

Actividad contra *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* y células de mamífero de nuevas *N*-bencil (2-furilmetil) cinamamidas

Activity against *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania chagasi* and mammalian cells of new *N*-benzyl (2-furylmethyl) cinnamamides

Sandra Milena Leal Pinto¹, José Gregorio Hernández Barajas², Leonor Yamile Vargas Méndez³, Vladimir V. Kouznetsov², Patricia Escobar Rivero¹

RESUMEN

Introducción: La quimioterapia contra la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas es inefectiva, condición que agrava el problema de salud pública que estas enfermedades tropicales representan. **Objetivo:** Determinar la actividad de nuevas *N*-bencil (2-furilmetil) cinamamidas en las formas libres e intracelulares de *Leishmania chagasi* y *Trypanosoma cruzi* y en células Vero y THP-1. **Materiales y métodos:** Los parásitos y las células fueron tratados con diferentes concentraciones de los compuestos y su actividad fue determinada microscópicamente y por la prueba colorimétrica de MTT en el caso de los parásitos y células de mamífero, respectivamente. Los resultados de actividad fueron expresados como la concentración que inhibe o destruye 50% o 90% de los parásitos o células. **Resultados:** Las *N*-arilalquilamidas **1**, **2** y **5** fueron activos en epimastigotes de *T. cruzi* con actividades entre CI_{50} 3,71-38,81 μ M y CI_{90} entre 50,87-59,87 μ M. El compuesto **2** presentó actividad en amastigotes intracelulares de *L. chagasi* con CI_{50} 77,76 μ M. Las amidas preparadas no presentaron toxicidad en células THP-1 y solo el compuesto **4** fue parcialmente tóxico en células Vero (CC_{50} 65,90 \pm 5,71 μ M). **Conclusiones:** La baja toxicidad presentada por los compuestos **1**, **2** y **5** y la actividad antiparasitaria mostrada soportan el diseño de nuevas moléculas relacionadas para ser evaluadas en sistemas *in vitro* e *in vivo* contra estas enfermedades parasitarias. *Salud UIS* 2009; 41: 275-279

Palabras clave: Leishmaniasis, enfermedad de Chagas, amastigotes intracelulares, citotoxicidad, cinamamidas *N*-sustituidas

1. Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales CINTROP-UIS. Escuela de Medicina. Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Industrial de Santander.

2. Laboratorio de Química Orgánica y Biomolecular. Escuela de Química. Universidad Industrial de Santander.

3. Grupo de Investigaciones Ambientales. Universidad Santo Tomas.

Correspondencia: Sandra Milena Leal Pinto, Bact. Escuela de Medicina, Departamento de Ciencias Básicas. Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales CINTROP, Sede UIS Guatiguará, 6344000 ext. 3565 fax 6540808

E-mail: sandramilena20@gmail.com

Recibido: 13 de noviembre de 2009 **Aceptado:** 20 de diciembre de 2009

ABSTRACT

Introduction: The chemotherapy against leishmaniasis and Chagas disease is ineffective, a condition that is aggravating the public health problem caused by these tropical diseases. **Objective:** To determine the activity of new *N*-benzyl(2-furylmethyl) cinnamamides in the free and intracellular forms of *Leishmania chagasi* and *Trypanosoma cruzi* and Vero and THP-1 cells. **Materials and Methods:** The parasites and cells were treated with different concentrations of the compounds and the activity was determined microscopically and MTT colorimetric test in the case of parasites and mammalian cells. Antiparasitic activity of tested compounds was expressed as the concentration that inhibits or destroys 50% or 90% of parasites and cells. **Results:** The *N*-arylalkylamides **1**, **2** and **5** were active against *T. cruzi* epimastigotes with a range of activities between IC_{50} 3.71-38.81 μ M and IC_{90} between 50.87-59.87 μ M. The compound **2** was active on intracellular amastigotes of *L. chagasi* with IC_{50} 77.76 μ M. The tested amides were not toxic to THP-1 cells; just only compound **4** resulted partially toxic on Vero cells (CC_{50} 65.9 \pm 5.71 μ M). **Conclusions:** The low toxicity and the antiparasitic activity showed by the cinnamanide compounds **1**, **2** and **5** support the design of new related molecules in order to be evaluated on *in vitro* and *in vivo* systems for these parasitic diseases. *Salud UIS* 2009; 41: 275-279

Keywords: Leishmaniasis, Chagas disease, intracellular amastigote, cytotoxicity, N-substituted cinnamamides

INTRODUCCIÓN

Las N-arilalquilamidas, derivadas del ácido cinámico son compuestos orgánicos ampliamente distribuidos en la naturaleza. Son moléculas importantes por sus diferentes propiedades fisicoquímicas y farmacológicas, algunas presentando actividad antioxidante y anticonvulsiva^{1,2}.

Recientemente se ha demostrado que algunos derivados inhiben la enzima 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa obtenida del hongo fitopatógeno *Cochliobolus lunatus*. Esta enzima está relacionada con desordenes reproductivos, enfermedades neuronales y neoplasias en humanos³.

Las propiedades fisiológicas en las que se han visto relacionados este tipo de compuestos, crean interés en su evaluación contra microorganismos que afectan a los humanos. La *Leishmania* y el *T. cruzi* son protozoos intracelulares pertenecientes a la familia Tripanosomatidae y causantes de dos enfermedades tropicales transmitidas por vectores conocidas como la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas. Estas enfermedades son endémicas en varios países de las regiones tropicales y subtropicales y responsables de cerca de 60000 muertes anuales, según reportes de la Organización Mundial de la Salud⁴.

No hay una vacuna y las opciones de tratamientos son pocas. Para leishmaniasis el tratamiento se basa en el uso de los antimoniales pentavalentes y en caso de falla terapéutica se utilizan anfotericina B, pentamindina,

miltefosine y paramomicina^{5,6}. El tratamiento de la enfermedad de Chagas se restringe al uso de dos medicamentos: el nifurtimox y el benznidazole, activos sólo en la fase aguda de la enfermedad^{7,8}. Estos tratamientos presentan inconvenientes especialmente su toxicidad, y eficacia variable y dado que son aplicados en periodos prolongados muchos pacientes abandonan sus tratamientos^{9,10}. Diferentes estrategias terapéuticas como la fototerapia, termoterapia, crioterapia, búsqueda racional de productos naturales activos, síntesis de nuevas moléculas químicas, entre otras, se están teniendo en cuenta para combatir los parásitos responsables de la leishmaniasis y la enfermedad de Chagas^{11,12}.

Tratando de encontrar nuevas moléculas con actividad antiparasitaria, en este trabajo se determinó la actividad de nuevas serie de cinamamidas N-sustituidas contra las formas libres e intracelulares de *L. chagasi* y *T. cruzi* y la citotoxicidad en células de mamífero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis

A una solución de ácido *trans*-cinámico (42,2 mmol) en tolueno anhidro (80 mL), se le adicionó el ácido bórico (5,0 mol %) y posteriormente la bencilamina (21,1 mmol); la mezcla obtenida se calentó a reflujo, utilizando una trampa de Dean-Stark, entre 5 y 9 horas dependiendo de la amina, hasta colectar un volumen de agua constante (cercano a la cantidad estequiométrica esperada). Esta información, junto al control por

cromatografía en capa fina (CCF) señaló la finalización de la reacción. Luego se eliminó la mayor parte del disolvente. La precipitación de los productos deseados **1-5** se realizó por adición de *n*-hexano. Su purificación se efectuó mediante cromatografía en columna sobre alúmina, usando mezclas de acetato de etilo y éter de petróleo como eluyentes¹³.

Compuestos y medicamentos de referencia

Se evaluaron cinco derivados de las *N*-arilalquilcinamamidas (Figura 1). Como medicamentos de referencia se utilizaron el nifurtimox (donado por el Doctor Simon Croft, London School of Higiene and Tropical Medicine) y la anfotericina B (AmB, Sigma). Las soluciones madre de los compuestos fueron preparadas en dimetilsulfoxido (DMSO) 100 veces diluidas. Las soluciones de trabajo fueron preparadas en medio de cultivo antes de los experimentos.

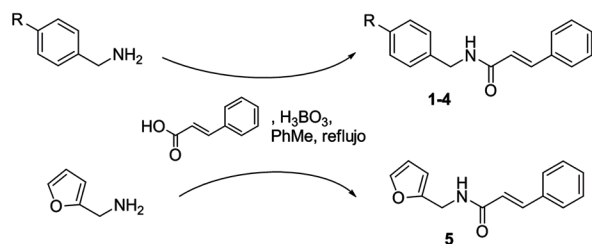


Figura 1. Preparación de los compuestos **1-5** utilizado en el estudio.

Parásitos y células de mamífero

Los parásitos *L. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) y *T. cruzi* (cepa 320I01)^{14,15} fueron mantenidos en su forma libre de promastigotes y epimastigotes a 28°C. Los promastigotes de *L. chagasi* fueron mantenidos en medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco) suplementado con hemina (Sigma), HEPES (Gibco) y 5% de suero bovino fetal inactivado con calor (SBFi, Gibco). Los epimastigotes de *T. cruzi* fueron mantenidos en medio de cultivo de LIT suplementado con 5% de SBFi y hemina.

Las líneas celulares de mamífero utilizadas en este estudio fueron células Vero (ATCC, TIB202) y THP-1 (ATCC, CCL-81). Ambas fueron mantenidas en medio de RPMI 1640 suplementado con 5% de SBFi a 37°C, 5%CO₂ y 95% atmósfera de humedad.

Actividad antiparasitaria

Formas libres de promastigotes de *L. chagasi* o epimastigotes de *T. cruzi* fueron tratados con 0,3-300 μM de los compuestos durante 3 días a 28°C. Parásitos controles fueron mantenidos sin compuesto. Los parásitos fueron observados microscópicamente y el recuento se realizó por conteo directo de los parásitos vivos en cámara de Neubauer empleando formalina 1% y eosina amarilla como diluyentes.

Amastigotes intracelulares de *L. chagasi* fueron obtenidos infectando células THP-1 con promastigotes en fase estacionaria y amastigotes intracelulares de *T. cruzi* fueron obtenidos infectando células Vero en monocapa con tripomastigotes de *T. cruzi*. En ambos casos se utilizó un radio de infección célula: parásito de 1:10 y la infección fue realizada durante 24 horas a 37°C, 5% CO₂ y 95% atmósfera de humedad.

Los amastigotes intracelulares fueron tratados con concentraciones de 0,1-100 μM de los compuestos durante 5 días adicionando una segunda dosis al tercer día. Las células fueron fijadas con metanol, coloreadas con Giemsa y observadas al microscopio luz para determinar el porcentaje de infección en 300 células.

Actividad citotóxica en células de mamífero

Las células THP-1 transformadas con forbol miristato acetato (PMA, Sigma) a su fenotipo adherente y las células Vero en monocapa fueron tratadas con 5-300 μM de los compuestos durante 3 días a 37°C, 5%CO₂ y 95% atmósfera de humedad. Células controles fueron mantenidas sin compuesto. La citotoxicidad se determinó mediante el uso la prueba calorimétrica del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol). Las células fueron tratadas con la sal (5 mg/mL) por 4 horas y posteriormente los cristales reducidos de formazan disueltos en DMSO. Las placas fueron leídas en un lector de microplacas (Anthos2020) a una densidad óptica de 580 nm¹⁶. El porcentaje de toxicidad fue determinado por la siguiente fórmula: % de citotoxicidad = 1-(número de células del grupo tratado/número de células del grupo control) x 100.

Análisis de resultados

Los resultados de actividad de los compuestos en los parásitos fueron expresados en concentraciones inhibitorias 50 y 90 (CI₅₀ y CI₉₀) y en las células de mamífero en concentraciones citotóxicas 50 y 90 (CC₅₀ y CC₉₀). Ellos fueron calculados utilizando el software

de regresión sigmoideal *Mx/fit*TM (ID Business Solution, Guildford, UK). Los resultados fueron expresados en unidades de μM y corresponden al promedio de dos experimentos con sus desviaciones estándar. El índice de selectividad (IS) fue calculado como el cociente de la CC_{50} sobre la CI_{50} .

RESULTADOS Y DISCUSION

Preparación de las cinamamidas N-sustituídas

Preparación de una nueva serie de *N*-bencilcinamamidas **1-4** y *N*-(2-furilmetil)cinamamida **5** se logró mediante la condensación entre diversas bencilaminas (o *N*-2-furilmetilamina) y ácido *trans*-cinámico, empleando

tolueno anhidro como disolvente y haciendo uso de las bondades catalíticas del ácido bórico (H_3BO_3) en procesos que conducen a la formación de amidas a partir de ácidos carboxílicos y aminas (Figura 1).

El proceso de condensación (adición-eliminación) realizado se facilitó a través del poder catalítico del ácido bórico; un catalizador económico y además de escaso impacto ambiental. Los rendimientos alcanzados usando esta metodología superaron los previstos, encontrándose un rendimiento promedio cercano al 81%, destacándose el rendimiento cuantitativo para el proceso de condensación de uno de los derivados (compuesto **1**). Todas las cinamamidas obtenidas son sustancias cristalinas, estables y de color blanco (Tabla 1).

Tabla 1. Características físico-químicas de las cinamamidas analizadas.

N-amidas	R	Formula molecular	P.M. ^a (g/mol)	Pf. ^b (°C)	Rend. ^c (%)
1	H	$\text{C}_{16}\text{H}_{15}\text{NO}$	237,12	97	100
2	Me	$\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}$	251,13	119	89
3	OMe	$\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_2$	267,13	110	87
4	Cl	$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{ClNO}$	271,08	155	78
5	-	$\text{C}_{14}\text{H}_{13}\text{NO}_2$	227,26	122	83

^a Peso molecular; ^b Punto de fusión; ^c Rendimiento

Actividad biológica

Los resultados de actividad contra parásitos y células de mamífero se muestran en la Tabla 2. En los ensayos contra *L. chagasi*, la cinamida **3** mostró ser activo contra la forma de promastigotes de *L. chagasi*, sin embargo,

fue inactivo contra la forma intracelular del parásito. El compuesto **2** inhibió amastigotes intracelulares de *L. chagasi* con actividad de CI_{50} 77,76 μM , CI_{90} >100 e IS > 3,85.

Tabla 2. Actividad de las *N*-bencil (2-furilmetil) cinamamidas contra parásitos y células.

Células	Estadios parasitarios	$\mu\text{M} \pm \text{DEV}^c$					Medicamentos de referencia	
		<i>N</i> -Bencil (2-furilmetil) cinamamidas					Nif ^d	AmB ^e
		1	2	3	4	5		
<i>Leishmania chagasi</i>	promastigotes	NA ^f	NA	53,33 $\pm 1,27$	NA	NA	ND ^g	0,05 $\pm 0,0006$
	amastigotes intracelulares	NA	77,76 $\pm 3,46$	NA	NA	NA	ND	0,23 $\pm 0,02$
<i>Trypanosoma cruzi</i>	epimastigotes	3,71 $\pm 0,84$	24,02 $\pm 0,69$	NA	95,09 $\pm 2,84$	38,81 $\pm 3,56$	0,71 $\pm 0,11$	ND
	amastigotes intracelulares	NA	NA	NA	NA	NA	0,71 $\pm 0,20$	ND
Células THP-1	—	NA	NA	NA	NA	NA	ND	25,23 $\pm 1,74$
Células Vero	—	NA	112,86 $\pm 4,74$	NA	65,9 $\pm 5,71$	NA	19,07 $\pm 6,23$	ND

^a Concentración que inhibe 50% de los parásitos, ^b Concentración citotóxica para el 50% de las células, ^c Desviación estándar,

^d Nifurtimox, ^e Anfotericina B, ^f No fue activo, ^g No fue determinado

En los ensayos contra *T. cruzi*, los compuestos **1**, **2** y **5** inhibieron epimastigotes de *T. cruzi* con rangos de actividad de CI_{50} 3,71-38,81 μ M y CI_{90} entre 50,87-59,87 μ M e IS >3 (datos no mostrados). Ningún compuesto fue activo en amastigotes intracelulares a la máxima concentración utilizada de 100 μ M. Esto podría deberse a varios factores uno de ellos, a la incapacidad del compuesto de ser internalizado por la célula hospedera. Un compuesto activo contra las formas intracelulares de un microorganismo tendría que atravesar barreras celulares como la membrana plasmática y la del fagosoma (en el caso de *Leishmania*) diferente a lo que sucede en las formas libres de los parásitos donde el compuesto tendría un efecto directo sobre el parásito.

Los compuestos evaluados no fueron tóxicos para las células THP-1 (CC_{50} >300 μ M). En las células Vero, el compuesto **4** fue parcialmente tóxico (CC_{50} 65,90 μ M, CC_{90} >300).

A pesar del número reducido de moléculas evaluadas, los resultados encontrados son promisorios. Aunque la amida **2** mostró baja actividad en amastigotes intracelulares de *L. chagasi* con valores casi 300 veces mayores que el medicamento de referencia AmB, su actividad igual que la actividad presentada por los compuestos **1**, **2** y **5** contra las formas libres de *T. cruzi*, soportan el diseño de nuevas moléculas relacionadas para ser evaluadas contra estos parásitos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a COLCIENCIAS por la financiación de este trabajo a través del grupo de excelencia CENIVAM (contrato No 432-2004) y a la Universidad Industrial de Santander. LYMM agradece a COLCIENCIAS por su beca.

CONFLICTO DE INTERES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses en la realización de este trabajo

REFERENCIAS

- Kang TS, Jo HO, Park WK, Kim JP, Konishi Y, Kong JY, et al. Synthesis and antioxidant activities of 3,5-dialkoxy-4-hydroxycinnamamides. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; 18: 1663-1667.
- Kristan K, Starčević S, Brunskole M, Rižner TL, Gobec S. Cinnamates and cinnamamides inhibit fungal 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Mol Cell Endocrinol* 2006; 248: 239-241.
- Balsamo A, Crotti P, Lapucci A, Macchia B, Macchia F. Structure-Activity relationship in cinnamamides. synthesis and anticonvulsant activity evaluation of some derivatives of (E)- and (Z)-m-(Trifluoromethyl)cinnamamide. *J Med Chem* 1981; 24: 525-532.
- Gelb MH, Hol WGJ. Parasitology. Drugs to combat tropical protozoan parasites.. *Science* 2009; 294: 343-344.
- Oullette M, Drummelsmith J, Papadopoulou B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* 2004;7: 257-266.
- Croft SL, Seifert K, Yarley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006; 123: 399-410.
- Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *TRENDS in Parasitol* 2003; 19: 495-501.
- Croft SL, Barrett MP, Urbina JA. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *TRENDS in Parasitol* 2005; 21: 508-512.
- Coura JM. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:549-554.
- Sereno D, da Silva AC, Mathieu-Daude F, Ouaisi A. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. *Parasitol Int* 2007; 56:3-7.
- Escobar P, Hernández IP, Rueda CM, Martínez F, Paéz E. Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in *Leishmania* promastigotes. *Biomédica* 2006; 26: 49-56.
- Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *Clin Rev* 2007; 326: 377-382.
- Barajas JG, Vargas LY, Kouznetsov VV, Stashenko EE. Efficient synthesis of new N-Benzyl- or N-(2-Furylmethyl)cinnamamides promoted by the 'Green' catalyst boric acid, and their spectral analysis. *synthesis* 2008; 3: 377-382.
- Luna KP, Jaramillo CL, Gutierrez R, Esteban L, Angulo VM. Aislamiento de *T. cruzi* en pacientes en fase crónica de la enfermedad de Chagas por medio de hemocultivo y xenocultivo. *Biomédica*. 2003; 23:119.
- Luna KP, Jaramillo CL, Hernández G, Gutiérrez R, Vallejo GA, Angulo VM. ITS-RFLP-and RAPD-based genetic variability of *Trypanosoma cruzi* I, human and vector strains in Santander(Colombia). *Parasitol Res* 2009; 105: 519-528.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983; 65: 55-63.