

Artículos Originales

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

Antiparasitic activity of novel dihydrodibenzo[*c,f*]thiazolo[3,2-*a*]azepin-3(2*H*)-ones against *Leishmania chagasi* and *Trypanosoma cruzi*

Sandra Milena Leal Pinto¹, Alirio Palma Rodríguez², Ederson Cuberos Jaimes², Nelson Galeano², Patricia Escobar Rivero¹

RESUMEN

Introducción: La leishmaniasis y la enfermedad de Chagas son consideradas como problemas de salud pública en varios países, y nuevas estrategias quimioterapéuticas son necesarias para el control de estas enfermedades. **Objetivo:** El objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* la actividad antiparasitaria de 7 nuevas dihidrodibenzo[*c,f*]tiazolo[3,2-*a*]azepin-3(2*H*)-onas contra *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma cruzi*, y la citotoxicidad sobre las células de mamífero Vero y THP-1. **Materiales y métodos:** La actividad antiparasitaria se determinó microscópicamente por conteo directo de parásitos vivos en comparación con el control no tratado, y la citotoxicidad en células de mamífero por el método colorimétrico de MTT. Las formas extracelulares e intracelulares de los parásitos utilizados así como las células de mamífero, fueron tratadas con diferentes concentraciones de los compuestos (0,3–600 µM) por 3-5 días. Los resultados de actividad de los compuestos fueron expresados en concentración inhibitoria (CI₅₀) y concentración citotóxica (CC₅₀). **Resultados:** En *T. cruzi*, 4 compuestos (**4a**, **4b**, **4d**, **4g**) fueron activos contra epimastigotes con rangos de actividad de CI₅₀ entre 11,28-32,66 µM, y tres (**4a**, **4c**, **4g**) contra la forma intracelular (CI₅₀ = 18,42-23,62 µM), sin presentar toxicidad en células de mamífero. En *L. chagasi*, seis compuestos (**4a-d**, **4g**) fueron activos contra promastigotes con CI₅₀ entre 8,27-28,59 µM. El compuesto **4d** fue parcialmente activo contra amastigotes intracelulares de *L. chagasi* (CI₅₀ = 59,36 µM). **Conclusiones:** Los compuestos **4a** y **4g** presentaron actividad *in vitro* contra *L. chagasi* y *T. cruzi* y baja toxicidad en células de mamífero. Estudios posteriores con los compuestos activos encontrados, de genotoxicidad, mecanismos de acción y de evaluación de su actividad en modelos experimentales, son necesarios para establecer su posible uso como antiparasitarios. *Salud UIS* 2009; 41: 268-274

Palabras clave: *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma cruzi*, toxicidad, dihidrodibenzo[*c,f*]tiazolo[3,2-*a*]azepin-3(2*H*)-onas, células Vero y células THP-1

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

2. Laboratorio de Síntesis Orgánica (LSO), Escuela de Química, Universidad Industrial de Santander.

Correspondencia: Sandra Milena Leal Pinto, Bact. CINTROP, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. Sede Guatiguará, Teléfono: 6344000, Ext. 3550, fax: 6540808

E-mail: sandramilena20@gmail.com

Recibido: 15 de octubre de 2009 - **Aprobado:** 15 de diciembre de 2009.

ABSTRACT

Introduction: Leishmaniasis and Chagas disease are considered public health problems in several countries and new chemotherapeutic approaches are needed to control these diseases. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the antiparasitic activity of 7 new dihydrodibenzo[*c,f*]thiazolo[3,2-*a*]azepin-3(2H)-ones on *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma cruzi*, and the cytotoxicity on Vero and THP-1 cells. **Materials and methods:** The antiparasitic activities were determined microscopically counting living parasites compared with untreated control, and the mammalian cell toxicities using the MTT colorimetric test. (Extracellular and intracellular forms of the parasites used and mammalian cells were treated with different concentrations (0.3-600 μ M) of compounds for 3-5 days). The activities of the compounds were expressed as the concentration to inhibit 50% percent of parasites (IC_{50}) and the concentration to kill 50% of the mammalian cells (CC_{50}). **Results:** 4 compounds (**4a**, **4b**, **4d**, **4g**) were active against *T. cruzi* epimastigotes with ranges of IC_{50} from 11.28 to 32.66 μ M, and three (**4a**, **4c**, **4g**) inhibited the intracellular form (IC_{50} = 18.42-23.62 μ M), with low toxicity on mammalian cells. In *L. chagasi*, 6 compounds (**4a-d**, **4g**) were active against promastigote forms (IC_{50} = 8.27-28.59 μ M). Compound **4d** was partially active against intracellular amastigotes of *L. chagasi* (IC_{50} = 59.36 μ M). **Conclusions:** The compounds **4a** and **4g** were actives on both *T. cruzi* and *L. chagasi* parasites with low toxicity on mammalian cells. Further studies of genotoxicity, mechanisms of action and evaluation of its activity in experimental models are necessities. *Salud UIS* 2009; 41: 268-274

Keywords: *Leishmania chagasi*, *Trypanosoma cruzi*, toxicity, dihydrodibenzo[*c,f*]-thiazolo[3,2-*a*]azepin-3(2H)-ones, Vero and THP-1 cells

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una patología con diferentes formas clínicas como leishmaniasis cutánea (LC), leishmaniasis mucocutánea (LMC) y leishmaniasis visceral (LV). Son producidas por diferentes especies de *Leishmania*, las cuales son transmitidas al hospedero vertebrado a través de mosquitos del género *Phlebotomus* en Europa, Asia y África, y *Lutzomia* en América. Se estima que al menos 88 países en el mundo son endémicos para la enfermedad, y que ésta afecta cerca de 12 millones de personas con 2 millones de nuevos casos anuales^{1,2}. En Colombia, en el año 2005 se reportaron 18.000 nuevos casos de leishmaniasis, siendo LC la forma clínica más común. Sin embargo, casos de LV (forma mortal de la enfermedad si no se trata) continúan observándose³. Los antimoniales pentavalentes (Pentostam® y Glucantime®) siguen siendo los medicamentos de elección. Como segunda opción se utiliza la anfotericina B y sus presentaciones liposomales, la pentamidina, la paramomicina y la miltefosina^{2,4,5}.

La enfermedad de Chagas afecta a 18-20 millones de personas y 40 millones están en riesgo de contraerla en América Latina^{5,6}. En Colombia, se estima que cerca de 700.000 personas están infectadas con el parásito, observándose una incidencia de 30 y 40 mil casos al año⁷. Esta parasitosis es producida por el parásito *T. cruzi*, y es transmitida a los hospederos vertebrados a través de las heces de triatomos infectados con el parásito. Existen otras formas de transmisión como la

oral, trasplacentaria, por trasplantes de órganos, leche materna y transfusiones sanguíneas⁸. El nifurtimox y el benznidazol son los medicamentos utilizados para su tratamiento; sin embargo, éstos son efectivos solo en la fase aguda de la infección⁶.

El panorama actual para el tratamiento de estas dos parasitosis es bastante precario. Los medicamentos disponibles son pocos, costosos, tóxicos, de eficacia variable, además su administración es dolorosa y dado que deben ser aplicados durante períodos prolongados, un gran número de pacientes desiste de los mismos. Sumado a lo anterior, casos de parásitos resistentes a los tratamientos actuales han sido reportados^{1-5,6,9}.

El desarrollo de nuevos medicamentos para estas enfermedades, consideradas como olvidadas y no tenidas en cuenta por la industria farmacéutica, debe ser prioritario^{2,10}.

En este sentido, el Laboratorio de Síntesis Orgánica conjuntamente con el Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad Industrial de Santander, inició un estudio sistemático sobre el potencial sintético de las *orto*-alililanilinas en la síntesis de nuevos derivados de heterociclos nitrogenados benzofusionados¹¹⁻¹³ con potencial actividad biológica, incluida la actividad anti-*T. cruzi* y anti-*L. chagasi*¹⁴. Como continuación de este estudio sistemático, en el presente artículo se reporta la actividad antiparasitaria y citotoxicidad de siete derivados de la dihidrodibenzo[*c,f*]

tiazolo[3,2-*a*]azepin-3(2*H*)-ona, **4a-g**, un nuevo sistema heterocíclico constituido de un anillo de la dibenzo[*b,e*]azepina fusionado a un anillo de 1,3-tiazolidinona.

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis

La síntesis de los productos intermedios y finales se realizó siguiendo protocolos reportados en la literatura con ligeras modificaciones^{11-13, 15-17}.

Compuestos y medicamentos de referencia

Se evaluaron siete (7) nuevas dihidrodibenzo[*c,f*]tiazolo[3,2-*a*]azepin-3(2*H*)-onas (Figura 1) y como medicamentos de referencia se utilizaron la anfotericina B y el nifurtimox. Se prepararon soluciones stock en <1% de dimetil sulfóxido (DMSO, Carlo Erba) y soluciones de trabajo en medio de cultivo que correspondían a las concentraciones de los compuestos a evaluar¹⁴.

Parásitos y células

Promastigotes de *L. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) fueron mantenidos en medio RPMI 1640 (Gibco) suplementado con hemina (Sigma), HEPES (Sigma) y suero bovino fetal inactivado (SBFi, Gibco), y epimastigotes de *T. cruzi* (cepa 320I01)^{18,19} se cultivaron en medio LIT 10% SBFi a 28°C. Las células Vero (células epiteliales de riñón de mono verde africano ATCC, código TIB202) y THP-1 (monocitos humanos, ATCC, código CCL-81) fueron cultivadas en medio RPMI 1640 10% SBFi 37°C 5% CO₂ y 95% de humedad.

Actividad contra promastigotes de *L. chagasi* y epimastigotes de *T. cruzi*

Promastigotes de *L. chagasi* (1,5 x10⁶ parásitos/ml) y epimastigotes de *T. cruzi* cepa 320I01 (5x10⁵ parásitos/ml) en fase exponencial de crecimiento fueron incubados durante 72 h a 28 °C con los diferentes compuestos, evaluando inicialmente concentraciones de 0,3-300 µg/ml, y realizando diluciones seriadas 1:10. Como controles se dejaron los parásitos sin tratamiento. La actividad en promastigotes fue determinada mediante el método colorimétrico descrito por Mosmann modificado, empleando la sal de tetrazolio (MTT, Sigma) en combinación con el fenazina metosulfato (PMS, Sigma) e incubando 4 h a 37 °C, 5% CO₂ y 95% de atmósfera de humedad. La intensidad del color fue determinado en un lector de microplacas Anthos 2020 a una longitud de onda de 580 nm. La inhibición

del crecimiento de los epimastigotes de *T. cruzi* fue determinada por conteo microscópico en una cámara de Neubauer.

Actividad contra las formas intracelulares de los parásitos

Las células THP-1 transformadas con forbol miristato acetato (PMA, Sigma) durante 72 h, y células Vero, fueron infectadas con promastigotes de *L. chagasi* en fase estacionaria de crecimiento y tripomastigotes de *T. cruzi* cepa 320I01 en un radio célula: parásito de 1:10, durante 24 h a 37°C, 5%CO₂ y 95% atmósfera de humedad. Las células infectadas fueron tratadas con los compuestos durante 5 días a 37°C, 5%CO₂ y 95% atmósfera de humedad, y adicionando una segunda dosis a las 72 h. Las células fueron fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa. El porcentaje de infección en 300 células fue determinado microscópicamente.

Ensayos de toxicidad en células de mamífero

Las células Vero y THP-1 transformadas fueron tratadas con los compuestos a concentraciones iniciales de 0,6-600 µg/ml durante 72 h a 37°C, 5%CO₂ y 95% de humedad. La mortalidad en las células se determinó por el método colorimétrico MTT. La toxicidad de los compuestos se calculó mediante la fórmula % de citotoxicidad= 1-(número de células del grupo tratado/número de células del grupo control) x 100²⁰.

Análisis de resultados

Las actividades citotóxica e inhibitoria 50 (CC₅₀ y CI₅₀) de cada uno de los compuestos se calcularon empleando el programa de regresión sigmoidal *Mxsoft*TM (ID Business Solution, Guildford, UK). Las desviaciones estándar fueron calculadas a partir del promedio de las CI₅₀ de dos experimentos, y las diferencias significativas se determinaron utilizando la Prueba t-Student. Valores de *p* < 0,05 se consideraron estadísticamente significativos.

El Índice de Selectividad (IS) fue calculado mediante la siguiente fórmula: CC₅₀ en células de mamífero/ CI₅₀ en parásitos.

RESULTADOS

Síntesis

Como se observa en la Figura 1, la preparación de las nuevas dihidrodibenzo[*c,f*]tiazolo[3,2-*a*]azepin-3(2*H*)-onas **4a-g** se realizó en tres etapas, partiendo de las ortoalil-*N*-bencilanilinas sustituidas **1a-g**, compuestos éstos que previamente fueron obtenidos de las correspondientes

N-alil-*N*-bencilanilinas por un proceso de transposición amino-Claisen. Inicialmente, mediante una alquilación intramolecular de Friedel-Crafts catalizada por un ácido de Brønsted, los precursores **1a-g** fueron transformados a sus correspondientes dihidrodibenzo[*b,e*]azepinas **2a-g**, las cuales, a su vez, en la segunda etapa fueron tratadas con cantidades equimolares de cloro-cromato de piridinio (PCC) en diclorometano para convertir las cuantitativamente en las dibenzo[*b,e*]azepinas **3a-g**. En

la tercera etapa de la ruta sintética, se utilizó el enlace imínico endocíclico del anillo azepínico central para hacerlo reaccionar con el ácido mercapto acético en una reacción de ciclocondensación, utilizando cantidades muy pequeñas del complejo trifluoruro de boro-dietil éter como catalizador, y tolueno a reflujo como solvente de la reacción. En estas condiciones y después de un prolongado calentamiento, se obtuvieron los productos de interés **4a-g**.

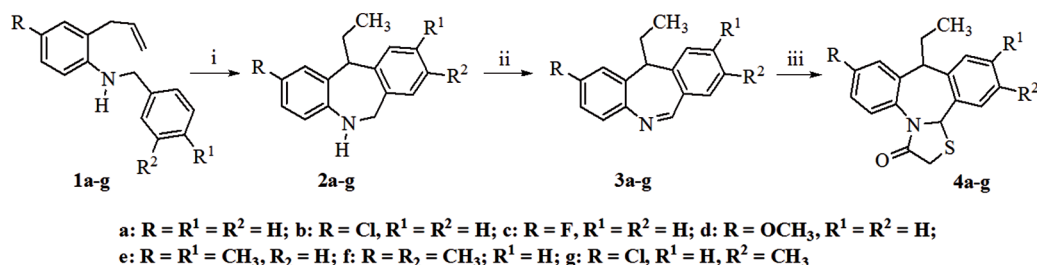


Figura 1. Reactivos y condiciones: (i) 95% H₂SO₄, 75-90 °C, 5-60 min., o 70% HClO₄, 90 °C, 60 min. (para el derivado **1d**). (ii) 1 equiv PCC, CH₂Cl₂, 0 °C, 30-40 min. (iii) 3 equiv HSCH₂CO₂H, BF₃·OEt₂ (trazas), tolueno, reflujo, 24-40 h.

Actividad antiparasitaria y citotóxica

Los resultados de la actividad de las nuevas dihidrodibenzo[*c,f*]tiazolo[3,2-*a*]azepin-3(2H)-onas contra *L. chagasi*, *T. cruzi*, células Vero y macrófagos THP-1 se muestran en la Tabla 1. Los compuestos con actividades de CI₅₀ y/o CC₅₀ < 50 μM fueron considerados activos y/o tóxicos.

En promastigotes de *L. chagasi*, los compuestos **4a-4e**, **4g**, fueron activos con rangos de IC₅₀ entre 8,27 y 28,59 μM e IS > 2; sin embargo, sólo el compuesto **4d** que mostró una mayor inhibición en promastigotes, al ser evaluado en la forma intracelular demostró una inhibición parcial con IC₅₀ = 59,36 μM e IS = 4,68.

Los epimastigotes de *T. cruzi* fueron susceptibles al tratamiento con los derivados **4a**, **4c**, **4d** y **4f**, con rangos de actividad de CI₅₀ = 11,28-32,66 μM y con IS > 2, siendo el compuesto **4b** el más activo y con un IS de 10,98. Los compuestos **4a**, **4c**, **4g** inhibieron amastigotes intracelulares de *T. cruzi*, con rangos de CI₅₀ = 18,42-23,62 μM y con IS > 2. De la misma manera, **4a** y **4e** inhibieron el crecimiento de ambas formas parasitarias; sin embargo, el compuesto **4c** fue

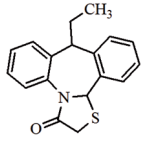
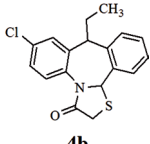
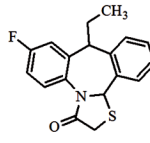
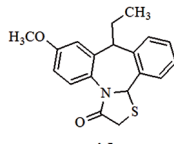
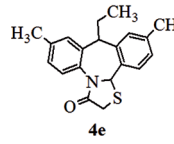
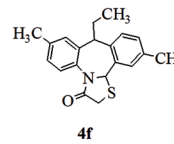
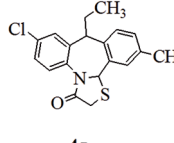
activo en la forma intracelular del parásito (CI₅₀ = 22,86 μM), mostrando también una inhibición parcial en epimastigotes de *T. cruzi* (CI₅₀ = 56,76 μM).

La citotoxicidad que presentaron estos compuestos fue, en general, baja, con rangos de CC₅₀ 31,50- >300 μM y 41,60- >300 μM en células Vero y THP-1, respectivamente. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (*p* = 0,1), al comparar las CC₅₀ de las dos líneas celulares de mamífero probadas.

Los compuestos **4a**, **4b**, **4d**, **4g** fueron activos contra las formas extracelulares de ambos parásitos, sin presentar toxicidad en las células de mamífero. Los compuestos **4a** y **4g** fueron activos contra amastigotes intracelulares de *T. cruzi*, aunque **4g** fue considerado parcialmente tóxico, con una CC₅₀ = 50,66 μM.

No se observó diferencia significativa (*p* > 0,05) al comparar la actividad de todos los compuestos evaluados sobre las formas extracelulares de ambos parásitos, al igual que cuando se comparó la actividad entre epimastigotes y amastigotes intracelulares de *T. cruzi* (*p* = 0,26).

Tabla 1. Actividad antiparasitaria y citotóxica de las dihidrodibenzo[*c,f*]tiazolo[3,2-*a*]azepin-3(2*H*)-onas **4a-g**

Compuesto	<i>T. cruzi</i> CI ₅₀ ^a (μM±DS ^c)				<i>L. chagasi</i> CI ₅₀ (μM±DS)			Células de mamífero CC ₅₀ ^b (μM±DS)		
	epimastigotes	IS ^d	Amastigotes intracelulares	IS	promastigotes	IS	Amastigotes intracelulares	IS	Vero	THP-1
 4a	32,66 ±4,03	>9,18	23,62 ±1,90	12,70	11,65 ±9,02	>25,75	>100	>3	>300	>300
 4b	11,28 ±9,8	10,98	58,52 ±1,95	2,11	10,05 ±2,3	4,26	>100	>0,42	123,95 ±1,15	42,9 ±13,98
 4c	65,76 ±4,1	>4,56	22,86 ±0,10	>13,12	13,68 ±5,19	>21,92	>100	>3	>300	>300
 4d	20,76 ±0,52	12,73	97,38 ±4,27	2,70	8,27 ±2,42	33,65	59,36 ±4,27	4,68	263,75 ±4,82	278,36 ±2,89
 4e	61,05 ±3,37	0,51	>100	>0,31	28,50 ±10,21	2,60	>100	>0,74	31,50 ±1,26	74,24 ±24,75
 4f	68,38 ±1,11	0,79	>34,35	>1,57	>100	>0,90	>100	>0,90	54,06 ±9,62	90,79 ±2,84
 4g	17,24 ±0,34	2,93	18,42 ±1,51	2,75	28,59 ±2,53	1,45	>100	>0,41	50,66 ±6,52	41,62 ±1,48
Nfx ^e	1,23 ±0,12	17,04	0,48 ±0,19	43,68					20,97 ±4,2	
AmB ^f					0,02 ±0,001	1392	0,20 ±0,001	139,2		27,84 ±1,25

^a Concentración Inhibitoria; ^b Concentración Citotóxica, ^c Desviación Estándar, ^d Índice de Selectividad, ^e Nifurtimox,

^f Anfotericina B

DISCUSIÓN

Las nuevas dihidrodibenzo[*c,f*]tiazolo[3,2-*a*]azepin-3(2*H*)-onas **4a**, **4b**, **4d**, y **4g** fueron activas contra ambas formas parasitarias de *T. cruzi* y con IS > 2. Estos resultados son importantes, teniendo en cuenta que dichos compuestos no han sido previamente reportados en la literatura, y que no se les conoce ninguna actividad biológica.

A pesar que los compuestos estudiados fueron menos activos que el medicamento de referencia (nifurtimox), utilizado contra *T. cruzi*, éstos presentan la ventaja de no ser tóxicos a las concentraciones evaluadas, además se pueden sintetizar con relativa facilidad a partir de materia prima asequible y económicamente viable. Por eso, en la actualidad se están llevando a cabo estudios QSAR, con el fin de optimizar su actividad antiparasitaria y de esta manera avanzar en el desarrollo de un medicamento eficaz para el tratamiento de la enfermedad de Chagas.

En *L. chagasi* no se observó el mismo comportamiento, pues aunque estos compuestos fueron activos contra las formas de promastigote, no tuvieron el mismo efecto sobre la forma intracelular. Sin embargo, la toxicidad que revelaron fue baja en los macrófagos utilizados como modelo de infección para este parásito, y se podría emplear este modelo de célula para continuar el estudio de esta clase de compuestos en otras especies de *Leishmania*.

En conclusión, en este estudio se demostró que las dihidrodibenzo[*c,f*]tiazolo[3,2-*a*]azepin-3(2*H*)-onas **4a**, **4c**, **4d** y **4g** evaluadas inhiben amastigotes intracelulares de *T. cruzi* y promastigotes de *L. chagasi*, sin que presenten toxicidad en células de mamífero. Dado que estos compuestos no han sido anteriormente probados contra parásitos, los resultados obtenidos constituyen una buena base para seguir avanzando en las siguientes etapas del descubrimiento de fármacos antiparasitarios, con la ayuda de otros estudios como modelos *in vivo*, mecanismos de acción, sinergismos y con herramientas de la química computacional que ayudan a potencializar su acción como son los estudios QSAR.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a COLCIENCIAS por la financiación de este trabajo a través del proyecto No 1102-405-20350 (contrato No 106-2007), al Centro de Excelencia CENIVAM (contrato No 432), y a la Universidad Industrial de Santander.

REFERENCIAS

1. <http://www.who.int/health-topics/leishmaniasis.html>
2. Sereno D, da Silva AC, Mathieu-Daude F, Ouaisi A. Advances and perspectives in Leishmania cell based drug-screening procedures. *Parasitol Int* 2007; 56: 3-7.
3. Instituto Nacional de Salud. Programa de Enfermedades de Transmisión Vectorial. Situación de leishmaniasis en Colombia. Sivigila 2006; semanas epidemiológicas 1-12.
4. Croft SL, Seifert K, Yarley V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res* 2006; 123: 399-410.
5. Croft SL, Barrett MP, Urbina JA. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *TRENDS in Parasitol* 2005; 21: 508-512.
6. Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *TRENDS in Parasitol* 2003; 19: 495-501.
7. Carod FJ. Enfermedad de Chagas e ictus. *Neurología* 2006; 21: 135-149.
8. Santander SP, Cuéllar A, Thomas M, Guzmán F, Gómez A, López MC, et al. Expresión de marcadores en células dendríticas de pacientes chagásicos crónicos estimuladas con la proteína KMP-11 y el péptido K1 de *Trypanosoma cruzi*. *Biomédica* 2007; 27: 18-27.
9. Coura JR. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 549-554.
10. Davies CR, Kaye P, Croft SL, Sundar S. Leishmaniasis: new approaches to disease control. *Clin. Rev* 2007; 326: 377-382.
11. Palma A, Jaimes J, Kouznetsov VV, Stashenko E, Bahsas A, Amaro J. New and efficient synthesis of 6,11-dihydro-11-ethyl-5*H*-dibenz[*b,e*]azepine derivatives starting from *N*-benzylanilines via amino-Claisen and Friedel-Crafts methodologies. *Synlett* 2004; 2721-2724.
12. Yépez AF, Palma A, Stashenko E, Bahsas A, Amaro JM. 2-Allyl-*N*-benzyl substituted α -naphthylamines as building blocks in heterocyclic synthesis. New and efficient synthesis of benz[*e*]naphtho[1,2-*b*]azepine and naphtho[1,2-*b*]azepine derivatives. *Tetrahedron Lett* 2006; 47: 5825-5828.
13. Gómez SL, Stashenko E, Palma A, Bahsas A, Amaro JM. Sequential amino-Claisen rearrangement/intramolecular 1,3-dipolar cycloaddition/reductive cleavage approach to the stereoselective synthesis of *cis*-4-hydroxy-2-aryl-2,3,4,5-tetrahydro-1(1*H*)-benzazepines. *Synlett* 2006; 2275-2277.

14. Palma A, Yépes AF, Leal SM, Coronado CA, Escobar P. Synthesis and *in vitro* activity of new tetrahydronaphtho[1,2-*b*]azepine derivatives against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania chagasi* parasites. *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19: 2360-2363.
15. Anderson WK, Lai G. Boron trifluoride-diethyl ether complex catalyzed aromatic amino-Claisen rearrangements. *Synthesis* 1995: 1287-1290.
16. Brown FC. 4-Thiazolidinones. *Chem Rev* 1961; 61: 463-521.
17. Singh SP, Parmar SS, Raman K, Stenberg VI. Chemistry and biological activity of thiazolidinones. *Chem Rev* 1981; 81: 175-203.
18. Luna KP, Jaramillo CL, Gutierrez R, Esteban L, Angulo VM. Aislamiento de *Trypanosoma cruzi* en pacientes en fase crónica de la enfermedad de Chagas por medio de hemocultivo y xenocultivo. *Biomédica*. 2003; 23:119.
19. Luna KP, Jaramillo CL, Hernández G, Gutiérrez R, Vallejo GA, Angulo VM. ITS-RFLP-and RAPD-based genetic variability of *Trypanosoma cruzi* I, human and vector strains in Santander(Colombia). *Parasitol res* 2009; 105: 519-528.
20. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Meth* 1983; 65: 55-63.