



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS**

TEMA DE TESIS

Síntesis, evaluación biológica y estudios *in silico* de moléculas diseñadas
como híbridos contra *Trypanosoma cruzi*

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. CÉSAR MENDOZA MARTÍNEZ



TUTOR: Dr. Francisco Hernández Luis AÑO: 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A mi familia por ser los responsables de encaminarme en las maravillas de la ciencia, son el motor que me impulsa a seguir.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al Dr. Francisco Hernández Luis por el apoyo incondicional y por compartir su hambre de conocimiento día con día pero principalmente por su amistad. Las palabras no son suficientes para expresarle mi gratitud.

Al Dr. José Correa Basurto porque desde el momento en que decidimos aventurarnos en el diseño de fármacos asistido por computadora ha sido un asiduo mentor y amigo. Gracias por abrirnos las puertas de su laboratorio sin dudar.

Al Dr. Benjamín Noguera Torres por el apoyo recibido en la realización de las pruebas biológicas y por sus valiosas observaciones.

Al Dr. Juan Luis Bautista por ser mi primer mentor en el área de la química, con quien comparto la alegría de haber terminado este trabajo, por su impulso que ha sido crucial en el alcance de este objetivo así como por su amistad que compartimos desde mis años de preparatoriano.

Al Q.F.B. Natanael Zarco Salinas por su apoyo en la realización de este trabajo (parte computacional) pero sobre todo por la gran amistad que ha perdurado a pesar del tiempo.

Al Dr. Rafael Castillo y la M.C. Alicia Hernández por sus enseñanzas y valiosas aportaciones en el desarrollo de este trabajo.

Al personal de la USAI por el apoyo en la realización de los espectros de los compuestos sintetizados en este trabajo y por sus valiosas aportaciones en este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio 122, compañeros de generación, compañeros en el área de computo, profesores y todos aquellos con quienes comparto la dicha de generar conocimiento.

Al consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios de maestría.

Ha todos aquellos que han compartido un momento de su vida con este su humilde servidor, no hay momentos malos y si grandes enseñanzas, MUCHAS GRACIAS.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dr. Manuel Jiménez Estrada
Vocal	Dr. Benjamín Noguera Torres
Vocal	Dr. José Alfredo Vásquez Martínez
Vocal	Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano
Secretario	Dr. Fernando Cortés Guzmán

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 122 del Departamento de Farmacia, Facultad de Química, de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Francisco Hernández Luis y el laboratorio de modelado molecular, Escuela Superior de Medicina, del Instituto Politécnico Nacional a cargo del Dr. José Correa Basurto.

INDICE GENERAL

1. INTRODUCCION	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
2.2.1. Ciclo de vida	2
2.2. Dianas para la búsqueda de antiprotozoarios	5
2.2.1. Dihidrofolato reductasa (DHFR)	5
2.2.1.1. Inhibidores de DHFR	5
2.2.2. Pteridin reductasa (PTR)	10
2.2.2.1. Inhibidores de PTR	11
2.3. Estrategias para el diseño de moléculas biológicamente activas	12
2.3.1. Hibridación molecular	11
2.3.2. Diseño de fármacos asistido por computadora (DiFaC)	13
2.3.2.1. Análisis de secuencias	13
2.3.2.2. Acoplamiento molecular	14
2.3.2.3 La química cuántica en el diseño de fármacos	15
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	16
4.1. Hipótesis	16
4.2. Objetivo general	16
4.3. Objetivos particulares	16
5. METODOLOGÍA	17
5.1 Consideraciones para el diseño de los híbridos	17
5.1.1. Dianas protozoarias seleccionadas	18
5.1.2. Moléculas de interés en el diseño	18
5.2. Síntesis de los híbridos propuestos	22
5.2.1. Síntesis del fragmento A	22
5.2.2. Síntesis de híbridos	22
5.2.2.1. Síntesis de 1 y 2	23
5.2.2.2. Síntesis de 3	24
5.2.2.3. Síntesis de 4	24

5.2.2.4. Síntesis de 5 y 6	24
5.3. Evaluación biológica	26
5.4. Estudios <i>in silico</i>	26
5.4.1 Elección de las estructuras cristalográficas de las proteínas	26
5.4.2. Alineamientos de secuencia y graficas tridimensionales	26
5.4.3. Estudios para el acoplamiento molecular (docking)	27
5.4.3.1 Preparación del ligando	27
5.4.3.1.1. Análisis tautomérico de triaminquinazolina (TAQ)	27
5.4.3.1.2. Análisis de las moléculas propuestas para el acoplamiento molecular	27
5.4.3.2. Preparación de la proteína	28
5.4.3.3. El acoplamiento molecular (<i>docking</i>)	28
6. RESULTADOS Y DISCUSION	29
6.1 Síntesis y caracterización estructural de los híbridos diseñados.	29
6.1.2 Síntesis de híbridos	32
6.1.2.1 Síntesis del hibrido 2 y su caracterización	33
6.1.2.2 Síntesis del hibrido 3 y caracterización	34
6.1.2.2. Síntesis del hibrido 4 y caracterización	35
6.1.2.2 Síntesis del hibrido 5 y caracterización	36
6.1.2.1 Síntesis del hibrido 6 y su caracterización	37
6.2 Parte biológica	38
6.2.1. Pruebas biológicas sobre <i>T. cruzi</i>	38
6.3. Resultados de la parte computacional.	40
6.3.1 Alineamiento de secuencias	40
6.3.2. Estabilidad de tautómeros de triaminquinazolina (TAQ)	44
6.3.3. Acoplamiento molecular (<i>Docking</i>)	50
6.3.4. Análisis de los ligandos	58
7. CONCLUSIONES	65
BIBLIOGRAFIA	67
APÉNDICE I. Parte experimental	71
APÉNDICE II. Pruebas de actividad biológica	79
APÉNDICE III. Espectros	81

RESUMEN

Las enfermedades parasitarias se encuentran ampliamente distribuidas en el planeta, y son un problema de mucha importancia en los países subdesarrollados. Algunas de estas enfermedades son consideradas de primera importancia por la OMS. La enfermedad de Chagas es una de ellas, la cual es causada por un protozooario llamado *Trypanosoma cruzi*. Que entra al cuerpo humano a través de la contaminación con heces de la chinche besucona (vector). Los dos estadios del parásito en el hombre son el tripomastigote y el amastigote (intracelular). Debido a que es una enfermedad sistémica, el tratamiento se dificulta. Esto se complica puesto que existen muy pocos fármacos para su tratamiento, algunos de ellos introducidos hace más de 40 años en la terapéutica. Existen otros problemas de importancia, y consisten en la resistencia que estos organismos han desarrollado y en los severos efectos adversos de los fármacos de elección, por lo que hace necesaria la búsqueda de nuevos agentes antiparasitarios. En este trabajo se diseñaron, sintetizaron y evaluaron tanto *in silico* como *in vitro* una serie de 6 moléculas híbridas. Para el diseño se tomaron como base moléculas con actividad antiprotozoaria. En particular, todos los compuestos poseen la entidad química “quinazolina” como base. Estos compuestos se sintetizaron vía aminación reductiva, utilizando borohidruro de sodio. Se realizaron estudios de alineamiento de secuencia de las siguientes proteínas: dihidrofolato reductasa (DHFR) y pteridín reductasa (PTR) de *T. cruzi*, *L. major* y humano. Estos estudios muestran que la similitud entre PTR de *T. cruzi* y *L. major* es muy alta, y que DHFR de *T. cruzi* y humano difieren considerablemente tanto en el sitio activo como en toda la secuencia en general. Se realizaron estudios de acoplamiento molecular (*docking*) los cuales confirman lo anterior. Así mismo fue posible obtener un modelo generado del *docking* que se relaciona con la actividad biológica experimental. La evaluación biológica se realizó *in vitro* sobre tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* y de acuerdo a los resultados se encontró un compuesto mucho más potente que los fármacos de elección (Nifurtimox y Benznidazol). Interesantemente el derivado más activo sintetizado es un compuesto organometálico. Esto abre nuevas perspectivas en la búsqueda de compuestos antiparasitarios.

1. INTRODUCCION

A pesar de los avances en los diversos campos de la medicina, las enfermedades tropicales constituyen uno de los principales problemas de salud pública en los países que las padecen. El término enfermedades tropicales agrupa los padecimientos infecciosos que prosperan en los climas cálidos y húmedos de algunas regiones de nuestro planeta; ejemplos de estos trastornos son el paludismo y el dengue. Aproximadamente una sexta parte de la población mundial (mil millones de personas) padece alguna de estas enfermedades.¹ Entre todas las infecciones tropicales, la Organización Mundial de la Salud (OMS) considera un subgrupo que denomina enfermedades tropicales desatendidas, debido a que los montos económicos destinados a su investigación por los gobiernos y consorcios farmacéuticos es mucho menor que al de otros padecimientos, aunque alrededor de 500 000 personas en el mundo mueren anualmente por su causa.² En este subgrupo de enfermedades desatendidas se ubican la enfermedad de Chagas, la leishmaniosis, el tracoma, la esquistosomiasis, la filariasis linfática y la oncocercosis.² Las dos primeras causadas por protozoarios, la tercera por una bacteria y las restantes por helmintos. Estudios relacionados con el control de las enfermedades parasitarias predicen que el desarrollo de vacunas y la implementación de estrategias de educación para la salud serán factibles a largo plazo.¹ A corto y mediano plazo, la alternativa para el control de estas enfermedades es la prevención y el tratamiento por fármacos.² En este sentido, la quimioterapia actual para la enfermedad de Chagas no es efectiva y produce efectos secundarios severos. Además, los fármacos utilizados para su tratamiento fueron introducidos a la clínica hace más de veinte años.³ Lo anterior resalta la importancia de la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos contra esta enfermedad.

En este contexto se ubica el presente trabajo de tesis cuyo objetivo fue el diseño, síntesis, evaluación antiparasitaria y estudios *in silico* de moléculas híbridas con el propósito de contar con sustancias activas contra *Trypanosoma cruzi*, agente causal de la enfermedad de Chagas, así como contribuir al conocimiento de los requerimientos estructurales del tipo de compuestos estudiados con relación a la actividad antiprotozoaria que presenten.

2. ANTECEDENTES

Este apartado presenta la información documental que da lugar al planteamiento del problema o que sustenta la hipótesis propuesta en el presente trabajo de tesis. La información esta dividida en tres partes principales. La primera aborda aspectos del protozooario *Trypanosoma cruzi* como agente causal de la enfermedad de Chagas. La segunda trata sobre las enzimas dihidrofolato reductasa (DHFR) y pteridin reductasa (PTR) como dianas protozoarias para la búsqueda de nuevos antiparasitarios. La tercera presenta dos estrategias de la química farmacéutica utilizadas en la búsqueda de nuevos principios activos: la hibridación molecular y el diseño asistido por computadora.

2.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis americana. Es un protozooario flagelado perteneciente a la familia de tripanosomátidos y a la orden kinetoplastida.⁴ Se localiza exclusivamente en el continente americano en donde ha estado presente por más de 9000 años.⁴

La enfermedad de Chagas se transmite al humano por organismos vectores, los cuales son insectos hematófagos principalmente de los géneros *Rhodnius*, *Triatoma* y *Panstrongylus*. Adicionalmente, existen otras rutas de transmisión como son la transfusión sanguínea, el trasplante de órganos y a través de la placenta en mujeres embarazadas.⁴ De acuerdo con reportes de la OMS las tasas de mortalidad por esta enfermedad varían de 8 a 12% dependiendo del país encuestado, tratamiento aplicado, edad y estado de salud de los pacientes. Estudios recientes mostraron que hay aproximadamente 200 000 nuevos casos y 21 000 muertes anuales asociadas con la enfermedad de Chagas.⁵ Este padecimiento está presente principalmente en zonas rurales tropicales y subtropicales, con altitudes por debajo de los 1380 m sobre el nivel del mar, donde prosperan los insectos que transmiten esta enfermedad.

2.2.1 Ciclo de vida

Para tratar de encontrar una terapia exitosa contra *T. cruzi* es necesario conocer el ciclo de vida del mismo e identificar las etapas que constituyen los puntos claves para

combatirlo. El ciclo de vida se inicia cuando el insecto vector (conocido en nuestro país como chinche besucona) se infecta al ingerir sangre del hombre o mamíferos infectados con el estadio tripomastigote de este protozoo. En el tubo digestivo del insecto, el parásito sufre tres transformaciones que se desarrollan durante 16 a 18 días: esferomastigotes presentes como formas redondeadas en el estómago; epimastigotes ubicados en el intestino y que se multiplican intensamente por división binaria; tripomastigotes metacíclicos que pueden infectar a seres humanos o animales. El parásito parece no causar daño a la chinche,⁶ quien permanece infectada toda su vida que es de un año aproximadamente.⁷ Una de las estrategias para combatir este padecimiento es la eliminación del vector mediante la aplicación de insecticidas en las zonas afectadas. Este procedimiento disminuye la propagación de la enfermedad pero no ayuda a las personas que ya fueron infectadas.

El ciclo de vida continúa cuando los vectores infectados pican nuevamente al hombre o a los animales para succionarles sangre y defecan sobre la superficie corporal de los afectados. Al frotar estas deyecciones sobre la piel contaminan el sitio de la picadura, u otro punto lesionado, donde los parásitos penetran al tejido en forma de tripomastigotes metacíclicos. Los tripomastigotes también pueden llegar a la conjuntiva humana al ser depositados por los insectos en la hendidura de los párpados o por el mismo paciente, quien a través de sus manos contaminadas con heces del insecto, los lleva hasta sus ojos, u otras mucosas, donde los parásitos ingresan directamente.⁶

La infección en el huésped comienza con la penetración de los tripomastigotes metacíclicos en los macrófagos que se encuentran en los tejidos subcutáneos y la dermis. Los parásitos sobreviven a la fagocitosis de los macrófagos ya que escapan del fagosoma antes de la fusión con el lisosoma y se dirigen al citoplasma.⁸ En los macrófagos se transforman en amastigotes y se multiplican activamente por división binaria. Más tarde, se diferencian nuevamente en tripomastigotes los cuales, al destruir al macrófago, se liberan a los espacios intersticiales y al torrente sanguíneo. Esta forma flagelada va a infectar a otras células, particularmente las cardiacas, músculo esquelético y músculo liso donde forman los nidos de amastigotes, repitiendo el ciclo de

infección.⁹ La aparición de los parásitos en la sangre ocurre aproximadamente después de 7 a 14 días de iniciada la infección.

Clínicamente se reconocen dos etapas de esta enfermedad, la aguda y la crónica. La primera dura aproximadamente de 10 a 15 días después de iniciada la infección y se caracteriza por una intensa multiplicación parasitaria en los tejidos (amastigotes) y elevada parasitemia (presencia del parásito en sangre, tripomastigote). La etapa crónica se presenta con un predominio del parasitismo tisular y una mínima parasitemia.⁷

Para el tratamiento de este padecimiento hay dos fármacos indicados e introducidos a la clínica hace más de veinte años, el nifurtimox y el benznidazol.⁹ Recientemente la OMS ha recomendado el uso de un compuesto denominado miltefosina pero aún se espera mayor información sobre su eficacia clínica. El nifurtimox y benznidazol presentan actividad fundamentalmente contra los estadios epimastigotes y tripomastigotes de *T. cruzi* (Fig. 1). Por ello, ambos fármacos se utilizan en el tratamiento de la fase aguda pero no de la etapa crónica de la enfermedad.⁹

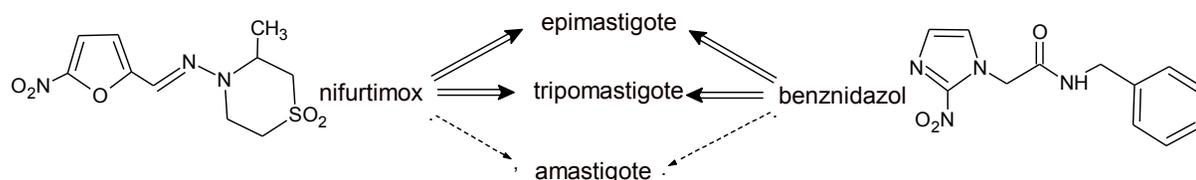


Figura 1. Actividad de benznidazol y nifurtimox sobre estadios de *T. cruzi*

El hecho de contar con dos fármacos, y una tercera molécula en la etapa de desarrollo, constituye uno de los puntos cruciales de la problemática para quimioterapia de esta enfermedad. Es conocido que los organismos patógenos tienden a evolucionar en especies resistentes a los fármacos utilizados para su erradicación; *T. cruzi* no es la excepción, por lo que es necesario la búsqueda de nuevas moléculas con actividad contra este protozooario y tenerlas disponibles cuando dicho parásito genere resistencia contra los fármacos existentes.

Otro problema que dificulta los avances en el tratamiento lo constituye el hecho de que actualmente se tienen distintas cepas de *T. cruzi* con diferentes sensibilidades a los dos

fármacos mencionados. En Sudamérica se encuentran las cepas Tulyuhuen, Y y CLBrenner (Tabla 1).¹⁰ En nuestro país se encuentran las cepas NINOA, INC-5 y Nayarit, obtenidas de pacientes con la enfermedad de Chagas crónica.

Tabla 1. Sensibilidad de cepas Sudamericanas de *T. cruzi* a nifurtimox y benznidazol

Fármaco	<i>T. cruzi</i> (epimastigote) (CI ₅₀ μM)		
	Cepa Y	Cepa Tulahuen	Cepa CL Brener
nifurtimox	9.7	7.7	4.9
benznidazol	ND	4.5	ND

ND: no determinado

2.2. Dianas para la búsqueda de antiprotozoarios

En la actualidad existen diversas estrategias utilizadas para el descubrimiento de nuevas moléculas con perspectivas de ser utilizadas en el tratamiento de la enfermedad de Chagas. Una de ellas deriva del conocimiento de enzimas cuya inhibición comprometa la vida del protozoario pero no afecte al hospedero.¹¹ Dos enzimas que se ubican en este contexto son la dihidrofolato reductasa y la pteridin reductasa.

2.2.1. Dihidrofolato reductasa (DHFR)

La DHFR es una enzima que se encuentra en células eucariotas donde es clave en la síntesis de timina (base nitrogenada del ADN).¹² El papel que desempeña la DHFR en esta ruta metabólica es la reducción del ácido dihidrofólico al ácido tetrahidrofólico (Fig. 2). Es una enzima NADPH dependiente y el sitio de unión al ácido dihidrofólico es muy cercano al de este cofactor. La estructura cristalizada de la enzima ha sido publicada para *T. cruzi*, *Leishmania major* y *Plasmodium vivax*. A diferencia de la DHFR humana, la enzima de los parásitos es dimérica y esta ligada a timidilato sintasa.

2.2.1.1. Inhibidores de DHFR

Existen varios estudios publicados sobre el desarrollo de inhibidores de la DHFR con la finalidad de ser utilizados como antineoplásicos, antibacterianos, antiparasitarios o antiartríticos.^{13,14} Entre los fármacos que actúan de esta forma se encuentran la pirimetamina (antipalúdico), trimetoprima (antibacteriano), cicloguanilo (antipalúdico)

descontinuado) y metotrexato (antineoplásico, antiartrítico y activo contra *T. cruzi*) (Fig. 3). El problema fundamental con estas moléculas es su baja selectividad ya que inhiben a la DHFR humana y a la de otros organismos, por lo que presentan problemas de toxicidad a concentraciones terapéuticas.¹⁵

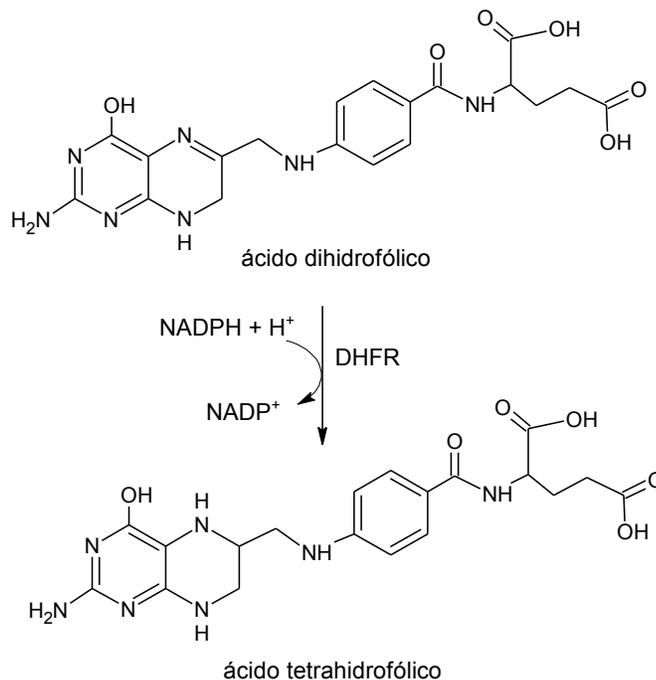


Figura 2. La dihidrofolato reductasa y la reducción del ácido dihidrofólico

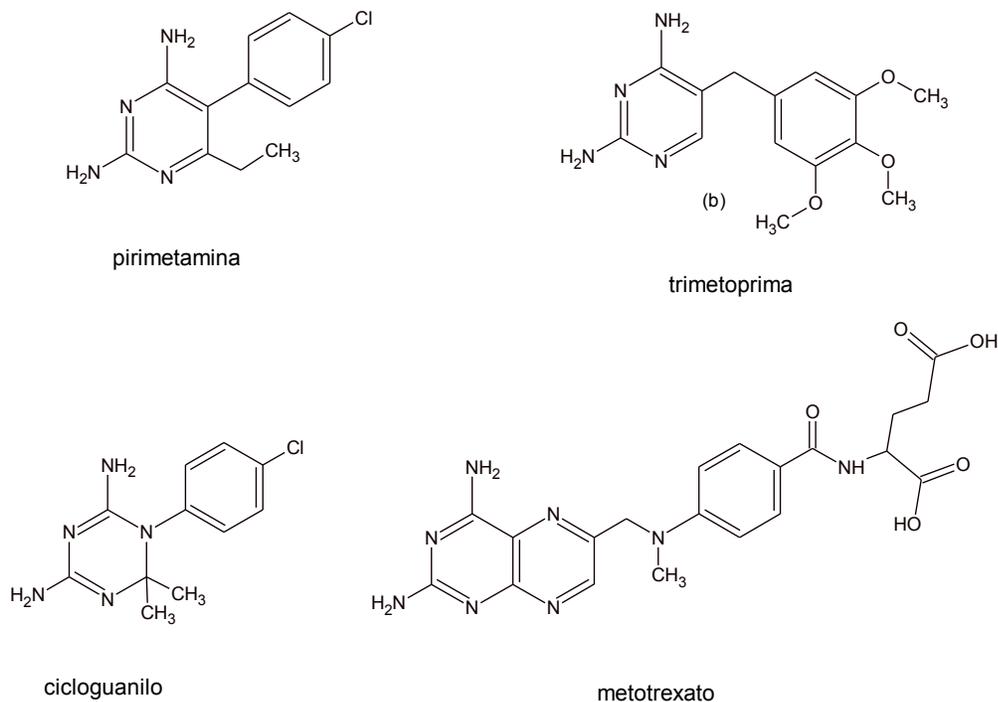


Figura 3. Fármacos inhibidores de la dihidrofolato reductasa.

Por ello se han diseñado numerosos inhibidores con la intención de contar con moléculas de mayor selectividad. De los grupos con mayor éxito en este sentido son algunos derivados de la 2,4-diaminopirimidina, 2,4-diaminopteridinas y 2,4-diamino[1,4]dioxino[2,3-*d*]pirimidina. Mención particular es para la triaminquinazolina (TAQ) por la selectividad mostrada hacia células neoplásicas (Fig. 4).³

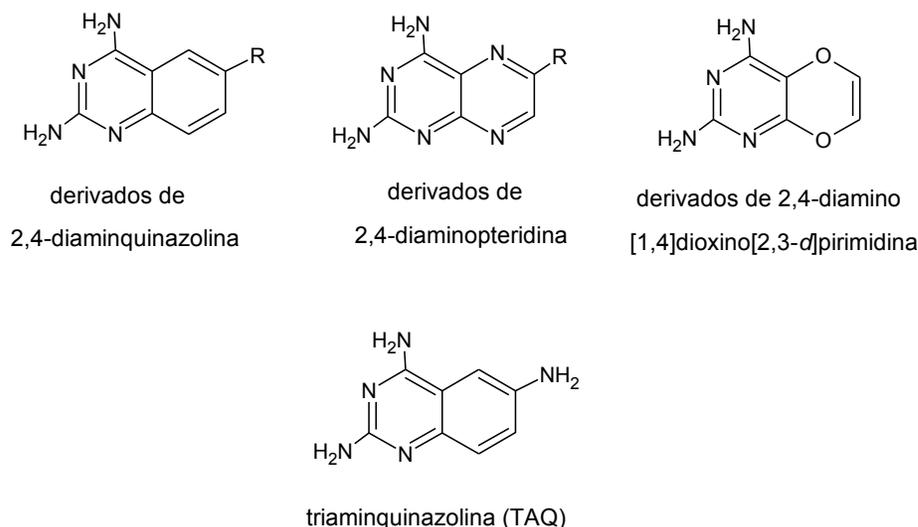
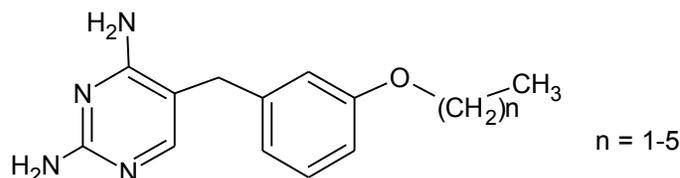


Figura 4. Inhibidores de DHF con mayor selectividad antitumoral.

Para el caso de inhibidores de la DHFR de protozoarios se tiene como antecedente el trabajo de Sirawaraporn et. al en la década de los 80's cuando reportaron el hallazgo de inhibidores selectivos pero poco potentes contra *T. cruzi*, *L. donovani* y *L. major*.¹⁶ Desde entonces, muchos grupos se dieron a la tarea de optimizar la actividad biológica y la selectividad de los inhibidores reportados. Entre estos trabajos podemos citar al realizado por Combs et al., quienes sintetizaron y probaron contra promastigotes de *L. mexicana* una serie de 2,4-diaminopirimidinas 5-substituidas (Fig. 5) que inhibieron a la DHFR de este parásito con valores de CI_{50} de 0.2–2 μ M (CI_{50} : concentración inhibitoria media). Chowdhury et al., evaluaron in silico esa serie de compuestos y encontraron que para alcanzar una actividad optima de inhibición era necesario que el sustituyente alquilo presentara de 2 a 6 átomos de carbono. Además, basados en sus estudios de acoplamiento molecular, propusieron que esta cadena era la que le podría conferir selectividad de acción a los compuestos en un orden de hasta 250 veces sobre la

enzima humana.¹⁷ La explicación radica en que las cadenas alquílicas interactúan en con el aminoácido fenilalanina 88 (Phe88) del sitio activo de la enzima de *T. cruzi* y el cual es sustituido por la asparagina 64 en la enzima humana (Fig. 6). Mediante este estudio se hizo evidente que era posible diseñar inhibidores altamente selectivos hacia la enzima del parásito. La selectividad de acción se representa como la relación CI_{50} parásito/ CI_{50} humana.



L. major (promastigote) $CE_{50} = 5.6 \mu\text{M}$
L. donovani (amastigote) $CE_{50} = 4.6 \mu\text{M}$, selectividad 30
T. cruzi (amastigote) $CE_{50} = 3 \mu\text{M}$

Figura 5. Inhibidores reportados por Sirawaraporn et. al.

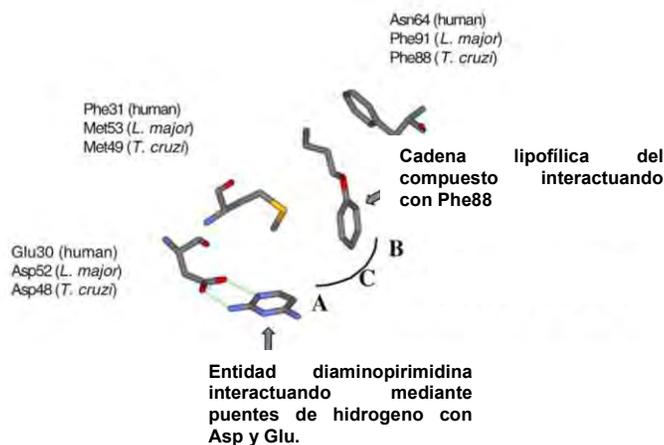
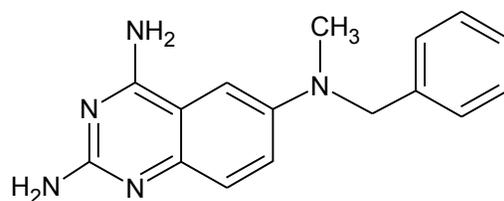


Figura 6. Estudios in silico de Chowdhury, et al., que muestran la interacción con Phe88.

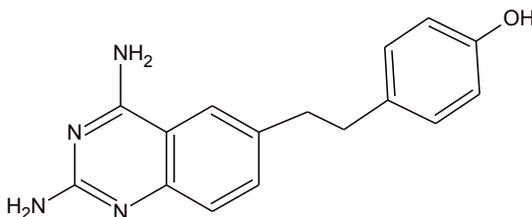
Otro trabajo interesante fue el realizado por Berman et al., quienes sintetizaron 2,4-diaminoquinazolininas (Fig. 7) las cuales fueron evaluadas contra promastigotes de *L. mexicana* y amastigotes de *L. major*.¹⁸ Este trabajo marcó una pauta para utilizar derivados de quinazolinina como inhibidores de la DHFR parasitaria.



L. major (amastigotes) $CE_{50} = 0.025 \mu\text{M}$
L. mexicana 80% de inhibición de DHFR a $0.27 \mu\text{M}$

Figura 7. Derivados de 2,4-diaminoquinazolina.

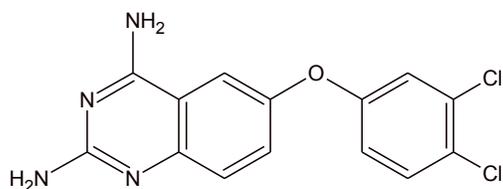
Para tratar de profundizar en el estudio de derivados de quinazolina, Gilbert et al., informaron sobre la selectividad que mostraron un grupo de este tipo de compuestos sobre *T. cruzi*, *T. brucei* y *L. donovani*. Con base en estudios in silico propusieron que las moléculas con cadena alquílica eran las más selectivas, aunque no explicaron porque uno de sus derivados, que se muestra en la Fig. 8, presentó mejor selectividad para los tripanosomas que para *Leishmania* a pesar de no tener una cadena alquílica, sino un grupo fenólico.¹⁹



T. brucei rhodesiense $CI_{50} = 0.54 \mu\text{M}$; selectividad 12
T. cruzi $CI_{50} = 0.078 \mu\text{M}$, selectividad 8
L. donovani $CI_{50} = 79 \mu\text{M}$, selectividad 0.001

Figura 8. 2,4-diaminoquinazolina antiprotoozarias.

Un trabajo complementario al anterior fue el realizado por Hardy et al., quienes sintetizaron derivados de la 2,4-diaminoquinazolininas con la presencia de átomos de cloro para tratar de incrementar las interacciones hidrofóbicas con el receptor. El compuesto con mejor selectividad y actividad contra *L. major* se presenta en la Fig. 9.²⁰



L. major (promastigote) $CE_{50} = 0.41 \mu\text{M}$, selectividad 9

Figura 9. Derivado 2,4-aminoquinazolina clorado.

El trabajo más reciente con 2,4-diaminoquinazolinonas sobre DHFR de *T. cruzi* fue llevado a cabo por Chattopadhyay et al., quienes realizaron estudios QSAR y de acoplamiento molecular. En este trabajo nuevamente se encontró que la selectividad hacia el parásito versus la enzima humana, esta dada por la fenilalanina (Phe88) mencionada anteriormente.²¹

2.2.2. Pteridin reductasa (PTR)

Pteridin reductasa es una enzima relacionada con DHFR, ambas son oxido-reductasas y NADPH dependientes; sin embargo el sustrato natural de PTR es la pterina.²² En condiciones en donde DHFR se encuentra disminuida en su actividad, la PTR es capaz de convertir al ácido dihidrofólico en ácido tetrahidrofólico. Esto significa que aunque exista un inhibidor potente de DHFR no garantiza que la célula en cuestión muera, puesto que posee la alternativa metabólica de utilizar la PTR.²³ Los sustratos de DHFR y PTR están estructuralmente relacionados entre si, lo que resulta comprensible porque una de ellas puede sustituir a la otra en algún momento de la vida celular (Fig. 9). La PTR sólo ha sido localizada en los parásitos del género *Leishmania* y *Trypanosoma*. Las investigaciones han mostrado que la DHFR se encuentra en mayor proporción con respecto a PTR, aunque esta relación se modifica dependiendo del estadio en el cual se encuentre el parásito. Esta presencia es importante dado que ambas enzimas funcionan tanto en el estadio tripomastigote como en el amastigote; de allí que los inhibidores a estas macromoléculas pueden actuar tanto en la etapa aguda como en la crónica de la infección por *T. cruzi*. Actualmente ya se ha reportado la cristalografía de rayos X para la PTR de *L. major* y *T. cruzi*. En este último caso se descubrieron dos isoenzimas, las cuales se nombraron como PTR1 y PTR2.²⁴ Aunque ambas isoenzimas presentan el mismo sitio activo, su diferencia funcional no esta todavía clara.

2.2.2.1. Inhibidores de PTR

Los estudios de inhibidores de PTR son escasos, debido a que no es una enzima muy conocida. A partir del conocimiento de que PTR puede sustituir a la DHFR y que es una de las causas de la resistencia observada por los parásitos a los antifolatos, se han comenzado a desarrollar trabajos dirigidos a la búsqueda de moléculas capaces de inhibir conjuntamente a PTR y a DHFR.^{25,26} Estos estudios no han arrojado resultados alentadores debido a que se encuentran inhibidores a solo una de las dos enzimas. Sin embargo se mantiene el interés dado que los estudios cristalográficos indican que el sitio activo de PTR en *T. cruzi* y de *L. major* son prácticamente iguales, por lo que se espera que los inhibidores puedan actuar sobre ambos parásitos.

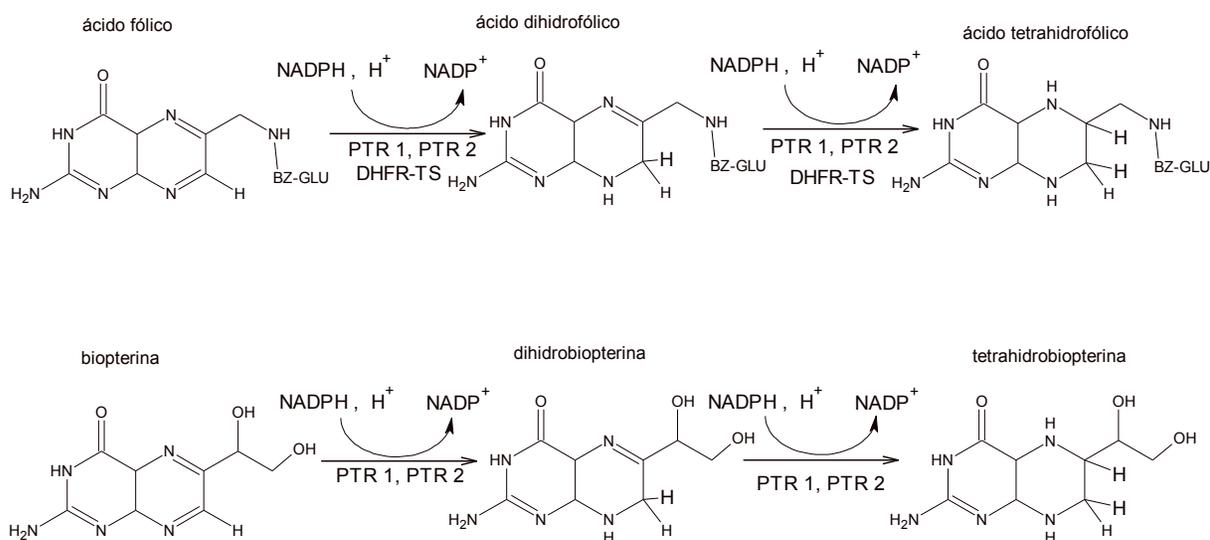


Figura 10. Sustratos y funciones de dihidrofolato reductasa (DHFR) y pteridin reductasa (PTR).

2.3 Estrategias para el diseño de moléculas biológicamente activas

En el campo de la química farmacéutica existen numerosas formas de buscar moléculas activas.²⁷ Dos de ellas son la hibridación molecular y el diseño de fármacos asistido por computadora.

2.3.1. Hibridación molecular

Las moléculas híbridas están constituidas por dos porciones estructurales o moléculas de principios activos. Dado que estos componentes estructurales son capaces de

desencadenar respuestas biológicas por mecanismos distintos, se dice que los híbridos son de acción dual. La calificación de híbrido sólo se aplica a moléculas constituidas por componentes diferentes. Cuando los componentes son los mismos se denominan gemelos. En ambos casos, las porciones estructurales pueden estar juntas, traslapadas o unidas por una cadena generalmente de tipo hidrocarbonada a manera de conector (linker)(Fig. 11).

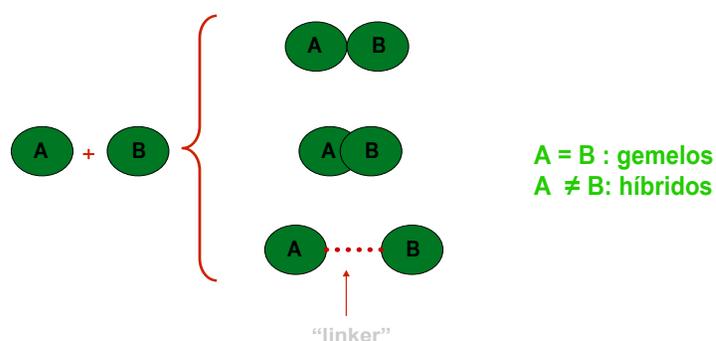
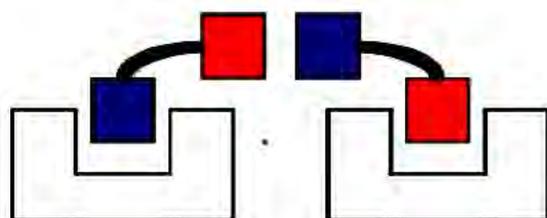
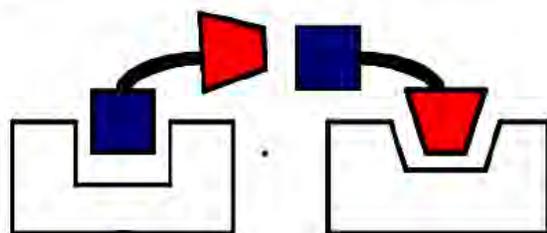


Figura 11. Diferencia entre híbridos y gemelos

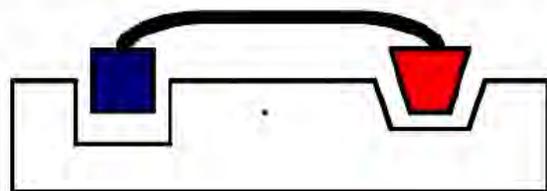
Dado que las dianas biológicas o blancos farmacológicos sobre las que actúan los compuestos híbridos pueden estar o no relacionadas es necesaria una clasificación mecánica de este tipo de compuestos.²⁸ Esto da lugar a tres tipos de híbridos que se presentan en la Fig. 12.



Tipo A: Una sola diana
(Ambas entidades interactúan en el mismo sitio de la diana)



Tipo B: Dos dianas independientes
(Las dos entidades de la molécula híbrida actúan en dianas independientes)



Tipo C: Dos sitios de la misma diana
(Las dos entidades de la molécula híbrida actúan al mismo tiempo)

Figura 12. Tipos de híbridos.

En la literatura se mencionan diversas moléculas que se han desarrollados como moléculas híbridas^{29,30} Entre ellas se encuentra el compuesto experimental wr207 con actividad antipalúdica mayor que los componentes que la integran.²⁹

2.3.2. Diseño de fármacos asistido por computadora (DiFaC)

El diseño de fármacos asistido por computadora es un área de la química farmacéutica que consiste en aplicar algún procedimiento realizado por una computadora para relacionar la actividad biológica de una molécula con su estructura. Los objetivos de este tipo de estudios son descubrir nuevos estructuras prototipos (lead), optimizar prototipos descubiertos, seleccionar un candidato de un de un grupo de moléculas y explicar la actividad de un grupo de compuestos.³¹

Esta área de la química farmacéutica requiere del conocimiento de las herramientas computacionales ya existentes, tales como aquellas que permiten analizar la secuencia de aminoácidos de una proteína o la secuencia de nucleótidos del cual proviene. Por otra parte, también existen herramientas computacionales que nos permiten tener una visualización del receptor y de la forma en que un ligando interactúa con el mismo. Esto es conocido como acoplamiento molecular o "*docking*". Otra área de aplicación es el análisis cuantitativo estructura-actividad (QSAR) bidimensional o tridimensional, lo cual permite conocer los requerimientos estructurales de una serie de moléculas con base a sus propiedades moleculares (descriptores) aplicando un análisis estadístico.³² En los apartados siguientes se aborda solamente el análisis de secuencias y el acoplamiento molecular.

2.3.2.1 Análisis de secuencias

Esta herramienta permite analizar y comparar una serie de secuencias ya sea de una cadena de nucleótidos o aminoácidos.^{33,34} Para ello existe varios programas basados en diferentes algoritmos.

Este análisis ha sido importante en las dianas moleculares (proteínas) de interés en el campo de los antiparasitarios porque ha servido para buscar diferencias entre las especies de las cuales provienen y con ello incrementar la selectividad de acción de los ligandos. Los datos que se obtienen de estos estudios son:

- Identidad: es el número de aminoácidos idénticos en dos o más secuencias proteicas. Se expresa en porcentaje.
- Consenso: es el resultado del alineamiento de las secuencias en el que se toma en cuenta tanto la identidad como la similitud (número de aminoácidos que se puedan comportar de una forma semejante por sus propiedades de liposolubilidad, acido-base, polaridad, etc). Se expresa en porcentaje

2.3.2.2. Acoplamiento molecular.

El acoplamiento molecular o “docking” es una herramienta que permite aproximar, de manera teórica, la interacción ligando-receptor. Nos permite entender los factores estructurales que pueden ser importantes en la interacción de un fármaco con una macromolécula endógena. Existen varios programas para este fin, tales como Golden, Autodock y Flex.³⁵

En todos ellos se utilizan varias aproximaciones. Una de ellas es la consideración del receptor flexible sólo en su sitio activo o rígido en su totalidad; esta última a pesar de haber sido demostrado ser de utilidad, provoca una gran restricción a la alta movilidad de los sistemas biológicos.³⁶

Por otra parte, actualmente los ligandos se tratan con movilidad en ciertos enlaces, lo que le permite tener mas grados de libertad y con ello encontrar una conformación optima en la interacción con la macromolécula.³⁷ Es importante mencionar que los estudios de *docking* usan un sistema de búsqueda y un método de cálculo de energía de unión. El sistema de búsqueda más usados por Autodock es el genético Lamarkiano y el cálculo de energía se hace con métodos parametrizados.

Anteriormente, la evaluación de la interacción se realizaba desde un punto de vista geométrico. Sin embargo este procedimiento no considera las fuerzas de interacción tales como enlaces de hidrógeno y fuerzas Van der Waals.³⁸ La tendencia actual en la mayoría de los paquetes computacionales es usar funciones para la evaluación de la energía de unión presentándola como la energía libre de Gibbs. Estas funciones están parametrizadas con datos experimentales, es decir son campos de fuerza que han demostrado ser de mucha utilidad. Desafortunadamente esto es causa de que se puedan encontrar falsos positivos, por lo que el manejo de los datos obtenidos se debe realizar con cierta discreción.

La función con la que se determina la ΔG es la siguiente³⁹:

$$\Delta G = \Delta G_s + \Delta G_c + \Delta G_i + \Delta G_r + \Delta G_{rt} + \Delta G_v$$

ΔG_s = Energía libre debido al solvente.

ΔG_c = Energía libre por cambio de conformación del ligando y el receptor.

ΔG_i = Energía interna por interacciones específicas ligando-receptor.

ΔG_r = Pérdida de energía libre por congelamiento de las rotaciones internas del ligando y el receptor.

ΔG_{rt} = Pérdida de energía libre rotacional y traslacional por asociación de dos cuerpos (constante).

ΔG_v = Energía libre debido a los cambios en los modos vibracionales (difícil de calcular y generalmente ignorada).

La mayoría de los valores que se colocan en esta ecuación son obtenidos de datos experimentales, por lo que se necesita de una gran base de datos para generar una buena función de evaluación.

2.3.2.3 La química cuántica en el diseño de fármacos

Actualmente existen numerosos estudios en los que se emplea la química cuántica para el diseño de fármacos.⁴⁰ Estos estudios son conocidos como *Ab initio*. Sin embargo aun no son utilizados de forma amplia en la química farmacéutica en parte por el costo computacional que ello implica. Esto es comprensible dado que el diseño requiere abordar sistemas grandes y complejos como los sistemas biológicos. A pesar de esta limitación ha mostrado ser muy útil, por lo que en el futuro se espera que sea la opción más atractiva para el diseño racional de fármacos. La importancia de estos estudios radica en que la interacción fármaco-receptor se realiza a nivel molecular en donde los factores electrónicos juegan el papel más importante y sólo es accesible estudiarlos mediante la química cuántica. En particular la teoría de funcionales de la densidad, cuyos desarrollos están basados en la densidad electrónica de los átomos parece ser la de mayor perspectiva.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Dada la problemática en el tratamiento de la enfermedad de Chagas, causada por *Trypanosoma cruzi*, por los pocos fármacos usados para su tratamiento y la sensibilidad de las diferentes cepas de este parásito a los mismos, ¿existe la posibilidad de utilizar la hibridación molecular como una herramienta de diseño de nuevas estructuras que puedan presentar actividad contra el protozooario antes mencionado?

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. Hipótesis

Si se adicionan a la estructura de la 2,4,6-triaminoquinazolina porciones estructurales de compuestos quimioterapéuticos se tendrán moléculas híbridas contra *T. cruzi* con probable acción sobre las enzimas dihidrofolato reductasa y pteridin reductasa.

4.2. Objetivo general

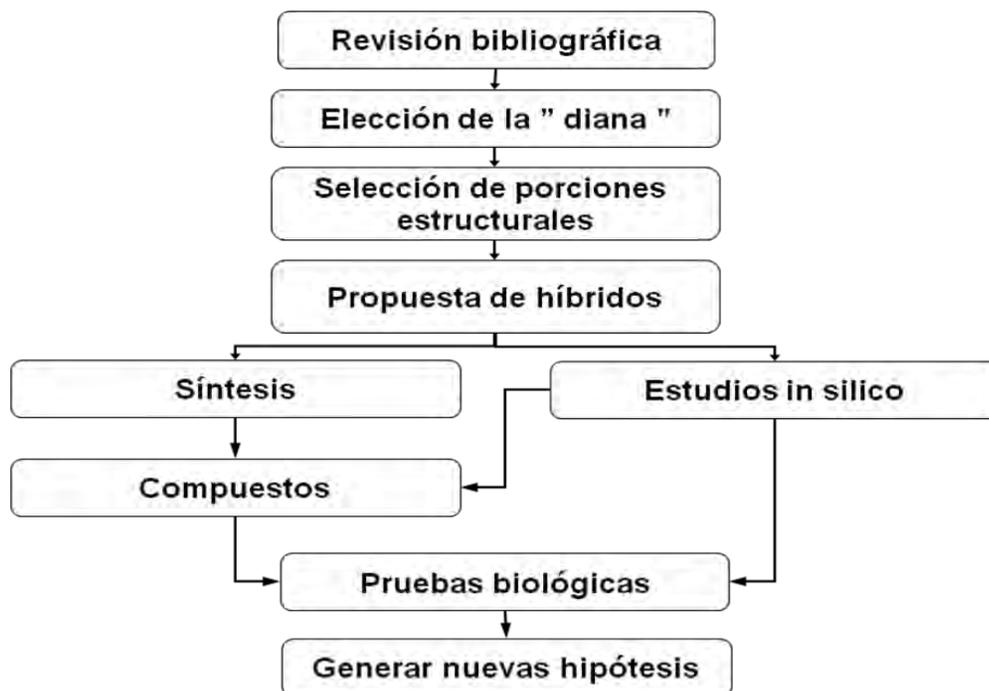
Diseñar, sintetizar, evaluar in vitro y estudiar *in silico* moléculas híbridas de la 2,4,6-triaminoquinazolina con porciones estructurales de compuestos quimioterapéuticos como agentes contra *Trypanosoma cruzi*.

4.3. Objetivos particulares

- Diseñar moléculas híbridas utilizando a la 2,4,6-triaminoquinazolina como estructura base (scaffold) y porciones estructurales que formen parte de moléculas con actividad quimioterapéutica.
- Sintetizar y caracterizar estructuralmente las moléculas híbridas diseñadas.
- Enviar a evaluación biológica contra *T. cruzi* los híbridos obtenidos.
- Realizar estudios in silico de identidad y consenso de las enzimas dihidrofolato reductasa y la pteridin reductasa de especies protozoarias y humana.
- Estudiar el acoplamiento molecular de los híbridos sintetizados con las enzimas dihidrofolato reductasa y pteridin reductasa

5. METODOLOGÍA

Con la intención de alcanzar los objetivos planteados, se llevaron a cabo las siguientes actividades.



5.1 Consideraciones para el diseño de los híbridos

En el diseño se eligió que los híbridos fueran del tipo B (dos dianas independientes) con las características que se muestran en la Fig.13.

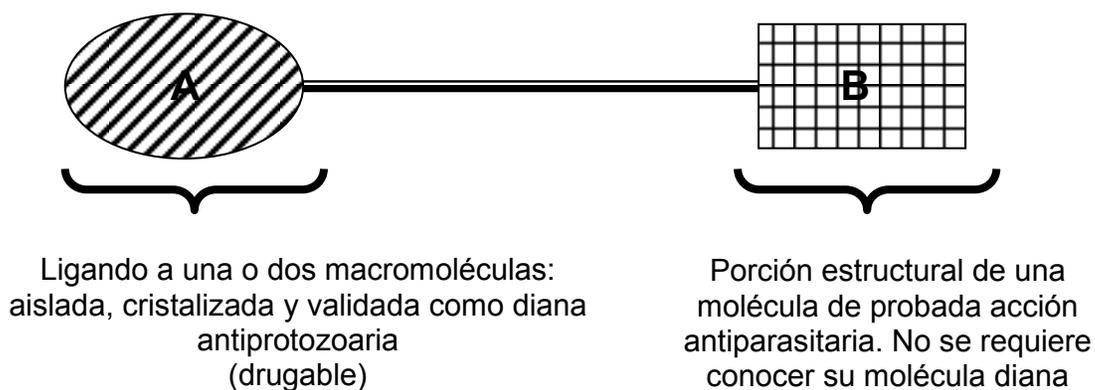


Figura 13. Características del diseño para los híbridos.

5.1.1. Dianas protozoarias seleccionadas

Se eligieron las enzimas DHFR y PTR de *T. cruzi* debido a que se encuentran activas tanto en el estadio tripomastigote como amastigote del parásito y están reportadas como cristales para su estudio por medios computacionales.^{41,42} Además, la DHFR es una diana validada en el campo de la química farmacéutica, dado que su inhibición provoca la muerte de los organismos patógenos.

5.1.2. Moléculas de interés en el diseño

Se realizó una extensa búsqueda en la bibliografía sobre alguna molécula capaz de inhibir a alguna de las dianas antes mencionadas. Se encontró que la 2,4,6-triaminoquinazolina fue co-cristalizada con la PTR de *L. major* (Fig 14).⁴¹ De acuerdo a un análisis de alineamiento el cual se mostrará en los resultados de la parte computacional, se determinó que el sitio activo de la PTR de *L. major* es prácticamente el mismo que el de la PTR de *T. cruzi*. Por ello, se tomó a la 2,4,6-triaminoquinazolina como el fragmento A de los híbridos a diseñar, en espera que esta porción estructural sea la que interactúe con la PTR del protozario en estudio.

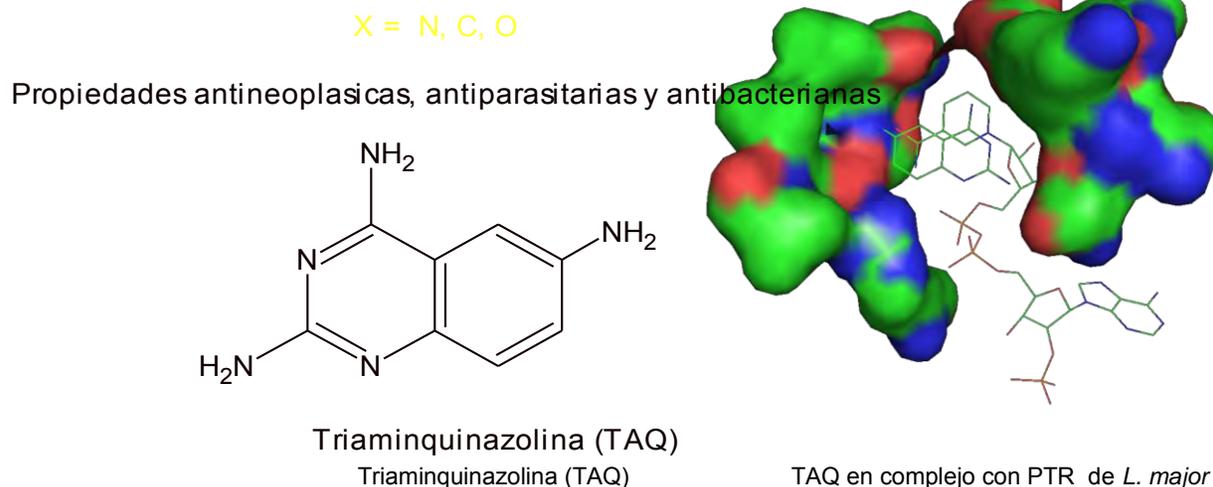


Figura 14. TAQ y pteridin reductasa.

Por otro lado se realizó la búsqueda de moléculas activas contra protozoarios no necesariamente relacionadas con DHFR o PTR para constituir la parte B de cada uno de los híbridos a diseñar. Las moléculas consideradas fueron las siguientes.

a) Nitrobencilo.

Esta porción estructural se ha reportado en algunos trabajos como un grupo que confiere potencia antihelmíntica en las moléculas que lo presentan. El compuesto que se muestra en la Fig. 15, presentó actividad contra dos cepas de cisticercos de *Taenia crassiceps*.⁴³

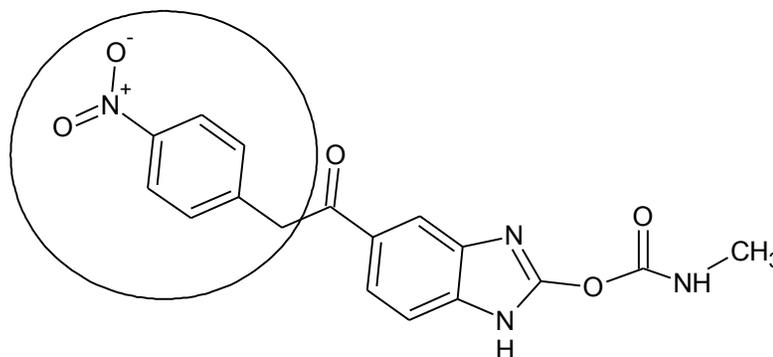


Figura 15. Derivado de nitrobencilo activo biológicamente contra cisticercos.

b) Ferroceno.

Actualmente, existe un amplio campo de la química bioinorgánica que se dedica al estudio de compuestos organometálicos y de coordinación como anticancerígenos, antibacterianos, antiprotozoarios etc. En este campo una molécula que ha generado interés, tanto por su estructura peculiar como por su baja toxicidad, es el ferroceno. Esta molécula ha sido incorporada en algunos compuestos que mostraron actividad contra *Plasmodium falciparum* y *T. brucei*,⁴⁴ resultando en un incremento en la actividad de los derivados obtenidos (Fig 16). Otro ejemplo lo constituye la ferroquina, desarrollada por Sanofi-Aventis como análoga a la cloroquina (antipalúdico de elección), y que se encuentra en las últimas etapas de desarrollo como fármaco antipalúdico (Fig. 17).⁴⁵

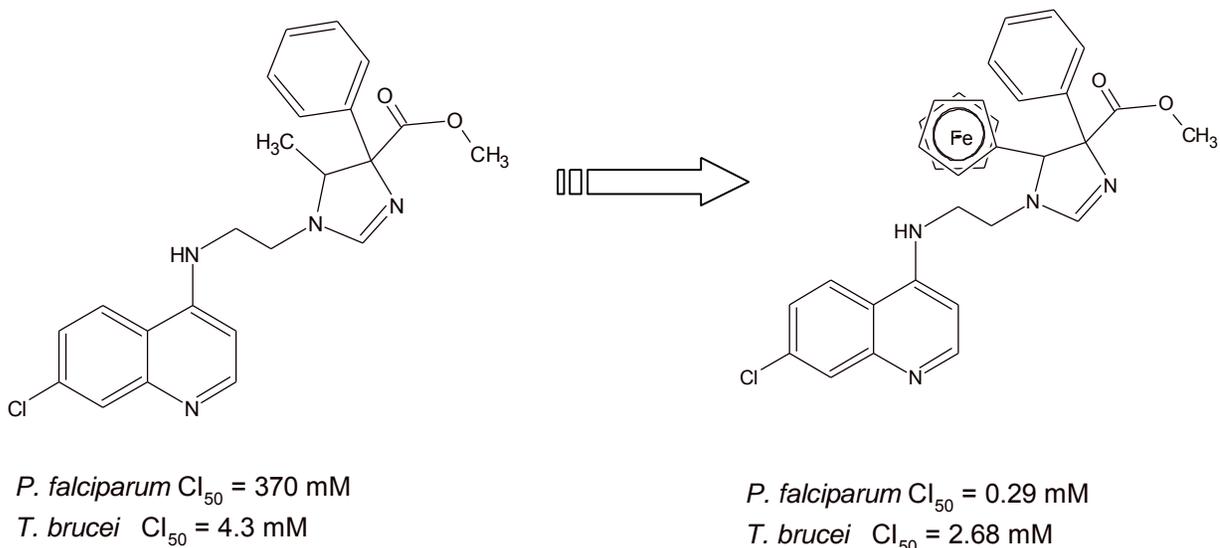


Figura 16. Moléculas experimentales desarrolladas por Chitalu et al.

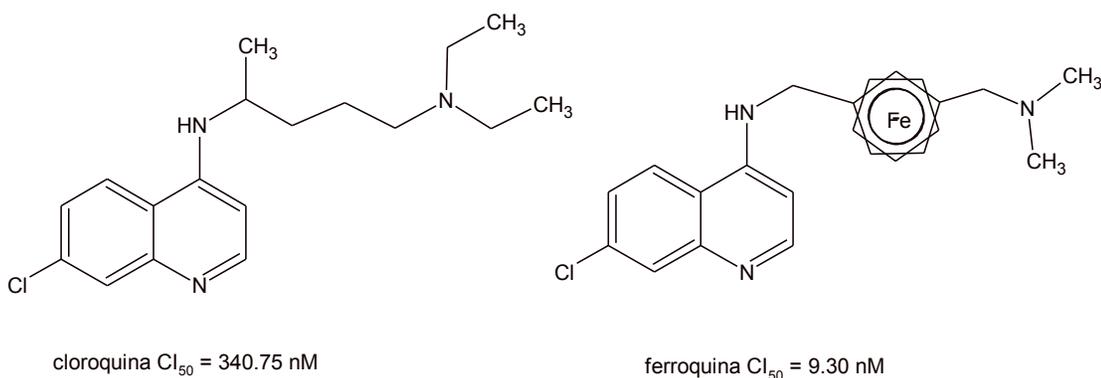
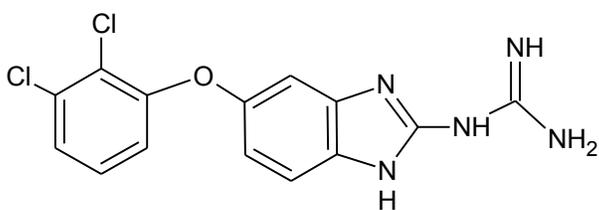


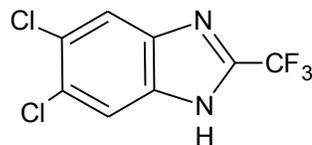
Figura 17. Cloroquina y su análogo con ferroceno contra *Plasmodium falciparum*

c) Bencimidazol.

Dentro de nuestro grupo de investigación se han preparado varios derivados del bencimidazol diseñados como antiprotozoarios.⁴⁶ Algunos de ellos han sido probados en *L. mexicana* que desde un punto de vista genético es la especie más cercana a *T. cruzi*. Dos ejemplos de estos compuestos se muestran en la Fig. 18.



L. mexicana (promastigotes) $CI_{50} = 7 \text{ mM}$



L. mexicana (promastigotes) $CI_{50} = 20.8 \text{ }\mu\text{M}$

Figura 18. Derivados benzimidazólicos leishmanicidas.

5.1.3. Híbridos propuestos.

De acuerdo lo expuesto anteriormente se consideró que tanto el fragmento A como el fragmento B se unieran mediante un conector (linker). Así se propusieron tres moléculas híbridas (Fig. 19). Los híbridos **1** al **4** poseen un metileno como conector, y los híbridos **5** y **6** poseen un fragmento de dos metileno.

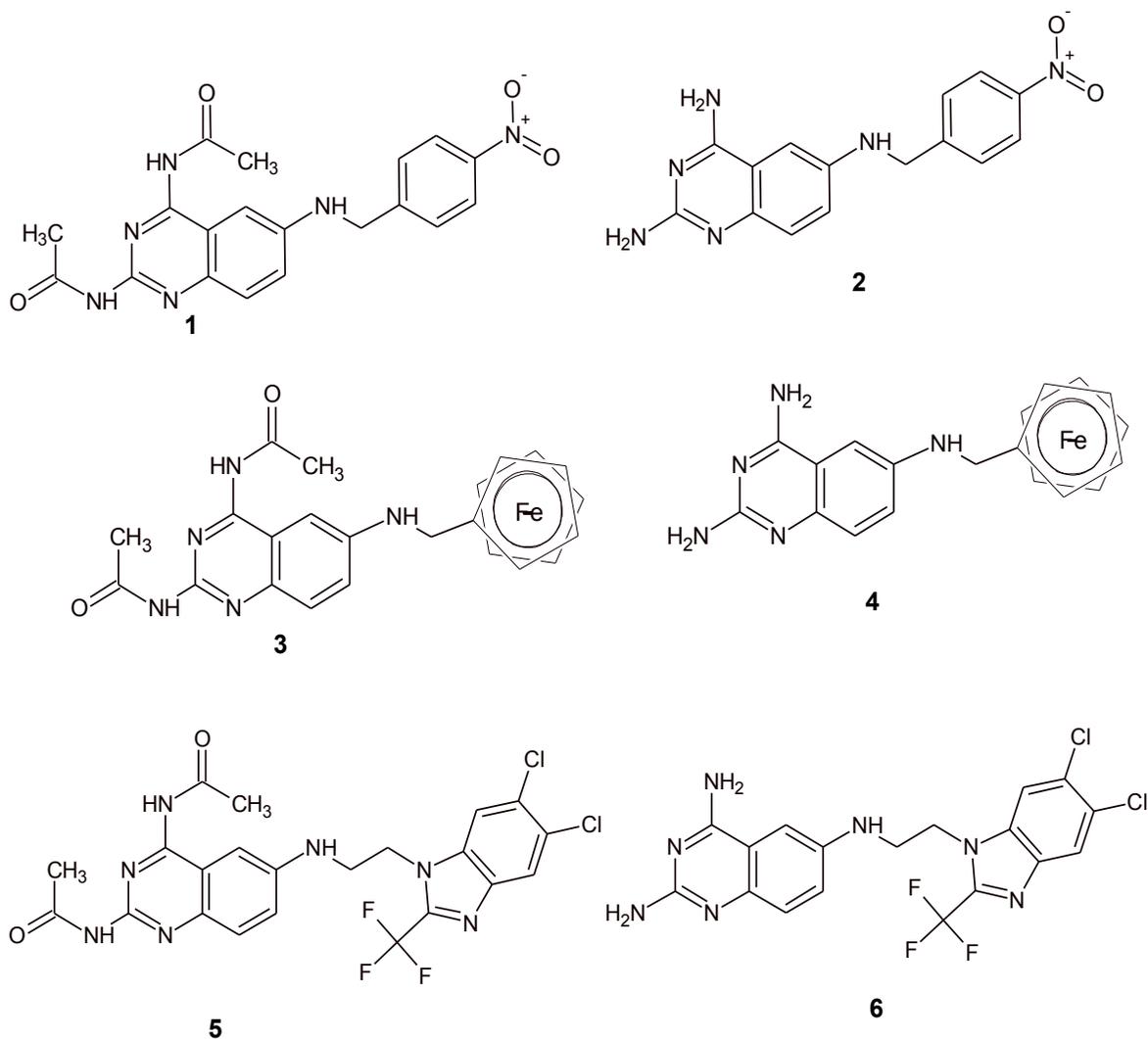


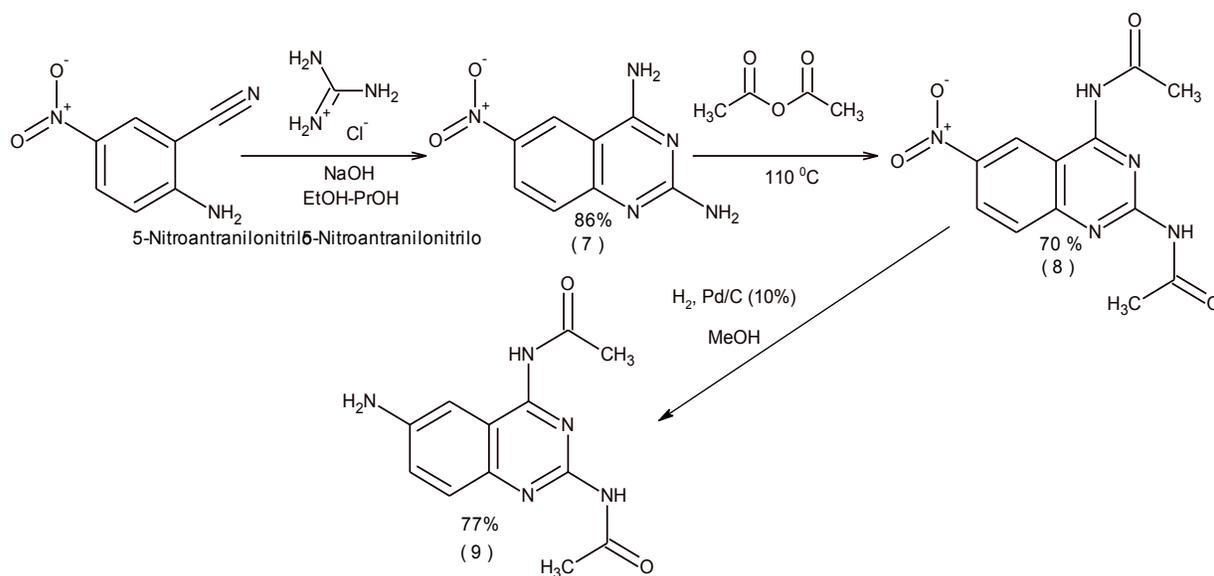
Figura 19. Moléculas propuestas para síntesis

5.2. Síntesis de los híbridos propuestos

5.2.1. Síntesis del fragmento A

Para la obtención de 2,4,6-triaminoquinazolina se estableció la ruta de síntesis partiendo de 5-nitroantranilonitrilo, sin embargo antes de hacer el acoplamiento con la parte B de la molécula, se pensó en colocar algún tipo de grupo protector para permitir cierta libertad de trabajo con la amina en posición 6 de la quinazolina.

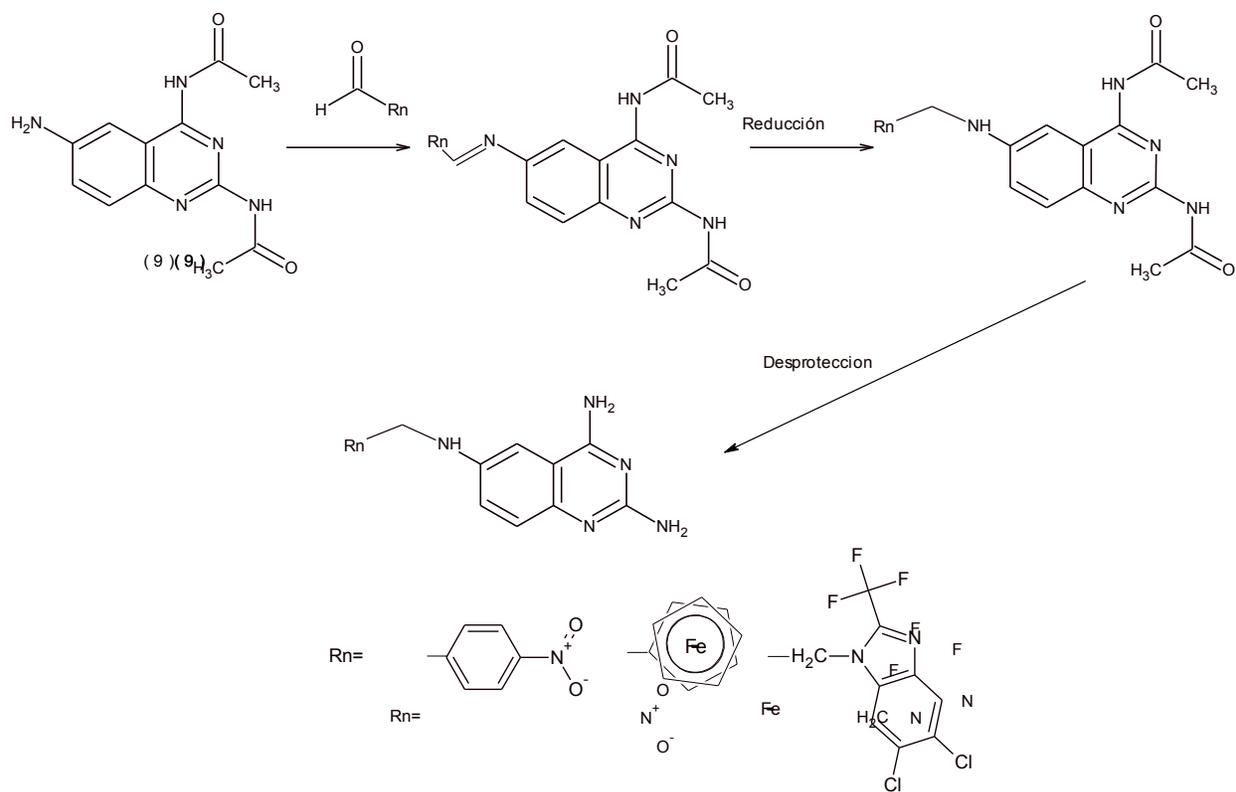
La primera parte de la síntesis del fragmento A se realizó mediante la ciclocondensación del 5-nitroantranilonitrilo con clorhidrato de guanidina en medio básico para obtener **7** (Esquema 1). Este compuesto se acetiló (grupo protector) con anhídrido acético para dar **8**. La hidrogenación catalítica de **8** dio lugar a **9** que se utilizó para la aminación reductiva en la siguiente etapa.



Esquema 1. Síntesis del fragmento A.

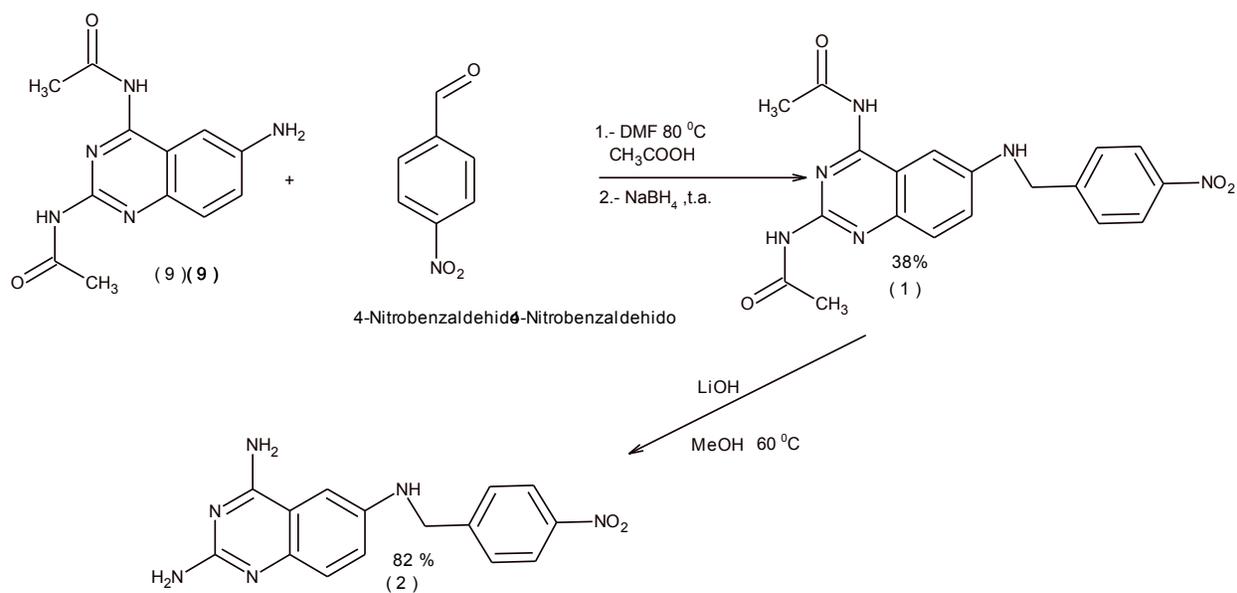
5.2.2. Síntesis de híbridos

Para la preparación de los híbridos se utilizaron dos rutas: vía sustitución nucleofílica bimolecular (ruta 1) y vía aminación reductiva (ruta B). La segunda ruta es la que dio mejores resultados (Esquema 2). Es importante mencionar que en ningún caso se aisló la base de Schiff ya que esta se sometió inmediatamente a la reducción.



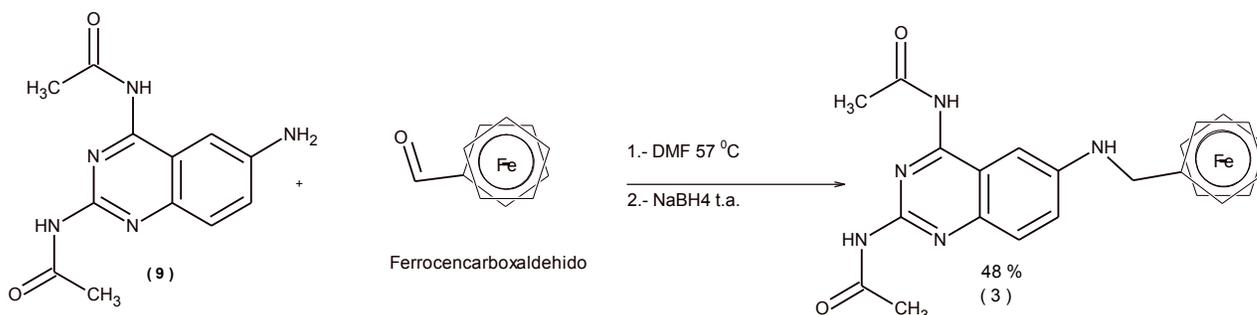
5.2.2.1. Síntesis de **1** y **2**.

La condensación de **9** con 4-nitrobenzaldehido y posterior reducción con borohidruro de sodio dio origen al compuesto **1** el cual posteriormente se desprotegió en condiciones básicas para dar origen al compuesto **2** (Esquema 3).



5.2.2.2. Síntesis de **3**.

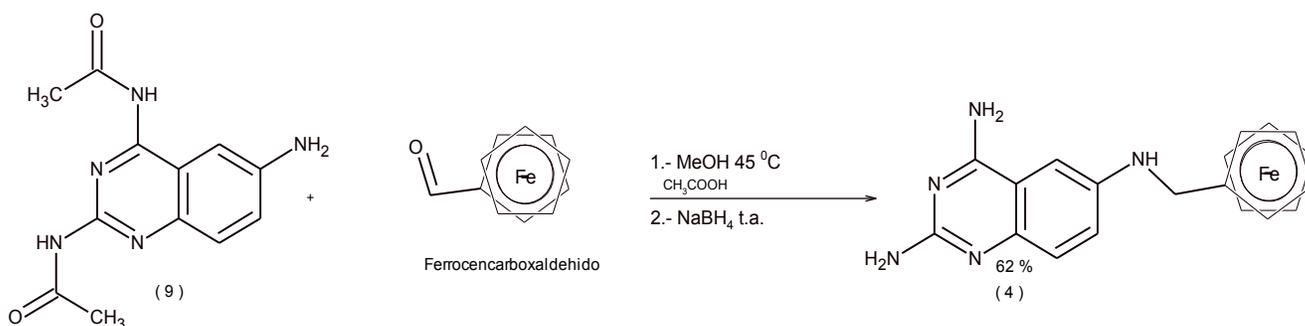
La condensación de **9** con ferrocencarboxaldehído en dimetilformamida y posterior reducción con borohidruro de sodio dio origen al compuesto **3** (Esquema 4).



Esquema 4. Ruta sintética del compuesto **3**.

5.2.2.3. Síntesis de **4**.

La síntesis del compuesto **4** este se realizó con la condensación de **9** con ferrocencarboxaldehído en metanol y catálisis ácida y posterior reducción con borohidruro de sodio (Esquema 5).

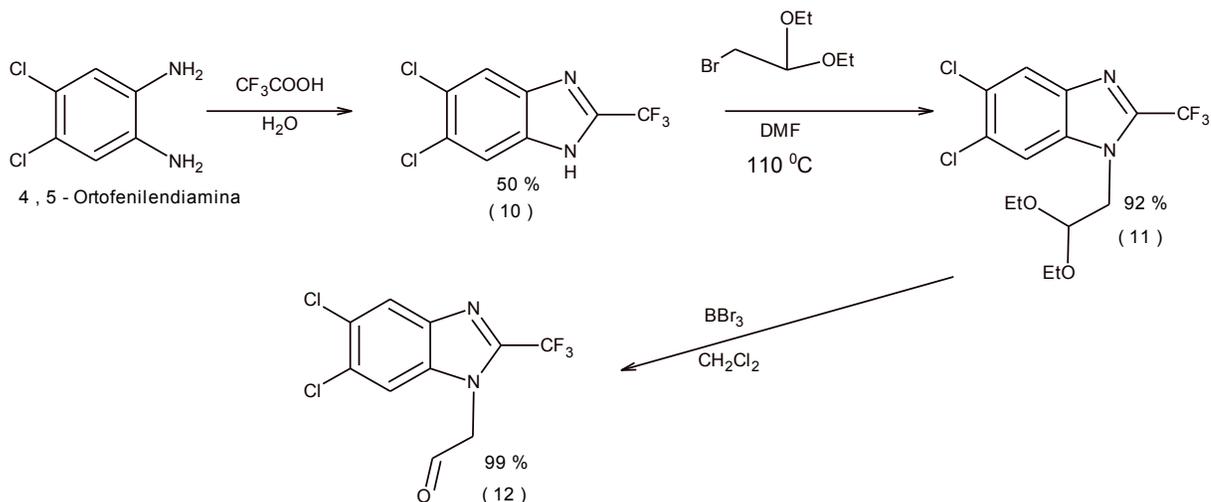


Esquema 5. Ruta sintética del compuesto **4**.

5.2.2.4. Síntesis de **5** y **6**.

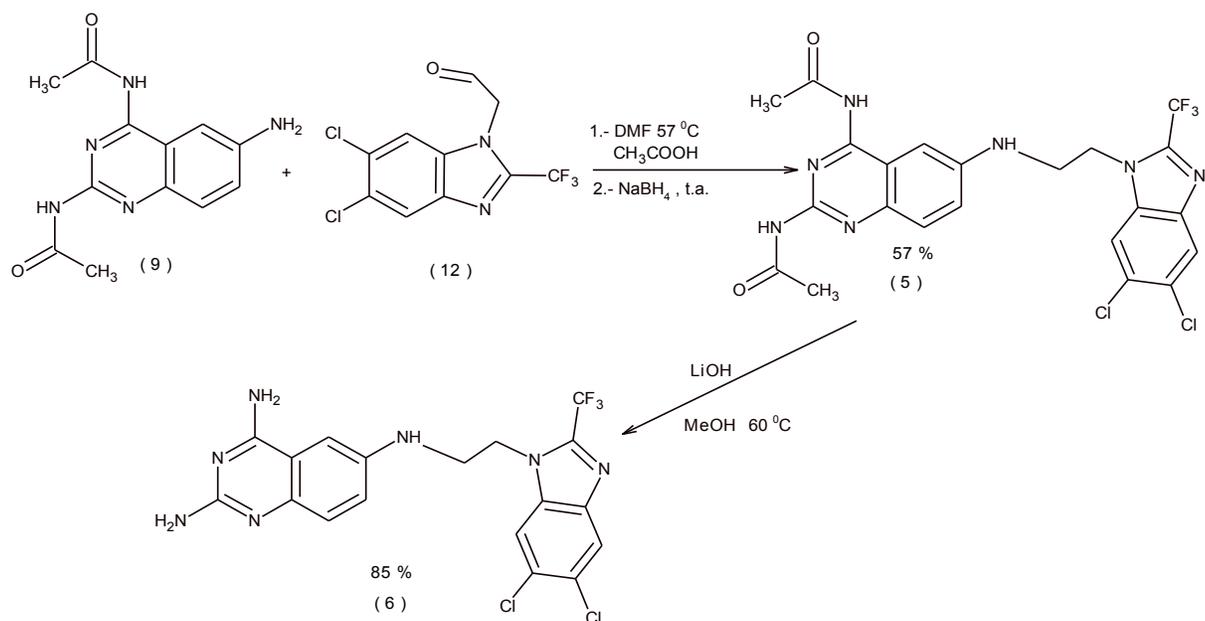
Primeramente se sintetizó el aldehído **12** para posteriormente realizar el acoplamiento con el fragmento A. El compuesto **12** se obtuvo a partir de una ruta en 3 pasos. La primera etapa consistió en una condensación de la 4,5-dicloroortofenilendiamina con ácido trifluoroacético para dar lugar al derivado bencimidazólico **10**. El siguiente paso

consistió en someter a **5** a una sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2) con dietilacetaldel del 2-bromoacetaldel para formar al compuesto **11**. La desprotección de **11** se realizó utilizando diversos reactivos (medio ácido, cloruro de hierro, I_2 en acetona) pero sólo con BBr_3 fue efectiva para dar a lugar al aldehído **12** (Esquema 6).



Esquema 6. Ruta sintética del intermediario **12**.

Posteriormente **12** se sometió a una condensación con **9** y posterior reducción con borohidruro de sodio para dar **5**. Se realizó la desprotección del compuesto **5** en medio básico para formar **6** (Esquema 7).



Esquema 7. Ruta sintética de los compuestos **5** y **6**.

5.3. Evaluación biológica

La parte experimental correspondiente a este apartado fue realizada en la Escuela Nacional de Ciencias Biológica del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN) a cargo del Dr. Benjamín Noguera Torres.

- Se utilizaron ratones de la cepa CD1 del bioterio de la ENCB-IPN.
- Se utilizaron los tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* cepas NINOA e INC-5 del Departamento de Parasitología de la ENCB-IPN

Como controles positivos se utilizaron los fármacos nifurtimox (Lampit, Bayer) y benznidazol (Rochagan, Roche) adquiridos comercialmente. Los resultados de los estudios in vitro se presentan como porcentaje de inhibición después de exponer los tripomastigotes a diferentes concentraciones. Con estos valores se calculó la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) de cada uno de los compuestos con una regresión lineal simple.

5.4. Estudios *in silico*

5.4.1 Elección de las estructuras cristalográficas de las proteínas

Se recurrió al banco de datos de proteínas (PDB) para seleccionar la DHFR humana, de *T. cruzi* y la PTR de *T. cruzi* y *L. major*. Los ID para cada uno de ellos son los siguientes:

- Pteridin reductasa 2 (ptr2) de *T. cruzi*.
ID PDB= 1MXH
- Dihidrofolato reductasa de *T. cruzi*.
ID PDB= 2h2q
- Pteridin reductasa 1 (ptr1) de *L. major*.
ID PDB= 1w0c
- Dihidrofolato reductasa humana.
ID PDB= 1kMS

5.4.2. Alineamientos de secuencia y gráficas tridimensionales

Para el alineamiento de secuencias se utilizó el programa NTI.v.10. Las secuencias de las proteínas se adquirieron en Medline®.

Se realizaron los siguientes alineamientos de secuencias

- a) Alineamiento de PTR2 de *T. cruzi* con PTR de *L. major* para evaluar la similitud de las mismas.
- b) Alineamiento de la secuencia de DHFR humana, *T. cruzi*
- c) Alineamiento de la secuencia de DHFR de *L. major* y *T. cruzi*
- d) Alineamiento de DHFR *T. cruzi* con PTR de *L. major* y PTR2 de *T. cruzi*.
- e) Alineamiento de DHFR y PTR de *T. cruzi*.

Se utilizó el programa VMD 1.8.3. para generar las gráficas de Ramachandran de estas proteínas.

5.4.3. Estudios para el acoplamiento molecular (docking)

5.4.3.1 Preparación del ligando

5.4.3.1.1. Análisis tautomérico de triaminquinazolina (TAQ).

En otro estudio se analizaron las propiedades de triaminquinazolina para conocer en este sistema la distribución de tautómeros presentes para seleccionar un solo tipo de tautómero para todos los híbridos además de conocer la reactividad de las aminas presentes en las moléculas. Se realizaron cálculos ab initio en fase gaseosa y en solución utilizando una aproximación a la teoría de funcionales de la densidad (DFT) con el funcional híbrido B3LYP y usando el conjunto de bases 6,31G^{**} del programa Gaussian 03. Este nivel de computo es denotado como B3LYP/6-31G^{**}. Para el análisis en solvente se utilizó un método continuo (PCM) en agua, DMSO y THF con correcciones termodinámicas. De este análisis se calcularon los porcentajes de tautómeros presentes con respecto al más estable. Así mismo se realizó el análisis de la molécula protonada en los átomos de nitrógeno utilizando un método continuo-discreto, utilizando una molécula de agua en agua, DMSO y THF como disolventes y comparando estos resultados en fase gaseosa.

5.4.3.1.2 Análisis de las moléculas propuestas para el acoplamiento molecular

Determinado el tipo de tautómero a utilizar en el acoplamiento molecular, se realizó el análisis conformacional de las moléculas de interés utilizando el programa Spartan 03 de "wave function" a un nivel de teoría semiempírico (PM3).

Los conformeros de menor energía se optimizaron con el paquete Gaussian 03 utilizando la teoría de funcionales de la densidad (DFT) (LSDA y B3LYP 6-31G**). Se determinó que todas las moléculas fueran mínimos en la superficie de energía potencial mediante cálculo de las frecuencias vibracionales.

Finalmente se preparó el archivo PDB del ligando utilizando el programa Molekel 4.3.

5.4.3.2. Preparación de la proteína.

Se eliminaron las moléculas de agua y de ligando utilizando un lector de texto para abrir el archivo PDB, así como Autodock Tools 1.5.2, y Molekel 4.3.

Se agregaron los hidrógenos susceptibles de hacer puentes de hidrógeno considerando un pH de 7, se hizo la asignación de las cargas de Kollman y efectos de solvatación utilizando el software Autodock Tools 1.5.2.

5.4.3.3. El acoplamiento molecular (*docking*)

Para la preparación de los archivos de entrada se utilizó Autodock Tools. Para el cálculo se utilizaron las versiones de Autogrid 3 y 4 para la generación del grid así como Autodock 3 y 4 para evaluar el acoplamiento molecular propiamente dicho. Para el análisis de los resultados se utilizó Autodock Tools 3.05 y 4.1, pymol viewer y VMD 1.8.3.

Primeramente se realizó un análisis conocido como “docking” ciego (blind docking) de tal manera que el grid generado abarcara toda la proteína. A partir de estos resultados se realizó un “*docking*” focalizado con un grid de 60 Å x 60 Å x 60 Å. El grid se centró en un punto del sitio activo reportado.

Para PTR1 de *L. major* el centro se localizó a 5.063 Å del aminoácido Tyr194.

Para PTR2 de *T. cruzi* el centro se localizó a 4.445 Å del aminoácido Tyr182.

Para DHFR de *T. cruzi* el centro se localizó a 7.353 Å del aminoácido Phe88.

Para DHFR de humano el centro se localizó a 10.3 Å del aminoácido Asp64.

Para el acoplamiento molecular se utilizó un algoritmo de tipo Lamarckiano con un tamaño de población de 100 (100 conformaciones) y 10000000 evaluaciones.

Cabe mencionar que se utilizó Autodock3 para todas las proteínas y Autodock 4 solo para DHFR de *T. cruzi* con la intención de comparar resultados.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Síntesis y caracterización estructural de los híbridos diseñados.

En la Tabla 2 y 3 se muestran algunos datos generales y datos espectroscópicos respectivamente.

Tabla 2. Datos generales de los compuestos sintetizados

Compuesto	R.f.	Sistema de elución ^a	pf o pd (°C)	Aspecto y color	Rendimiento (Reacción)(%)
1	0.74	Sistema II	204-205	Polvo amarillo	38
2	0.54	Sistema IV	215-218	Polvo rojo	82
3	0.76	Sistema II	218.3-220.9	Polvo amarillo	48
4	0.53	Sistema IV	210.6-211	Polvo amarillo	62
5	0.75	Sistema II	222.3-222.9	Polvo amarillo	57
6	0.59	Sistema IV	133-136	Polvo café	85
7	0.4	Sistema IV	359-361	Polvo naranja	86
8	0.8	Sistema III	278.7-279.8	Polvo amarillo	70
9	0.67	Sistema III	238-238.2	Polvo amarillo	77
10	0.32	Sistema I	272.7-274.5	Cristales blancos	50
11	1.6	Sistema I	76.8-77.6	Cristales crema	92
12	1.3	Sistema I	ND	Aceite oscuro	99

pf: Punto de fusión.

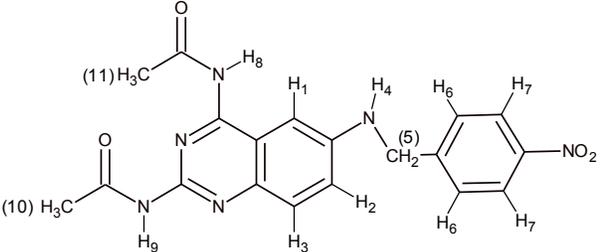
pd: Punto de descomposición.

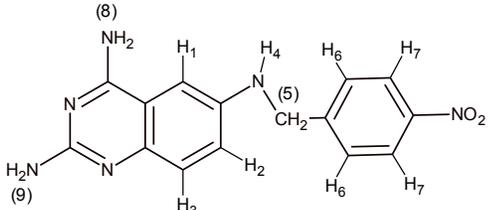
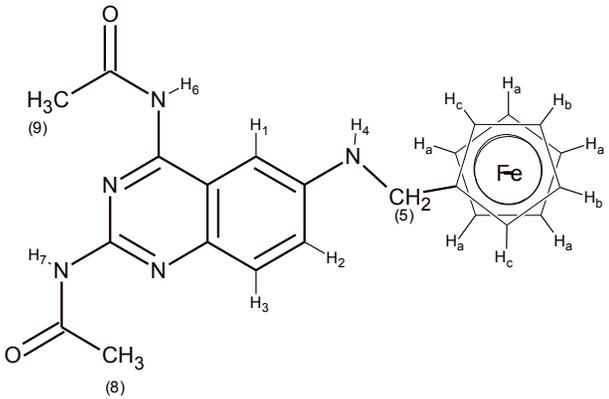
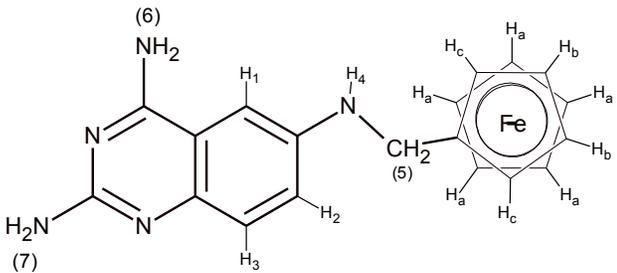
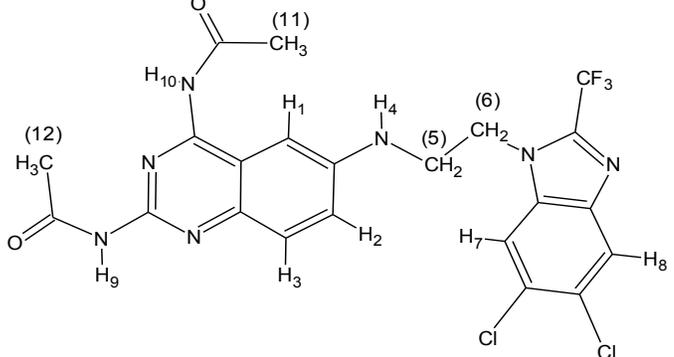
R.f.: Factor de retención.

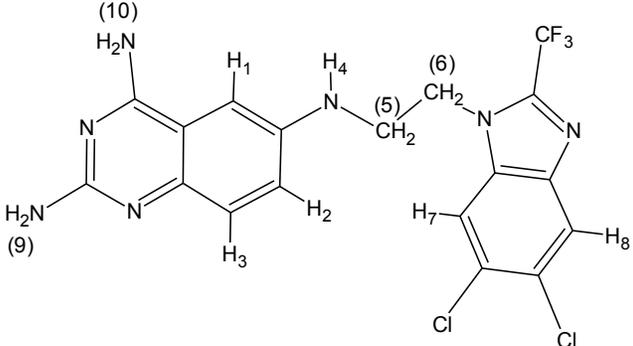
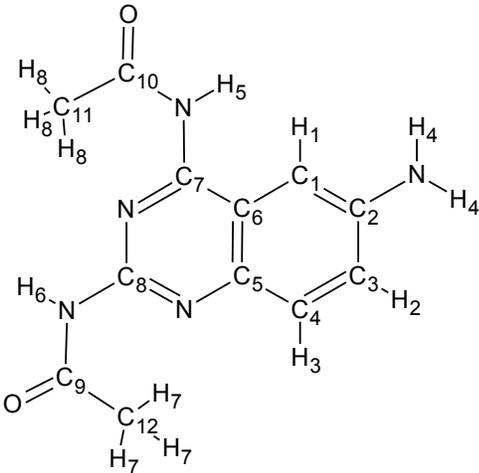
ND: No determinado

^a La composición de cada sistema se muestra en el apéndice I.

Tabla 3. Caracterización espectroscópica de los híbridos

Compuesto	Características espectroscópicas
 <p>N-{2-(acetilamino)-6-[(4-nitrobenzil)amino]quinazolin-4-il}acetamida (1)</p>	<p>EM-[FAB(+)] m/z=395</p> <p>IR -pastilla-KBr (cm⁻¹): 3350 y 3342 (N-H), 1670 y 1629 (C=O), 1620 (-NO₂)</p> <p>RMN ¹H (DMSO-d₆): 7.01 ppm [(H₁)(d, J= 2.4-meta, 1H)], 7.3 ppm [(H₂)(dd, J= 9-orto, J= 2.4-meta, 1H)], 7.51 ppm [(H₃)(d, J= 9-orto, 1H)], 6.91 ppm [(H₄)(t, J= 6, 1H)], 4.56 ppm [(H₅)(t, J= 6, 2H)], 8.21 ppm [(H₇)(d, J= 8.4-orto, 2H)], 7.6 ppm [(H₇)(d, J= 8.4-orto, 2H)], 10.22 ppm [(H₈)(s.a., 1H)], 10.41 ppm [(H₉)(s, 1H)], 2.42 ppm [(H₁₀)(s.a., 3H)], 2.17 ppm [(H₁₁)(s, 3H)].</p>

 <p><i>N</i>⁶-(4-nitrobenzil)quinazolin-2,4,6-triamina (2)</p>	<p>EM-[FAB(+)] m/z=311 IR -pastilla-KBr (cm⁻¹): 3369 (N-H), 1517 (-NO₂). RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆): 7.5 ppm [(H_{1,2,3})(señal compleja, 3H)], 6.2 ppm [(H₄)(s.a., 1H)], 4.46 ppm [(H₅)(s.a., 2H)], 7.86 ppm [(H₆)(s.a., 1H)], 8.19 ppm [(H₇)(s.a., 1H)], 5.54 ppm [(H₈)(s.a., 2H)], 7.25 ppm [(H₉)(s.a., 2H)].</p>
 <p><i>N</i>-{2-(acetilamino)-6-[(ferrocenmetil)amino]quinazolin-4-il}acetamida (3)</p>	<p>EM-[FAB(+)] m/z=460 IR -pastilla-KBr (cm⁻¹): 3369 y 3244 (N-H), 1693 y 1668 (C=O), 825 (C-H ferroceno). RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆): 7.10 ppm [(H₁)(d, <i>J</i> = 2.4-meta, 1H)], 7.4 ppm [(H₂)(dd, <i>J</i> = 9-orto, <i>J</i> = 2.4-meta, 1H)], 7.47 ppm [(H₃)(d, <i>J</i> = 9-orto, 1H)], 6.17 ppm [(H₄)(t, <i>J</i> = 5.6, 1H)], 4.1 ppm [(H₅)(t, <i>J</i> = 5.6, 2H)], 8.21 ppm [(H₇)(d, <i>J</i> = 8.4-orto, 2H)], 4.22 ppm [(H_a)(s, 5H)], 4.34 ppm [(H_b)(t, <i>J</i> = 1.8, 2H)], 4.13 ppm [(H_c)(t, <i>J</i> = 1.8, 2H)], 10.52 ppm [(H₆)(s.a., 1H)], 10.2 ppm [(H₇)(s.a., 1H)], 2.49 ppm [(H₈)(s, 3H)], 2.2 ppm [(H₉)(s, 3H)].</p>
 <p><i>N</i>⁶-(ferrocenmetil)quinazolin-2,4,6-triamina (4)</p>	<p>EM-[FAB(+)] m/z=460 IR -pastilla-KBr (cm⁻¹): 3369 y 3244 (N-H), 1693 y 1668 (C=O), 823 (C-H ferroceno). RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆): 7.0 ppm [(H_{1,2,3,7})(señal compleja, 5H)], 5.5 ppm [(H₄)(s.a., 1H)], 4 ppm [(H₅)(s, 2H)], 4.2 ppm [(H_a)(s, 5H)], 4.32 ppm [(H_b)(s, 2H)], 4.1 ppm [(H_c)(s.a., 2H)], 5.5 ppm [(H₆)(s.a., 2H)].</p>
 <p><i>N</i>-{2-(acetilamino)-6-[[5,6-dicloro-2-(trifluorometil)-1H-bencimidazol-1-il]etil]amino}quinazolin-4-il}acetamida (5)</p>	<p>EM-[FAB(+)] m/z=541 IR -pastilla-KBr (cm⁻¹): 3343 (N-H), 1670 (C=O), 720 (C-F). RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆): 7.04 ppm [(H₁)(s, 1H)], 7.08 ppm [(H₂)(d, <i>J</i> = 4.5-orto, 1H)], 7.44 ppm [(H₃)(d, <i>J</i> = 4.5-orto, 1H)], 6.29 ppm [(H₄)(t, <i>J</i> = 4.8, 1H)], 4.6 ppm [(H₅)(s.a., 2H)], 3.6 ppm [(H₆)(s.a., 2H)], 8.1 ppm [(H₇)(s, 1H)], 7.8 ppm [(H₈)(s, 1H)], 10.49 ppm [(H₉)(s, 1H)], 10.22 ppm [(H₁₀)(s.a., 1H)], 2.16 ppm [(H₁₁)(s, 3H)], 2.48 ppm [(H₁₁)(s, 3H)].</p>

 <p><i>N</i>⁶-{2-[5,6-dicloro-2-(trifluorometil)-1<i>H</i>-bencimidazol-1-il]etil}quinazolin-2,4,6-triamina (6)</p>	<p>EM-[FAB(+)] <i>m/z</i>=457</p> <p>IR -pastilla-KBr (cm⁻¹): 3350 (N-H), 1273 (C-N), 742 (C-F).</p> <p>RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆): 6.8 ppm [(H₁)(s, 1H)], 7.0 ppm [(H_{2,3,9})(señal compleja, 4H), 5.61 ppm [(H₄)(s.a., 1H), 4.5 ppm [(H₅)(s, 2H)], 3.5 ppm [(H₆)(s, 2H)], 8.14 ppm [(H₇)(s, 1H)], 7.9 ppm [(H₈)(s.a., 1H)], 5.65 ppm [(H₁₀)(s.a., 2H)].</p>
 <p><i>N</i>-[2-(acetilamino)-6-aminoquinazolin-4-il]acetamida (9)</p>	<p>EM-[FAB(+)] <i>m/z</i>=259</p> <p>IR -pastilla-KBr (cm⁻¹): 3353 y 3230 (N-H).</p> <p>RMN ¹H (DMSO-<i>d</i>₆): 7.04 ppm [(H₁)(d, <i>J</i> = 3-meta, 1H), 7.28 ppm [(H₂)(dd, <i>J</i> = 8-orto, <i>J</i> = 3-meta, 1H), 7.5 ppm [(H₃)(d, <i>J</i> = 8-orto, 1H)], 5.61 ppm [(H₄)(s.a., 2H)], 10.46 ppm [(H₅)(s.a., 1H)], 10.22 ppm [(H₆)(s.a. 1H)], 2.2 ppm [(H₇)(s., 3H)], 2.34 ppm [(H₈)(s., 3H)].</p> <p>RMN ¹³C (DMSO-<i>d</i>₆): 102.37 ppm (C₁), 145.16 ppm (C₂), 126.02 ppm (C₃), 127.48 ppm (C₄), 146.55 ppm (C₅), 116.825 ppm (C₆), 156.03 ppm (C₇), 150.08 ppm (C₈), 169.18 ppm (C₉), 170.73 ppm (C₁₀), 24.82 ppm (C₁₁ y 12).</p> <p>Experimento HSQC (H-C, a un enlace): H₁-C₁, H₂-C₃, H₃-C₄.</p> <p>Experimento HMBC (H-C a dos o tres enlaces): H₁-C₇-C₂-C₃, H₂-C₆-C₄-C₁, H₃-C₅-C₃-C₆, H₅-C₇-C₆-C₁₁, H₆-C₉-C₁₂-C₈, H₈-C₁₀, H₇-C₉.</p>

s: singulete, d:doblete, dd: doble de dobles, s.a.:singulete ancho.

La caracterización del compuesto **9** se realizó como modelo de los derivados acetilados posteriores. Por espectrometría de masas dio el ion molecular (*m/z*= 256). La espectroscopia de IR mostró las bandas correspondientes a la vibración del enlace N-H de las amidas y amina a 3353 cm⁻¹, 3230 cm⁻¹. Las señales RMN de ¹H se asignaron como lo muestra la Fig. 20. Esto se hizo utilizando los experimentos HMBC y HSQC. Desplazamientos similares se repiten en todos los derivados acetilados.

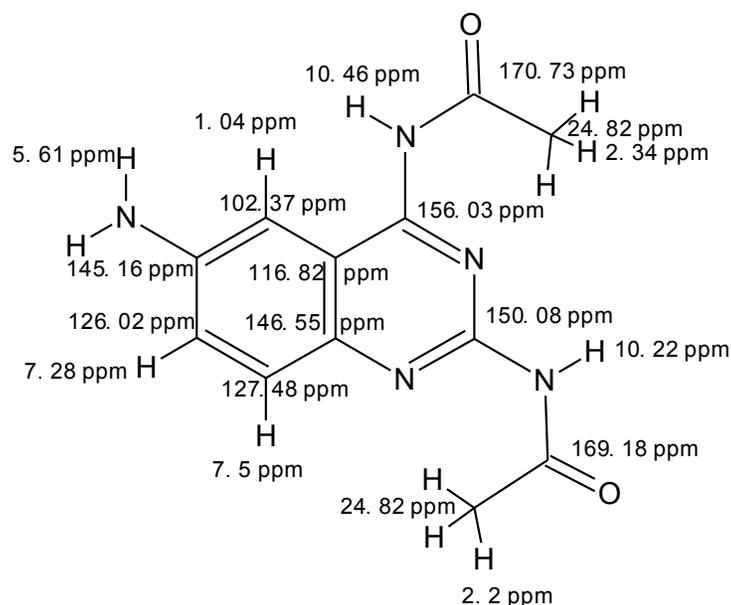


Figura 20. Asignación de los desplazamientos químicos de **9**.

8.1.2 Síntesis de híbridos

Para la síntesis final de los híbridos se diseñaron dos rutas una vía sustitución nucleofílica bimolecular (ruta 1) y otra vía aminación reductiva (ruta 2) sin embargo la segunda ruta es la que mejores resultados dio. Es importante mencionar que en ningún caso se aisló la base de Schiff ya que esta se sometió inmediatamente a la reducción.

8.1.2.1 Síntesis del híbrido **1** y su caracterización.

El compuesto **1** se sintetizó vía aminación reductiva. La espectrometría de masas del compuesto **1** correspondió al ion molecular esperado (m/z 395). El espectro de IR mostró las señales esperadas. Para el compuesto **1** las frecuencias que corresponden a la vibración asimétrica del enlace N-H de las amidas son 3350 cm^{-1} y 3342 cm^{-1} , la vibración simétrica de los grupos carbonilos se encuentran a 1670 cm^{-1} y 1629 cm^{-1} y la vibración asimétrica del grupo nitro se encuentra 1518 cm^{-1} . El espectro de RMN del compuesto **1** mostró claramente para el anillo de quinazolina las señales que corresponden al protón marcado como H_1 como doblete (7.01 ppm, $J=2.4$ acoplamiento meta), el protón marcado como H_2 se muestra como un doble de dobles (7.39 ppm, $J=9$ acoplamiento orto, $J=2.4$ acoplamiento meta), y el protón marcado como H_3 se muestra como un doblete (7.51 ppm, $J=9$, acoplamiento orto). Los señales del protón de la amina (H_4) se mostraron como un triplete con acoplamiento a los protones del metileno ipso (6.91 ppm, $J=6$). Para los protones del metileno marcado como H_5 se

mostraron como un doblete (4.56 ppm $J= 6$ acoplamiento al protón de la amina). Para el anillo de nitrobenzilo las señales corresponden a 2 dobletes (8,21 ppm, $J= 8.4$ acoplamiento orto y 7.6 ppm, $J= 8.4$ acoplamiento orto) cada doblete integra para dos protones los cuales corresponden al anillo aromático del nitrobenzilo (protones H₆ y H₇). Se muestran dos protones de las amidas (H₈ y H₉) a 10.22 y 10.41 ppm. Por ultimo las señales para los protones del grupo acetilo (H₁₀ y H₁₁) se presentaron como singuletes 2.42 ppm y 2.17 ppm integrando cada uno para tres protones.

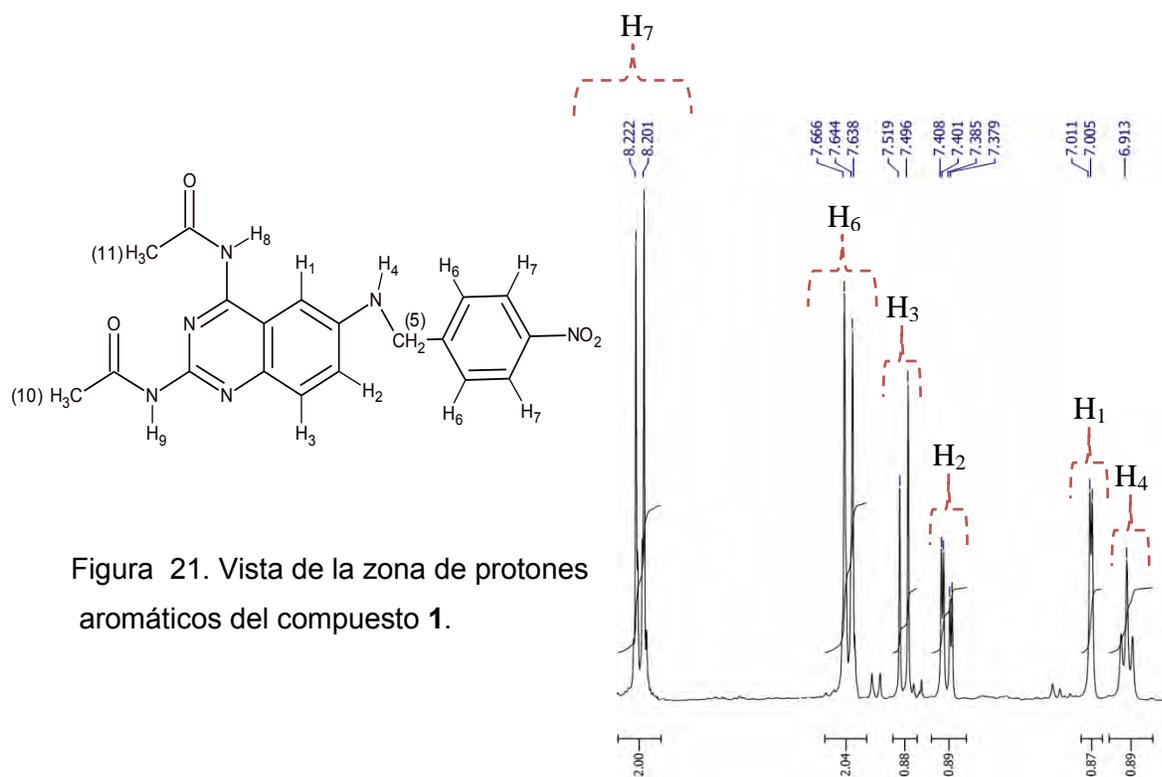


Figura 21. Vista de la zona de protones aromáticos del compuesto **1**.

8.1.2.1 Síntesis del híbrido **2** y su caracterización.

El compuesto **2** se obtuvo de la hidrólisis de **1**. Para el compuesto **2** la espectroscopia de masas mostró al ion molecular ($m/z= 311$). En espectroscopia de infrarrojo se presentaron las frecuencias esperadas, a 3369 cm^{-1} la vibración asimétrica del enlace N-H, a 1517 cm^{-1} la vibración asimétrica del grupo NO_2 . En el espectro de RMN de ^1H se observaron señales anchas probablemente debido al equilibrio termodinámico que existe en la molécula. Los protones del anillo de quinazolinona se encuentran a 7.5 ppm y 6.95 ppm, los protones del anillo de nitrobenzilo se encuentran a 8.19 ppm y 7.66 ppm

cada uno integrando para dos protones, en un desplazamiento de 7.25 ppm se encuentra la señal para los dos protones de una de las aminas unidas al anillo de quinazolina y a 5.54 ppm se encuentra la señal de la otra amina unida al anillo de quinazolina. La señal de la amina secundaria se encuentra a 6.2 ppm. La señal del metileno se encuentra a 4.46 ppm.

8.1.2.2 Síntesis del híbrido **3** y caracterización.

El compuesto **3** se obtuvo por aminación reductiva. La espectrometría de masas mostró el ion molecular (m/z 460). El espectro de IR registró la vibración asimétrica de las aminas a 3396 cm^{-1} y 3244 cm^{-1} . Las bandas de vibración de los carbonilos se presentaron a 1693 cm^{-1} y 1668 cm^{-1} , a 1007.79 se mostró la vibración del enlace C-H del ferroceno. El espectro de RMN de ^1H mostró las señales esperadas, la señal del hidrogeno H_1 se muestra como un doblete (7.10 ppm, $J=2.4$, acoplamiento meta), la señal del hidrogeno H_2 se muestra como un doble de dobles (7.4 ppm $J= 2.4$, acoplamiento meta, $J=9$ acoplamiento orto) y la señal del hidrogeno H_3 se muestra como un doblete (7.47 ppm, $J=9$ acoplamiento orto). La señal del protón H_4 de la amina se presentó como un triplete (6.17 ppm $J=5.6$ acoplamiento con los hidrógenos del metileno ipso). La señal de los protones del metileno H_5 se encontraron como un doblete (4.1 ppm $J= 5.6$ acoplamiento al protón de la amina secundaria). Las señales de los protones del ferroceno las podemos dividir en dos tipos, los que corresponden al anillo de libre rotación (H_a) y los que corresponden al anillo unido al metileno (H_b y H_c). Aquellos del anillo de libre rotación se observaron como un singulete (4.22 ppm) (existe una barrera pequeña de energía para el giro del anillo). La señal de los protones H_b se registraron como un triplete correspondiente a un acoplamiento con los protones H_c (4.34 ppm $J=1.8$). Los protones H_c se mostraron igualmente como un triplete que resultó del acoplamiento con el otro protón H_c y un protón H_b (4.13 ppm $J=1.8$). Los protones de las amidas (H_6 y H_7) se presentaron como singuletes anchos (10.52 ppm y 10.2 ppm). Los protones de los grupos acetilo (H_8 y H_9) se mostraron como singuletes anchos (2.49 ppm y 2.2 ppm).

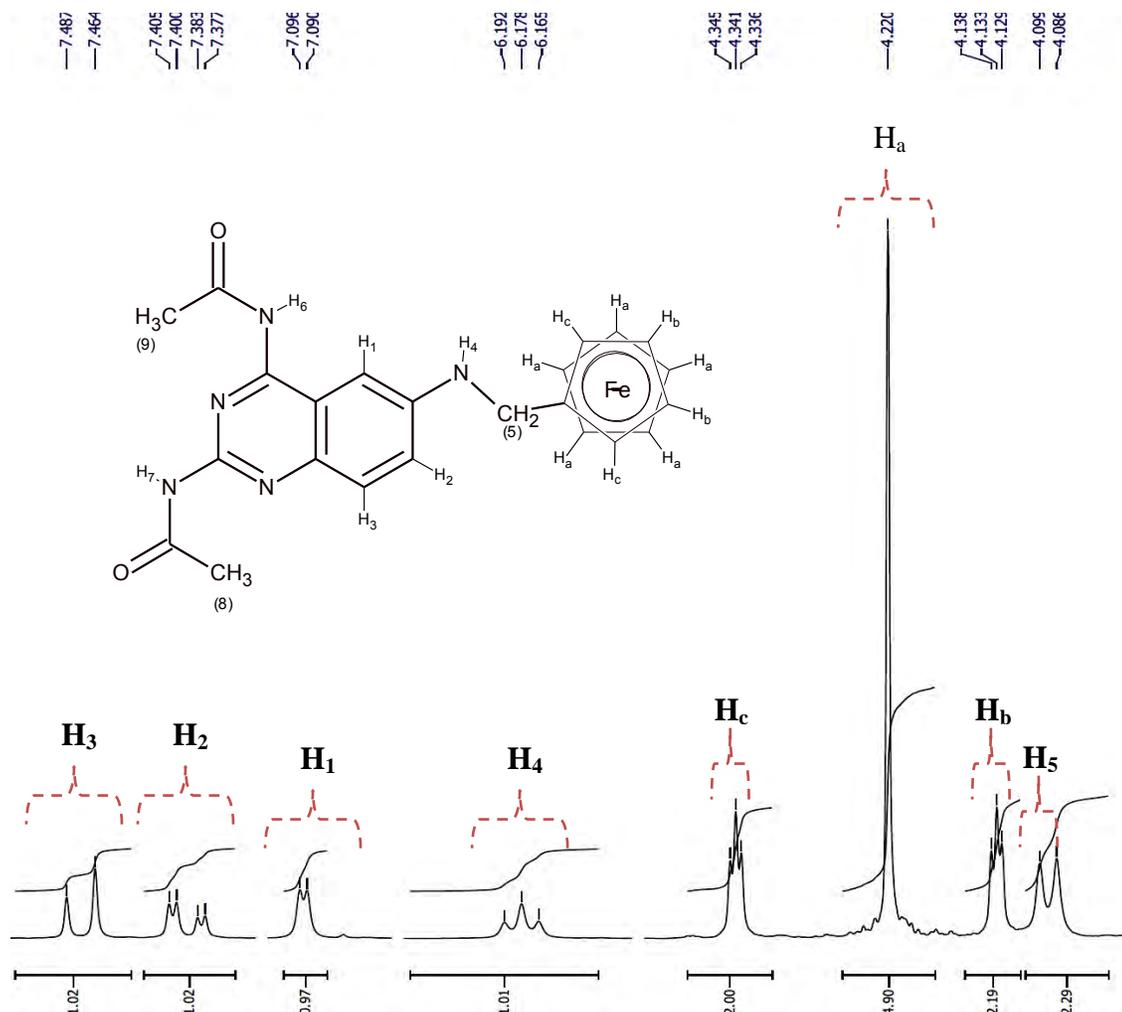


Figura 22. Vista de las señales de los protones de la quinazolina y del ferroceno.

8.1.2.2. Síntesis del híbrido **4** y caracterización.

A diferencia del compuesto **2**, el compuesto **4** se obtuvo vía aminación reductiva pero utilizando como solvente metanol, en el cual dio buenos rendimientos. La espectroscopia de masas de **4** muestra el ion molecular esperado (m/z 374). La fragmentación de esta molécula es sumamente interesante y esta se muestra en la Fig 23. El espectro de IR se presentan las bandas características para las aminas a 3393 cm^{-1} y las bandas de vibración del anillo de ferroceno a 823 cm^{-1} . La espectroscopia de RMN muestra las señales para el anillo aromático, el protón H_1 , H_2 , H_3 y H_7 se encuentran en el mismo desplazamiento a 7.0 ppm. Los protones correspondiente a las aminas H_4 se encuentran a 5.5 ppm. La señal de los protones (H_5) del metileno se muestra como singulete a 4 ppm La señal de la amina unida a quinazolina (H_6) se encuentra a 5.5 ppm.. Las señales características de los protones del ferroceno se

muestran como singuletes, la correspondiente al anillo de libre rotación H_a se localizan a 4.2 ppm y las señales correspondientes a los protones H_b y H_c se muestran a 4.32 y 4.10 ppm respectivamente. El espectro de RMN fue obtenido después de 24 horas de haber disuelto la muestra ya que al inicio las señales eran demasiado anchas. Aun así las señales son anchas pero interpretables, por lo que parece estar implicado un equilibrio termodinámico.

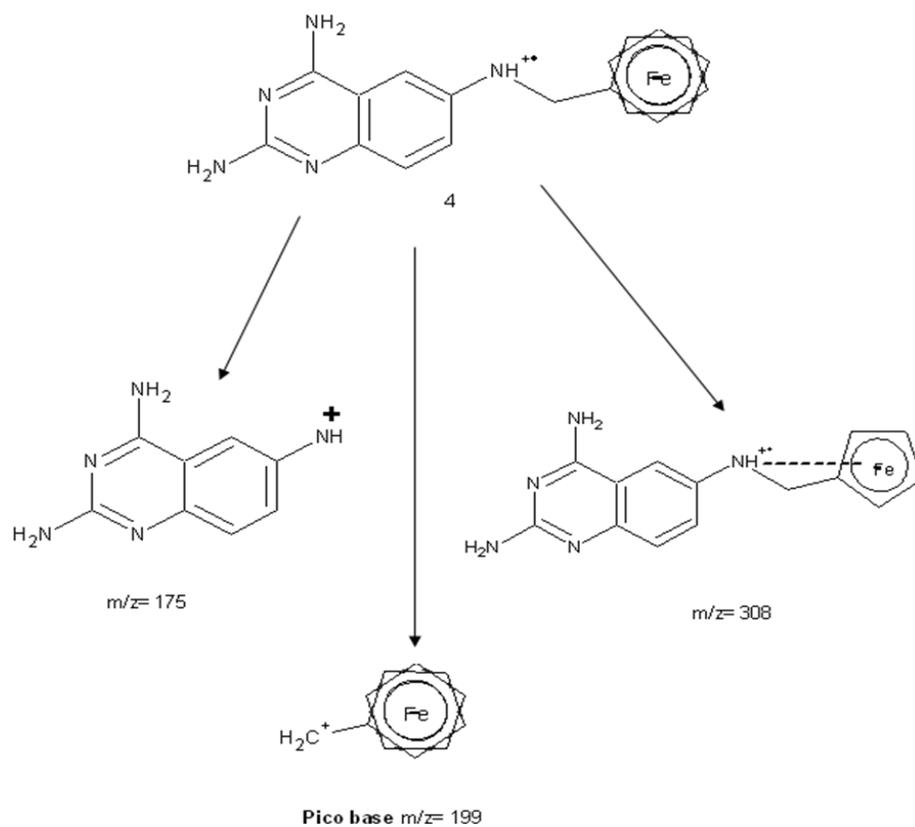


Figura 23. Fragmentos generados en EM para el compuesto **4**.

8.1.2.2 Síntesis del híbrido **5** y caracterización.

La espectroscopia de masas de **5** muestra al ion molecular ($m/z=541$) correspondiente al peso molecular del compuesto C1. La espectroscopia de IR muestra las bandas esperadas correspondientes a la vibración asimétrica del enlace N-H a 3343 cm^{-1} , el enlace C=O a 1670 cm^{-1} . El espectro de RMN de protón muestra el fenómeno de atropisomerismo debido a que las señales se encuentran repetidas. La señal correspondiente al protón H₁ se muestran como un singulete (7.04 ppm) que esta repetida a menor intensidad a 7 ppm. La señal correspondiente al protón H₂ se muestra como un doblete (7.08 ppm $J=4.5$ acoplamiento orto). La señal del protón H₃ se muestra

como un doblete (7.44 ppm, $J = 4.5$, acoplamiento orto) repetida a 7.3 ppm. El protón correspondiente a la amina H_4 se muestra como un triplete (6.29 ppm, $J = 4.8$ acoplamiento con los protones del metileno. La señal de los protones del metileno (H_5 y H_6) se muestran como singuletes (4.6 y 3.6 ppm). La señal de los protones del Benzimidazol (H_7 y H_8) se muestran como singulete repetido (8.1 y 8 ppm) y otro singulete (7.8 ppm) respectivamente. Los protones de las amidas (H_9 y H_{10}) se muestran cada uno como singuletes (10.49 ppm y 10.22 ppm). Los protones de los grupos acetilo (H_{10} y H_{11}) se muestran como singuletes (2.16 y 2.48 ppm).

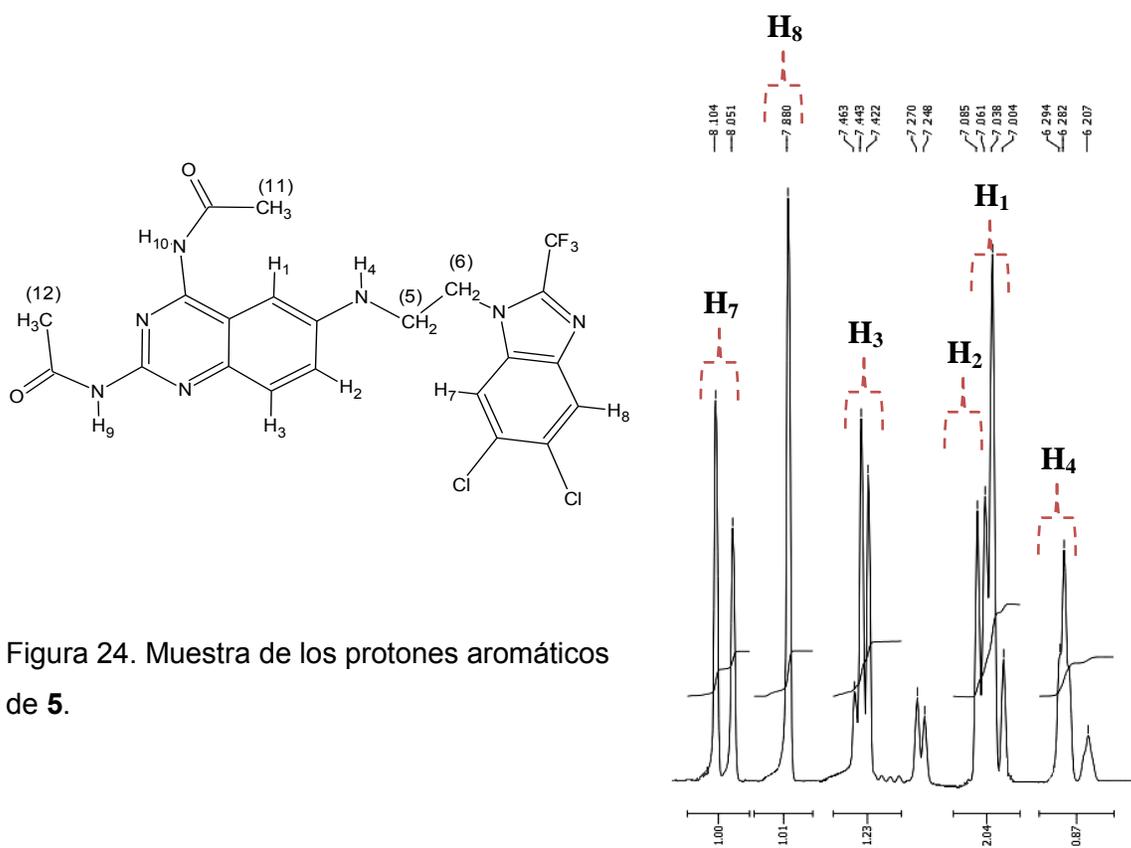


Figura 24. Muestra de los protones aromáticos de **5**.

8.1.2.1 Síntesis del híbrido **6** y su caracterización.

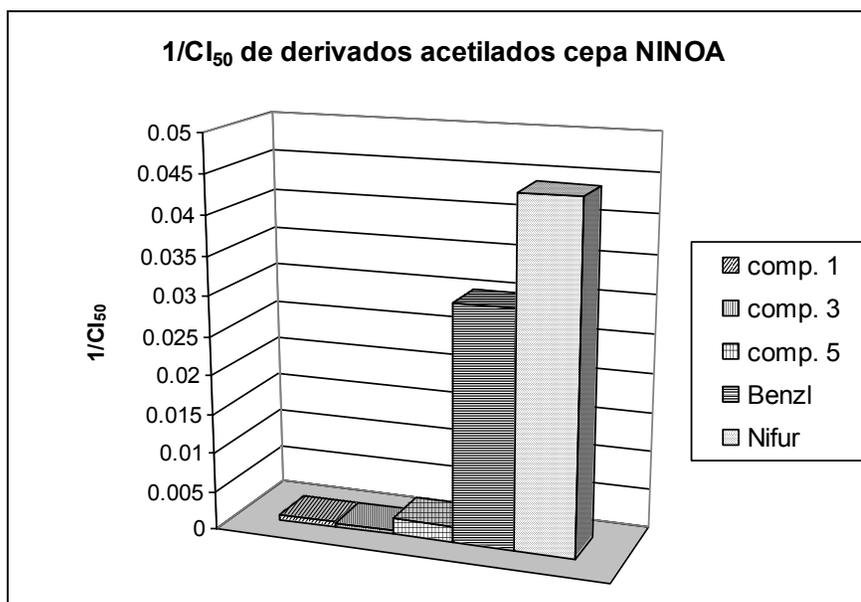
El compuesto **6** se obtuvo por hidrólisis de **5**. La espectrometría de masas muestra al ion molecular correspondiente ($m/z = 457$). El espectro de IR registra las bandas para la vibración de las aminas a 3350 cm^{-1} , la vibración del enlace C-N a 1273 cm^{-1} , a 742 cm^{-1} la vibración del enlace C-F. El espectro de RMN de ^1H presenta las señales esperadas para los protones del anillo benzimidazólico (8.14 y 7.9 ppm), los protones aromáticos (6.8, 7 y 6.9 ppm) aunque las señales se manifiestan anchas puesto que los protones de una de las aminas unida al anillo de quinazolina se encuentra en esta misma región

por la integración obtenida, la otra amina se encuentra hacia campo alto (5.6 ppm), y los protones de los dos metilenos todavía a campos más altos (4.5 y 3.5 ppm).

8.2 Parte biológica.

8.2.1. Pruebas biológicas sobre *T. cruzi*.

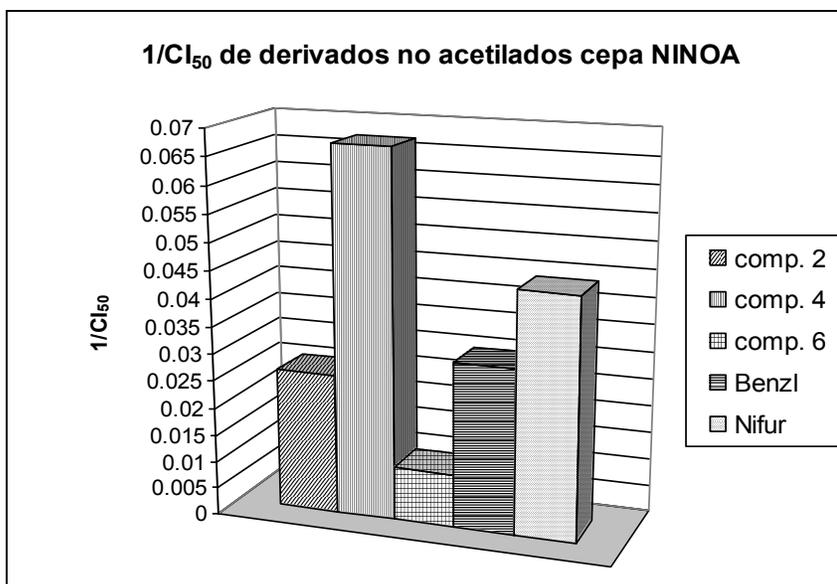
Los resultados de las pruebas biológicas *in vitro* con *T. cruzi* cepa NINOA se graficaron con la inversa del CI_{50} (μM) calculada y comparada con los fármacos de referencia LAMPIT(Nifutimox) y RADANIL (Benznidazol).



Compuesto	1/CI ₅₀
1	0.00058
2	0.00046
3	0.0021
Benzl	0.0030
Nifur	0.044
pirim	Sin actividad

Grafica 1. 1/CI₅₀ de derivados acetilados en la cepa NINOA.

Como se puede observar en las gráficas, los derivados acetilados tuvieron actividad tripanomicida moderada comparada con los fármacos de referencia (benznidazol y nifurtimox) aunque el compuesto diacetilado **5** mostró una actividad moderada con respecto a nifurtimox. La mayoría mostro mejor actividad con respecto a pirimetamina que es un conocido inhibidor de DHFR.

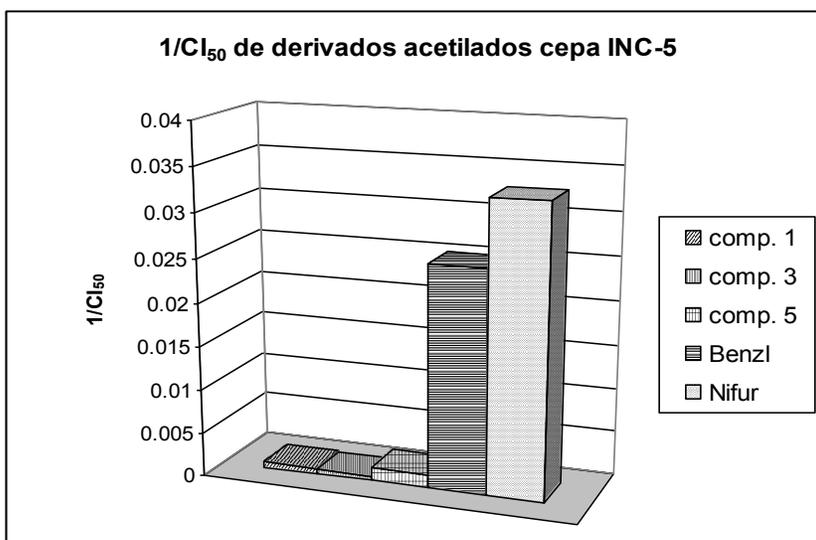


Compuesto	1/CI ₅₀
2	0.026
4	0.067
6	0.0097
Benzl	0.03
Nifur	0.044
pirim	Sin actividad

Grafica 2. CI₅₀ de derivados no acetilados en la cepa NINOA.

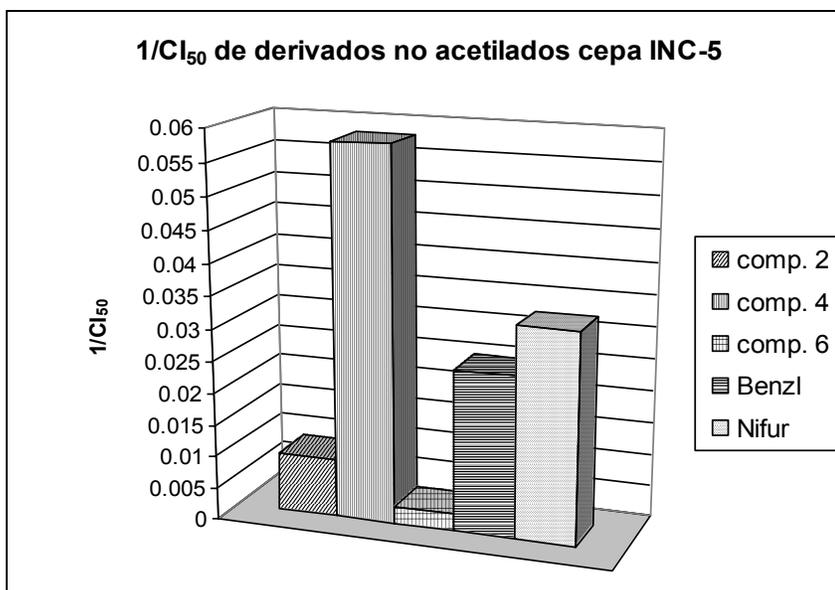
Los derivados no acetilados son interesantes dado que algunos de ellos como **2** y **6** muestran un comportamiento cercano a los fármacos de elección. El compuesto **4** (derivado de ferroceno) llega a superar al nifurtimox, por lo que se considera un buen agente tripanomicida. Es interesante observar como los derivados acetilados casi no presentan actividad, aunque el compuesto **5** presenta actividad moderada.

La evaluación con una cepa resistente como lo es la INC-5 muestra la misma tendencia que las gráficas anteriores pero con actividad mucho menor. Solo el compuesto **4** siguió presentando una fuerte actividad tripanomicida.



Compuesto	1/CI ₅₀
1	0.00058
2	0.00046
3	0.0015
Benzl	0.025
Nifur	0.033
pirim	Sin actividad

Grafica 3. CI₅₀ de derivados acetilados en la cepa INC-5.



Compuesto	1/CI ₅₀
2	0.0092
4	0.058
6	0.0027
Benzl	0.025
Nifur	0.033
pirim	Sin actividad

Grafica 4. CI₅₀ de derivados no acetilados en la cepa INC-5.

En las dos cepas se encontró que el compuesto más potente fue **4**, el cual es un derivado con ferroceno. Este compuesto llega a superar hasta por casi el doble a los fármacos de referencia, por lo que estudios dirigidos hacia su metabolismo (prueba *in vivo*) y toxicidad merecen ser estudiados a profundidad.

8.3 Resultados de la parte computacional.

Los estudios computacionales se realizaron en la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional a cargo del Dr. José Correa Basurto. Se recibió el apoyo del Q.F.B. Natanael Zarco Salinas del Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados del IPN (alineamientos).

8.3.1 Alineamiento de secuencias.

El alineamiento de secuencias muestra que la similitud en PTR1 de *T. cruzi* y PTR de *L. major* es muy grande con una de identidad de 45.4 % y un concenso de 60.4 % (fig. 25). Sin embargo los aminoácidos del sitio activo se conservan totalmente.

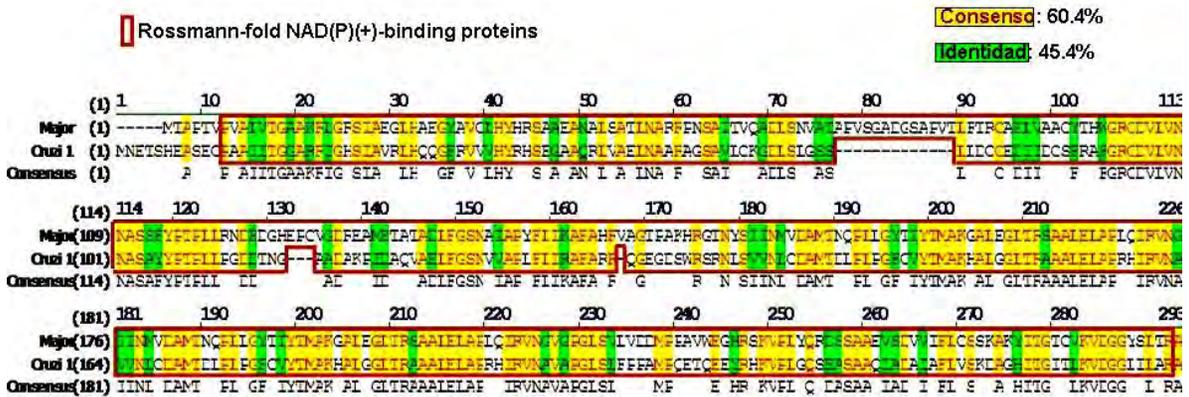


Figura 25. Mapa del alineamiento de PTR1 de *T. cruzi* y PTR *L. major*.

Al comparar las secuencias de los dos tipos de PTR de *PTR1* y *PTR2* prácticamente no existe diferencia entre ambas como lo muestra el análisis con una identidad de 96% y un consenso de 97.1%. La diferencia es muy pequeña.

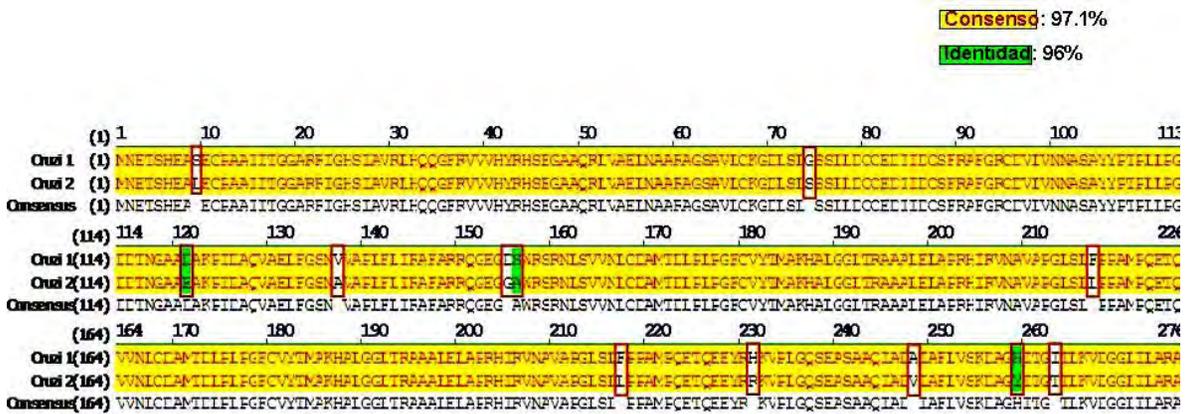


Figura 26. Alineamiento de PTR1 y PTR2 de *T. Cruzi*.

Adicionalmente se puede analizar la estructura tridimensional de las proteínas mediante los ángulos phi y psi utilizando las graficas de Ramachandran, esto nos permite tener idea de la distribución en el espacio de los aminoácidos, particularmente de los ángulos phi y psi, orientando así a las regiones que pertenecen a una hoja β -plegada o α -hélice. En el primer cuadrante se hallan las combinaciones de la hoja β , en el segundo cuadrante se hallan la hélice α derecha y los giros (loops); en el tercer cuadrante las combinaciones de la hélice α izquierda. La similitud de las gráficas (fig. 27) entre PTR2 de *T. cruzi* y PTR de *L. major* es notable por lo que espacialmente poseen una distribución similar de sus aminoácidos confirmando la similitud tanto lineal como tridimensional de las dos proteínas. Por lo tanto podemos pensar que triaminquinazolina (TAQ) se puede unir tanto a PTR de *L. major* (con la que ya fue co-cristalizada) como a

PTR2 de *T. cruzi*. Si esto es cierto entonces las afinidades deben similares como se demostró en el estudio de docking que se discute mas adelante.

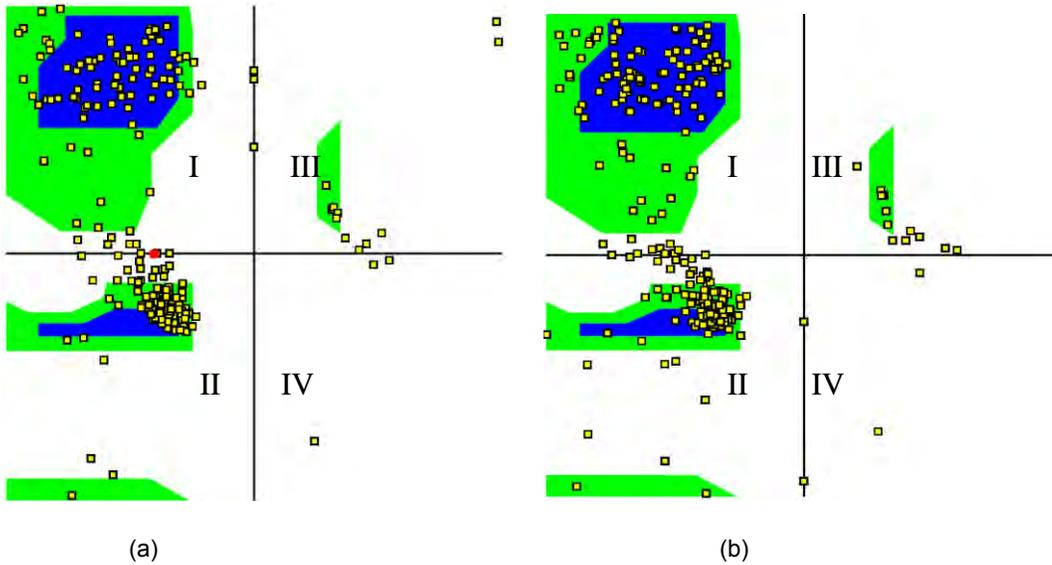


Figura 27. Graficas de Ramachandran de (a) PTR2 de *T. cruzi* y (b) PTR de *L. major*.

Por otra parte se analizaron las similitudes entre la DHFR humana y la de *T. cruzi* buscando encontrar similitudes y diferencias (fig.28). Aunque la identidad y el consenso son muy bajas (9.4 % y 13.4 % respectivamente) esto es así porque DHFR de *T. cruzi* es heterodimérica (con timidilato sintasa). El análisis más valioso es en la zona de DHFR marcada con café. El sitio de unión del folato que es el sitio al cual dirigimos el estudio de docking es muy parecido en ambas especies, aunque cambian en Phe46, Leu48 y Tyr178.

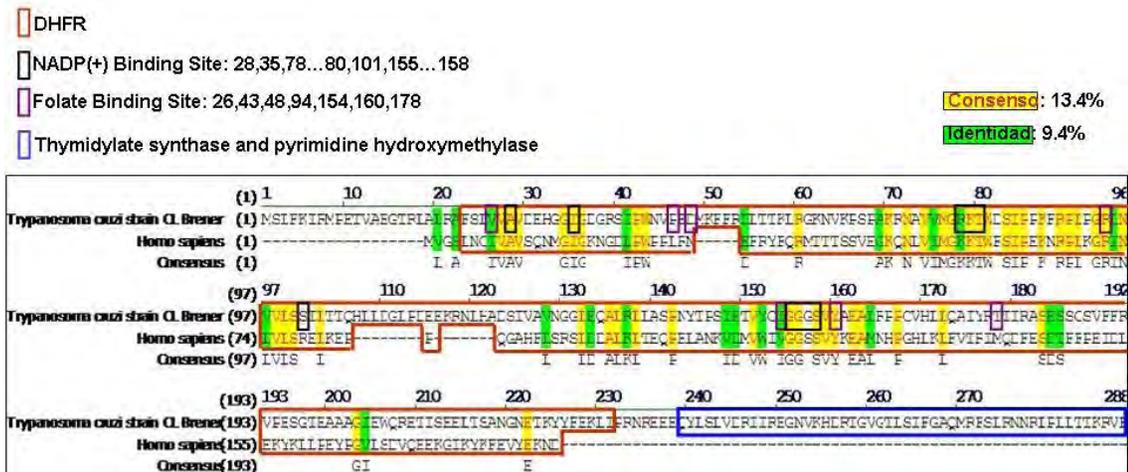


Figura 28. Alineamiento de secuencias entre DHFR humana y de *T. cruzi*.

Aunque existen sitios en los que hay aminoácidos diferentes pero con un comportamiento similar (identidad) como Val27, Ile154.

Estas diferencias pueden aportarnos datos valiosos para el diseño de inhibidores novedosos.

Por otra parte el alineamiento de la secuencia de DHFR de *T. cruzi* y PTR1 muestra que poseen muy bajo consenso porque DHFR esta como dímero con timidilato-sintasa, fue necesario hacer todo el alineamiento porque la semejanza se extiende hasta timidilato sintasa. Existen zonas comunes que en el futuro podrían ayudarnos a diseñar nuevas moléculas.

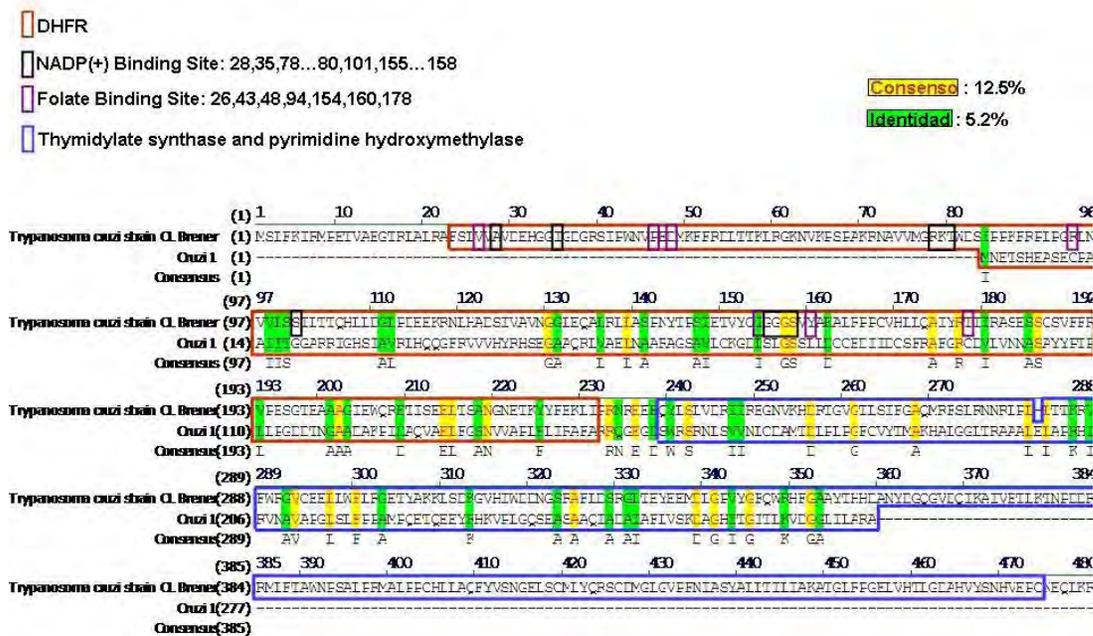


Figura 29. Alineamiento entre PTR1 y DHFR de *T. cruzi*.

8.3.2 Estabilidad de tautómeros de triaminquinazolina (TAQ).

En la Tabla 4 se muestran todos los tautómeros analizados y sus claves.

Tabla 4. Tautómeros de 2,4,6-triaminquinazolina (TAQ)

Clave	Estructura	Clave	Estructura
I		II'	
II		III'	
III		IV'	
IV		IV''	
V		IV'''	

El análisis de la distribución tautomérica y la estabilidad de los mismos se realizaron comparando los valores obtenidos de energía electrónica, energía interna, entalpía y energía libre de Gibbs. Las correcciones termodinámicas no resultaron ser tan importantes para el cálculo de la estabilidad de los tautómeros.

Tabla 5. Energías relativas al tautómero a (Kcal.)

		I-II	I-II'	I-III	I-III'	I-IV	I-IV'	I-IV''	I-IV'''
GAS	ΔE	12,1103058	10,485056	12,750993	18,528473	16,6704174	17,0299803	16,0830685	16,4846746
	ΔH	12,1103058	10,485056	12,751621	18,528473	16,6704174	17,0299803	16,0830685	16,4846746
	ΔG	12,1623891	10,39595	12,487439	18,224758	16,4238061	16,5009898	15,6444393	16,2073154
	$\Delta E.E.$	12,1857952	10,517436	12,783247	18,80966	16,8037631	17,1825906	16,1716101	16,5939867
AGUA	ΔE	7,53638909	7,6079252	9,0304892	10,930588	11,859302	12,2922836	12,3023237	11,7099548
	ΔH	7,53576159	7,6072977	9,0298617	10,92996	11,8586745	12,2916561	12,3016962	11,7093273
	ΔG	7,76543006	7,7566449	8,8855345	10,821401	11,920798	12,2458479	12,2496129	11,791531
	$\Delta E.E.$	7,7715169	7,7708266	9,2414579	11,202739	12,2949819	12,6473912	12,6702326	12,1270603
DMSO	ΔE	7,6687936	7,862694	9,1258707	11,159629	11,9515459	12,5395223	12,5539551	11,7752158
	ΔH	7,6687936	7,862694	9,1264982	11,159629	11,9515459	12,5395223	12,5539551	11,7752158
	ΔG	7,88591189	8,0038837	8,9595806	11,039775	11,9948441	12,4673587	12,481164	11,8335742
	$\Delta E.E.$	7,89708156	7,9928395	9,3218419	11,416971	12,3701575	12,8544694	12,879256	12,1738098
THF	ΔE	8,71108688	8,3402288	9,7696954	12,759778	12,9511686	13,4067405	13,1733069	12,7535658
	ΔH	8,71171439	8,3402288	9,7696954	12,759778	12,9511686	13,407368	13,1733069	12,7541306
	ΔG	8,87988693	8,4130199	9,5789325	12,595998	12,9172831	13,2285278	13,0063894	12,7327953
	$\Delta E.E.$	8,87267058	8,4279546	9,9150894	12,991141	13,278352	13,6592503	13,4212987	13,062175

En la Tabla 5 se presentan los datos energéticos relativos al tautómero más estable. Los datos indican que utilizando las correcciones termodinámicas los valores nunca invierten la estabilidad que utilizando solo la energía electrónica como punto de comparación, así mismo se muestra una tendencia hacia la estabilización de algunos tautómeros que en fase gas son poco estables. Ya sea en fase gaseosa o en disolvente, el tautómero I es el predominante; sin embargo, se observa un claro decremento en su estabilidad en disolventes polares. En este comportamiento deben contribuir factores tales como la formación de enlaces de hidrógeno que estabilicen en mayor medida las moléculas propuestas, las cuales no son consideradas en los métodos continuos.

Es de notar que moléculas que en fase gaseosa son aparentemente inestables, en disolventes polares ganan energía de estabilización. Esta tendencia es menor en THF cuya constante dieléctrica se encuentra muy por debajo de DMSO y agua.

En la Tabla 6 se presentan las constantes de equilibrio determinadas por la ecuación de Boltzmann que utiliza como criterio la energía libre de Gibbs.

Tabla 6 Constantes de equilibrio relativas al tautómero I

	I→II	I→II'	I→III	I→III'	I→IV	I→IV'	I→IV''	I→IV'''
GAS	1,2009E-09	2,372E-08	6,93575E-10	4,296E-14	8,99428E-13	7,8951E-13	3,3542E-12	1,2964E-12
AGUA	2,0158E-06	2,046E-06	3,04025E-07	1,156E-08	1,80591E-09	1,043E-09	1,0364E-09	2,2465E-09
DMSO	1,6447E-06	1,348E-06	2,68287E-07	7,996E-09	1,59363E-09	7,175E-10	7,0096E-10	2,0925E-09
THF	3,0694E-07	6,753E-07	9,42619E-08	5,774E-10	3,35602E-10	1,984E-10	2,8872E-10	4,5829E-10

En la Tabla 7 se presenta el análisis de la distribución como la suma del porcentaje de abundancia de los tautómeros diferentes de I considerados en este estudio; lo cual indica que los otros tautómeros se encuentran en cantidades muy pequeñas. De allí que es necesario realizar un estudio más completo que incluya interacciones como enlaces de hidrógeno entre tautómeros y disolvente; en particular con el agua, ya que tiene la capacidad de ser dador y aceptor de los mismos. Curiosamente es en este disolvente donde se encuentra el porcentaje mayor de los otros tautómeros por lo que en agua se incrementa la estabilidad de los mismos.

Tabla 7. Porcentaje y estabilidad de los tautómeros

	Porcentaje de tautómeros diferentes de I	Estabilidad de tautómeros
GAS	2,56198E-06	I-II'-II-III-IV''-IV'''-IV-IV'-III'
AGUA	0,000438344	I-II'=II-III-III'-IV'''≈IV-IV'=IV''
DMSO	0,000327364	I-II-II'-III-III'-IV'''-IV-IV'-IV''
THF	0,000107832	I-II'-II-III-III'-IV'''-IV-IV''-IV'

En la Tabla 8 se presentan los momentos dipolares determinados para los diferentes tautómeros tanto en fase gaseosa como en solución. Claramente se muestra la tendencia al incremento del momento dipolar y esto podría ser la respuesta a la pérdida de estabilidad del tautómero I.

Tabla 8. Momentos dipolares de cada uno de los tautómeros

	Momentos dipolares de cada uno de los tautómeros								
	I	II	II'	III	III'	IV	IV'	IV''	IV'''
AGUA	5,4051	3,9816	0,4075	9,7117	10,2895	2,1289	8,3313	5,7214	5,1804
DMSO	5,3108	3,9203	0,449	9,6282	10,2112	2,1351	8,3103	5,6989	5,1488
THF	4,7982	3,4804	0,5318	8,993	9,5849	2,0691	7,9139	5,4686	4,8553
GAS	2,8815	2,0688	0,7531	6,4433	7,032	17,676	6,1813	4,3044	3,7151

Para el análisis de longitud de enlace y planaridad de las aminas de TAQ se tomó sólo el tautómero predominante el cual se numeró como se muestra en la Fig. 30.

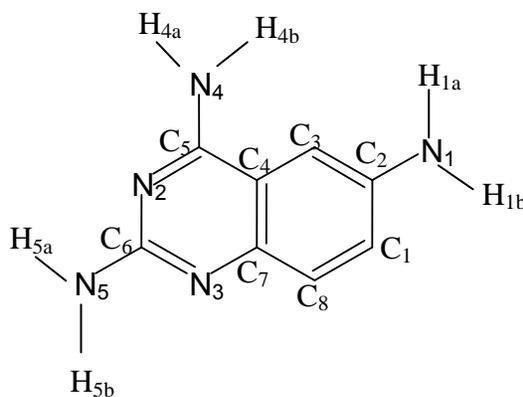


Figura 30. Numeración establecida para TAQ

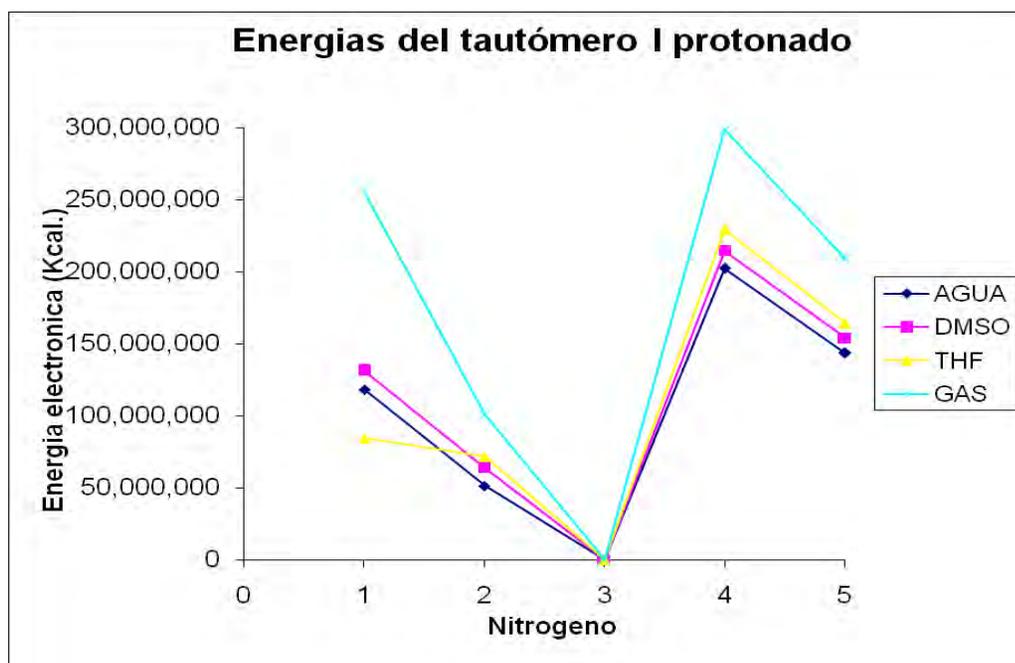
En la Tabla 9 se muestran algunos de los ángulos diedros de las aminas analizando la planaridad de las mismas con respecto al anillo base.

Tabla 9. Angulo dihedro de las aminas en el tautómero predominante I

	Angulo dihedro de las aminas en el tautómero predominante I					
	H _{1a} -N ₁ -C ₂ -C ₃	H _{1b} -N ₁ -C ₂ -C ₁	H _{4a} -N ₄ -C ₅ -N ₂	H _{4b} -N ₄ -C ₅ -C ₄	H _{5a} -N ₅ -C ₆ -N ₂	H _{5b} -N ₅ -C ₆ -N ₃
GAS	23,42842	30,38052	12,29507	30,62489	20,49564	17,93083
AGUA	24,68566	29,48428	11,61253	19,66724	23,00712	20,70496
DMSO	24,81168	29,05852	11,65822	20,42628	23,07125	20,55893
THF	24,79834	29,38602	12,49702	23,37313	22,90827	20,28045

Los resultados indican que el efecto del disolvente es importante y es posible decir que las aminas tienden a la planaridad cuando tienen este efecto. La disminución del ángulo diedro es máxima en agua y en DMSO. Sin embargo, aún en el solvente THF se observa este fenómeno, lo que podría indicar la conjugación de los pares libres de los nitrógenos con el anillo y disminución de su nucleofilia. Este cambio prácticamente es nulo con respecto al nitrógeno 1, que podría ser el más nucleófilo.

Así mismo, se modelaron los tautómeros protonados en diferentes disolventes con una molécula de agua para observar la afinidad del mismo y utilizar este criterio como primera aproximación a la capacidad acido-base de la molécula. En la Grafica 5 se muestran los valores de energía electrónica relativos al más estable y establece cual protonación estabiliza a la molécula. Aunque esto solamente considera prácticamente la posibilidad de ser protonada, no indica que tan estable debe ser como ion en cada uno de los disolventes.



Grafica. 5. Análisis de la estabilidad relativa del tautómero a protonado.

El análisis del momento dipolar y de la variación de la distancia N-H del átomo de nitrógeno protonado (Tabla 10) indican que el enlace es más fuerte cuando TAQ esta protonada en el nitrógeno de l aposición 3, lo que indica que éste deber ser el más básico dado que tiene la menor longitud de enlace. Sin embargo, esto no significa que sea el más nucleófilico, debido sobre todo a que tanto el nitrógeno 2 como el 3 están

impedidos estéricamente. Las aminas que deberían tener la mejor nucleofilia serían la 1, 4 y 5. El análisis de la estabilidad del tautómero I, protonado en esas posiciones, nos ayudaría a diferenciarlos en su capacidad nucleofílica. En todos los disolventes, el más estable es la especie protonada en el nitrógeno 1, lo cual indica que éste debe ser el más nucleofílico. En la literatura se reportan reacciones tipo S_N2 de triaminquinazolina con haluros de alquilo, en donde mayoritariamente obtiene la sustitución en el nitrógeno 1, y en menor proporción en las posiciones 2 y 3. Estos resultados experimentales apoyan estos datos teóricos planteados, aunque un estudio más detallado, implicaría modelar la evolución de este tipo de reacciones.

Tabla 10. Momentos dipolares (debye) del tautómero I protonado

		Momentos dipolares (debye) del tautómero a protonado en cada nitrógeno y distancias N-H en Å° (Nitrógeno protonado).				
		N1	N2	N3	N4	N5
AGUA	μ	18,2224	11,1235	4,5333	12,119	9,8909
	distancia N-H	1,07138	1,03397	1,0392	1,08068	1,07394
DMSO	μ	17,8966	11,0025	3,8623	12,9645	9,7942
	distancia N-H	1,07144	1,03293	1,02889	1,08208	1,0741
THF	μ	16,6831	10,3998	3,8704	11,2577	7,1498
	distancia N-H	1,06829	1,03093	1,02635	1,07684	1,07177
GAS	μ	12,3964	7,8418	3,2278	8,5296	6,5534
	distancia N-H	1,058	1,02414	1,02164	1,06087	1,05968

Esta tendencia se observó anteriormente en la estabilidad de los tautómeros. Este tipo de estudios continuo-discretos se reportan en la literatura como buenos métodos para hacer aproximaciones acido-base. Así mismo, los puentes de hidrógeno hacen que la molécula logre la máxima planaridad posible para permitir una máxima conjugación de los electrones. Esto se resume en la Tabla 11.

Tabla 11. Ángulos dihedros de TAQ protonada en el nitrógeno 3.

	Ángulos dihedros de TAQ protonada en el nitrógeno 3					
	H _{1a} -N ₁ -C ₂ -C ₃	H _{1b} -N ₁ -C ₂ -C ₁	H _{4a} -N ₄ -C ₅ -N ₂	H _{4b} -N ₄ -C ₅ -C ₄	H _{5a} -N ₅ -C ₆ -N ₂	H _{5b} -N ₅ -C ₆ -N ₃
GAS	17,11932	18,11786	0,50726	1,44703	0,38845	0,66129
AGUA	23,06292	25,81851	0,2143	0,86117	5,82817	7,93681
DMSO	23,11635	25,55414	0,11031	0,4133	0,07432	0,03357
THF	22,47908	24,53364	0,44393	1,17387	0,43705	0,43466

8.3.3. Acoplamiento molecular (*Docking*).

Estos estudios se realizaron con la finalidad de encontrar alguna correlación entre la actividad biológica y alguno de los modelos teóricos generados. Así mismo para conocer las interacciones de importancia con DHFR y PTR.

Los resultados del acoplamiento molecular utilizando Autodock3 con PTR1 de *L. major* y PTR2 se muestran en las Tablas 12 y 13.

Tabla 12. Resultados de <i>docking</i> para PTR con Autodock3		
<i>Derivados acetilados</i>		
	<i>L. major (ptr1)</i>	<i>T. cruzi (ptr2)</i>
	Kd/(nM)/ΔG (Kcal/mol)	Kd/(nM)/ΔG (Kcal/mol)
9	520/-8.57	298/-8.898
1	7.35/-11.102	1.03/-12.258
3	16.6/-10.704	7.54/-11.08
PIRIM	560/-8.52	345/-8.82
Orden de potencia	1>3>9>PIRIM	1>3> 9>PIRIM

Tabla 13. Resultados de <i>docking</i> para PTR con Autodock3		
<i>Derivados no acetilados</i>		
	<i>L. major (ptr1)</i>	<i>T. cruzi (ptr2)</i>
	Kd/(nM)/ΔG (Kcal/mol)	Kd/(nM)/ΔG (Kcal/mol)
TAQ	1290/-8.036	402/-8.726
2	6.55/-11.162	1.19/-12.17
4	9.99/-10.918	4.95/-11.334
6	0.329/-12.938	78.5/-12.976
PIRIM	560/-8.52	345/-8.82
Orden de potencia	6>4>2>PIRIM>TAQ	6>2>4>PIRIM>TAQ

En este estudio se pretendía corroborar que la afinidad de los ligandos por PTR de *T. cruzi* y *L. major* fueran similares. Como se puede ver, las Kd y las energías de unión de los compuestos lo son. Este resultado apoya la idea de que ambos sitios de unión son similares. Igualmente la tendencia en el orden de potencia es similar tanto en los derivados acetilados como en los no acetilados. El compuesto más potente de ambas series resulta ser **6**.

Por otro lado, gracias a estos estudios fue posible identificar dos sitios en PTR2 de *T. cruzi*, la zona I que es una zona altamente lipofílica y por el cual fue muy afín **4** y **6** (con sustituyente ferroceno y bencimidazol, respectivamente). Del lado opuesto, la zona II altamente hidrofílica (argininas) y por el cual fue muy afín el derivado **2** al formar enlace de hidrógeno entre el grupo nitro y la arginina 21 (Arg21) (Fig. 31).

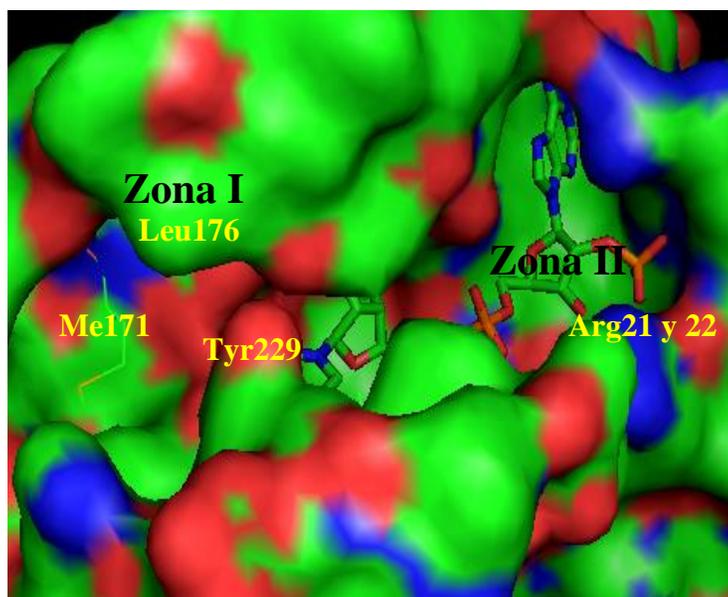


Figura 31. Vista del sitio catalítico de PTR2 de *T. cruzi*.

Los resultados del acoplamiento molecular utilizando Autodock3 con DHFR de *T. cruzi* y humana se muestran en las Tablas 14 y 15.

Tabla 14. Resultados de <i>docking</i> para DHFR con Autodock3			
<i>Híbridos no acetilados</i>			
	Humana	<i>Trypanosoma cruzi</i>	
	Kd/(nM)/ ΔG (Kcal/mol)	Kd/(nM)/ ΔG (Kcal/mol)	Selectividad
TAQ	781/-8.33	1.640 / -7.89	2.10
2	10.4/-10.886	5.53/ -11.26	0.53
4	4.01/-11.46	15.5/-10.646	3.86
6	0.111/-13.572	7.47/-11.194	66.83
PIRIM	80.3/-9.68	220/-9.08	2.14
Orden de potencia	6>4>2> PIRIM>TAQ		6>4>2>PIRIM>TAQ

En cuanto a derivados no acetilados el más potente con la enzima humana como con la de *T. cruzi* resulta ser **6**, y la selectividad de **4** se pierde.

Tabla 15. Resultados de <i>docking</i> para DHFR con Autodock3			
<i>Híbridos acetilados</i>			
	Humana	<i>Trypanosoma cruzi</i>	
	Kd/(nM)/ ΔG (Kcal/mol)	Kd/(nM)/ ΔG (Kcal/mol)	Selectividad
9	262.6/-8.97	263/-8.97	1.00
1	6.914/-11.154	19.7/-10.592	2.86
3	25.944/-10.48	12.6/-10.78	0.48
PIRIM	80.3/-9.68	220/-9.08	2.14
Orden de potencia	1>3>PIRIM>9	3>1>PIRIM>9	

En cuanto a derivados acetilados el compuesto más activo resulta ser **3** con *T. cruzi*, sin embargo con la enzima humana es el compuesto **1**. Existe cierta selectividad por DHFR de *T. cruzi* con el compuesto **3**.

Igualmente, para DHFR se determinaron dos zonas. La zona I altamente lipofílica cercana a fenilalanina88 (Phe88) y la zona II del cual forma parte la arginina 94 (Arg94) (Fig. 32). Los derivados nitrados (**1** y **2**) interactuaron principalmente con Arg94 (puente de hidrógeno del grupo nitro con arginina) y los derivados **3**, **4**, **5** y **6** interactuaron con los aminoácidos de la zona II.

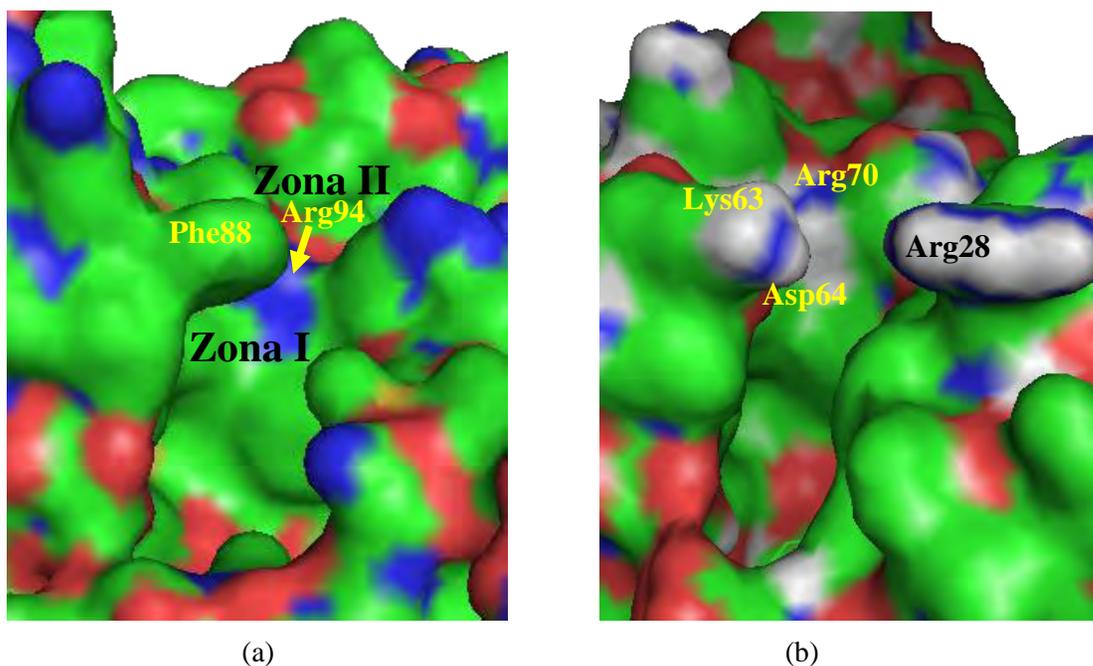


Figura 32. (a) Sitio activo de DHFR de *T. cruzi* (b) Sitio activo de DHFR de humano.

Fue interesante comparar el sitio de unión de DHFR de *T. cruzi* y humano. El sitio catalítico de la enzima humana es altamente hidrofílico, por lo que sustituyentes lipofílicos deberían interactuar mejor con DHFR de *T. cruzi* que a la humana. A partir de los resultados generados por Autodock3 para DHFR de *T. cruzi* y los datos encontrados en la bibliografía, se decidió que los aminoácidos que se considerarían flexibles para DHFR de *T. cruzi* con Autodock4 fueran fenilalanina 88, fenilalanina 52 y arginina 94. Los resultados del acoplamiento molecular utilizando Autodock4 con DHFR de *T. cruzi* se muestran en las Tablas 16 y 17.

Los resultados para los derivados acetilados muestran que el más potente de los ligandos es **3** (derivado de ferroceno). Por otro lado, la variación de energía con respecto a los resultados obtenidos con Autodock3 son considerables, ya que a nivel molecular, y particularmente en sistemas biológicos, las variaciones aunque pequeñas pueden ser demasiado importantes para ser menospreciadas.

Tabla 16. Resultados de <i>docking</i> para DHFR con Autodock4		
	<i>Derivados no acetilados</i>	
	AUTODOCK 4 Residuos flexibles-Phe88, Phe52, Arg94	Diferencia de energía de unión entre ADT4 y ADT3
	Kd/(pM)/ ΔG (Kcal/mol)	
9	730.7/-12.46	-2.76
1	39.9/-14.19	-2.69
3	8.76/-15.09	-3.524
5	31.37/-14.33	-2.726
PIRIM	1130/-12.21	-3.13
Orden de potencia	3>5>1>9>PIRIM	

En cuanto a los derivados no acetilados, el orden de potencia obtenido con respecto a los derivados acetilados es exactamente el mismo; aunque los valores energéticos varían. Igualmente el más potente de todos los compuestos es **4** (derivado de ferroceno).

Tabla 17. Resultados de docking para DHFR con Autodock4		
	Derivados no acetilados	
	AUTODOCK 4 Residuos flexibles-Phe88, Phe52, Arg94	Diferencia de energía de unión entre ADT4 y ADT3
	Kd/(pM)/ ΔG (Kcal/mol)	
TAQ	15520/-10.65	-2.79
2	59.45/-13.95	-3.09
4	10.87/-14.17	-2.71
6	62.47/-13.92	-2.73
PIRIM	1130/-12.21	-3.13
Orden de potencia	4>2>6>PIRIM>TAQ	

Los aminoácidos con los que interactúa la quinazolina se muestran en la Fig. 33. Estas interacciones son principalmente a través de enlaces de hidrógeno. Esta interacción es común en todos los derivados no acetilados, aunque los derivados acetilados interactúan en una forma similar.

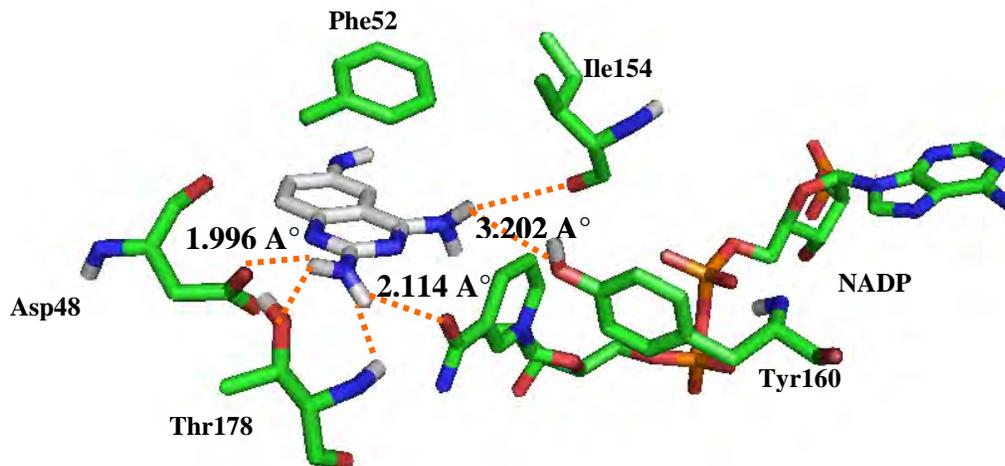


Figura 33. Principales interacciones de triaminquinazolina (TAQ) con DHFR de *T. cruzi*. Las interacciones de los derivados no acetilados (**2**, **4** y **6**) se muestran en la Fig. 34. La interacción de **2** se repite en este análisis (enlace de hidrógeno del grupo nitro y Arg94). Aunque es necesario mencionar que a través del anillo de nitrobencilo, éste interactúa con Phe88 y Phe52 (9interacciones hidrofóbicas). La interacción del compuesto **4** con Phe88 a través del grupo ferroceno denota la alta lipofilia de este sitio,

debido a que fue el más potente de los derivados no acetilados (interacciones lipofílicas). Igualmente el compuesto **6** interactúa con la zona lipofílica a través del anillo de bencimidazol (interacciones hidrofóbicas).

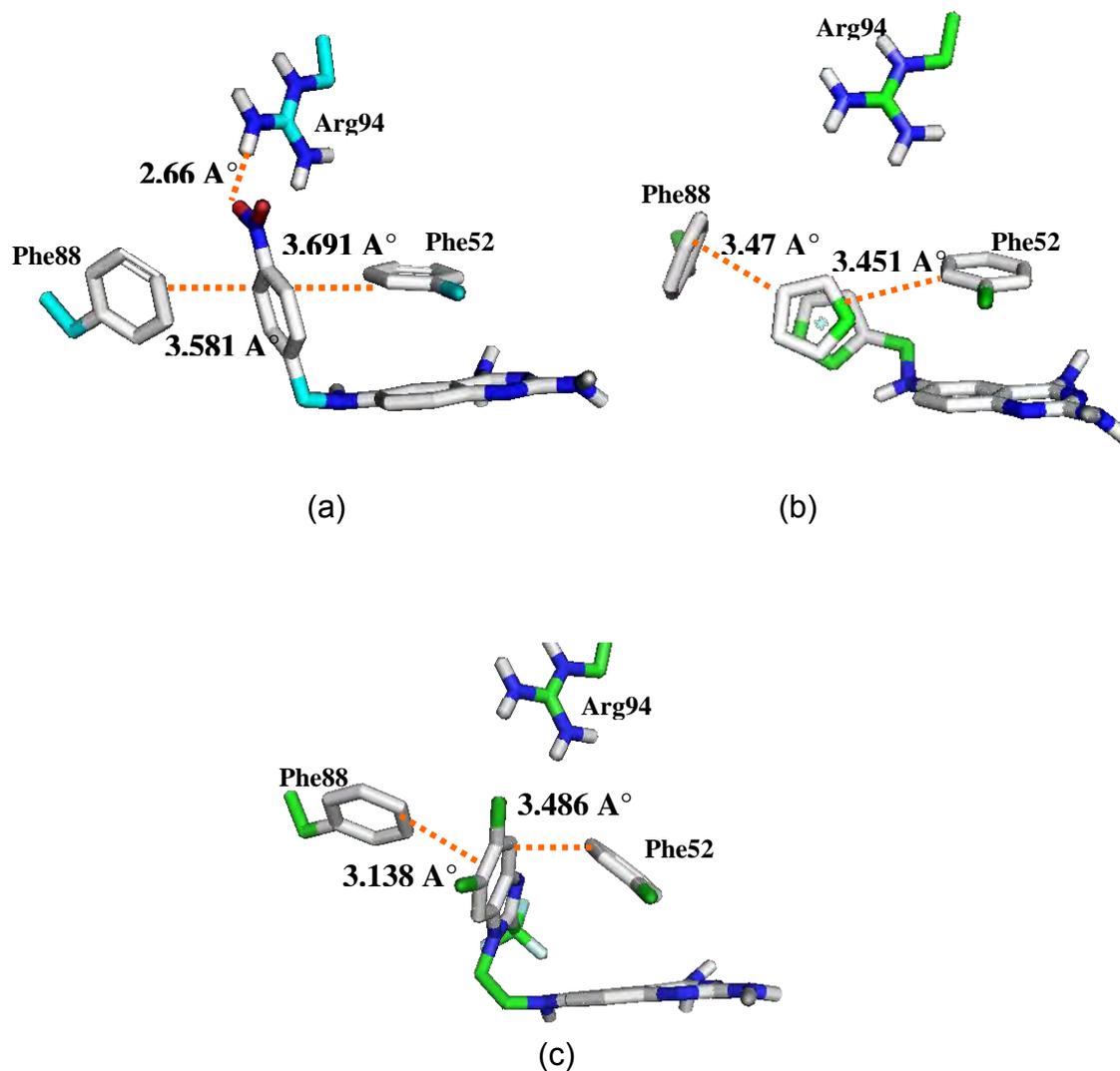


Figura 34. Interacciones principales del sustituyente de (a) **2** (b) **4** (c) **6**, con DHFR de *T. Cruzi*.

Se realizó un estudio con un derivado fenólico análogo al sintetizado y evaluado por Gilbert et al. Como se muestra en la Fig.35.

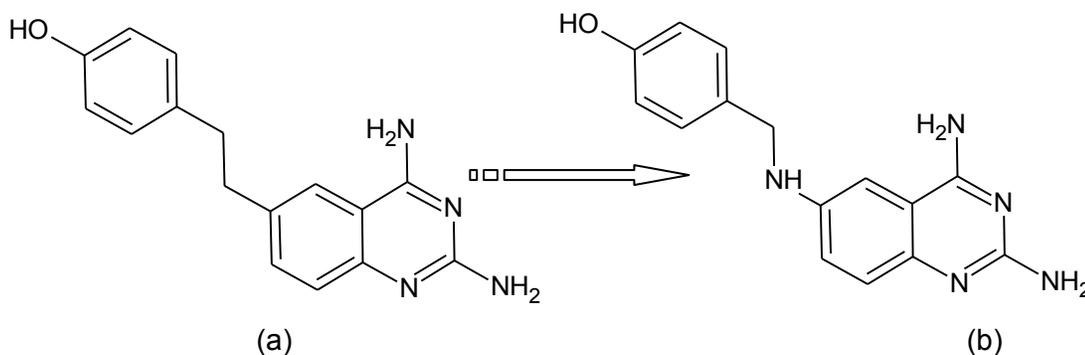


Figura 35. (a) Derivado de Gilbert et al. (b) derivado análogo (**2b**).

Como se observa en la Fig. 35, el análogo **2b** es un derivado de los compuestos sintetizados en esta tesis. La intención fue conocer si este compuesto podría interactuar con Arg94 a través del grupo OH de una forma similar al grupo nitro. Los resultados de este estudio indican que la conformación de **2b** es similar al derivado **2**, por lo que se podría pensar que la selectividad observada en el compuesto de Gilbert et al. esta dada de esta forma, lo cual no lograron explicar con su modelo teórico. La Arg94 presente en DHFR humano, se encuentra más alejado y por tanto, menos disponible para la formación del enlace de hidrógeno. La interacción del grupo nitroaromático es mucho mas fuerte que el fenol, pero la actividad reportada para el derivado de Gilbert sugiere que el modelo desarrollado en esta tesis se debe mejorar sintetizando el derivado fenólico.

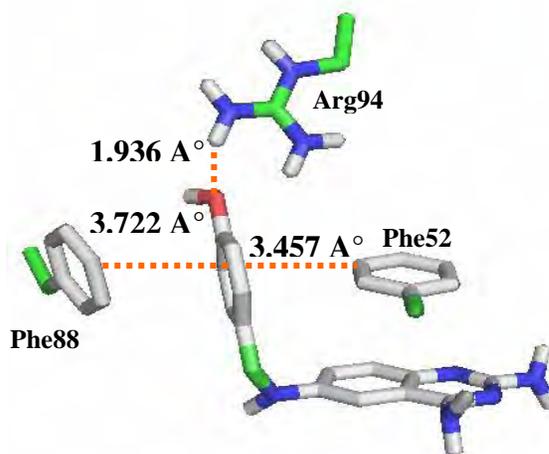
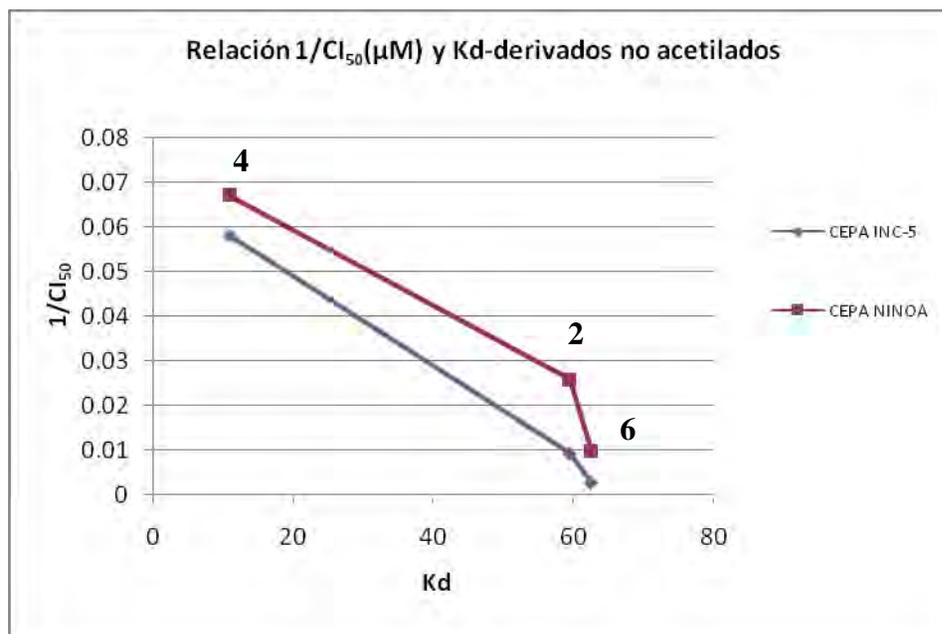


Figura 36. Interacción de **2b** con DHFR de *T. cruzi*.

Los resultados de este modelo concuerdan con la tendencia de las pruebas biológicas con los derivados no acetilados, aunque los derivados acetilados deberían ser mucho

más potentes. Asumiendo que el modelo es bueno, esto podría explicarse tal vez desde un punto de vista de transporte de la molécula a través de la membrana, haciéndose deficiente por el alto peso molecular y por que la entidad amidina ya no se encuentra disponible para ser reconocida por los transportadores P2 presentes en *T. cruzi*^{47,48}.



Grafica 6. Relación $1/Cl_{50}$ vs Kd (teórico-ADT4) en dos cepas de *T. cruzi*.

La relación entre los Kd's experimentales y los Cl₅₀ de los compuestos **4**, **2**, **6**, se muestran en la Grafica 6. Es evidente que existe cierta relación aunque se necesita un mayor número de compuestos para demostrar que el modelo es bueno para predecir actividades, incluso esto depende del propio campo de fuerzas que ocupa autodock.

De los tres derivados acetilados, el compuesto **5** resultó ser el más potente. Esto nos está dando un dato valioso porque es posible que este compuesto pueda trasladarse por la membrana biológica del parásito con mayor facilidad. Existe información en la literatura de derivados bencimidazólicos que pueden ser transportados fácilmente por difusión simple⁴⁹, es posible que este fenómeno esté ocurriendo en este caso y que la molécula sea capaz de llegar intacta al receptor (DHFR) aunque no es más activo que su homólogo no acetilado (como resultaron con Autodock3 y 4).

6.3.4. Análisis de los ligandos.

Los datos mostrados en esta sección se calcularon utilizando dos tipos de funcionales, uno híbrido (B3LYP) y otro local puro (LSDA). Se sabe que los funcionales híbridos son buenos métodos de cálculo para correlacionar los datos obtenidos de esta forma con los datos experimentales. Esto es debido principalmente a que existe cancelación de errores. Los datos mostrados aquí fueron obtenidos mediante el funcional puro. Cabe mencionar que la tendencia entre los dos funcionales es la misma y que este estudio constituye una primera aproximación.

Primeramente se calculó el momento dipolar de los híbridos sintetizados. Los datos del momento dipolar μ se muestran en la Tabla 15. Los datos de actividad biológica indican que la tendencia es la misma en ambas cepas de *T. cruzi* por lo que en la Tabla 18 solo se muestra un valor relativo de actividad para cada compuesto; con el número 1 se muestra al más activo y con el número 4 al menos activo.

Derivados acetilados			Derivados no acetilados		
Molécula	μ	Tendencia en la actividad	Molécula	μ	Tendencia en la actividad
1	6.8551	2	2	7.1745	2
3	8.2851	3	4	3.0161	1
5	4.1725	1	6	5.0991	3
Pirim	2.2813	4	Pirim	2.2813	4

Moléculas con un momento dipolar entre 3 a 7 deben ser activas para compuesto desacetilados. Un punto a destacar lo constituye la diferencia en el momento dipolar y actividad biológica que presentan los derivados **3** (pobre actividad) y **4** (buena actividad), en ellos la variación del momento dipolar es enorme. Los datos presentados podrían ayudarnos para el diseño de nuevas moléculas como derivados de **4**, las cuales deben tener momentos dipolares cercanos a 3.

Otra propiedad determinada fue la densidad electrónica, la cual fue “mapeada” con el potencial electrostático a un isovalor de 0.0004 (Fig. 37). El compuesto **2** posee una fuerte densidad electrónica en el grupo nitro. Asumiendo que la molécula es capaz de llegar al sitio activo de la DHFR, esta densidad podría ser importante para la interacción con algún aminoácido polar como la arginina (como lo muestran los estudios con Autodock3 y Autodock4). Por otro lado, el compuesto **4** no posee una gran densidad electrónica en la entidad ferroceno, el cual de esta manera podría interactuar en una

zona lipofílica de la DHFR (Phe88) (Fig. 34). A pesar de que la polaridad aumenta en los derivados acetilados, prácticamente toda la densidad se concentra en los grupos carbonilos por lo que el resto de la molécula tiene baja densidad, dando lugar a interacciones lipofílicas, principalmente.

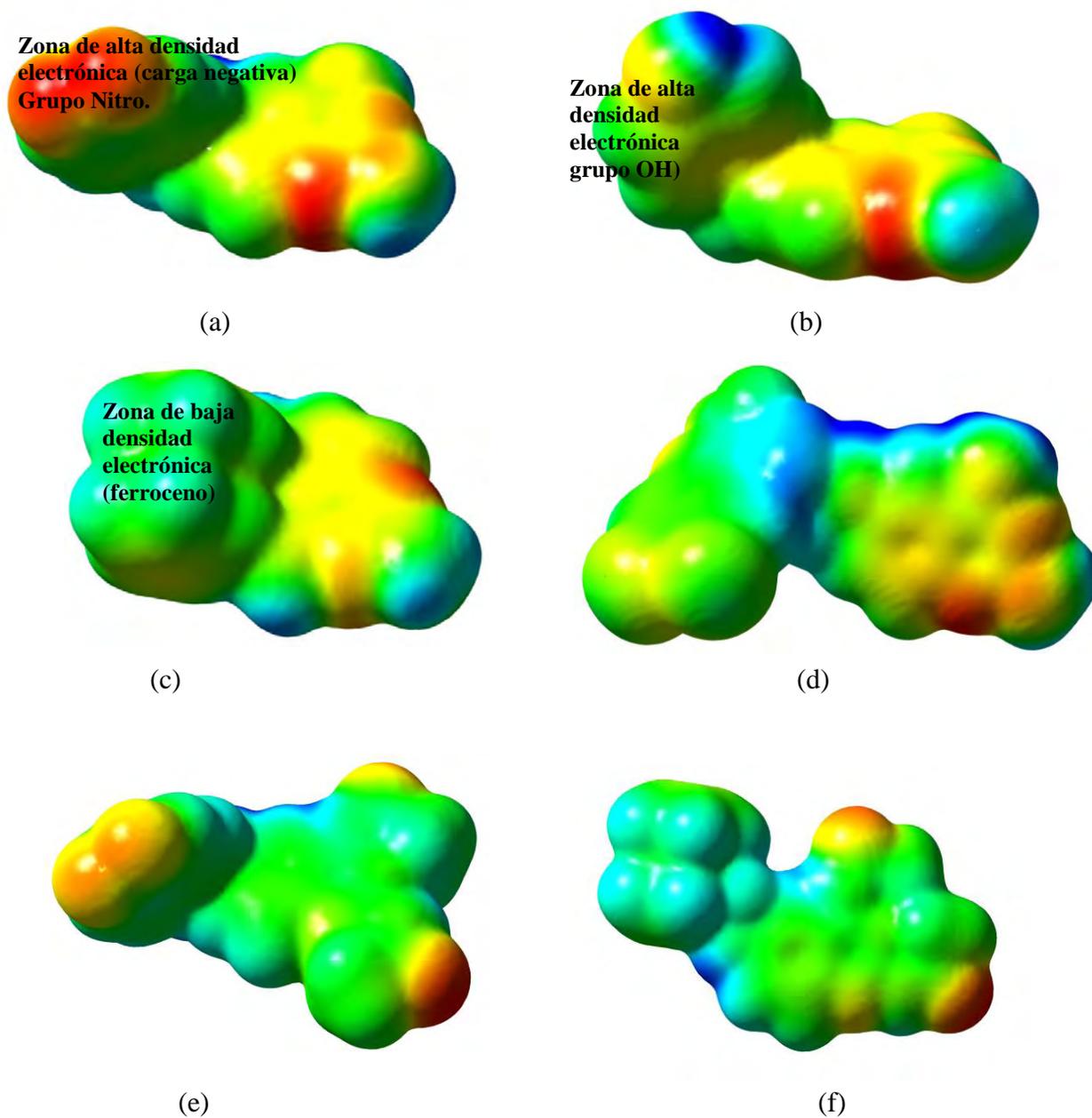
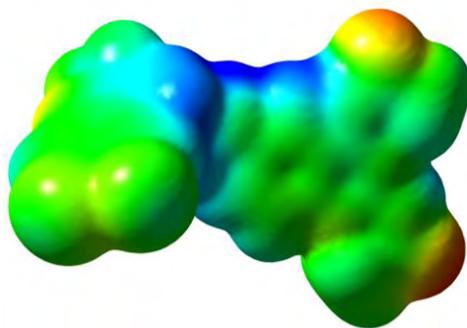


Figura 37. Densidad electrónica de los derivados mapeados con el potencial electrostático de (a) **2** (b) **2a** (c) **4** (d) **6** (e) **1** (f) **3** (g) **5**, a un isovalor de 0.004 y un nivel de teoría LSDA 6-31G**.



(g)

Figura 37. (continuación).

El caso del derivado más activo **4** merece un análisis detallado tanto por su actividad como por ser organometálico. En este compuesto tanto el orbital molecular ocupado más alto y el orbital desocupado más bajo (LUMO) se localizan sobre la quinazolina. Es interesante observar que el grupo ferroceno posee una parte del HOMO en el átomo de Fe. Se sabe que esta zona es muy básica y que puede protonarse fácilmente, lo que esta de acuerdo a la localización de este orbital en la molécula.

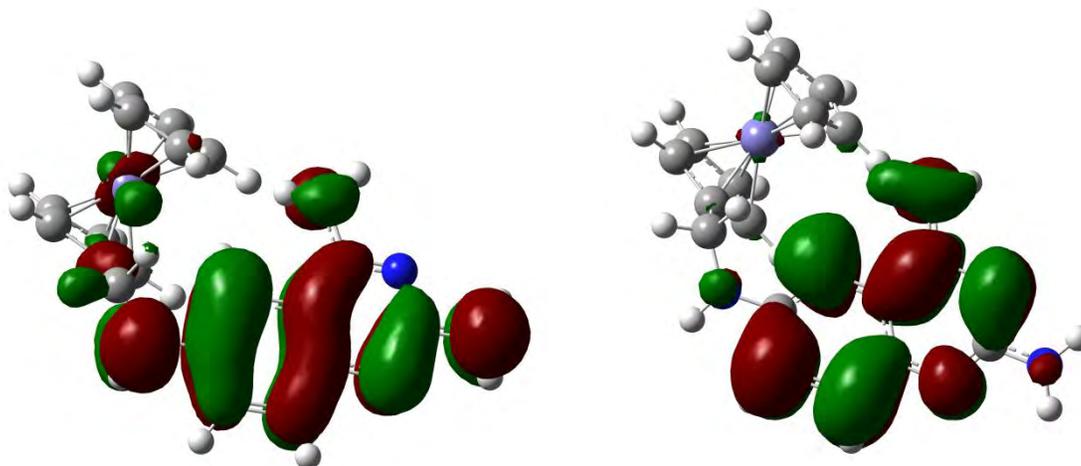


Figura 38. (a) Homo, (b) Lumo, del derivado **B2**.

La siguiente parte de este análisis sólo se realizó sobre los derivados no acetilados. Si suponemos que la quinazolina recibe poca influencia de los sustituyentes, entonces las cargas deberían ser similares en los tres compuestos (**1**, **3** y **5**) y la diferentes potencias solo estarían dada por los sustituyentes. Esta hipótesis se verifica mediante un análisis más detallado de las mismas como se muestra en la Tabla 16. Los desplazamientos de las señales en RMN de quinazolina sugieren que la influencia de los sustituyentes es

mínima, debido en parte a que la molécula no está conjugada con los mismos. De manera cualitativa esto se puede observar en los mapas de potencial electrostático.

Para estudiar la participación de los sustituyentes en la actividad biológica de las quinazolininas se determinaron las cargas de Mulliken, las cargas NBO (Natural Bonding Analysis), y las derivadas del potencial electrostático (ESP). Para ello, las moléculas se dividieron en dos zonas, una que corresponde al anillo de quinazolina y otra al sustituyente. Se compararon las cargas de algunos de los átomos de la quinazolina para analizar la influencia del sustituyente sobre ellas. Las Gráficas 7, 8 y 9 muestran que el anillo se comporta de manera muy similar en los tres compuestos, solo es influenciado en el caso de los compuestos **5** y **6** por el grupo trifluorometilo. Incluso el compuesto de prueba **2b** se comporta en esta zona de manera similar.

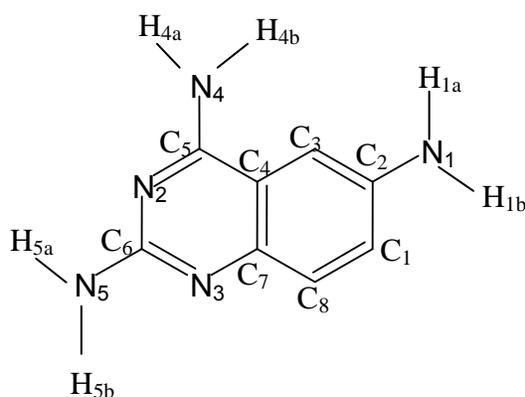
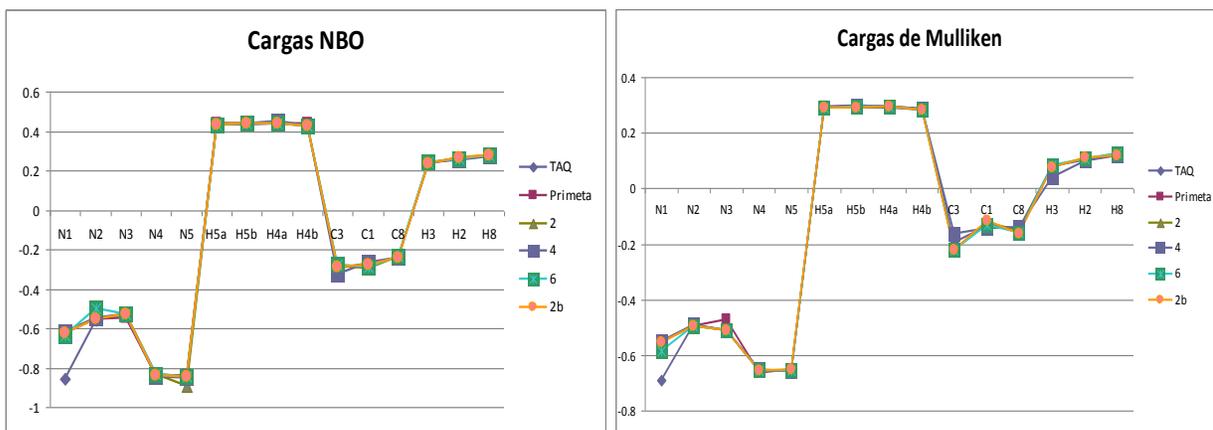


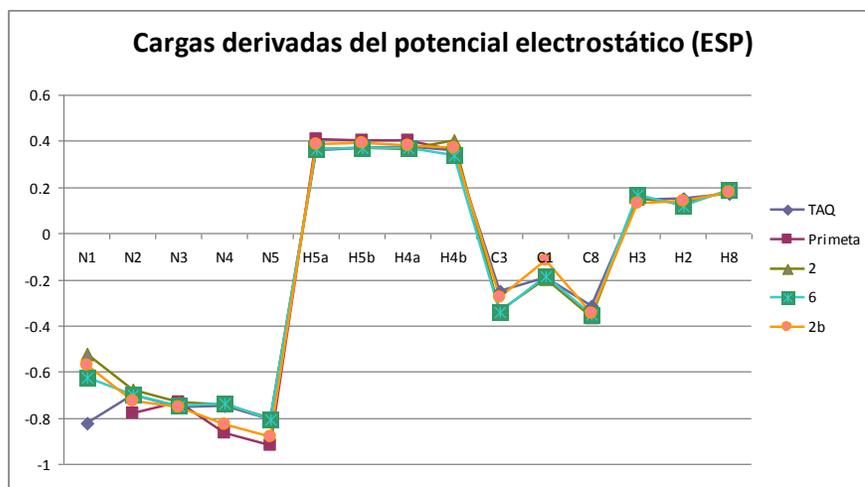
Figura 39. Numeración utilizada para el análisis de cargas.



(7)

(8)

Gráficas 7, 8 y 9. Gráficas de las cargas de los derivados en algunos átomos seleccionados de manera comparativa del anillo de quinazolina (7) Cargas NBO (8) Cargas de Mulliken (9) Cargas ESP (derivadas del potencial electrostático).



(9)

Graficas 7, 8 y 9. (continuación).

En particular los átomos de hidrógeno unidos a los nitrógenos, que según el estudio docking son los que estabilizan a la molécula en su unión a la DHFR poseen prácticamente la misma carga. Por lo tanto, la potencia deberá estar dada por el sustituyente, es decir las interacciones del sustituyente ayudarán a una mejor estabilización. El análisis de estas cargas en algunos átomos de los sustituyentes se realizó de acuerdo a la numeración de la Fig. 40.

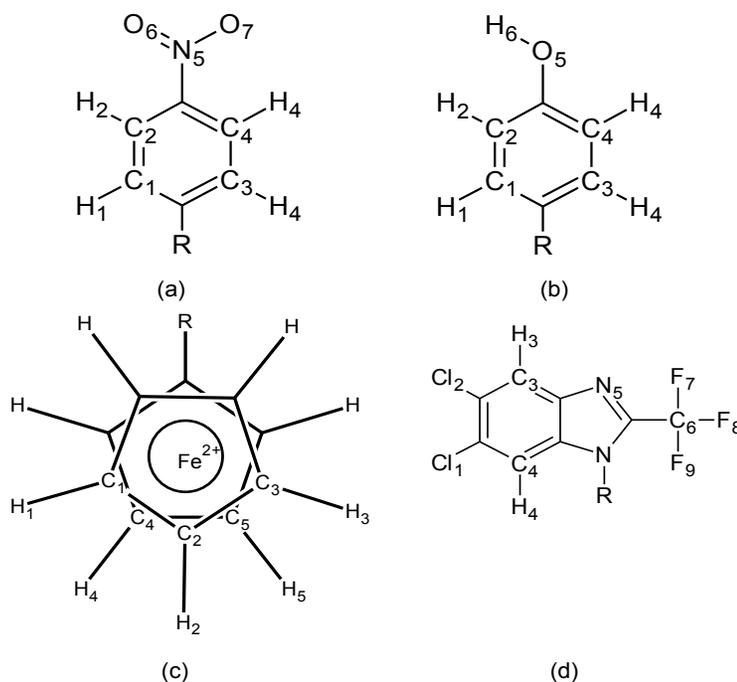
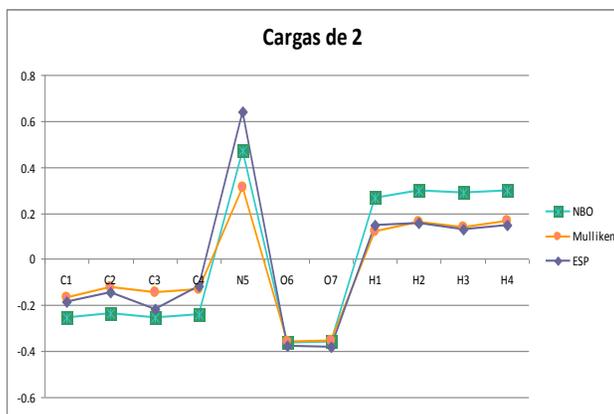
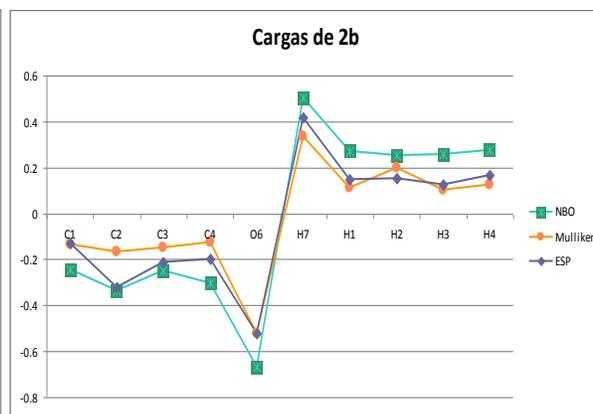


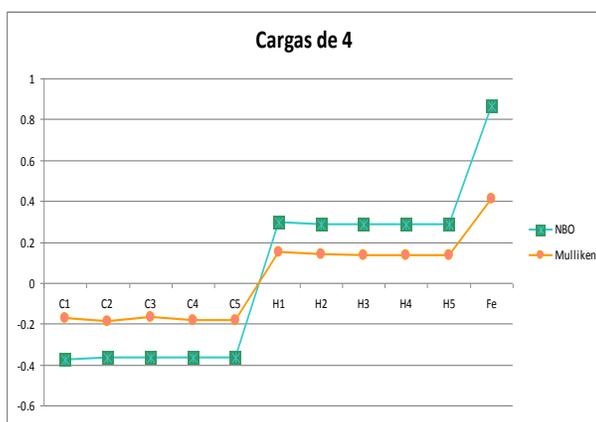
Figura 40. Numeración asignada a los sustituyentes de (a) **2** (b) **2b** (c) **4** (d) **6**, para análisis de las cargas.



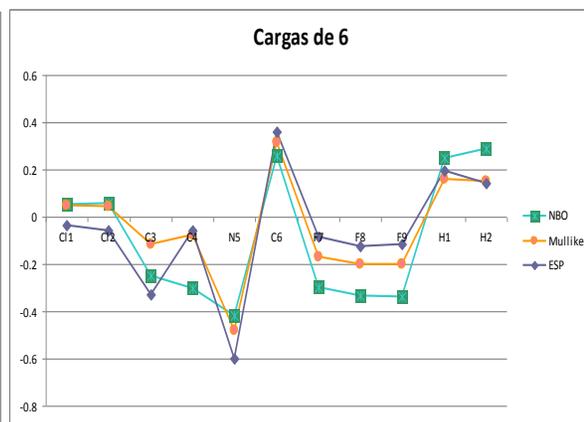
(10)



(11)



(12)



(13)

Graficas 10, 11, 12 y 13. Gráficas de las cargas (Mulliken, NBO y ESP) de (10) **A2** (11) **D2** (12) **B2** y (13) **C2**.

En las gráficas 10 y 11 se muestran las cargas de los derivados **2** y **2b**. Toda la carga negativa en ambos casos esta soportada en los átomos de oxígeno, aunque este átomo en el derivado fenólico es el más negativo. Si se contara con el compuesto **2b** su actividad nos confirmaría la importancia de la carga en el átomo de oxígeno, asumiendo que su interacción fuera con la Arg94 de la DHFR o la Arg21 de la PTR. Posiblemente el compuesto **2b** sea mucho más potente debido a que un análogo del mismo sintetizado por Gilbert et al. presentó una gran potencia como inhibidor de la DHFR. Para el derivado **4** se observa que existe deficiencia electrónica en los hidrógenos (carga positiva) (grafica 12), es decir si interactuara con un aminoácido como Phe88 de DHFR debería ser de la forma en que se muestra en el estudio docking (Fig. 34 (b)) a través de enlaces de hidrógeno no clásicos entre los hidrógenos del ferroceno y los

carbonos de fenilalanina. Para el derivado **6** la mayor parte de la carga negativa se concentra en los átomos de flúor que ejercen su influencia sobre todo el anillo de bencimidazol ya que incluso los átomos de cloro, a pesar de su alta electronegatividad soportan muy poco o casi nada de carga negativa (grafica 13).

En un futuro estos datos teóricos podrían ayudar a generar buenos modelos QSAR, contando desde luego con análogos que interactúen preferentemente con la zona I y otros que interactúen con la zona II de la DHFR, e incluso híbridos de este tipo. En el caso del diseño de inhibidores duales de DHFR y PTR, las dos zonas en PTR están muy lejanas entre si por lo que un híbrido como el propuesto para DHFR podría no funcionar bien con esta enzima.

7. CONCLUSIONES

Al finalizar el trabajo realizado podemos aceptar la hipótesis planteada por el mismo. Los resultados obtenidos nos permiten establecer la tesis de que el diseño de híbridos constituidos por la 2,4,6-triaminoquinazolina y porciones estructurales de compuestos antiparasitarios, es un recurso válido para la búsqueda de compuestos con actividad contra *T. cruzi* y probablemente interaccionen experimentalmente con la enzima dihidrofolato reductasa y pteridin reductasa del protozoario para ejercer su acción.

Los estudios teóricos realizados nos permiten establecer que para la 2,4,6-triaminoquinazolina, el tautómero predominante es que presenta la actividad biológica y que no es influido por los sustituyentes en la posición 6 de manera sustantiva.

El acoplamiento molecular se realizó con derivados del tautómero predominante. Las propiedades mecano-cuánticas de estas moléculas podrían ayudar a explicar la actividad biológica observada.

Los resultados de alineamientos de secuencias como los de acoplamiento molecular corroboran que el sitio activo de PTR de *L. major* y *T. cruzi* son similares.

Los cálculos realizados con Autodock3 nos ayudaron a determinar los aminoácidos más importantes en la unión del inhibidor a la enzima. Así el modelo generado con Autodock4 parece ser mucho más prometedor para correlacionar al menos cualitativamente los resultados experimentales. En estos estudios el compuesto **4** fue el más potente lo que coincide con el compuesto más activo experimentalmente. El análisis de la distribución electrónica de esta molécula indica que el ferroceno es un sustituyente muy lipofílico, y por ello debe estar interactuando con la fenilalanina88. Sin embargo, otro dato interesante es que parecen existir dos zonas para el desarrollo de inhibidores, una que se encuentra por debajo de la fenilalanina88 (zona I) y otra por arriba en la que existe una arginina94 (zona II) que posiblemente este interactuando con el grupo nitro de uno de los derivados. Esta arginina también existe en la enzima humana pero se encuentra mucho más alejada del sitio de unión por lo que no interactúa con el grupo nitro.

Es posible que la excelente potencia observada por el compuesto **4** sea también debido a que el ferroceno es un grupo que en numerosos estudios ha demostrado tener

capacidad de no permitir la salida de la célula una vez que ha entrado unido a algún compuesto. Aunque el derivado diacetilado **3** presenta actividad nula, los derivados acetilados son moléculas muy polares por lo que esa podría ser la causa de que no pudieran llegar al sitio activo a pesar de que los resultados computacionales predigan que deberían ser mucho más potentes, excepto por el caso del **5**, que posiblemente estén siendo transportado a través de la membrana y por ello presenta una actividad moderada comparada con los fármacos de referencia.

La tarea para continuar en el futuro esta investigación depende de que sean sintetizados análogos, particularmente el compuesto propuesto **2b** que parece ser prometedor. Todo esto con la finalidad de enriquecer la información de modelos teóricos tanto derivados de un estudio docking como Ab initio.

BIBLIOGRAFIA

1. a) [http://www.who.int/neglected_diseases/en/] Acessado en 2009.
b) [<http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/aboutparasites.htm>] Acessado en 2009.
2. a) Control of Chagas Disease: Second Report of the WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series, No. 905. Geneva: World Health Organization, 2002.
b). [http://www.who.int/neglected_diseases/faq/en/index6.html] Acessado en 2009.
3. a) [<http://emedicine.medscape.com/article/214581-overview>] Acessado en 2009.
b) [<http://www.infodoctor.org/www/meshC03.htm?idos=7969>] En esta página se puede ver un video sobre la enfermedad de Chagas. Acessado en 2009.
4. Gilbert H. I. **Biochimica Biophysica Acta** (2002) 1587: 249– 257.
5. Aufderheide A. C., Salo W., Madden M., Streitz J., Buikstra J., Guhl F., Arriaza B., Renier C., Wittmers Jr. L. E., Fornaciari G., Allison M. **Proceeding National Academy Science USA** (2004) 101: 2034–2039.
6. Tyler K., Engman D.M. **Journal Parasitology** (2002) 31: 472–481.
7. Botero D., Restrepo M. **Human Parasitosis** (2003). 4ª ed., Corporation for Biologycals Research's. 213.
8. Lanzer M., Gross U., Moll H. **Parasitology Today** (1997)13:1–3.
9. Tay J., Lara R., Velasco O., Gutiérrez M. (2002). **Parasitología Médica**. 7ª edición. Méndez Editores. México D.F. pp. 123-145, 203–227.
10. Boiani L., Aguirre G., Gonzalez M., Cerecetto H., Agustina Chidichimo A., Cazzulo J., Bertinaria M., Guglielmo S. **Bioorganic Medicinal Chemistry** (2008) 16: 7900–7907
11. Cohen-Freue G., Holzer T.R., Forney J.D., McMaster W.R. **International Journal Parasitology** (2007) 37: 1077–1086.
12. Kompis I.M., Islam K., Then R.L.. **Chemical Review** (2005) 105: 593–620.
13. Hawser S., Lociuoro S., Islam K. **Biochemical Pharmacology** (2006) 7: 941–948.
14. Kuyper L.F., Baccanari D.P., Jones M.L., Hunter R.N., Tansik R.L., Joyner S.S., Boytos C.M., Rudolph S.K., Knick V., Wilson R. H., Caddell J.M., Friedman H.S., Comley J.C.W., Stables J.N. **Journal Medicinal Chemistry** (1996) 34: 892–903.
15. Kinnamon K.E., Poon B.T., Hanson W.L., VB Waits W.B. **American Journal Tropical Medicine Hygiene** (1998) 58: 804–806.

16. Sirawaraporn W., Sertsrivanich R., Booth R.G., Hansch C., Neal R.A., Santi D.V., **Molecular Biochemical Parasitology** (1988) 31: 79.
17. Chowdhury S.F., Villamor V.B., Guerrero R.H., Leal I., Brun R., Croft S.L., Goodman J.M., Maes L., Ruiz-Perez L.M., Pacanowska D.G., Gilbert I.H. **Journal Medicinal Chemistry** (1999) 42:4300–4312.
18. Berman J.D., King M., Edwards N. **Antimicrobial Agents Chemotherapy** (1989) 33: 1860–1863.
19. Zuccotto F., Martin A.C.R., Laskowski R.A., Thornton J.M., Gilbert I.H., **Journal Computer Aided Molecular Design** (1998) 12: 241–257.
20. Hardy L.W., Matthews W., Nare B., Beverley S.M. **Experimental Parasitology** (1997) 87:157–169.
21. Schormann N., Senkovich O., Walker K., Wright D.L., Anderson A.C., Rosowsky A., Ananthan S., Shinkre B., Velu S., Chattopadhyay D. **Proteins** (2008) 73, 889–901.
22. Nare B., Hardy L.W., Beverley S.M. **Journal Biological Chemistry** (1997) 272: 13883–13891.
23. Robello C., Navarro P., Castanys S., Gamarro F. **Molecular Biochemical Parasitology** (1997) 90: 525–535.
24. Schormann R., Pal B., Senkovich O., Carson M., Howard A., Smith C., DeLucas L., Chattopadhyay D. **Journal Structural Biology** (2005) 152: 64–75.
25. Schüttelkopf A.W., Hardy L.W., Beverley S.M., Hunter W.N. **Journal Molecular Biology** (2005) 352: 105–116.
26. Cavazzuti A.,G. Paglietti, Hunter W.N., Gamarro F., Piras S., Loriga M., Alleca S., Corona P., McLuskey K., Tulloch L., Gibellini F., Ferrari S., Costi M.P. **Proceeding National Academy Science USA** (2008) 105: 1448–1453.
27. Lindsley C.W. **Drug Discovery Today** (2004) 9: 695–696 .
28. Bernard M. **Account Chemical Research** (2008) 41: 69–77.
29. Kogen H., Toda N., Tago K., Marumoto S., Takami K., Ori M., Yamada N., Kazuo Y., Naruto S., Abe K., Yamazaki R., HaraT., Aoyagi A., Abe Y., Kaneko T. **Organic Letter** (2002) 4: 3359–3362.
30. Zhi Ch., Long Z., Manikowski A. **Journal Medicinal Chemistry** (2006) 49:1455–1465.

31. Stahura F.L. Xue L.; Godden J.W.; Bajorath J. **Journal Molecular Graphics Modelling**. (2002) 20: 439–446.
32. Fay N. **Drug Discovery Today** (2006) 11: 1075–1084.
33. Bruno M, Malde S, Poliakov A, Do C.B., Couronne O., Dubchak I., Batzoglou S. **Bioinformatics** (2003) 19 Suppl. 1: 154–62.
34. Lipman D.J., Altschul S.F., Kececioglu J.D. **Proceeding National Academy Science USA** (1989) 86: 4412–4415.
35. Kitchen D.B., Decornez H., Furr J.R., Bajorath J. **Nature Reviews. Drug Discovery**. (2004) 3: 935–949.
36. Forli S., Botta M. **Journal Chemical Information Model** (2007) 47:1481-1492.
37. Meng E.C, Shoichet B.K, Kuntz I.D. **Journal of Computational Chemistry** (2004) 13: 505–524.
38. Schneider G., Böhm H-J. **Drug Discovery Today** (2002) 7: 67-70.
39. Schormann N., Senkovich O.; Ananthan S.; Chattopadhyay D . **Journal Molecular Structure (Theochem)** (2003) 635: 37–44.
40. Cavalli A., Carloni P., Recanatini M.. **Chemical Review** (2006) 106: 3497–3519.
41. McLuskey K., Gibellini F., Carvalho P., Avery M.A., Hunte W.N. **Acta Crystallographica** (2004). D60: 1780–1785.
42. Schormann N., Pal B., Senkovich O., Carson M., Howard A., Smith C., DeLucas L., Chattopadhyay D. **Journal Structural Biology** (2005) 152: 64–75.
43. Palomares-Alonso F, Jung-Cook H., Pérez-Villanueva J., Piliado J.C., Rodríguez-Morales S., Palencia-Hernández G., López-Balbiaux N., Hernández-Campos A., Castillo R., Hernández-Luis F. **European Journal Medicinal Chemistry** (2009) 44:1794–1800.
44. Barends M., Jaidee A., Khaohirun N., Singhasivanon P., Nosten F. **Malaria Journal**. (2007) 6:81.
45. Musonda Ch.C., Yardley V., Carvalho de Souza R.C., Ncokazi K., Egan T.J., Chibale K.. **Organic Biomolecular Chemistry** (2008) 6:4446–4451.
46. Rodríguez-Morales E.A. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Autónoma Benito Juárez de Oaxaca. 2007.
47. Hasne M. P.; Barrett M. P. **Journal Applied Microbiology** (2000) 89: 697–701.

48. Klenke B., Stewart M., Barrett M.P., Brun R., Gilbert I. **Journal Medicinal Chemistry** (2001) 44: 3440-3452.
49. Mottier L., Alvarez L., Ceballos L., Lanusse C. **Experimental Parasitology**. (2006)113: 49–57.

APÉNDICE I. Parte experimental

Instrumentación

-Para la evaporación del solvente a presión reducida se utilizo un rotaevaporador marca Buchi modelo R-114 con baño acoplado a bomba de vacio marca GAST modelo 0523-V47-6528DX, enfriador marca VWR WScientific modelo1107 y bomba de vacio marca Vacubrand modelo PC610 con regulador de vacio integrado. .

-Para la determinación de puntos de fusión se utilizo un aparato marca BUCHI modelo B-540 con capilares de vidrio.

-La hidrogenación catalítica se realizó en un equipo para hidrogenación Marca PARR modelo 3916 EG adaptado a un tanque de hidrogeno de la casa INFRA.

-La determinación de los espectros de masas, Infrarrojo y resonancia magnética nuclear se realizaron en la USAI (Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación).

- RMN (SOLUCION-DMSO). Marca Varian, Modelo BNMRS-400 MHZ.
- IR-PASTILLA(KBr). Marca Perkin-Elmer, Modelo Spectrum RXI.
- EM. FAB. Bombardeo con iones de Cesio. Temperatura de la cámara: menor a 50°C. Detección de iones: Positivos. Marca: Thermo-Electrón. Modelo: DFS (Double Focus Sector). Analizador másico: Doble sector (magnético y eléctrico, geometría inversa)

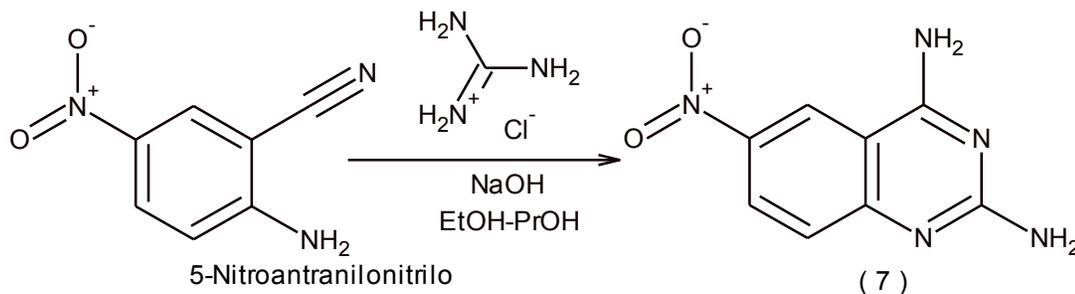
Cromatografía.

Para el monitoreo de las reacciones así como para verificar la pureza de los productos se utilizo cromatografía en capa fina.

Sistemas de elución.

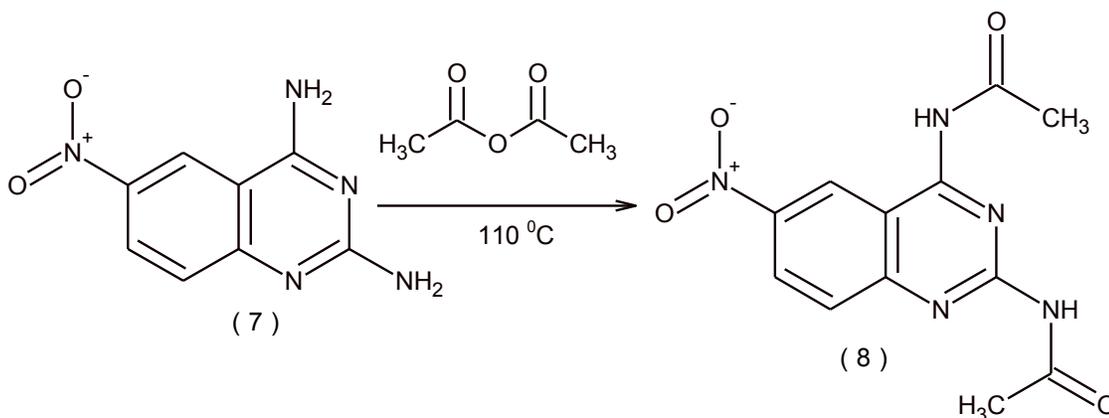
Tipo de sistema	Composición
Sistema I	Hexano, CHCl ₃ , Acetato de etilo (50:35:15)
Sistema II	CHCl ₃ , MeOH (80:20)
Sistema III	CHCl ₃ , MeOH (60:40)
Sistema IV	2-Butanol, Acido acético, Agua (80:20:5)

Síntesis de 2,4-diamina, 6-Nitroquinazolina (7).



En un matraz bola de 250 mL se colocó el 5 g 5-nitroantranilonitrilo (0.031 mol) con 40 ml de propanol en agitación durante 20 minutos. En un vaso de precipitado se disolvieron 3.4134 g de KOH (1.2 eq.) en 20 mL de etanol agitando durante 20 minutos, luego de ese tiempo se agregaron 3.65 g de clorhidrato de guanidina (1.5 eq.) y la solución se agitó otros 20 minutos. Esta solución se adicionó al matraz bola y la mezcla se colocó a reflujo en un sistema provisto con reóstato, canastilla de calentamiento y refrigerante con recirculación por 6 horas. Posteriormente se dejó enfriar y el precipitado naranja se filtró y lavó repetidas veces con agua hasta que el pH estuviera neutro y luego se lavó con etanol hasta que la solución fuera incolora. Se obtuvieron 5.4 gramos de compuesto (7). %Rendimiento: 86%, R.f.: 0.4-Sistema de IV. p.d.: 359-361.

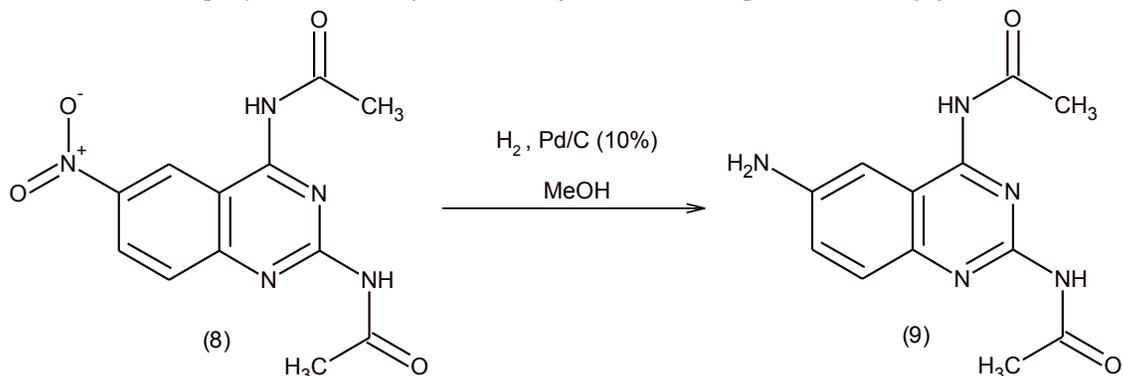
Síntesis de *N,N'*-(6-nitroquinazolin-2,4-diil)diacetamida (8).



Se colocó en un matraz bola de 250 mL provisto de una columna vigreux 1 gramo de 7 (0.0048 mol) junto con 7.1 mL de anhídrido acético y se colocó a calentamiento a 100 °C durante 12 horas. Después de ese tiempo la mezcla de reacción se vertió sobre agua-hielo (250 mL) y el precipitado se filtró y lavó con agua repetidas veces hasta que

el pH de la solución de lavado estuviera neutro. Se obtuvieron 0.89 gramos de un polvo amarillo (**8**). % de rendimiento: 70 %, R.f.: 0.8-Sistema III, p.f.: 278.7-279.8 C.

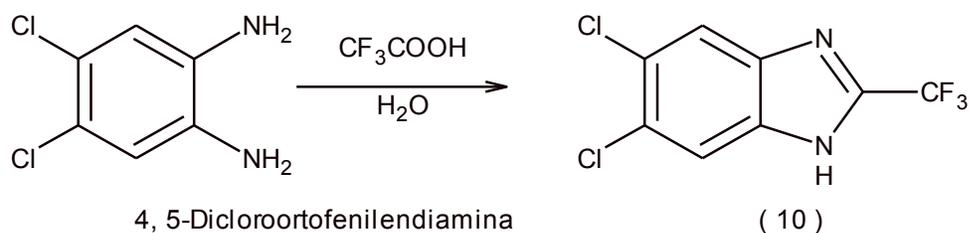
Síntesis de *N*-[2-(acetilamino)-6-aminoquinazolin-4-il]acetamida (**9**).



Se colocó en un frasco de hidrogenación PARR 0.5 gramos de **8** (0.0048 mol) con 0.05 gramos de Pd/C (10%) y 40 mL de metanol a hidrogenación a 60 lb/pg² durante 1 hora consumiéndose 8 lb/in². Posteriormente se filtró la solución en un embudo de filtro poroso para separar el Pd/C y la solución amarillo-verdosa, se concentró y se llevo a sequedad obteniéndose 0.3460 g de un sólido amarillo (**9**).

% de rendimiento: 77%, R.f.: 0.667 C-Sistema III, p.f.: 238-238.2.

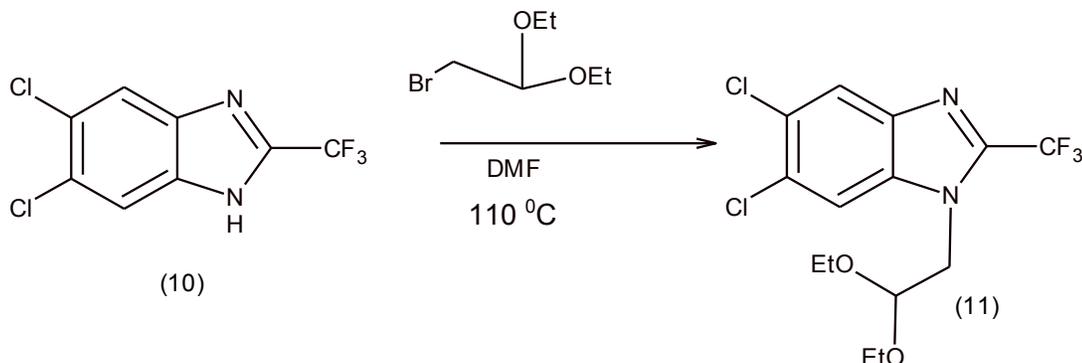
Síntesis de 5,6-dicloro-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (**10**).



En un matraz bola de de 250 mL equipado con agitación magnética, condensador de aire en posición de reflujo y atmosfera de N₂ se colocaron 0.5 g de 4,5-dicloro-1,2-fenilendiamina (0.0028 mol) y 0.22 mL de CF₃COOH con 1.5 mL de H₂O. La mezcla se lleva a reflujo por 5 horas. Posteriormente se adicionó una solución saturada de NaHCO₃ y se filtró. El sólido se limpió con carbón activado en etanol y se recristalizó con tolueno. Se obtuvieron 0.35 g de un sólido cristalino blanco (**10**).

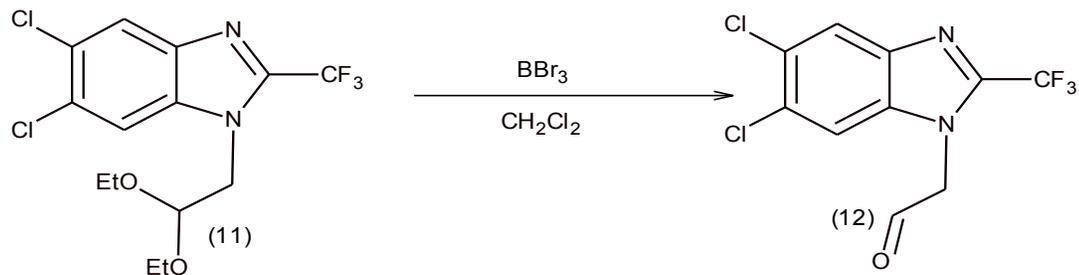
% de rendimiento: 50%. R.f.:0.32 -Sistema I, p.f.: 272.7-274.5.

Síntesis de 5,6-dicloro-1-(2,2-dietoxietil)-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol (**11**).



Se colocó en un matraz de de 50 mL 1.43 gramos de (0.0038)(**10**) junto con dietilacetal del 2-bromoacetaldehido (1.5 eq.) y 1.1921 gramos de carbonato de sodio (2.5 eq.) a reflujo durante 10 horas hasta que se consumió la materia prima. Pasado este tiempo la mezcla de reacción se vació sobre agua-hielo (250 mL) y el sólido crema se filtró y lavó repetidas veces. Este sólido se disolvió en CHCl_3 con 0.19 gramos de carbón activado y se dejó agitando 12 horas. Pasado este tiempo la solución se filtró en un embudo de vidrio poroso y la solución resultante se llevo a sequedad en el rotaevaporador. Se obtuvieron 1.93 gramos de un sólido crema. (**11**). % de rendimiento: 92%, R.f.: 1.6-Sistema I, p.f.: 76.8-77.6.

Síntesis de [5,6-dicloro-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-1-il]acetaldehido (**12**).

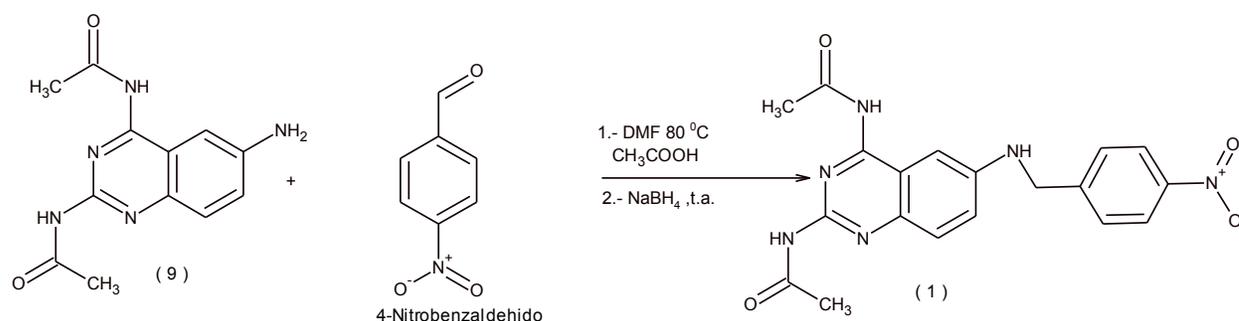


En un matraz bola de 50 ml se disolvió 1 g de **11** (0.0027 mol). Luego se agregó lentamente 10.77 mL de una solución 1M de BBr_3 en CH_2Cl_2 (4 eq.). Se dejó en agitación a temperatura ambiente y bajo atmósfera de nitrógeno durante 35 minutos. Después de ese tiempo se vertió lentamente 50 mL de H_2O y se neutralizo con

NaHCO₃. Se extrajo 3 X 50 mL con CHCl₃ y la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se llevo a sequedad con el rotaevaporador. Se obtuvieron 0.8 g de un aceite oscuro (**12**) y así se ocupo en la siguiente reacción.

% de rendimiento: 99 % , R.f.: 1.3-Sistema I.

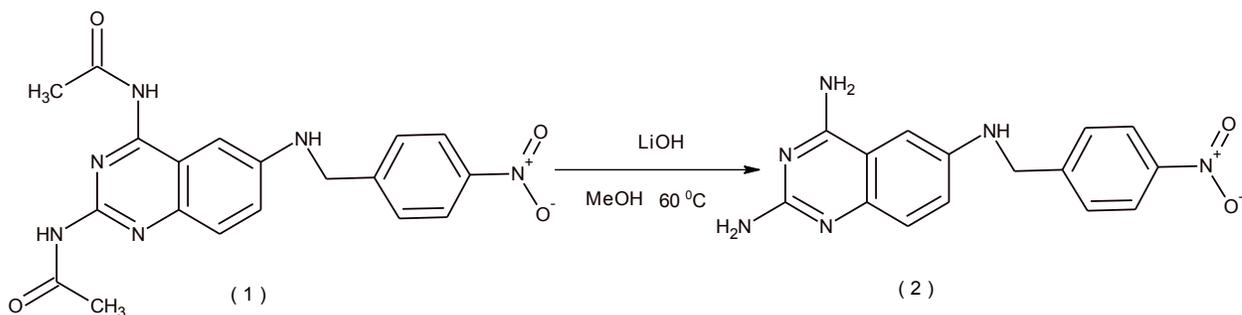
Síntesis de *N*-{2-(acetilamino)-6-[(4-nitrobenzil)amino]quinazolin-4-il}acetamida (**1**).



Se colocó en una matraz bola de 50 mL equipado con agitación magnética, columna vigreux y atmosfera de N₂, 0.25 g p-nitrobenzaldehído (0.016 mol) junto con 0.5850 g de **9** (1.4 eq.), 2 mL de DMF y una gota de acido acético, en agitación y a una temperatura de 58 °C durante 1 hora. Después de ese tiempo la mezcla se enfrió a 0 °C con un baño de hielo-agua y se adicionaron lentamente 0.0902 g (1.5 eq.) de NaBH₄. Posteriormente se quita el baño de hielo dejándolo a temperatura ambiente por 12 horas. Transcurrido ese tiempo se evaporó la DMF con el rotaevaporador y se agregó una solución fría saturada de Na₂CO₃ y el precipitado amarillo se filtró y lavó con agua repetidas veces. Se obtuvieron 0.17 g de un compuesto amarillo (**1**).

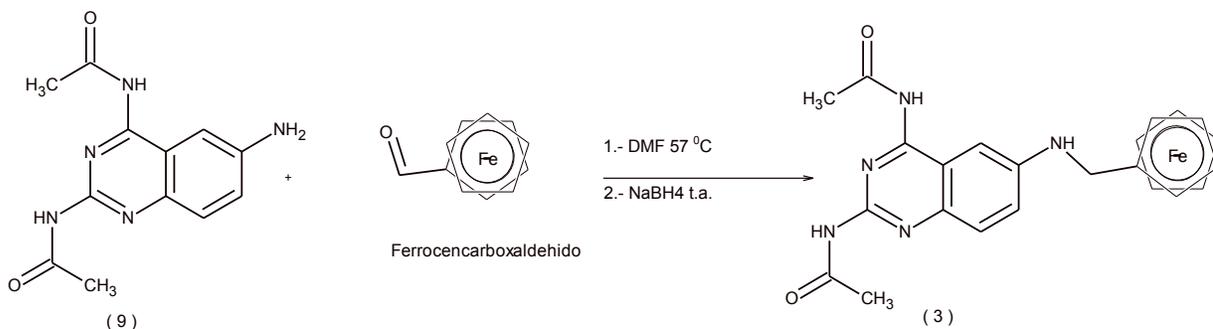
% de rendimiento: 38%, R.f.: 0.7428-Sistema II, p.f.: 204-205 °C.

Síntesis de *N*⁶-(4-nitroencil)quinazolin-2,4,6-triamina (2)



En un matraz bola de 50 mL equipado con agitación magnética, parrilla de calentamiento, columna vigreux y atmosfera de N₂ se colocó 0.19 g de **1** (0.00048) en 5 ml de metanol junto con 0.023 g de hidróxido de litio (2 eq.) (disuelto en la mínima cantidad de agua) por 2 horas a 60 °C. Se evaporó el metanol y luego se agregó agua fría. El sólido rojo se filtró y lavó con agua. Se obtuvieron 0.124 g de un polvo rojo (**2**). % de rendimiento: 82%, R.f.: 0.54-Sistema IV, p.f.: 215-218 °C.

Síntesis de *N*-[2-(acetilamino)-6-[(ferrocenmetil)amino]quinazolin-4-il]acetamida (3)

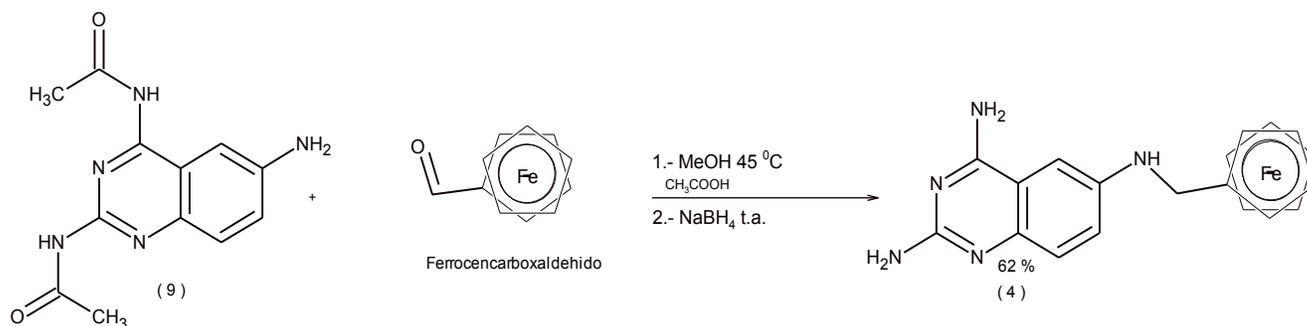


Se colocó en una matraz bola de 50 ml equipado con agitación magnética, columna vigreux y atmosfera de N₂, 0.31 g de ferrocencarboxaldehido (0.00143) junto con 0.3 g de **9** (1 eq.), 1 mL de DMF y una gota de ácido acético, en agitación y a una temperatura de 85 °C durante 45 minutos. Después de ese tiempo la mezcla se enfrió a 0 °C con un baño de hielo-agua y se adicionaron lentamente 0.0671 g (2 eq.) de NaBH₄. Posteriormente quito el baño de hielo dejándolo a temperatura ambiente por 12 horas. Transcurrido ese tiempo se evaporó la DMF con el rotaevaporador y se agregó una solución fría saturada de Na₂CO₃ y el precipitado amarillo se filtró y lavo con agua

repetidas veces. Ya seco se lavo repetidas veces con éter etílico y se obtuvieron 0.3239 g de un compuesto amarillo (**3**).

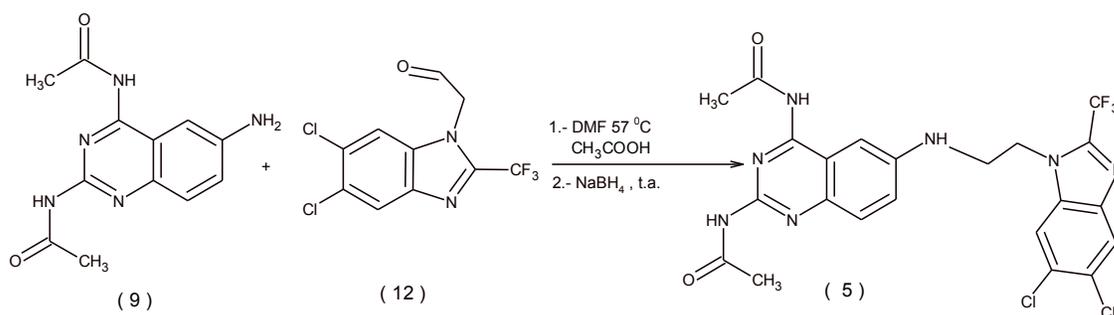
% de rendimiento: 48%, R.f.: 0.76-Sistema II, p.f.: 218.3-220.9.

Síntesis de *N*⁶-(ferrocenmetil)quinazolin-2,4,6-triamina (**4**)



Se colocó en una matraz bola provisto de columna vigreux y agitador magnético 0.2044 g de ferrocencarboxaldehido (0.00094 mol) junto con 0.35 g de de **9** (1.4 eq.) a 40 °C en 20 mL de MeOH y una gota de acido acético durante 12 horas. Posteriormente se evaporó el metanol y se resuspendió el polvo amarillo en 20 mL de metanol anhidro. Se bajó la temperatura de la mezcla con un baño de agua-hielo a 0°C y se agregaron lentamente 0.05419 g (1.5 eq.) de NaBH₄. Se dejó a agitación durante 12 horas y a temperatura ambiente. Después de ese tiempo se evaporo el solvente, se agregó una solución de agua carbonatada saturada, se filtró y lavó repetidas veces. El sólido se limpio con carbón activado en metanol. Se obtuvieron 0.32 g de un compuesto amarillo (**4**). % de rendimiento: 62%, R.f.:0.53-Sistema IV,p.f.: 210.6-211 °C.

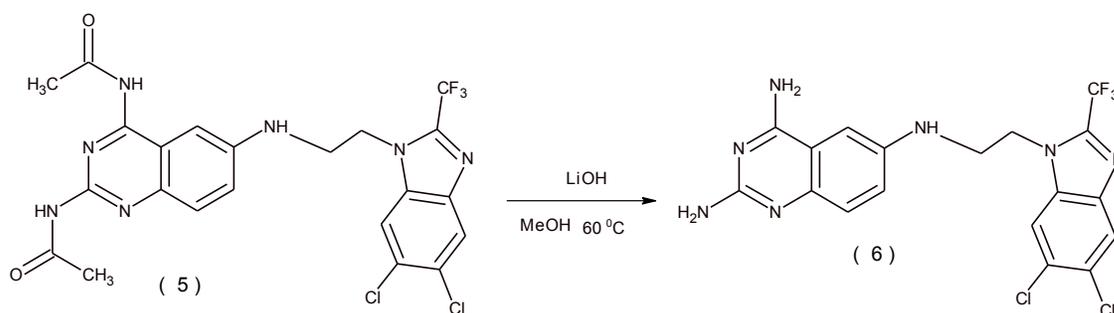
Síntesis de *N*-{2-(acetilamino)-6-[[5,6-dicloro-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-1-il]etil]amino}quinazolin-4-il}acetamida (**5**).



Se colocó en una matraz bola de 50 mL equipado con agitación magnética, columna vigreux y atmósfera de N₂, 0.31 g de **12** (0.00104 mol) junto con 0.25 g de **9** (1 eq), 1 mL de DMF y una gota de ácido acético, en agitación y a una temperatura de 58 °C durante 45 minutos. Después de ese tiempo la mezcla se enfrió a 0 °C con un baño de hielo-agua y se adicionaron lentamente 0.0671 g (2 eq.) de NaBH₄. Posteriormente quito el baño de hielo dejándolo a temperatura ambiente por 12 horas. Transcurrido ese tiempo se evaporó la DMF con el rotaevaporador y se agregó una solución fría saturada de Na₂CO₃ y el precipitado amarillo se filtró y lavó con agua repetidas veces. Se obtuvieron 0.3239 g de un compuesto amarillo (**5**).

% de rendimiento: 57%, R.f.: 0.7428-Sistema II, p.f.: 222.3-222.9.

Síntesis de *N*⁶-{2-[5,6-dicloro-2-(trifluorometil)-1*H*-bencimidazol-1-il]etil}quinazolin-2,4,6-triamina (**6**).



En un matraz bola de 50 mL equipado con agitación magnética, parrilla de calentamiento, columna vigreux y atmósfera de N₂ se colocó 0.25 g de **5** (0.00046) en 5 ml de metanol junto con 0.02548 g de hidróxido de litio (2.3 eq.) (disuelto en la mínima cantidad de agua) por 2 horas a 60 °C. Se evaporó el metanol y luego se agregó agua fría. El sólido rojo se filtró y lavó con agua. Se obtuvieron 0.18 g de un polvo café oscuro (**6**). % de rendimiento 85%, R.f.:0.59-Sistema IV, p.f.: 132-136 °C.

APÉNDICE II. Pruebas de actividad biológica

La parte experimental correspondiente a este apartado fue realizada en la Escuela Nacional de Ciencias Biológica del Instituto Politécnico Nacional (ENCB-IPN) a cargo del Dr. Benjamín Noguera Torres.

- Se utilizaron ratones de la cepa CD1 del bioterio de la ENCB-IPN.
- Se utilizó la cepa NINOA de *Trypanosoma cruzi* y el aislado INC-5 del Departamento de Parasitología de la ENCB.

Estas cepas se mantienen de tres formas:

- a) Medio de cultivo bifásico (base agar sangre con 10% de sangre de carnero y fase líquida BHI) y en BHI modificado (adicionado con solución de Lock, Hemina y SFB) con la finalidad de mantener las cepas en fase de epimastigotes.
- b) En triatomas infectados los cuales se alimentaron de ratones con la finalidad de obtener e infectar a estos con tripomastigotes metacíclicos.
- c) En ratones CD1 haciendo pases para mantener el parásito en la fase de tripomastigote sanguíneo.

6.1.2 Compuestos

- Cristal Violeta como control positivo
- Nifurtimox (LAMPIT, BAYER) y Benznidazol (ROCHAGAN, ROCHE) como los fármacos de referencia.
- Una serie de derivados sintetizados en esta tesis.

Métodos evaluación *in vitro*

-Obtención de tripomastigotes sanguíneos

Se obtuvo sangre por punción cardiaca de ratones infectados con la cepa NINOA y el aislado INC-5 con parasitemias altas (más de 4×10^6 parásitos/mL), utilizando HEPARINA como anticoagulante y solución salina fisiológica (NaCl 0.85%) estéril para diluir la sangre a una concentración final de 1×10^6 tripomastigotes sanguíneos/mL.

Para evaluar la probable actividad tripanocida de los compuestos se utilizó la sangre infectada con tripomastigotes a una concentración de 1×10^6 parásitos/mL, donde 195 μ L fueron incubados con 5 μ L de los fármacos (para una concentración final de 100, 50, 5 y 10 μ g/mL del compuesto). La incubación fue realizada en microplacas de 96 pozos a 4 °C por 24 horas⁴⁸.

Después de las 24 horas de incubación la reducción en el número de tripomastigotes (lisis parasitaria) se determinó usando el método de Pizzi.

Los compuestos fueron disueltos en DMSO, la concentración final del solvente nunca excedió de 2.5%, una concentración no tóxica a parásitos ni células mamíferas⁴⁹.

Se determinó la concentración que causa el 100% de lisis de parásitos (CL₁₀₀) para la cepa NINOA con cristal violeta, a través de un gradiente de concentraciones finales en placa que fueron desde 25 µg/mL hasta 1.1 µg/mL. Con lo que se determinó que el control positivo fuera de 12.5 µg/mL de cristal violeta (causó el 100% de lisis) y el control de reactivos DMSO al 2.5% como concentración final en cada pozo, ambos controles fueron usados en todos los experimentos que se hicieron por triplicado para cada cepa y fármaco.

-Cuenta de parásitos por el método de pizzi

Se colectaron 5 µL de sangre de los ratones infectados haciendo un pequeño corte de la vena caudal, la sangre se depositó en un portaobjetos y se distribuyó uniformemente en el área del cubreobjetos. Se contaron 25 campos microscópicos utilizando el objetivo de 40x, para el conteo se tomó en cuenta el número de campos posibles que se pudieran contar en esta área^{50,51}.

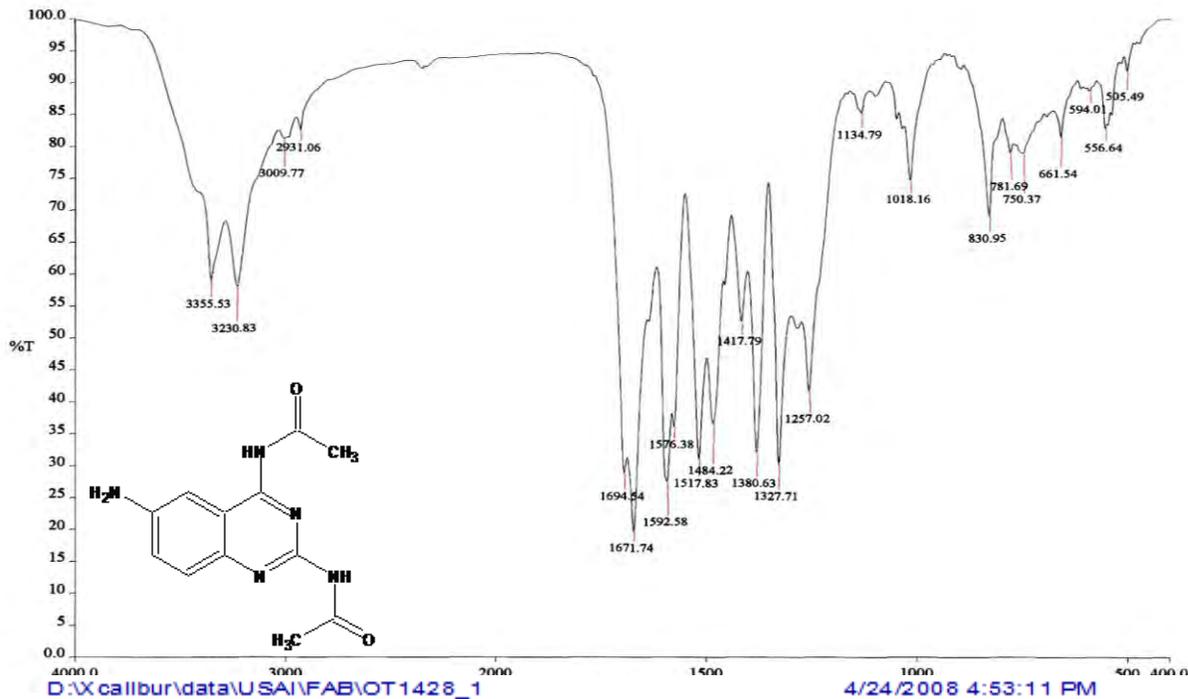
- Determinación del porcentaje de lisis

Tomando en cuenta la cantidad de tripomastigotes sanguíneos presentes en el control negativo (sangre infectada sin fármaco) se determinó el porcentaje de lisis en función de la cantidad de parásitos que sobrevivieron en presencia del fármaco.

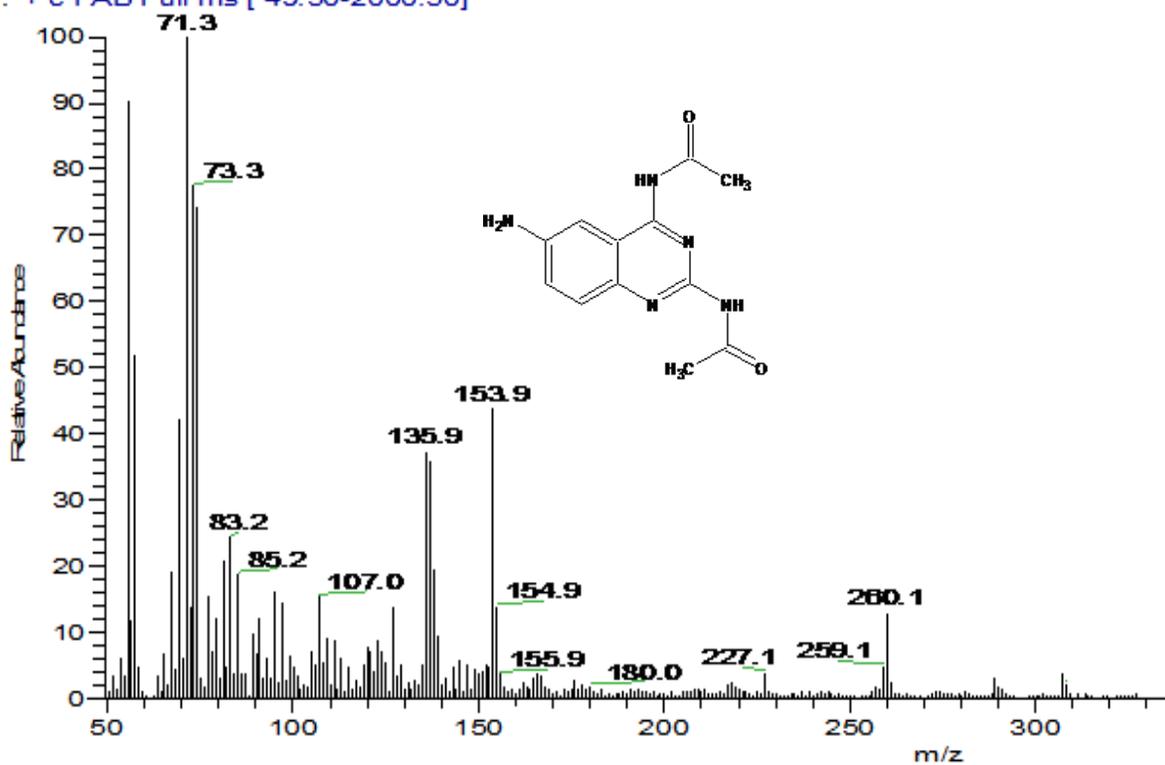
-Observación de los tripomastigotes sanguíneos después de la evaluación *in vitro* y obtención del porcentaje de parásitos dañados

Después de la evaluación *in vitro* se realizaron extendidos de la sangre tratada (3 por cada tratamiento para la concentración de mejor actividad), estas extensiones se tiñeron con Giemsa (1:10) durante 30 minutos y posteriormente se observaron al microscopio a 100x para observar si hubo alteraciones morfológicas en los parásitos. Se contaron los tripomastigotes sanguíneos que presentaron algún daño citológico y se determinó el porcentaje de parásitos dañados.

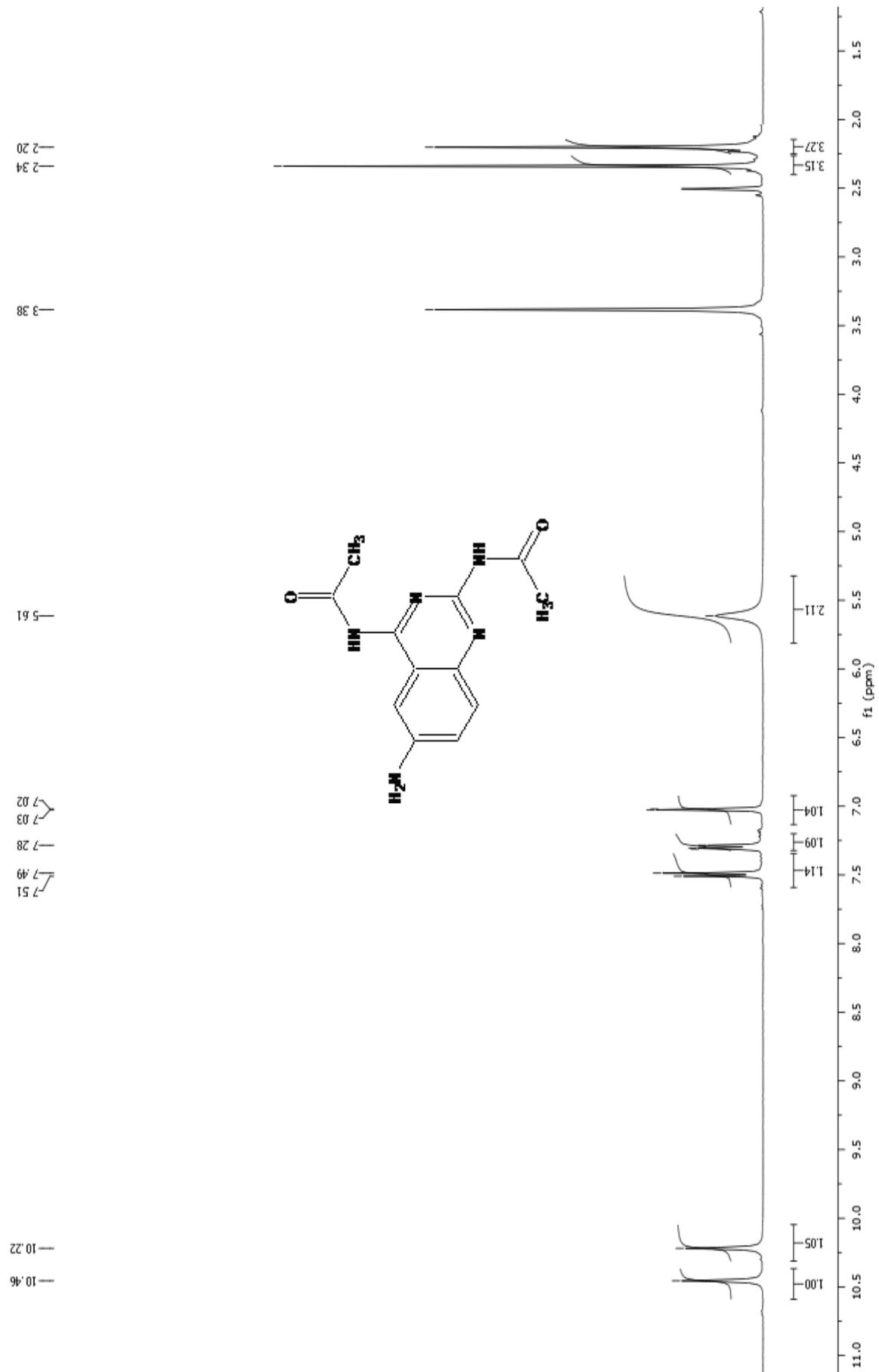
APÉNDICE III. Espectros

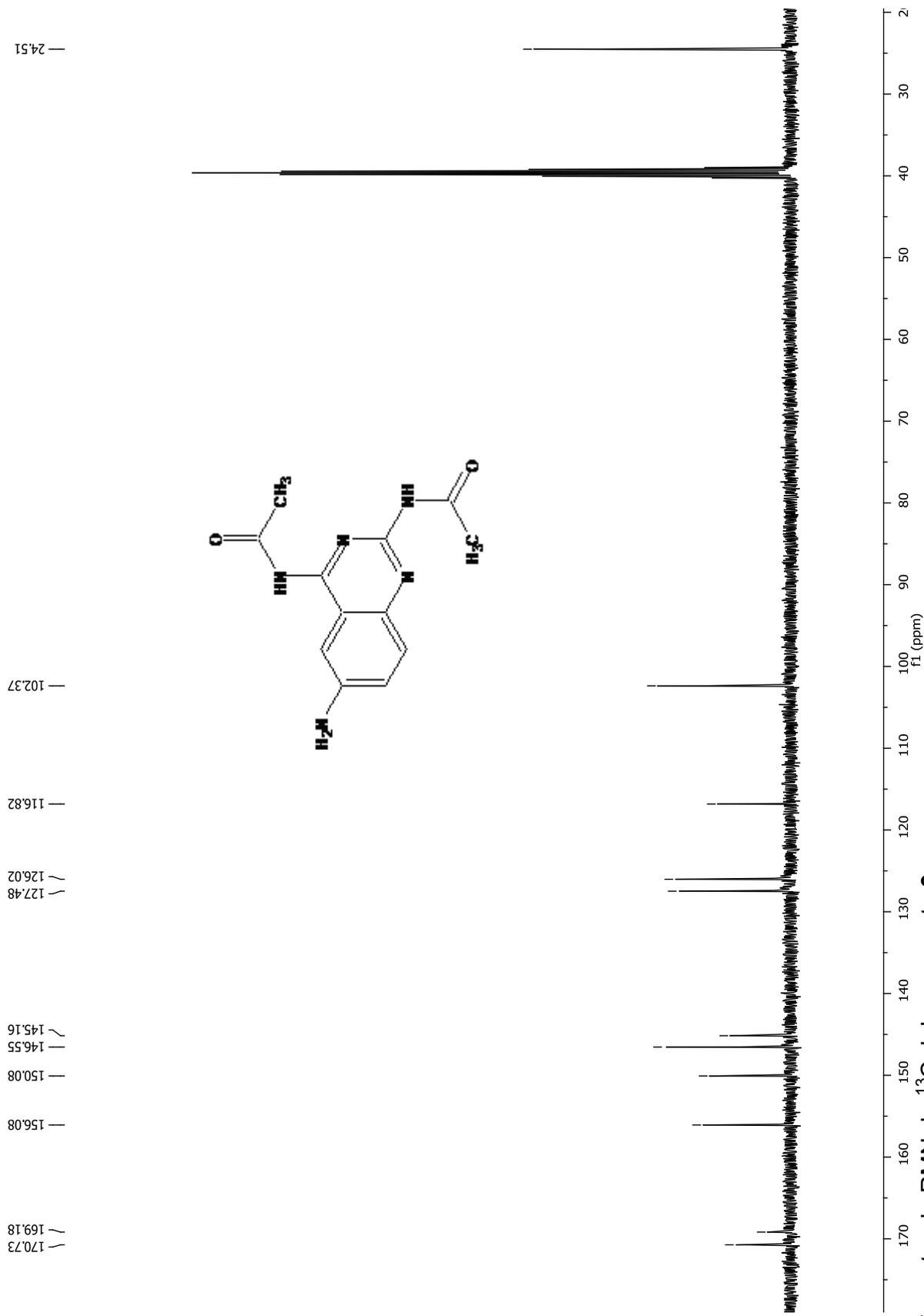


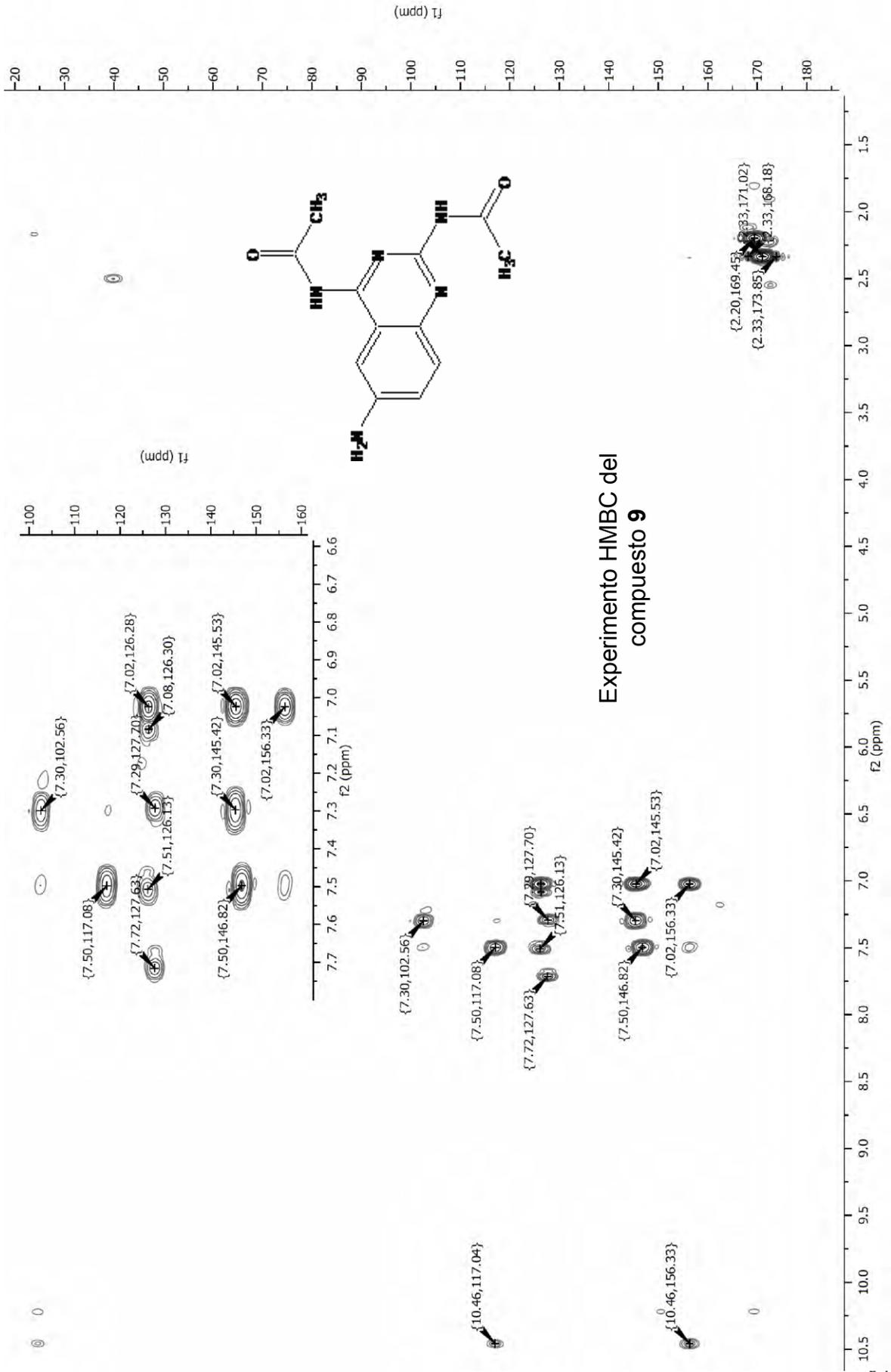
OT1428 1 #1-4 RT: 0.00-0.82 AV: 4 NL: 1.97E6
T: + c FAB Full ms [49.50-2000.50]

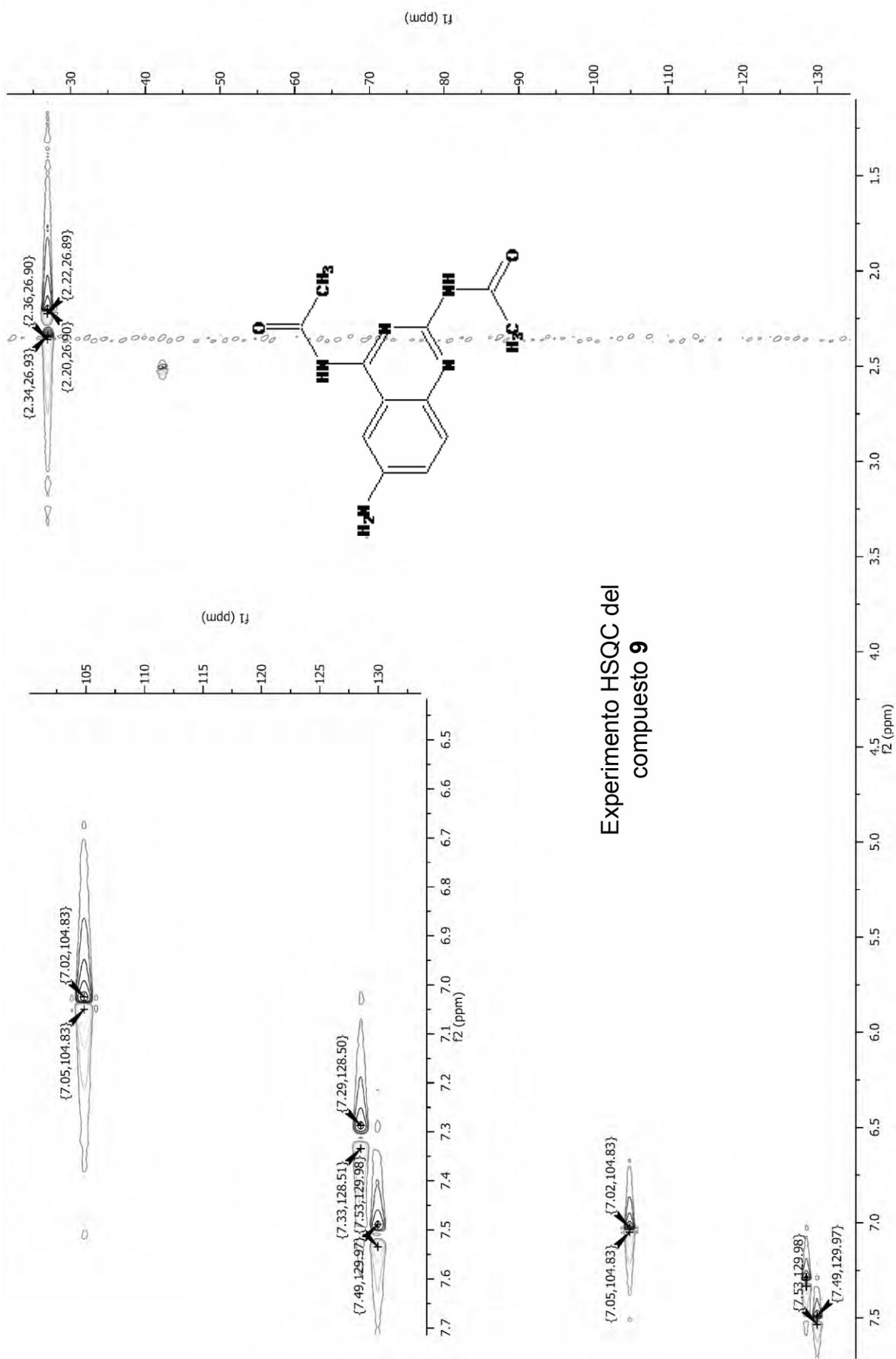


Espectros de infrarrojo y masas del compuesto 9.

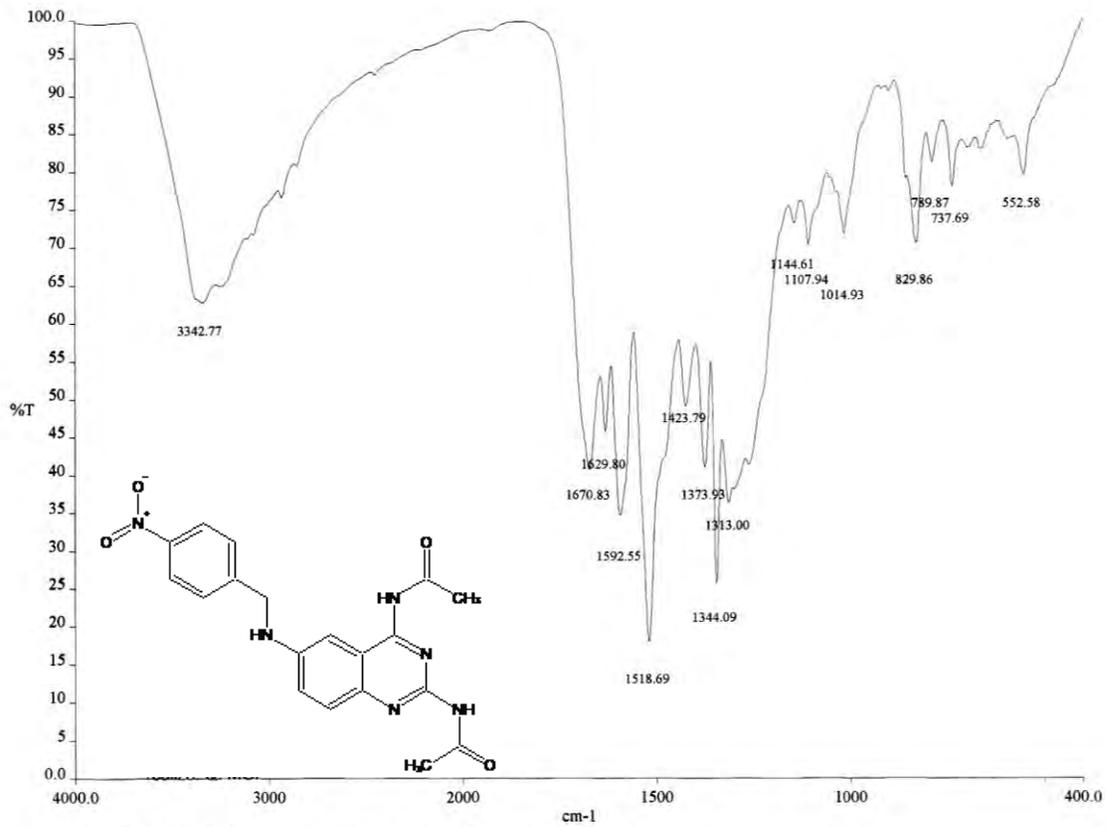


Espectro de RMN de ^{13}C del compuesto **9**.





Experimento HSQC del compuesto **9**

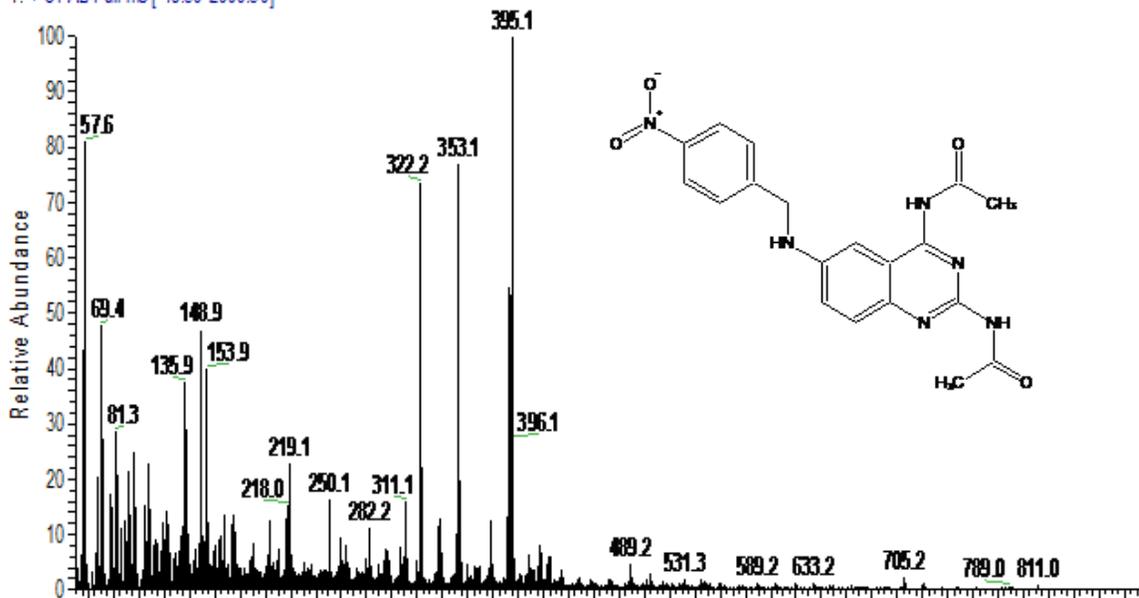


d:\pel_data\spectra\farmacia\francisco hernandez luis\cmm23182.sp - USAI, Facultad de Quimica, UNAM

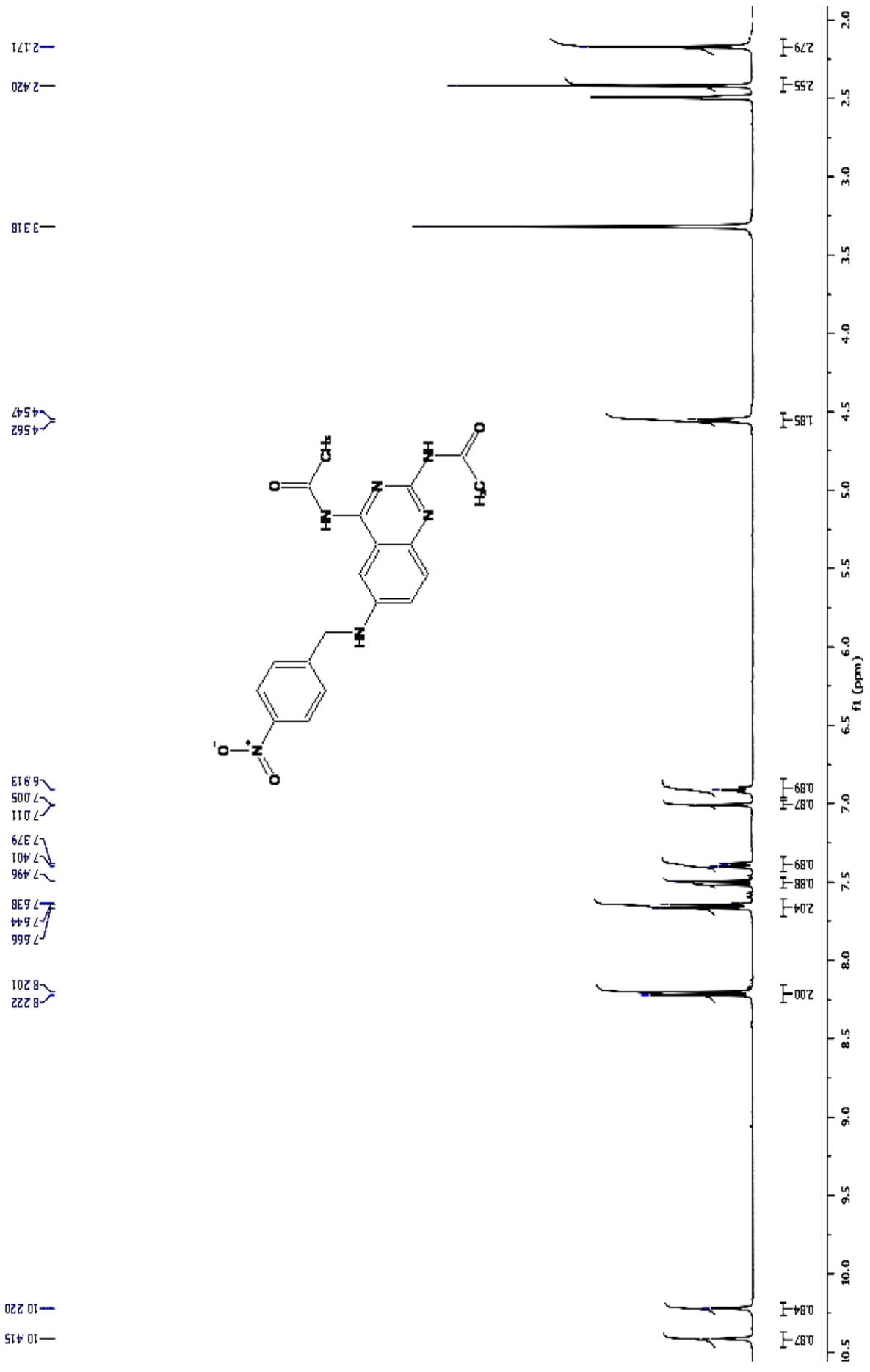
D:\Xcalibur\data\USAI\FAB\OT1958_1

9/19/2008 5:12:38 PM

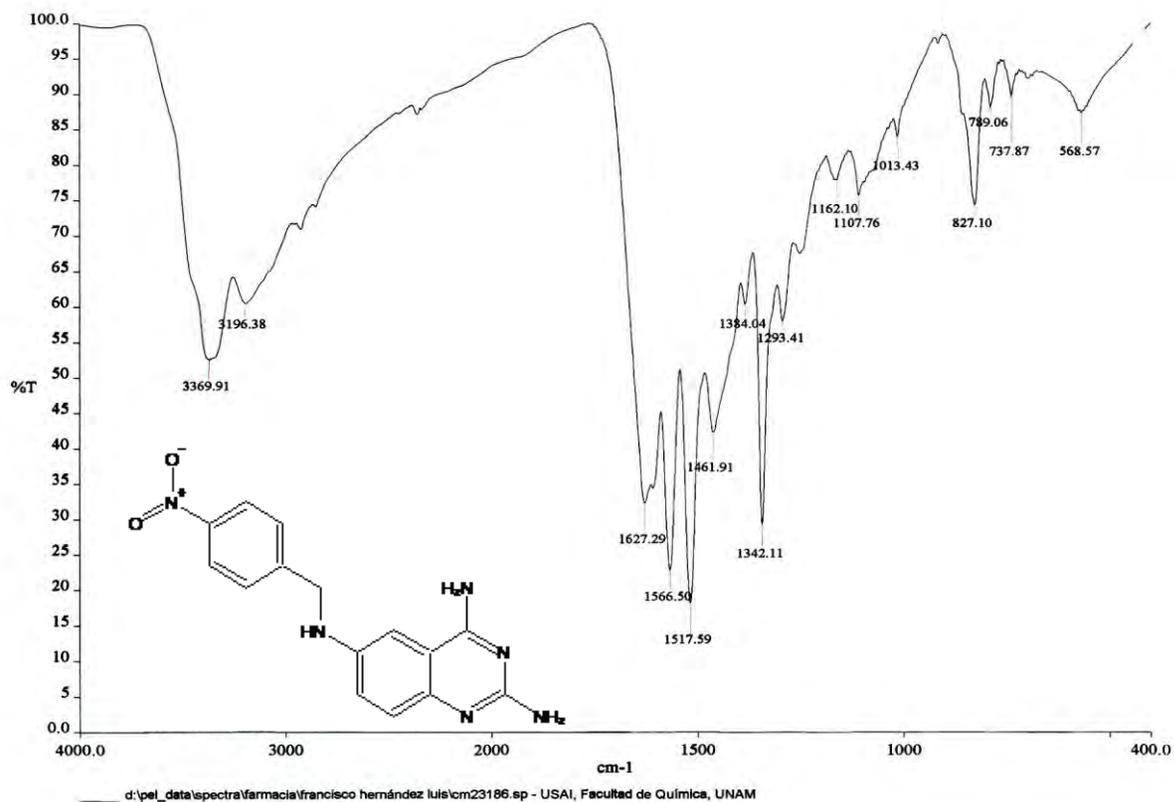
OT1958 1#1-4 RT: 0.00-0.82 AV: 4 NL: 9.27E6
T: + c FAB Full ms [49.50-2000.50]



Espectro de infrarrojo y masas del compuesto 1.



Espectro de RMN de ^1H del compuesto 1.

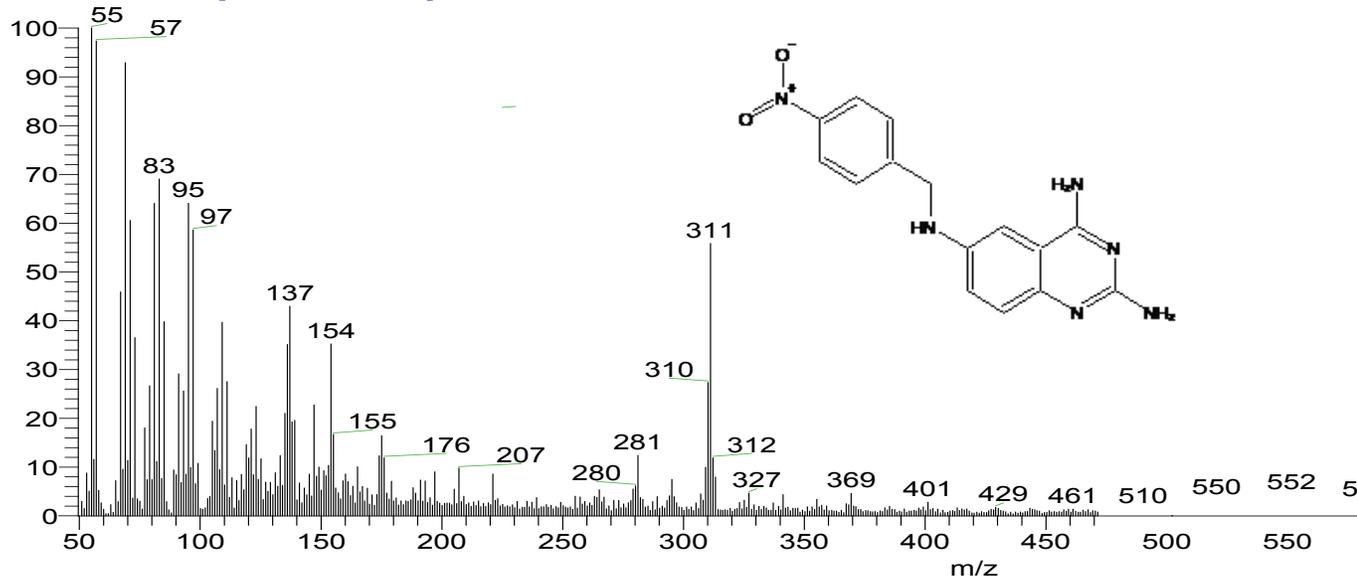


D:\Xcalibur\data\USAIFAB\OT2809_2

6/25/2009 8:53:38 PM

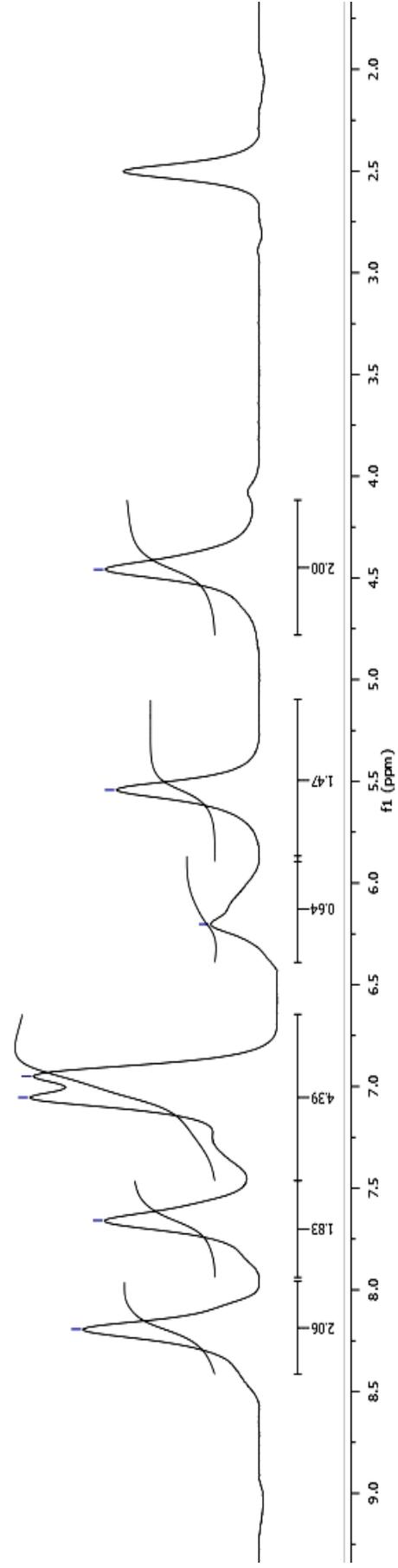
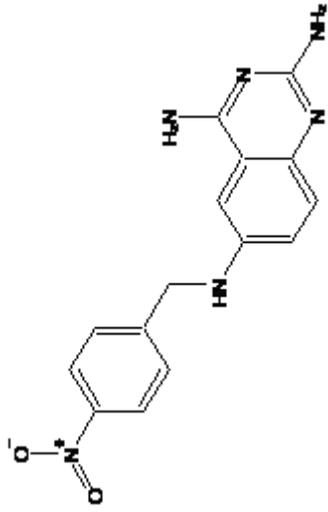
CSH1-A

OT2809_2 #2-4 RT: 0.24-0.71 AV: 3 NL: 4.
T: + c FAB Full ms [49.50-1200.50]

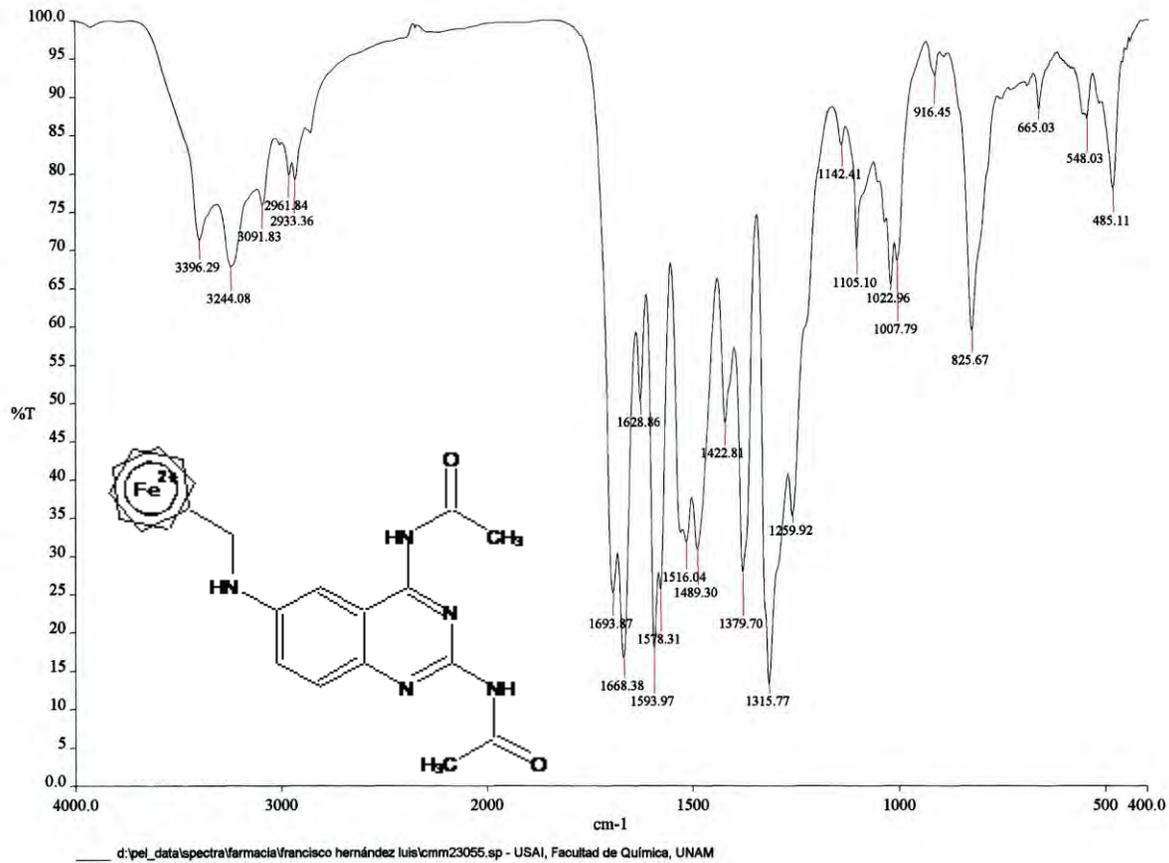


Espectro de infrarrojo y masas del compuesto 2.

8.193
7.659
7.054
6.950
6.202
5.542
4.459



8 Espectro de RMN de ^1H del compuesto 2.

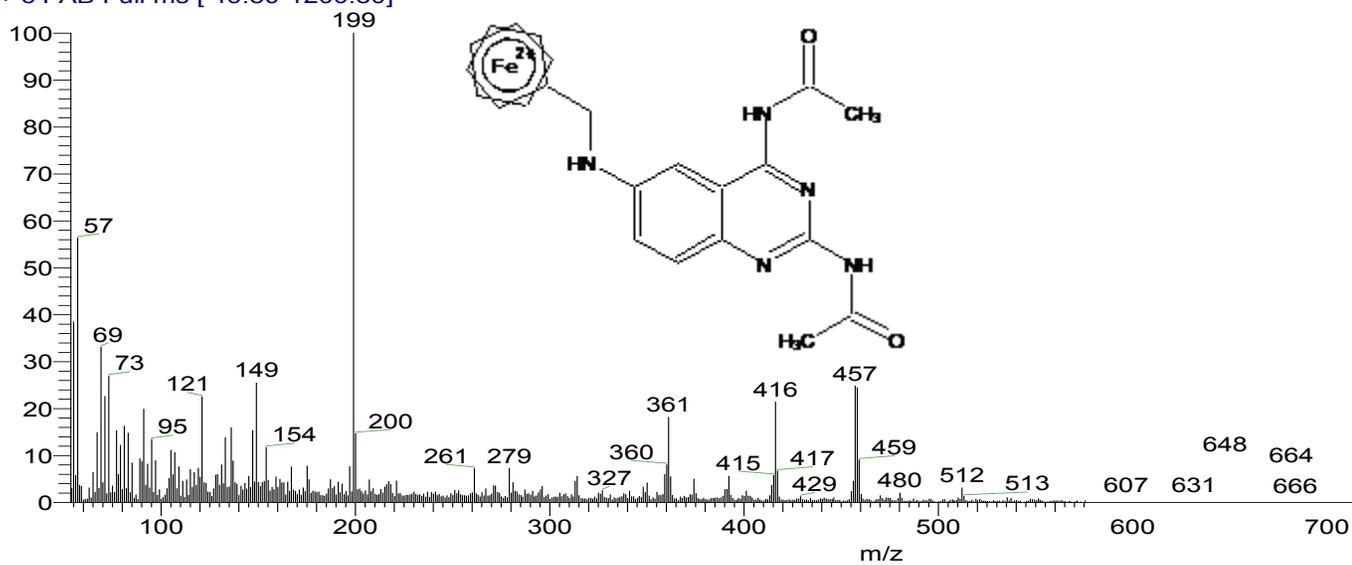


D:\Xcalibur\data\USAI\FAB\OT2810_1

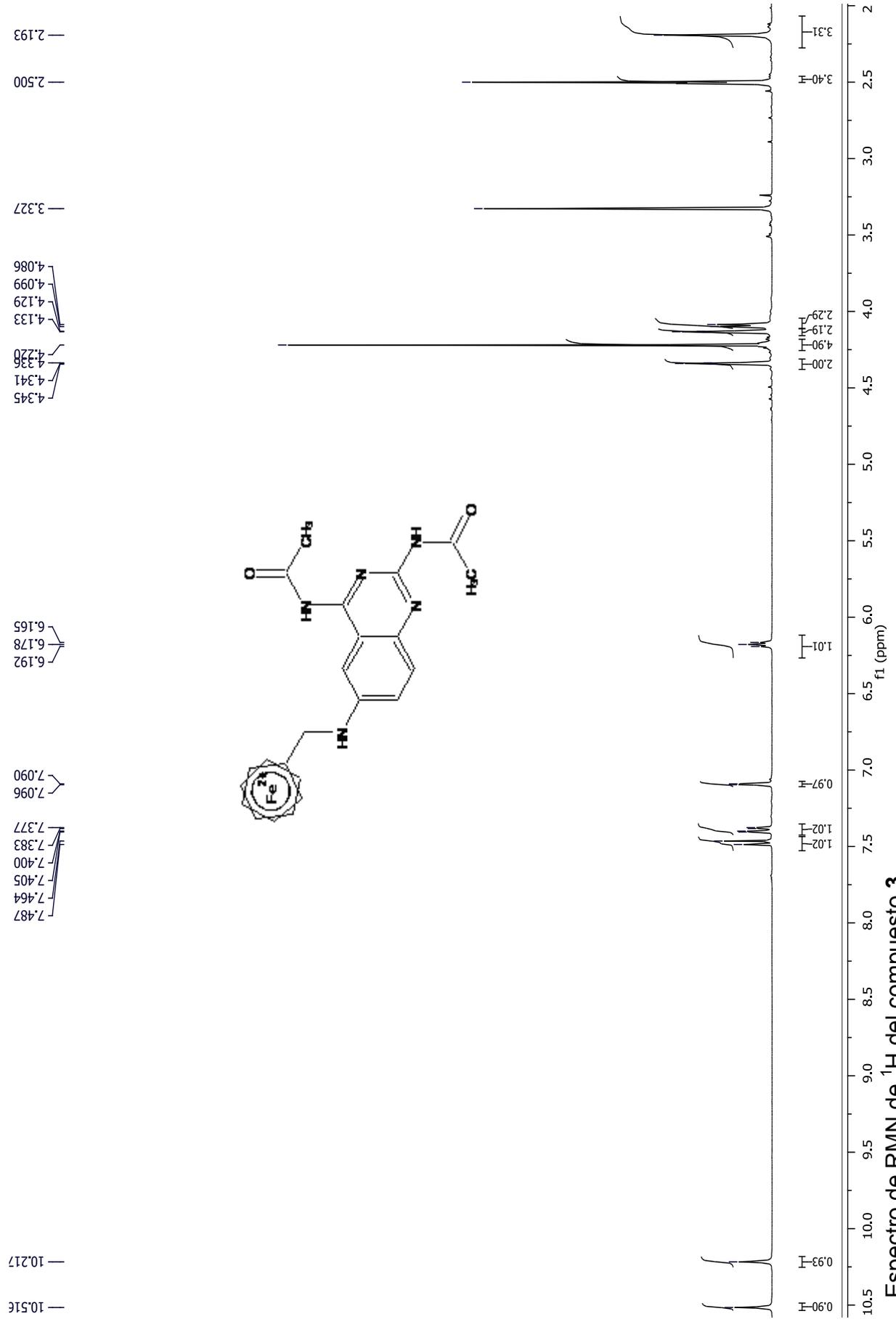
6/25/2009 9:03:05 PM

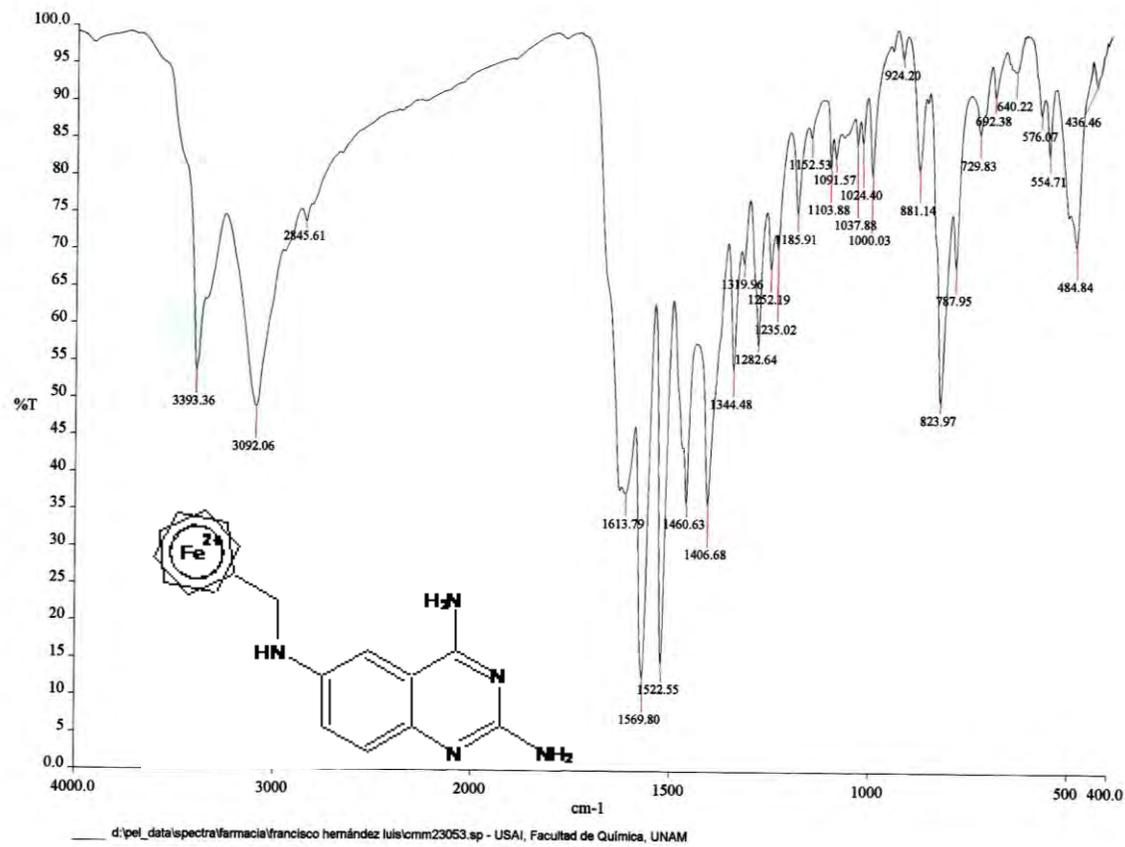
CSHA2-A

OT2810_1 #2-3 RT: 0.24-0.47 AV: 2 NL: 2.
T: + c FAB Full ms [49.50-1200.50]



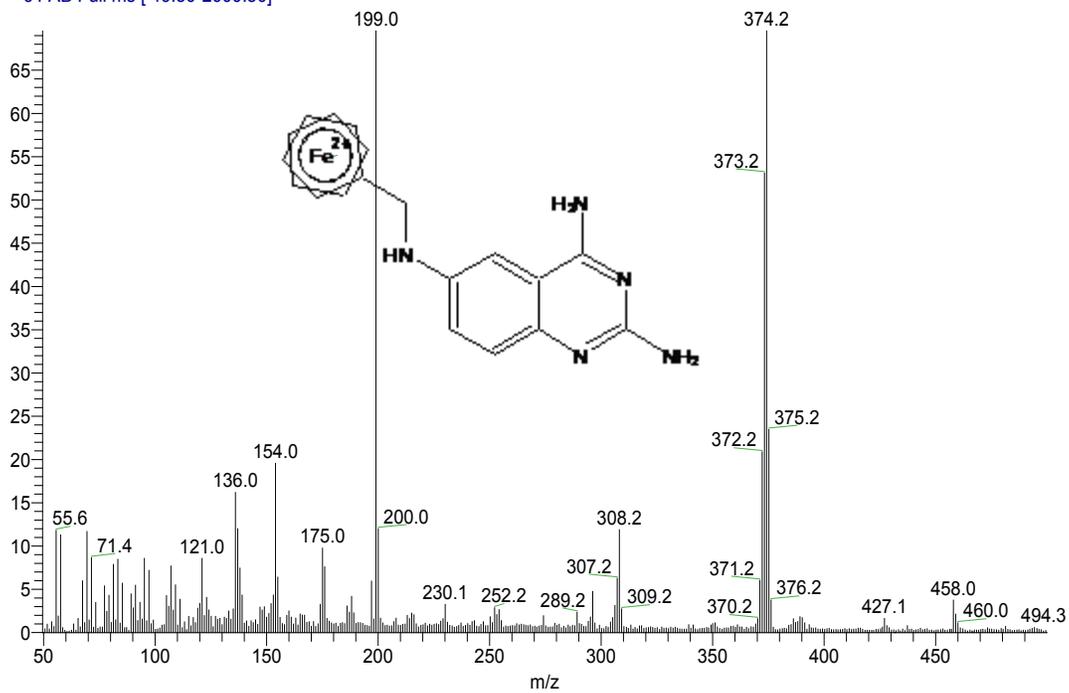
Espectro de infrarrojo y masas del compuesto 3.



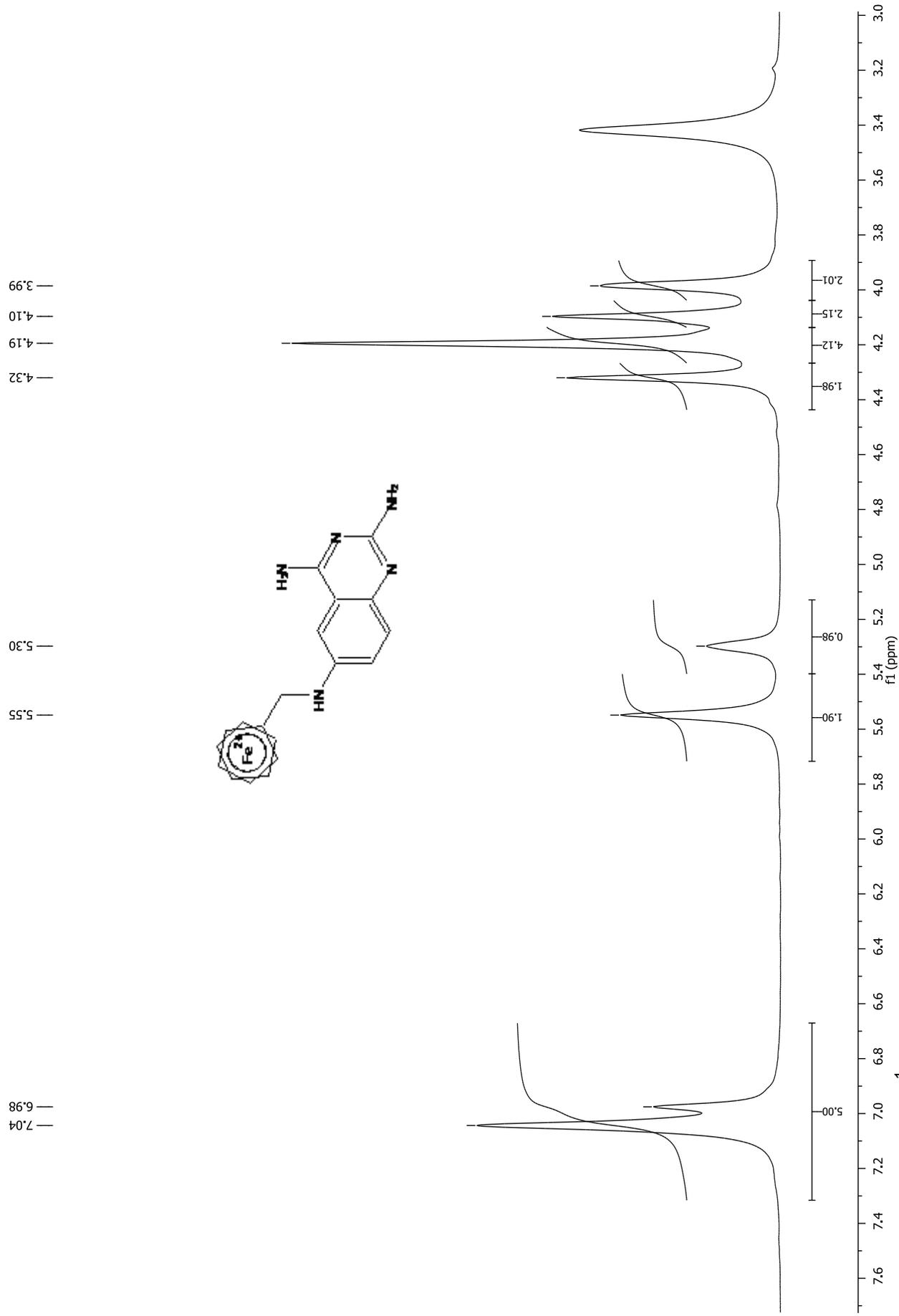


OT1849_1 #1-4 RT: 0.00-0.82 AV: 4 NL: 6.75E6
 T: + c FAB Full ms [49.50-2000.50]

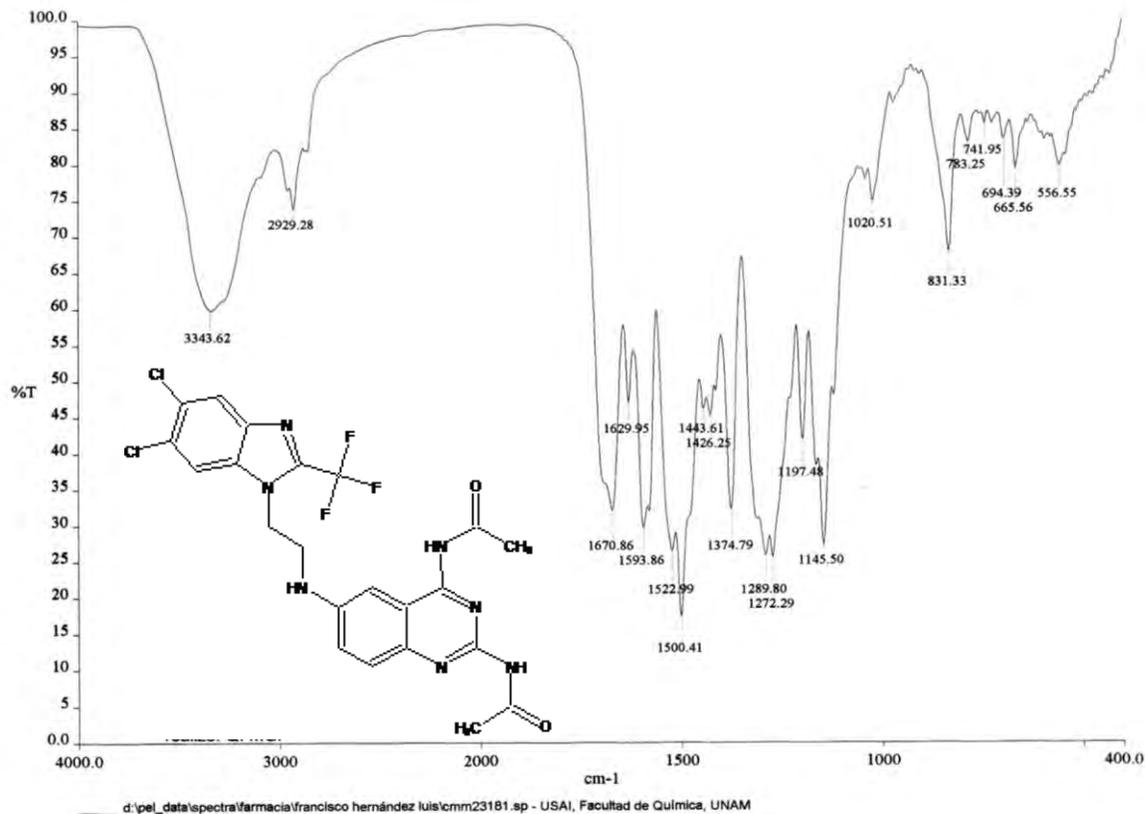
Relative Abundance



Espectro de infrarrojo y masas del compuesto 4.



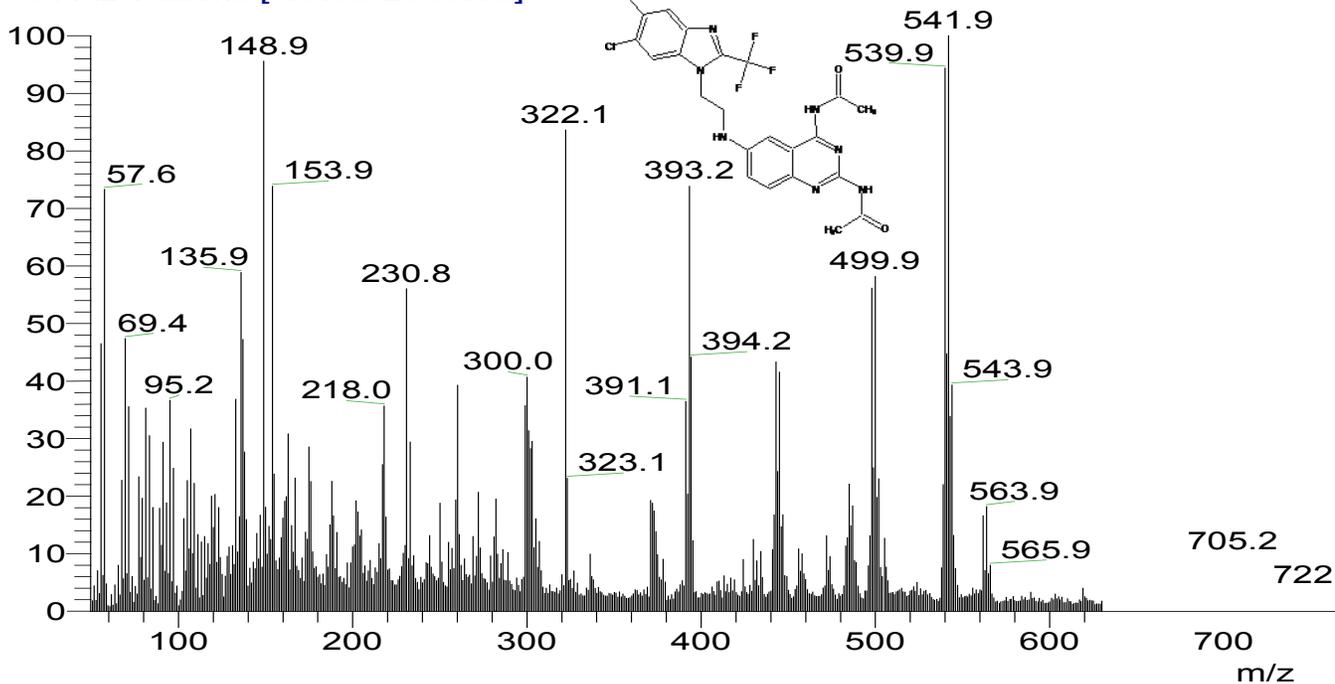
3 Espectro de RMN de ^1H del compuesto **4**.



D:\Xcalibur\data\USAIFAB\OT1993_1

9/19/2008 6:26:41

OT1993_1 #1-4 RT: 0.00-0.82 AV: 4 NL: 3.29E6
T: + c FAB Full ms [49.50-2000.50]



OT1993_1 #1-4 RT: 0.00-0.82 AV: 4 NL: 3.14E6
T: + c FAB Full ms [49.50-2000.50]

100

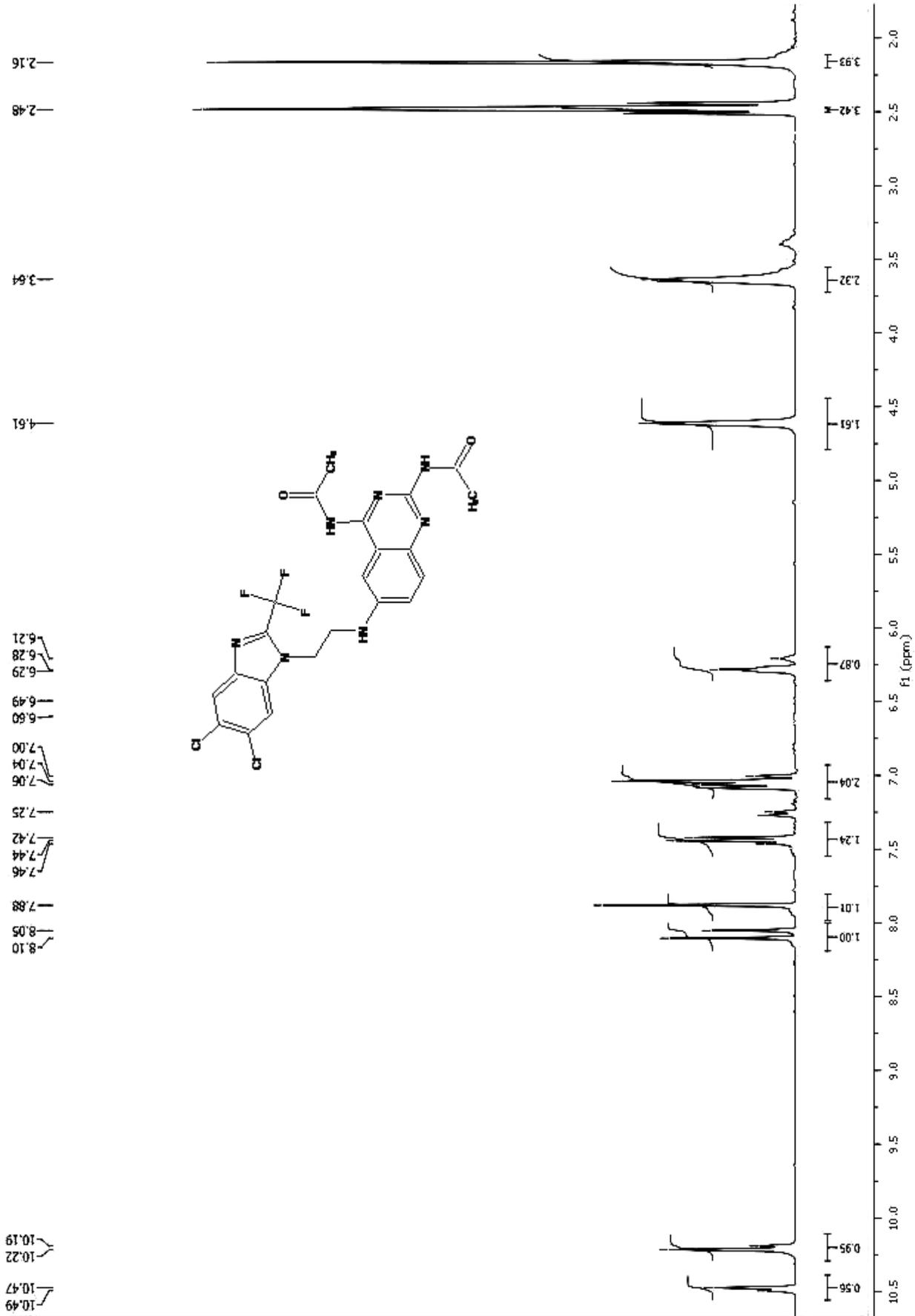
148.9

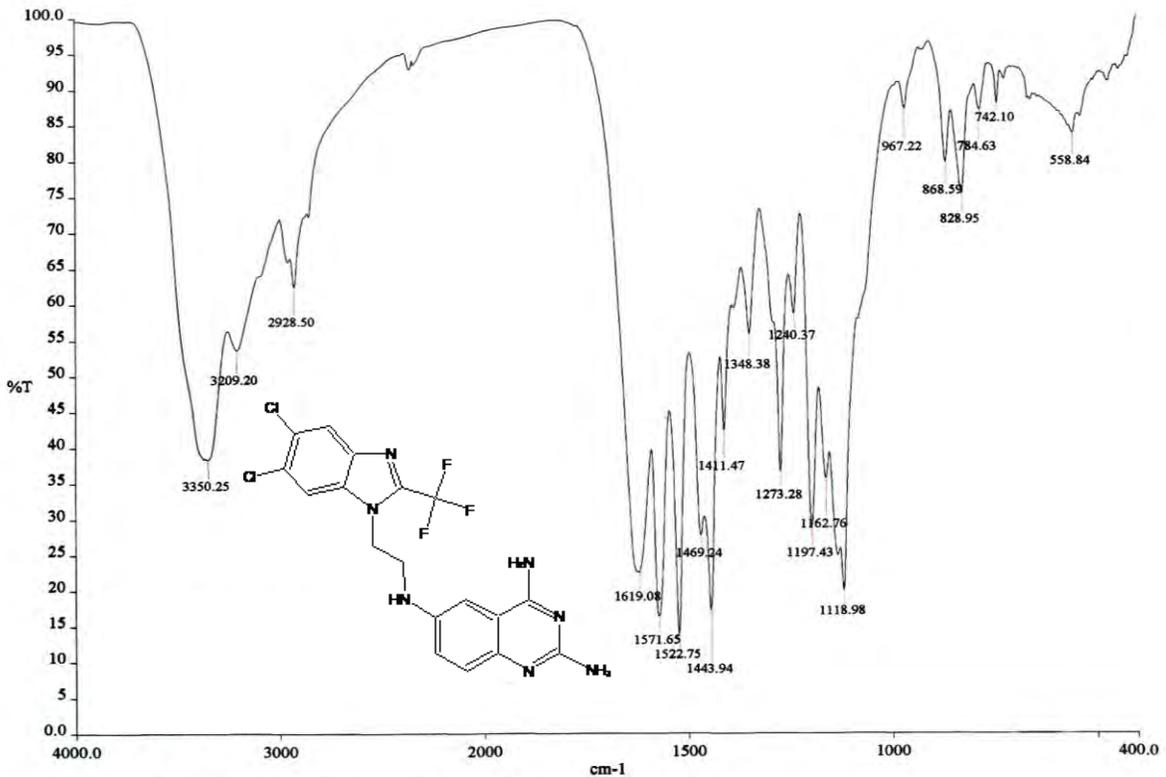
90

94

80 57.6

153.9





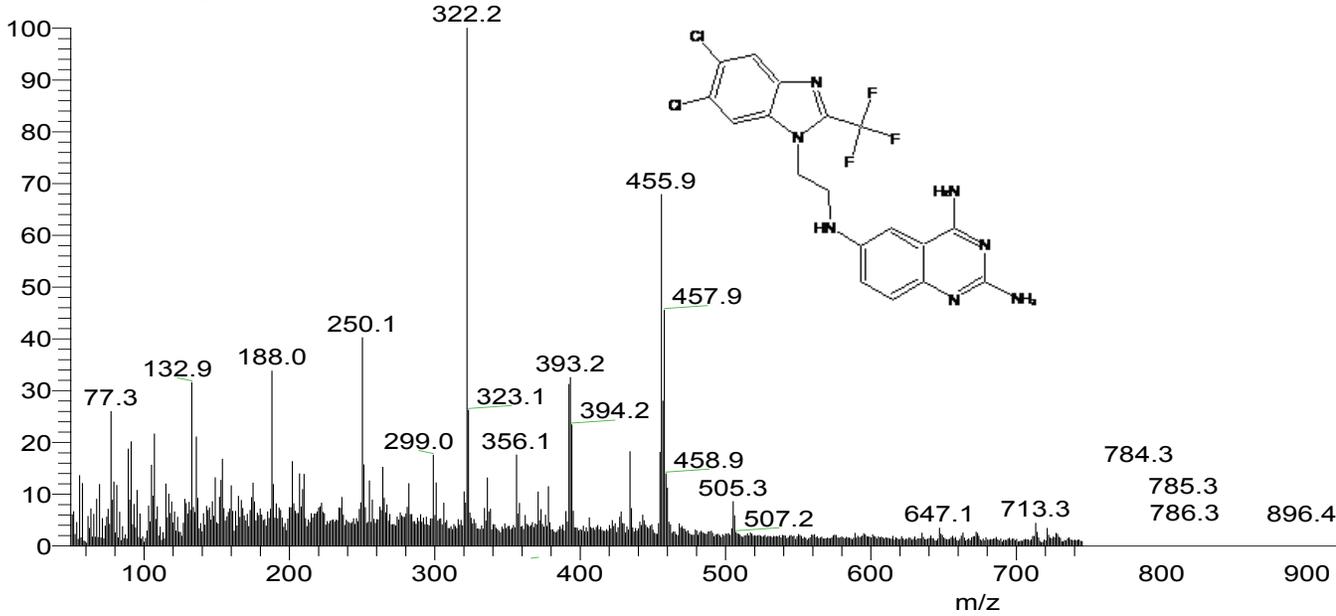
d:\pel_data\spectra\farmacia\francisco hernández luis\cmm23180.sp - USAI, Facultad de Química, UNAM

D:\Xcalibur\data\USA\FAB\OT2011_1

9/24/2008 1:33:18 PM

CSH3

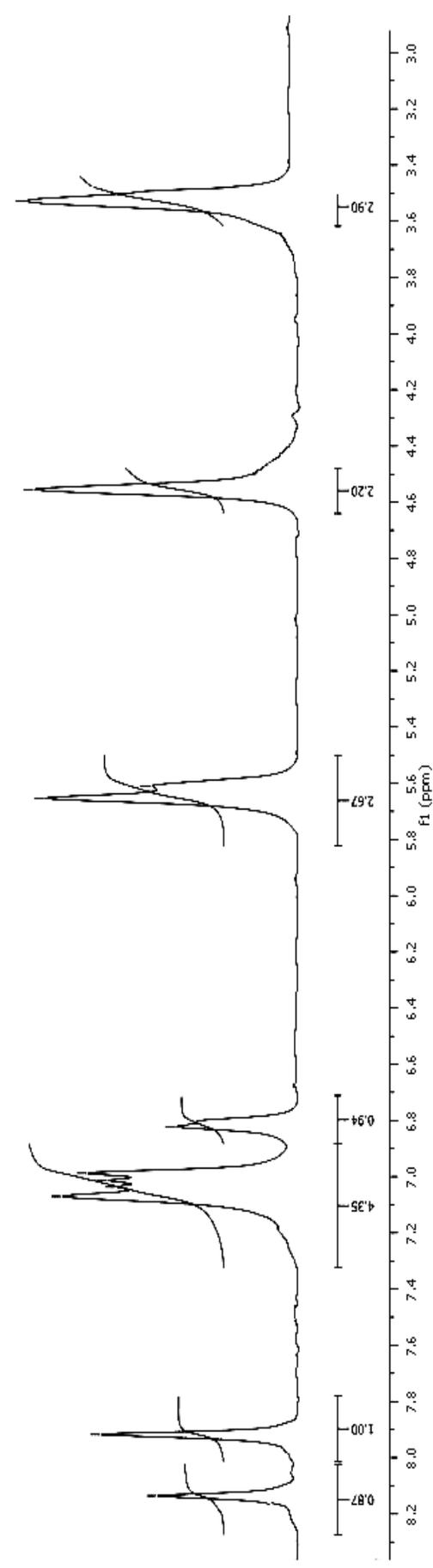
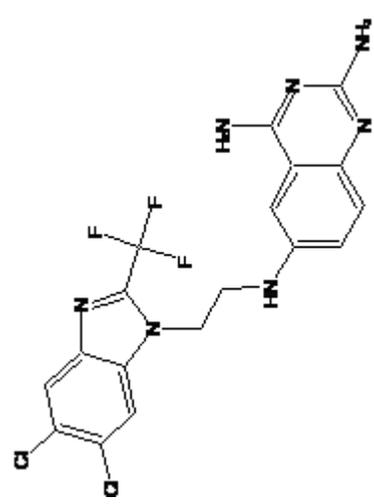
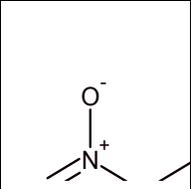
OT2011_1 #1-4 RT: 0.00-0.82 AV: 4 NL: 7.1
T: + c FAB Full ms [49.50-2000.50]



OT2011_1 #1-4 RT: 0.00-0.82 AV: 4 NL: 7.79E5
T: + c FAB Full ms [49.50-2000.50]

Espectro de infrarrojo y masas del compuesto 6.

90
80
70
60



69 Espectro de RMN de ^1H del compuesto **6**.