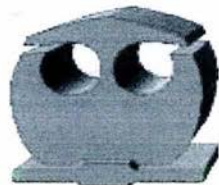


**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACIÓN ANTIINFLAMATORIA DE DERIVADOS
ELECTROTRANSFORMADOS DE LA HISPANOLONA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO-BIÓLOGO

PRESENTA:

JUAN ALBERTO GUEVARA SALAZAR

MÉXICO, D.F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Jurado Asignado:

Presidente	JOSÉ MANUEL MÉNDEZ STIVALET
Vocal	ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ
Secretario	BERNARDO ANTONIO FRONTANA URIBE
1 ^{er} suplente	MARÍA DE LOURDES MAYET CRUZ
2 ^o suplente	MARGARITA ROMERO ÁVILA

Sitio donde se desarrolló el tema:

**LABORATORIO DE ELECTROQUÍMICA Y ELECTROSÍNTESIS
Y EN LA UNIDAD DE PRUEBAS DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA
DEL INSTITUTO DE QUÍMICA, U.N.A.M.**

Asesor:



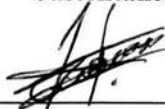
Dr. Bernardo Antonio Frontana Uribe

Supervisor Técnico:



M. en C. María Teresa Ramírez Apan

Sustentante:



Juan Alberto Guevara Salazar

DEDICATORIA

- A MI MADRE: *AMÉRICA SALAZAR ORCÍ*
- A MI HERMANA: *L.C. LAURA ACIREMA GUEVARA SALAZAR*

AGRADECIMIENTOS

- A MI ASESOR: *Dr. BERNARDO A. FRONTANA URIBE*
- A MI SUPERVISORA: *M. en C. MARÍA TERESA RAMÍREZ APAN*
- A: *M. en C. ANTONIO NIETO CAMACHO*
- A MIS AMIGOS: *JONATHAN, MARCELA, ARMANDO, FÁTIMA,
CARMEN, ADRIANA, BEATRIZ, MÓNICA, RAFAEL
YA TODOS AQUELLOS QUE ESTUVIERON SIEMPRE
CONMIGO*
- A ALGUIEN ESPECIAL: *JOSÉ JAIME HERRERA OLIVIER*
- A MIS COMPAÑEROS: *ELIZABETH, ROXANA, LUCHA, GABY, ALEJANDRA,
JIMMY, CARLOS Y ALEJANDRO.*
- A: *MIS PROFESORES
YA LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO*

Los resultados presentados en esta tesis se obtuvieron con experimentos realizados entre octubre del 2002 y mayo del 2004 en el Laboratorio de Electroquímica y Electrosíntesis y en la Unidad de Pruebas de Actividad Biológica del Instituto de Química, bajo la dirección del Dr. Bernardo Antonio Frontana Uribe y la M. en C. María Teresa Ramírez Apan.

Este trabajo se presentó en:

SIMPOSIO INTERNO 2004 DEL INSTITUTO DE QUÍMICA, U.N.A.M., MÉXICO D.F.

08-11 de marzo de 2004

Este trabajo fue financiado con el proyecto CONACYT J-34873E

ÍNDICE

Índice	5
Abreviaturas	8
I INTRODUCCIÓN	11
II ANTECEDENTES	11
II.1 Productos Naturales	11
II.2 Modificación Molecular a partir de los productos naturales	12
II.3 Grupos de Metabolitos Secundarios	13
II.3.a Terpenos y Esteroides	13
II.3.b Diterpenos	16
II.4 Métodos Electroquímicos	21
II.4.a Coulombimetría a Potencial Controlado	23
II.4.b Coulombimetría a Corriente Controlada	23
II.5 Electrooxidación del Furano	24
II.6 Inflamación	26
II.6.a Inflamación Aguda	26
II.6.a1 Fase Transitoria Aguda	27
II.6.a2 Fase Subaguda Tardía	29
II.6.a3 Fase Proliferativa Crónica	30
II.6.b Inflamación Crónica	31
II.7 Mediadores lípidos de la inflamación	31
II.7.a Prostaglandinas	32
II.7.b Leucotrienos	35
II.7.c Lipoxinas	37

II.7.d Factor Activador de Plaquetas	38
II.7.d1 Vía Remodeladora (Remodeling pathway)	39
II.7.d2 Vía Síntesis <i>de Novo</i>	40
II.8 Óxido Nítrico	40
II.9 Farmacología de los Antiinflamatorios No Esteroidales	42
II.10 Farmacología de los Antiinflamatorios Esteroidales	43
II.11 Modelos de Evaluación Antiinflamatoria	47
II.11.a Edema inducido por TPA	48
II.11.b Edema inducido por EPP	51
II.11.c Producción de NO por estimulados con LPS a M ϕ murinos	51
II.11.d Medición de la Viabilidad de M ϕ murinos por el ensayo de MTT	52
III HIPÓTESIS	54
IV OBJETIVOS	54
IV.1 Objetivos General	54
IV.2 Objetivos Particulares	54
V PARTE EXPERIMENTAL	55
V.1 Instrumentación	55
V.2 Reactivos	56
V.3 Procedimiento General de la electrólisis a corriente controlada	57
V.4 Síntesis del derivado 1 a partir de la Hispanolona	59
V.5 Protección del grupo funcional cetona de la Hispanolona (Derivado 2)	61
V.6 Síntesis del Derivado 3 de la Hispanolona a partir del Derivado 2	62

V.7 Síntesis del Derivado 4 de la Hispanolona a partir del Derivado 1	64
V.8 Animales	65
V.9 Actividad antiinflamatoria en el edema inducido con TPA en la oreja de ratón	66
V.10 Actividad antiinflamatoria en el edema inducido con EPP en la oreja de ratón	67
V.11 Actividad inhibitoria de la producción de NO dependiente de iNOS y ensayo de viabilidad en macrófagos murinos	68
VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN	70
VI.1 Caracterización de los derivados semisintéticos de la Hispanolona	70
VI.1.a Espectrofotometría Infrarroja	70
VI.1.b Resonancia Magnética Nuclear de ¹ H	71
VI.1.c Resonancia Magnética Nuclear de ¹³ C	72
VI.1.d Espectrometría de Masas	75
VI.2 Actividad antiinflamatoria en el edema inducido con TPA en la oreja de ratón	77
VI.3 Actividad antiinflamatoria en el edema inducido con EPP en la oreja de ratón	80
VI.4 Actividad inhibitoria de la producción de NO dependiente de iNOS y ensayo de viabilidad en macrófagos murinos	83
VI.5 Relación de la actividad antiinflamatoria de la Hispanolona y sus derivados	86
VII CONCLUSIONES	90
VIII REFERENCIAS	92
IX ESPECTROS	95

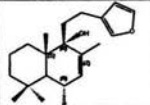
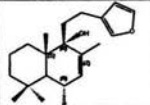
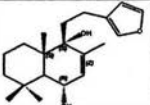
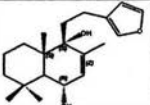
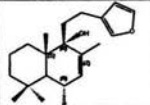
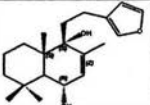
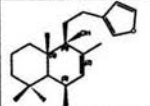
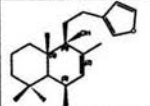
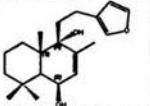
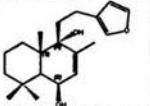
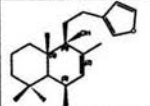
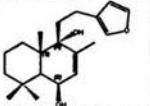
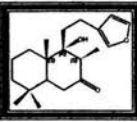
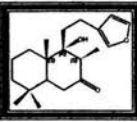
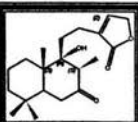
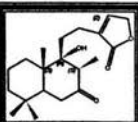
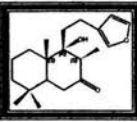
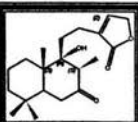
ABREVIATURAS

12-HETE: Ácido 12-hidroxicicosatetranoico	D1: Derivado 1, derivado electrooxidado de la Hispanolona
15-HETE: Ácido 15-hidroxicicosatetranoico	D2: Derivado 2, derivado protegido de la Hispanolona
15-LPO: 15-Lipoxigenasa	D3: Derivado 3, derivado electrooxidado y protegido de la Hispanolona
5-HPETE: Ácido 5-hidroperoxicicosatetranoico	D4: Derivado 4, derivado α -butenólido de la Hispanolona
5-LPO: 5-Lipoxigenasa	DAG: Diacilglicerol
A: Ampere	DEPT: Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
AA: Ácido Araquidónico	DEX: Dexametasona
Ac: Anticuerpo	DMAPP: Pirofosfato de dimetilalilo
AcOEt: Acetato de etilo	DMEN: Dulbecco's Modified Tagle Medium
ACTH: Hormona Adrenocorticotrófica	DMSO: Dimetilsulfóxido
AG: Aminoguanidina	DNA: Ácido Desoxirribonucleico
AINES: Antiinflamatorios No Esteroidales	DRX: Difracción de Rayos X
ANOVA: Análisis de Varianza	E: Voltaje
AP-1: Proteína Activadora 1	ECA: Enzima Convertidora de la Angiotensina
ASA: Ácido Acetilsalicílico	EDRF: Factor de Relajación Derivado del Endotelio
c.c.f.: Cromatografía en capa fina	ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
C₅a: Factor del Complemento	EM: Espectrometría de Masas
CINVESTAV: Centro de Investigación y de Estudios Avanzados	eNOS: Óxido Nítrico Sintetasa epitelial
cols.: Colaboradores	EP: Exudado Peritoneal
COSY: COrrrelation SpectroscopY	EPP: Etilfenilpropiolato
COX: Ciclooxigenasa	
COX-1: Ciclooxigenasa Constitutiva	
COX-2: Ciclooxigenasa Inducible	
cte.: Constante	

ESM: Error estándar de la media	Inh.: Inhibición
F: Constante de Faraday (96 487 C/mol)	iNOS: Óxido Nítrico Sintetasa inducible
FAD⁺: Dinucleótido de Adenina y Flavina [ox]	I.P.N.: Instituto Politécnico Nacional
FADH₂: Dinucleótido de Adenina y Flavina [red]	IPP: Pirofosfato de isopentenilo
FANES: Fármacos Antiinflamatorios No esteroideos	IR: Infrarrojo
FPP: Farnesilpirofosfato	J: Constante de acoplamiento
GGPP: Geranilgeranilpirofosfato	LcB: Linfocito B
GM-CSF: Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor	LcT: Linfocito T
GPP: Geranilpirofosfato	LPS: Lipopolisacárido
G-R: Receptor Glucocorticoide	LT: Leucotrieno
GRE: Elementos de Respuesta a Glucocorticoides	LTA₄: Leucotrieno A ₄
GSH: Glutatión	LTB₄: Leucotrieno B ₄
HETCOR: Heteronuclear CORrelated Spectroscopy	LTC₄: Leucotrieno C ₄
HP: Hispanolona	LTD₄: Leucotrieno D ₄
Hsp-90: Heat shock protein-90	LTE₄: Leucotrieno E ₄
<i>i:</i> Corriente eléctrica	LX: Lipoxina
IC₅₀: Concentración Inhibitoria 50	LXA₄: Lipoxina A ₄
ICAM-1: Molécula de adhesión para MN	LXB₄: Lipoxina B ₄
IE: Impacto Electrónico	M: Masa Molar (Peso Molecular)
IFNγ: Interferón γ	MN: Leucocitos Mononucleares
IL-1: Interleucina 1	MOP: Mieloperoxidasa
IL-2: Interleucina 2	mRNA: RNA mensajero
IL-6: Interleucina 6	MTT: Bromuro de 3-(4, 5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazolio
IL-8: Interleucina 8	Mϕ: Macrófago
IND: Indometacina	n: Número de electrones
	NAD⁺: Dinucleótido de Nicotinamida [ox]
	NADH: Dinucleótido de Nicotinamida [red]
	NEP: Endopeptidasa Neutral

NF-κB : Nuclear Factor- kappa-B	PLC : Fosfolipasa C
NK : Células <i>Natural Killer</i>	PMN : Leucocitos Polimorfonucleares
nNOS : Óxido Nítrico Sintetasa neuronal	<i>p</i>-TsOH : Ácido <i>para</i> -toluensulfónico
NO : Óxido Nítrico	Q : Carga eléctrica
NOESY : The Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy	R : Resistencia
NOM : Norma Oficial Mexicana	red : Reducido
NOS : Óxido Nítrico Sintetasa	RMN : Resonancia Magnética Nuclear
NR : No Reportado	RNA : Ácido Ribonucleico
ox : Oxidado	RNS : Especies Reactivas de Nitrógeno
p.f. : Punto de fusión	ROS : Especies Reactivas de Oxígeno
PAF : Factor Activador de Plaquetas	SOD : Superóxido dismutasa
PBS : Solución Amortiguadora de Fosfatos	<i>t</i> : Tiempo
PG : Prostaglandina	TGF : Transforming Growth Factor
PGD₂ : Prostaglandina D ₂	TNFα : Factor de Necrosis Tumoral α
PGE₂ : Prostaglandina E ₂	TPA : 13-acetato de 12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol
PGF_{2α} : Prostaglandina F _{2α}	TxA₂ : Tromboxano A ₂
PGG₂ : Prostaglandina G ₂	U.N.A.M. : Universidad Nacional Autónoma de México
PGH₂ : Prostaglandina H ₂	U.V. : Ultravioleta
PGI₂ : Prostaciclina	VCAM-1 : Molécula de adhesión para LcT
PKA : Proteincinasa A	W : Peso de una sustancia
PKC : Proteincinasa C	
PLA₂ : Fosfolipasa A ₂	

FÉ DE ERRATAS

ERROR	CORRECCIÓN						
<p>En la página 6 dice:</p> <p>II.11.c Producción de NO por estimulados con LPS a Mφ murinos</p>	<p>Debe decir:</p> <p>II.11.c Producción de NO por estimulación con LPS a Mφ murinos</p>						
<p>En la página 21 en la Tabla 2 se encuentra:</p> <table border="1" data-bbox="154 772 517 876"> <tr> <td data-bbox="154 772 314 876">  </td> <td data-bbox="314 772 425 876"> <p>6-α-Solidagenol</p> </td> <td data-bbox="425 772 517 876"> <p>5-10</p> </td> </tr> </table>		<p>6-α-Solidagenol</p>	<p>5-10</p>	<p>Debe estar:</p> <table border="1" data-bbox="542 772 899 876"> <tr> <td data-bbox="542 772 702 876">  </td> <td data-bbox="702 772 813 876"> <p>6-α-Solidagenol</p> </td> <td data-bbox="813 772 899 876"> <p>5-10</p> </td> </tr> </table>		<p>6-α-Solidagenol</p>	<p>5-10</p>
	<p>6-α-Solidagenol</p>	<p>5-10</p>					
	<p>6-α-Solidagenol</p>	<p>5-10</p>					
<p>En la página 21 en la Tabla 2 se encuentra:</p> <table border="1" data-bbox="154 980 517 1085"> <tr> <td data-bbox="154 980 314 1085">  </td> <td data-bbox="314 980 425 1085"> <p>6-β-Solidagenol</p> </td> <td data-bbox="425 980 517 1085"> <p>5-10</p> </td> </tr> </table>		<p>6-β-Solidagenol</p>	<p>5-10</p>	<p>Debe estar:</p> <table border="1" data-bbox="542 980 899 1085"> <tr> <td data-bbox="542 980 702 1085">  </td> <td data-bbox="702 980 813 1085"> <p>6-β-Solidagenol</p> </td> <td data-bbox="813 980 899 1085"> <p>5-10</p> </td> </tr> </table>		<p>6-β-Solidagenol</p>	<p>5-10</p>
	<p>6-β-Solidagenol</p>	<p>5-10</p>					
	<p>6-β-Solidagenol</p>	<p>5-10</p>					
<p>En la página 103 en el Espectro 9 se encuentra:</p> <table border="1" data-bbox="264 1137 412 1258"> <tr> <td data-bbox="264 1137 412 1258">  </td> </tr> </table>		<p>Debe estar:</p> <table border="1" data-bbox="646 1137 794 1258"> <tr> <td data-bbox="646 1137 794 1258">  </td> </tr> </table>					
							
							

I. INTRODUCCIÓN:

La Hispanolona es un metabolito secundario que posee la estructura base de Labdano y fue aislada de la planta *Ballota hispanica* (*Lamiaceae*)⁵. Esta molécula posee un grupo funcional furano que es susceptible de transformarse por reacciones electroquímicas. Mediante Coulombimetría a corriente controlada como método de modificación molecular se electrotransformó esta molécula obteniendo nuevos derivados espiro tetracíclicos y un derivado α -butenólido mediante una hidrólisis ácida del compuesto electrolizado de la Hispanolona.

La hispanolona y sus derivados fueron evaluados en modelos de inflamación *in vivo* e *in vitro*.

II. ANTECEDENTES:

II.1 Productos Naturales

Un producto natural es aquél compuesto de origen orgánico o inorgánico que está presente en la naturaleza que puede ser aislado y procesado por el hombre; sin embargo, este término no debe ser utilizado para aquellos compuestos cuya estructura química haya sido modificada por el hombre. Los productos naturales orgánicos pueden aislarse de las diversas fuentes que nos brinda el mundo viviente en sus 5 reinos: *Monera*, *Protista*, *Fungi*, *Plantae* y *Animalia*; no obstante, los vegetales constituyen una de las principales fuentes para aislar metabolitos secundarios que pueden ser no necesariamente principios activos, que posean propiedades medicinales o terapéuticas.

En particular los vegetales son clasificados por diversos sistemas para identificarlos y hacer más sencilla alguna búsqueda, aislamiento, asignación clasificatoria de una planta recientemente descubierta, etc. Entre los sistemas más utilizados actualmente se encuentran los siguientes:

- 1) **Alfabético.**- Este tipo de clasificación es meramente de tipo de búsqueda bibliotecaria, ya que es ampliamente utilizada en farmacopeas, catálogos, monografías, etc. Los nombres recopilados son los triviales o su nombre científico.

- 2) **Morfológico.**- Las plantas aisladas y desecadas, se dividen en:
 - a) *Organizadas.*- Flores, hojas, tallos, raíces, semillas, etc.
 - b) *No organizadas.*- Gomas, látex, resinas, ceras, etc.
- 3) **Farmacológico.**- Clasifica a las plantas según su actividad farmacológica de sus principios activos.
- 4) **Taxonómico.**- Constituye el sistema más utilizado para clasificar a los vegetales, ya que define con certeza qué tipo de planta es, ya que todas ellas poseen características, morfológicas y genéticas distintas. A continuación se mencionan los 12 descriptores taxonómicos aplicados a todos los reinos:

1) Reino	7) Familia
2) Phylum	8) Subfamilia
3) Subphylum	9) Tribu
4) Clase	10) Género
5) Orden	11) Especie
6) Suborden	12) Subespecie (en ocasiones)

Los metabolitos secundarios son sustancias que se transforman durante el metabolismo del organismo (bacteria, hongo, protozoario, planta, animal) e independiente de su cinética de crecimiento. Estos metabolitos frecuentemente son marcadores químicos particulares de la especie de la cual se trate.¹ Existen dos formas para identificar a los marcadores de las plantas:

- 1) **Química.**- Clasificadas según su estructura química y nombre sistemático IUPAC.
- 2) **Biogenética.**- Clasifica de acuerdo a su origen biosintético.

Entre los grupos químicos o metabolitos secundarios de origen natural más conocidos se encuentran: Alcaloides, lignanos, cumarinas, terpenoides, policétidos, flavonoides, entre otras¹.

II.2 Modificación Molecular a partir de los Productos Naturales

La modificación molecular⁷ es un método muy utilizado para diseñar fármacos de una manera racional y productiva en comparación con síntesis seleccionadas al azar y/o ensayos de compuestos naturales. El propósito de manipular la estructura química de un compuesto natural o semisíntesis es para conferirle actividad biológica, o bien, para optimizar alguna actividad farmacológica, disminuir su toxicidad y/o mejorar sus propiedades farmacocinéticas o de formulación farmacéutica. La modificación molecular se lleva a cabo

de acuerdo a una serie de criterios generados a partir de la experiencia e información previa. Los procesos más comunes de modificación son:

- a) Apertura o Cierre de Anillos
- b) Introducción de Enlaces Múltiples: Principio de Vinología
- c) Homología: Adición de 1 ó más átomos de carbono a un anillo o cadena.
- d) Introducción de Grupos Voluminosos
- e) Bioisosterismo: Es un grupo de átomos, iones o moléculas que poseen la misma conformación electrónica, es decir; un intercambio de un grupo funcional por su equivalente electrónico que tendrá probablemente la misma actividad biológica.

Existen tres estrategias generales de Modificación Molecular que consisten en:

1) Simplificación del Modelo

Es un método conocido como “variación estructural disyuntiva”, aplicado fundamentalmente a productos naturales de estructura compleja, simplificando selectivamente la molécula.

2) Asociación de dos Moléculas

Es la unión de dos estructuras con una determinada actividad con la esperanza de potenciarla.

3) Replicación Moduladora

Es la sustitución de determinados grupos de la estructura modelo.

Este tipo de métodos sobre las modificaciones moleculares implican un estudio más profundo acerca de la relación Estructura-Actividad Biológica de una serie de compuestos modificados químicamente y probados biológicamente.

II.3 Grupos de Metabolitos Secundarios

II.3.a Terpenos y Esteroides

Los terpenoides y esteroides, constituyen el más amplio conjunto conocido de metabolitos secundarios de los vegetales. Éstos tienen en común un número entero de unidades pentacarbonadas ramificadas derivadas del 2-metilbutadieno (isopreno), constituidas a partir de unidades condensadas de manera “*cabeza-cola*” de un número variable de dichas unidades.

Los precursores de los principales tipos de terpenos, formados a partir de reacciones catalizadas por enzimas, son los ésteres pirofosfóricos de alcoholes pentacarbonados (C_5)_n formados por la adición de secuencias de unidades de C_5 . El pirofosfato de isopentenilo o IPP (Figura 1a, 1b) es catalizado enzimáticamente para transformarse en un isómero llamado pirofosfato de dimetilalilo o DMAPP² (Figura 2) y es el origen de los distintos tipos de terpenos.

Existen dos rutas biosintéticas por las cuales se puede obtener el derivado IPP y a su vez DMAPP (Figura 1a y 1b):

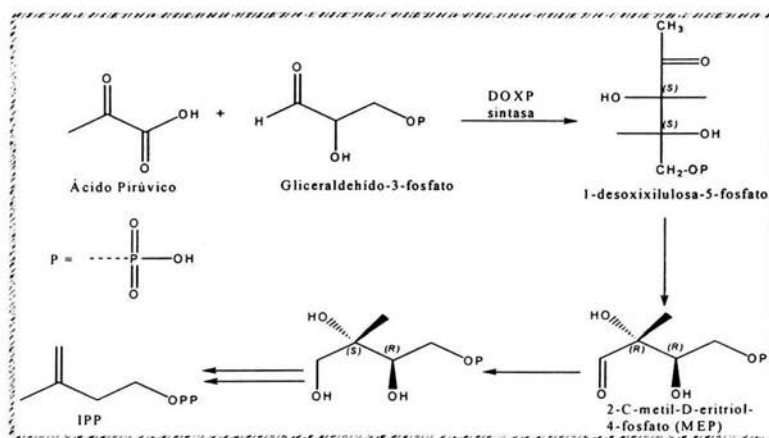


Figura 1a. Ruta DOXP (1-Desoxixilulosa-5-fosfato).²

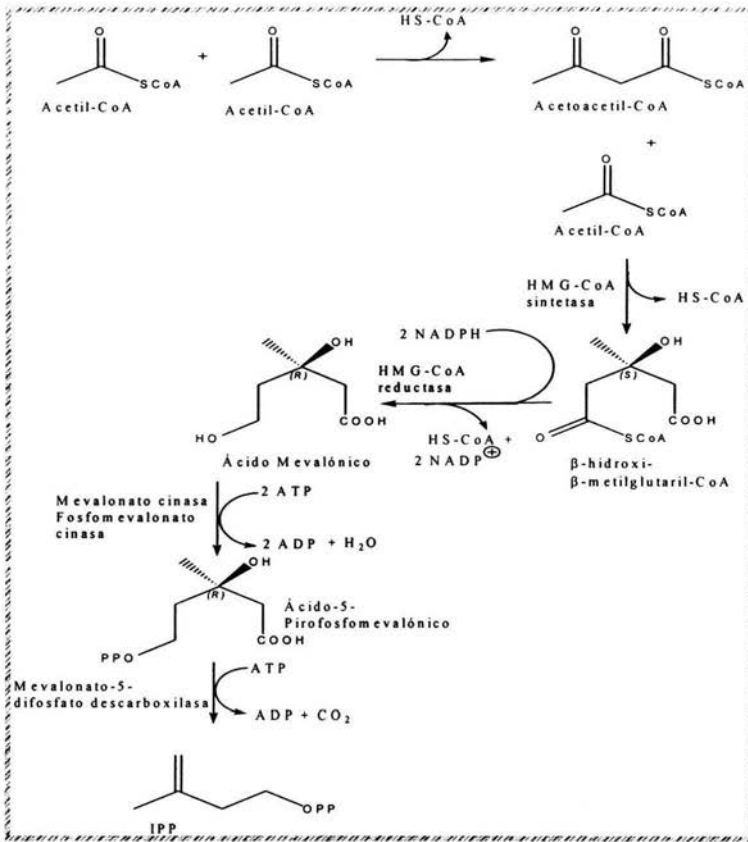


Figura 1b. Ruta Acetato Mevalonato.²

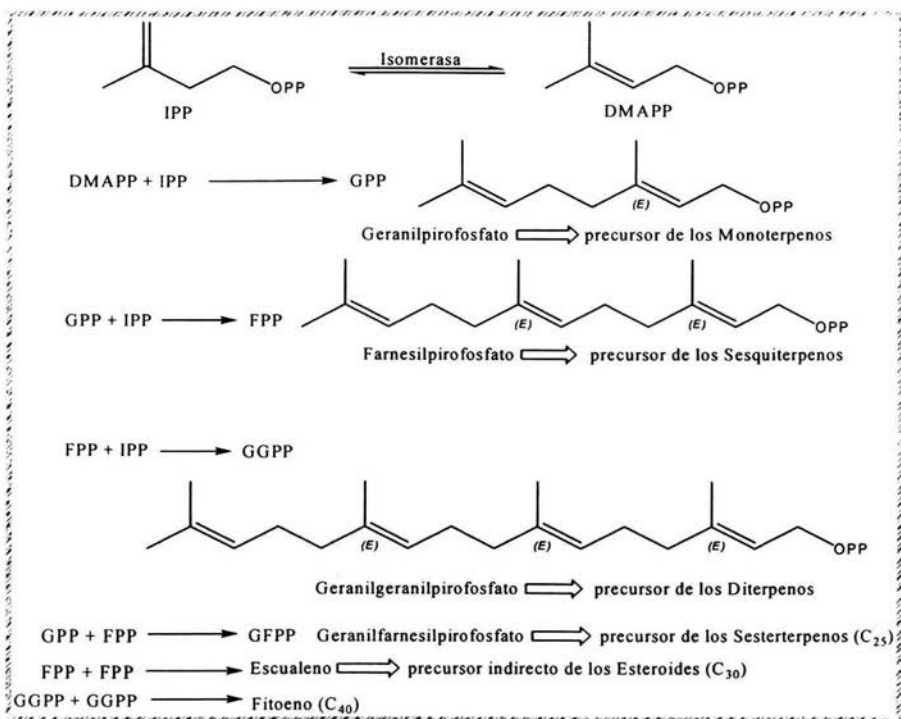


Figura 2. Origen biogénico de los terpenos.²

II.3.b Diterpenos

Los diterpenos constituyen un amplio conjunto de compuestos de 20 carbonos procedentes de su principal precursor que es el Geranilgeranilpirofosfato o GGPP (Figura 2). La distribución de estos en la naturaleza está concentrada en algunos insectos y organismos marinos, pero sobre todo en los vegetales. Los principales tipos de estructuras de los diterpenos son: Acíclicos o lineales, ciclados, bicíclicos, tricíclicos y tetracíclicos. Su estructura depende estrechamente de la catálisis generada por la enzima, y la orientación del GGPP durante dicha catálisis.

El interés terapéutico de los diterpenoides es limitado, ya que la industria farmacéutica no produce ningún diterpeno puro; sin embargo, algunos diterpenoides presentan actividades biológicas muy específicas que pueden ser atribuidas a este tipo de compuestos, y curiosamente están ampliamente distribuidos en las familias de plantas *Lamiaceae* y *Asteraceae*, entre otras. Dentro de las actividades biológicas que se les atribuye a algunas especies de la familia de las *Lamiaceae* son: propiedades antihipertensivas (*plenctranthus*

barbatus), antitumorales (*Rabdosia*), antiinflamatorias y analgésicas, antiespasmódicas, antitusivas, sedantes, ansiolíticas y antiinflamatorias débiles de la planta *Ballota nigra*².

La Hispanolona es un metabolito secundario de tipo diterpeno bicíclico que posee como estructura base el Labdano; cuyo origen biogénético es la ruta DMAPP-GGPP (Figura 3):

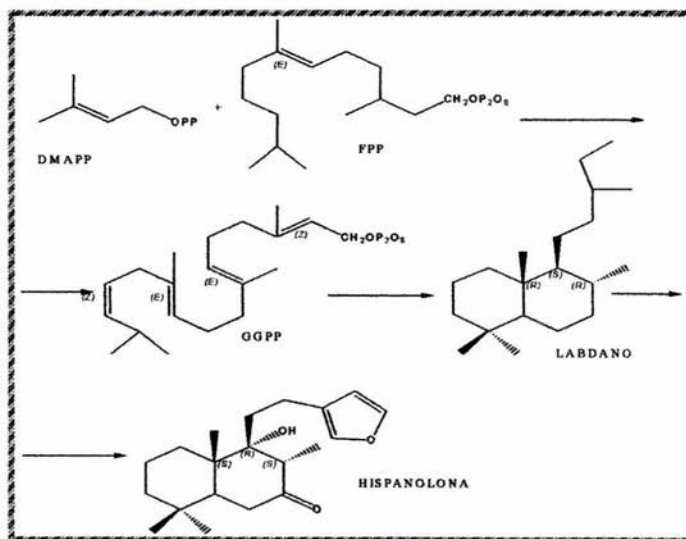


Figura 3. Origen Biogénético de la Hispanolona.^{2, 11}

Este diterpeno fue aislado por primera vez de la planta *Ballota hispanica* también conocida como *Ballota hirsuta* (Figura 4) perteneciente a la familia *Lamiaceae*³ distribuida ampliamente en la mitad del sur de la Península Ibérica.



Figura4. *Ballota hirsuta* o *Ballota hispanica*¹⁴

Posteriormente la Hispanolona también se obtuvo de otra planta que se encuentra distribuida en China conocida en medicina tradicional como Yi Mu Cao y taxonómicamente clasificada como *Leonurus heterophyllus* (*Lamiaceae*) (Figura 5).

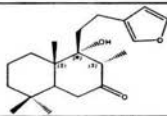
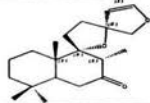
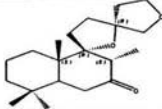
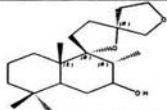
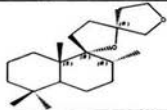
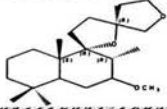
Esta planta es utilizada para tratar problemas de tipo ginecológico entre las que destacan: la menstruación irregular, amenorrea y hemorragias postparto, así como edema crónico y nefritis aguda¹¹.



Figura 5. *Leonurus heterophyllus*¹⁵

En 1991 *Leonurus heterophyllus* fue estudiada más profundamente⁴, en especial sus dos principales productos, que son la Hispanolona y la Prehispanolona. De estos compuestos se produjeron 4 derivados semisintéticos y fueron probados biológicamente sobre la inhibición de la unión del radioligando del Factor Activador de Plaquetas (PAF) a su receptor (Receptor PAF) en plaquetas de conejo de la cepa New Zeland. Los resultados de este bioensayo se muestran en la siguiente tabla (Tabla1):

Tabla 1 Estudio sobre la Hispanolona y sus derivados sobre [³H]-PAF⁴.

Nombre de los Compuestos	Estructuras	IC ₅₀ (μM) unión de [³ H]-PAF (n=4)	IC ₅₀ (μM) Agregación plaquetaria (n=3)
BN52021 (Estándar)	No reportada	4.8 ± 1.6	3.3 ± 1.2
Hispanolona		Inactivo	Inactivo
Prehispanolona		14.1 ± 7.9	28.4 ± 7.3
14, 15-dihidroprehispanolona		13.4 ± 7.4	19.0 ± 7.9
Derivado 2		1.2 ± 0.7	4.6 ± 1.9
Derivado 3		14.2 ± 7.7	59.7 ± 1.2
Derivado 4		5.7 ± 2.7	11.4 ± 2.1

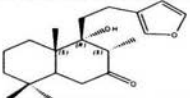
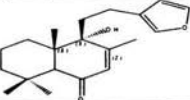
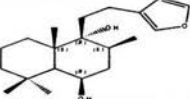
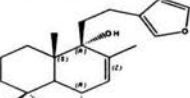
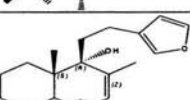
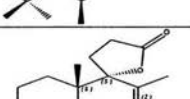
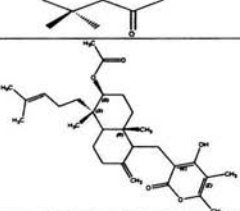
Los resultados de este estudio sugirieron que la actividad se presenta cuando la estructura se encuentra en forma espirotetracíclica y tal actividad aumenta al sustituir grupos más polares en la posición 7; por lo tanto, la Hispanolona resulta ser inactiva como antagonista al receptor PAF⁴ al parecer porque carece de los cuatro anillos.

La Hispanolona ha sido sintetizada químicamente⁵ por Wong y cols. También ha sido probada sobre microorganismos, donde este producto natural y otros 2 análogos naturales (Dehidrohispanolona y Ballonigrina) aislados de la especie *Ballota saxatilis* subespecie *saxatilis* (*Lamiaceae*). Los resultados del bioensayo sobre bacterias GRAM +, GRAM – y *Candida albicans* fueron medianamente potentes comparados con los antibióticos estándares⁶.

Existe evidencia de que una molécula llamada Solidagenona, aislada de la planta *Solidago chilensis* (Asteraceae), y cuatro derivados semisintéticos, poseen actividad inhibitoria de la expresión de genes involucrados en los mecanismos de los glucocorticoides⁸, como se muestra en la Tabla 2 hay gran similitud entre la solidagenona y la hispanolona, ambas poseen un grupo carbonilo en las posiciones 6 y 7 respectivamente, la única diferencia sustancial en la solidagenona es la presencia de un doble enlace entre los carbonos 7 y 8. La Solidagenona y sus derivados tienen también similitud con la hispanolona, aunque esta última no fue probada en el estudio.

Con respecto al bioensayo realizado en la solidagenona y sus derivados semisintéticos, se observa una relación entre la estructura y actividad: si el carbonilo de la posición 6 de la solidagenona es reducido a -OH la actividad no se ve modificada, sin embargo, cuando el -OH es eliminado y sustituido por un -CH₃ la acción se ve afectada negativamente. En cuanto a la solidagolactona, es el compuesto menos activo, ya que no posee la estructura labdánica. Todos los compuestos tuvieron cierta actividad inhibitoria, pero menor al estándar.

Tabla 2. Estudio sobre la inhibición de la expresión genética mediada por glucocorticoides de la Solidagenona y sus derivados⁸.

Estructura	Nombre	IC ₅₀ (µg/mL) Inhibición de la expresión de genes mediada por glucocorticoides
	Hispanolona	No probada en el estudio
	Solidagenona	1-5
	Solidaganol	1-5
	6-α-Solidagenol	5-10
	6-β-Solidagenol	5-10
	Solidagolactona	10-25
	Sesquicilina (estándar)	0.5

II.4 Métodos Electroquímicos

La electroquímica es una rama de la Físicoquímica que involucra la relación existente entre la materia y la energía, basada principalmente en la conversión de energía química a energía eléctrica y viceversa.¹¹ Es también uno de los métodos analíticos instrumentales de gran importancia científica, tecnológica e industrial. Las mediciones con este tipo de métodos son principalmente de resistencia, corriente eléctrica y voltaje con fines analíticos;

sin embargo, cuando a una de estas mediciones adicionamos otra variable como el tiempo, surgen métodos electroanalíticos de gran contribución científica.

Algunos Métodos Electroanalíticos son⁹:

Magnitud Medida	Variable Controlada	Método
Voltaje (E)	$i = 0$	1) Potenciometría selectiva de iones
		2) Potenciometría a corriente nula
$E = f(\text{Volumen}_{\text{titulante}})$	$i = 0$	Titulaciones Potenciométricas
Peso de fase electrodepositado	E	Electrodeposición a potencial controlado
	Concentración	Voltamperometría
	t	Cronoamperometría de redisolución de barrido de potencial lineal
$i = f(E)$	t	Voltamperometría de barrido de potencial lineal
	E	Titulaciones amperométricas
$i = f(\text{Volumen}_{\text{titulante}})$	E	Titulaciones amperométricas
Carga Coulombs = ($i \times t$)	E ó i	Coulombimetría
$1/R$ (Conductancia)	Concentración	Mediciones de conductancia
$1/R = f(\text{Volumen}_{\text{titulante}})$		Titulaciones conductimétricas

En particular para una transformación electroquímica la técnica más utilizada es la Coulombimetría.

La Coulombimetría posee 2 variantes:

Coulombimetría a Potencial Controlado
Coulombimetría a Corriente Controlada

Estas técnicas están fundamentadas en la Ley de Faraday que postula que: “La cantidad de carga Q usada en una transformación electroquímica equivale a un Faraday de electricidad ($F = 96\,487 \text{ C/mol}$) y es proporcional a la reacción de un equivalente en peso de sustancia W ”; y está dada por la siguiente ecuación:

$$Q = \frac{WnF}{M}$$

donde:

W = Peso en gramos de la sustancia a electrolizar

Q = La cantidad de Carga en Coulombs

M = Masa Molar del analito

n = Número de electrones requeridos por molécula en la reacción

F = Constante de Faraday (96 487 C/mol)

II.4.a Coulombimetría a Potencial Controlado^{9,10}

Todo análisis Coulombimétrico a Potencial Controlado debe satisfacer las siguientes condiciones fundamentales:

- 1) La sustancia de interés debe ser electrolizada con 100% de eficiencia en corriente, esto es, sólo tienen una ruta electroquímica de reacción
- 2) El número de Coulombs debe ser precisamente determinado
- 3) No puede haber reacciones secundarias de estequiometría diferente
- 4) El potencial permanece constante durante el análisis
- 5) La corriente eléctrica cambia constantemente durante la electrólisis

Este método es útil y exacto en el intervalo de cantidades de miligramos hasta microgramos y, por tanto, en análisis de trazas. La sensibilidad está limitada por manejo de la muestra y detección del punto final.

II.4.b Coulombimetría a Corriente Controlada⁹

Durante esta técnica de electrólisis, la corriente eléctrica permanece constante y la reacción de electrodo se debe realizar con un 100% de eficiencia de corriente. A una corriente constante dada, la reacción se lleva a cabo en un tiempo determinado; es decir, si la carga Q es proporcional a la cantidad de masa W, entonces, la carga es proporcional al tiempo de electrólisis según la Ley de Ampere:

$$Q = it$$

Q = Carga en Coulombs

i = Intensidad de Corriente

t = Tiempo

Una de las ventajas de este método es que es muy sencillo sabiendo la estequiometría de la reacción y se puede determinar la cantidad de sustancia electrolizada, así como el tiempo requerido de reacción. Además el equipo es menos costoso que la técnica a Potencial Controlado.

La desventaja de este método es que el potencial es variable durante la reacción y cuando las últimas trazas del producto ya están oxidadas, la corriente sigue siendo de intensidad i y el electrodo empieza a oxidar al disolvente u otro producto presente en el medio provocando un fuerte cambio en el potencial (Figura 6).

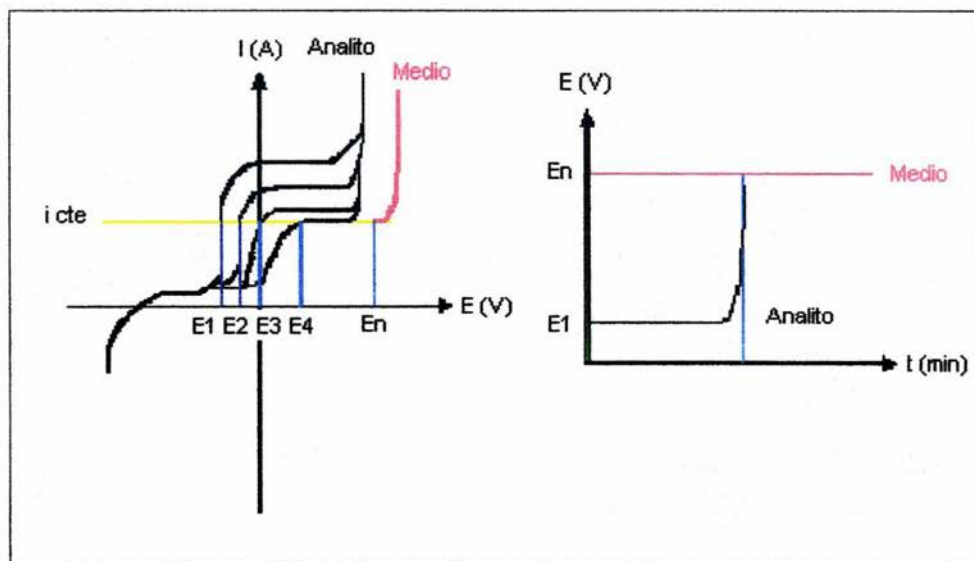
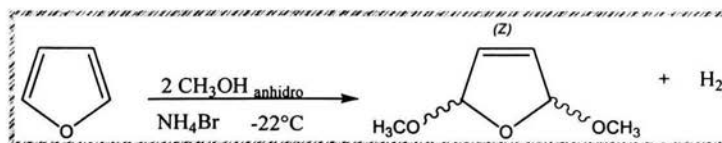


Figura 6. Seguimiento I/E de una Electrólisis a corriente controlada.¹¹

II. 5 Electrooxidación del Furano

Con la Coulombimetría a corriente controlada es posible oxidar electrolíticamente a la molécula de furano (presente en la Hispanolona) disuelta en una solución metanólica

0.15M de NH_4Br a temperatura de -22°C y a una densidad de corriente de 10 mA/cm^2 con agitación constante.¹¹



Este método posee ventajas sobre el método químico, ya que este último necesita un control más estricto sobre las condiciones experimentales, que consisten a grosso modo en tener Cl_2 o Br_2 durante la reacción, así como neutralizar con Na_2CO_3 el hidrácido producido durante la misma ya que el anillo de furano es sensible en medio ácido. El rendimiento de la reacción química es del 73%, mientras que efectuada con Coulombimetría a Corriente Controlada, el rendimiento aumenta 13 unidades porcentuales con respecto a la reacción convencional (86%).¹²

El mecanismo electroclítico genera un pH constante durante la reacción de oxidación del furano y las reacciones involucradas se presentan en la Figura 7:

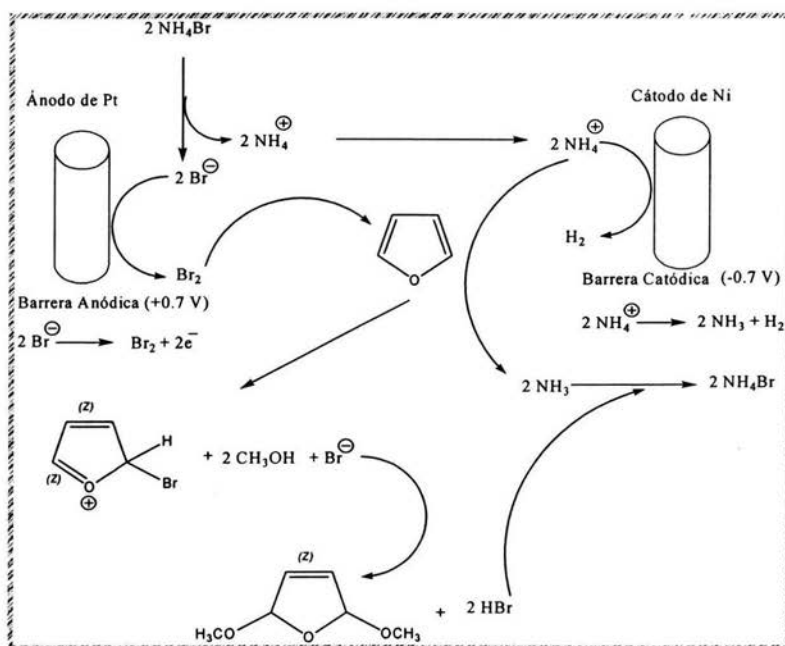


Figura 7. Mecanismo electroclítico de oxidación del furano.¹¹

Con este método Coulombimétrico es posible electrolizar de la misma manera a la Hispanolona, ya que este diterpenoide posee un anillo de furano¹¹ y la reacción observada es la siguiente (Figura 8):

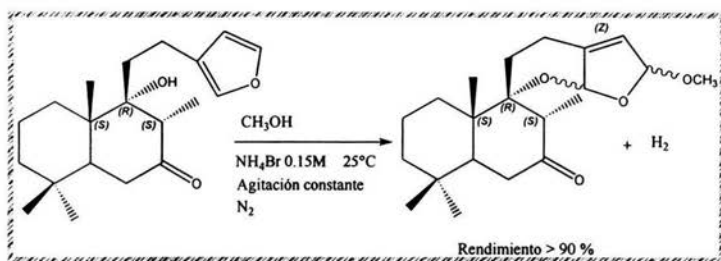


Figura 8. Electrooxidación de la Hispanolona mediante Coulombimetría a Corriente Controlada.

II.6 Inflamación ¹³

La inflamación es una respuesta fisiológica de defensa del organismo que se desencadena durante la invasión de microorganismos, traumatismo mecánico, isquemia y neoplasias; dicha respuesta está localizada especialmente en el tejido conectivo y vascular producida por diversas sustancias irritantes que se generan durante el proceso con el fin de destruir al agente patógeno o reconstituir el tejido dañado. En la Figura 10 se muestra la participación de mediadores químicos y humorales en la respuesta inflamatoria.

La inflamación es uno de los procesos más comunes en la enfermedad, es una reacción elemental frente a una agresión al organismo y/o decrecer cualquier estímulo perjudicial al tejido; por ello, la inflamación participa en el mecanismo inmunológico del hospedero. La respuesta inflamatoria se divide en Inflamación aguda y crónica dependiendo de su duración y cinética (Figura 9).

II.6.a Inflamación Aguda

La inflamación aguda se caracteriza por signos clínicos muy marcados los cuales son el dolor, calor, eritema, edema y pérdida de la función. La generación de estos signos es el resultado de tres fases concertadas: Fase transitoria aguda, subaguda y proliferativa crónica (Figura 9):



Figura 9. Proceso de inflamación.

II.6.a1 Fase Transitoria Aguda:

La lesión celular producida por toxinas de microorganismos o agentes irritantes produce la liberación de histamina de las células cebadas o mastocitos y la formación de cinina, bradicinina y serotonina,^{13, 19} las cuales por vía receptores de terminales nerviosas inducen dolor, vasodilatación de arteriolas y capilares que intensifican la permeabilidad capilar, lo que conduce a una extravasación del plasma sanguíneo, líquido y proteínas que se acumulan en el foco inflamatorio, dando origen al eritema o rubor y edema inflamatorio. Después de los acontecimientos mencionados, se produce la formación de Prostaglandinas, Leucotrienos y Lipoxinas productos del metabolismo del Ácido Araquidónico. Las prostaglandinas intensifican la vasodilatación en arteriolas, esfínteres precapilares y vénulas postcapilares.

Por otra parte, los leucotrienos del tipo C₄ y D₄ (LTC₄ y LTD₄) actúan sobre el revestimiento endotelial de vénulas postcapilares y con ello la extravasación del plasma, por tanto, las células endoteliales vasculares se ven dañadas y la luz vascular se estrecha y aún se oblitera por acúmulos de estos y plaquetas, de manera que sobreviene la anoxia y el metabolismo celular se vuelve anaerobio, con la formación excesiva de ácido láctico. Todo esto lleva a una elevación de la presión osmótica local por aumento del número de moléculas y al descenso del pH hasta 5.5.

El PAF también participa en la fase aguda ocasionando el cuadro clínico característico de la respuesta inflamatoria ante agentes irritantes o etiológicos junto con los derivados del ácido araquidónico¹⁹. En la Tabla 3 se resume la participación de los mediadores lípidos en los signos clínicos de la inflamación.

Tabla 3. Relación de los autocoides con los signos clínicos de la inflamación.¹⁹

Signos Clínicos	Mediadores Lípidos
Dolor e Hiperalgnesia	PGE ₂ , LTB ₄ , PAF
Eritema y Vasodilatación	PGE ₂ , PGI ₂ , LTB ₄ , LXA ₄ , PAF
Calor	PGE ₂ , PGI ₂ , LXA ₄ , PAF
Edema	PGE ₂ , LTB ₄ , LTC ₄ , LTD ₄ , LTE ₄ , PAF

II.6.a2 Fase Subaguda Tardía:

Esta fase se caracteriza por la infiltración de leucocitos polimorfonucleares (PMN) y leucocitos mononucleados (MN) al foco inflamatorio. Para el reclutamiento de estas células se requiere de moléculas de adhesión (integrinas) como la E-selectina expresada por el endotelio, la cual es necesaria para que los neutrófilos lleguen al sitio de la inflamación antes que otras células, sin embargo, después del arribo de los neutrófilos, se expresan en el endotelio otras moléculas de adhesión: ICAM-1 y VCAM-1 de carácter intracelular y vascular respectivamente. Las moléculas ICAM-1 son selectivas para la extravasación de Monocitos y Macrófagos y VCAM-1 para la diapedesis de Linfocitos T (LcT). También existen mediadores solubles con efectos quimiotácticos como el factor del complemento C_{5a}, el LTB₄ y el Factor Activador de Plaquetas (PAF). El LTB₄ es además un potente agente proinflamatorio, ya que induce la quimiotaxis y quimiocinesis de leucocitos PMN (principalmente eosinófilos) y monocitos, con la subsecuente agregación y degranulación del contenido de estas células. En esta fase también participan algunas citocinas como la Interleucina-1 (IL-1), y el Factor de necrosis Tumoral α (TNF- α) ambas interleucinas

proviene de la activación de macrófagos y monocitos. Los macrófagos activados inducen la expresión de genes para otras citocinas²⁰ como la IL-2, IL-6, IL-8 y factores de crecimiento como GM-CSF; estas moléculas favorecen el metabolismo del ácido araquidónico (AA), la activación de células *Natural Killer* (NK) y linfocitos T y B. Algunas funciones adicionales a las citocinas durante el proceso inflamatorio se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Funciones de las citocinas más importantes durante el proceso inflamatorio.^{19,20}

Citocinas	Funciones Principales
IL-1	Activa el endotelio vascular, quimiotaxis, activación de LcT e induce la fiebre sistémicamente
IL-2	Induce la proliferación y producción de citocinas
IL-6	Induce la activación de LcB y la producción de Anticuerpos (Ac)
IL-8	Aumenta el acceso de células efectoras, induce la expresión de ligandos en el endotelio reconociendo β_2 -integrinas
TNF- α	Activa el endotelio vascular, aumenta la permeabilidad capilar y el fluido que llega a los nódulos linfáticos. Provoca fiebre sistémicamente y es responsable del shock endotóxico;
GM-CSF	Induce la proliferación y diferenciación hacia todas las líneas celulares

En el caso de la inflamación provocada por un proceso infeccioso, las células MN al fagocitar al agente etiológico utilizan mecanismos oxidativos y no oxidativos. El mecanismo oxidativo es más eficiente e implica un aumento en el metabolismo de la glucosa con la consecuente producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ROS: O_2^- , OH, H_2O_2), los cuales son microbicidas, fungistáticos y antiparasitarios; además, los fagocitos aumentan la producción de Óxido Nítrico (NO) a partir de la L-arginina. Los mecanismos No-oxidativos son los encargados de disminuir el pH del interior del fagosoma, favorecer la liberación de enzimas hidrolíticas y la síntesis de proteínas catiónicas que destruyen el material extraño.

II.6.a3 Fase Proliferativa Crónica:

En esta fase se advierte únicamente degeneración y fibrosis tisular, eventos que propician a que la inflamación llegue a ser crónica.

II.6.b Inflamación Crónica

La inflamación crónica se ha caracterizado por una prolongada infiltración de células como macrófagos y linfocitos, proliferación de tejido conectivo, neogénesis capilar y deposición de proteínas de la matriz extracelular, y en la vecindad de la lesión aparecen cuerpos celulares gigantes extraños. Como se mencionó, predominan los macrófagos activados, lo cual favorece la liberación de sustancias pro-inflamatorias y especies ROS y RNS, lo que conlleva a una exacerbación de la inflamación.

II.7 Mediadores lípidos de la inflamación

Los mediadores lípidos comprenden a dos grupos que son los Eicosanoides y el Factor Activador de Plaquetas (PAF), el primero comprende a la familia de las Prostaglandinas (PG), Leucotrienos (LT) y Lipoxinas (LX), y el segundo sólo al PAF.

Los eicosanoides son moléculas de 20 carbonos con 3 a 4 insaturaciones y con oxigenación en distintas posiciones derivadas de su precursor principal denominado Ácido Araquidónico. El ácido araquidónico se sintetiza a partir del ácido linoleico proveniente de los alimentos y es almacenado en la membrana celular en forma de ácidos grasos esterificados llamados fosfolípidos, así como el Fosfatidilcolina, Fosfatidiletanolamina, Fosfatidilinositol entre otros¹⁹.

El ácido araquidónico se encuentra en baja proporción en forma libre, por tal razón la biosíntesis de eicosanoides depende de la disponibilidad y la participación de la enzima Fosfolipasa A₂ (PLA₂), la cual libera el ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana celular. Una vez que el ácido araquidónico ha sido liberado es transformado en eicosanoides gracias a reacciones catalizadas por enzimas intracelulares: Ciclooxigenasa (Prostaglandinas), Lipoxigenasas (Leucotrienos, Lipoxinas y Ácidos hidroxieicosatrienoicos) y Epoxigenasas (Ácidos epoxieicosatrienoicos) (Figura 11)¹⁹. Por otra parte, la PLA₂ estimula la biosíntesis de PAF a partir de la membrana plasmática para formar Liso-PAF.

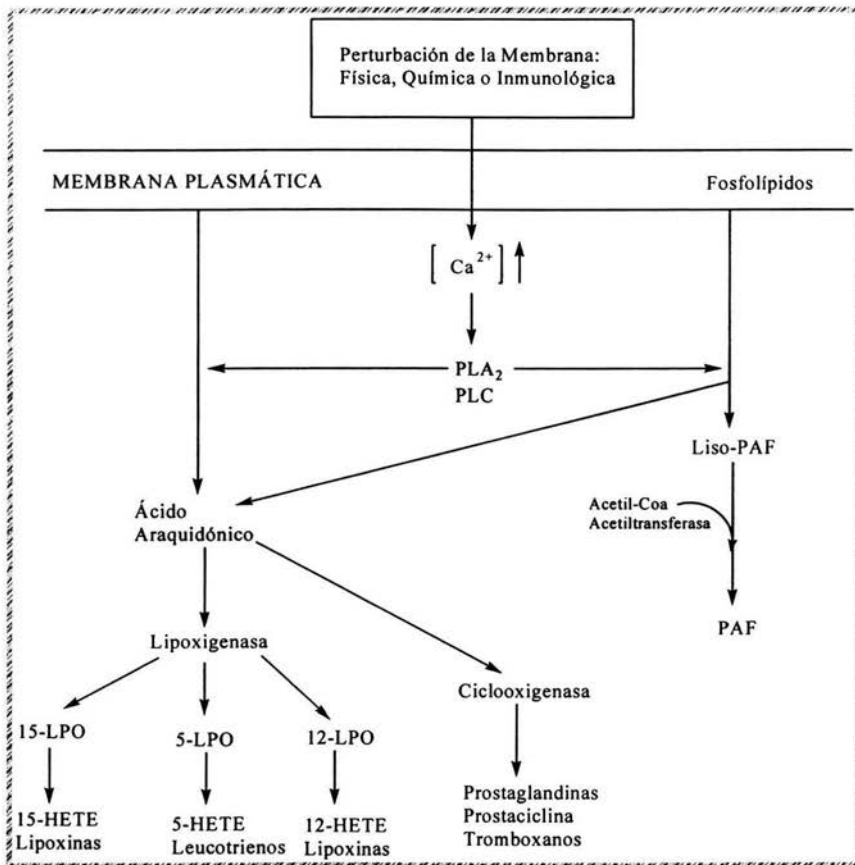


Figura 11. Biosíntesis de los eicosanoides y PAF.¹⁹

II.7.a Prostaglandinas¹⁹:

La estructura base de las prostaglandinas es un ácido carboxílico de 20 átomos de carbono que contiene un anillo de ciclopentano entre los carbonos 9, 10, 11 y 12 y un grupo hidroxilo en el carbono 15. La estructura base se ha denominado como Ácido Prostanico o Prostanoides. Las prostaglandinas están divididas en series que diferencian la sustitución de un átomo de oxígeno en el anillo de ciclopentano con una letra (PGD, PGE, PGF, PGG, PGH). El número que se le asigna a cada prostaglandina indica el número de dobles enlaces que posee la molécula. En general la primera serie de prostaglandinas derivan del ácido linoleico y la segunda serie del ácido araquidónico.

La Ciclooxygenasa (COX) es una enzima muy abundante en el retículo endoplásmico y cataliza 2 distintas reacciones: 1) la ciclización del ácido araquidónico formando PGG₂ y 2) la hidroperoxidación de PGG₂ formando PGH₂. A partir de PGH₂, se sintetizan las distintas prostaglandinas, tromboxanos y la prostaciclina (Figura 12). La COX posee dos isoformas, denominadas COX-1 y COX-2. la primera se expresa de manera constitutiva en casi todas las células y su activación produce la prostaciclina (PGI₂) la cual al ser liberada al endotelio vascular produce un efecto antitrombogénico, y cuando se libera en la mucosa gástrica es citoprotectora. La COX-2 es una enzima que se induce por citocinas, endotoxinas bacterianas y factores de crecimiento, incrementando su actividad en más de 20 veces durante la reacción de inflamación en monocitos humanos y macrófagos murinos. La biosíntesis de Prostaglandinas es inhibida por fármacos antiinflamatorios no esteroideos y antiinflamatorios esteroideos.

En la Tabla 5 se muestran las respuestas fisiológicas de las prostaglandinas.

Tabla 5. Función biológica de los derivados del AA mediados por COX (Prostaglandinas).¹⁹

Compuesto	Respuesta Biológica
Ácido Araquidónico (AA)	Precursor de todas las prostaglandinas
PGG ₂	Derivado ciclizado del AA y precursor de la PGH ₂
PGH ₂	Derivado hidroperoxidado de la PGG ₂ , y precursor de las demás prostaglandinas
PGD ₂	Contracción muscular lisa, inhibición de la agregación plaquetaria
PGE ₂	Vasodilatación, hiperalgesia, fiebre, natriuresis, diuresis e inmunomodulación
PGF _{2α}	Contracción muscular lisa, broncoconstricción y abortifaciente
PGI ₂	Vasodilatación e inhibición de la agregación plaquetaria
TxA ₂	Vasoconstricción y agregación plaquetaria

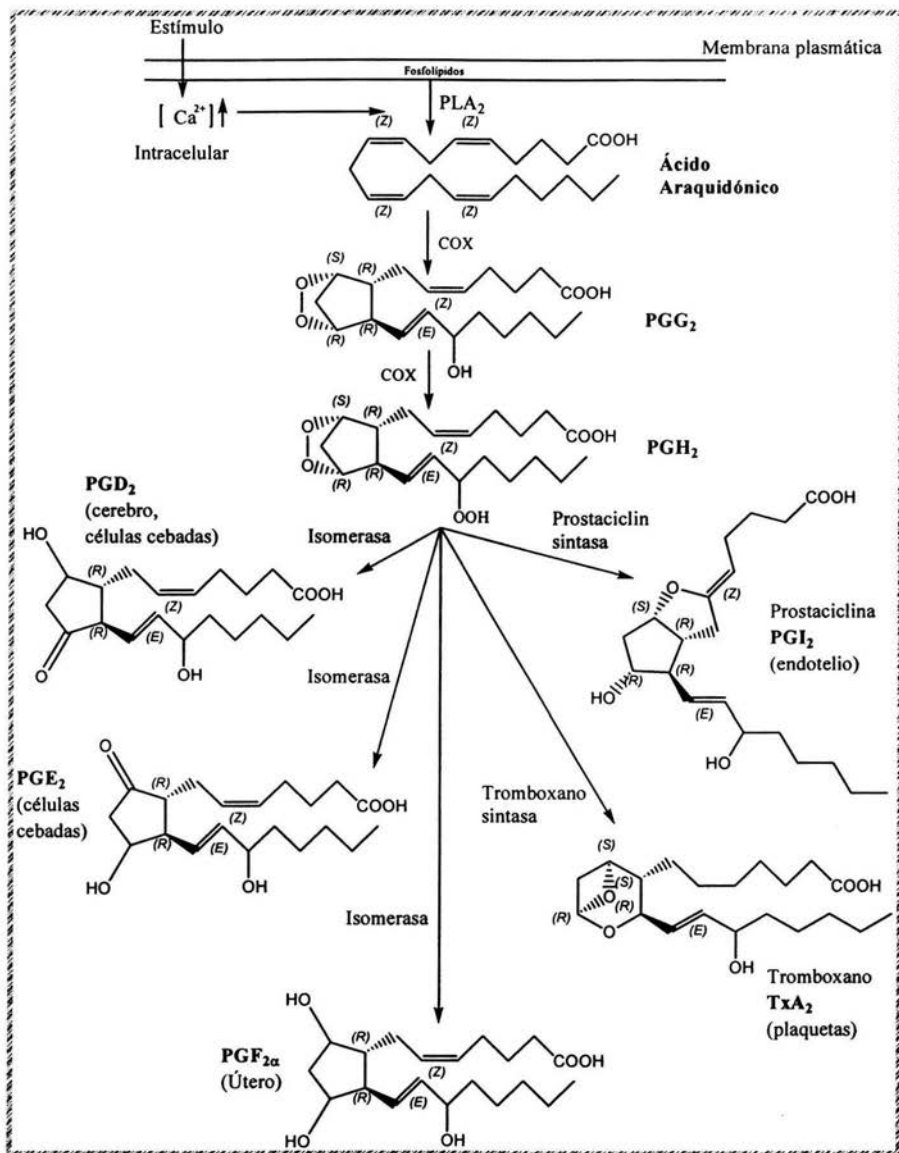


Figura 12. Biosíntesis de las Prostaglandinas, Tromboxano y Prostaciclina mediada por la Ciclooxygenasa (COX).¹⁹

II.7.b Leucotrienos¹⁹:

Los leucotrienos son moléculas que contienen 3 insaturaciones por dobles enlaces en su estructura y fueron descubiertos en leucocitos en 1970.

La nomenclatura de estas moléculas consiste en el número de insaturaciones que poseen, es decir, los leucotrienos de la serie 4 poseen 4 insaturaciones derivados del ácido araquidónico (ácido eicosatetraico), mientras que los de la serie 5 derivados del ácido eicopentanoico que posee 5 dobles enlaces. Los leucotrienos son biosintetizados a partir del ácido araquidónico por la acción principal de la enzima 5-Lipoxigenasa (5-LPO); esta enzima cataliza 2 reacciones consecutivas: 1) la inserción molecular de un átomo de oxígeno en el carbono 5 del ácido araquidónico formando el ácido 5-hidroperoxieicosatetraico (5-HPETE) y 2) la transformación subsecuente del 5-HPETE en un epóxido denominado LTA₄. A partir del LTA₄ se biosintetizan los demás leucotrienos independientes de la 5-LPO (Figura 13). En la Tabla 6 se resume las funciones fisiológicas de los leucotrienos.

Tabla 6. . Función biológica de los derivados del AA mediados por 5-LPO (Leucotrienos).¹⁹

Compuesto	Tipo de célula que los produce	Función fisiológica
AA	Todas las implicadas	Precursor de todos los leucotrienos
5-HPETE	Todas las implicadas	Precursor del LTA ₄
LTA ₄	Todas las implicadas	Precursor de los demás leucotrienos
LTB ₄	Neutrófilos	Marginación, migración, degranulación, generación del anión superóxido y síntesis de eicosanoides
LTC ₄	Células cebadas, Basófilos, Eosinófilos	Broncoconstricción, vasoconstricción, descenso del flujo sanguíneo, decremento de la contractilidad cardíaca y exudación del plasma
LTD ₄		
LTE ₄		

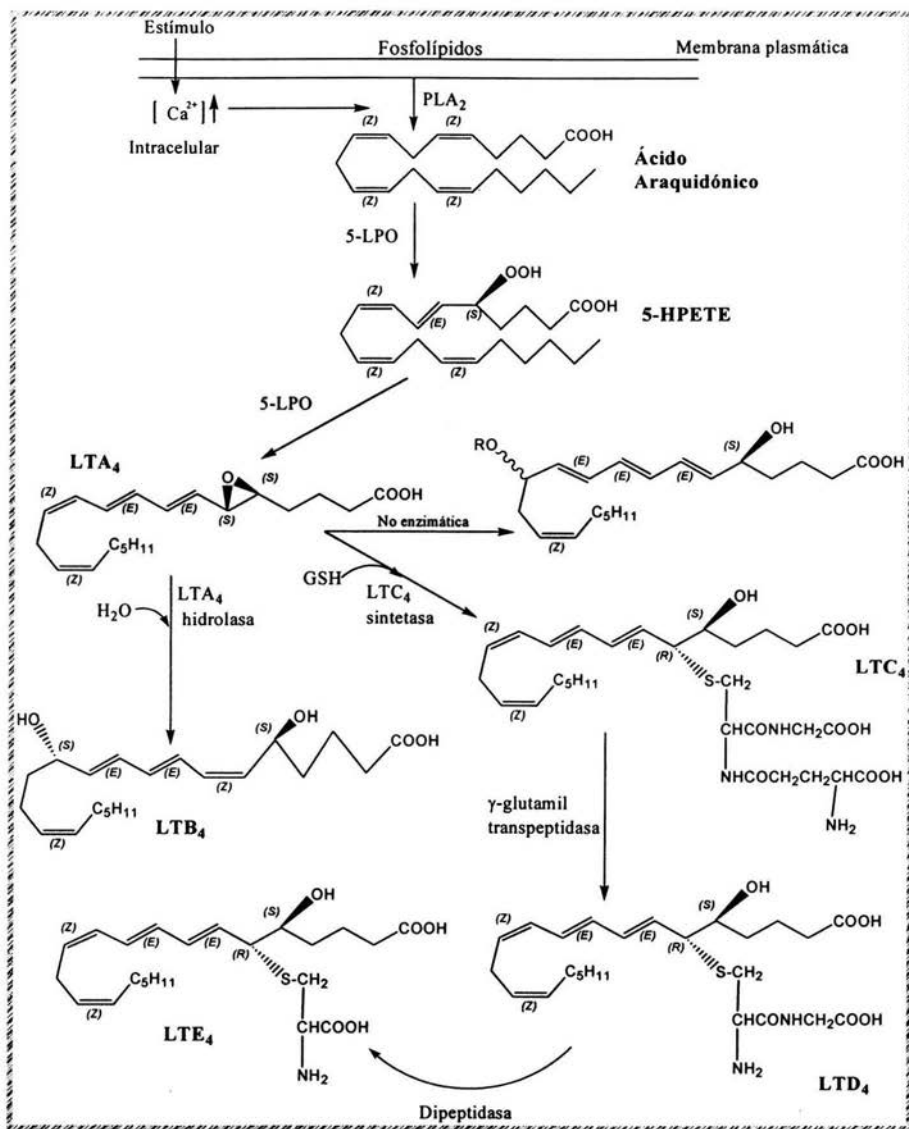


Figura 13. Biosíntesis de los Leucotrienos mediada por la 5-Lipoxigenasa (5-LPO).¹⁹

II.7.c Lipoxinas¹⁹:

La biosíntesis de leucotrienos es iniciada por la inserción de oxígeno molecular (O_2) en el carbono 5 del ácido araquidónico por la 5-LPO; pero las Lipoxinas (LX) se generan a partir de la oxigenación en las posiciones 5 y 15 por las enzimas 5-LPO y 15-LPO respectivamente. Esta oxigenación produce un intermediario epóxido 5, 6-epoxitetraeno, el cual es rápidamente convertido en LXA_4 o LXB_4 por epóxido-hidrolasas (Figura 14). Asimismo los productos de 5-LPO y 15-LPO ejercen funciones fisiológicas importantes, como se muestra en la Tabla 6.

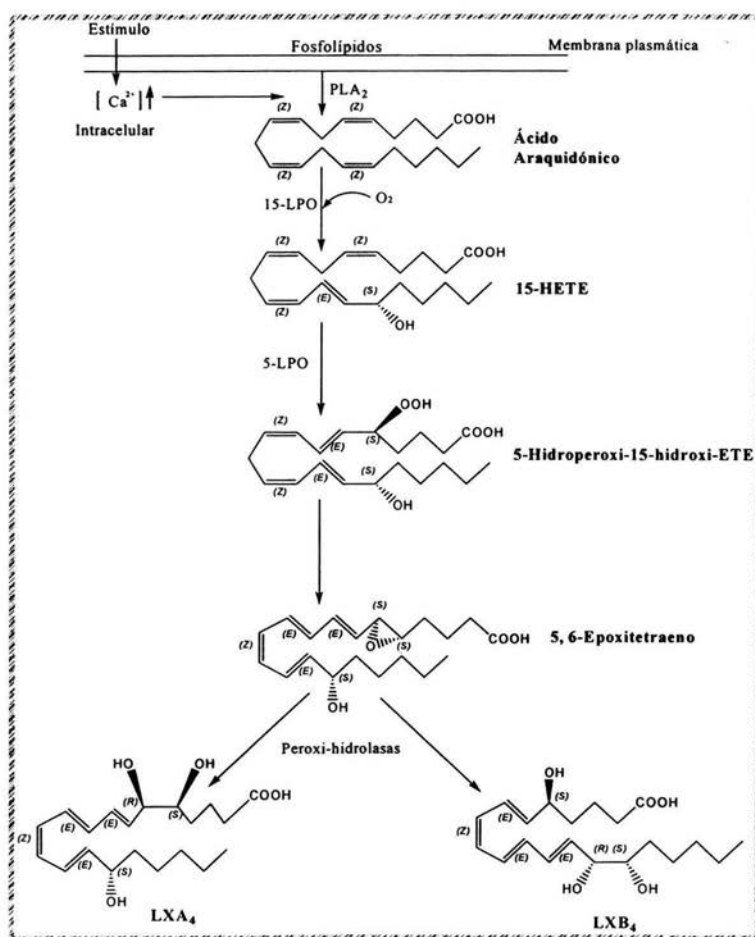


Figura 14. Biosíntesis de los Lipoxinas mediada por las enzimas 5-Lipoxigenasa y 15-Lipoxigenasa (5-LPO y 15-LPO).¹⁹

Tabla 6. . Función biológica de los derivados del AA mediados por 5-LPO y 15-LPO (Lipoxinas).

Compuesto	Función Biológica
AA	Precursor de todas las lipoxinas
15-HETE	Precursor de 5-hidroperoxi-15-hidroxi-ETE
5-Hidroperoxi-15-hidroxi-ETE	Precursor de 5, 6-epoxitetraeno
5, 6-Epoxitetraeno	Precursor de LXA ₄ y LXB ₄
LXA ₄	Quimiotaxis y quimicinesis hacia neutrófilos, inhibición de la actividad de células NK, dilatación arteriolar, antagonista a leucotrienos, liberación de TxA ₂ y PGI ₂ , contracción de músculo liso bronquial, activación de PMN y estimulación de formación de prostaglandinas
LXB ₄	Inhibición de la actividad de células NK, vasoconstricción y contracción de músculo liso bronquial

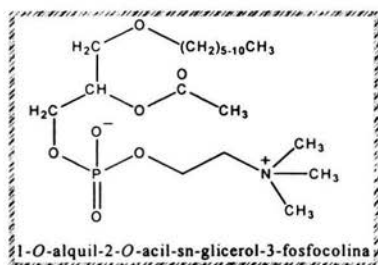
II.7.d Factor Activador de Plaquetas

El factor Activador de Plaquetas (PAF) es un Fosfolípido Activo de suma importancia como mediador en las interacciones célula-célula. Esta molécula tiene varias funciones fisiológicas, entre las cuales se encuentran: ^{16, 19}

- 1) Activación de Leucocitos Polimorfonucleares (PMN) y otros leucocitos
- 2) Liberación de ácido araquidónico y producción de eicosanoides
- 3) Alteración de la Permeabilidad Vascular y extravasación del plasma
- 4) Hipotensión
- 5) Decremento de la potencia cardíaca
- 6) Vasoconstricción
- 7) Broncoconstricción
- 8) Edema pulmonar
- 9) Estimulación de la Glicogenólisis en el hígado
- 10) Estimulación de la contracción uterina
- 11) Agregación plaquetaria

Sin embargo, el PAF también está involucrado en diversos procesos fisiopatológicos dentro de los que destacan: Enfermedades alérgicas e inflamatorias como asma, anafilaxia sistémica, inflamación aguda, shock endotóxico, ulceración gastrointestinal, pancreatitis, daño agudo a pulmón, glomerulonefritis, rechazo a transplantes e isquemia cerebral, renal y al miocardio^{4, 17}.

La estructura y nombre químicos de este fosfolípido es:



La biosíntesis de este mediador es partir de 2 vías fundamentales:

II.7.d1 Vía Remodeladora (Remodeling pathway):

Los leucocitos PMN, células endoteliales y monocitos cuando son activados por toxinas o citocinas inician la biosíntesis del PAF por esta vía.

Cuando una toxina de algún agente etiológico entra en contacto con el organismo, por ejemplo a causa de una lesión celular, el Factor XII de la coagulación inicia la cascada de reacciones para formar Trombina que interacciona con su receptor el cual está asociado a una Proteína G que abre un canal de Ca^{2+} y activa a la Fosfolipasa C, dicha activación hidroliza al Fosfoinosítido y forma IP_3 y Diacilglicerol (DAG). El IP_3 provoca la liberación de Ca^{2+} del sistema tubular denso en las plaquetas, sin embargo, en los Leucocitos, PMN, $M\phi$, Monocitos, Células Cebadas y Endoteliales, la entrada de Ca^{2+} provoca la activación de la PLA_2 .^{15, 16, 19} Cuando es activada la PLA_2 cataliza la desacilación en la posición 2 del 1-O-alkil-PC para obtener Liso-PAF y este es esterificado en la misma posición por la enzima Acetiltransferasa para formar PAF. La degradación del PAF es a partir de la hidrólisis del éster en la posición 2 de la base glicerol por la enzima PAF-acetilhidrolasa para formar Liso-PAF que a su vez es acilado en la misma posición por la enzima Aciltransferasa para formar 1-O-alkil-PC. La ruta de biosíntesis y degradación del PAF se muestra en la siguiente figura (Figura 15).

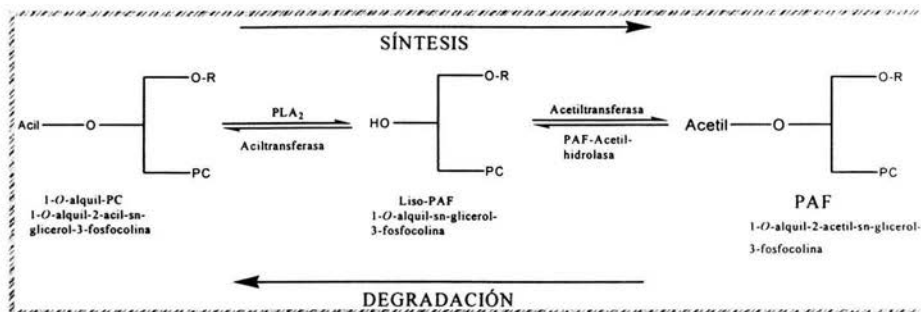


Figura 15. Ruta Biosintética del PAF por la Vía Remodeladora.¹⁶

II.7.d2 Vía Síntesis *de Novo*:

La síntesis de PAF es a través de la catálisis enzimática de la 1-alcil-2-acil-*sn*-glicerolcolinafosfotransferasa, y su biosíntesis es análoga a la de la Fosfatidilcolina, pero las enzimas son específicas para los precursores adecuados.

La síntesis *de Novo* sucede en células endoteliales y epiteliales, aún no está bien establecido si sucede en células inflamatorias (Figura 16); sólo se sabe que los leucocitos PMN sintetizan PAF por esta ruta siempre y cuando sean estimuladas por Ésteres de Forbol.^{16, 19}

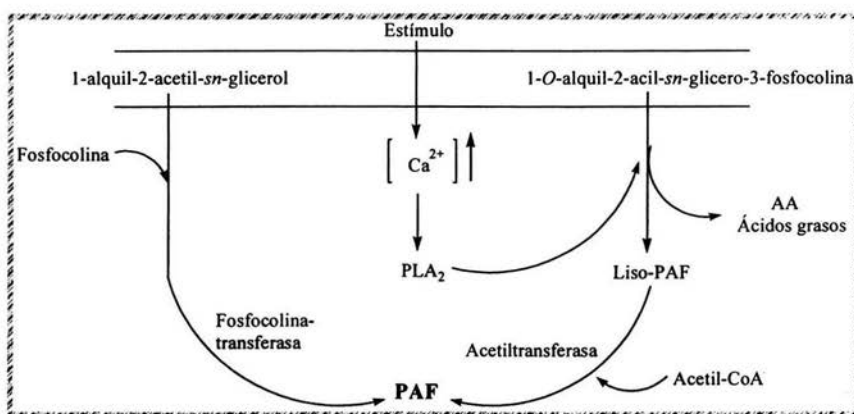


Figura 16. Biosíntesis del PAF a partir de las vías Remodeladora y *de Novo*.¹⁶

II.8 Óxido Nítrico

La relajación de la fibra muscular lisa como un componente estructural activo de la pared vascular da origen a una vasodilatación directa. El agente que desencadena este proceso fue en un principio conocido como el factor de relajación derivado del endotelio (EDRF),²³

descubierto por Furchgott y Zawadzki en 1980. Este factor es producido por la célula endotelial como consecuencia de estímulos fisiológicos, del estrés o de los estímulos químicos que *in vivo* puedan ejercer la acetilcolina y/o la bradicinina sobre sus respectivos receptores en la pared endotelial.

Tras comprobarse que el EDRF influía sobre el tono vascular y en particular el flujo sanguíneo cerebral, se demostró que este factor tenía las mismas características funcionales que el óxido nítrico (NO), el cual es producido por una familia de enzimas que se les denomina óxido nítrico sintetasas (NOS). Se sabe además que el PAF modula la permeabilidad microvascular por medio de señalizaciones bioquímicas que involucran a la estimulación de la NOS²⁴.

La isoforma enzimática (iNOS) también es regulada negativamente por los glucocorticoides, IL-1, PAF y el TGF²⁵. En la siguiente tabla (Tabla 7) se resume la localización de las isoformas de NOS.

Tabla 7. Isoformas de las enzimas Óxido Nítrico Sintetasas (NOS).²³

Isoforma	Tejido y células en el cuales se encuentran
Constitutiva Neuronal (nNOS)	Cerebro, músculo esquelético, neutrófilos, islotes pancreáticos, endotelio, epitelios del sistema respiratorio, y en órganos del sistema gastrointestinal
Constitutiva Endotelial (eNOS)	Células endoteliales y neuronas
Inducible (iNOS)	Macrófagos, músculo liso, células endoteliales, neuronas situadas en el hilio del hipotálamo, cerebelo, corteza cerebral

En la inflamación aguda el NO activa a las formas constitutiva e inducible de la COX (COX-1 y COX-2). Durante la inflamación crónica y/o proceso infeccioso los macrófagos liberan Especies Reactivas de Oxígeno (ROS) para eliminar al agente etiológico, sin embargo, estas células son capaces también de producir óxido nítrico (NO) que es una sustancia sumamente tóxica para los microorganismos²⁰, además de que es un gran agente inhibidor de la replicación viral. La producción de óxido es estimulada inicialmente por el IFN γ (también por LPS o IL-1)²⁰ sobre el M ϕ donde la iNOS es inducida a través de la activación del Factor Nuclear κ -B (NF- κ B) y la consecuente producción de óxido nítrico

via L-arginina/Citrulina, que es incrementada por el TNF α y la unión de la Tetrahydrobiopterina con la iNOS (Figura 17).

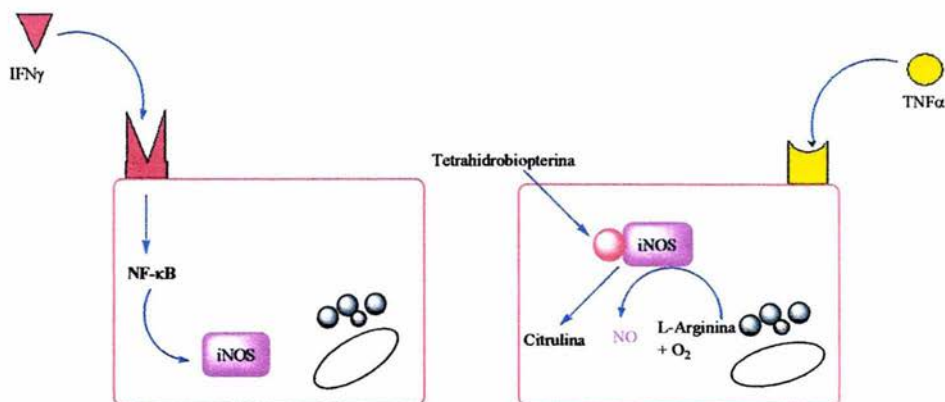


Figura 17. Inducción de la iNOS y producción de NO a través de la vía L-Arginina / Citrulina.^{23,26}

Las interacciones del NO con las ROS son complejas. Algunas veces, estas moléculas se inactivan entre sí, pero, en determinadas circunstancias, pueden combinarse para generar radicales peroxinitrito altamente reactivos capaces de oxidar tioles y las bases nitrogenadas del DNA, además de iniciar la peroxidación de lípidos independientemente de la presencia de metales (Figura 18). En presencia de ciertos metales, el peroxinitrito permite formar especies del tipo NO $_2^+$, los cuales pueden nitrar por sustitución electrofílica aromática (Friedel-Craft) compuestos fenólicos, incluyendo los anillos aromáticos de las proteínas.

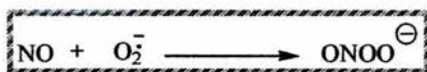


Figura 18. Formación del Peroxinitrito a partir del Óxido Nítrico.

II.9 Farmacología de los Antiinflamatorios NO Esteroidales²¹

Los fármacos antiinflamatorios, analgésicos y antipiréticos constituyen un grupo heterogéneo de compuestos, con frecuencia no relacionados químicamente, que a pesar de ello comparten ciertas acciones terapéuticas y efectos colaterales. El prototipo de estos fármacos es el Ácido Acetilsalicílico (ASA), y por tanto, a estos se les ha denominado tipo aspirina, pero actualmente es más aceptado llamarlos como Fármacos Antiinflamatorios No Esteroidales (FANES o AINES).

La inhibición de la biosíntesis de prostaglandinas producida por el ASA, Indometacina y otros fármacos se ha demostrado por muchos experimentos *in vivo* e *in vitro*. Este efecto sólo depende de que el fármaco alcance a la enzima Ciclooxygenasa (COX) y con ello sobreviene la inhibición de la síntesis de prostaglandinas en plaquetas, semen, orina y líquido sinovial de las articulaciones de las rodillas artríticas. También hay correlación espectro-orden entre la potencia de estos fármacos como inhibidores de la COX y su actividad antiinflamatoria. La única excepción sobresaliente es la Indometacina, que parece ser más potente en las pruebas antiinflamatorias que en los ensayos de inhibición enzimática.

Los fármacos del tipo salicilatos (Ácido Acetilsalicílico), pirazolónicos (Fenilbutazona), *p*-aminofenoles (Paracetamol), derivados del indol (Indometacina), derivados del diclofenaco (Diclofenaco), derivados del ácido propiónico (Ibuprofeno), entre otros; están involucrados en la inhibición de la producción de prostaglandinas. Estos fármacos actúan sobre la inhibición de la enzima COX involucrada en la biotransformación del ácido araquidónico en PGG₂ y PGH₂ que son los precursores principales de las prostaglandinas cuyo efecto biológico puede llegar a exacerbar la inflamación en el sitio de la lesión o infección²¹.

II.10 Farmacología de los Antiinflamatorios Esteroidales²¹

Los corticosteroides son hormonas secretadas por la corteza suprarrenal así como la hormona adrenocorticotrófica (ACTH), cuyos efectos fisiológicos y farmacológicos influyen sobre el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos, también sobre el equilibrio de electrolitos/agua y sobre las funciones del sistema cardiovascular y nervioso, riñón, músculo esquelético y otros tejidos. Además los corticosteroides confieren al organismo la capacidad de resistir a diversos tipos de estímulos nocivos y modificaciones ambientales.

Los corticosteroides naturales se clasifican en Mineralocorticoides y Glucocorticoides, de acuerdo a la potencia relativa que tienen para retener Na⁺ y depositar glucógeno hepático y su actividad antiinflamatoria, como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Potencias relativas de algunos corticosteroides.¹³

Corticoides	Retención de Na ⁺	Depósito de glucógeno hepático	Efecto Antiinflamatorio
<i>Naturales</i>			
Cortisol	1*	1	1
Cortisona	0.8*	0.8	0.8
Corticosterona	15	0.35	0.3
11-Desoxicorticosterona	100	0	0
Aldosterona	3000	0.3	?
<i>Sintéticas</i>			
Prednisolona	< 1*	4	4
Triamcinolona	0	5	5

* Estimula la excreción de Na⁺ en ciertas circunstancias.

Con respecto a las acciones antiinflamatorias, los glucocorticoides tienen la capacidad de prevenir o suprimir el desarrollo de las manifestaciones de la inflamación. Inhiben la respuesta inflamatoria de tipo radiante, mecánico, químico, infeccioso o inmunológico.

Los corticosteroides inhiben no sólo los fenómenos de la Fase Transitoria Aguda del proceso de inflamatorio sino también las manifestaciones de la Fase Subaguda Tardía.

El mecanismo de acción de los glucocorticoides incluye a la inhibición de la producción de ácido araquidónico y sus metabolitos como las prostaglandinas, leucotrienos y lipoxinas, a través de la síntesis inducida por los glucocorticoides de varias proteínas entre las que se encuentran la Lipocortina-1 que inhibe la actividad de la PLA₂ y la biosíntesis del PAF; inducen la transducción del gen que codifica para las enzimas ECA (Enzima Convertidora de la Angiotensina) y NEP (Endopeptidasa Neutral) cuya función es metabolizar a la bradicinina y a las taquininas respectivamente. Otras acciones de los glucocorticoides es la represión de los genes que codifican para la PLA₂, COX y 5-LPO, inhibiendo así la producción de los mediadores lípidos derivados del ácido araquidónico (Figura 20).

Los glucocorticoides también inhiben la producción del TNF α liberado por las células fagocíticas, esta citocina induce la expresión génica (además de PAF y LTB₄) de la proteína AP-1 producida por los oncogenes *c-fos* y *c-jun* que codifican para las dos subunidades FOS y JUN de la proteína. La AP-1 es como factor de transcripción para el gen que codifica para la Colagenasa (Figura 19), así pues los glucocorticoides pueden inhibir la acción de la AP-1 de dos maneras: 1) Represión mutua por la unión del receptor

glucocorticoide activado (G-R), o bien, 2) el G-R se une al gen de la colagenasa impidiendo la transcripción del gen inducido por AP-1. Además estos antiinflamatorios pueden reprimir la transcripción de los genes de AP-1 y NF- κ B estimulados por citocinas.

Asimismo inhiben la producción de IL-1 que induce la producción de PGE₂ y colagenasas, activación de LcT y aumento de la síntesis hepática de proteínas durante la Fase Aguda de la Inflamación; que actúan como sustancias quimiotácticas para leucocitos^{21,22}.

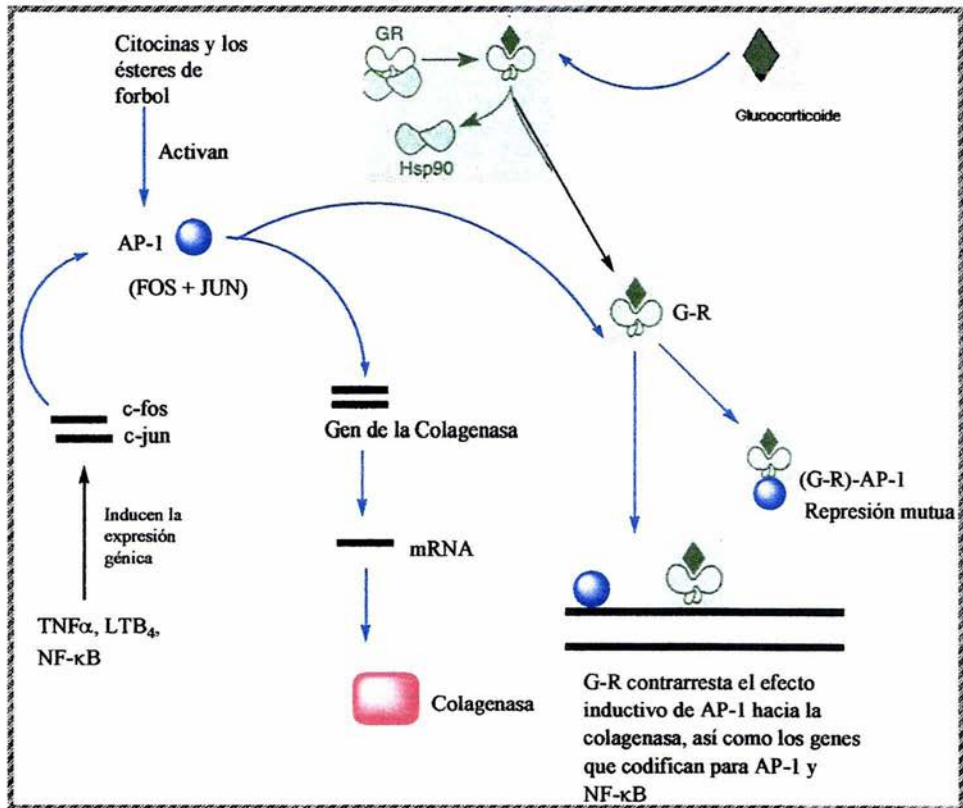


Figura 19. Mecanismo antiinflamatorio del Receptor Glucocorticoide (G-R) con su ligado hacia la represión de la transducción del gen de la colagenasa inducido por el factor de transcripción AP-1.²²

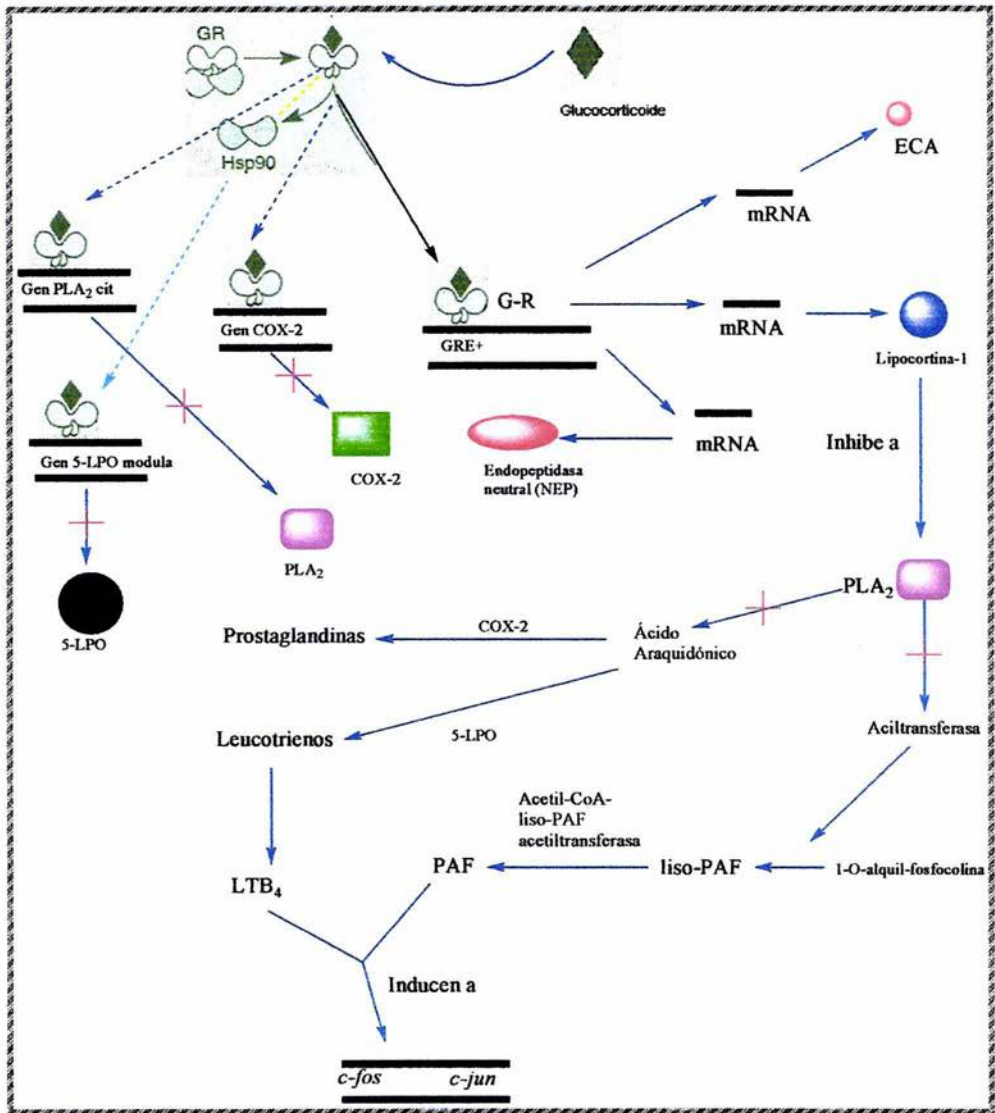


Figura 20. Mecanismo general antiinflamatorio de los glucocorticoides.²²

Algunos ejemplos de fármacos esteroidales utilizados actualmente por su gran potencia antiinflamatoria son: Prednisona, Prednisolona, 6 α -metilprednisolona, Fludrocortisona, Prametasona, Betametasona y Dexametasona.

II.11 Modelos de Evaluación Antiinflamatoria

La dermatitis es una inflamación de la piel, la cual se hace evidente por edema y eritema, infiltración de neutrófilos, aumento en la actividad de la enzima Mieloperoxidasa (MOP) involucrada en la síntesis de HClO y HIO a partir de H₂O₂²⁶; e hiperplasia de la epidermis asociada al incremento de poliaminas, prostaglandinas y leucotrienos. A partir de estos fenómenos se han implementado desde la década de los ochenta varios modelos de inflamación de naturaleza aguda como crónica en el tejido cutáneo empleando animales de experimentación. Cada uno se basa en el uso de un agente irritante aplicado directamente sobre la piel (*in situ*), o bien inyectando aquel en una parte específica del organismo. Estos modelos *in vivo* han servido para identificar el potencial tópico y sistémico de los fármacos antiinflamatorios no esteroideos como los esteroideos, así como fármacos involucrados en reacciones de hipersensibilidad temprana (antialérgicos).

La siguiente tabla (Tabla 9) muestra algunos ensayos para dilucidar la actividad antiinflamatoria.

Tabla 10. Ensayos para dilucidar actividad antiinflamatoria *in vivo*.

Agente Irritante	Signo de Inflamación	Animal	Tejido
Inflamación aguda tipo vascular			
Luz U.V.	Eritema	Cobayo	Piel del lomo
Calor	Edema	Rata	
TPA, EPP, AA, Cantaridina		Rata, Ratón	Oreja
Carragenina		Rata	Pata
Inflamación de tipo celular			
Aplicación de un volumen de aire	Exudado y mediadores	Rata	Piel
Implantación de esponja	Granuloma		Subcutáneo
Implantación de aceite			
Inflamación tipo inmune			
Sensibilización y reto antigénico	Edema	Ratón	Oreja
Reacción pasiva de Arthus	Lesión de la piel	Rata	Piel
Anafilaxia cutánea pasiva		Rata, Cobayo	

En este estudio se utilizaron dos ensayos *in vivo* que corresponden a una inflamación aguda tipo vascular, donde los agentes irritantes que provocan el edema fueron el 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA) y Etil-fenil-propiolato (EPP), el primero utilizado para evaluar antiinflamatorios de tipo esterooidal y No esterooidal y el segundo para evaluar antiinflamatorios esterooidales.²⁶

II.11.a Edema inducido por TPA

El TPA es un promotor de tumores y activador de la Proteincinasa C. Induce una respuesta inflamatoria de larga duración asociada con un pasajero incremento en la producción de prostaglandinas bloqueada por AINES y antagonistas de receptores LTB₄ e inhibidores de 5-LPO, por lo que se ha sugerido que los leucotrienos son los responsables de la inflamación y la hiperplasia asociada a este agente irritante (Figura 22).

El mecanismo de acción por el cual se lleva a cabo el efecto inflamatorio del TPA aún no está dilucidado, pero se ha reportado que este compuesto genera radicales libres del tipo ROS en modelos de carcinogénesis en piel. En la siguiente figura (Figura 21) se muestra un esquema del mecanismo inflamatorio que provoca el TPA.

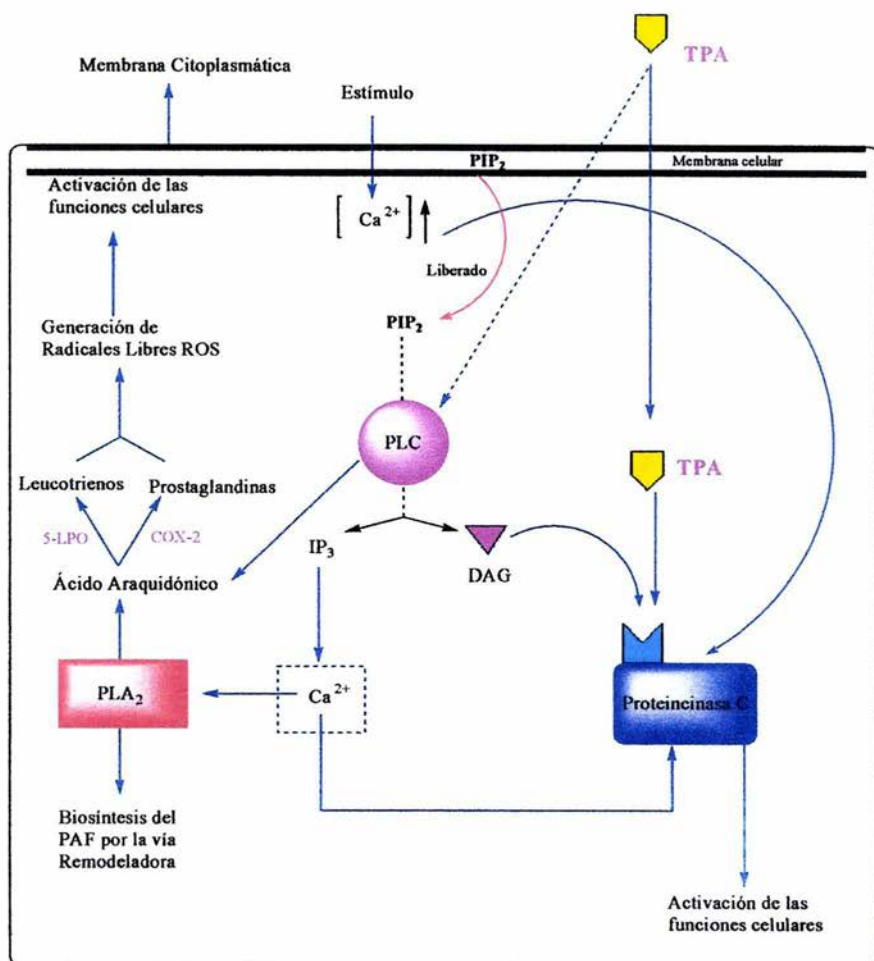


Figura 21. Mecanismo de acción inflamatorio propuesto para el TPA.

Existe evidencia de que el edema inducido con TPA y otros agentes irritantes tienen una relación estrecha con la inhibición de la agregación plaquetaria. El grupo de Merlos y cols.²⁸ probaron varios compuestos potencialmente antagonistas al receptor PAF y los resultados que hallaron se muestran en la Tabla 11.

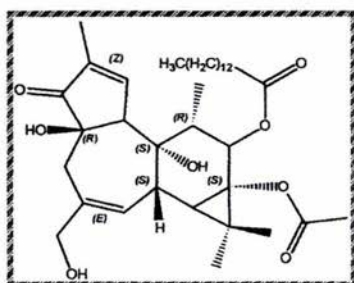


Figura 22. 13-acetato de 12-*O*-tetradecanoilforbol (TPA).

Tabla 11. Relación TPA y otros agentes con antagonistas al receptor PAF.²⁸

Compuestos	Agregación plaquetaria inducida por PAF IC ₅₀ (μM)	Hipotensión inducida por PAF ID ₅₀ (mg/kg) i.v.	Inducción del edema en la oreja ID ₅₀ (mg/oreja)			
			Ácido Araquidónico	TPA	Ditranol	Ácido Benzoico
UR-10324	0.012	0.018	0.058	0.025	0.61	0.28
UR-11353	0.010	0.025	0.075	0.94	0.085	0.43
CV-6209	0.012	0.008	0.059	0.056	0.057	0.17
WEB-2086	0.091	0.17	0.76	0.39	0.29	0.47
YM-461	0.88	0.035	> 2	1.52	0.12	> 2
BN-52021	0.55	> 5	> 1	> 1	> 1	> 1
Indometacina	NT	NT	1.25	0.015	0.086	0.34
Fenidona	NT	NT	0.013	0.32	> 2	0.57
Dexametasona	NT	NT	0.12	0.023	0.14	0.33

En este estudio se demostró que el compuesto UR-10324 guarda la relación más estrecha entre la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por PAF y la inhibición del edema inducido con TPA y AA en oreja de ratón. En cambio los compuestos en estado iónico (YM-461 y BN-52021) fueron los menos activos. Los autores concluyeron que existe una relación entre la inflamación inducida con TPA y la capacidad de inhibir la agregación plaquetaria, debido a que el TPA puede activar la PLC, y ésta a su vez vía IP₃ se activa la PLA₂, y de esta manera promueve la formación del PAF.

II.11.b Edema inducido por EPP

El Etil-fenil-propiolato (EPP) (Figura 23) se ha utilizado para evaluar a los fármacos involucrados en un mecanismo esteroidal (Glucocorticoides),²⁷ sin embargo, el modo de acción del EPP para inducir la inflamación aún no está dilucidado.

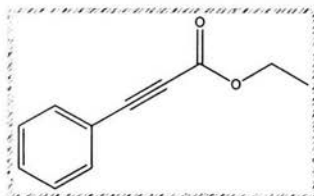


Figura 23. Etil-fenil-propiolato.

II.11.c Producción de NO por estimulación con LPS a Mφ murinos

Este ensayo se ha propuesto como un modelo *in vitro* para evaluar el efecto antiinflamatorio a través de cuantificar la reducción en la producción de NO sintetizado por la iNOS medida en nitritos (NO_2^-), en cultivos de Mφ estimulados con LPS¹⁸. El método de Griess es utilizado para detectar nitritos mediante la reacción del anión con la sulfanilamida en medio ácido obteniendo una sal de diazonio. La sal de diazonio reacciona con el agente cromóforo que es el naftiletilendiamina obteniendo un compuesto colorido detectado a 515 nm (Figura 24)^{18, 29}. Durante el ensayo es necesario adicionar al medio la enzima superóxido dismutasa (SOD) para evitar la formación del radical-anión superóxido.

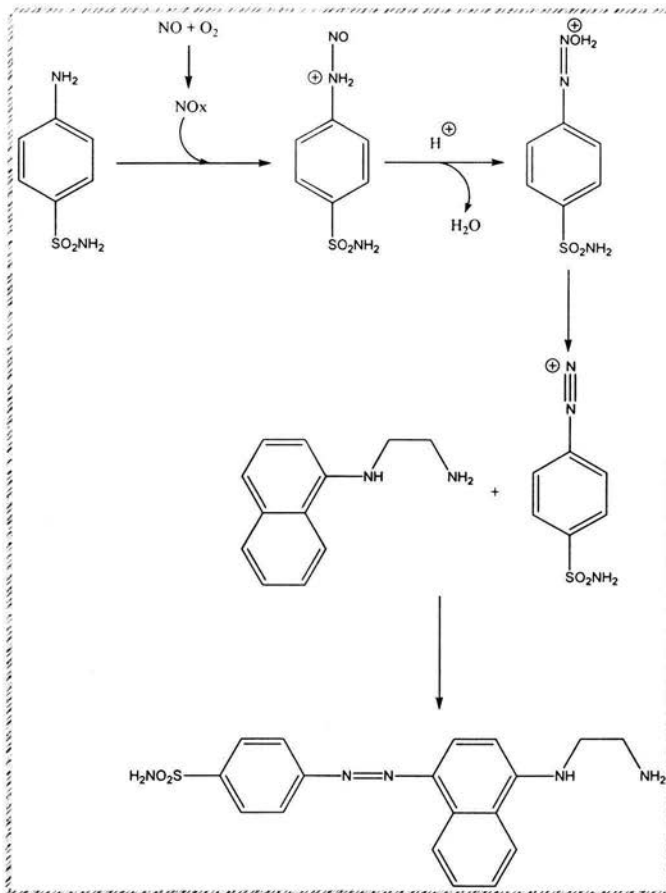


Figura 24. Esquema general de reacciones llevadas a cabo durante la determinación de nitritos por el método de Griess.²⁹

II.11.d Medición de la Viabilidad de Mφ murinos por el ensayo de MTT

El proceso de respiración es un indicador de la viabilidad celular de los macrófagos y es posible medirla por espectrofotometría en la región del visible con el método del Bromuro de 3-(4, 5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazolio (MTT). El fundamento del método se basa en involucrar moléculas que participan en reacciones enzimáticas redox-acidez en el Ciclo de Krebs y Fosforilación Oxidativa donde el FAD-Diaforasa por medio del NADH + H⁺ es reducido; una vez llevada a cabo la reacción, el FADH₂-Diaforasa reduce al MTT a una sal de formazán colorida detectada a 590 nm (Figura 25)^{18,30}.

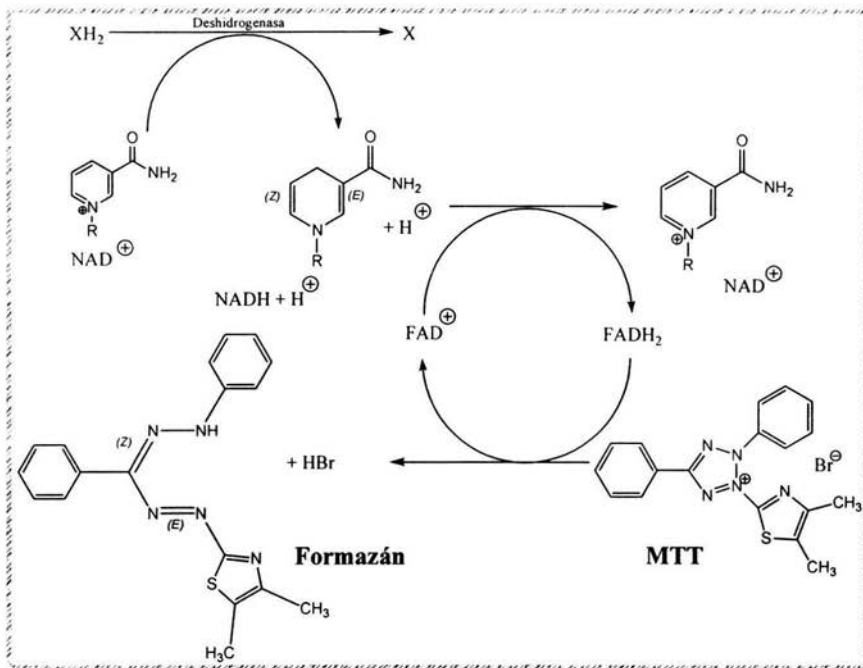


Figura 25. Esquema general de reacciones llevadas a cabo durante la determinación de la viabilidad celular por el método de MTT.³⁰

III. HIPÓTESIS:

El PAF está implicado en eventos celulares y humorales de la respuesta inflamatoria y sistema cardiovascular, por lo que los antagonistas del PAF poseen actividad antiinflamatoria debido a su unión a estos receptores o bien, inhiben alguna enzima involucrada en la biosíntesis de este autacoide.

Algunos diterpenos de tipo labdánico como la prehispanolona y derivados, son antagonistas de receptores al PAF, porque presentan una estructura espirotetracíclica y una sustitución del carbonilo de la posición 7 por grupos más polares que aumentan la afinidad por el receptor. La Hispanolona es un diterpeno labdánico bicíclico unido a un anillo de furano por un puente etilénico y esta es capaz de generar una estructura espirotetracíclica diferente a la encontrada en la prehispanolona, por lo que este compuesto y/o sus derivados pueden ser buenos candidatos para obtener compuestos con actividad semejante.

IV. OBJETIVOS:

IV.1 Objetivo General

Obtener por Coulombimetría a corriente controlada derivados semisintéticos de la Hispanolona y probar su actividad antiinflamatoria.

IV.2 Objetivos Particulares

- Sintetizar nuevos derivados de la Hispanolona utilizando electrooxidación a corriente controlada y transformaciones químicas convencionales como método de modificación molecular.
- Caracterizar mediante técnicas espectroscópicas los derivados electrogenerados a partir de la Hispanolona.
- Evaluar la actividad antiinflamatoria de la Hispanolona y derivados sobre el edema inducido con TPA y EPP en la oreja de ratón.
- Determinar la actividad de la Hispanolona y derivados sobre la producción de óxido nítrico dependiente de la Óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS) en macrófagos murinos.

V. PARTE EXPERIMENTAL:

V.1 Instrumentación

- La electrólisis a corriente controlada se realizó en un Potenciostato/Galvanostato EG&G Company modelo 179, utilizando la celda y electrodos que se describirán en el procedimiento general. Se utilizó también un Coulombímetro Scribner associates Inc. modelo 279A. El sistema de agitación de la electrólisis fue con un motor EG&G Princeton Applied Research modelo 377.
- La materia prima y los productos fueron pesados en la balanza analítica Explorer Ohaus o la balanza analítica Sartorius.
- Para la cromatografía en capa fina (c.c.f.) se emplearon cromatofolios de aluminio ALUGRAM SIL 20x20 cm recubiertos con gel de sílice 60F₂₅₄ (Macherey-Nagel). El revelado se realizó con una disolución de Ce(SO₄)₂ al 2% en H₂SO₄ y con una lámpara de U.V. modelo UVGL-55 a SW 254 nm y LW 365 nm.
- La concentración de los productos se empleó un equipo de destilación al vacío Rot Büchi RE 111 y una vaporera Yamato Water Bath BM 100.
- La adsorción de los productos fue sobre celita, previa a la purificación de los productos de cada reacción. La purificación y separación se realizó mediante cromatografía en columna flash empleando gel de sílice (Silicagel 60) con tamaño de partícula 40-63 µm de diámetro (malla 230-400 ASTM). La recristalización se llevó a cabo mediante la técnica de par de disolventes Hexano/AcOEt.
- Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johnes y no están corregidos.
- Los espectros de Infrarrojo (IR) se realizaron en un espectrofotómetro Nicolet Magna-IR 750 empleando la técnica de película, solución en CHCl₃ o en pastilla de KBr, dependiendo de la muestra analizada.
- Los espectros de masas de baja resolución, se determinaron en un espectrómetro de masas (EM) JEOL JMS-AX 505 a 70 eV por el método de impacto electrónico. Los espectros de masas de alta resolución se obtuvieron en un espectrómetro JEOL JMS-SX 102A modelo JSX-LEM-IQUI por el método FAB⁺.

- Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C y DEPT así como el análisis HETCOR y COSY se adquirieron en un equipo Varian Unity 300. Los análisis de NOESY se corrieron a 300 y 500 MHz, los cuales se obtuvieron en un equipo Varian Unity Plus 500. Los productos fueron disueltos en CDCl_3 .
- Los análisis de difracción de rayos X (DRX) se obtuvieron en un equipo Bruker AXS con detector de área.
- El inóculo de células (macrófagos) se realizó en una Cámara de Neubauer Bright-Line Hemacytometer con ayuda de un microscopio Nikon Diaphot 300.
- El exudado peritoneal (EP) se incubó en una incubadora Napco modelo 5410.
- Los ensayos de Óxido Nítrico y Citotoxicidad se realizaron en una campana de flujo laminar Alder.
- Los resultados de los ensayos de Óxido Nítrico y Citotoxicidad se leyeron en un lector de microplacas Bio-Tek instruments, Vermont U.S.A.
- La aplicación tópica de TPA, EPP y los compuestos sobre la oreja de los ratones en los ensayos *in vivo* se realizaron con microjeringas de la marca Hamilton.
- La medición del pH de la solución PBS se realizó en un potenciómetro Beckman modelo 39841 y con un electrodo modelo 39841.

V.2 Reactivos

Se utilizaron los siguientes reactivos para la parte sintética del proyecto: Hispanolona, NH_4Br (97% Aldrich), N_2 (Grado 5 Praxair), H_2O destilada, CH_3OH destilado, Acetona, AcOEt destilado, Hexano destilado, Éter dietílico destilado, Celita, NaHCO_3 (J.T. Baker Analyzed), Na_2CO_3 (J.T. Baker Analyzed), Na_2SO_4 (J.T. Baker Analyzed), Ácido Cítrico (Química Meyer), $p\text{-TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Aldrich), Benceno, Etilénglicol (Sigma), $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ al 2 % de H_2SO_4 .

Los reactivos utilizados en las pruebas de actividad biológica fueron los siguientes: TPA (Sigma), EPP (Aldrich), Acetona (Merck), EtOH (J.T. Baker Analyzed), Indometacina (Sigma), Dexametasona (Sigma), Tioglicolato (BD Bioxon), LPS (Sigma. LPS de *Escherichia coli* serotipo 055:B5), SOD (Boehringer Mannheim GmbIt), NaNO_2 (Sigma), Aminoguanidina (Sigma), MTT (Aldrich), DMSO (Sigma), Pentobarbital sódico (Sedalphorte), Medio DMEN (Gibco).

Tioglicolato: (Peptona de Caseína, L-cistina, Dextrosa anhidra, Extracto de Levadura, NaCl, Tioglicolato de Sodio, Resazurina y Agar).

Medio DMEN: (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Glucosa, L-glutamina, Piridoxina HCl, Piruvato de Sodio y NaHCO_3).

Reactivo de Griess: [H_3PO_4 (J.T. Baker Analyzed), Naftiletilenendiamina (Sigma) y Sulfanilamida (Sigma)].

PBS: [Na_2HPO_4 (J.T. Baker Analyzed), KH_2PO_4 (Mallinckrodt), NaCl (Fermont) y KCl (Monterrey)].

Hispanolona: ($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_3$) Cristales blancos, con punto de fusión de 125-128 °C. Los espectros de IR, ^1H RMN corresponden a los descritos en la literatura^{3,11}.

V.3 Procedimiento general de la electrólisis a corriente controlada

Las electrólisis fueron realizadas en una celda de vidrio tipo Batch con un motor eléctrico para agitación constante, modelos K0028 y 377/16 de la marca EG&G PAR. Se emplearon electrodos concéntricos, una malla cilíndrica de platino como electrodo de trabajo (área = 15 cm^2) y como contra-electrodo una placa cilíndrica de níquel (con diámetro menor al electrodo de platino) (Figura 26).

Para cada electrólisis realizada el compuesto a oxidar se disolvió en la celda con 40 mL de la solución 0.15 M de NH_4Br en metanol destilado. Esta disolución se sometió a agitación constante y se desoxigenó con N_2 durante 15 min. Posteriormente se realizó la electrólisis a corriente controlada de 150 mA cuya densidad de corriente es $\rho = 10 \text{ mA/cm}^2$ durante el tiempo necesario para que pase la cantidad de electricidad requerida dependiendo de la masa de analito (considerando un rendimiento faradaico del 100 %)¹¹. La carga necesaria para efectuar la electrólisis se determinó a partir de la ley de Faraday:

$$W = \frac{QM}{nF}$$

donde:

W = Peso en gramos de la sustancia a electrolizar

Q = La cantidad de Carga en Coulombs

M = Masa Molar del analito

n = Número de electrones requeridos por molécula en la reacción

F = Constante de Faraday (96 487 C/mol)

El tiempo requerido para electrolizar toda la materia prima se determinó a partir de la Ley de Ampere:

$$Q = it$$

Una vez concluida la electrooxidación se tomó una cromatografía en capa fina donde se constató el consumo de la materia prima. El metanol se evaporó en el rotaevaporador y las sales se filtraron lavando con acetona. El filtrado se concentró en el rotaevaporador y el producto fue separado mediante cromatografía en columna flash y recrystalizado por par de disolventes. Finalmente los productos puros se enviaron a las diferentes técnicas espectroscópicas para caracterizar a los productos de reacción.

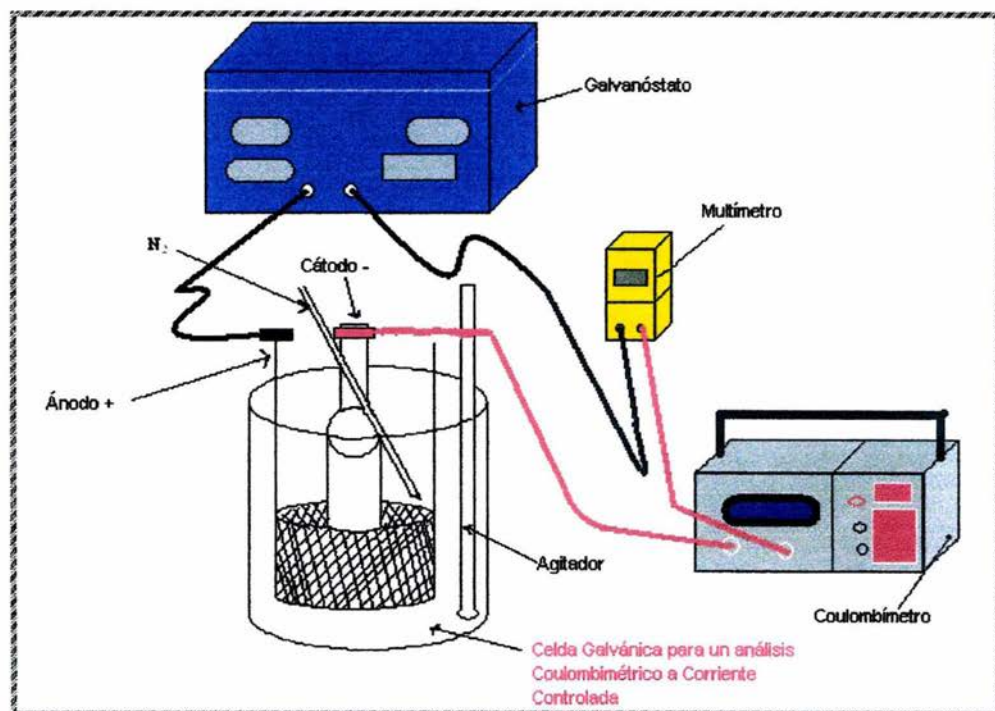
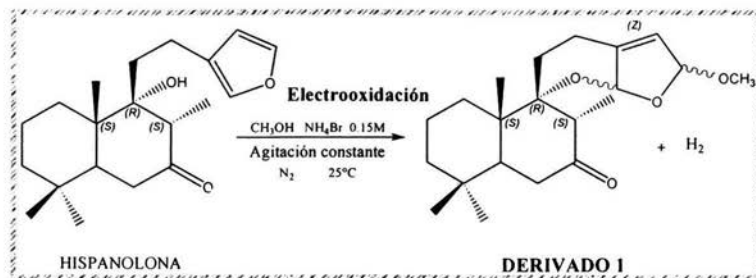


Figura 26. Equipo de electrólisis a corriente controlada para la reacción de electrooxidación de la Hispanolona.

V.4 Síntesis del Derivado 1 a partir de la Hispanolona



Se pesaron entre 100-500 mg (0.3140-1.5701 mmol) de Hispanolona y se disolvieron en 40 mL de disolución 0.15M de NH₄Br en CH₃OH destilado y se procedió a realizar la electrólisis a corriente controlada a temperatura ambiente como se describe en el procedimiento general.

La reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa fina (c.c.f.) Hexano/AcOEt (6:10). La mezcla de reacción obtenida fue separada en las siguientes condiciones:

Fase Estacionaria: Gel de Sílice malla 230-400

Fase Móvil: Hexano/AcOEt en polaridades crecientes

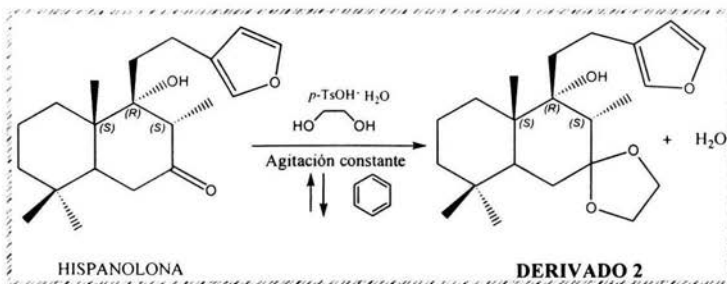
Los eluatos correspondientes al producto se juntaron y se concentraron al vacío. El rendimiento de la reacción fue del 25-33%. El compuesto (derivado 1) (C₂₁H₃₂O₄) se presenta en forma de cristales blancos con punto de fusión de 91-95°C y fue caracterizado por ¹H RMN, ¹³C RMN (Tabla 12) y DEPT a 300 MHz. La caracterización de los 4 diastereoisómeros en IR, EM, FAB⁺, ¹H RMN, ¹³C RMN, DEPT, FLOCK, HETCOR, COSY y NOESY están descritos en la literatura¹¹.

Tabla 12. Desplazamientos químicos correspondientes al espectro de RMN para los cuatro diastereoisómeros obtenidos de la reacción de electrooxidación de la hispanolona (300 MHz, Acetona-D₆, TMS).

Posición	δ C	δ H (J Hz)
1 α ax	32.6 <i>t</i>	1.65, <i>tm</i> (13.1)
1 β ec	-	1.55, <i>dm</i> (10.2)
2 β ax	19.3 <i>t</i>	1.68, <i>tm</i> (12.5)
2 α ec	-	1.50, <i>dm</i> (10.2)
3 α ax	42.2 <i>t</i>	1.16, <i>tm</i> (13.1)
3 β ec	-	1.41, <i>dm</i> (12.5)
4	34.0 <i>s</i>	-
5	46.6 <i>d</i>	2.09, <i>dd</i> (7, 3)
6 β ax	39.6 <i>t</i>	2.33, <i>t</i> (14,7)
6 α ec	-	2.22, <i>dd</i> (14, 3)
7	210.5 <i>s</i>	-
8	51.0 <i>d</i>	2.79, <i>m</i>
9	^a 81.84 <i>s</i> ^b 81.72 <i>s</i>	-
10	44.1 <i>s</i>	-
11	^a 32.69 <i>t</i> ^b 32.93 <i>t</i>	1.91, <i>m</i>
12	^a 24.07 <i>t</i> ^b 23.92 <i>t</i>	2.1-2.3, <i>m</i>
13	^a 146.40 <i>s</i> ^b 146.83 <i>s</i>	-
14	^a 124.41 <i>d</i> ^b 124.72 <i>d</i>	5.68, ancho*
15	^a 107.52 <i>d</i> ^b 109.00 <i>d</i>	5.47, <i>s</i> 5.73, <i>m</i>
16	^a 108.38 <i>d</i> ^b 109.58 <i>d</i>	5.41, <i>s</i> 5.68, <i>s</i> *
17	8.51 <i>q</i>	1.01, <i>dd</i> (7, 1)
18	33.52 <i>q</i>	0.83, <i>s</i>
19	21.68 <i>q</i>	0.90, <i>s</i>
20	16.78 <i>q</i>	1.22, <i>s</i>
CH ₃ O-	^a 53.45 <i>q</i> ^a 53.73 <i>q</i> ^b 53.20 <i>q</i> ^b 53.36 <i>q</i>	^a 3.271, <i>s</i> ^a 3.276, <i>s</i> ^b 3.242, <i>s</i> ^b 3.245, <i>s</i>

Todos los diastereoisómeros mostraron las mismas señales a excepción de a y b. *Señales traslapadas.

V.5 Protección del grupo funcional cetona de la Hispanolona (Derivado 2)

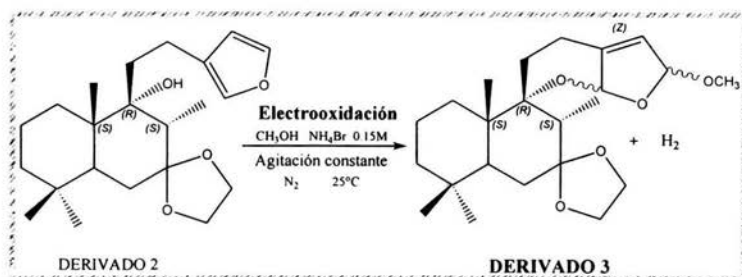


Se colocaron en un matraz bola 700 mg (2.1981 mmol) de Hispanolona, 75 mg de ácido *p*-toluensulfónico monohidratado ($p\text{-TsOH} \cdot \text{H}_2\text{O}$), 1.3 mL de etilenglicol ($\text{HO}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{OH}$) y 60.0 mL de benceno (C_6H_6); esta mezcla se dejó en agitación constante en un sistema a reflujo adaptado con una trampa Dean-Stark durante 6h⁵.

La reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa fina (c.c.f.) Hexano/AcOEt (6:10).

Finalmente cuando la materia prima se consumió, el disolvente fue evaporado al vacío y el concentrado se sometió a una extracción con disolución saturada de NaHCO_3 /éter dietílico; la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y filtrado a gravedad. La evaporación del disolvente permitió obtener monocristales que fueron enviados a DRX obteniendo la estructura del compuesto. El rendimiento de la reacción fue del 98%. La espectroscopía del compuesto ($\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{O}_4$) corresponde a la descrita en la literatura⁵. La totalidad del producto se utilizó para la siguiente transformación.

V.6 Síntesis del Derivado 3 de la Hispanolona a partir del Derivado 2



La Hispanolona protegida se disolvió en 40 mL de NH₄Br 0.15M en CH₃OH destilado en una celda y se sometió a una electrólisis a corriente controlada como lo describe el procedimiento general. La reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa fina (c.c.f.) Hexano/AcOEt (6:10). La mezcla de reacción fue separada en las siguientes condiciones:

Fase Estacionaria: Gel de Sílice malla 230-400

Fase Móvil: Hexano/AcOEt en polaridades crecientes

Los eluatos correspondientes a producto se juntaron y se concentraron al vacío. El rendimiento de la reacción fue de 93.3%. El compuesto (derivado 2) se presenta como un aceite color amarillo. La muestra se envió a caracterizar en ¹H RMN, ¹³C RMN a 300 MHz (Tabla 13), DEPT, IR y EM por Impacto electrónico y FAB⁺.

IR (Película) ν cm⁻¹: 3534.14, 2954.73, 1670.34, 1464.13, 1372.48, 1340.20, 1321.70, 1193.94, 1143.09, 1103.89, 1054.25, 1031.95, 947.71, 841.77, 786.31, 756.44.

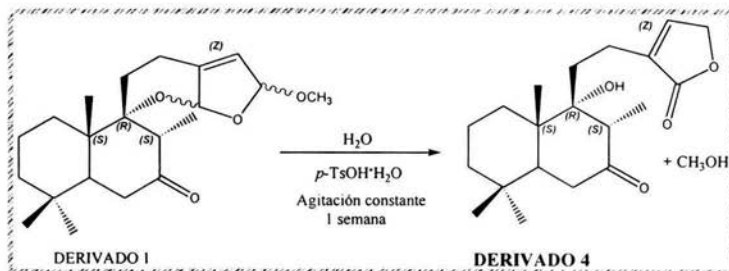
EM por impacto electrónico m / z (abundancia relativa): M⁺ 392 (25%), 361 (16%), 280 (20%), 267 (15%), 253 (100%), 237 (15%), 223 (23%), 211 (54%), 209 (45%), 195 (36%), 185 (35%), 153 (30%), 123 (59%), 109 (52%), 87 (68%), 86 (22%), 57 (23%), 55 (17%).
EM de alta resolución FAB⁺ m / z, observado: 393.2651, estimado: 393.2641 (C₂₃H₃₆O₅), con un error de +2.5 ppm. Correspondiente a una fórmula mínima C₂₃H₃₆O₅, cuya masa molar es de 392.26 g / mol.

Tabla 13. Desplazamientos químicos correspondientes al espectro de RMN para los cuatro diastereoisómeros obtenidos de la reacción de electrooxidación del derivado protegido de la hispanolona (300 MHz, Acetona-D₆, TMS).

Posición	δ C	δ H (J Hz)
1 α ax	32.1 <i>t</i>	1.65, <i>tm</i> (15.2)
1 β ec	-	1.54, <i>dm</i> (9.9)
2 β ax	19.3 <i>t</i>	1.67, <i>tm</i> (12.5)
2 α ec	-	1.51, <i>dm</i> (10.0)
3 α ax	42.2 <i>t</i>	1.16, <i>tm</i> (14.0)
3 β ec	-	1.41, <i>dm</i> (12.3)
4	33.8 <i>s</i>	-
5	44.7 <i>d</i>	2.08, <i>dd</i> (3.8)
6 β ax	42.6 <i>t</i>	2.1-2.3, <i>m</i>
6 α ec	-	2.1-2.3, <i>m</i>
7	111.9 <i>s</i>	-
8	53.1 <i>d</i>	2.78, <i>m</i>
9	^a 78.3 <i>s</i> ^b 78.3 <i>s</i>	-
10	44.3 <i>s</i>	-
11	^a 32.1 <i>t</i> ^b 32.3 <i>t</i>	1.90, <i>m</i>
12	^a 24.0 <i>t</i> ^b 23.9 <i>t</i>	2.1-2.3, <i>m</i>
13	^a 147.3 <i>s</i> ^b 147.7 <i>s</i>	-
14	^a 124.1 <i>d</i> ^b 124.3 <i>d</i>	5.66, ancho*
15	^a 107.6 <i>d</i> ^b 109.1 <i>d</i>	5.47, <i>s</i> 5.73, <i>m</i>
16	^a 108.5 <i>d</i> ^b 109.7 <i>d</i>	5.41, <i>s</i> 5.68, <i>s</i> *
17	7.6 <i>q</i>	0.91-0.93, <i>d</i> (6.7)
18	33.6 <i>q</i>	0.85, <i>s</i>
19	22.2 <i>q</i>	0.87, <i>s</i>
20	16.2 <i>q</i>	0.96, <i>s</i>
CH ₃ O-	^a 53.4 <i>q</i> ^b 53.4 <i>q</i> ^b 53.8 <i>q</i> ^b 53.8 <i>q</i>	^a 3.283, <i>s</i> ^a 3.283, <i>s</i> ^b 3.248, <i>s</i> ^b 3.248, <i>s</i>
22	64.8 <i>t</i>	3.89-3.99, <i>m</i>
23	66.3 <i>t</i>	3.89-3.99, <i>m</i>

Todos los diastereoisómeros mostraron las mismas señales a excepción de a y b. *Señales traslapadas.

V.7 Síntesis del Derivado 4 de la Hispanolona a partir del Derivado 1



Se pesaron entre 25-100 mg (0.0747-.2989 mmol) del derivado 1 disueltos en 10- 40 mL de CH_3OH destilado y 0.5-2.0 mL de H_2O destilada. Se utilizó $p\text{-TsOH}\cdot\text{H}_2\text{O}$ en cantidad catalítica. La reacción se dejó a temperatura ambiente durante una semana en agitación constante. La reacción se monitoreó mediante cromatografía en capa fina (c.c.f.) Hexano/ AcOEt (6:10); cuando la materia prima se consumió, se evaporó el CH_3OH y se procedió a extraer el producto con una disolución saturada de Na_2CO_3 /éter dietílico. La fase orgánica fue secada con Na_2SO_4 anhidro y filtrada. El disolvente se evaporó al vacío en el rotaevaporador y la mezcla se redisolvió en acetona para posteriormente adsorberla sobre Celita y proceder a la purificación del producto (Derivado 4) a través de una columna cromatográfica flash en las siguientes condiciones:

Fase Estacionaria: Gel de Sílice malla 230-400

Fase Móvil: Hexano/ AcOEt en polaridades crecientes

Los eluatos correspondientes al producto se juntaron y se concentraron al vacío. El rendimiento de la reacción fue del 24.0-35.0%. El compuesto (derivado 4) se presenta en forma de cristales color amarillo con punto de fusión de 109-111°C y fue enviado a caracterizar por ^1H RMN, ^{13}C RMN a 200, 300 y 500 MHz, DEPT, FLOCK, COSY, NOESY (Tabla 14), HETCOR, IR y EM por Impacto electrónico y de Alta Resolución FAB^+ .

IR (Disolución en CHCl_3) $\nu\text{ cm}^{-1}$: 3611.2, 3444.3, 2935.4, 2873.2, 2844.4, 1754.6, 1720.6, 1706.9, 1670.3, 1657.3, 1600.0, 1463.6, 1450.7, 1391.1, 1348.5, 1272.0, 1001.6, 929.2.

EM por impacto electrónico m/z (abundancia relativa): M^+ 334 (3%), 210 (79%), 168 (31%), 139 (100%), 109 (64%), 67 (15%), 55 (16%), 41 (18%). EM de alta resolución FAB^+ m/z , observado: 335.2210, estimado: 335.2222 ($\text{C}_{20}\text{H}_{30}\text{O}_4$), con un error de

-3.6 ppm. Correspondiente a una fórmula mínima $C_{20}H_{30}O_4$, cuya masa molar es de 334.45 g/mol.

Tabla 14. Desplazamientos químicos correspondientes al espectro de RMN para el derivado α -butenólido de la hispanolona (500 MHz, $CDCl_3$, TMS)

Posición	δC	δH (J/Hz)	FLOCK (H→C)	COSY (H→H)	NOESY (H→H)
1 α_{ax}	31.91 <i>t</i>	1.63, <i>tm</i> (13.5)	C-1, 2	H-1 $_{\beta ec}$, 3 $_{\alpha ax}$	H-1 $_{\beta ec}$ *, 2 $_{\alpha ec}$, 3 $_{\alpha ax}$, 5 $_{\alpha ax}$
1 β_{ec}	-	1.55, <i>m</i>	C-1, 2	H-1 $_{\alpha ax}$, 3 $_{\alpha ax}$	H-1 $_{\alpha ax}$, 2 $_{\alpha ec}$, 2 $_{\beta ax}$ *, 11, 12, 20
2 β_{ax}	18.5 <i>t</i>	1.58, <i>m</i>	C-1, 2, 4	H-2 $_{\alpha ec}$, 3 $_{\beta ec}$, 3 $_{\alpha ax}$	H-1 $_{\beta ec}$ *, 2 $_{\alpha ec}$, 3 $_{\beta ec}$, 19, 20
2 α_{ec}	-	1.41, <i>m</i>	C-1, 2, 4	H-1 $_{\alpha ax}$, 3 $_{\alpha ax}$	H-1 $_{\alpha ax}$, 1 $_{\beta ec}$, 2 $_{\beta ax}$ *, 3 $_{\alpha ax}$, 3 $_{\beta ec}$
3 α_{ax}	41.3 <i>t</i>	1.19-1.26, <i>m</i>	C-1, 2, 4, 5, 18, 19	H-1 $_{\alpha ax}$, 2 $_{\beta ax}$, 2 $_{\alpha ec}$, 18, 19	H-2 $_{\alpha ec}$, 3 $_{\beta ec}$, 5 $_{\alpha ax}$, 18
3 β_{ec}	-	1.44-1.48, <i>m</i>	C-1, 2, 4, 5	H-1 $_{\alpha ax}$, 3 $_{\alpha ax}$, 18, 19, 20	H-2 $_{\alpha ec}$, 2 $_{\beta ax}$ *, 3 $_{\alpha ax}$, 19, 18
4	33.6 <i>s</i>	-	-	-	-
5	46.4 <i>d</i>	2.03, <i>dd</i> (13.5, 3.6)	C-7	H-6 $_{\beta ax}$, 6 $_{\alpha ec}$	H-3 $_{\alpha ax}$, 6 $_{\alpha ec}$, 18, OH
6 β_{ax}	39.2 <i>t</i>	2.29, <i>td</i> (13.5, 0.6)	C-5, 8, 10	H-5, 6 $_{\alpha ec}$, -OH	H-6 $_{\alpha ec}$, 8, 19, 20
6 α_{ec}	-	2.42, <i>dd</i> (13.5, 3.5)	C-5, 7, 8, 10	H-5, 6 $_{\beta ax}$, 11	H-5 $_{\alpha ax}$, 6 $_{\beta ax}$, 18
7	211.7 <i>s</i>	-	-	-	-
8	51.0 <i>d</i>	2.72, <i>q</i> (6.5)	-	H-17	H-6 $_{\beta ax}$, 11, 17, 20
9	81.4 <i>s</i>	-	-	-	-
10	43.4 <i>s</i>	-	-	-	-
11	31.97 <i>t</i>	1.83-1.98, <i>m</i>	C-12	H-12	H-1 $_{\beta ec}$, 8, 14, 17, 20, OH
12	22.0 <i>t</i>	2.36-2.48, <i>m</i>	C-11	H-11	H-8, 11, 14, 17
13	134.4 <i>s</i>	-	-	-	-
14	144.3 <i>d</i>	7.15, <i>q</i> (1.5)	C-15, 16	H-15	H-11, 12, 15, 17
15	70.2 <i>t</i>	4.79, <i>q</i> (2)	C-13, 14	H-12, 14	H-14
16	174.4 <i>s</i>	-	-	-	-
17	8.3 <i>q</i>	1.11, <i>d</i> (6.5)	C-8, 9	H-8, 18	H-8, 11, 12, 14, OH
18	33.0 <i>q</i>	0.88, <i>s</i>	C-3, 4, 5, 18, 19	H-3 $_{\beta ec}$, 17, 20	H-3 $_{\alpha ax}$, 3 $_{\beta ec}$, 5 $_{\alpha ax}$, 6 $_{\alpha ec}$, 19
19	21.3 <i>q</i>	0.90, <i>s</i>	C-3, 4, 5, 18, 19	H-2 $_{\alpha ec}$, 3 $_{\beta ec}$, 17, 20	H-3 $_{\beta ec}$, 6 $_{\beta ax}$, 18, 20
20	16.2 <i>q</i>	1.17, <i>s</i>	C-1, 5, 9, 10, 11	H-1 $_{\beta ec}$, 1 $_{\alpha ax}$, 2 $_{\beta ax}$, 2 $_{\alpha ec}$, 8, 18, 19	H-2 $_{\beta ax}$, 6 $_{\beta ax}$, 8, 11, 12, 19
OH		2.10, <i>s</i> ancho		H-6 $_{\beta ax}$	H-5 $_{\alpha ax}$, 11, 17

*Señales traslapadas.

V.8 Animales

Se utilizaron ratones hembra de la cepa Swiss-Taconi, de peso 25-30 g donados por el CINVESTAV Unidad Sur I.P.N., y se siguieron las guías del Comité de Uso y Cuidado de Animales (No. NOM-06ZZ00 1999). Todos los animales fueron sometidos a las mismas condiciones estándar: T = 25 ± 1 °C, 12/12 h de luz-oscuridad, alimento y agua *ad libitum*.

Los experimentos fueron llevados a cabo utilizando 4-8 animales por grupo.

V.9 Actividad antiinflamatoria en el edema inducido con TPA en la oreja de ratón¹⁸

- Se pesaron todos los animales y fueron separados en grupos de 4 a 8: un grupo control y varios grupos tratados.
- Cada grupo fue anestesiado con pentobarbital sódico a una dosis de 31.5 mg/kg por vía intraperitoneal.
- A los grupos control y tratados se les aplicó tópicamente 10 µL de una solución etanólica de TPA (250 µg / mL) en la oreja derecha, y 10 µL de etanol en la oreja izquierda.
- 10 min después de la aplicación de TPA, a los grupos tratados se les aplicó 20 µL de los compuestos de prueba en ambas caras de la oreja derecha a las dosis de 0.316, 1.0 y 3.16 µmol/oreja disueltos en acetona, y en la oreja izquierda sólo se aplicaron 20 µL de acetona. Al grupo control se le aplicaron 20 µL de acetona en cada oreja.
- Se dejaron 4h de post-aplicación y eventualmente cada grupo de animales fue sacrificado por dislocación cervical tomando biopsias de cada oreja con un sacabocado de 7 mm de diámetro. Cada una de las orejas control y tratadas fueron depositadas en tubos Eppendorff previamente pesados.
- Se obtuvieron las diferencias de peso entre la oreja control y la tratada de cada animal. El porcentaje de inhibición fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - [(\bar{x}_{\text{tratado}} / \bar{x}_{\text{control}}) 100]$$

- La indometacina y dexametasona se tomaron como estándares de la prueba a las dosis de: 0.13, 0.42 y 1.3 µmol/oreja para la indometacina; 0.00316, 0.0316 y 0.316 µmol/oreja para el caso de la dexametasona; ambos antiinflamatorios fueron disueltos en etanol y tuvieron su propio grupo control. Para la dexametasona, ésta fue colocada 4 h antes de la aplicación del TPA y se dejó actuar por 4h de post-aplicación. Se probó la aminoguanidina a las dosis de 0.316, 1.0 y 3.16 µmol/oreja y se siguió el mismo protocolo de la indometacina.
- Los resultados de la actividad antiinflamatoria se representaron como: el porcentaje de inhibición \pm Error Estándar de la Media (%Inh. \pm ESM).

- Los datos fueron analizados estadísticamente con la pruebas t de “Student” o ANOVA-Dunnett. Todos los valores $p < 0.05$ se tomaron como significativos.

V.10 Actividad antiinflamatoria en el edema inducido por EPP en la oreja de ratón^{18,27}

- Se pesaron todos los animales y fueron separados en grupos de 4 a 8: un grupo control y varios grupos tratados.
- Cada grupo fue anestesiado con pentobarbital sódico a una dosis de 31.5 mg/kg por vía intraperitoneal.
- Al grupo control se le aplicó tópicamente 20 μ L de acetona en ambas orejas y a los grupos tratados se les aplicó 20 μ L de los compuestos de prueba a la dosis de 1.0 μ mol/oreja disuelto en acetona. El derivado 3 fue aplicado a las dosis de 0.1, 0.316 y 1.0 μ mol/oreja disuelto en el mismo disolvente; en la oreja izquierda sólo se aplicaron 20 μ L de acetona en el caso de todos los grupos.
- Se dejaron 4 h de post-tratamiento y terminado este tiempo se aplicó a cada grupo 20 μ L de una solución al 5% el agente irritante (EPP) disuelto en acetona en la oreja derecha, mientras que la oreja izquierda recibió sólo 20 μ L de acetona.
- Se dejaron 4 h de post-aplicación, después de este tiempo cada grupo de animales fue sacrificado por dislocación cervical y se tomaron biopsias de cada oreja con un sacabocado de 7 mm de diámetro. Cada una de las orejas control y tratadas fueron depositadas en tubos Eppendorff previamente pesados.
- Se obtuvieron las diferencias de peso entre la oreja control y la tratada de cada animal. El porcentaje de inhibición fue calculado con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ Inhibición} = 100 - \left[\left(\frac{\bar{x}_{\text{tratado}}}{\bar{x}_{\text{control}}} \right) 100 \right]$$

- La dexametasona se tomó como estándar de la prueba a las dosis de: 0.01, 0.0316, 0.1 y 0.316 μ mol/oreja disuelta en etanol. El porcentaje de inhibición del edema se determinó con su propio grupo control.
- Los resultados de la actividad antiinflamatoria se representaron como: el porcentaje de inhibición \pm Error Estándar de la Media (%Inh. \pm ESM).

- Los datos fueron analizados estadísticamente con la pruebas t de “Student” o ANOVA-Dunnett. Todos los valores $p < 0.05$ se tomaron como significativos.

V.11 Actividad inhibitoria de la producción de NO dependiente de iNOS y ensayo de Viabilidad en macrófagos murinos

- Se obtuvieron M ϕ primarios de ratones hembra de la cepa Swiss-Taconi que fueron previamente pre-tratados con 1 mL de medio tioglicolato al 3% por administración intraperitoneal.
- Después de 3 días se extrajo Exudado Peritoneal (EP) inyectando medio DMEN a través de la pared abdominal anterior. El EP se centrifugó a 3000 rpm durante 3 min para obtener el botón de células; éstas fueron lavadas en 2 ó 3 ocasiones con medio DMEN. Se contaron las células y se ajustó la densidad del inóculo a 1.0×10^6 células / mL depositando éstas en placas de 24 pozos. Se dejaron incubadas por 2h a 37°C en una incubadora con CO₂/O₂ (5%/95%).
- Se desechó el sobrenadante y las células se lavaron con solución buffer de fosfatos (PBS). Se agregaron a algunos pozos 1 mL de medio y a otros se les agregó 0.5 mL de medio con LPS y 0.5 mL de medio con diferentes concentraciones del compuesto de prueba, además se agregaron 60 U / mL de SOD. La concentración final del LPS fue de 10 μ g / mL y la de los compuestos de estudio estuvieron en el rango de 10 a 100 μ M.
- Se dejaron incubar por 24 h a 37 °C.
- Se tomaron 100 μ L del sobrenadante y se adicionaron 100 μ L del reactivo de Griess (1% de Sulfanilamida, 0.1% de Naftiletilendiamina y 5% de H₃PO₄) en cada pozo. Las placas se agitaron durante 10 min a temperatura ambiente.
- Después de la formación del cromóforo, la absorbancia fue determinada a 515 nm en un lector de ELISA. La curva de calibración (Absorbancia vs. Concentración) fue determinada con un estándar de NaNO₂.
- Todos los experimentos se repitieron 3 veces en ensayos independientes. La producción de nitritos por los compuestos de prueba respecto al grupo control fue calculada con la siguiente ecuación:

$$\% [\text{NO}_2^-] = 100 - [(A/B) 100]$$

A = Es la producción de nitritos por LPS y el compuesto de prueba.

B = Es la producción de nitritos estimulados con LPS

- La aminoguanidina se utilizó como estándar en este ensayo. La dexametasona fue probada a las concentraciones de 0.01, 0.1 y 1.0 μM y la Indometacina a 10, 31 y 100 μM .
- Posteriormente las placas fueron lavadas con el mismo medio y se realizó el ensayo de citotoxicidad por el método de MTT.
- Se adicionaron 50 μL de una solución de MTT para alcanzar una concentración final de 5 mg / mL en PBS en un volumen final de 500 μL en cada pozo, y la placa se incubó a 37°C por 4 h.
- La determinación de la viabilidad celular se determinó por la reducción de MTT a Formazán que fue disuelto con 100 μL de DMSO. La absorbancia del Formazan fue leída a 570 nm.
- Los resultados fueron expresados en lecturas de absorbancia absoluta y un decremento de esta, indica reducción en la viabilidad celular.
- Los datos fueron reportados como porcentaje de viabilidad celular.
- Los resultados de la actividad inhibitoria de la producción de nitritos fueron representados como: el porcentaje de inhibición \pm Error Estándar de la Media (%Inh. \pm ESM). Se aplicó la prueba ANOVA-Tukey para determinar el grado de significancia y se tomaron aquellos datos con valores de $p < 0.05$ como significativos.

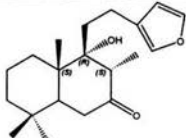
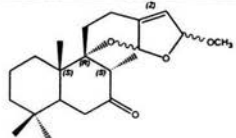
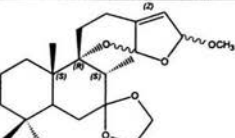
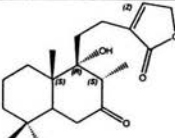

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

VI.1 Caracterización de los derivados semisintéticos de la Hispanolona

VI.1.a Espectrofotometría Infrarroja

Los cambios que sufrieron las bandas en los espectros de infrarrojo de los derivados semisintéticos con respecto a la Hispanolona³ fueron sustanciales, sobre todo en las bandas correspondientes a los grupos -OH, -CO-, y el anillo de furano, y cambios menos cuantitativos en los sistemas -CH₃ y -CH₂- (Tabla 15).

Tabla 15. Caracterización de los derivados semisintéticos de la Hispanolona por Espectrofotometría Infrarroja.

Nombre	<i>Hispanolona</i> ³	<i>Derivado 1</i> ¹¹	<i>Derivado 3</i>	<i>Derivado 4</i>
Estructura				
	ν (cm ⁻¹)	ν (cm ⁻¹)	ν (cm ⁻¹)	ν (cm ⁻¹)
-OH	3602	-----	-----	3611.2, 3444.3
-CH ₃ ,	2935	2987, 2939	2954.7	2935.4, 2873.2
-CH ₂ -				
-CO-	1705	1694	-----	1754.6 (de lactona), 1720.6 (ciclo-6-cetona)
C-CH ₃	1388	1371	1372.5	1391.1
-OH	1388	-----	-----	1348.5
-C-O-C-O-	-----	1194, 1165, 1102, 1030	1193.9, 1143.1, 1103.9, 1054.2, 1031.9	-----
-CH ₂ - de ciclo	1024	1030	1031.9	1001.6
	873	846	841.7	929.2
Espectro	-----	-----	3	7

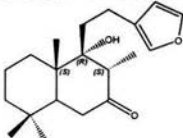
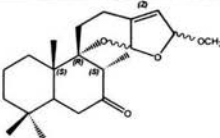
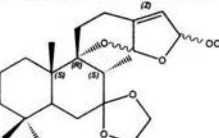
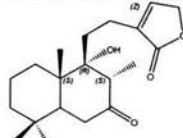
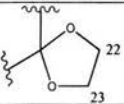
En esta tabla se puede apreciar que las bandas correspondientes al grupo -OH desaparecen para el caso de los derivados 1 y 3, que son precisamente aquellos que sufrieron la electrooxidación entre el grupo -OH y el anillo de furano. En el caso del sistema de enlace del tipo -C-O-C-O- la Hispanolona y el derivado 4 no lo poseen y los derivados 1 y 3 presentan este conjunto de bandas que representan un diacetal que es producto de la electrooxidación. En cuanto al grupo furano la diferencia no es significativa entre la Hispanolona, 1 y 3, pero en el caso de 4 hay un aumento del número de onda de casi 50

unidades con respecto a la Hispanolona; esto es debido a que el **4** posee en la posición C-16 un grupo cetona, formando una lactona. Con respecto a las vibraciones correspondientes a los grupos $-CH_3$ y $-CH_2-$ no sufren modificaciones importantes en el espectro.

VI.1.b Resonancia Magnética Nuclear de 1H

En este análisis de RMN, existen diferencias bien definidas entre las moléculas analizadas y estas radican en algunas desapariciones de señales en posiciones estratégicas durante las reacciones, así como nuevas señales y cambios en los desplazamientos químicos (δ) con respecto al espectro de la Hispanolona³ (Tabla 16).

Tabla 16. Caracterización de los derivados semisintéticos de la Hispanolona por 1H RMN a 500 MHz.

Nombre	Hispanolona ³	Derivado 1	Derivado 3	Derivado 4
Estructura				
Posición	δH (JHz)	δH (JHz)	δH (JHz)	δH (JHz)
$6_{\beta ax}$	NR	2.33, <i>t</i> (14.7)	2.1-2.3, <i>m</i>	2.29, <i>td</i> (13.5, 0.6)
$6_{\alpha ec}$	NR	2.22, <i>dd</i> (14.3)	2.1-2.3, <i>m</i>	2.42, <i>dd</i> (13.5, 3.5)
7	-----	-----	-----	-----
8	2.72	2.79, <i>m</i>	2.78, <i>m</i>	2.72, <i>q</i> (6.5)
9	-----	-----	-----	-----
10	-----	-----	-----	-----
11	NR	1.91, <i>m</i>	1.90, <i>m</i>	1.83-1.98, <i>m</i>
12	2.27-2.59	2.1-2.3, <i>m</i>	2.1-2.3, <i>m</i>	2.36-2.48, <i>m</i>
13	-----	-----	-----	-----
14	6.22	^a y ^b 5.68, ancho	5.66, ancho	7.15, <i>q</i> (1.5)
15	7.18	^a 5.47, <i>s</i> ^b 5.75, <i>m</i>	^a 5.47, <i>s</i> ^b 5.73, <i>m</i>	4.79, <i>q</i> (2.0)
16	7.30	^a 5.41, <i>s</i> ^b 5.68, <i>s</i>	^a 5.41, <i>s</i> ^b 5.68, <i>s</i>	-----
17	1.11 (6.5)	1.01, <i>dd</i> (7.1)	0.91-0.93, <i>d</i> (6.7)	1.11, <i>d</i> (6.5)
-OH	2.10, <i>s</i> ancho	-----	-----	2.10, <i>s</i> ancho
-OCH3	-----	^a 3.271, <i>s</i> ^a 3.276, <i>s</i> ^b 3.242, <i>s</i> ^b 3.245, <i>s</i>	^a 3.283, <i>s</i> ^a 3.283, <i>s</i> ^b 3.248, <i>s</i> ^b 3.248, <i>s</i>	-----
	-----	-----	²² 3.89-3.99, <i>m</i> ²³ 3.89-3.99, <i>m</i>	-----
Espectro	-----	1	4	8

NR = No reportado. a y b = correspondiente a las señales de los 4 diastereoisómeros formados.

En este análisis se observa que los protones de los derivados de la Hispanolona en las posiciones $\delta_{\beta_{ax}}$, $\delta_{\alpha_{ec}}$, 8, 11 y 12 no sufren un desplazamiento químico significativo con respecto al producto natural. En la posición 14 los derivados **1** y **3** presentan un desplazamiento negativo con respecto a la Hispanolona, ya que el anillo de furano ha cambiado su conformación electrónica de aromática a no aromática, mientras que el derivado **4** aumenta el desplazamiento químico en la misma posición porque en la posición 16 existe un grupo más electronegativo correspondiente a un carbonilo. Con respecto a los protones de las posiciones 15 y 16 los derivados **1** y **3** muestran un decremento del desplazamiento químico con respecto al producto padre, además aparecen las señales correspondientes a los diastereoisómeros formados durante la electrooxidación entre el 9-OH y 16; el derivado **4** en la posición 14 sufre un aumento del desplazamiento químico y una disminución del mismo en los protones de la posición 15; estos cambios se deben al efecto electronegativo del átomo oxígeno del carbonilo de la posición 16. En los protones del grupo $-\text{CH}_3$ de la posición 17, no sufren cambios significativos, salvo una ligera disminución de δ para el derivado **3**. Una prueba contundente de la reacción de electrooxidación de la Hispanolona es precisamente la desaparición del singulete correspondiente al grupo $-\text{OH}$ de la posición 9 en los casos de los derivados **1** y **3**. La hispanolona y el derivado **4** sí poseen dicha señal. Los derivados **1** y **3** muestran también singuletes típicos del grupo $-\text{OCH}_3$ de sus isómeros estructurales en la posición 15 a diferencia de la hispanolona y el derivado **4**. Finalmente el derivado **3** muestra el sistema de protones del ciclo 1, 3 dioxolano de la posición 7. Las señales correspondientes a las posiciones 1 al 5 no muestran diferencias sustanciales.

Los espectros de COSY(11), NOESY(12), FLOCK(13) y HETCOR(14) del derivado **4** se pueden consultar la sección de espectros de este trabajo.

VI.1.c Resonancia Magnética Nuclear de ^{13}C

El análisis de ^{13}C nos muestra los cambios que sufren los átomos de carbono dentro de la estructura de los derivados que fueron modificados molecularmente a partir de la hispanolona, los cambios observados son específicamente del desplazamiento químico (Tabla 17).

En el caso del C6 el derivado **3** sufre un ligero aumento del desplazamiento químico debido a la protección del carbonilo en el C7, pero existe una diferencia grande en él, debido a que el carbonilo desplaza alrededor de 210 ppm para el caso de los derivados **1** y **4**, mientras

que la protección en el derivado **3** se ve dramáticamente reducido a 112 ppm ya que el grupo 1, 3 dioxolano ejerce menor atracción electrónica que el átomo de oxígeno del grupo cetónico. Los carbonos C8, C9, C10, C11 y C12 no sufren diferencias entre los compuestos. El C13 para **4** se ve disminuido en 10 ppm con respecto a **1** y **3** ya que el diacetal formado durante la electrooxidación desplaza un poco más que la lactona que presenta **4** en el anillo de furano. En el caso de C14 el derivado **4** desplaza alrededor de 20 ppm positivamente con respecto a **1** y **3** ya que el efecto del carbonilo de C16 afecta al anillo, sin embargo, en C15 los derivados **1** y **3** presentan un desplazamiento mayor que el derivado **4**, ya que en este último el carbono está totalmente reducido con dos protones presentando un triplete y en los otros poseen un grupo $-OCH_3$ presentando un doblete. En la posición C16 evidentemente **4** está mucho más desplazado que **1** y **3** ya que en esa posición se encuentra el grupo carbonilo. El C17 se ve ligeramente afectado negativamente en el derivado **3** por la protección del carbonilo en C7. Los grupos $-CH_3$ en C18, C19 y C20 no resultan afectados.

Sólo en los derivados **1** y **3** aparecen las señales de los carbonos correspondientes a los $-OCH_3$ en la posición C15, y en el derivado **3** aparecen las señales C22 y C23 del grupo 1, 3-dioxolano. Existen señales pareadas en posiciones C11, C12, C13, C14, C15 y C16 que corresponden a los diastereoisómeros formados durante la reacción de electrooxidación de la hispanolona. Los carbonos de C1-C5 no sufren modificaciones.

Tabla 17. Caracterización de los derivados semisintéticos de la Hispanolona por ^{13}C RMN a 500 MHz.

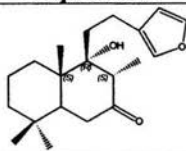
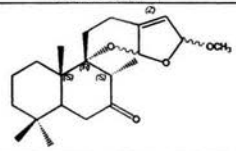
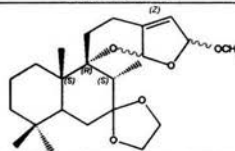
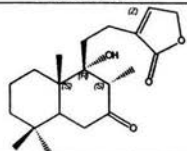
Nombre	Hispanolona	Derivado 1	Derivado 3	Derivado 4
Posición	δ C	δ C	δ C	δ C
6	NR	39.6, <i>t</i>	42.6, <i>t</i>	39.2, <i>t</i>
7	NR	210.5, <i>s</i>	111.9, <i>s</i>	211.7, <i>s</i>
8	NR	51.0, <i>d</i>	53.1, <i>d</i>	51.0, <i>d</i>
9	NR	^a 81.84, <i>s</i> ^b 81.72, <i>s</i>	^a 78.3, <i>s</i> ^b 78.3, <i>s</i>	81.4, <i>s</i>
10	NR	44.1, <i>s</i>	44.3, <i>s</i>	43.4, <i>s</i>
11	NR	^a 32.69, <i>t</i> ^b 32.93, <i>t</i>	^a 32.1, <i>t</i> ^b 32.3, <i>t</i>	31.97, <i>t</i>
12	NR	^a 24.07, <i>t</i> ^b 23.92, <i>t</i>	^a 24.0, <i>t</i> ^b 23.9, <i>t</i>	22.0, <i>t</i>
13	NR	^a 146.40, <i>s</i> ^b 146.83, <i>s</i>	^a 147.3, <i>s</i> ^b 147.7, <i>s</i>	134.4, <i>s</i>
14	NR	^a 124.41, <i>d</i> ^b 124.72, <i>d</i>	^a 124.1, <i>d</i> ^b 124.3, <i>d</i>	144.3, <i>d</i>
15	NR	^a 107.52, <i>d</i> ^b 109.00, <i>d</i>	^a 107.6, <i>d</i> ^b 109.1, <i>d</i>	70.2, <i>t</i>
16	NR	^a 108.38, <i>d</i> ^b 109.58, <i>d</i>	^a 108.5, <i>d</i> ^b 109.7, <i>d</i>	174.4, <i>s</i>
17	NR	8.51, <i>q</i>	7.6, <i>q</i>	8.3, <i>q</i>
18	NR	33.52, <i>q</i>	33.6, <i>q</i>	33.0, <i>q</i>
19	NR	21.68, <i>q</i>	22.2, <i>q</i>	21.3, <i>q</i>
20	NR	16.78, <i>q</i>	16.2, <i>q</i>	16.2, <i>q</i>
-OCH ₃	-----	^a 53.45, <i>q</i> ^a 53.73, <i>q</i> ^b 53.20, <i>q</i> ^b 53.36, <i>q</i>	^a 53.4, <i>q</i> ^a 53.4, <i>q</i> ^b 53.8, <i>q</i> ^b 53.8, <i>q</i>	-----
22	-----	-----	64.8, <i>t</i>	-----
23	-----	-----	66.3, <i>t</i>	-----
Espectro	-----	2	5	9

NR = No reportado en la publicación original. a y b = correspondiente a las señales de los 4 diastereoisómeros formados.

VI.1.d Espectrometría de Masas

Las moléculas fueron enviadas a espectrometría de masas para determinar la masa molar de cada compuesto y que su fórmula mínima correspondiera con la relación m/z del ión molecular así como las fracciones más importantes de cada compuesto (Tabla 18).

Tabla 18. Caracterización de los derivados semisintéticos de la Hispanolona por Espectrometría de Masas por impacto electrónico.

Nombre	<i>Hispanolona</i> ³	<i>Derivado 1</i> ¹¹	<i>Derivado 3</i>	<i>Derivado 4</i>
Estructura				
Fórmula Mínima	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	C ₂₁ H ₃₂ O ₄	C ₂₃ H ₃₆ O ₅	C ₂₀ H ₃₀ O ₄
Masa Molar Teórica (g/mol)	318.45	348.48	392.53	334.45
M ⁺ FAB ⁺	-----	349.2368	393.2651	335.2210
M ⁺	318	348	392	334
Espectro	-----	-----	6	10

En este caso se pudo constatar que las moléculas sintetizadas sí corresponden a la masa molar teórica, aunque la abundancia relativa del ión molecular no es muy alta con respecto a las demás fracciones.

En resumen, los derivados semisintéticos de la hispanolona fueron realizados bajo un esquema cronológico previamente diseñado como lo muestra la Figura 27.

Los rendimientos de los compuestos y sus puntos de fusión fueron determinados con el fin de proporcionar una mejor caracterización (Tabla 19).

Tabla 19. Resultados de los rendimientos y puntos de fusión de los derivados semisintéticos de la Hispanolona.

Nombre	<i>Hispanolona</i> ³	<i>Derivado 1</i> ¹¹	<i>Derivado 3</i>	<i>Derivado 4</i>
Estructura				
Rendimiento (%)	Producto Padre	25-33	93.3	24-35
Punto de Fusión (°C)	125-128	91-95	Aceite	109-111

El rendimiento de la reacción del derivado 1 es casi de 100%¹¹ cuando es determinado por c.c.f. durante la reacción de electrooxidación, pero este baja cuando es purificado en la columna cromatográfica. En el caso del derivado 4 el rendimiento es bajo ya que durante la reacción de hidrólisis se forman otros productos además del α -butenólido. En cuanto a los puntos de fusión estos van disminuyendo con respecto a la hispanolona al formar el ciclo C correspondiente al derivado 1; el derivado 3 es un aceite ya que el ciclo C se ha formado y además se protegió al grupo carbonilo en C7 con etilénglicol. El derivado 4 sólo presenta una ligera disminución del punto de fusión ya que en esta no existe el ciclo C.

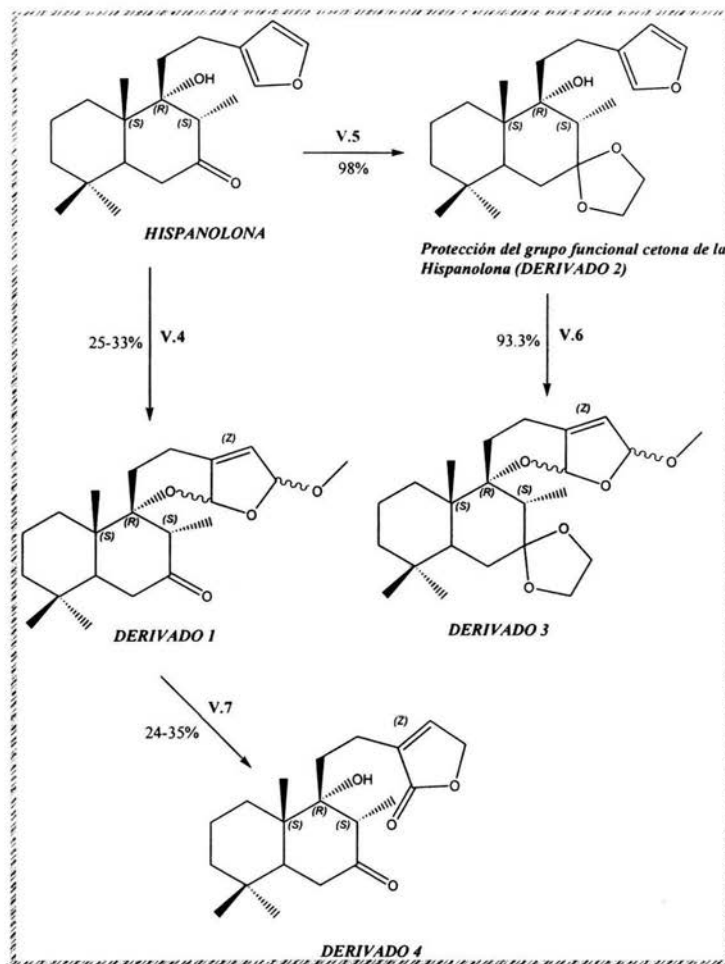


Figura 27. Diagrama general de la síntesis de los derivados semisintéticos de la Hispanolona.

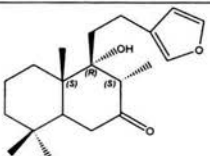
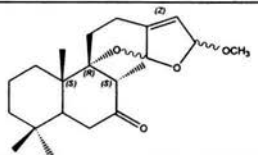
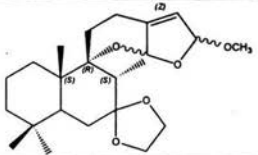
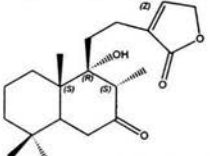
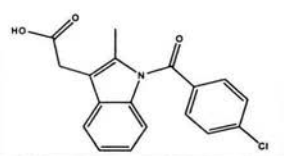
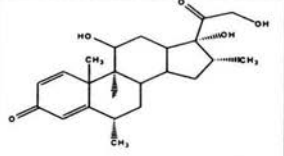
VI.2 Actividad antiinflamatoria en el edema inducido con 13-acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (TPA) en la oreja de ratón

Los resultados de este ensayo muestran que la Hispanolona y sus derivados poseen actividad antiinflamatoria dependiente de la concentración (Tabla 20, Gráfica 1). La Hispanolona es la molécula que posee mayor actividad con respecto a sus derivados, pero aproximadamente 3 veces menor con respecto a los estándares Indometacina y Dexametasona.

Resulta interesante observar que la mayor inhibición del edema la presenta el producto natural, y cuando este es modificado electroquímicamente para formar una estructura espiro-tetracíclica (D1) la actividad decae aproximadamente en un 30%. En cuanto al derivado cerrado y protegido (D3) su actividad decrece casi el 50% con respecto a la hispanolona; es decir, al sustituir el carbonilo de la posición 7 por el heterociclo 1,3-dioxolano se reduce significativamente la antiinflamación. Cabe mencionar que el carbonilo no es tan importante en la acción antiinflamatoria ya que el D1 es ligeramente más activo que el D3.

El derivado α -butenólido (D4) muestra la actividad más baja de todos los derivados, ya que esta molécula no posee el espirociclo ni la protección del carbonilo en la posición 7; entonces es probable que la actividad antiinflamatoria en este modelo provenga del anillo de furano en su forma aromática, ya que al cerrarlo con un nuevo anillo pierde actividad, y modificaciones en el anillo sin cerrarlo también muestra una baja inhibición del edema. Es importante mencionar que el grupo -OH de la posición 9 y el carbonilo de la posición 7 participan claramente en la potenciación de la actividad antiinflamatoria.

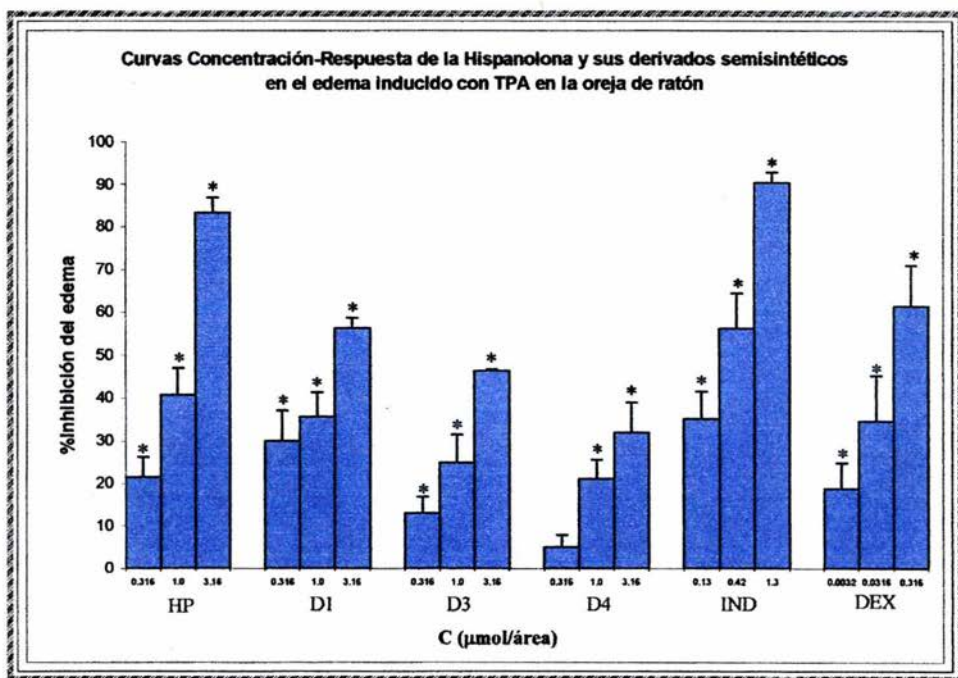
Tabla 20. Relación de Concentración-Respuesta de la Hispanolona y sus derivados semisintéticos en el edema inducido con TPA en la oreja de ratón.

Compuesto	Nombre	C ($\mu\text{mol} / \text{área}$)	% Inhibición \pm ESM
HISPANOLONA Y SUS DERIVADOS			
	Hispanolona (HP)	0.316	21.44 \pm 4.8 *
		1.000	40.76 \pm 6.3 *
		3.160	83.26 \pm 3.6 *
	Derivado 1 (D1)	0.316	29.89 \pm 7.2 *
		1.000	35.65 \pm 5.7 *
		3.160	56.35 \pm 2.4 *
	Derivado 3 (D3)	0.316	12.87 \pm 4.1 *
		1.000	24.88 \pm 6.7 *
		3.160	46.39 \pm 0.4 *
	Derivado 4 (D4)	0.316	5.10 \pm 2.8
		1.000	21.09 \pm 4.6 *
		3.160	31.96 \pm 7.0 *
ESTÁNDARES			
	Indometacina (IND)	0.130	35.15 \pm 6.4 *
		0.420	56.29 \pm 8.2 *
		1.300	90.35 \pm 2.6 *
	Dexametasona (DEX)	0.00316	18.87 \pm 6.0 *
		0.03160	34.67 \pm 10.6 *
		0.31600	61.46 \pm 9.6 *

Los datos reportados como %Inhibición \pm ESM. * $p < 0.05$

Área = 7 mm²

% Inhibición de Aminoguanidina: (0.316 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$: 8.28 \pm 2.0*); (1.0 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$: 15.66 \pm 2.1*); (3.16 $\mu\text{mol}/\text{oreja}$: 26.80 \pm 3.2*).



Gráfica 1. Curvas Concentración-Respuesta de la Hispanolona y sus derivados semisintéticos en el edema inducido con TPA en la oreja de ratón. *Datos significativos como %Inhibición ± ESM con $p < 0.05$ probados con t "Student" o ANOVA-Dunnnett. Área = 7 mm²

VL3 Actividad antiinflamatoria en el edema inducido con Etilfenilpropiolato (EPP) en la oreja de ratón

Este ensayo se ha propuesto para hacer una discriminación gruesa entre los antiinflamatorios no esteroideos y esteroideos.²⁷ La hispanolona y sus derivados semisintéticos fueron sometidos a este ensayo y mostraron resultados muy interesantes como el caso del D3, que fue el único compuesto que con actividad antiinflamatoria con aparente dependencia a la concentración (Tabla 21, Gráfica 2).

La Hispanolona y el D4 fueron totalmente inactivos, el D1 tuvo el efecto contrario, es decir, promovió la inflamación.

En cuanto al análisis estructura-respuesta se puede observar con claridad que la ausencia del espirociclo en la Hispanolona y D4 es el responsable de la carencia de la actividad antiinflamatoria, mientras que en el caso del D1 con el anillo C formado, muestra una actividad pro-inflamatoria a diferencia del D3 que fue el único con actividad antiinflamatoria. Se puede sugerir que la actividad de estos dos compuestos guarda una

relación parecida a un glucocorticoide. El D1 posee un grupo más polar en la posición 7 correspondiente a un carbonilo haciendo que la actividad sea pro-inflamatoria, mientras que en el D3 con un grupo menos polar (1, 3-dioxolano) hace que la actividad cambie totalmente con respecto al D1.

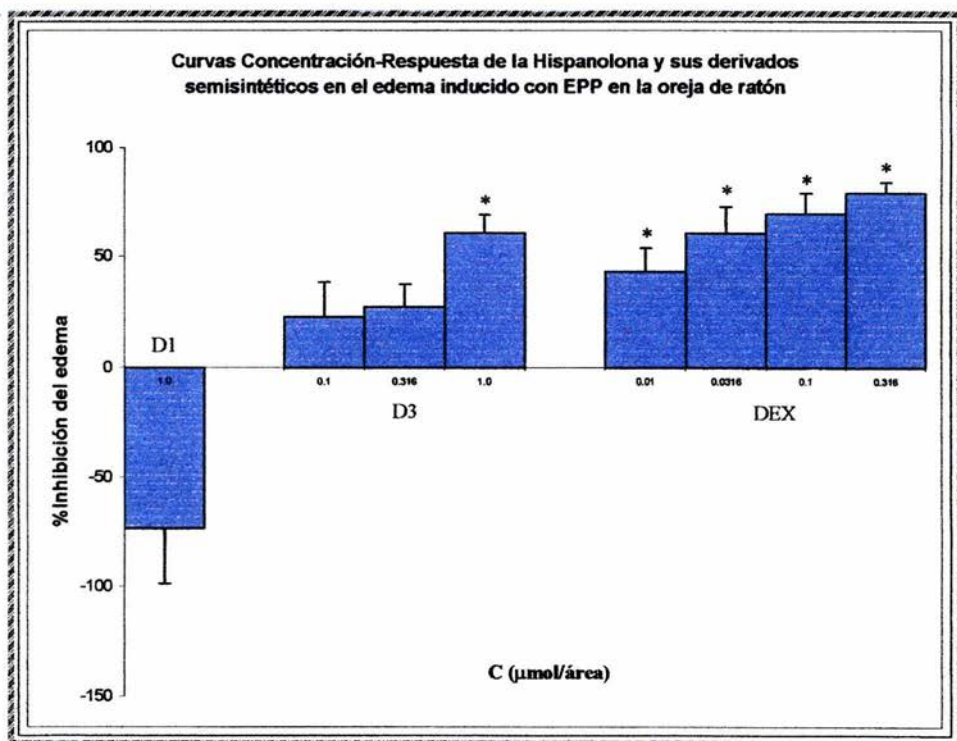
La actividad de D3 es mucho más baja que la dexametasona ya que este estándar posee los 4 anillos estereoquímicamente correctos para que haya una gran afinidad con el receptor, además de los grupos funcionales que potencian la actividad que son el átomo de flúor en la posición 9 y un átomo de oxígeno en la posición 11¹³. El D3 no posee todas estas condiciones, aunque tiene cierto parecido a un glucocorticoide, por ejemplo: el anillo A y B son *sillas* unidas *cara-cara* al igual que algunos glucocorticoides (en el caso de la dexametasona el anillo A es plano); el anillo C es un anillo de seis miembros en forma de *bote* torcido, y en el glucocorticoide este es un anillo de ciclohexano en forma de *silla* unido *cara-cara* en C8-C9. En cuanto al anillo de 5 miembros también existen algunas similitudes: en el D3 es un heterociclo de furano con doble enlace en C13-C14 unido a un grupo -OCH₃ en la posición 15 y en el glucocorticoide es un ciclopentano saturado con un grupo -CH₃ en la posición 15. Con lo que respecta a los grupos que potencian la actividad el D3 tiene un átomo de oxígeno en la posición 9 un poco menos electronegativo que un átomo de flúor pero suficientemente electronegativo, mientras que en la posición 11 el D3 no posee ningún átomo de oxígeno a diferencia de los glucocorticoides.

Los resultados demostraron que el D3 fue uno de los compuestos menos activos en el modelo del edema inducido con TPA y el único con actividad en el edema inducido con EPP, lo que sugiere que éste compuesto pudiera tener un mecanismo de acción diferente a la hispanolona.

Tabla 21. Curvas Concentración-Respuesta de la Hispanolona y sus derivados semisintéticos en el edema inducido con EPP en la oreja de ratón.

Compuesto	Nombre	C (μmol / área)	% Inhibición ± ESM
HISPANOLONA Y SUS DERIVADOS			
	Hispanolona (HP)	1.000	Sin Actividad
	Derivado 1 (D1)	1.000	+73.19 ± 25.5
	Derivado 3 (D3)	0.100	22.70 ± 15.8
		0.316	27.11 ± 10.3
		1.000	60.62 ± 8.31 *
	Derivado 4 (D4)	1.000	Sin Actividad
ESTÁNDAR			
	Dexametasona (DEX)	0.01000	43.20 ± 10.8 *
		0.03160	60.70 ± 12.1 *
		0.10000	69.40 ± 10.0 *
		0.31600	79.38 ± 4.9 *

Los datos reportados como %Inhibición ± ESM. * $p < 0.05$
 Área = 7 mm²



Gráfica 2. Curvas Concentración-Respuesta de la Hispanolona y sus derivados semisintéticos en el edema inducido con EPP en la oreja de ratón. *Datos significativos como %Inhibición \pm ESM con $p < 0.05$ probados con *t* "Student" o ANOVA-Dunnnett. Área = 7 mm²

V1.4 Actividad inhibitoria de la producción de NO dependiente de iNOS y ensayo de Viabilidad en macrófagos murinos

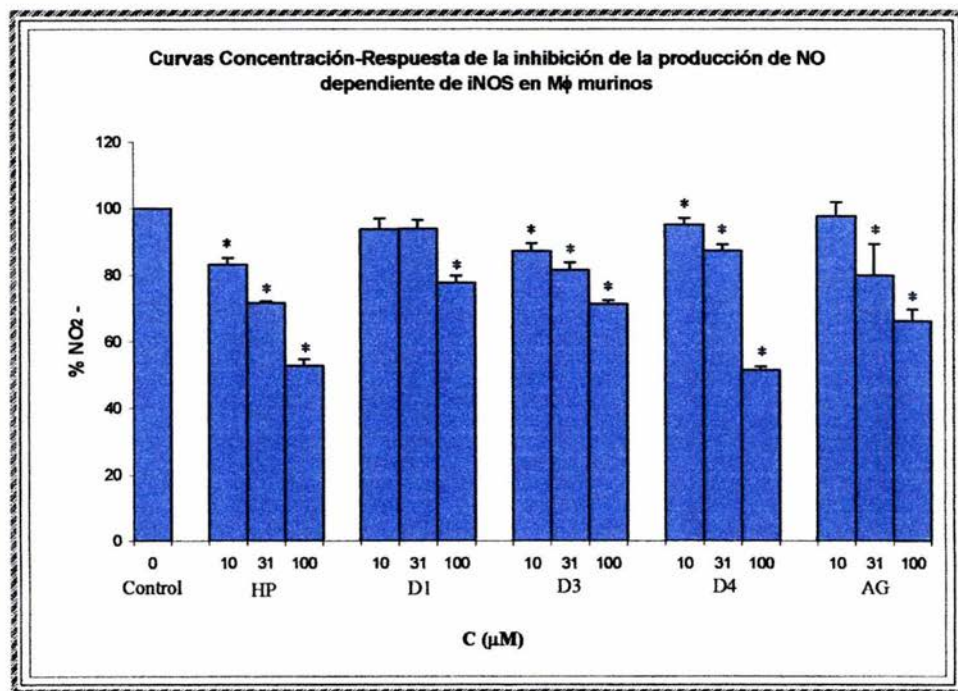
En este experimento se midió la capacidad de los compuestos de inhibir la producción de nitritos derivados del óxido nítrico vía iNOS y los resultados fueron interesantes desde el punto de vista químico-estructural-biológico con respecto al estándar, los cuales se muestran en la Tabla 22 y Gráfica 3.

Todos los compuestos tuvieron una actividad inhibitoria en la producción de nitritos dependiente de la concentración; sin embargo, la Hispanolona y al D4 produjeron la mayor actividad inhibitoria en la producción de nitritos superior a la AG. La viabilidad de los macrófagos en presencia de las diferentes concentraciones de HP y D4 fue del 100%.

Los derivados D1 y D3 produjeron una inhibición en la producción de nitritos menor a la AG; sin embargo, el D3 a la concentración de 100 μM produjo una citotoxicidad del 73%,

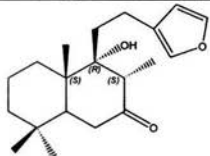
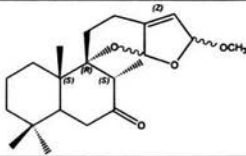
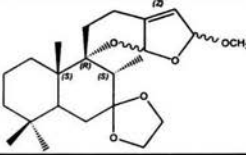
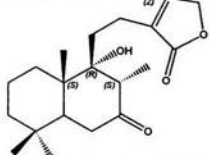
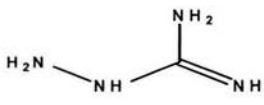
por lo que la inhibición en la producción de nitritos es producto de la muerte celular y no por la inhibición de la iNOS; así pues el grupo 1, 3-dioxolano de D3 es el responsable de la citotoxicidad de éste.

Al relacionar la estructura en la actividad sobre la inhibición de la producción de nitritos, se observa que la presencia del anillo de 5 miembros en la HP y D4 es importante para tal actividad independientemente del anillo de furano de HP y la lactona del derivado D4.



Gráfica 3. Curvas Concentración-Respuesta de la inhibición de la producción de NO de la Hispanolona y sus derivados semisintéticos medida en %NO₂⁻. En Mφ murinos. *Datos significativos como % [NO₂⁻] ± ESM con **p* < 0.05 probados con ANOVA-Tukey.

Tabla 22. Curvas Concentración-Respuesta de la Hispanolona y sus derivados semisintéticos en la actividad inhibitoria de la producción de NO dependiente de iNOS y Viabilidad de Mφ murinos.

Compuesto	Nombre	C (μM)	% Producción de [NO ₂] ⁻ ± ESM
HISPANOLONA Y SUS DERIVADOS			
	Hispanolona (HP)	10	83.20 ± 2.0 * a
		31	71.51 ± 0.6 * a
		100	52.63 ± 2.1 * a
	Derivado 1 (D1)	10	93.70 ± 3.3 a
		31	93.93 ± 2.7 a
		100	77.74 ± 2.1 * (72%)
	Derivado 3 (D3)	10	87.25 ± 2.4 * a
		31	81.52 ± 2.2 * a
		100	71.26 ± 1.1 * (27%)
	Derivado 4 (D4)	10	95.09 ± 2.0 a
		31	87.34 ± 1.9 * a
		100	51.38 ± 1.1 * a
ESTANDAR			
	Aminoguanidina (AG)	10	97.82 ± 4.2 a
		31	80.01 ± 9.4 * a
		100	66.16 ± 3.5 * a

Los datos reportados como %Producción de [NO₂]⁻ ± ESM. * $p < 0.05$

(x%): viabilidad celular. Cuando x% = 95-100 %: a

%[NO₂]⁻ Dexametasona: (0.01 μM: 78.31 ± 1.4*); (0.1μM: 72.73 ± 1.4*); (1.0 μM: 68.25 ± 1.7*)

%[NO₂]⁻ Indometacina: (10 μM: 77.26 ± 8.2); (31 μM: 76.78 ± 7.6); (100 μM: 73.68 ± 4.0*)

VI.5 Relación de la actividad antiinflamatoria de la Hispanolona y sus derivados

En la Tabla 23 se muestra la comparación de los derivados semisintéticos de la hispanolona en los ensayos de actividad antiinflamatoria.

La HP y D4 son los compuestos más activos en inhibir la producción de nitritos aproximadamente en un 48%, superior a los fármacos de referencia. En el edema inducido con TPA la HP resultó ser 50% más activo que D4 en su efecto antiinflamatorio; no obstante, requirió 3 veces más concentración para alcanzar la misma eficacia que la IND. La HP y la AG se probaron a las mismas concentraciones equimolares, siendo esta última menos activa. Tanto HP y D4 carecieron de actividad antiinflamatoria en el edema inducido con EPP.

El efecto antiinflamatorio entre los derivados D1 y D3 fueron similares en el edema inducido con TPA pero inferiores a IND y superiores a la AG. Respecto a la inflamación producida por el agente EPP fue notable el efecto de D3, cuya actividad es comparable con la DEX aún cuando la concentración que se usó para éste fue 3 veces mayor que el fármaco esteroideal. En el mismo modelo, el D1 produjo un aumento en la inflamación, lo que sugiere que éste promueve la formación y/o liberación de sustancias pro-inflamatorias. En cuanto a la actividad sobre la inhibición en la producción de nitritos, ambos derivados aparentemente tuvieron el mismo efecto; sin embargo, el D3 fue aproximadamente 3 veces más tóxico que D1, por lo que la inhibición que produjo D1 muestra que es más activo que D3, pero menos que los fármacos de referencia.

En base a estos resultados se propone que la hispanolona y sus derivados pudieran interferir en la activación de la PKC, o bien sobre la PLA₂ enzima clave para liberar el AA de los fosfolípidos de la membrana y con ello la formación de los eicosanoides; sin embargo, existe la posibilidad de que HP y sus derivados tengan el mismo modo de acción que los FANES, es decir, que inhiban a la COX. Por otra parte no hay diferencias importantes entre HP y D4 en cuanto al log P y el tamaño de las moléculas, ya que estas son prácticamente iguales (Tabla 24), sin embargo, la actividad antiinflamatoria difiere en más del 50% en el edema inducido con TPA, lo que sugeriría que actúan en diferentes sitios de acción.

En el modelo *in vitro* la HP y D4 guardan una relación fisicoquímica estrecha; es decir, entre más pequeñas y menos liposolubles sean, presentan una mayor actividad que la AG, IND y DEX sobre la inhibición de la producción de óxido nítrico, lo que sugiere que la HP y D4 podrían cruzar la membrana plasmáticas e interferir sobre el NF- κ B, el cual coordina

la expresión de genes que codifican para la iNOS, COX-2, citocinas y moléculas de adhesión, y no por la inhibición directa sobre iNOS puesto que ambos derivados fueron más activos que AG. Como HP y D4 carecieron de actividad sobre la inflamación inducida con EPP, descarta la posibilidad de un mecanismo esteroidal (Figura 28).

Con respecto a D3, es el compuesto más voluminoso y más lipofílico de toda la serie (Tabla 24), y estos datos se relacionan estrechamente con su actividad, ya que fue el compuesto más activo en el edema inducido con EPP, lo que sugiere que su modo de acción antiinflamatorio pudiera estar relacionado con el receptor a glucocorticoides.

Cabe mencionar que la electronegatividad de las moléculas probadas, no difiere mucho entre cada una de ellas por lo que no participan sobre la actividad antiinflamatoria en estos modelos.

Es importante destacar que los derivados semisintéticos de la hispanolona (D1, D3 y D4) pudieran tener cierto antagonismo hacia el receptor PAF debido al gran parecido estructural a la prehispanolona y sus derivados puesto que se ha demostrado que la prehispanolona es un antagonista del receptor PAF⁴ y que parte de este modo de acción explica su actividad antiinflamatoria²⁸.

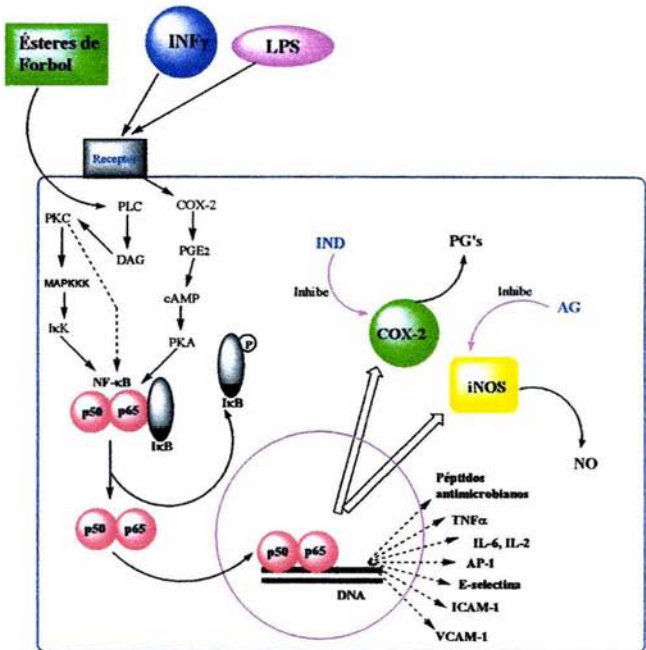


Figura 28. Mecanismo de acción^{34,35} probable de los compuestos HP, D1 y D4

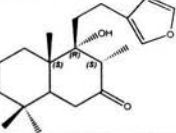
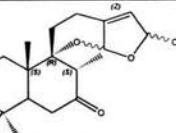
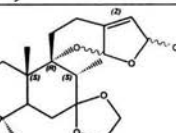
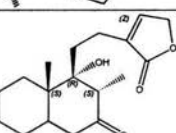
Tabla 23. Comparación de las actividades de los 3 modelos antiinflamatorios de la Hispanolona y sus derivados semisintéticos.

Estructura	Nombre	%Inh \pm ESM en TPA a 3.16 μ mol/área	%Inh \pm ESM en EPP a 1.0 μ mol/área	%Inhibición de [NO ₂ ⁻] + ESM a 100 μ M
HISPANOLONA Y SUS DERIVADOS				
	(HP)	83.26 \pm 3.6 *	No Activo	47.37 \pm 2.1 * <i>a</i>
	(D1)	56.35 \pm 2.4 *	+73.19 \pm 25.5	22.26 \pm 2.1 * (72 %)
	(D3)	43.39 \pm 0.4 *	60.62 \pm 8.31 *	28.74 \pm 1.1 * (27%)
	(D4)	31.96 \pm 7.0 *	No activo	48.62 \pm 1.1 * <i>a</i>
ESTÁNDARES				
	(IND)	90.35 \pm 2.6 * a 1.3 μ mol/área	-----	26.32 \pm 4.0 * <i>a</i>
	(DEX)	61.46 \pm 9.6 * a 0.316 μ mol/área	79.38 \pm 4.9 * a 0.316 μ mol/área	31.75 \pm 1.7 * a 1.0 μ M <i>a</i>
	(AG)	26.80 \pm 3.2 * a 3.16 μ mol/área	-----	33.84 \pm 3.5 * <i>a</i>

Los datos reportados como % (k) \pm ESM. * $p < 0.05$.

Área = 7 mm². (x%): viabilidad celular.

Tabla 24. Descriptores moleculares de los derivados electrotransformados de la Hispanolona calculados bajo un modelo semi-empírico PM3 con el programa PC-Spartan pro.

Estructura	Nombre	log P	χ	A (Å ²)	V (Å ³)
	HP	3.93	0.16	354.63	326.19
	D1	4.48	0.18	371.79	346.88
	D3	4.60	0.17	413.93	386.61
	D4	3.66	0.18	364.15	334.74

VII. CONCLUSIONES:

- Los derivados electrotransformados de la Hispanolona fueron sintetizados por la estrategia de replicación moduladora como método de modificación molecular por medio de la técnica Coulombimetría a corriente controlada.
- Cada compuesto fue caracterizado por RMN ^1H , ^{13}C , EM, IR, entre otras, obteniendo las señales correspondientes a los grupos funcionales modificados de cada uno.
- Los compuestos se evaluaron en los modelos de inflamación con TPA y EPP obteniendo actividades antiinflamatorias significativas.
- La HP y derivados inhibieron significativamente la producción de óxido nítrico dependiente de iNOS.
- Se observó relación de la estructura química de los compuestos con la actividad biológica. En el modelo del TPA es indispensable que la base de labdano presente cierta movilidad y una estructura tricíclica donde exista un anillo de furano.
- En el ensayo de EPP, es necesario que la estructura presente una lipofilidad alta, rigidez, volumen y que posea al menos 4 ciclos, lo que le confiere una semejanza a una estructura esferoidal, por tanto, el D3 posiblemente ejecute su actividad antiinflamatoria por interacción con el receptor glucocorticoide y se comporte como un fármaco esteroideal debido a su semejanza con aquellos.
- Para que haya actividad en el ensayo de óxido nítrico, la estructura debe presentar tres ciclos, uno de los cuales debe ser de 5 miembros derivado del furano o el mismo furano y un carbonilo en la posición 7 de la estructura labdánica.
- La HP y derivados probablemente ejerzan su actividad antiinflamatoria inhibiendo el complejo (NF- κ B)-I κ B o evitando la activación del mismo por alguna otra vía.

- Los resultados muestran que los derivados electrotransformados de la Hispanolona tiene gran semejanza con la prehispanolona y sus derivados, por lo que no se descarta la posibilidad de que puedan ser antagonistas al receptor PAF, o interfiera sobre la síntesis del fosfolípido.

VIII. REFERENCIAS:

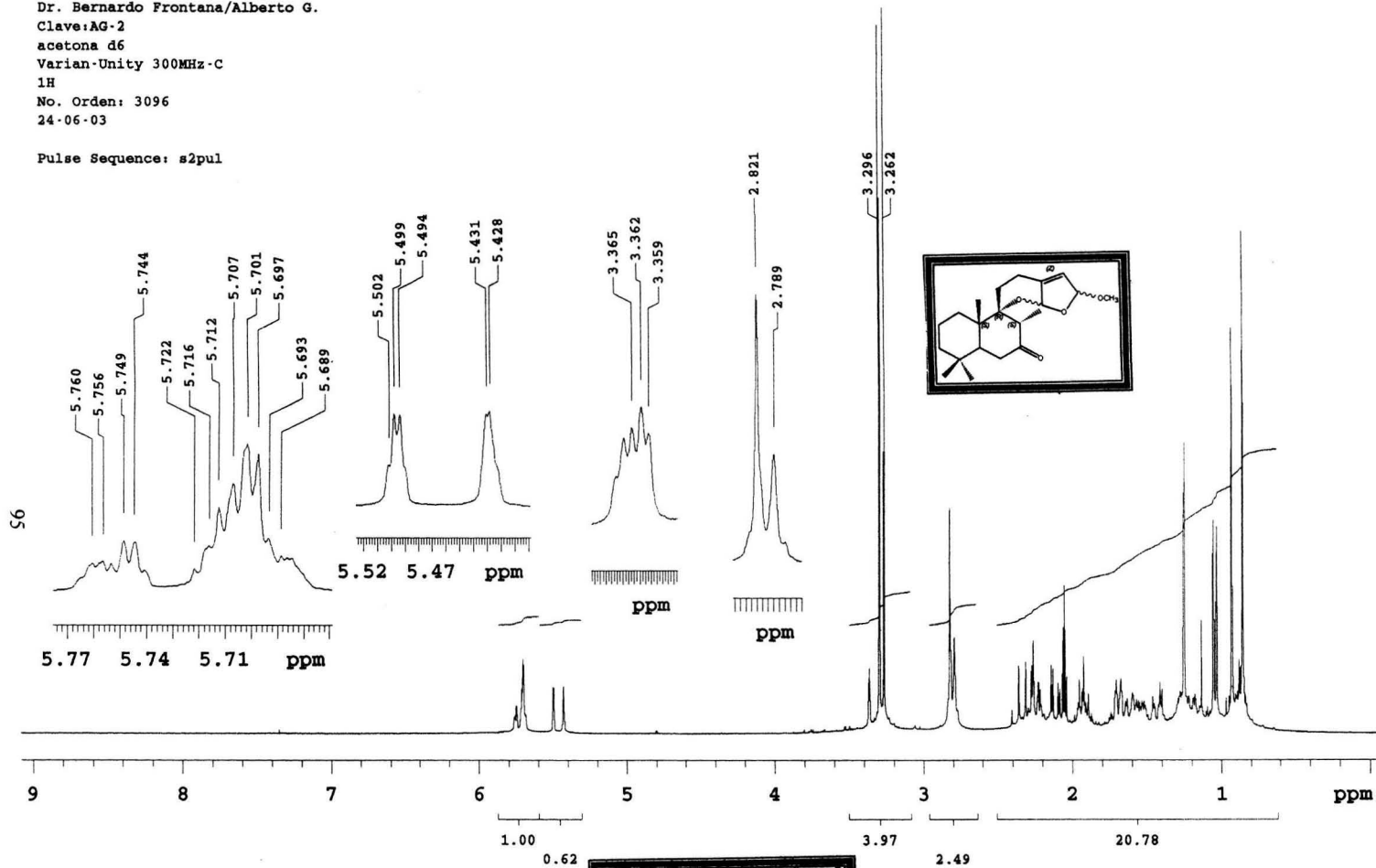
- ^[1] Mata Essayag Rachel, Curso Teórico de Farmacognosia; 2ª Versión; (2000), México D.F. p.p. 2-4, 42
- ^[2] Bruneton Jean; Farmacognosia: Fotoquímica, Plantas Medicinales; 2ª Edición, Trad. Ángel Villar del Fresno; Edit. Acribia, S.A., Zaragoza (España), (2001), p.p. 457-463, 629-644
- ^[3] Savona Giuseppe, Piozzi Franco; "*Hispanolone, a new Furanoditerpene*"; Heterocycles, Vol. 9, No. 3 (1978), p.p. 257-260
- ^[4] Lee Chi-Ming, Jiang Li-Ming, *et al.*; "*Prehispanolone, a novel platelet activating factor receptor antagonist from Leonurus heterophyllus*"; Br. J. Pharmacol., 108, (1991), p.p. 1719-1724
- ^[5] Shun Cheung Wing, Wong Henry N. C.; "*Total Synthesis of (-)-Hispanolone and An Improved Approach Towards Prehispanolone*"; Tetrahedron, 55, (1999), p.p. 11001-11016
- ^[6] Çitoglu Gülçin, Tanker Mekin, Sever Betül, *et al.*; "*Antibacterial Activities of Diterpenoids Isolated from Ballota saxatilis subsp. saxatilis*"; Planta Medica, 64, (1998), p.p. 484-485
- ^[7] Avendaño López María del Carmen; Introducción a la Química Farmacéutica; 1ª Edición; Edit. Interamericana-McGraw-Hill; España, 1993; p.p. 47-63
- ^[8] Razmilic B. Iván, Schmeda-Hirschmann Guillermo; "*Activity of Solidagenone and their Semisynthetic Derivatives on the Glucocorticoid-Mediated Signal Transduction*"; Planta Medica, 66, (2000), p.p. 86-88
- ^[9] Willard Hobart H., Merritt Lynne L. Jr., *et al.*; Métodos Instrumentales de Análisis; Trad. Rojas Hernández Alberto, Capella Vizcaíno Santiago, *et al.*; Edit. Grupo Editorial Iberoamérica; México D.F., 1991, p.p. 644, 724
- ^[10] Strobel Howard A., Heineman William R.; Chemical Instrumentation: A systematic Approach; 3rd Edition; Edit. John Wiley & Sons.; U.S.A., 1989; p.p. 1154
- ^[11] Nieto Mendoza Elizabeth; "*Electrooxidación de la Hispanolona*"; Tesis; México, D.F., (2003), p.p.38, 40
- ^[12] Clauson-Kaas Niels, Limborg Franz, Glens Kirsten; "*Electrolytic Methoxylation of Furan*"; Acta Chemica Scandinavica; 6, (1952); p.p. 531-534

- ^{113]} Litter Manuel; Farmacología Experimental y Clínica; 7ª Edición; Edit. Librería “El Ateneo” Editorial, Argentina, (1988); p.p. 1260-1263, 1303-1307
- ^{114]} <http://utopia.knoware.nl/users/aart/flora/Labiatae/Ballota/B.hirsuta/2.detail.jpeg>
(16-II-04)
- ^{115]} <http://www.zsu.edu.cn/museum/creature/plant/Labiatae.htm> (16-II-04)
- ^{116]} Gallin John I., Goldstein Ira M., Ralph; Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates; 2nd Edition; Edit. Raven Press, New York / U.S.A., (1992); p.p. 149-153
- ^{117]} R. Sant’Anna Carlos Mauricio, Bicca de Alencastro Ricardo, Barreiro Eliezer J.; “*Toward a platelet-activating factor pseudoreceptor: Semiempirical modeling of cation- π and hydrogen bond interactions in agonist binding*”; Journal of Molecular Structure (Theochem); 429, (1998), p.p. 217-227
- ^{118]} Arciniegas Amira, Ramírez Apan Ma. Teresa, Pérez-Castorena Ana L., Romo de Vivar Alfonso; “*Anti-inflammatory Constituents of Mortonia greggii Gray*”; Zeitschrift fur Naturforschung; 59c, (2004), 237-243
- ^{119]} Sigal, Leonard H., Ron Yacov; Immunology and Inflammation: Basic Mechanism and Clinical Consequences; Edit. McGraw-Hill, U.S.A., (1994); p.p. 272-283, 288
- ^{120]} Abbas Abul K., Litchman Andrew H., Pober Jordan S.; Inmunología Celular y Molecular; 3ª Edición; Trad. Mazana Casanova Javier, Corral Pazos de Provens, Disdier Rico Maite; Edit. McGraw-Hill-Interamericana, Madrid / España, (1999); p.p. 280, 294, 304, 321
- ^{121]} Goodman Gilman Alfred, Rall Theodore W., Nies Alan S., Taylor Palmer; Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica; 8a Edición; Editorial Médica Panamericana S.A.; Edit. Editorial Médica Panamericana, México D.F., (1991); p.p. 624-652
- ^{122]} Barnes Meter J., Adcock Ian; “*Anti-inflammatory actions of steroids: molecular mechanism*”; TiPS, 14, (1993); p.p. 436-440
- ^{123]} Rodrigo J., Alonso D., Fernández A. P., *et al.*; “*Nitric oxide: synthesis, neuroprotection and neurotoxicity*”, Departamento de Neuroanatomía y Biología Celular. Instituto Cajal. Madrid
- ^{124]} Ramírez María M., Quardt Suzanne M., Kim Daekyung, *et al.*; “*Platelet Activating Factor Modulates Microvascular Permeability through Nitric Oxide Synthesis*”; Microvascular Research, 50, (1995); p.p. 223-234

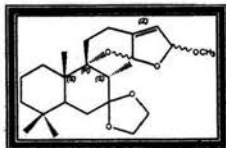
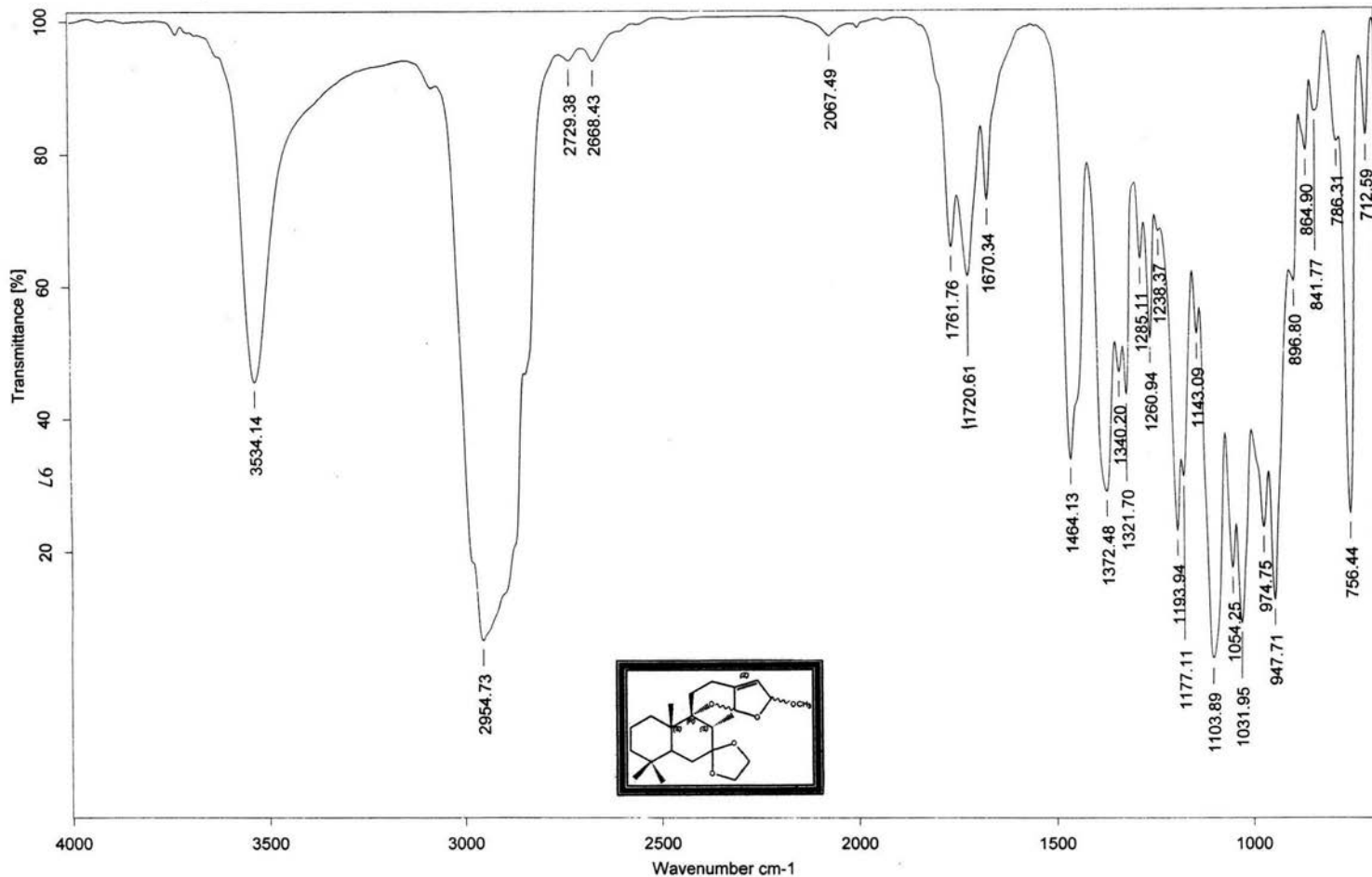
- ^[25] Margni Ricardo Anibal; Inmunología e Inmunoquímica: Fundamentos; 5ª Edición; Edit. Médica Panamericana S.A., (1996), Argentina; p.p. 448-449
- ^[26] Roitt Ivan M., Brostoff Jonathan, Male David K.; Inmunología; 3a Edición, Trad. Fernando Fontán Fontán; Edit. Ediciones Científicas y Técnicas, S.A. (Masson y Salvat Medicina); p.p. 15.14
- ^[27] Brattsand Ralph, Talen ARNE, Roempke Karin, *et al.*; "*Influence of 16a, 17a-Acetal Substitution and Steroid nucleus fluorination on the topical to systemic activity ratio of Glucocorticoids*"; J. Steroid Biochem. 16, (1982); p.p. 779-786
- ^[28] Merlos M., Gómez L. A., Giral M., *et al.*, "*Effects of PAF-antagonist in mouse ear oedema induced by several inflammatory agents*"; Br. J. Pharmacol., 104, (1991); p.p. 990-994
- ^[29] Nims Raymond W., Cook John C., Krishna Murali C., *et al.*; "*Colorimetric Assays for Nitric Oxide and Nitrogen Oxide Species Formed from Nitric Oxide Stock Solutions and Donor Compounds*"; Methods in Enzymology, 268, (1996); p.p. 93-105
- ^[30] Tetrazolium Salts- highly sensitive colour indicators of enzymatic redox reactions <http://www.serva.de/products/latest/tetrazolium.shtml> (17-IX-04)
- ^[31] Karin Michael, Cao Yixue, Greten Florian R., Li Zhi-Wei; "*NF- κ B in cancer: from innocent bystander to major culprit*"; Nature Reviews, 2, (2002); p.p. 301-310
- ^[32] Bowden G. Tim; "*Prevention of non-melanoma skin cancer by targeting ultraviolet-B-light signalling*"; Nature Reviews, 4, (2004); p.p. 23-35
- ^[33] Funk Colin D.; "*Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology*"; Science, 294, (2001); p.p. 1871-1875
- ^[34] Wolff Donald J., Lubeskie Andrew; "*Aminoguanidine is an isoform-selective, mechanism-based inactivator of Nitric Oxide Synthase*"; 316, (1995); p.p. 290-301
- ^[35] Connelly L., Palacios-Callender M., Ameixa C., Moncada S., Hobbs A. J.; "*Biphasic Regulation of NF- κ B Activity Underlies the Pro- and Anti-inflammatory Actions of Nitric Oxide*"; The Journal of Immunology; (2001); p.p. 3873-3881

Instituto de Quimica UNAM NZ
Dr. Bernardo Frontana/Alberto G.
Clave:AG-2
acetona d6
Varian-Unity 300MHz-C
1H
No. Orden: 3096
24-06-03

Pulse Sequence: s2pul



ESPECTRO 1



C:\infrarrojo\AIR-2004\4761.0 Dr. B. Frontana AG-5.1 Película EGR

24/06/2004

ESPECTRO

Dr. Bernardo Frontana / Juan Alberto Guevara

Clave: AG-5

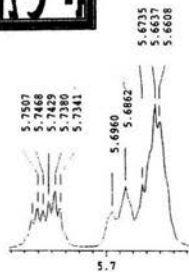
Disolvente: Acetona-d6

Hidrogeno-1

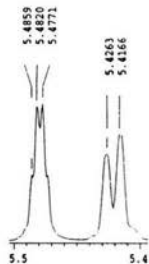
Eclipse 300 jeol (5)

14-1-2003

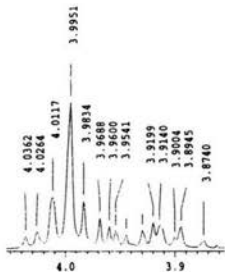
ESPECTRO 4



X : parts per Million :



X : parts per Mil

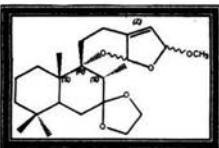


X : parts per Million : 1H



X : parts per Mi

2.0862
2.0735
2.0501



0.21936
0.70442
0.25284
0.24732

6.0 5.0

X : parts per Million : 1H



3.0

2.70371
2.8209
2.7876

0.14692

11.10707

0.315
0.48116

2.0

4.48677

0.60926

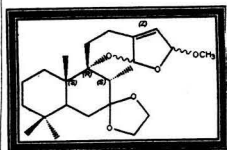
7.17421

1.0

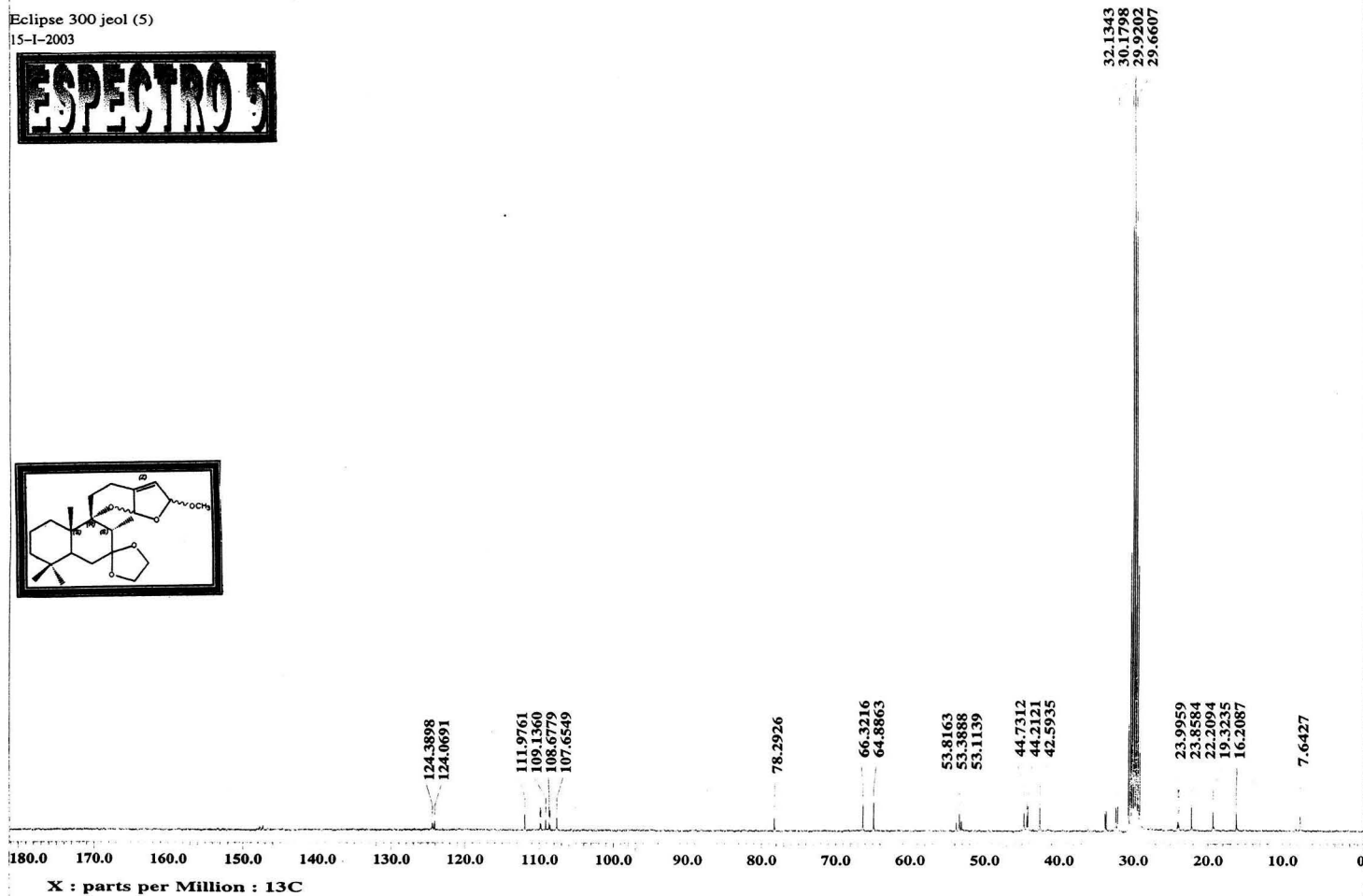
0

UNAM, INSTITUTO DE QUIMICA, apg
Dr. Bernardo Frontana / Juan Alberto Guevara
Clave: AG-5
Disolvente: Acetona-d6
Carbono-13
Eclipse 300 jeol (5)
15-I-2003

ESPECTRO 5



66



[Mass Spectrum]

Data : Dr-Frontana-Bernardo-045 Date : 17-Jan-103 16:42

Sample: FU-I-03-AG-5

Note : Javier-Perez

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]

RT : 0.37 min

Scan# : (6,14)

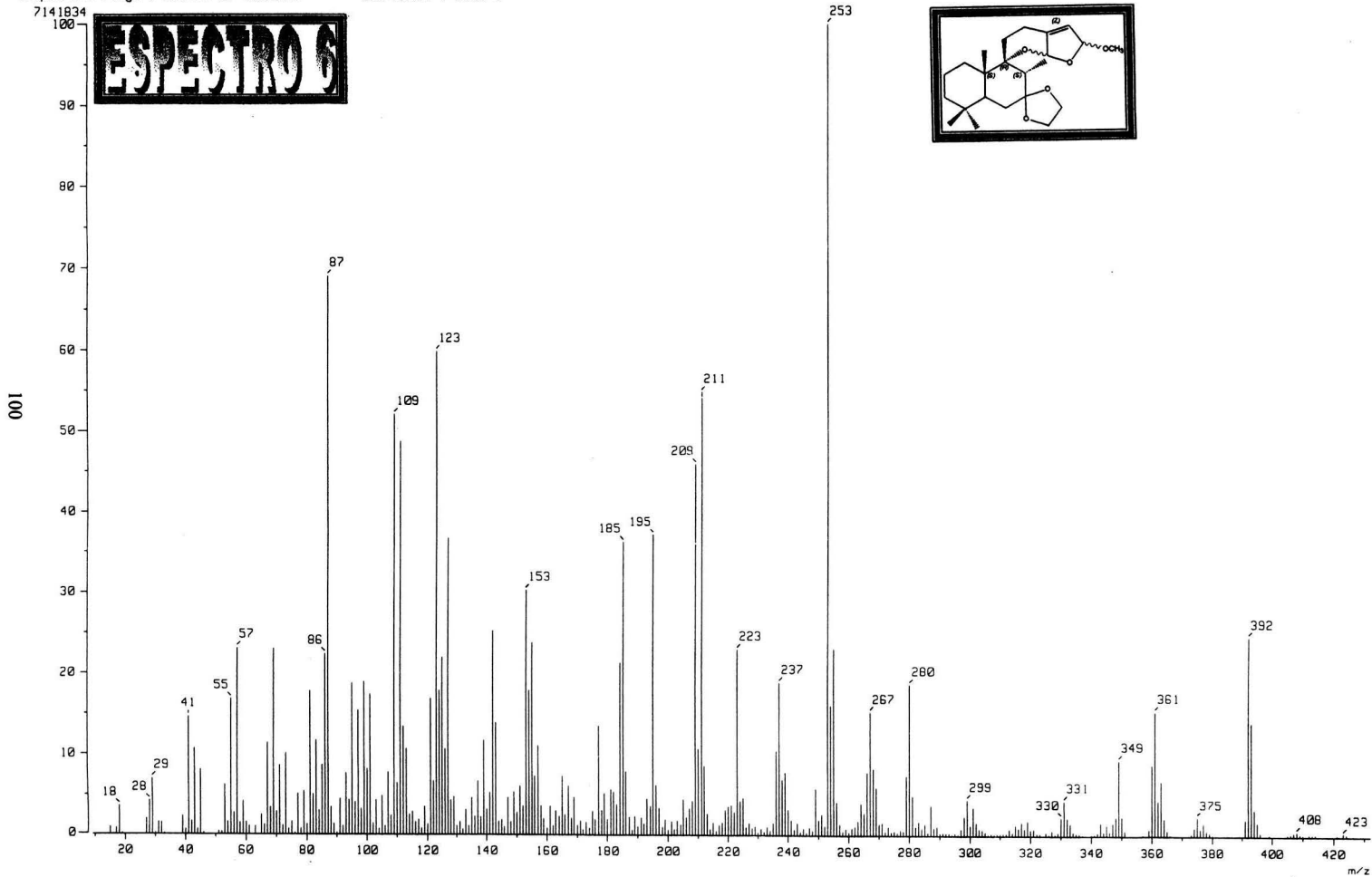
Temp : 89.9 deg.C

BP : m/z 253.0000

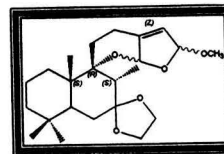
Int. : 681.10

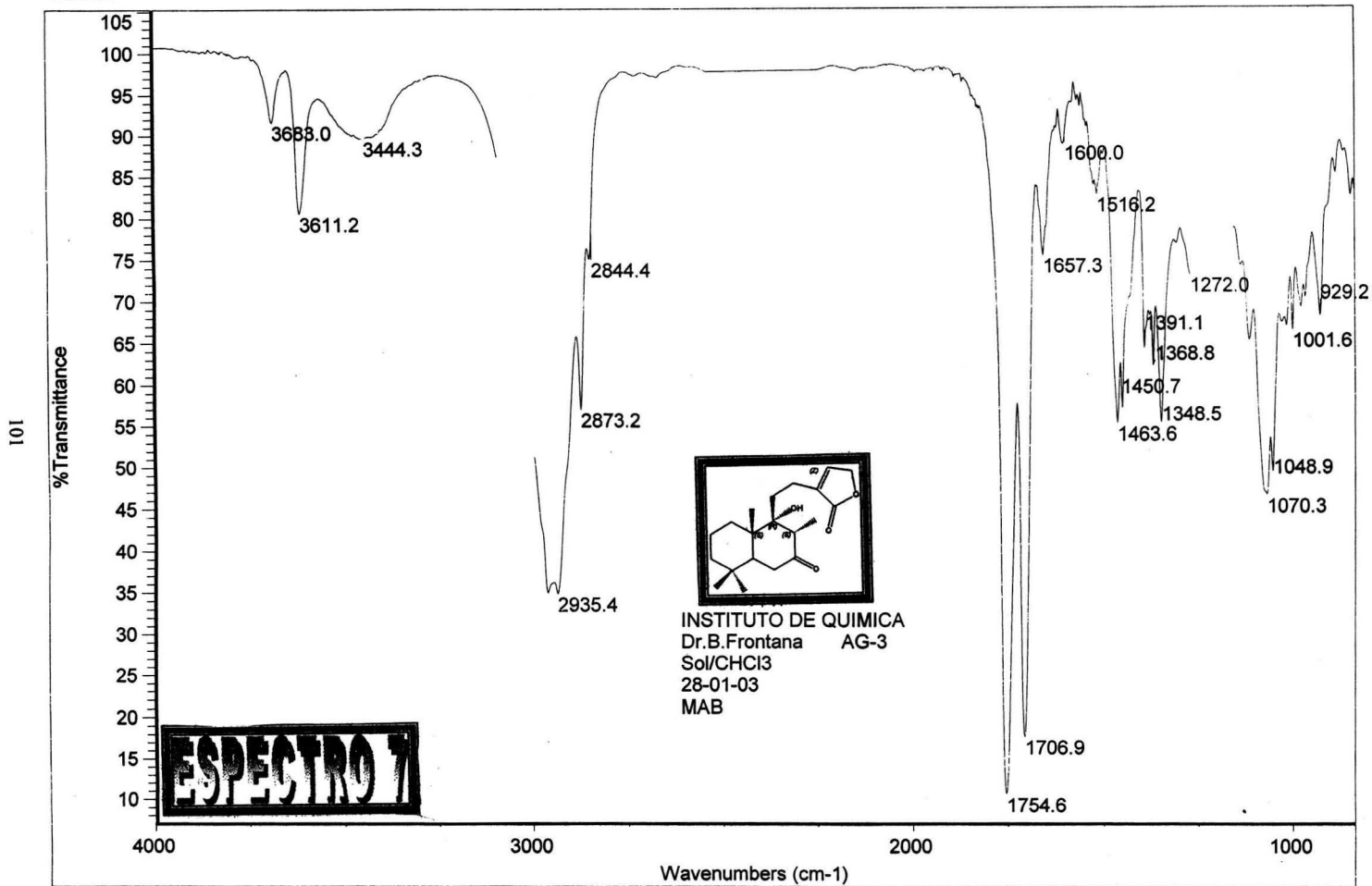
Output m/z range : 9.3472 to 432.0475

Cut Level : 0.00 %



ESPECTRO 6

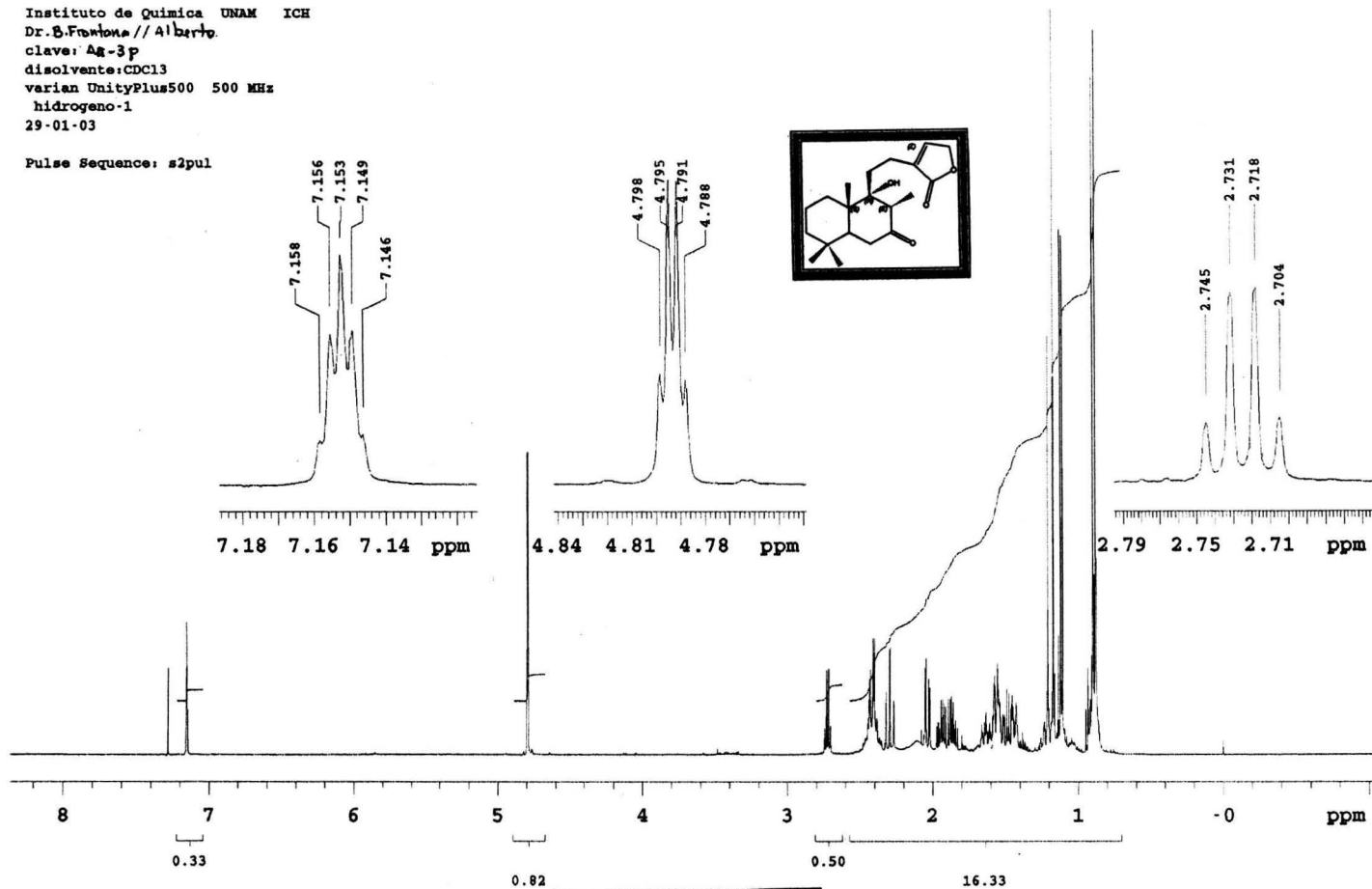




Instituto de Quimica UNAM ICH
Dr. S. Fuentes // Alberto
clave: Ag-3p
disolvente: CDCl3
varian UnityPlus500 500 MHz
hidrogeno-1
29-01-03

Pulse Sequence: s2pul

102



ESPECTRO 9

[Mass Spectrum]

Data : Dr-Frontana-Bernardo-074 Date : 23-Jan-03 17:46

Sample: FU-I-03-AG-3

Note : Javier-Perez

Inlet : Direct

Ion Mode : EI+

Spectrum Type : Normal Ion [MF-Linear]

RT : 1.41 min Scan# : (17,53)

Temp : 112.8 deg.C

BP : m/z 139.0000 Int. : 435.87

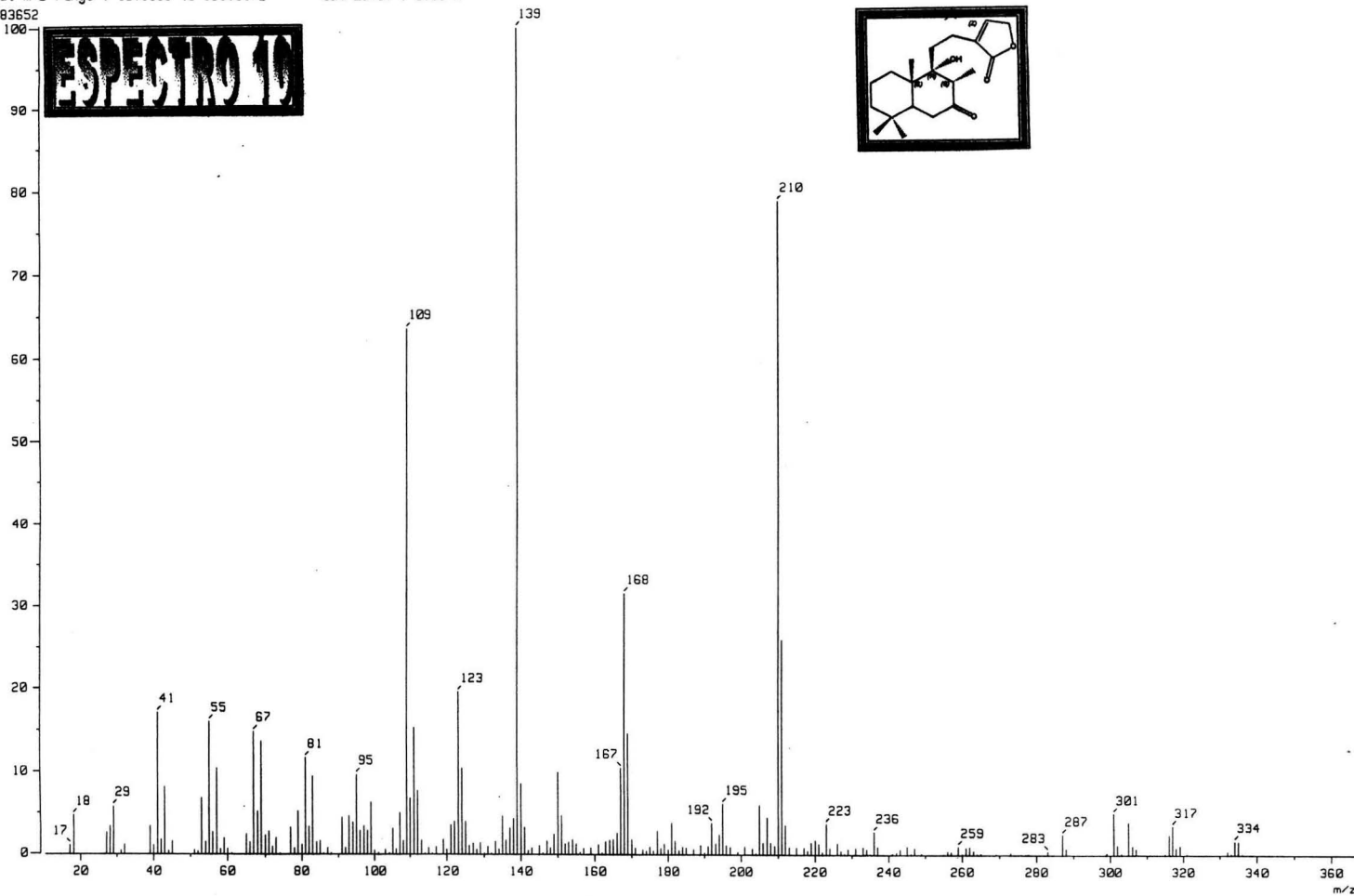
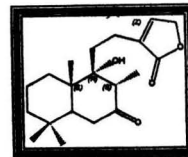
Output m/z range : 10.3858 to 366.6172

Cut Level : 0.00 %

4583652

104

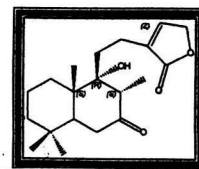
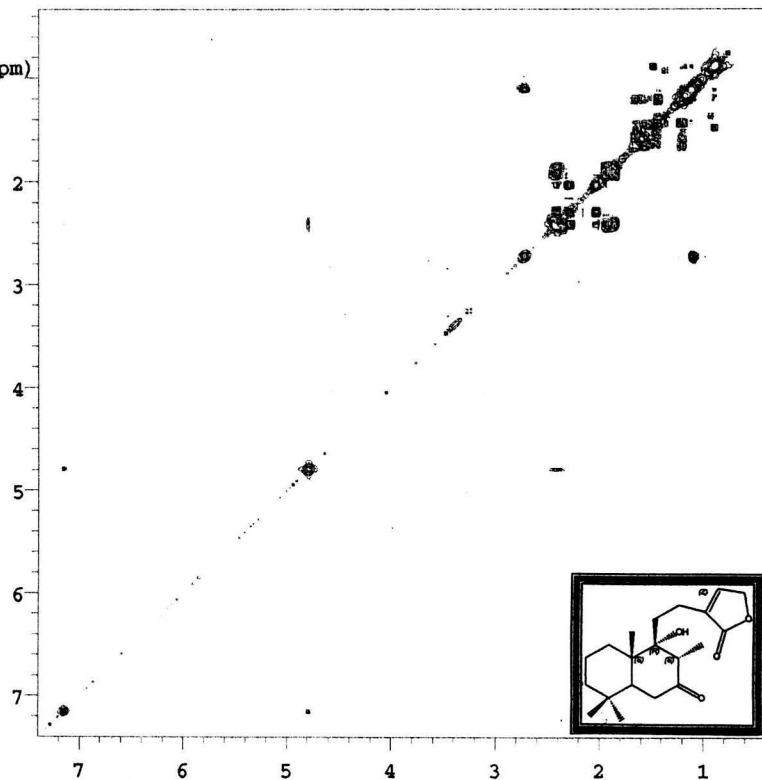
ESPECTRO 10



Instituto de Quimica UNAM ICH
Dr. ~~O. Fontana~~ // Alberto
clave: AG-3p
disolvente: CDCl3
Varian UnityPlus 500 500 MHz (7)
gcosy
30-01-03

Pulse Sequence: gcosy

F2
(ppm)



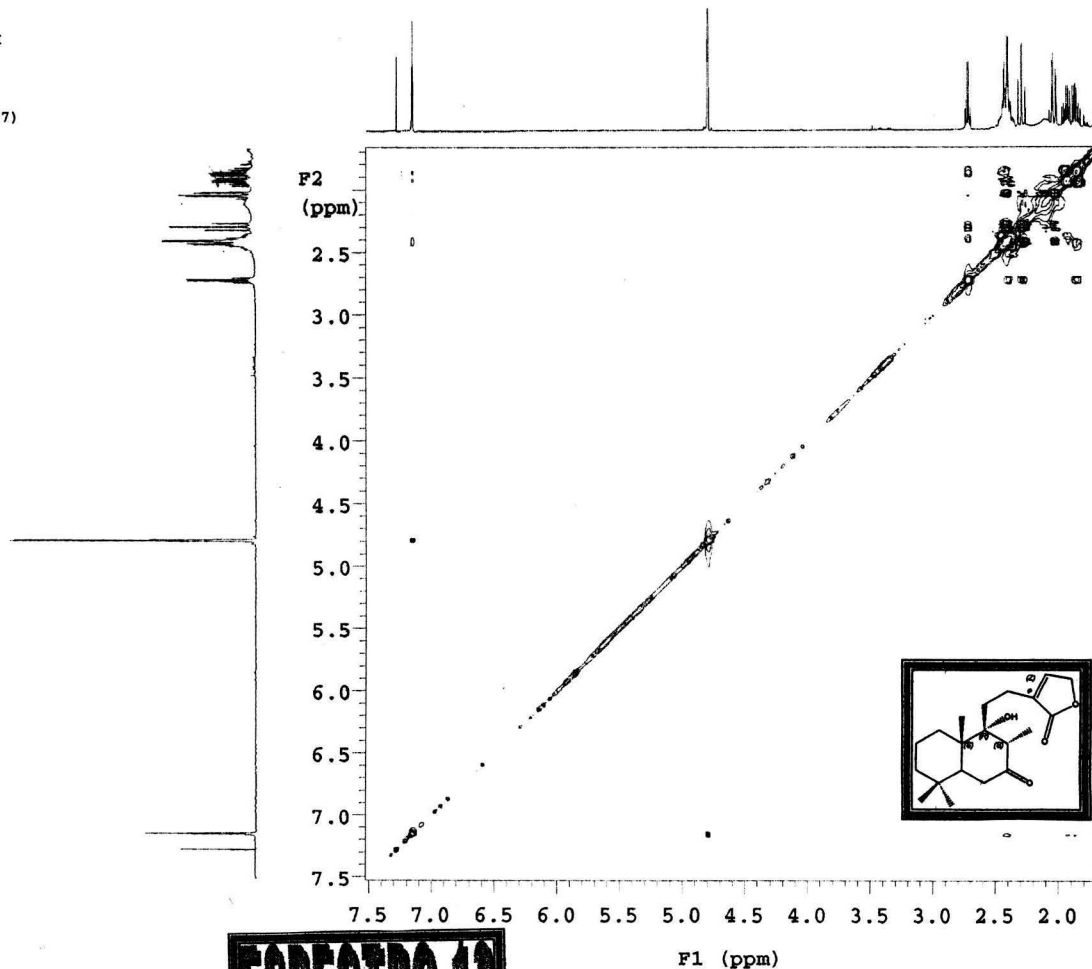
ESPECTRO 11

F1 (ppm)

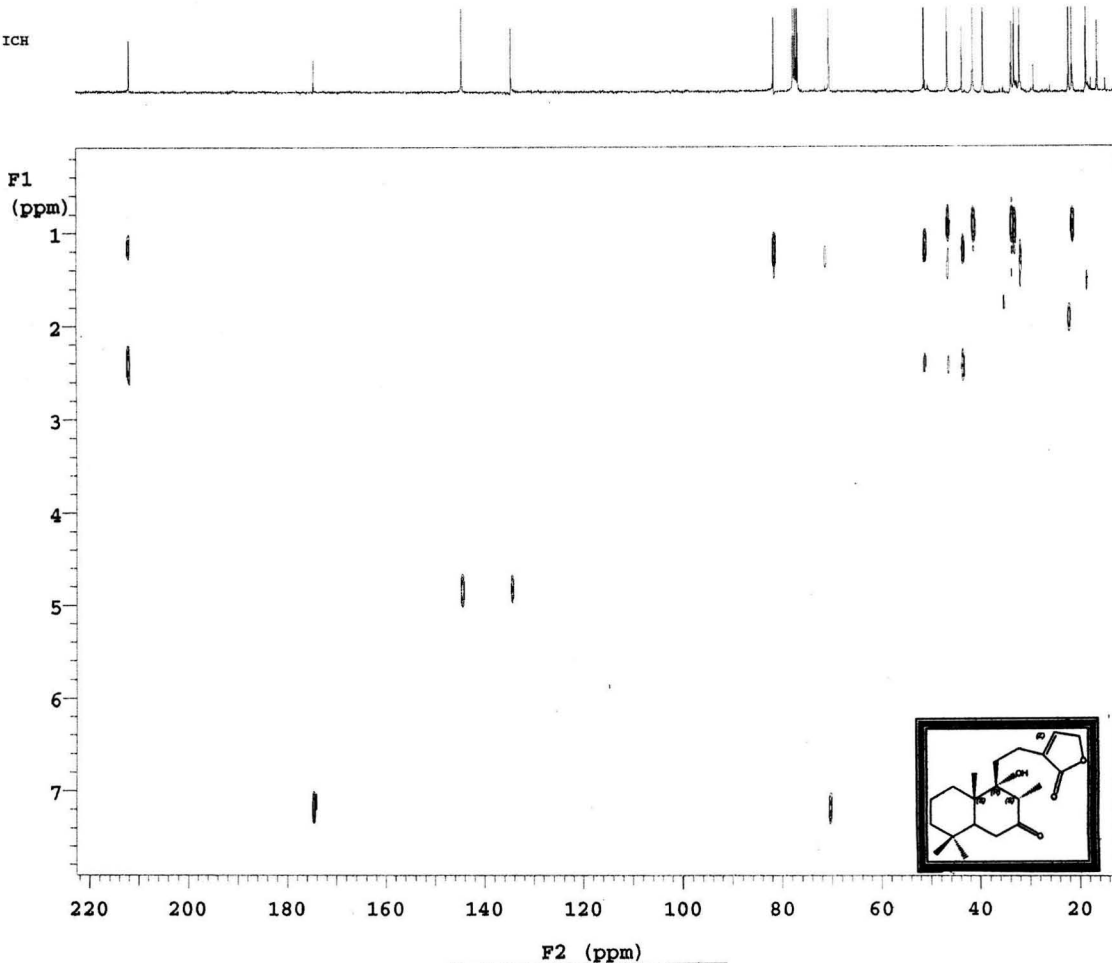
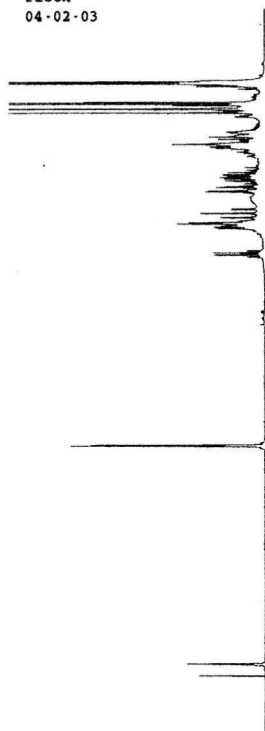
Instituto de Quimica UNAM ICH
Dr. E. Frontana//Alberto
clave:AG-3p
disolvente:CDCl3
Varian UnityPlus 500 500 MHz (7)
gnoesy
30-01-03

Pulse Sequence: noesy

106

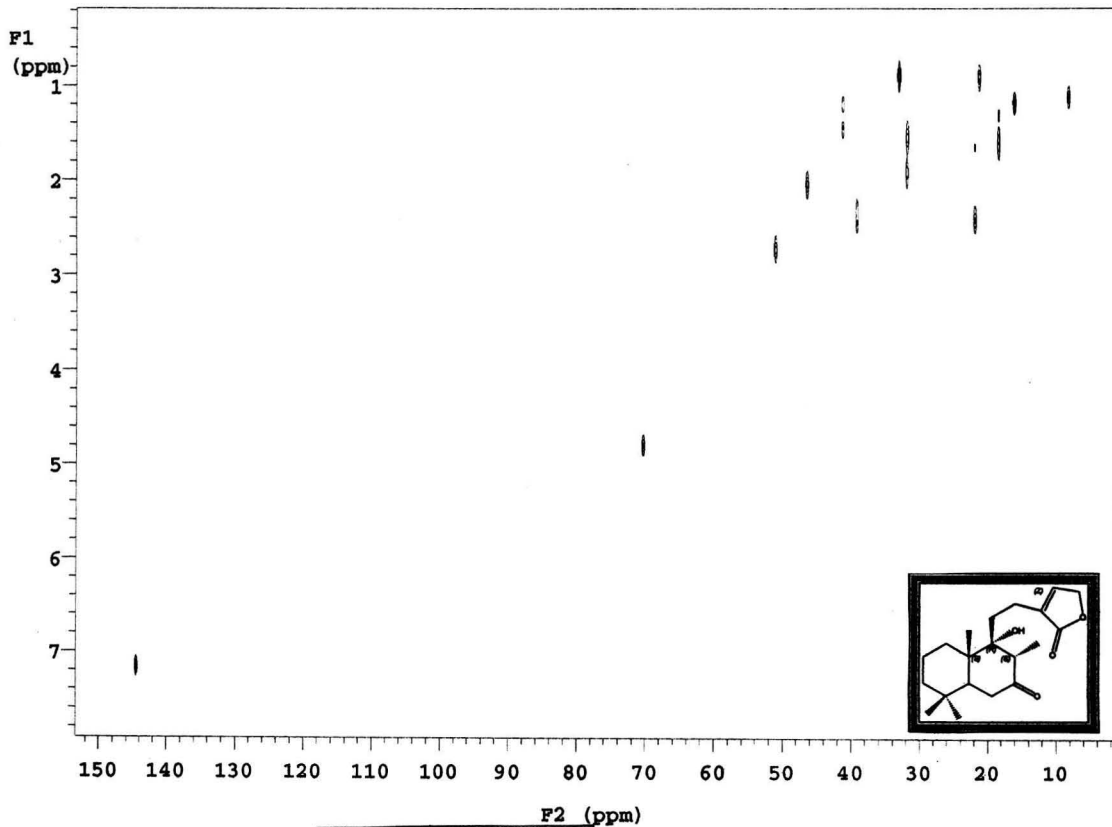
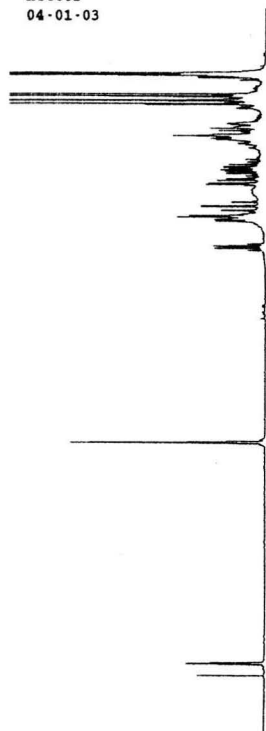


Instituto de Quimica UNAM ICH
Dr. B. Frontana//Alberto
clave:AG-3p
disolvente:CDCl3
varian unity300 75 MHz
flock
04-02-03



ESPECTRO 19

Instituto de Quimica UNAM ICH
Dr. B. Frontana//Alberto
clave:AG-3p
disolvente:CDCl3
varian unity300 75 MHz (4)
hetcor
04-01-03



108

ESPECTRO 14