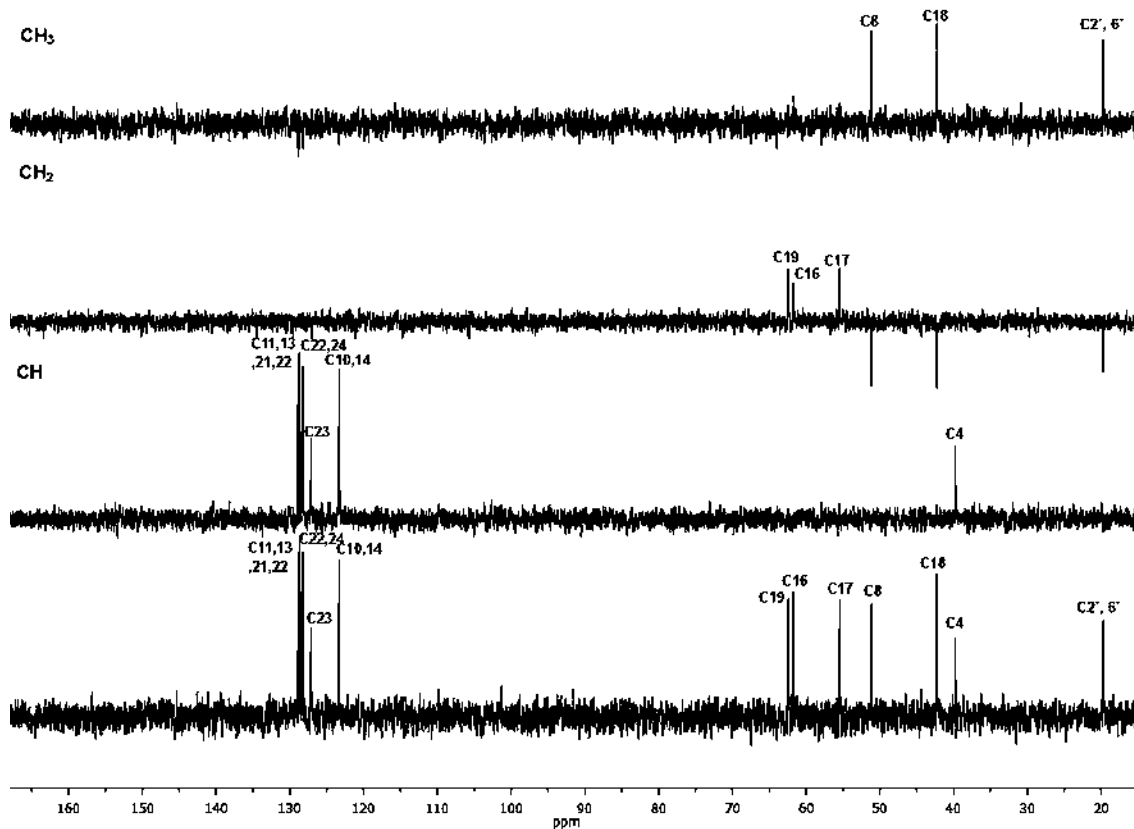


Figura 22. Análisis DEPT del compuesto SAD1

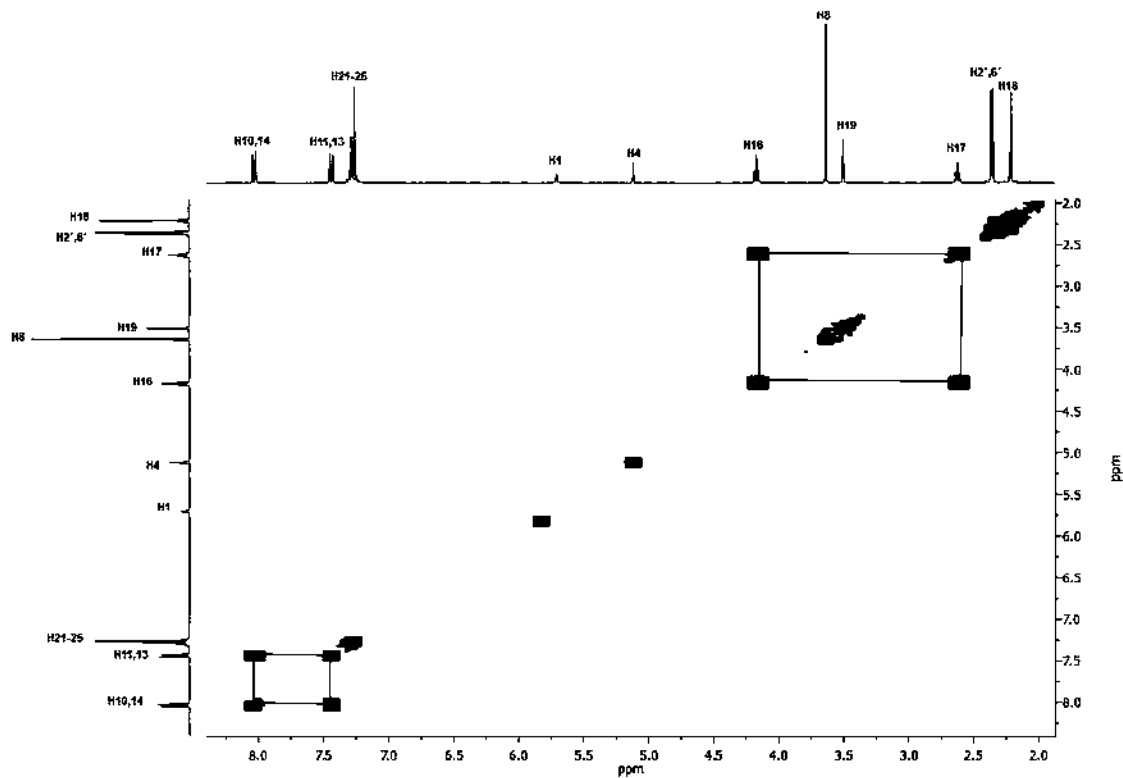


Figura 23. Análisis COSY del compuesto SAD1

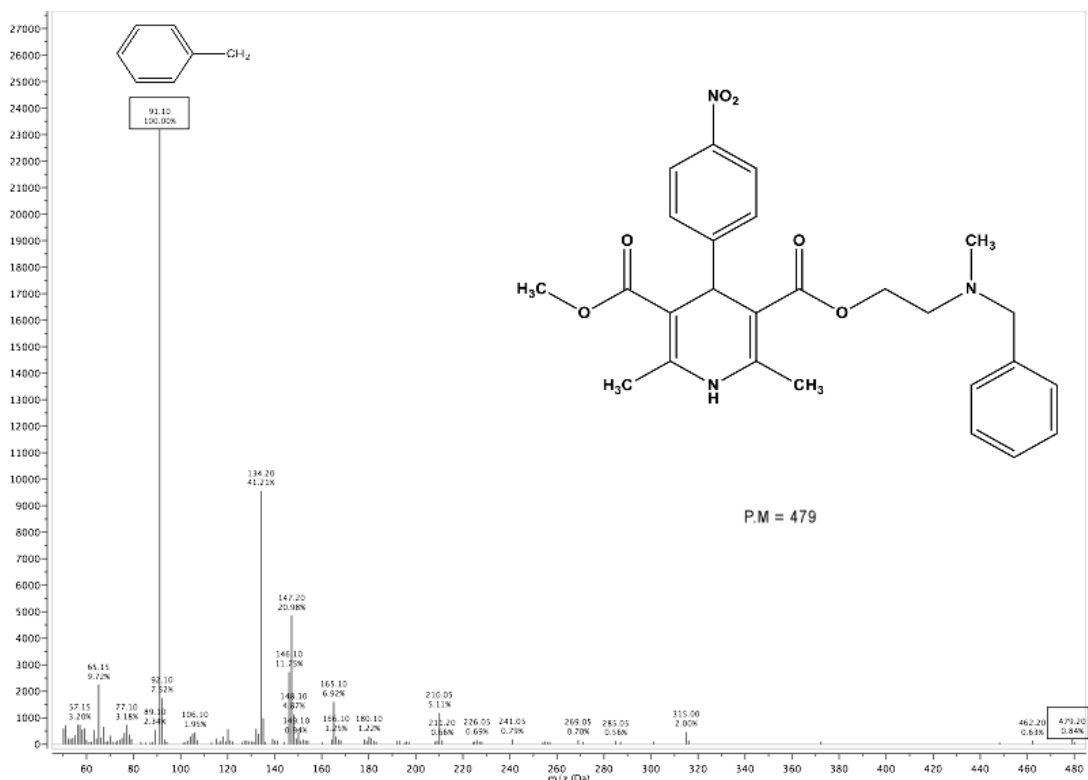


Figura 24. Espectro de masas del compuesto SAD1

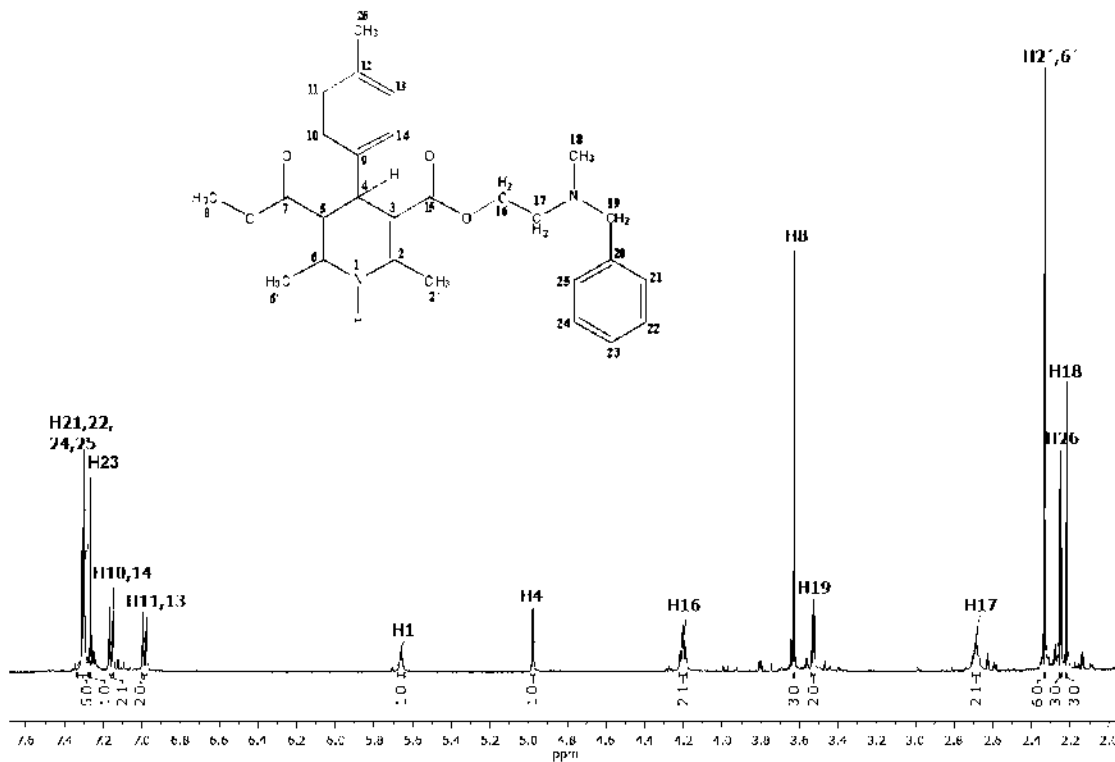


Figura 25. Espectro de RMN ^1H del compuesto SAD2

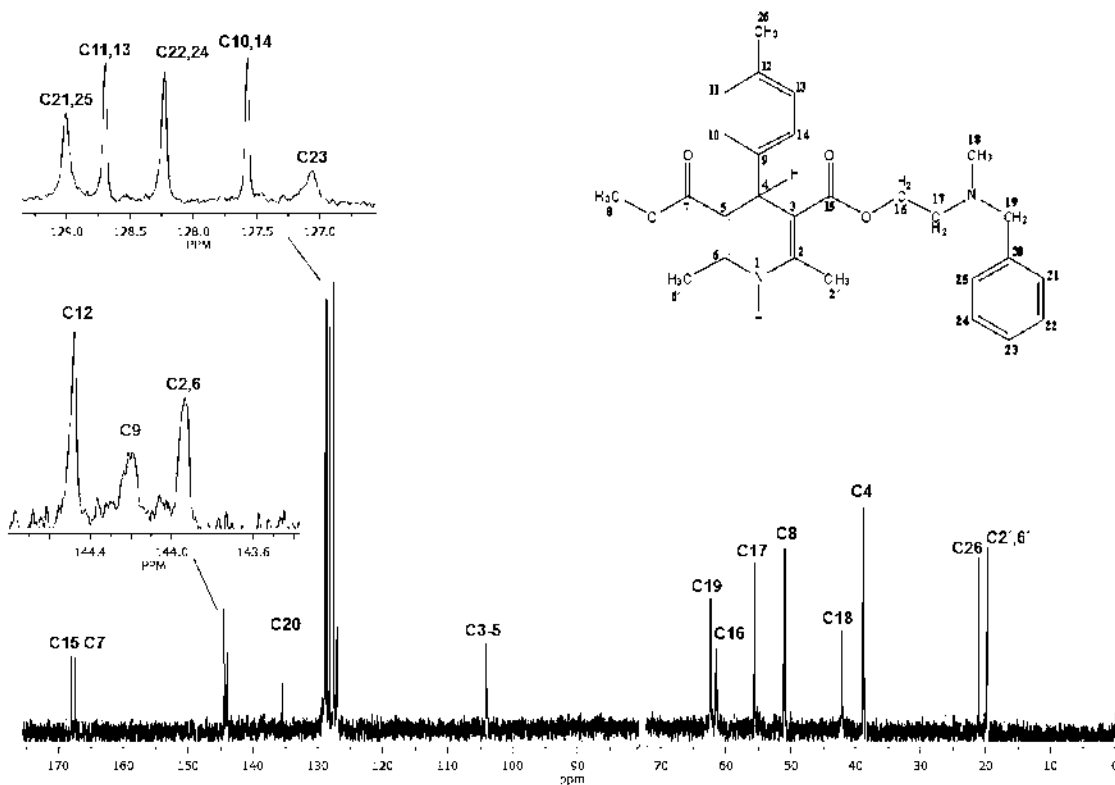


Figura 26. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto SAD2

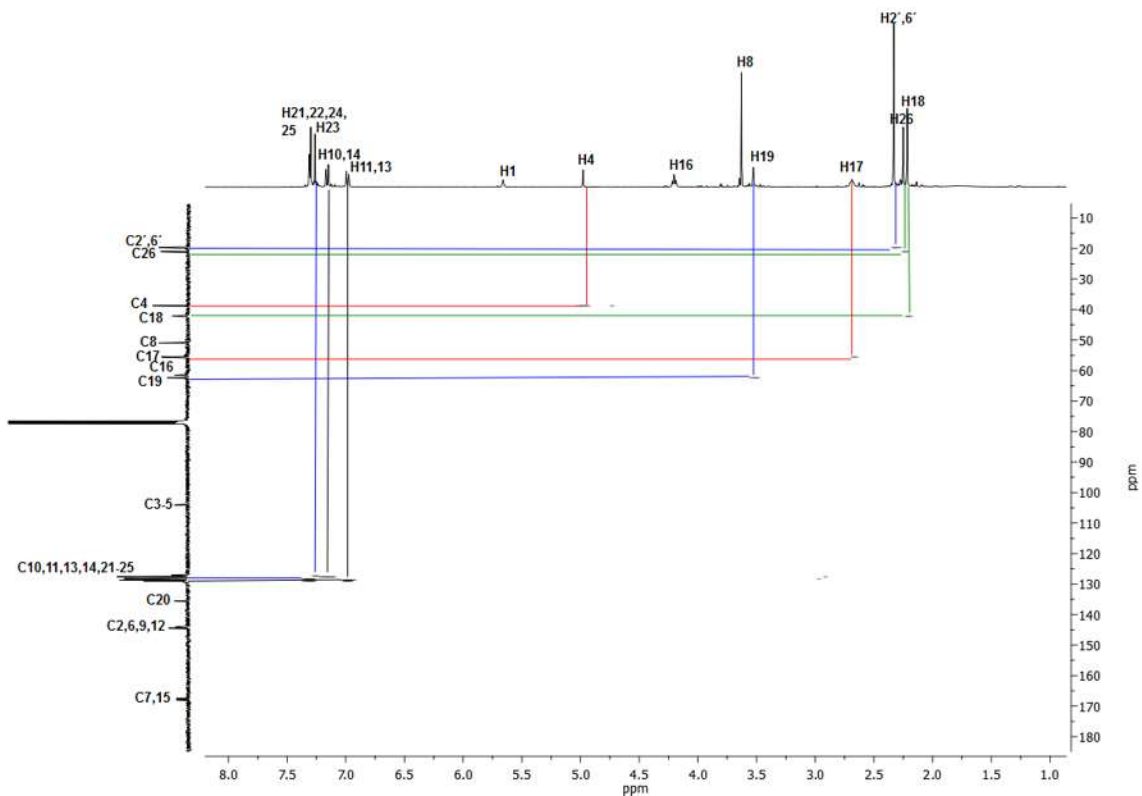


Figura 27. Análisis HETCOR del compuesto SAD2

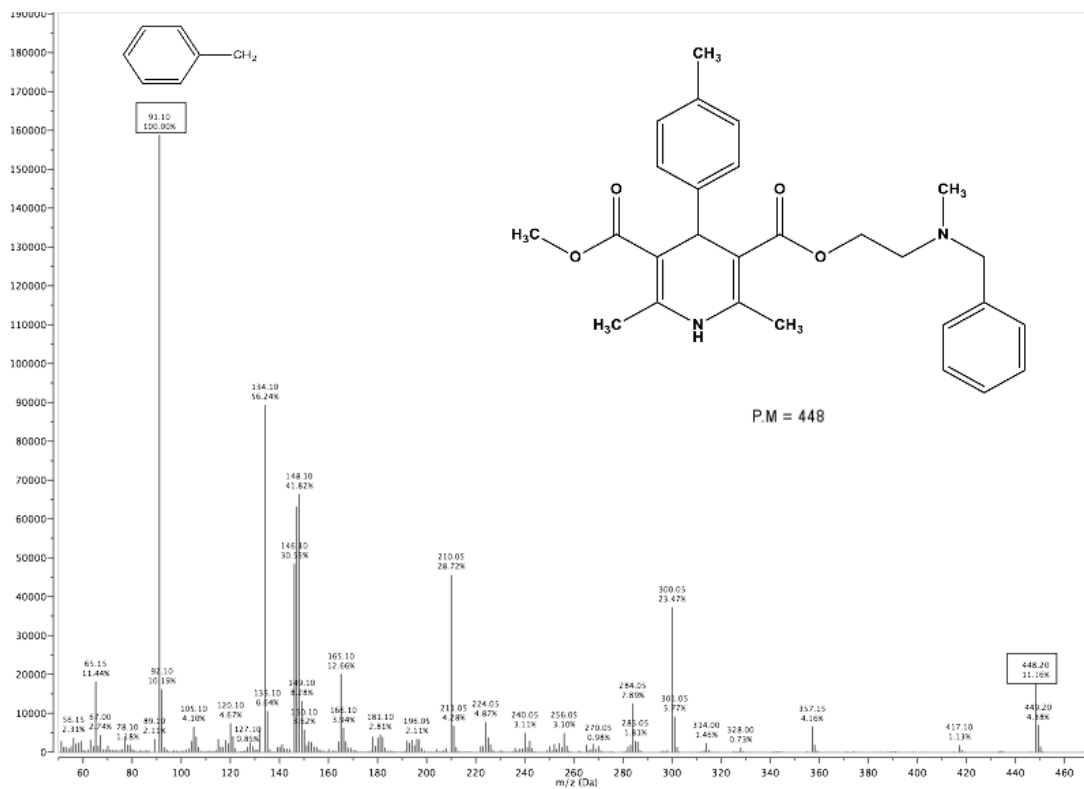
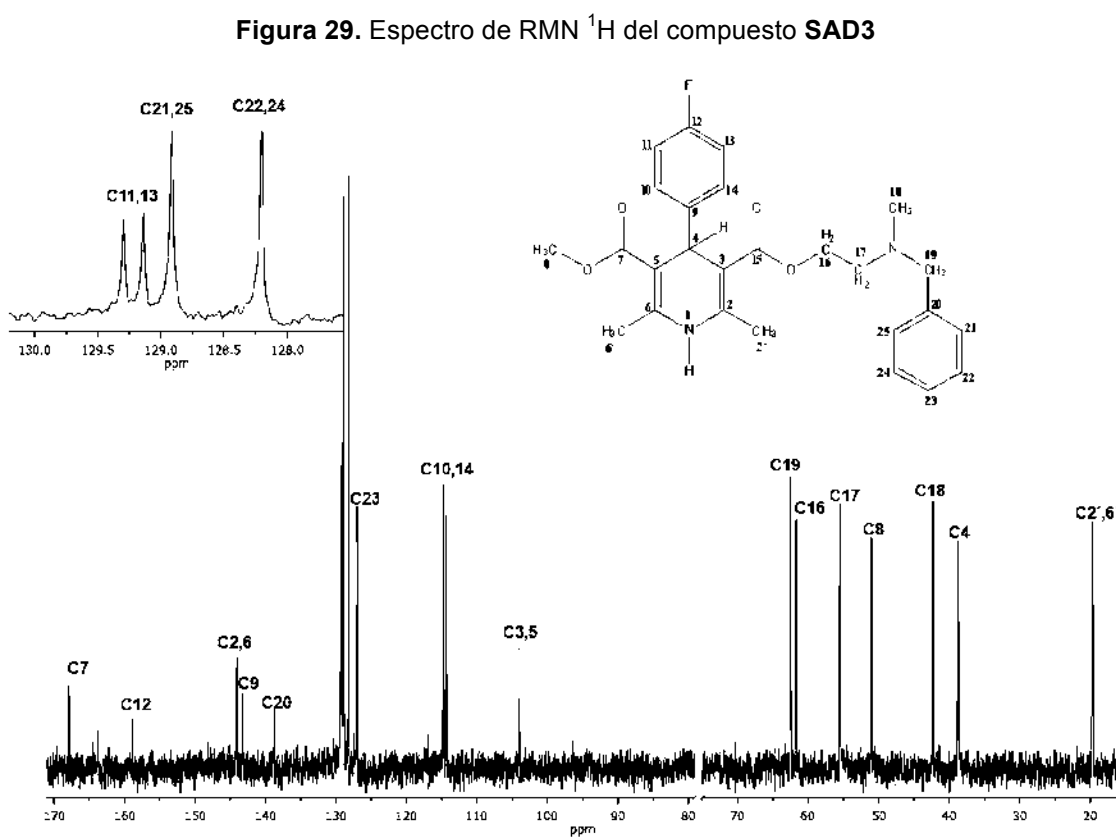
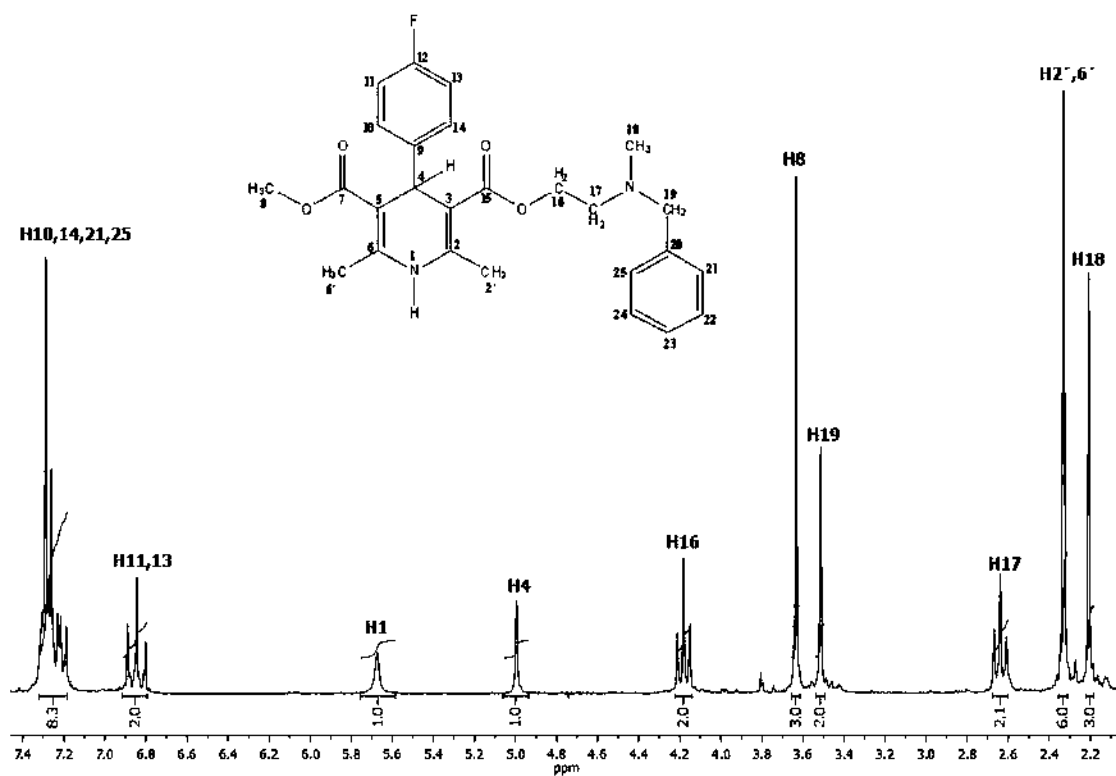


Figura 28. Espectro de masas del compuesto SAD2



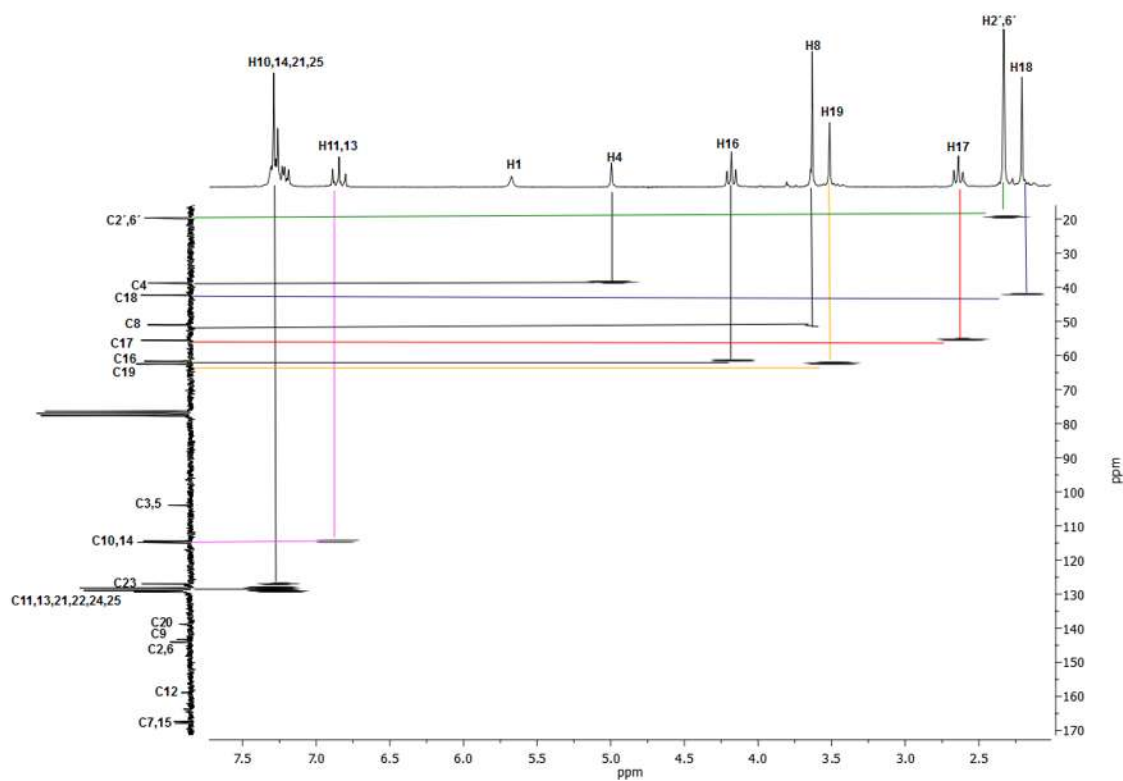


Figura 31. Análisis HETCOR del compuesto SAD3

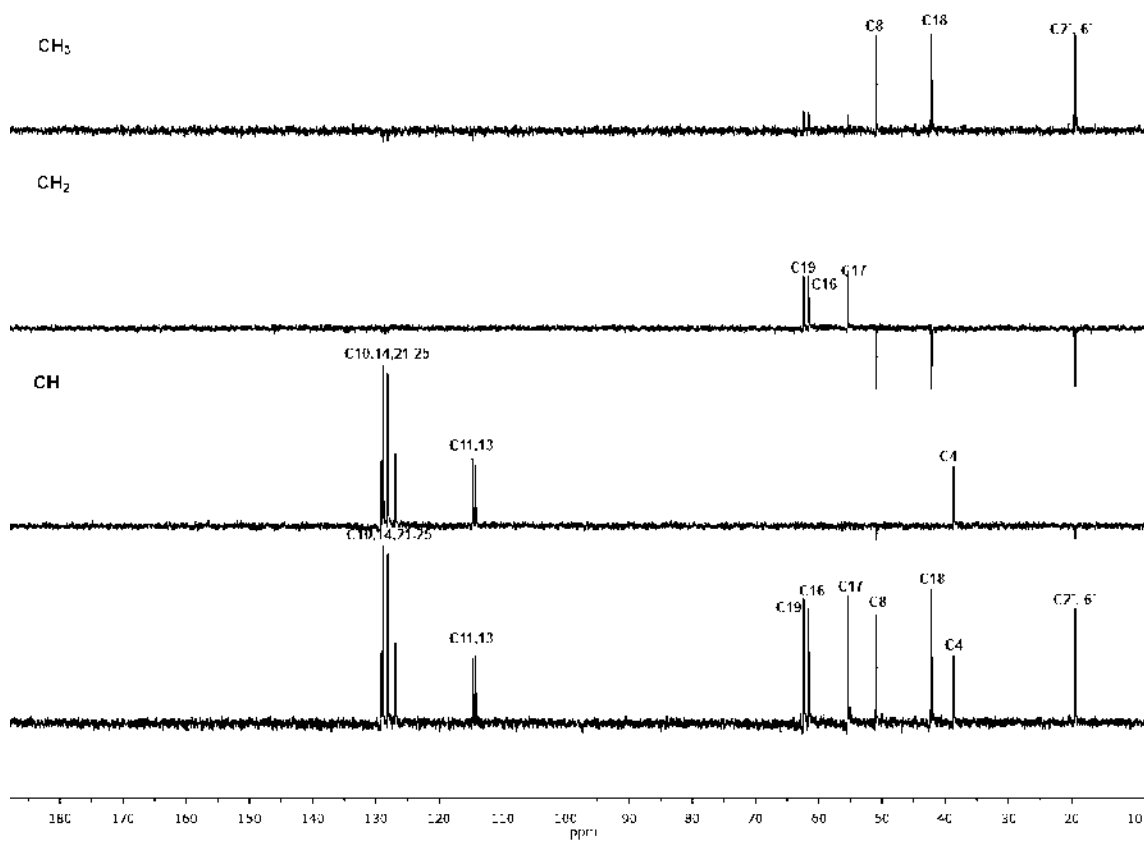


Figura 32. Análisis DEPT del compuesto SAD3

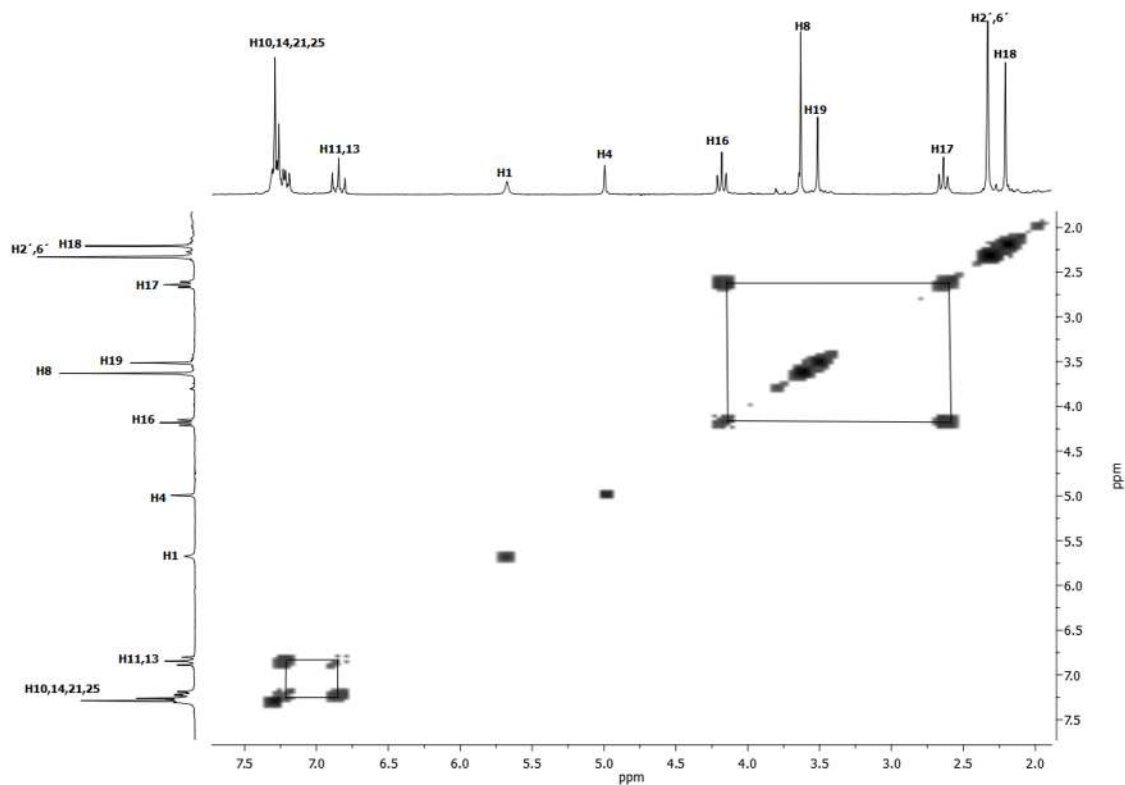


Figura 33. Análisis COSY del compuesto SAD3

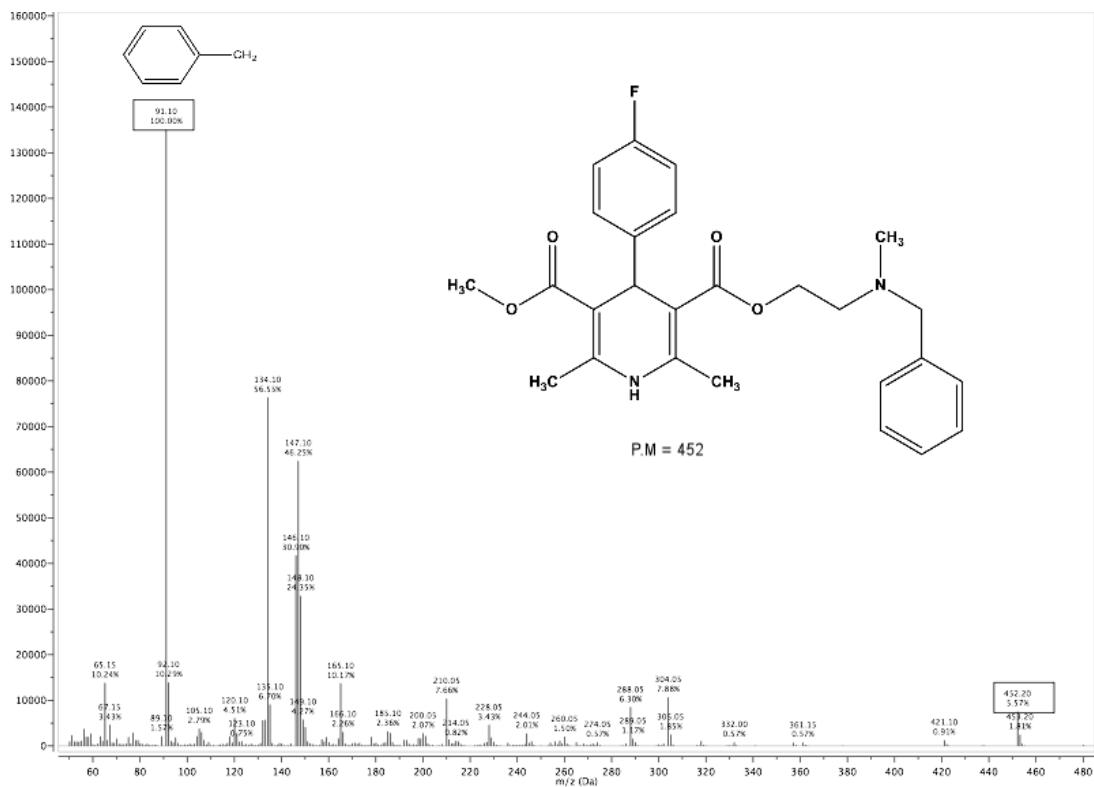
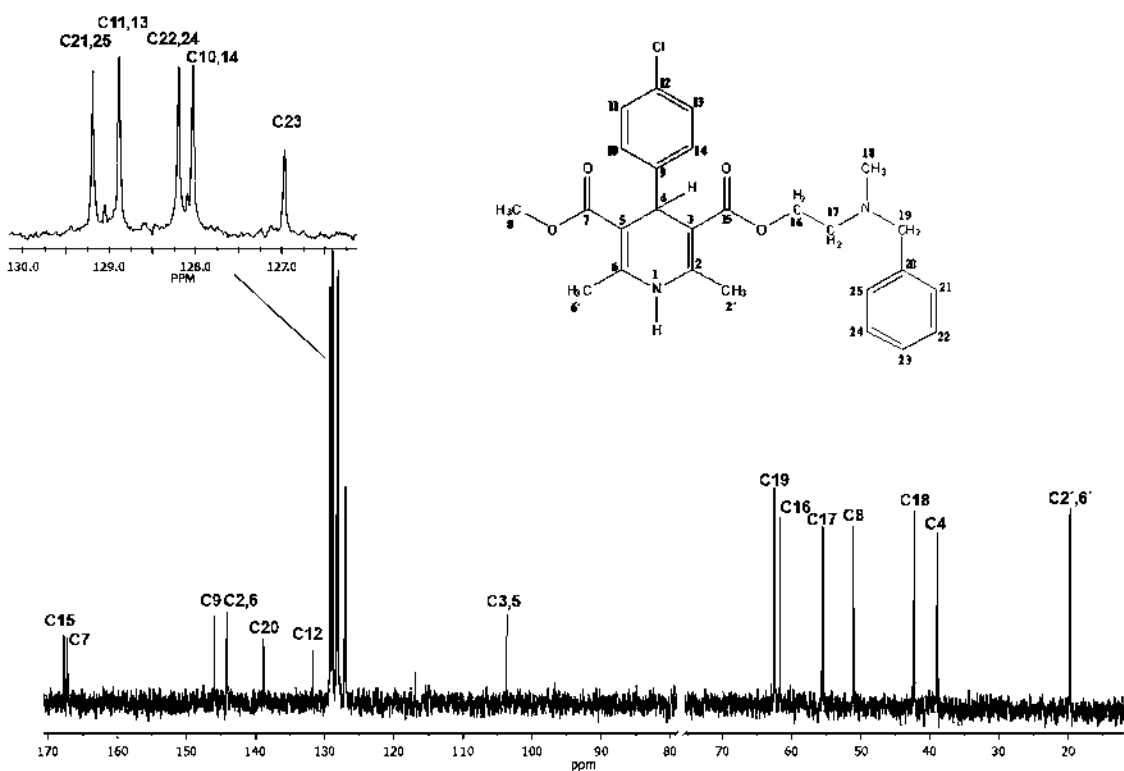
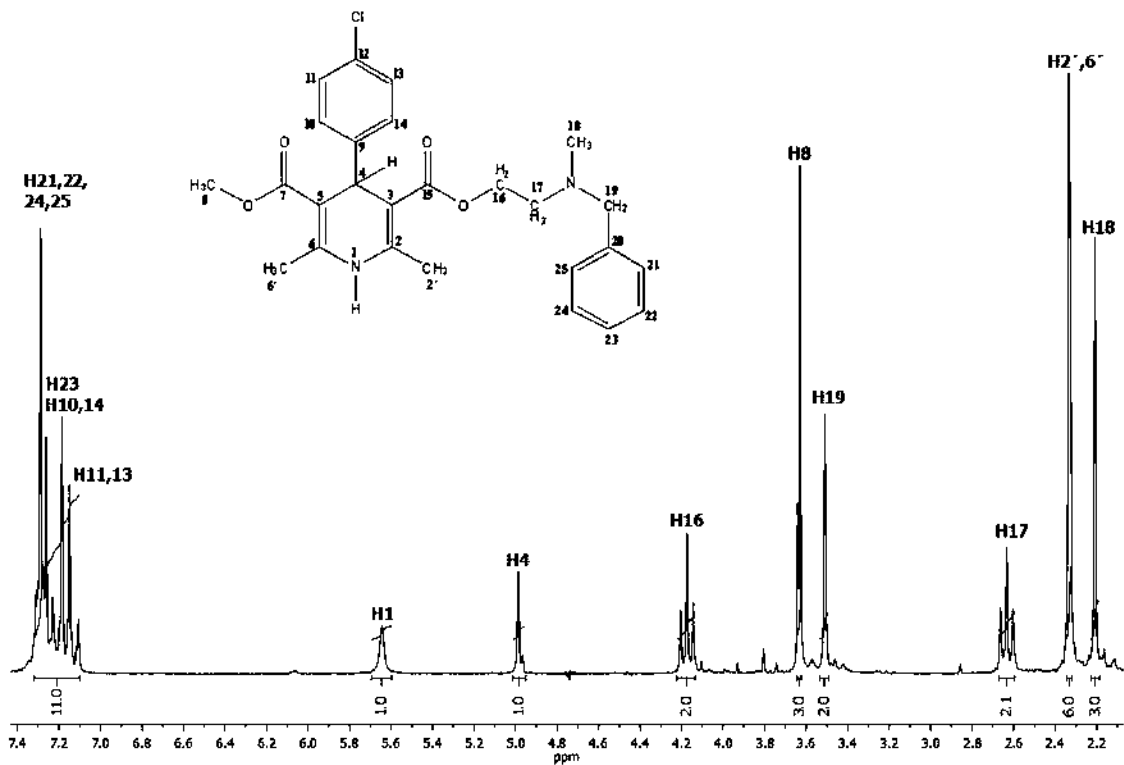


Figura 34. Espectro de masas del compuesto SAD3



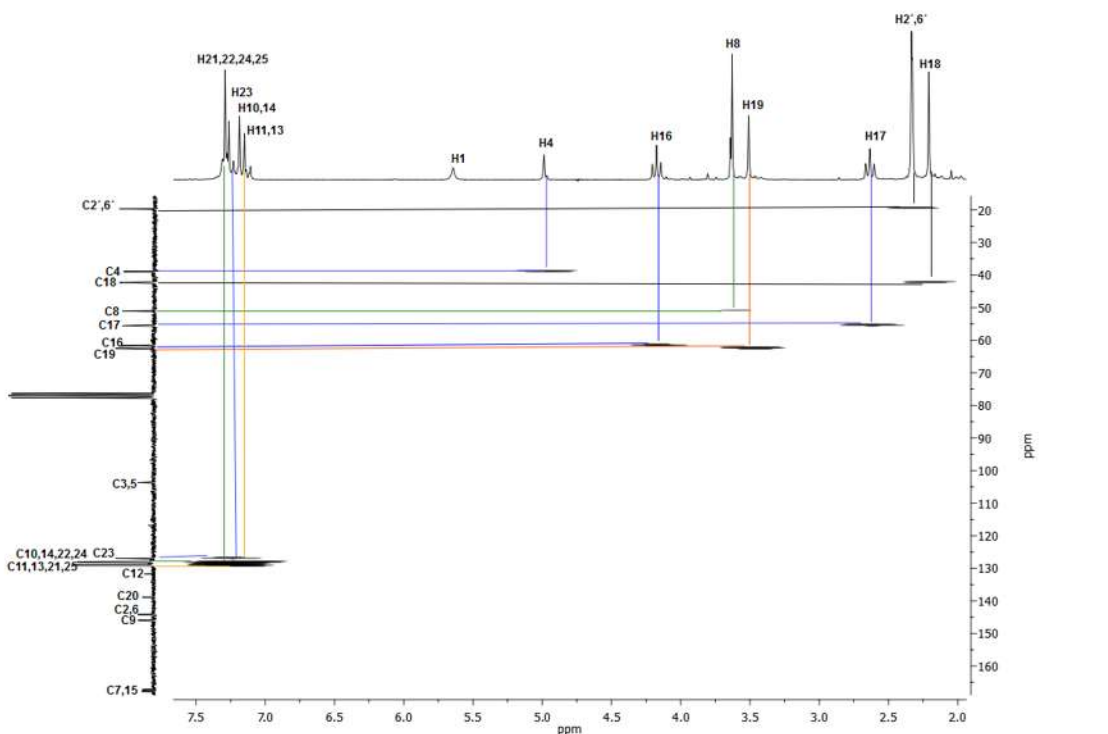


Figura 37. Análisis HETCOR del compuesto SAD4

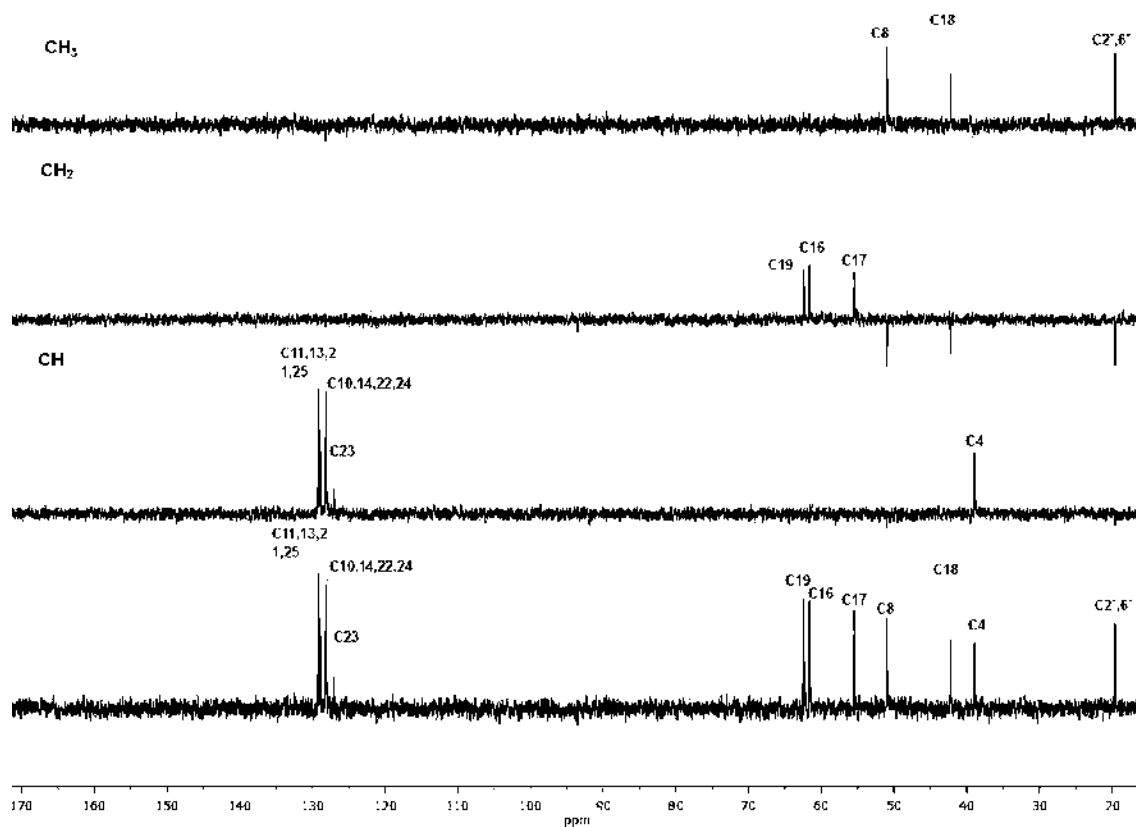


Figura 38. Análisis DEPT del compuesto SAD4

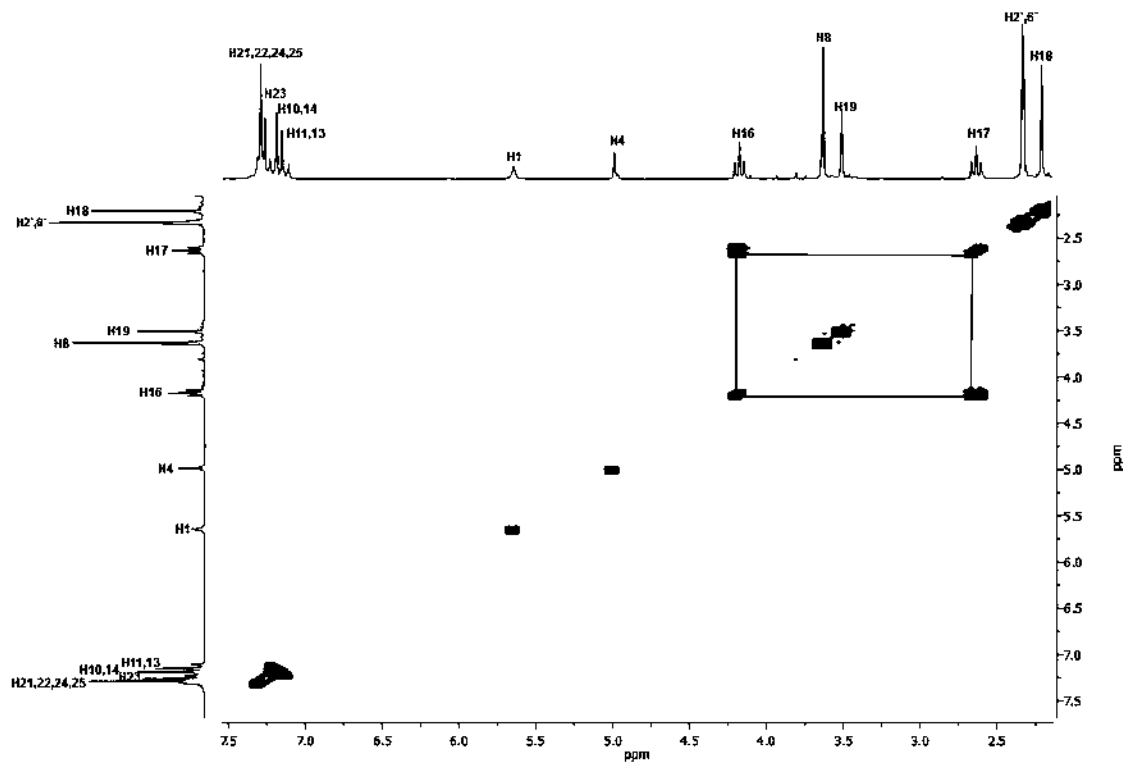


Figura 39. Análisis COSY del compuesto SAD4

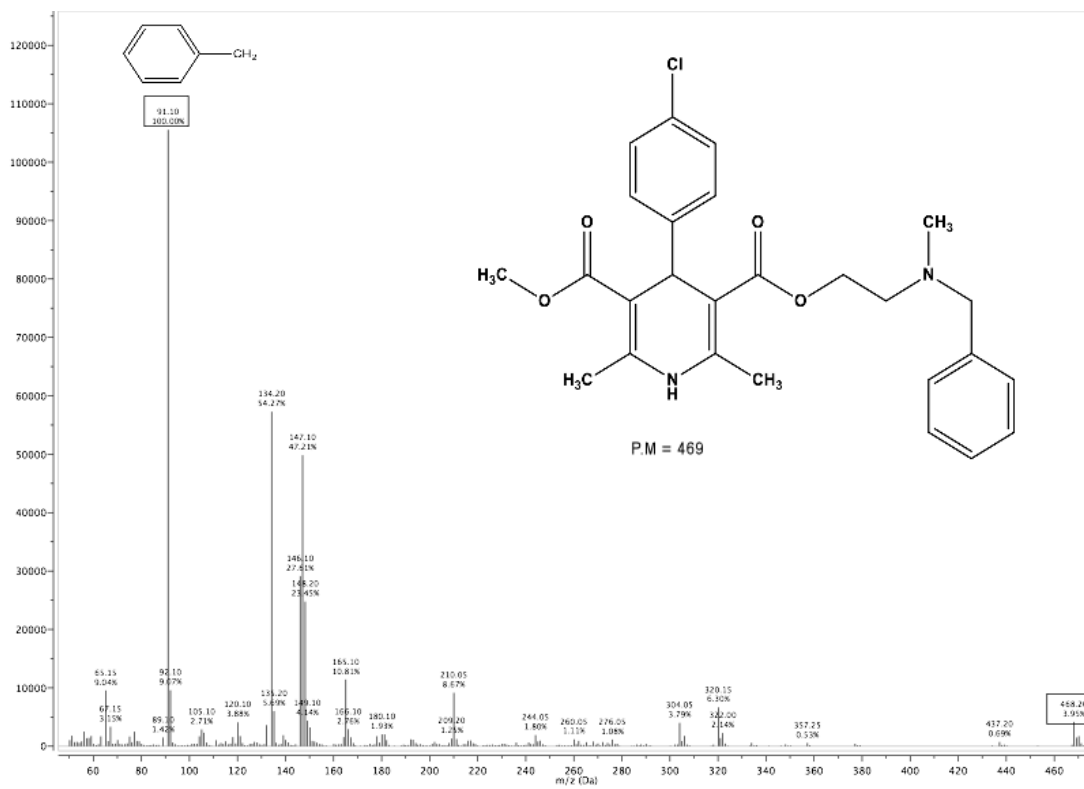


Figura 40. Espectro de masas del compuesto SAD4

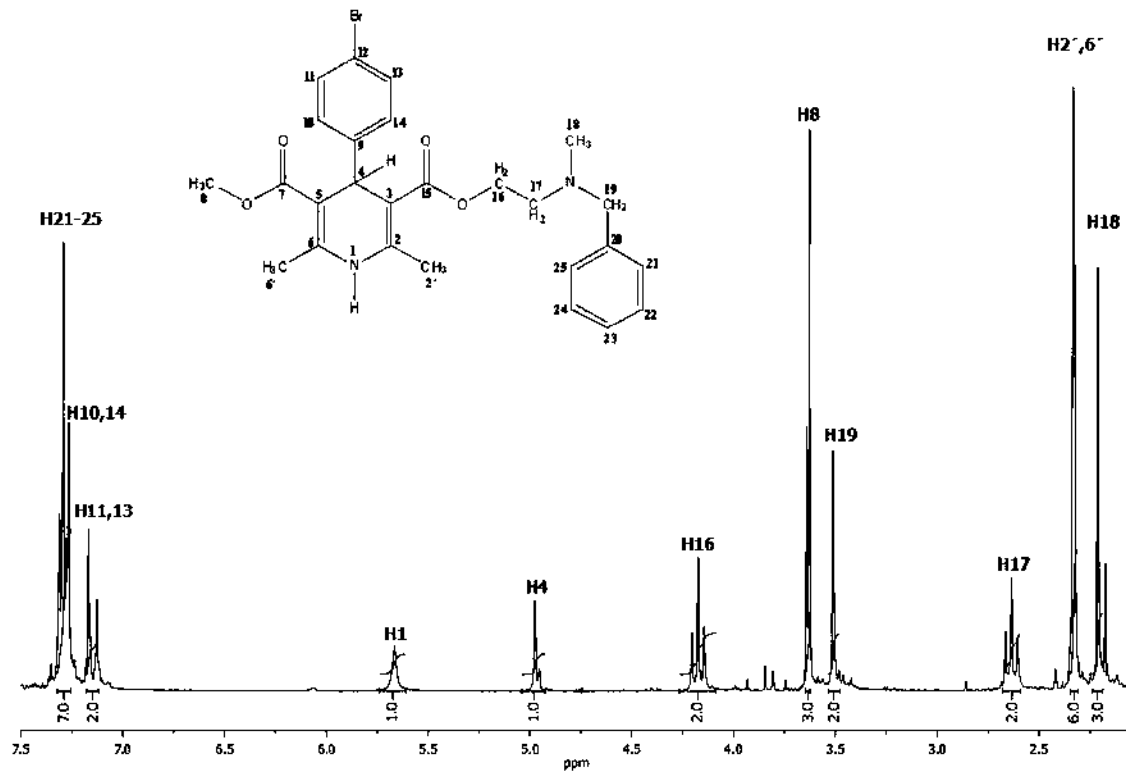


Figura 41. Espectro de RMN ^1H del compuesto SAD5

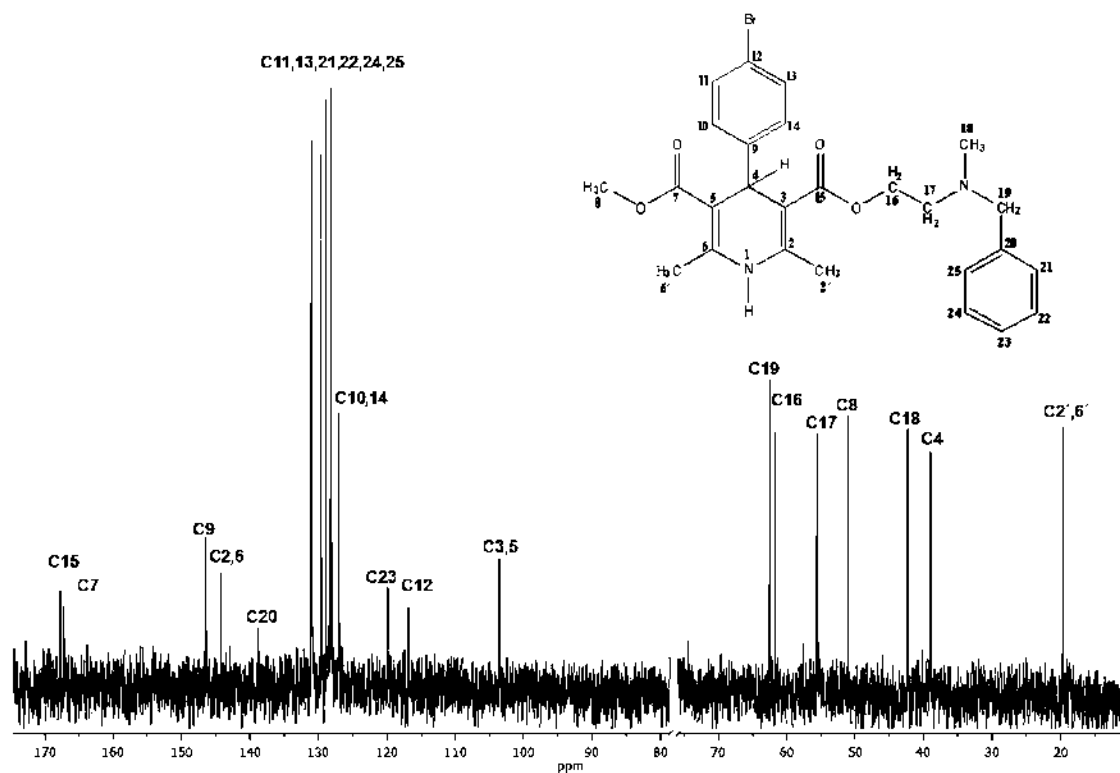


Figura 42. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto SAD5

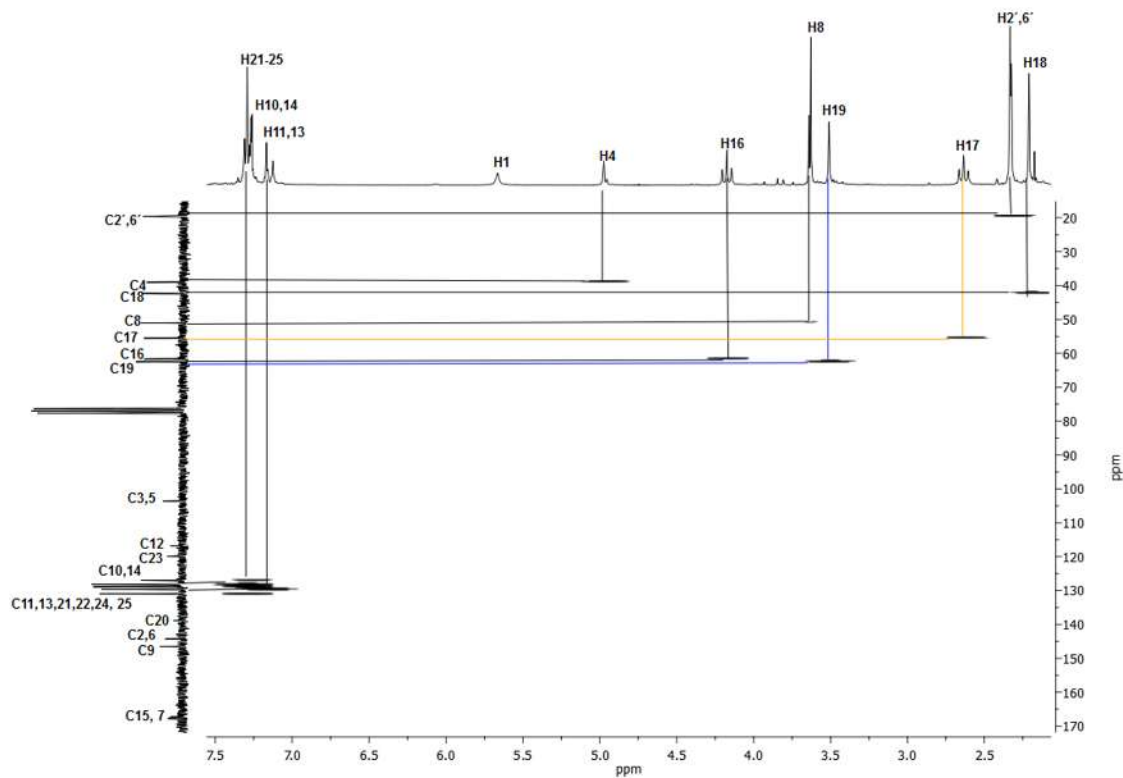


Figura 43. Análisis HETCOR del compuesto SAD5

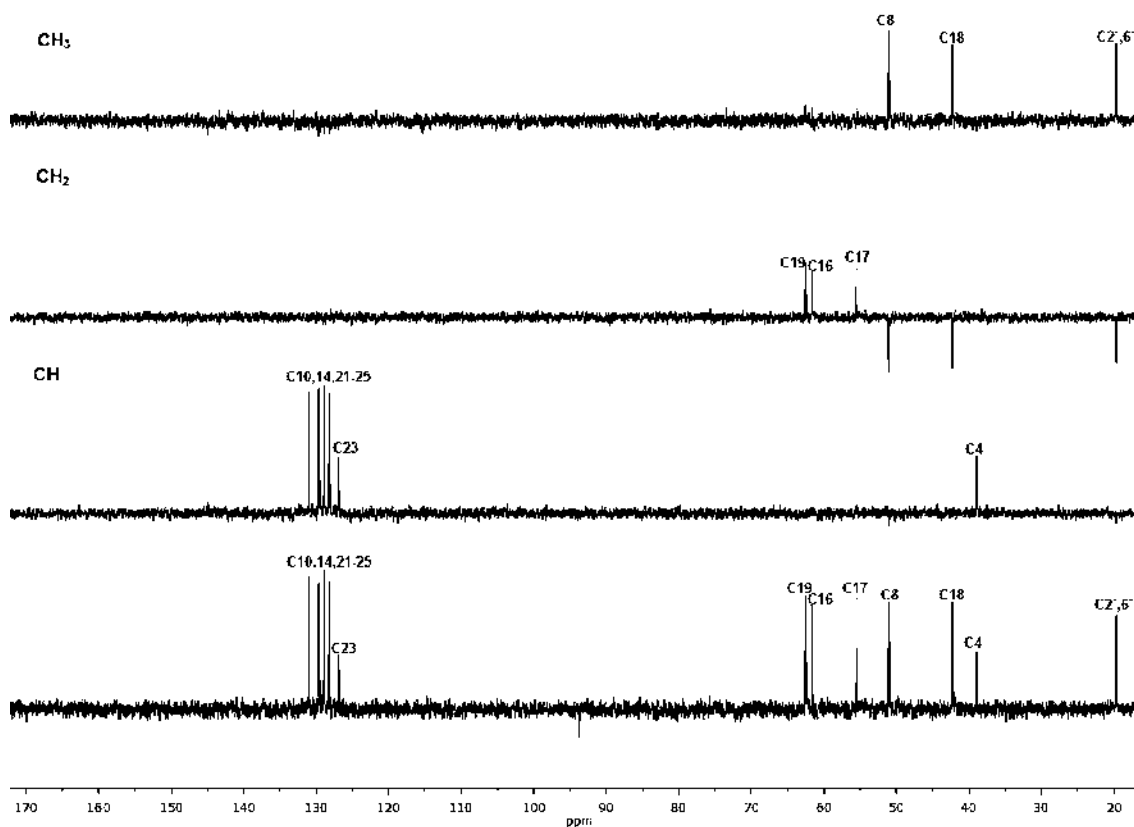


Figura 44. Análisis DEPT del compuesto SAD5

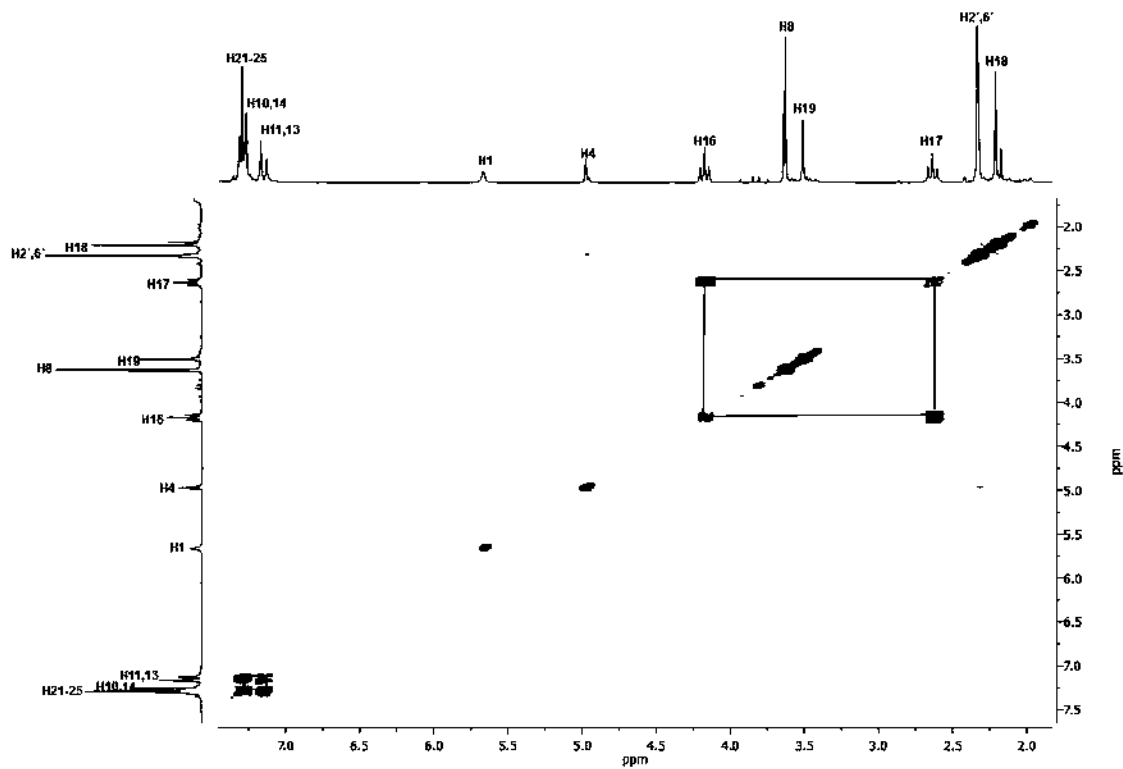


Figura 45. Análisis COSY del compuesto SAD5

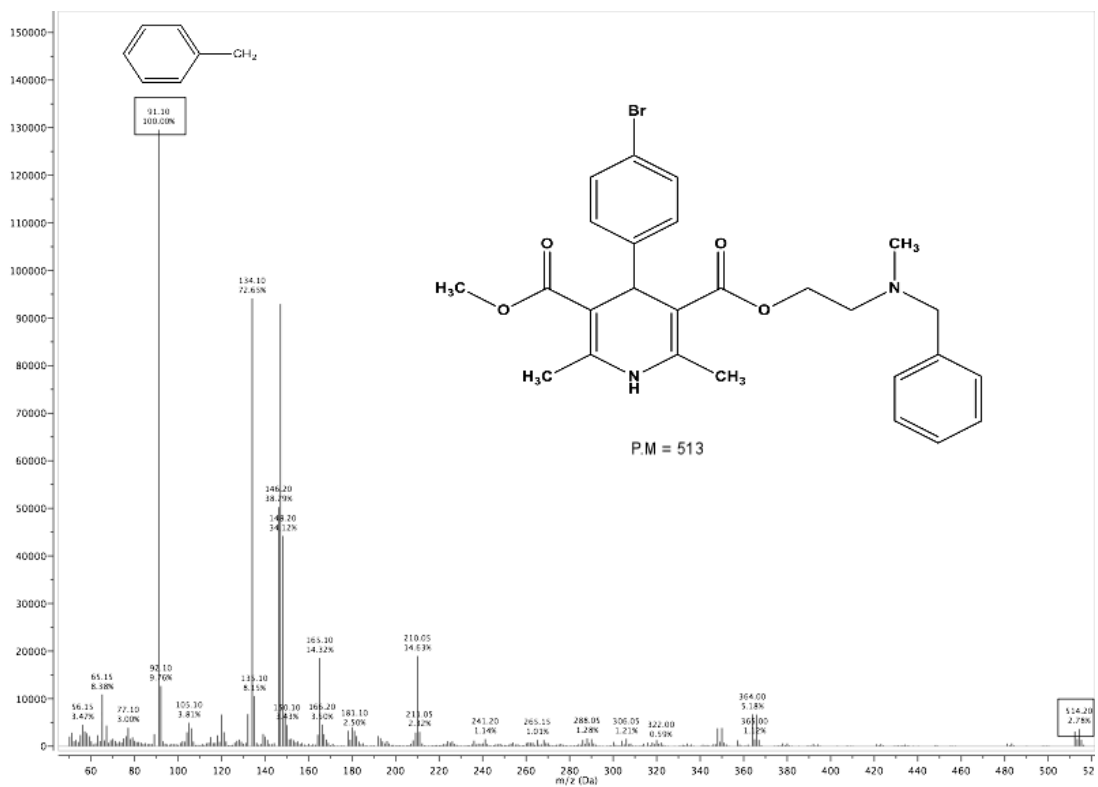


Figura 46. Espectro de masas del compuesto SAD5

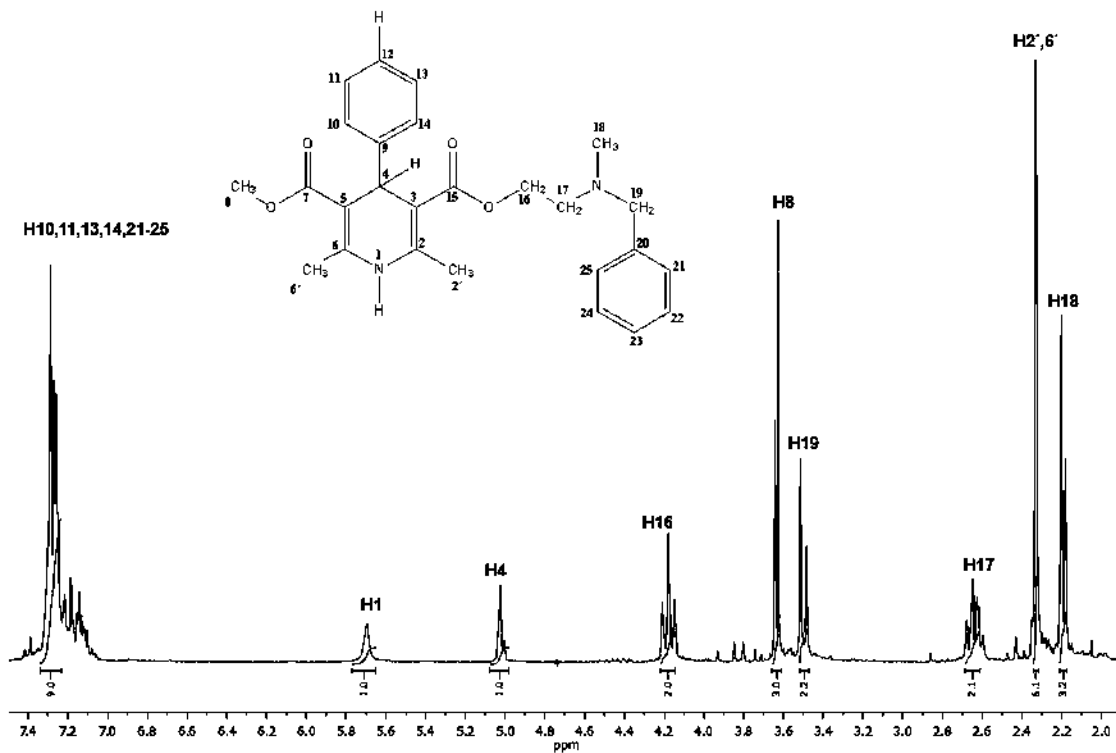


Figura 47. Espectro de RMN ¹H del compuesto SAD6

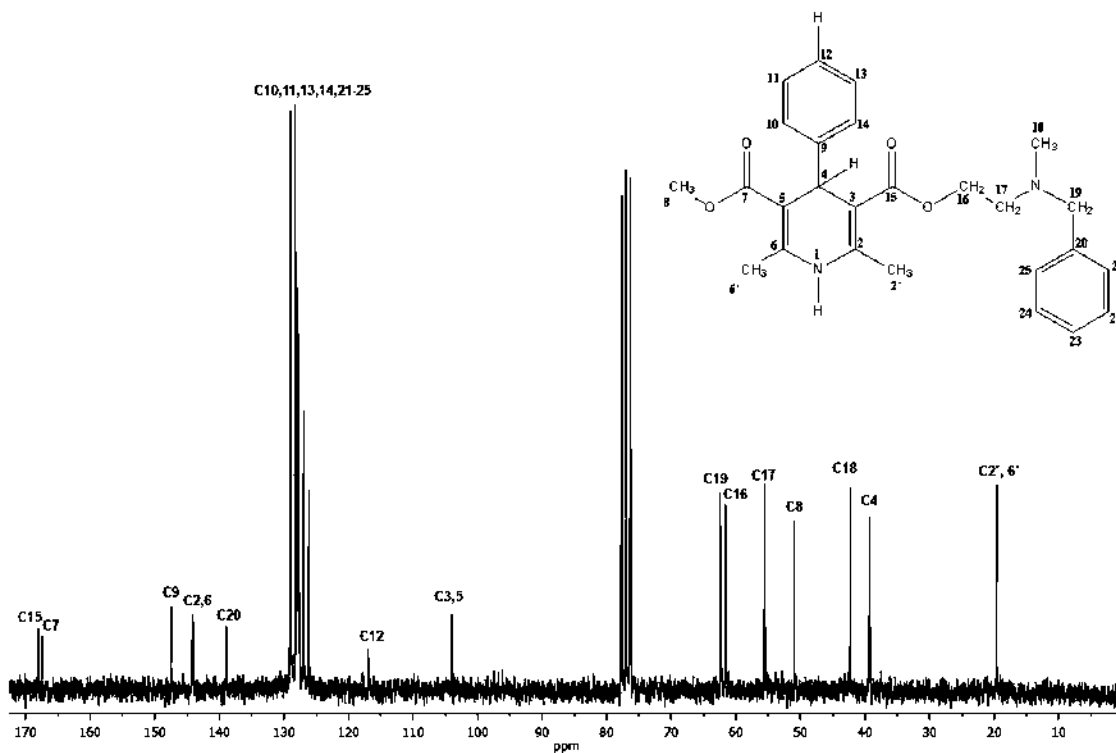


Figura 48. Espectro de RMN ¹³C del compuesto SAD6

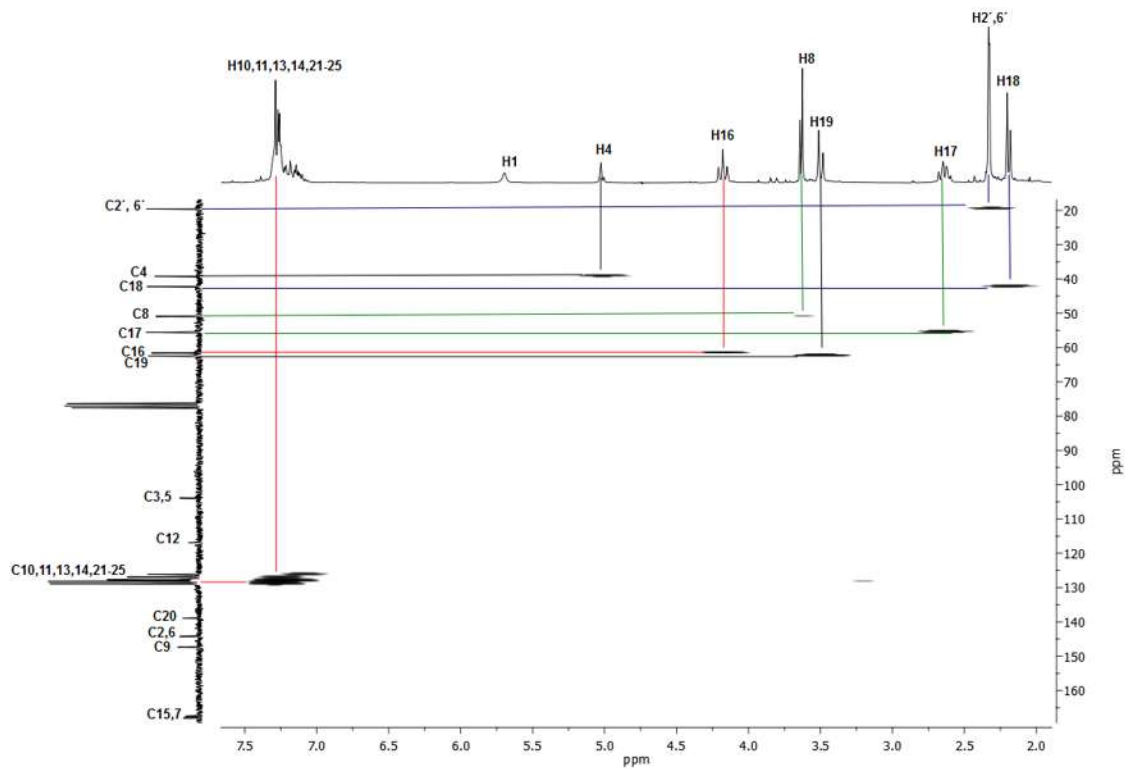


Figura 49. Análisis HETCOR del compuesto SAD6

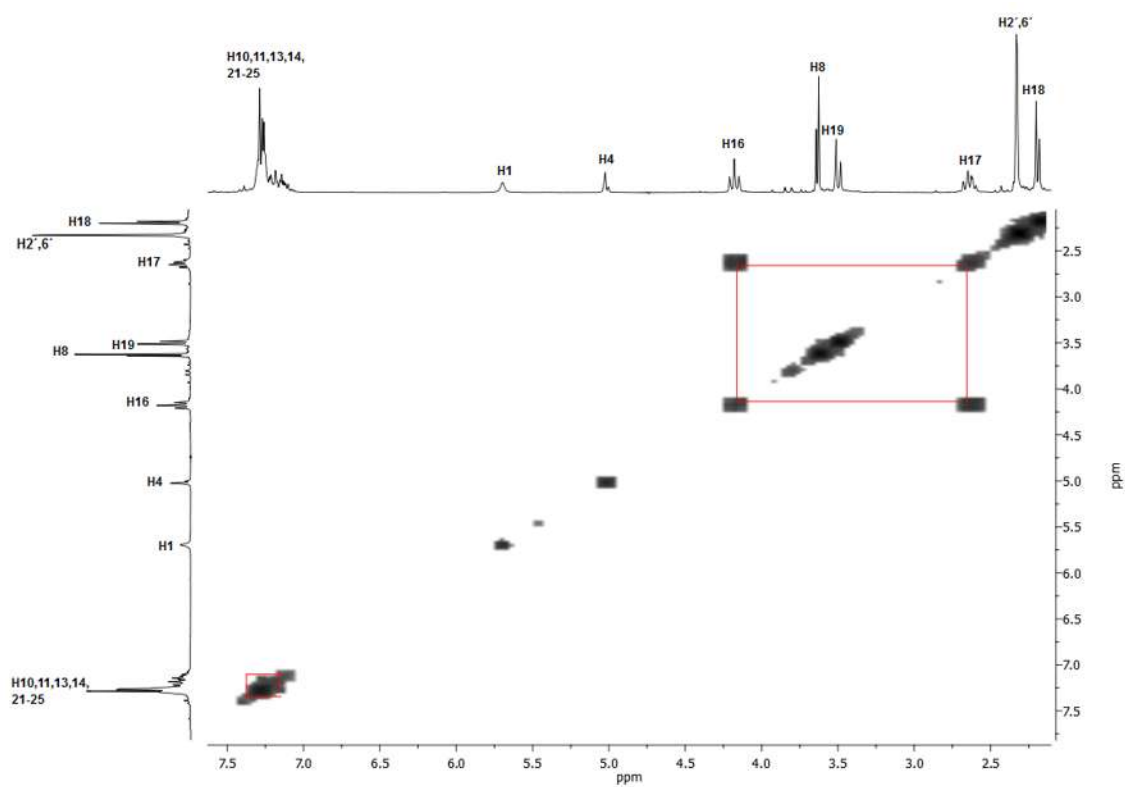


Figura 50. Análisis COSY del compuesto SAD6

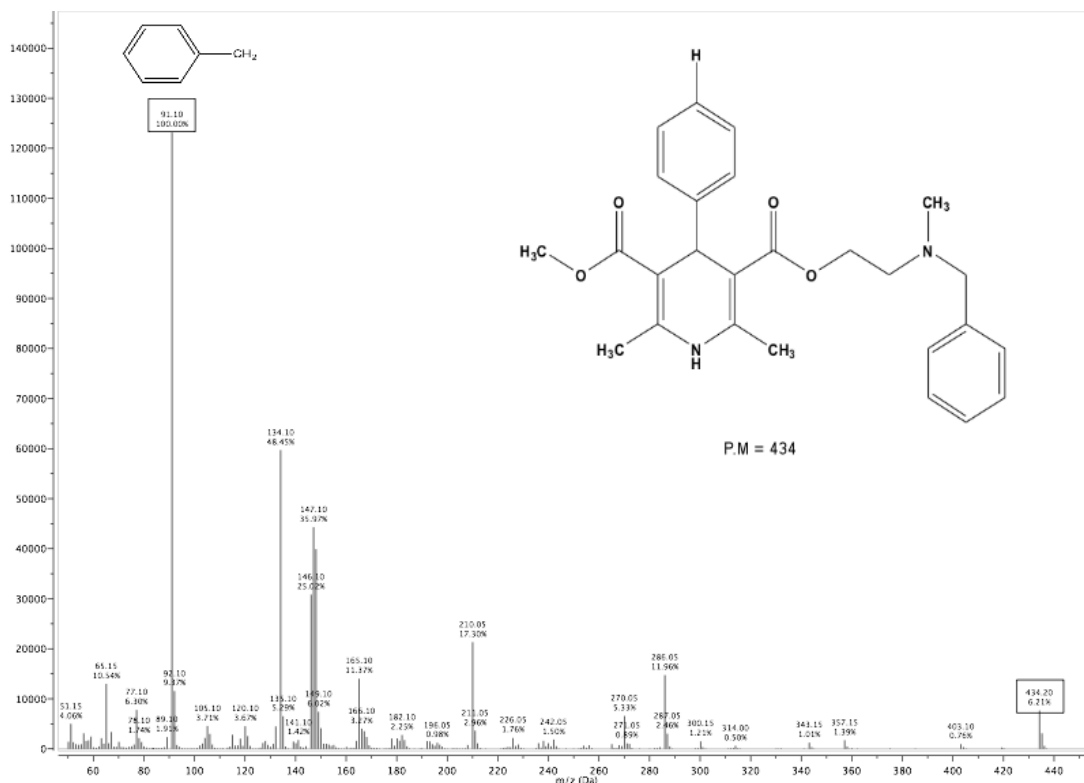
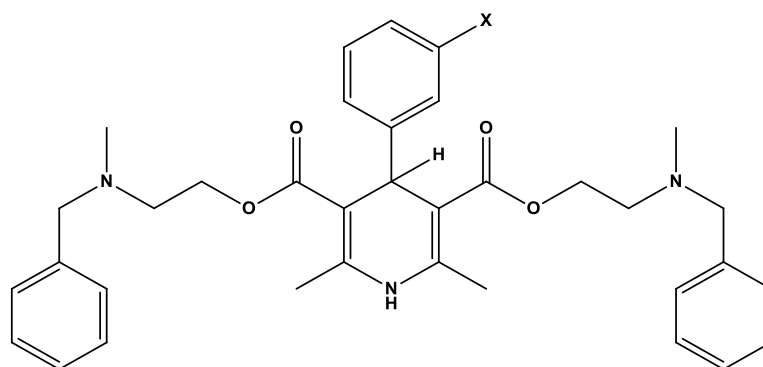


Figura 51. Espectro de masas del compuesto SAD6

Tabla 4. Estructura y pesos moleculares de las DHPs de la serie SMV.



DHP	X	Formula molecular	PM
SMV1	NO ₂	C ₃₅ H ₄₀ N ₃ O ₄	612
SMV2	CH ₃	C ₃₆ H ₄₃ N ₃ O ₄	582
SMV3	F	C ₃₅ H ₄₀ FN ₃ O ₄	585
SMV4	Cl	C ₃₅ H ₄₀ ClN ₃ O ₄	602
SMV5	Br	C ₃₅ H ₄₀ BrN ₃ O ₄	645
SMV6	H	C ₃₅ H ₄₁ N ₃ O ₄	568

7.3 Actividad biológica

7.3.1 Efecto relajante de las DHPs análogas a la nicardipina

Los resultados de la determinación del efecto relajante de las DHPs de las series SAD y SMV, así como de la nicardipina (NIC) y la nitrendipina (NIT) son presentados en las **figuras 52 y 53** y en la **tabla 5**. En este estudio se utilizó la NIC y la NIT como referencias, ya que estas DHPs son conocidas y se sabe que presentan un buen efecto relajante (Iwanami *et al.*, 1979; Meyer *et al.*, 1981; Hernández-Gallegos *et al.*, 1995). Además de que la molécula de NIC fue la base para el diseño de las DHPs de nuestra serie de estudio.

En la **figuras 52 y 53** se presentan las gráficas (log concentración vs. % de relajación) y se puede observar que tanto las DHPs de la serie **SAD**, como de la serie **SMV** tienen una respuesta dependiente de la concentración. Asimismo, las curvas presentaron la forma sigmoidea usual que se obtiene cuando los datos se grafican de manera semilogarítmica. El rango de concentraciones probadas fue de 1×10^{-9} a 3.16×10^{-6} , la concentración menor corresponde a aquella en la que la NIT empezó a presentar efecto, en tanto que la concentración más alta corresponde a la máxima concentración a la que se pudieron preparar las soluciones de las DHPs, sin tener problemas de solubilidad; las soluciones stock de las DHPs fueron preparadas a una concentración de 3.16×10^{-4} en agua-DMSO (50:50).

Los resultados del efecto relajante muestran que de las DHPs probadas la NIT fue la más potente, seguida de la NIC, mientras que de las DHPs de las series SAD y SMV, solo **SAD3** y **SAD6** tuvieron algún efecto, mientras que las otras diez DHPs prácticamente no presentaron efecto relajante. Esto es evidente tanto si comparamos las curvas en las gráficas de las **figuras 52 y 53**, como al comparar los valores de CI_{50} mostrados en la **tabla 5**. En el primer caso podemos ver que a la concentración de 3.16×10^{-7} M, la NIT ya alcanzó el efecto máximo (100 %), la NIC ya presenta un efecto por encima del 50%, mientras que las DHPs **SAD3** y **SAD6** apenas comienzan a presentar efecto. En cuanto a la CI_{50} , ésta no pudo ser determinada para los diez análogos restantes (**SAD1**, **SAD2**, **SAD4**, **SAD5** y **SMV1-SMV6**) debido a que no alcanzaron el 50 % de efecto, aún a la máxima concentración probada.

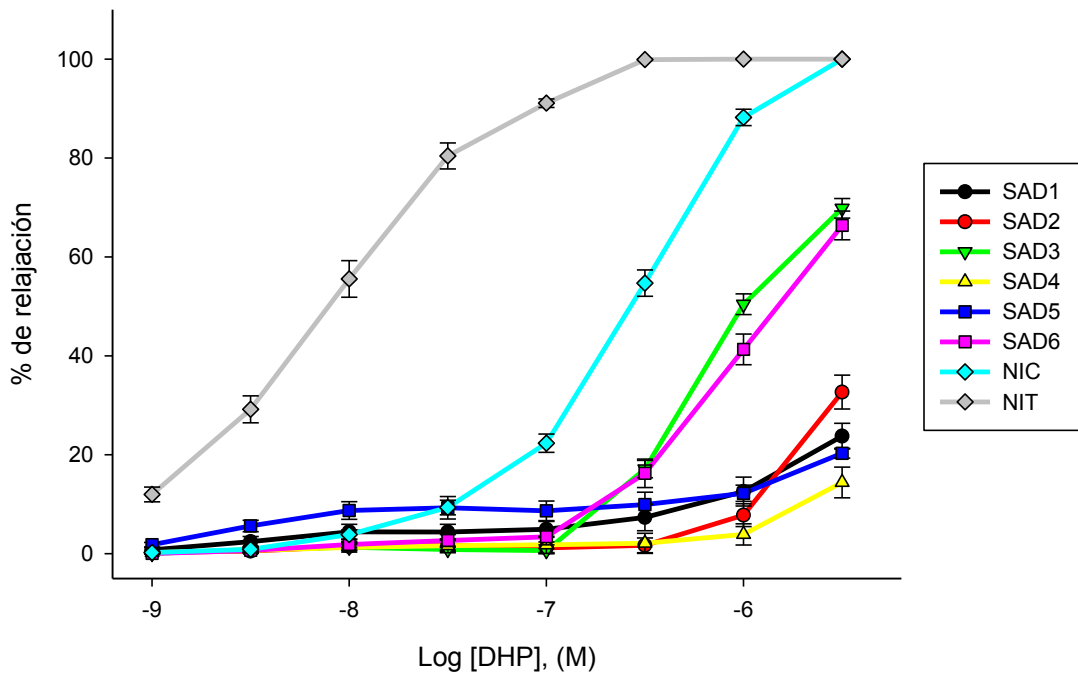


Figura 52. Efecto de la serie SAD sobre anillos de aorta de rata. Cada valor representa la media \pm error estándar de seis anillos.

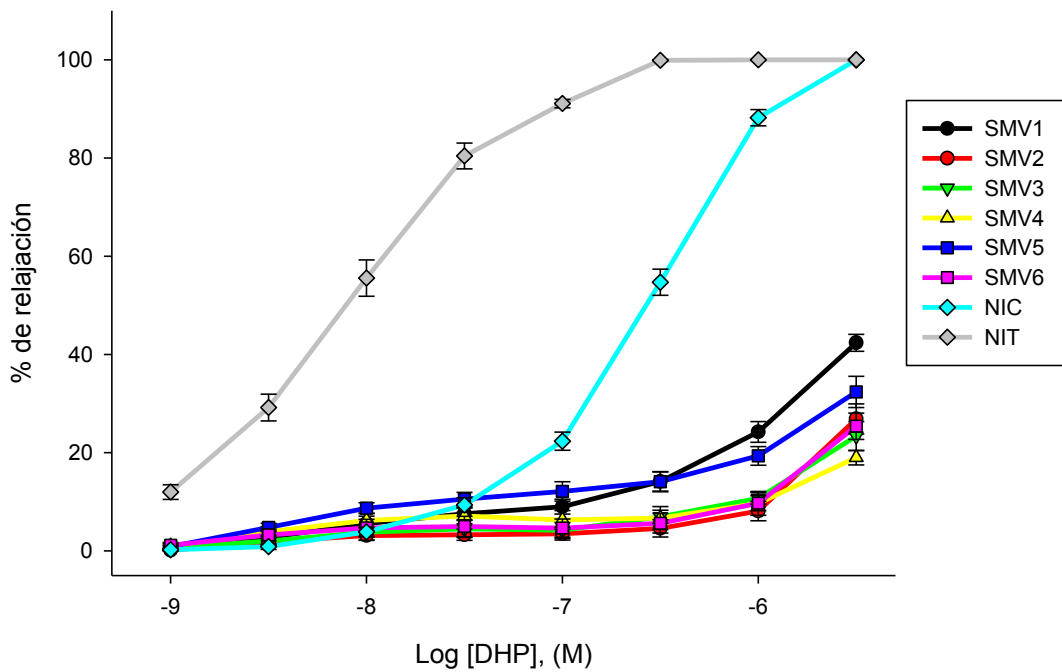


Figura 53. Efecto de la serie SMV sobre anillos de aorta de rata. Cada valor representa la media \pm error estándar de seis anillos.

Tabla 5. Potencia relajante de las DHPs.

DHPs	CI ₅₀ ^a (M)
SAD 1	> 3.16 E-06
SAD 2	> 3.16 E-06
SAD 3	0.99 (± 0.08) E-06 ^{*,&}
SAD 4	> 3.16 E-06
SAD 5	> 3.16 E-06
SAD 6	1.48 (± 0.13) E-06 ^{*,&}
SMV 1	> 3.16 E-06
SMV 2	> 3.16 E-06
SMV 3	> 3.16 E-06
SMV 4	> 3.16 E-06
SMV 5	> 3.16 E-06
SMV 6	> 3.16 E-06
NIC^b	2.65 (± 0.07) E-07
NIT^c	7.89 (± 0.14) E-09

^a Concentración molar requerida para inhibir la contracción un 50 % (± error estándar). ^b Nicardipina, ^c Nitrendipina. * y & Diferencia significativa (p < 0.05, prueba de Tukey) con respecto a nicardipina y nitrendipina, respectivamente.

7.3.2 Efecto tripanocida *in vitro*

El efecto tripanocida en las cepas de *Trypanosoma cruzi* (NINOA e INC5) fue determinado para las DHPs de las series SAD y SMV, así como para la nicardipina y el fármaco de referencia benznidazol. Los resultados de la evaluación de este efecto son presentados en las **figuras 54-57** y en la **tabla 6**.

En las **figuras 54 y 55** podemos observar el porcentaje de lisis que causo en la cepa NINOA cada una de las DHPs de las series SAD y SMV, a las diferentes concentraciones empleadas (5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$). Con respecto a las DHPs de la serie SAD, se puede ver que los compuestos **SAD1** y **SAD2** son lo que presentan el mayor efecto. Incluso su efecto está por arriba del que presentan la NIC y el Bnz. Esto mismo se puede ver al comparar los valores de CI_{50} tripanocida (expresados en términos molares) reportados en la **tabla 6**. Los resultados de esta tabla asimismo muestran que, además de **SAD1** y **SAD2**, también **SAD5**, **SAD6** y la NIC son más potentes que el Bnz. Por otra parte, las DHPs **SAD3** y **SAD4** fueron poco potentes en los ensayos con la cepa NINOA y su efecto a la mayor concentración probada fue menor al 50 %, razón por la que no se pudo calcular el valor de sus CI_{50} . Con respecto a los resultados de las DHPs de la serie SMV, éstos muestran que **SMV6** presento un efecto apreciable desde la primera concentración (5 mg/mL). Aunque a la concentración de 100 mg/mL ya todas las DHPs de esta serie, excepto **SMV4** y **SMV5**, presentan un efecto similar. La comparación de los valores de CI_{50} para NINOA indica que **SMV1-SMV3**, **SMV6** y NIC son más potentes que el Bnz.

Los resultados del efecto tripanocida en la cepa INC5 (**figuras 56 y 57**) muestran que de las DHPs ensayadas, **SAD2** y **SMV5** fueron las que finalmente presentaron un mayor porcentaje de lisis, aún cuando a bajas concentraciones fue **SAD5** la que presento el mejor efecto. La información de estas figuras también muestran que cuatro de las DHPs ensayadas (**SAD1**, **SAD6**, **SMV1** y **SMV2**) no lograron alcanzar el 50 % de efecto, aún a la máxima concentración probada. Los valores de CI_{50} para esta cepa (**tabla 6**) indican que si bien la nicardipina y la mayoría de las DHPs de las series SAD y SMV presentaron un efecto tripanocida apreciable, todas ellas fueron

menos potentes que Bnz en la cepa INC5.

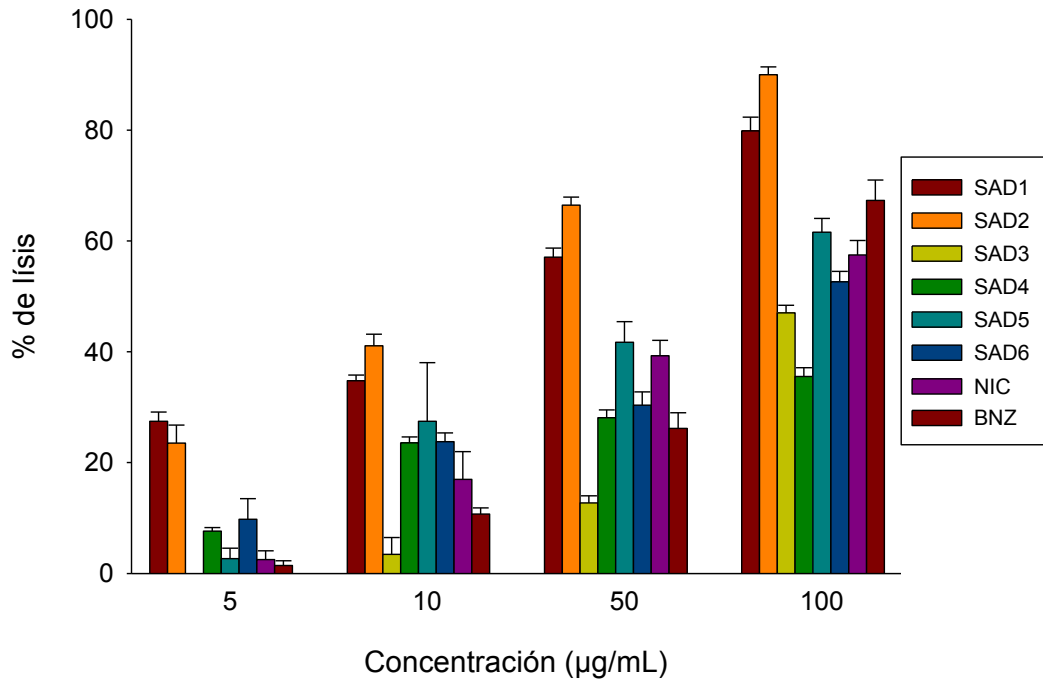


Figura 54. Actividad tripanosomicida de la serie SAD sobre la cepa NINOA. Cada valor representa el promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes.

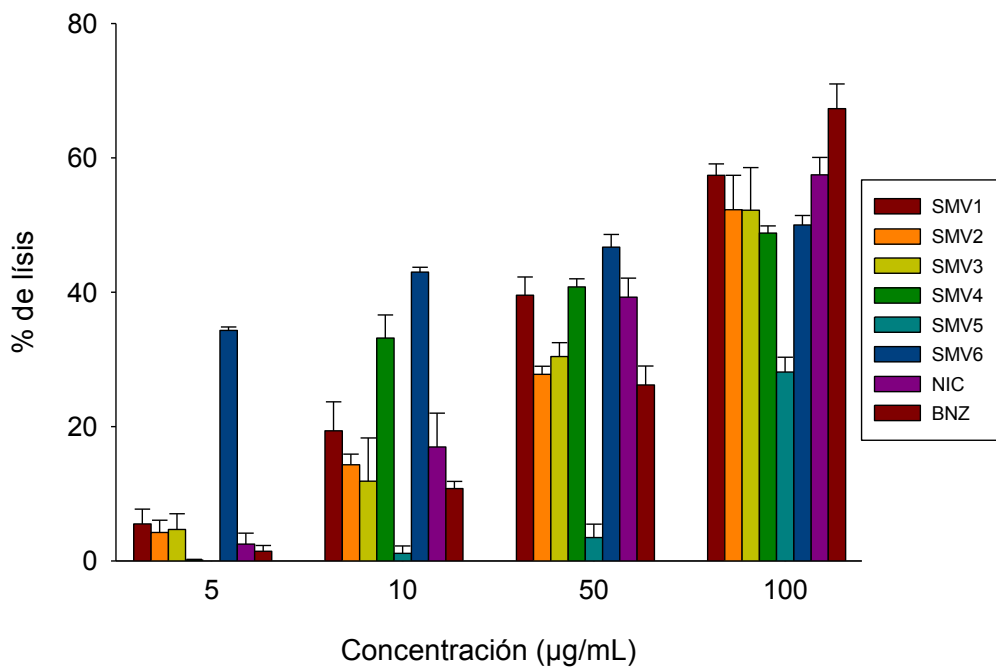


Figura 55. Actividad tripanosomicida de la serie SMV sobre la cepa NINOA. Cada valor representa el promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes.

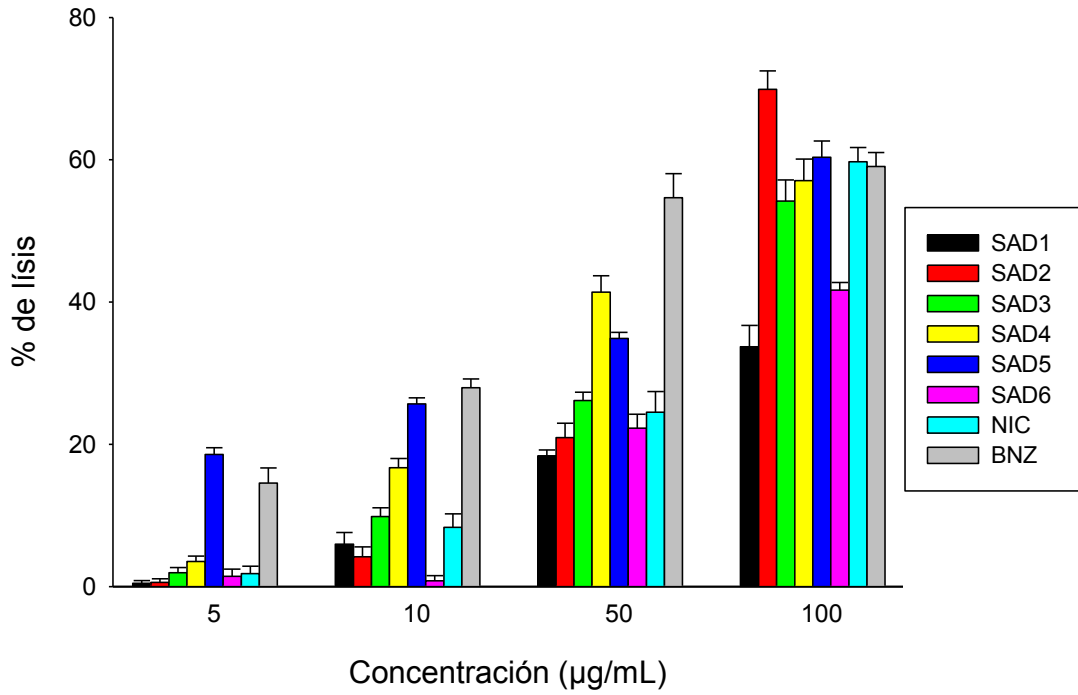


Figura 56. Actividad tripanosomicida de la serie SAD sobre la cepa INC5. Cada valor representa el promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes.

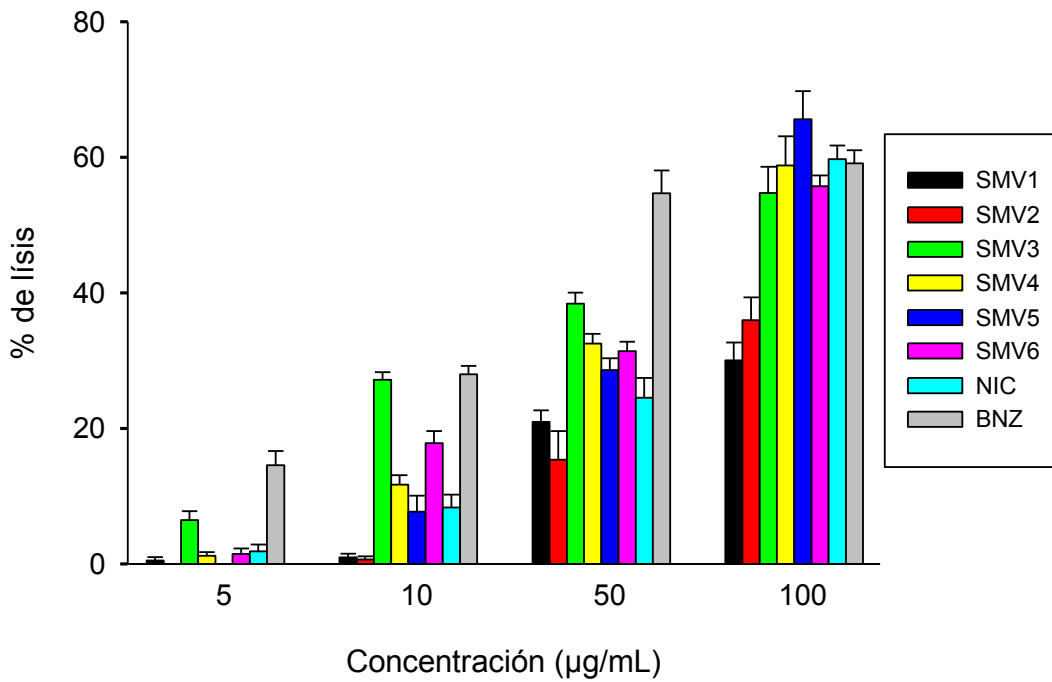


Figura 57. Actividad tripanosomicida de la serie SMV sobre la cepa INC5. Cada valor representa el promedio \pm error estándar de tres experimentos independiente

Tabla 6. Actividad tripanocida *in vitro* de los derivados de nicardipina y fármacos de referencia contra dos cepas de *T. cruzi* (NINOA e INC5).

Compuestos	NINOA CI ₅₀ ^a (μ M)	INC5 CI ₅₀ ^a (μ M)
SAD1	60.8 \pm 4.7 ^{&*}	> 208.8
SAD2	49.7 \pm 3.7 ^{&*}	183.3 \pm 4.4 ^{&}
SAD3	> 221.2 ^{&*}	205.8 \pm 4.4 ^{&*}
SAD4	> 213.2 ^{&*}	152.3 \pm 4.4 ^{&*}
SAD5	113.9 \pm 3.6 ^{&*}	145.48 \pm 4.3 ^{&*}
SAD6	228.1 \pm 2.9 ^{&*}	> 230.4
SMV1	122.5 \pm 5.3 ^{&*}	> 163.4
SMV2	167.6 \pm 4.4 ^{&*}	> 171.8
SMV3	162.7 \pm 4.8 ^{&}	140.5 \pm 2.6 ^{&*}
SMV4	> 166.1	136.9 \pm 3.4 ^{&*}
SMV5	> 155.0	122.8 \pm 1.5 ^{&*}
SMV6	176.1 \pm 3.8 ^{&*}	154.4 \pm 3.0 ^{&*}
NIC^b	156.0 \pm 4.5	182.2 \pm 2.6
Bnz^c	302.6 \pm 3.1	101.4 \pm 2.8

^a Concentración que produce la lisis del 50% de tripomastigotes sanguíneos. ^b Nicardipina, ^c Benznidazol. ^d Valor de CI₅₀ reportado para el Bnz es de 106 μ M (Nieto, 2012) * y [&] Diferencia significativa ($p < 0.05$, prueba de Tukey) con respecto a Nic y Bnz, respectivamente.

7.3.3 Efecto leishmanicida *in vitro*

La actividad leishmanicida (sobre cultivos de promastigotes de *L. mexicana*) de la nicardipina y sus análogos de las series **SAD** y **SMV**, así como del fármaco de referencia anfotericina B, son mostrados en las **figuras 58 y 59**, y en la **tabla 7**.

En las gráficas (concentración vs. % de inhibición metabólica) de las **figuras 58 y 59** podemos observar que la nicardipina y sus 12 análogos tienen una respuesta dependiente de la concentración. Asimismo, se puede observar que todas las DHPs probadas alcanzaron una respuesta de entre el 80 y 90 % del efecto máximo, que fue similar al alcanzado por el fármaco de referencia, aunque la ANF lo presenta desde la primera concentración probada (5 mg/mL), mientras que las DHPs, a excepción de **SMV1**, lo alcanzan hasta la concentración de 50 mg/mL.

Los valores de CI_{50} de la **tabla 7**, expresados en términos molares, nos permiten realizar la comparación entre los diferentes compuestos, encontrando que las DHPs de las series SAD y SMV, a excepción de **SAD2**, **SMV2** y **SMV3**, tienen una potencia leishmanicida similar a la de la nicardipina. Asimismo, los resultados de la **tabla 7** muestran que todas las DHPs ensayadas son menos potentes que el fármaco de referencia anfotericina B.

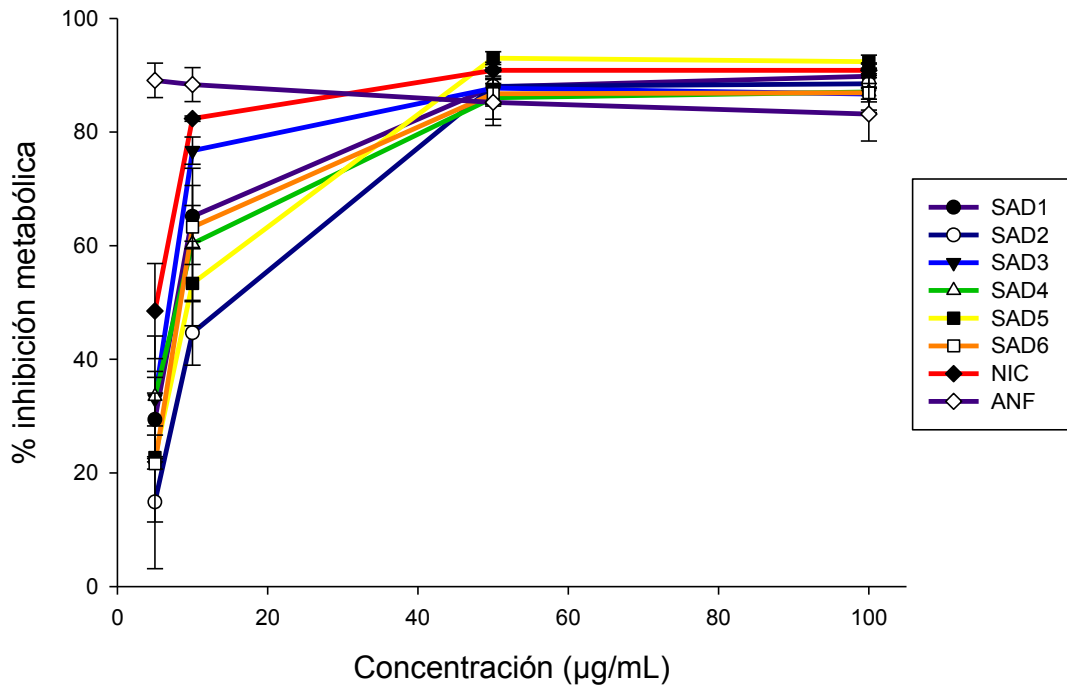


Figura 58. Actividad leishmanicida *in vitro* de la serie SAD contra promastigotes de *L. mexicana*. Cada valor representa el promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes (cada uno realizado por triplicado).

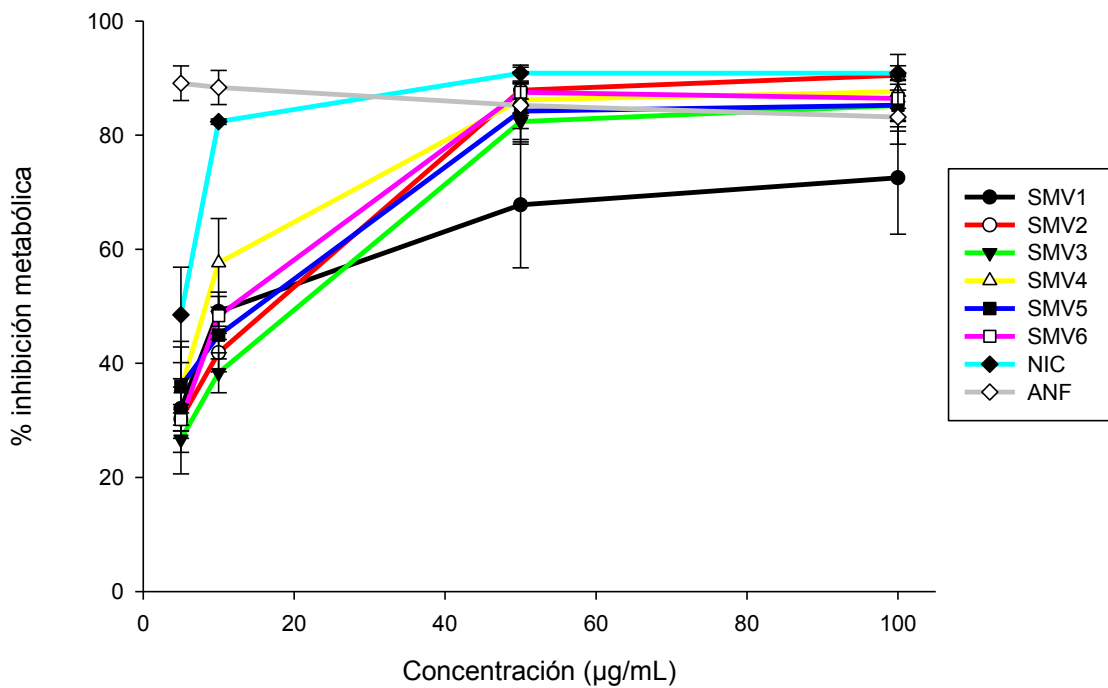


Figura 59. Actividad leishmanicida *in vitro* de la serie SMV contra promastigotes de *L. mexicana*. Cada valor representa el promedio \pm error estándar de tres experimentos independientes (cada uno realizado por triplicado).

Tabla 7. Efecto leishmanicida que presentan los análogos de la nicardipina contra *Leishmania mexicana* (MNYC/BZ/62/M379).

Compuestos	<i>L. mexicana</i> CI ₅₀ ^a (μ M)
SAD1	15.5 \pm 1.5
SAD2	23.0 \pm 1.1*
SAD3	13.7 \pm 0.4
SAD4	16.6 \pm 0.5
SAD5	18.3 \pm 3.1
SAD6	18.6 \pm 0.5
SMV1	17.2 \pm 3.6
SMV2	20.1 \pm 1.4*
SMV3	22.9 \pm 1.8*
SMV4	13.2 \pm 2.7
SMV5	15.4 \pm 3.2
SMV6	18.5 \pm 1.4
NIC ^b	10.5 \pm 1.0
ANF ^c	< 5.41

^a Concentración que produce la muerte del 50% en promastigotes de *L. mexicana*.

^b Nicardipina, ^c Anfotericina B. * Diferencia significativa ($p < 0.05$, prueba de Tukey) con respecto a NIC.

7.3.4 Efecto citotóxico en células de mamífero

El efecto citotóxico sobre células Vero fue evaluado para la nicardipina y sus análogos de las series SAD y SMV, así como para el benznidazol y la anfotericina B, que fueron los fármacos de referencia en las determinaciones de los efectos tripanocida y leishmanicida de las DHPs. Los resultados obtenidos de la evaluación del efecto citotóxico son mostrados en las **figuras 60 y 61**, así como en la **tabla 8**.

En la **figura 60** se puede apreciar que para el caso de las DHPs de la serie SAD, los compuestos **SAD4**, **SAD5** presentaron cierto grado de toxicidad a partir de la concentración de 50 µg/mL. En el caso de las DHPs de la serie SMV, únicamente el compuesto **SMV2** presentó cierta toxicidad, pero solo a la concentración más alta ensayada (100 µg/mL). Estas figuras también muestran que el efecto citotóxico de la nicardipina, al igual que el de la anfotericina, fue evidente a partir de la concentración de 50 µg/mL. En el caso del compuesto Bnz, éste presentó muy poco efecto citotóxico en células Vero.

A partir de las curvas (concentración vs. % de muerte) de las **figuras 60 y 61** se pudo calcular las CC_{50} , solo para los compuestos que presentaron una actividad citotóxica arriba del 50 %. Los valores de CC_{50} (expresados en términos molares) son reportados en la **tabla 8**. Estos valores muestran que la nicardipina y sus análogos poseen una potencia citotóxica significativamente menor a la de la anfotericina B.

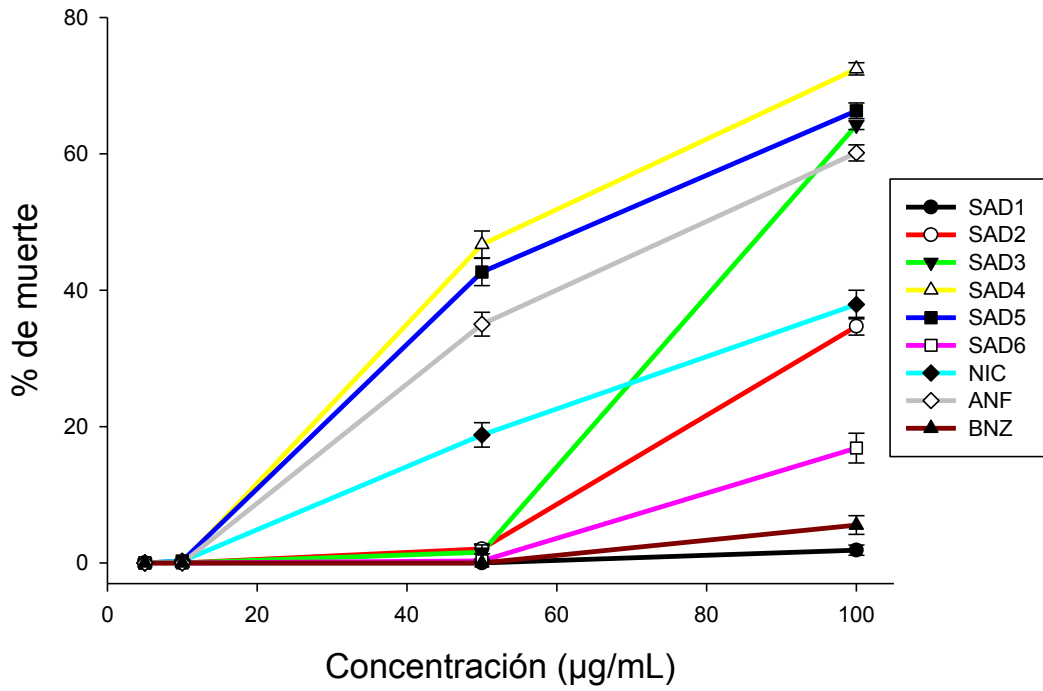


Figura 60. Determinación de la citotoxicidad de la serie SAD. Cada valor representa el promedio \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (cada uno realizado por triplicado).

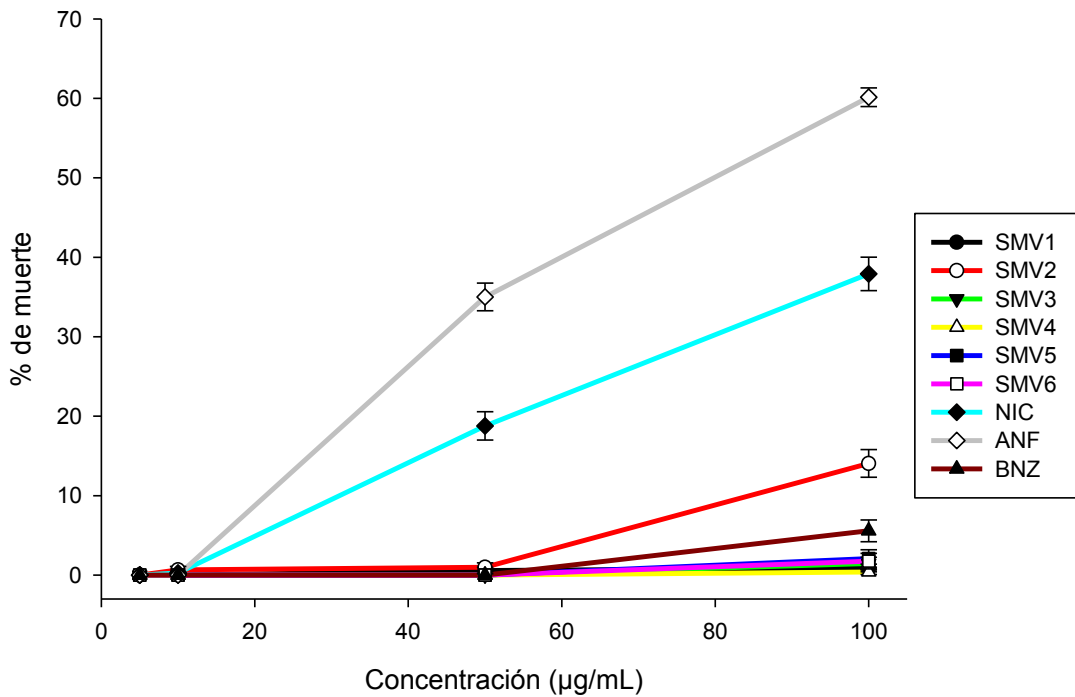


Figura 61. Determinación de la citotoxicidad de la serie SMV. Cada valor representa el promedio \pm error estándar de cuatro experimentos independientes (cada uno realizado por triplicado).

Tabla 8. Efecto citotóxico de los análogos de la nicardipina y los compuestos de referencia.

Compuestos	CC₅₀^a (μM)
SAD1	> 208.70
SAD2	> 223.20
SAD3	203.0 ± 0.1*
SAD4	117.9 ± 0.5*
SAD5	121.7 ± 0.3*
SAD6	> 230.40
SMV1	> 163.40
SMV2	> 171.82
SMV3	> 170.94
SMV4	> 166.11
SMV5	> 155.04
SMV6	> 176.06
NIC^b	> 208.77
ANF^c	81.87 ± 0.8*
Bnz^d	> 384.25

^a Concentración que produce el 50% de la citotoxicidad en células Vero. ^b Nicardipina, ^c Anfotericina B. ^d Benznidazol. * Diferencia significativa ($p < 0.05$, prueba de Tukey) con respecto anfotericina.

8. DISCUSION

8.1 Diseño y síntesis de las DHPs

La modificación de la molécula de nicardipina con la característica estructural propuesta (sustitución en la posición *para* del anillo 4-fenilo), resultó en DHPs con baja o nula actividad como BEC.

La baja o nula actividad relajante de las DHPs que poseen un sustituyente en la posición *para* del anillo aromático del centro quiral es una constante en todos los reportes en los que se ha sintetizado y evaluado DHPs con esta característica. Se ha propuesto que esta disminución en el efecto está asociada a una disminución en la fuerza de interacción de las DHPs con su sitio de unión en los canales de calcio, debida a un impedimento de tipo estérico provocado por el sustituyente de este anillo aromático (Coburn *et al.*, 1988).

En total se sintetizaron seis DHPs con estructuras acorde al diseño propuesto, es decir, análogos de nicardipina sustituidos en la posición *para* del anillo aromático. Cinco de las DHPs sintetizadas (**SAD2-SAD6**) son compuestos nuevos (no reportados en la literatura, Chemical Abstracts y bases de datos). Con respecto a la DHP **SAD1**, ésta ya ha sido reportada anteriormente por Iwanami *et al.* (1979), quienes la obtuvieron en su forma de sal (clorhidrato).

Los rendimientos obtenidos en la síntesis de las DHPs, calculados con base en el compuesto puro, fueron relativamente bajos (del 5 al 27 %), aunque similares a los reportados por otros trabajos en donde se sintetizaron DHPs semejantes. Por ejemplo, Noyola *et al.* (2003a) reportaron rendimientos del 16 al 32 % para análogos de nicardipina *meta* sustituidos. En el caso particular de **SAD1**, Iwanami *et al.*, (1979) reportaron un rendimiento del 50%, que es casi el doble del que se obtuvo en este trabajo (27 %), lo que puede atribuirse a que ellos partieron de reactivos diferentes. Como se mencionó anteriormente, el bajo rendimiento en la síntesis de las DHPs puede deberse en parte a la exhaustiva purificación que se hizo de los compuestos (varias pasadas por columna). Pese a lo anterior, se logró obtener cantidades

suficientes de cada DHP para su caracterización química y evaluación en las diferentes pruebas biológicas.

La pureza de las DHPs obtenidas, estimada por cromatografía en capa fina (probando varios sistemas de eluentes con diferente polaridad), fue satisfactoria, ya que en todos los casos se observó una sola mancha en la cromatoplaqueta. Esto también es apoyado por el análisis de los espectros de resonancia, en las que no se aprecian señales que pudieran corresponder a algún subproducto o contaminación.

La estructura de todas las DHPs fue plenamente confirmada por sus espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C . En los espectros de RMN ^1H se obtuvieron solo las señales correspondientes a los hidrógenos presentes en la estructura de la DHP; en algunos espectros se observó una señal a 1.6 ppm aproximadamente (no mostrada en las figuras) que corresponde a agua (debida a la humedad adsorbida por el cloroformo deuterado). De igual forma, en los espectros de RMN ^{13}C solo se observaron las señales correspondientes a cada uno de los carbonos presentes en la molécula, sin señales extras excepto la que aparece a 76-78 ppm que corresponde al cloroformo deuterado que fue utilizado para disolver las muestra (Gottlieb *et al.*, 1997).

Como puede observarse en los espectros de RMN ^1H , la mayoría de las señales son comunes en todos los compuestos, a excepción de las correspondientes a los protones del anillo aromático. Lo que era de esperarse en razón de que es en esta parte de la molécula en donde radica la diferencia estructural entre las DHPs, ya que poseen diferentes sustituyentes. De forma similar, en los espectros de RMN ^{13}C se puede observar que las únicas señales que difieren de una DHP a otra son las correspondientes a los carbonos del anillo aromático.

Con el fin de determinar de forma más precisa la correspondencia entre las señales de los hidrógenos (en los espectros de RMN ^1H) con su respectivo carbono (en los espectros de RMN ^{13}C) se realizó experimento tipo HETCOR para los espectros de las DHPs. En este tipo de análisis se determina la correlación entre los núcleos de ^1H y ^{13}C , con lo que es posible atribuir inequívocamente que señales (hidrógenos) corresponden a cada

carbono. En el caso de los hidrógenos de los carbonos aromáticos se tuvo que emplear de herramientas del programa MestReNova 8.1 (MestreLab Research) para ampliar los espectros y realizar una asignación más adecuada, aunque para algunos espectros esta herramienta no fue de gran utilidad debido a que estas señales aparecen demasiado juntas o superpuestas impidiendo la asignación exacta. Estos experimentos confirmaron la asignación dada a las señales en los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C .

También se utilizó el experimento DEPT el cual ayudó a asignar mejor las señales de los carbonos de la molécula, ya que nos permite diferenciar los desplazamientos de los carbonos que tienen hidrógenos, asignándolos por el grado de sustitución (CH_3 , CH_2 y CH). Como podemos ver en las **figuras 22, 32, 38 y 44**, todos los DEPT presentan señales y desplazamientos similares, excepto por el compuesto **SAD2** el cual presenta un carbono extra debido al sustituyente que presenta (CH_3) adicional. Cabe mencionar que los carbonos que estaban muy juntos y de los cuales se tenían dudas fueron asignados con ayuda de herramientas de predicción y de moléculas ya reportadas que presentaban los mismos átomos (Manríquez-Villalobos, 2012). Por otra parte, con ayuda del experimento COSY se pudo asignar los hidrógenos vecinos, observándose que existe una conectividad entre el H16 y el H17.

El análisis de los espectros de masas de las DHPs sintetizadas, confirmó que se tenían los productos esperados, ya que la masa de los iones moleculares obtenidos corresponde al peso molecular calculado para las DHPs, excepto en los compuestos **SAD4** y **SAD5**, en los que la masa del ion molecular es unidad mayor y una menor al peso molecular, respectivamente. En el caso del compuesto **SAD4** la diferencia puede ser el resultado de la pérdida de un hidrógeno, proponiéndose que el hidrógeno perdido es el que está unido al nitrógeno del anillo piridinico y que generaría un ión relativamente estable, proceso que pudo ocurrir por las condiciones del análisis. Para el compuesto **SAD5** que tiene un peso molecular de 513 g/mol, en su espectro de masas se observan señales correspondientes a iones de 512 y 514 m/z, que son debidas al ^{79}Br y ^{81}Br presentes en las moléculas de **SAD5**, los cuales tienen una abundancia isotópica aproximada de 1:1. El

análisis del patrón de fragmentación de las DHPs mostró que todas presentan un pico base de 91 m/z, que corresponde al ion bencilo, fragmento que resulta del rompimiento del enlace N-C19.

Todas las DHPs de la serie SAD son compuestos quirales y fueron sintetizados (y evaluados) como mezcla racémica. Esto es lo usual en estudios propios de un primer cernimiento, correspondiendo a trabajos futuros el desdoblamiento y la evaluación biológica de los enantiómeros.

8.2 Actividad biológica

8.2.1 Efecto relajante de las dihidropiridinas análogas a la nifedipina

La acción directa de las DHPs sobre el músculo liso vascular se traduce en la relajación del mismo. Este efecto resulta del bloqueo de los canales de calcio operados por voltaje, lo que impide el flujo de calcio; la apertura de los canales es provocada por la despolarización de la membrana, causada en este modelo por la concentración elevada de potasio. De esta manera la mayor o menor potencia relajante de los compuestos probados reflejará su capacidad para bloquear los canales de calcio.

Los resultados obtenidos en la evaluación del efecto relajante de las DHPs de las series SAD y SMV muestran que éstas son poco potentes o prácticamente inactivas. Estos resultados están de acuerdo con un gran número de trabajos en los que se han sintetizado y evaluado DHPs sustituidas en la posición *para* del anillo aromático y que han reportado que éstas poseen poco o nulo efecto BEC. Esta baja actividad relajante de las DHPs que presentan esta sustitución pone de manifiesto los estrictos requerimientos estéricos del sitio de unión en el canal de calcio para acomodar los sustituyentes en la posición *para* del anillo aromático de las DHPs. Estudios cuantitativos de la relación estructura-actividad (QSAR, por sus siglas en inglés) han permitido obtener ecuaciones que modelan la influencia de los sustituyentes en el anillo 4-fenilo sobre la actividad relajante de las DHPs. Tal es el caso del formulado por Coburn *et al.*, 1988, con base en 46 DHPs (análogas de nifedipina con diferentes sustituyentes en el anillo aromático), en el que se resalta la influencia estérica negativa de los

sustituyentes, cuando éstos se encuentran en la posición *para* del anillo aromático.

En la **tabla 5** y en las **figuras 52 y 53** podemos ver que solo **SAD3** y **SAD6** presentaron efecto relajante, aunque fueron poco potentes. Estas DHPs presentan como sustituyente en el anillo aromático un flúor y un hidrógeno, respectivamente. Estos sustituyentes son de tamaño relativamente pequeño en comparación a los sustituyentes que poseen las otras DHPs de la serie SAD; por ejemplo, esto se puede ver si se compara el parámetro L Sterimol (longitud) de los sustituyentes: H (2.06), F (2.65); CH₃ (3.00); Cl (3.52); NO₂ (3.44); Br (3.83). Por ello se puede suponer que el efecto relajante que presentan **SAD3** y **SAD6** se debe a que éstas todavía pueden tener acomodo en el sitio receptor a DHPs, aún cuando la fuerza interacción con él esté disminuida, a causa de la contribución negativa (por razones estéricas) que tienen el hidrógeno y el flúor. Un comportamiento similar se puede observar entre los análogos de nifedipina sustituidos en la posición *para* del anillo aromático, en los que las DHPs con hidrógeno y flúor presentan una potencia relajante regular (7.55 y 6.89, respectivamente, en términos de pCl_{50}), en tanto que las DHPs con cloro, bromo o grupo nitro son poco potentes (valores pCl_{50} de 5.09, 5.40 y 5.50, respectivamente) (Coburn *et al.*, 1988).

En el caso de las DHPs de la serie SMV, su falta de actividad relajante no puede ser atribuida al sustituyente en el anillo aromático, ya que éstas no lo presentan en la posición *para* sino en la posición *meta*, que es la misma posición en la que la NIT y la NIC presentan un grupo nitro como sustituyente; los estudios de relación estructura-actividad proponen que la mayoría de los sustituyentes en la posición *meta* contribuirán positivamente a la actividad relajante, en razón de sus propiedades hidrofóbicas y electrónicas. Existen reportes que indican que las DHPs simétricas son menos potentes que las asimétricas (Kojda *et al.*, 1991; Meyer *et al.*, 1981), sin embargo, esta aseveración no es correcta, ya que se ha visto que esto va a depender de la serie de DHPs estudiada (Hernández-Gallegos *et al.*, 1995). Por otra parte, se ha propuesto que el sitio de unión de las DHPs en el canal de calcio no está sobre la superficie de la membrana, si no inmerso en ella. Por lo que las

DHPs para poder acceder a él deben entrar (disolverse) al interior de la membrana, que como sabemos es de naturaleza hidrofóbica. Es por ello que si una DHP posee una cadena básica (ionizable a pH fisiológico) estará algo impedida para llegar e interactuar con su sitio de unión (Peri *et al.*, 2000); lo que explicaría en parte porque la NIC (que posee la cadena básica: N-metil-N-bencil-etiloamino en uno de sus ésteres) es menos potente que la NIT. En nuestro caso, las DHPs de la serie SMV poseen dos cadenas básicas, por lo que estarán aún más impedidas para acceder a su sitio de unión en el canal de calcio, dando como resultado una muy baja (prácticamente nula) actividad relajante.

En resumen, estos resultados indican que los análogos de nicardipina con las modificaciones estructurales propuestas (sustitución en la posición *para* del anillo aromático o presencia de cadenas básicas en los esteres) presentan baja o nula actividad relajante en músculo liso vascular.

8.2.2 Efecto tripanocida *in vitro*

Reportes en la literatura muestran claramente que fármacos de la familia de las DHPs poseen efecto anti-tripanosoma. Pese a ello, aún no está elucidado el mecanismo de acción por el que las DHPs logran este efecto. Aún cuando el propósito de este estudio no está enfocado a indagar dicho mecanismo, el uso de DHPs con bajo o nulo efecto relajante, nos permite confirmar en forma definitiva la propuesta de que el efecto anti-tripanosoma (y anti-leishmania) de las DHPs no está relacionado con su efecto bloqueador de canales de calcio; los estudios anteriores en este tema fueron realizados solo con DHPs que poseen alta potencia como BECs.

A la fecha tampoco es claro que características moleculares son importantes para que las DHPs presenten efecto contra tripanosidos, pero es interesante notar que, en los estudios reportados en la literatura, varias de las DHPs que presentan un buen efecto poseen en su estructura química una cadena de carácter básico (nicardipina, amlodipina, azelnidipina, lercanidipina) (Nuñez-Vergara *et al.*, 1997; Hirota *et al.*, 2004; Reimao *et al.*, 2010). Esto podría suponer que en la interacción de la molécula de DHP con su blanco biológico en el parásito, cualquiera que éste sea, es importante

(entre otras cosas) la presencia de sustituyentes (tipo cadenas básicas) que puedan establecer interacciones por puente de hidrógeno y/o ión-ión (o ión-dipolo).

Los resultados de la evaluación del efecto tripanocida *in vitro* indican claramente que varias de las DHPs ensayadas presentan un buen efecto. En razón de que la mayoría de las DHPs estudiadas en este trabajo son nuevas, no fue posible comparar los resultados obtenidos con datos de la literatura. Esto solo fue posible para el compuesto de referencia Bnz, cuyo efecto tripanocida en la cepa INC5 (expresada en términos de CI_{50}) fue comparable a los reportados en otro trabajo (ver **tabla 6**) (Nieto, 2012). En el caso de la cepa NINOA no se encontraron valores reportados para comparar con los obtenidos en el presente estudio.

El análisis de los valores de CI_{50} obtenidos (**tabla 6**) indican que las dos cepas de *T. cruzi* usadas (NINOA e INC5) difieren entre sí en cuanto a su respuesta (susceptibilidad) tanto a las DHPs como al Bnz. En el caso de la cepa NINOA, ésta fue al menos tres veces más susceptible que la cepa INC5 a las DHPs **SAD1** y **SAD2**; en relación a las otras DHPs la diferencia en susceptibilidad fue menor (menos del doble en los casos en los que se puede determinar) y no siempre en el mismo sentido (NINOA fue un poco más susceptible que INC5 a **SAD1**, **SAD2**, **SAD5**, **SAD6**, **SMV1**, **SMV2** y **Nic**, mientras que INC 5 fue un poco más susceptible que NINOA a las restantes DHPs). Con respecto al Bnz, la cepa INC5 fue tres veces más susceptible a él que la cepa NINOA. La diferencia de susceptibilidad entre cepas de *T. cruzi* está bien documentada, existiendo, por ejemplo, cepas con resistencia natural al Nfx y al Bnz (Filardi y Brener, 1987). Asimismo, se ha propuesto que existe una correlación entre divergencia filogenética entre cepas de *T. cruzi* y sus susceptibilidades a agentes quimioterapéuticos (Toledo *et al.*, 2003).

El examen de los resultados obtenidos para la cepa NINOA indica que la nicardipina y ocho de sus análogos evaluados tuvieron un efecto tripanocida mayor que la del fármaco de referencia Bnz, siendo el análogo **SAD2** el que presentó el efecto más alto (6 veces más potente que Bnz). En el caso de la cepa INC 5, los resultados fueron lo opuesto, teniendo el Bnz

una actividad tripanocida mayor al de la nicardipina y sus análogos ensayados; este cambio en el sentido de los resultados se debe, como se discutió anteriormente, al cambio en la susceptibilidad de las cepas hacia las DHPs, pero sobre todo al cambio de susceptibilidad con respecto al Bnz. Sin embargo, es interesante observar que si bien el Bnz presenta un efecto tripanocida más potente que las DHPs en la cepa INC5, algunas de éstas (como **SAD2** y **SMV5**) podrían tener una mayor eficacia (ver **figuras 56 y 57**; las gráficas muestran que las curvas de **SAD2** y **SMV5** están en plena fase de subida en tanto que el Bnz aparentemente ya alcanzó su efecto máximo).

El análisis de los resultados obtenidos con la cepa NINOA (valores de CI_{50} , **tabla 6**) indican que la transformación estructural a la nicardipina de poner un sustituyente en la posición *para* del anillo aromático (serie SAD), generó (en tres de los seis casos) análogos con mayor potencia tripanocida (**SAD1**, **SAD2**, **SAD5**). En tanto que la introducción de una cadena básica adicional (y cambio del sustituyente del anillo aromático; serie SMV), resultó en DHPs que, si bien tuvieron un efecto tripanocida importante (mayor al del Bnz), fueron menos potentes que la nicardipina. En el caso de la cepa INC5 los resultados obtenidos con las transformaciones estructurales fueron diferentes: solo dos análogos de la serie SAD (**SAD4** y **SAD5**) fueron más potentes que nicardipina, mientras que de la serie SMV fueron cuatro análogos (**SMV3-SMV6**) los que tuvieron mayor potencia que la nicardipina. Estos resultados nos indican que se deben seguir explorando ambas características estructurales en la búsqueda de nuevas DHPs con efecto anti-tripanosoma.

Los resultados obtenidos en la evaluación del efecto tripanocida confirman la posibilidad de obtener DHPs que carezcan de actividad como BECs, pero que presenten efecto importante contra *T. cruzi*.

8.2.3 Efecto leishmanicida *in vitro*

Los estudios acerca del efecto de DHPs sobre algunos parásitos de la familia Trypanosomatidae (a la cual pertenecen *T. cruzi* y *Leishmania*) comenzaron en 1997, cuando Nuñez-Vergara *et al.* reportó el efecto tripanocida de varias las DHPs, pero no fue sino hasta una década después que se publicó el primer trabajo del efecto leishmanicida de este tipo de compuestos (Palit y Ali, 2008). A la fecha son pocos los reportes del efecto leishmanicida de las DHPs y aún no se conoce cuál es el mecanismo de acción por el que las DHPs ejercen su efecto sobre *Leishmania*.

Los resultados obtenidos en la determinación del efecto leishmanicida indican que ninguno de los análogos de nicardipina ensayados fue más potente que la nicardipina, presentando en la mayoría de los casos valores de CI_{50} similares a la nicardipina. El valor de CI_{50} determinado para la nicardipina en la cepa MNYC/BZ/62/M379 de *L. mexicana* fue de 10.5 μM , valor que es aproximadamente la mitad del reportado en otras especies de *Leishmania* (Reimao *et al.*, 2010), lo que indica que la susceptibilidad de la cepa MNYC/BZ/62/M379 a las DHPs es alta; cabe mencionar que la cepa MNYC/BZ/62/M379 es la que causa más daño en México.

Los valores de CI_{50} de la nicardipina y sus análogos en *L. mexicana* están en un intervalo de 10.5 a 23 μM , que son valores significativamente menores a los determinados en *T. cruzi* (tanto en la cepa NINOA como en la INC5), lo que sugiere que los parásitos de la cepa MNYC/BZ/62/M379 de *L. mexicana* son más susceptibles al grupo de DHPs incluidas en este estudio, que los parásitos de las cepas NINOA e INC5 de *T. cruzi*.

En la comparación con anfotericina B (que fue el fármaco de referencia en este ensayo), los resultados muestran que aunque la nicardipina y sus análogos fueron menos potentes, poseen la misma eficacia que este compuesto de referencia.

8.2.4 Efecto citotóxico en células de mamífero

La evaluación del daño a la línea celular Vero nos permite contar con la información del potencial citotóxico que pudiesen presentar los compuestos sobre una célula eucariota distinta a la de los parásitos *T. cruzi* y *Leishmania*.

Los resultados de la determinación del efecto citotóxico reveló que las transformaciones estructurales de la nicardipina, presentes en las DHPs de las series SAD y SMV, resultó en la mayoría de los casos en la obtención de compuestos menos citotóxicos. Lo que representaría una mayor ventaja desde el punto de vista de seguridad farmacológica.

Aunque para varias de las DHPs no pudo ser determinado el valor de su CC_{50} , es posible afirmar que la potencia citotóxica de todas las DHPs ensayadas es significativamente menor a la de la anfotericina B. También es posible inferir que el efecto de las DHPs no se debe al bloqueo de canales de calcio, ya que la nicardipina (que posee un efecto como BEC relativamente alto, a juzgar por su efecto relajante) y **SAD3** (que presentó un modesto efecto BEC) son menos citotóxicas que **SAD4** y **SAD5**, que presentaron efecto BEC prácticamente nulo.

Los resultados mostraron que el Bnz presenta muy baja citotoxicidad en células Vero. Aún a la concentración más alta probada (100 mg/mL) sólo causó un 5% de muerte celular, estimándose un CC_{50} mayor a 384 μ M. Resultados similares han sido reportados en la línea celular LLC-MK2 (células de riñón de mono Rhesus) en los que se encontró una CC_{50} mayor a 1366 μ M (Reimao *et al.*, 2010). Una posible explicación de la baja citotoxicidad que presenta el benznidazol en células Vero es lo señalado por Buschini *et al.*, 2009, quienes reportaron que el efecto citotóxico del Bnz (en linfocitos humanos) solo es evidente cuando éstos han sido expuestos al fármaco por al menos 72 h; tratamientos más cortos (de 24 h, el mismo tiempo al que se expusieron las células Vero) no indujeron daño evidente en los linfocitos. Otra explicación alternativa de la baja toxicidad del Bnz es que las células Vero no posean la capacidad metabólica adecuada (como ocurre *in vivo* en el hígado) para biotransformar al Bnz en sus metabolitos reactivos que son los responsables de afectar el DNA, las proteínas y los lípidos, que dan como resultado final el daño celular (Díaz de Toranzo *et al.*, 1988; Byler *et al.*,

2012).

Estos resultados nos indican que el potencial citotóxico de la mayoría de las DHPs estudiadas es aceptable para continuar con estudios posteriores *in vivo*.

9. CONCLUSIONES

Análogos de nicardipina con bajo o nulo efecto bloqueador de canales de calcio tienen efecto tripanocida y leishmanicida.

El efecto tripanocida y leishmanicida de las DHPs no depende de su efecto bloqueador de canales de calcio.

10. REFERENCIAS

- Ambriz-Peña (2007). Determinación de la actividad *in vitro* de derivados de la nicardipina y nifedipina sobre la cepa W.Brener de *Trypanosoma cruzi*. *Ciencia Nicolaita*. N°46.
- Araujo C., Araujo A., Batista A., Oliveira A., Oliveira V., Lino Junior R., Vinaud M. y Bezerra J. (2011). Morphological alterations and growth inhibition of *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes exposed to zidovudine (AZT). *Parasitol. Res.* 108: 547–551.
- Arjona-Jiménez G., Villegas N., López-Céspedes Á., Marín C., Longoni S., Bolio-González M., Rodríguez-Vivas R., Sauri-Arceo C. y Sánchez-Moreno M. (2012). Prevalence of antibodies against three species of *Leishmania* (*L. mexicana*, *L. braziliensis*, *L. infantum*) and possible associated factors in dogs from Mérida, Yucatán, Mexico. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* doi:10.1016/j.trstmh.2011.12.003.
- Berman J.D. (1997). Human Leishmaniasis: Clinical, Diagnostic, and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years. 24: 684-703.
- Bern C., Montgomery S., Herwaldt B., Rassi Jr. A., Marin-Nieto J., Dantas R., Maguire J., Acquatella H., Morillo C., Kirchhoff L., Gilman R., Reyes P., Salvatella R. y Moore A. (2007). Evaluation and Treatment of Chagas Disease in the United States: A Systematic Review. *JAMA* 298: 2171-2181.
- Bero J., Hannaert V., Chataigné G., Hérent M. y Quetin-Leclercq J. (2011). In vitro antitrypanosomal and antileishmanial activity of plants used in Benin in traditional medicine and bio-guided fractionation of the most active extract. *J. Ethnopharmacol.* 137: 998–1002.
- Blum J., Zellweger M., Burri C. y Hatz C. (2008). Cardiac involvement in African and American tripanosomiasis. *Lancet Infect Dis.* 8: 631–41.
- Buschini A., Ferrarini L., Franzoni S., Galati S., Lazzaretti M., Mussi F., Northfleet de Albuquerque C., Araujo-Domingues-Zucchi TM. y Paola Poli P. (2009). Genotoxicity reevaluation of three commercial nitroheterocyclic drugs: nifurtimox, benznidazole, and metronidazole. *J. Parasitol. Res.* 2009: 1-11.
- Byler KG., Brito-Arias M., Marquez-Navarro A., Noguera-Torres B., Torres-

Bustillos L.G. y Martínez-Mayorga K. (2012). Identification of benzoylisoquinolines as potential anti-Chagas agents. *Bioorg. Med. Chem.* 20: 2587–2594.

Carlier Y., Truyens C., Deloron P. y Peyron F. (2012). Congenital parasitic infections: A review. *Acta Trop.* 121: 55– 70.

Chagas C. (1909). Nova tripanozomíaze humana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1: 159-217.

Chattopadhyay A. y Jafurulla M. (2011). A novel mechanism for an old drug: Amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* doi:10.1016/j.bbrc.2011.11.023

Coburn, A. R., Wierzba, M., Suto, J. M., Solo J. A., Triggle M. A. y Triggle J. D. (1988). 1,4-Dihydropyridine antagonist activities at the calcium channel: A quantitative structure-activity relationship approach. *J. Med. Chem.* 2103-2107.

Contreras-Paredes, R. (2008). Síntesis y caracterización química de 1,4-dihidropiridinas con potencial efecto activador de canales de calcio. Tesis de licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich., México. 1-3, 8, 9, 69-71.

De Castro., Batista D., Batista M., Batista W., Daliry A., de Souza E., Menna-Barreto R., Oliveira G., Salomáo K., Silva C., Silva P. y Soeiro M. (2011). Experimental Chemotherapy for Chagas Disease: A Morphological, Biochemical, and Proteomic Overview of Potential *Trypanosoma cruzi* Targets of Amidines Derivatives and Naphthoquinones, *Mol. Biol. Int.*. Article ID 306928, 13 pages. doi:10.4061/2011/306928

Denizot F. y Lang R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods.* 2. 89: 271-7.

De Souza W. (2002). From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. *Kinet. Biol. Disease.* 1: 1-21

De Souza W., de Carvalho T. y Santos E. (2010). Review on Trypanosoma cruzi: HostCell Interaction. Hindawi Publishing Corporation. *Int. J. Cell Biol.* Article ID 295394, 18 pages. doi:10.1155/2010/295394.

Díaz de Toranzo E.G., Castro J. A., Franke de Cazzulo B.M. y Cazzulo J.J. (1988). Interaction of benzimidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasmic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Birkhäuser Verlag*. 44: 880-881

Díaz-Chiguer D., Márquez-Navarro A., Noguera-Torres B., León-Ávila G., Pérez-Villanueva J., Hernández-Campos A., Castillo R., Ambrosio J., Nieto-Meneses R., Yépez-Mulia L. y Hernández-Luis F. (2011). In vitro and in vivo trypanocidal activity of some benzimidazole derivatives against two strains of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.* doi:10.1016/j.actatropica.2011.12.009

Dumonteil E. (1999). Update on Chagas' disease in México. *Salud Pública de México*. 41: 332-327.

El-Sayed N., Myler P., Blandin G., Berriman M., Crabtree J., Aggarwal G., Caler E., Renaud H., Worthey E., Hertz-Fowler C., Ghedin E., Peacock C., Bartholomeu D., Haas B., Tran A., Wortman J., Alsmark U., Angiuoli S., Anupama A., Badger J., Bringaud F., Cadag E., Carlton J., Cerqueira G., Creasy T., Delcher A., Djikeng A., Embley T., Hauser C., Ivens A., Kummerfeld S., Pereira-Leal J., Nilsson D., Peterson J., Salzberg S., Shallom J., Silva J., Sundaram J., Westenberger S., White O., Melville S., Donelson J., Andersson B., Stuart K. y Hall N. (2005a). Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. *Science* 309: 404-409.

El-Sayed N., Myler P., Bartholomeu D., Nilsson D., Aggarwal G., Tran A., Ghedin E., Worthey E., Delcher A., Blandin G., Westenberger S., Caler E., Cerqueira G., Branche C., Haas B., Anupama A., Arner E., Aslund L., Attipoe P., Bontempi E., Bringaud F., Burton P., Cadag E., Campbell D., Carrington M., Crabtree J., Darban H., Franco da Silveira J., de Jong P., Edwards K., Englund P., Fazelina G., Feldblyum T., Ferella M., Frasch A., Gull K., Horn D., Hou L., Huang Y., Kindlund E., Klingbeil M., Kluge S., Koo H., Lacerda D., Levin M., Lorenzi H., Louie T., Machado C., McCulloch R., McKenna A., Mizuno Y., Mottram J., Nelson S., Ochaya S., Osoegawa K., Pai G., Parsons M., Pentony M., Pettersson U., Pop M., Ramirez J., Rinta J., Robertson L.,

Salzberg S., Sanchez D., Seyler A., Sharma R., Shetty J., Simpson A., Sisk E., Tammi M., Tarleton R., Teixeira S., Van Aken S., Vogt C., Ward P., Wickstead B., Wortman J., White O., Fraser C., Stuart K. y Andersson B. (2005b). The Genome Sequence of *Trypanosoma cruzi*. Etiologic Agent of Chagas Disease. *Science* 309: 409-415.

Fernández M., Malchiodi E. y Algranati I. (2011). Differential Effects of Paromomycin on Ribosomes of *Leishmania mexicana* and Mammalian Cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55: 86–93.

Fidalgo L. y Gille L. (2011). Mitochondria and Trypanosomatids: *Targ. Drugs. Pharm. Res.* 28:2758–2770.

Filardi L.S. y Brener Z. (1984). A rapid method for testing in vivo the susceptibility of 279 different strains of *Trypanosoma cruzi* to active chemotherapeutic agents. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 79: 221–225.

Filardi L.S. y Brener Z. (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma 282 cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med Hyg.* 81: 755–759.

García-Almagro D. (2005). Leishmaniasis cutánea. *Actas Dermosifiliogr.* 96: 1-24.

Gontijo B. y Carvalho M. (2003). American cutaneous leishmaniasis. *Rev. Soc. Bra. Med. Trop.* 36:71-80.

Gottlieb H.E., Kontlyar V. y Nudelman A. (1997). RMN chemical shifts of common laboratory solvents as trace impurities. *J. Org. Chem.* 62: 7512-7515.

Hernández-Gallegos Z., Lehmann F.P.A., Hong E., Posadas F. y Hernández-Gallegos E. (1995). Novel halogenated 1,4-dihydropyridines: synthesis, bioassay, microsomal oxidation and structure-activity relationships. *Eu. J. Med. Chem.* 30: 355-364.

Hirota K., Tsubouchi A., Nakajima-Shimada J., Nara T. y Aoki T. (2004). Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells by nimodipine, with low cytotoxicity to host cells. *Trop. Med and Health* 32:181-188.

Horta M., Mendes B., Roma E., Motta F., Pereira J., Souza L., Morato M. y

Quercia L. (2012). Reactive Oxygen Species and Nitric Oxide in Cutaneous Leishmaniasis. *J. Parasitol. Res.* Article ID 203818, 11 pages doi:10.1155/2012/203818.

Hotez P.J., Bottazzi M.E., Franco-Paredes C., Ault S.K. y Periago M.R. (2008). The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. *Neglected Tropical Diseases*. 2: 300.

Ivens A., Peacock C., Worthey E., Murphy L., Aggarwal G., Berriman M., Sisk E., Rajandream M., Adlem E., Aert R., Anupama A., Apostolou Z., Attipoe P., Bason N., Bauser C., Beck A., Beverley S., Bianchetti G., Borzym K., Bothe G., Bruschi C., Collins M., Cadag E., Ciarloni L., Clayton C., Coulson R., Cronin A., Cruz A., Davies R., Gaudenzi J., Dobson D., Duesterhoeft A., Fazelina G., Fosker N., Frasch A., Fraser A., Fuchs M., Gabel C., Goble A., Goffeau A., Harris D., Hertz-Fowler C., Hilbert H., Horn D., Huang Y., Klages S., Knights A., Kube M., Larke N., Litvin L., Lord A., Louie T., Marra M., Masuy D., Matthews K., Michaeli S., Mottram J., Müller-Auer S., Munden H., Nelson S., Norbertczak H., Oliver K., O'Neil S., Pentony M., Pohl T., Price C., Purnelle B., Quail M., Rabinowitsch E., Reinhardt R., Rieger M., Rinta J., Robben J., Robertson L., Ruiz J., Rutter S., Saunders D., Schäfer M., Schein J., Schwartz D., Seeger K., Seyler A., Sharp S., Shin H., Sivam D., Squares R., Squares S., Tosato V., Vogt C., Volckaert G., Wambutt R., Warren T., Wedler H., Woodward J., Zhou S., Zimmermann W., Smith D., Blackwell J., Stuart K., Barrell B y Myler P. (2005). The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. *Science* 309: 436-442.

Iwanami M., Shibanuma T., Fujimoto M., Kawai R., Tamazawa K., Takenaka T., Takahashi K. y Murakami M. (1979). Synthesis of new-soluble dihidropiridine vasodilators. *Chem. Pharm. Bull.* 27: 1426-1440.

Kemmerling U., Bosco C. y Galanti N. (2010). Infection and invasion mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in the congenital transmission of Chagas' disease: A proposal. *Biol Res.* 43: 307-316.

Janis R.A., Silver P.J., y Triggle D.J. (1987). Drug action and cellular calcium regulation. *Adv. Drug. Res.* 16: 309-591.

- Khademvatan S., Javad M., Rahim F. y Saki J. (2011). Miltefosine-Induced Apoptotic Cell Death on *Leishmania major* and *L. tropica* Strains. *Korean J. Parasitol.* 49: 17-23.
- Kojda G., Klaus W., Werner G. y Fricke U. (1991). The influence of 3-ester side chain variation on the cardiovascular profile of nitrendipine in porcine isolated trabeculae and coronary arteries. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 344: 488-494.
- Lannes-Vieira J., Araújo-Jorge T., Correia M., Gadelha P. y Corrêa-Oliveira R. (2010). The Centennial of the Discovery of Chagas Disease: Facing the Current Challenges. *Plos Neglected Tropical Disease.* 4: 645-648
- Laskay T., Van Zandbergen G. y Solbach W. (2003). Neutrophil granulocytes-Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends Microbiol.* 11: 210-4.
- Lozano-Kasten F., Magallón-Gastélum E., Soto-Gutiérrez M., Kasten-Monges M., Bosseno M. y Frédérique S. (2008). Conocimiento epidemiológico y situación actual de la enfermedad de Chagas en el estado de Jalisco, México. *Salud Pública Mex.* 50: 508-515.
- Manriquez-Villalobos S. (2012). Síntesis de 1,4-dihidropiridinas con potencial actividad antitripanosoma. Tesis de licenciatura. Facultad de Químico Farmacobiología, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia, Mich., México. 1-3, 8, 9, 69-71.
- Meguro K, Aizawa M., Sohda T., Kawamatsu Y., y Nagaoka A. (1985). New 1,4-dihydropyridine derivatives with potent and long-lasting hypotensive effect. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 3787-3797.
- Mesa A., Molano P., Seon B., Figadere B., Robledo S., Muñoz D. y Sáez J. (2008). Síntesis y actividades leishmanicida y citotóxica *in vitro* de análogos 2-arilquinolinas. *Vitae*, Revista de la Facultad de Química Farmacéutica ISSN 0121-4004. Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia. 15: 259-266.
- Meyer H., Bossert F., Wehinger E., Stoepel K. y Vater W. (1981). Synthese und vergleichende pharmakologische Untersuchungen von 1,4-Dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)pyridin-3,5-dicarbonsäureestern mit nicht-

identischen Esterfunktionen. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 31: 407-409.

Monzote L., García M., Montalvo A., Scull R. y Miranda M. (2010). Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 105: 168-173.

Noel F., Cotrim P., Rouge A., Loureiro E., Menezes L., Roland C., Martins C., Osorio E., Muskus C. y Robledo S. (2005). Leishmania: papel de la glicoproteína p en la mediación de resistencia a medicamentos y estrategias de reversión. *Biomédica.* 25: 242-60.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-003-SSA2-1993. Para la disposición de sangre humana y sus componentes con fines terapéuticos. Diario Oficial de la Federación 8 de diciembre de 1993.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-032-SSA2-2002. Para la vigilancia epidemiológica, prevención y control de enfermedades transmitidas por vector. Diario Oficial de la Federación 8 de enero de 2001.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación 22 de Agosto de 2009.

Noyola M. (2003a). Síntesis y actividad tripanocida in vitro de análogos estructurales de la nicardipina. Tesis de maestro en ciencias. Escuela nacional de ciencias biológicas. Departamento de inmunología. México, D.F.

Noyola M. y Hernández-Gallegos Z. (2003b). Síntesis y actividad relajante en músculos liso vascular de una serie de 1,4-dihidropiridinas análogas de nicardipina. *Rev. Soc. Quím. Méx.* 47: 34-37.

Núñez-Vergara, L. J., Squella, J. A., Bollo- Dragnic, S., Morillo, A., Repetto, Y., Aldunate, J. y Letelier, M. E. (1997). Nitro aryl 1,4-dihydropyridine derivatives: effects on Trypanosome cruzi. *Comp. Biochem. Physiol.* 118: 105-111.

Oliveira dos Santos A., Costa M., Ueda-Nakamura T., Dias-Filho B., Veiga-Júnior V., de Souza Lima M y Nakamura C. (2011). Leishmania amazonensis: Effects of oral treatment with copaiba oil in mice. *Exp. Parasitol.* 129: 145–151.

Oliveira R., Passos A., Alves R., Romanha A., Prado M., Dias de Souza Filho J. y Alves R. (2003). In Vitro Evaluation of the Activity of Aromatic Nitrocompounds against *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 98: 141-144.

OPS. MSF. (2005). Curso de capacitación médica en el diagnóstico, manejo y tratamiento de la enfermedad de Chagas. *OPS*. 1: 1-37

Palit P. y Ali N. (2008). Oral therapy with amlodipine and lacidipine, 1,4-dihydropyridine derivatives showing activity against experimental visceral Leishmaniasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 52: 374- 377.

Pereira B., Silva F., Rebello K., Marín-Villa M., Traub-Cseko., Andrade T., Bertho Á., Caffarena E. y Alves C. (2011). In silico predicted epitopes from the COOH terminal extension of cysteine proteinase B inducing distinct immune responses during *Leishmania (Leishmania) amazonensis* experimental murine infection. *BMC Immunol*. 12:44.

Peri R., Padmanabhan S., Rutledge A., Singh S. y Triggle D.J. (2000). Permanently charged chiral 1,4-dihydropyridines: molecular probes of L-type calcium channels. Synthesis and pharmacological characterization of methyl (ω -trimethylalkylammonium) 1,4-dihydro-2,6-dimethyl-4-(3-nitrophenyl)-3,5-pyridinedicarboxylate iodide, calcium channel antagonists. *J. Med. Chem.* **43**: 2906-2914.

Pinto-Dias J. C. (2003). Tratamiento etiológico de la enfermedad de Chagas: Una síntesis. XlIIa. Reunión Intergubernamental INCOSUR/Chagas, Santiago, Chile. 1: 129-134.

Piscopo T. y Azzopardi M. (2006). Leishmaniasis. *Postgrad. Med. J.* 82:649–657. doi: 10.1136/pgmj.2006.047340corr

Pizzi T. (1957). Inmunología de la enfermedad de Chagas. Santiago, Universidad de Chile. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 4: 389-396.

Polanco-Hernández G., Escalante-Erosa F., García Sosa K., Acosta-Viana K., Chan-Bacab M., Sagua-Franco H., González J., Osorio-Rodríguez L., Moo-Puc R. y Peña-Rodríguez L. (2012). In vitro and in vivo trypanocidal activity of native plants from the Yucatan Peninsula. *Parasitol. Res.* 110:31–35.

Prata A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet. Infect. Diseases*. 1: 92-100.

Quijano-Hernández I. y Dumonteil E. (2011). Advances and challenges toward a vaccine against Chagas disease. *Human Vaccines*. 7: 1184-1191.

Ramos J., González-Alcaide G., Gascón J. y Gutiérrez F. (2011). Mapping of Chagas disease research: analysis of publications in the period between 1940 and 2009. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*

Rassi A Jr., Rassi A. y Marin-Nieto J. (2010). Chagas disease. *Lancet*. 375: 1388–402.

Rassi A Jr., Rassi A. y Rassi S. (2007). Predictors of Mortality in Chronic Chagas Disease: A Systematic Review of Observational Studies. *Am. Heart Association*. 115: 1101-1108.

Reimão J.Q., Scotti M.T. y Tempone A.G. (2010). Anti-leishmanial and anti-trypanosomal activities of 1,4-dihydropyridines: In vitro evaluation and structure–activity relationship study. *Bioorg. Med. Chem*. 18: 8044–8053.

Roca C., Pinazo M., López-Chejade P., Bayó J., Posada E., López-Solana J., Gállegos M., Portús M., Gascón J. y el grupo de investigación Chagas-Clot. (2011). Chagas Disease among the Latin American Adult Population Attending in a Primary Care Center in Barcelona, Spain. *Plos Neglected Tropical Disease*. 5: 1135-1140.

Rodríguez-Bataz E., Noguera-Torres B., Rosario-Cruz R., Martínez-Ibarra J.A. y Rosas-Acevedo J.L. (2011). Triatominos (Hemiptera: Reduviidae) vectores de *Trypanosoma cruzi* Chagas 1909, en el estado de Guerrero, México. *Rev. Biomed*. 22: 31-40.

Rojas-Aguirre Y., Castillo I., Hernández D., Noguera-Torres B., Márquez-Navarro A., Villalobos J., Sánchez-Bartéz F., Sánchez-Torres L., Gracia-Mora I., Castillo R. y Hernández-Luis F. (2012). Diversity in the supramolecular interactions of 5,6-dichloro-2-(trifluoromethyl)-1*H*-benzimidazole with modified cyclodextrins: Implications for physicochemical properties and antiparasitic activity. *Carbohydrate Polymers*. 87: 471–479.

Saraiva E., Pinto-da-Silva L., Wanderley J. y Bonomo A., Barcinski. y Moreira M. (2005). Flow cytometric assessment of *Leishmania* spp metacyclic differentiation: Validation by morphological features and specific markers. *Exp. Parasitol.* 110: 39-47.

Secretaría de Salud (2001). Programa de acción. Enfermedades transmitidas por vector. Primera edición 2001.

Secretaría de Salud. (2008). Programa de Acción Especifico 2007-2012. Otras Enfermedades Trasmitidas por Vector. Subsecretaría de prevención y promoción de la salud. Primera edición 2008.

Secretaria de Salud (2011). Boletín epidemiológico. Núm. 50. Vol. 28. Semana 50 Del 11 al 17 de diciembre del 2011.

Shimony O. y Jaffe C. (2008). Rapid fluorescent assay for screening drugs on *Leishmania* amastigotes. *J. Microbiol. Methods.* 75: 196-200.

Sica D.A. (2005). Calcium channel blocker class heterogeneity: select aspects of pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J. Clin. Hypertens.* 7: 21–26.

Soares M.B., Silva CV., Bastos T.M., Guimarães E.T., Figueira C.P., Smirlis D. y Azevedo W.F Jr. (2012). Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of nicotinamide. *Acta Trop.* 122: 224- 229.

Soeiro M. y De Castro S. (2011). Screening of potential anti-*Trypanosoma cruzi* candidates: In vitro and in vivo studies. *Open Med. Chem. J.* 5: 21-30.

Soto J. y Soto P. (2006). Miltefosina oral para el tratamiento de la leishmaniasis. *Biomedica.* 26: 207-17.

Suzuki K., Nagura J., Shiratori K., Murayama B., Harada N., Miyano T., y Takeya K. (1989). Study of the structure-activity relationships of new dihydropyridine derivatives. *J. Pharmacobio.-Dyn.* 12: 293-298.

Toledo, M.J., De O., Bahia M.T., Carneiro, C.M., Martins-Filho, O.A., Tibayrenc, M., Barnabé, C., Tafuri, W.L y de Lana, M. (2003). Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal geno- types. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 223–230.

Tripodi K., Menendez S. y Cricco J. (2011). Role of Heme and Heme-Proteins in Trypanosomatid Essential Metabolic Pathways. *Enzyme Res.* Article ID 873230, 12 pages.

Vaidian A., Weiss L. y Tanowitz H. (2004). Chagas' disease and AIDS. *Kinet. Biol. Disease.* 3:2.

Vidal-Acosta V., Ibáñez-Bernal S. y Martínez-Campos C. (2000). Infección natural de chinches Triatominae con *Trypanosoma cruzi* asociadas a la vivienda humana en México. *Salud Pública de México.* 42: 496-503.

Wheeler R., Gluenz E. y Gull K. (2011). The cell cycle of Leishmania: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Mol. Microbiol.* 79: 647–662.

Wilkinson S., Taylor M., Horn D., Kelly J. y Cheeseman I. (2008). A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *PNAS.* 105: 5022-5027.

REFERENCIAS ELECTRÓNICAS

[imagen promastigos]Club de Informática Médica y Telemedicina (Universidad de Panamá). Leishmania panamensis. Promastigotes en cultivo. Telmeds.org [publicada en línea]. 2009(10). [citado 22 de Oct de 2012].

Disponible en:

<http://www.telmeds.org/atlas/parasitologia/flagelados/leishmania-sp/leishmania-panamensis/leishmania-panamensis-promastigotes-en-cultivo/>

CDC, Leishmania, 2009,

<http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>

<http://www.cdc.gov/dpdx/htmlm/leishmaniasis>

Organización Mundial de la Salud, 2007, <http://www.who.int/en/>

Organización Mundial de la Salud, 2010, <http://www.who.int/en/>