



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Síntesis de trimetilapigenina, dimetilcrisina y
evaluación de la actividad relajante en músculo
liso traqueal y vascular

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
P R E S E N T A

APOLO LEONARDO ALFARO TORRES

Asesor:

Dr. Adelfo N. Reyes Ramírez

Director:

Dr. Andrés Navarrete Castro

MÉXICO, D.F.

JUNIO 2009





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio L-4 PA de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza de la FES Zaragoza UNAM y en el laboratorio L-126. Conjunto "E". Departamento de Farmacia, Facultad de Química. UNAM. Financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con el número de proyecto 82613 y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) a través de los proyectos DGAPA IN205008 y DGAPA IN208707.

Al Dr. Adelfo N. Reyes Ramírez por todo su apoyo, ayuda, confianza y la grandiosa amistad que me brindó. Así como enseñarme lo fascinante que es la química orgánica y regalarme el mejor año de mi vida trabajando a su lado.

Al Dr. Andrés Navarrete Castro por brindarme su apoyo, ayuda y buenos consejos. Así como mostrarme lo que es ser una mejor persona y enseñarme que todos los sueños están en nuestras manos.

A mis sinodales por los consejos y el tiempo brindado para hacer de este un mejor trabajo.

Al M. en C. Fernando Rodríguez Ramos por darme su apoyo, ayuda, conocimientos y consejos en todo este tiempo.

A mis compañeros Nelly Vázquez Burgos y David Contreras Atahualpa por que sin su ayuda las cosas hubieran sido más difíciles.

A mis compañeros José Luis Balderas y Alejandro Alfaro, por sacarme una sonrisa y darme un buen consejo cada vez que lo necesitaba.

En general a mis compañeros de los laboratorios L-4 PA de la FESZ y L-126 del edificio "E" de la Facultad de Química.

A las maestras Lourdes Cervantes, Martha Ugalde, Idalia Flores, Leticia Huerta, Domitila Burgos, Cirenía Sandoval y Francisca Robles por enseñarme como ser un profesional de excelencia y por su compromiso con los alumnos.

A los maestros Vicente Hdez. Abad, Ramón Soto, Ramón Rodríguez, Oscar Guadarrama, Mauro Arrieta, José Luis Balderas y Fernando Rodríguez por darme las mejores lecciones de mi carrera.

DEDICATORIAS

A mi mamá y hermanas por creer en mí y apoyarme en mis sueños.

A Greta y Julieta por que son las chicas que mueven mi mundo y lo hacen feliz, así como hacerme desear estar vivo en todo momento.

A Lana por compartir su vida conmigo.

A mami por apoyarme incondicionalmente solo por el hecho de verme feliz.

A mis tíos y primos que creyeron en mis sueños y me impulsaron a ser una mejor persona.

A Diana por ser eso que no esperaba, apoyarme en todas mis locuras y ser un pilar importante para construir mis sueños.

A Francisco e Iván que sin más que darles las gracias por ser mis hermanos.

A mis amigos Camarillo, Marcos y Karina por ser mis guías en este trayecto tan difícil.

A la Dr. Lourdes Castillo por enseñarme lo bello que son las ciencias químicas y por toda la amistad que me brindo, no tengo palabras para agradecerle todo lo que hizo por mí.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	i
1. MARCO TEÓRICO	1
1.1 Músculo Liso	1
1.2 Diferencias entre Músculo Liso Vascular y Aéreo	1
1.3 Contracción-Relajación en Músculo Liso vascular.....	1
1.3.1 Enfermedades Relacionadas con la Contracción del MLV	1
1.3.2 Mecanismo General de Relajación.....	2
1.3.2.1 Vía Canales de Potasio	3
1.3.2.2 Vía Inhibición de Fosfodiesterasas	3
1.3.2.3 Vía Prostaglandinas.....	3
1.3.2.4 Vía Agonistas β -Adrenérgicos.....	4
1.3.2.5 Vía Óxido Nítrico	4
1.3.2.6 Vía Péptido Natriurético	4
1.3.3 Mecanismo General de Contracción.....	4
1.3.3.1 Vía Canales de Calcio.....	5
1.3.3.2 Vía Angiotensina.....	6
1.3.3.4 Vía Endotelina	6
1.3.3.5 Vía Receptores α -Adrenérgicos	7
1.3.3.6 Vía Derivados del Ácido Araquidónico	7
1.4 Contracción-Relajación en Músculo Liso de Vías Aéreas.....	7
1.4.1 Enfermedades Relacionadas con la Contracción del MLA.....	7
1.4.2 Mecanismo General de Relajación	7
1.4.2.1 Vía Canales de Potasio	8
1.4.2.2 Vía Inhibición de Fosfodiesterasas	9
1.4.2.3 Vía Activación de Adenilato Ciclasa	9
1.4.2.4 Vía Activación de Guanilato Ciclasa.....	9
1.4.3 Mecanismo General de Contracción.....	10
1.4.3.1 Vía Activación de Canales de Calcio	11
1.4.3.2 Vía de Inactivación de Canales de Potasio	11

1.4.3.3 Vía Activación de IP ₃	11
1.4.3.5 Vía Metabolitos del Ácido Araquidónico	11
1.5 Flavonoides.....	12
1.5.1 Definición	12
1.5.1.1 Flavonas	12
1.5.2 Efectos Farmacológicos	12
1.5.3 Músculo Liso Vascular	13
1.5.4 Músculo Liso de Vías Aéreas	14
1.6 Síntesis de Flavonas	14
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
3. HIPÓTESIS	18
4. OBJETIVO GENERAL	19
4.1 Objetivos Específicos	19
5. METODOLOGÍA	20
5.1 Síntesis Orgánica	20
5.2 Evaluación Farmacológica	22
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS	27
6.1 Síntesis Orgánica	27
6.2 Evaluación Farmacológica	29
7. CONCLUSIONES	39
8. PERSPECTIVAS	40
9. BIBLIOGRAFÍA.....	41
10. APÉNDICE	47

INTRODUCCIÓN

Las flavonas son compuestos polifenólicos, presentes en plantas de diversos géneros (Nijveldt *et al.*, 2001). Este tipo de compuestos son importantes por su variada actividad farmacológica (Raj *et al.*, 2001), entre las que destacan la inhibición de enzimas fosfodiesterasas y del flujo de calcio extracelular, dichos mecanismos provocan la relajación del músculo liso traqueal y vascular (Herrera *et al.*, 1996; Ko *et al.*, 2004). Estos mecanismos farmacológicos convierten a las flavonas en sustancias con un alto potencial terapéutico en el tratamiento de enfermedades que involucren la contracción del músculo liso de vías aéreas (MLA) como son el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), así como también en la hipertensión relacionada con la contracción del músculo liso vascular (MLV) (García *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2007).

Existen dos flavonas la apigenina y la crisina que tienen actividad relajante sobre el músculo liso (Sutthanut *et al.*, 2007; Ko *et al.*, 2003). Sin embargo, los rendimientos de dichas sustancias a partir de sus fuentes naturales son muy limitados.

Es por ello que se planteó el diseño y la optimización de una ruta de síntesis para la obtención de flavonas análogas a la apigenina y la crisina, con buenos rendimientos y poder realizar su evaluación farmacológica en el modelo de tráquea aislada de cobayo y aorta de rata con el fin de obtener compuestos sintéticos análogos a un producto natural con una actividad relajante mayor, con potencial para ser utilizados en el tratamiento de enfermedades respiratorias obstructivas y en la hipertensión.

1. MARCO TEÓRICO

1.1 MÚSCULO LISO

El músculo liso está constituido por células que tienen forma de huso, está contenido en las paredes de varios órganos y conductos del cuerpo, entre los que se encuentran: vasos sanguíneos, estómago, intestinos, vesícula, vías aéreas, útero, entre otros. En adición a esto su estado contráctil es controlado por hormonas y otros mensajeros químicos, así como el potencial de acción que es originado en muchos casos en los canales de calcio tipo L, siendo esta una de las vías más importantes para la entrada del calcio extracelular (Webb, 2003).

1.2 DIFERENCIAS ENTRE MÚSCULO LISO VASCULAR Y AÉREO

Las principales diferencias entre el músculo liso de vías aéreas (MLA) y el músculo liso vascular (MLV) son entre otras, su elasticidad, ya que el MLV tiene mayor elasticidad que el MLA, su ubicación es diferente, el MLV está distribuido por todo el cuerpo, y el MLA sólo se encuentra en el sistema respiratorio. Los moduladores endógenos y los receptores que modulan el funcionamiento del MLA y MLV también son diferentes; por ejemplo, las prostaglandinas, péptidos, receptores de endotelina, tipos de fosfodiesterasas en especial la tipo IV que es específica para el MLA. El sistema adrenérgico colinérgico es también diferente en ambos tejidos (Sanders, 2001; Barnes *et al.*, 1998; Thirstrup, 2000).

1.3 CONTRACCIÓN-RELAJACIÓN EN MÚSCULO LISO VASCULAR

El músculo liso vascular es un tejido elástico en donde intervienen varios factores que llevan a la contracción y relajación del músculo. Estos fenómenos ocurren cuando se elevan o se disminuyen los niveles de calcio en donde intervienen varios componentes endógenos (Webb, 2003).

1.3.1 ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA CONTRACCIÓN DEL MLV

Las enfermedades que se relacionan con la contracción del MLV son la hipertensión arterial, insuficiencia cardiaca, shock cardiógeno, vasculopatía periférica y enfermedad de Raynaud (Mancia *et al.*, 2007; Rang *et al.*, 2004).

1.3.2 MECANISMO GENERAL DE RELAJACIÓN

En este proceso intervienen en el músculo liso vascular, hormonas, canales iónicos, péptidos y neurotransmisores, los cuales actúan incrementando la concentración de adenosín monofosfato cíclico (AMPc), guanosín monofosfato cíclico (GMPc) ó inhibiendo la entrada de calcio extracelular (Webb, 2003; Sanders, 2001), siendo estos los principales mecanismos por los cuales actúan los relajantes en el músculo liso vascular como se representa en la Figura 1.

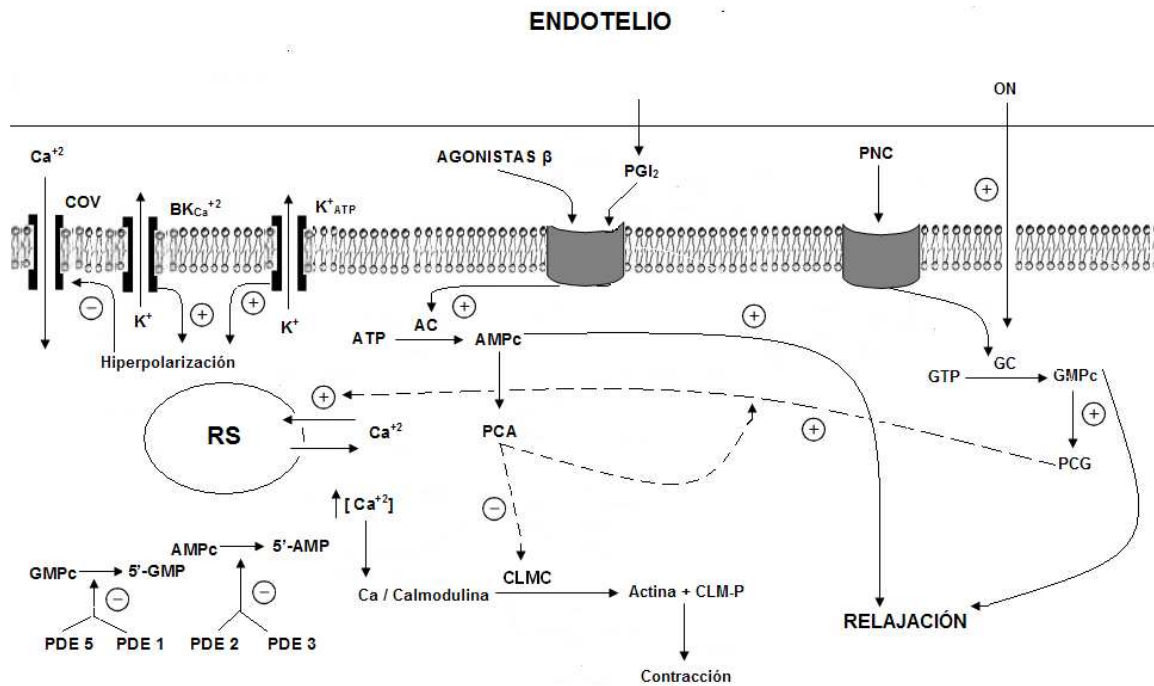


Fig. 1 MECANISMO DE RELAJACIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR. COV= canal operado por voltaje, $BK_{Ca^{2+}}$ = canal de potasio activado por calcio de larga conductancia, K^+_{ATP} = canal de potasio sensibles a ATP de conductancia intermedia, RS= retículo sarcoplásmico, PGI_2 = prostaciclina, ATP= adenosín trifosfato, AC= adenilato ciclasa, AMPc= adenosín monofosfato cíclico, PCA= proteína cinasa A, CLM= cadena ligera de miosina, CLMC= cadena ligera de miosina cinasa , PNC= péptido natriurético C, GTP= guanosín trifosfato, GC= guanilato ciclasa, GMPc= guanosín monofosfato cíclico, PCG= proteína cinasa G, PDE= fosfodiesterasa. Modificada de Sanders, 2001.

1.3.2.1 VÍA CANALES DE POTASIO

Los canales de potasio regulan el potencial de membrana en el músculo liso, cuando estos son activados hiperpolarizan la membrana, inhibiendo la apertura de los canales de calcio operados por voltaje (Karakı *et al.*, 1997), existen dos tipos de canales de potasio de gran relevancia en el músculo liso vascular:

- *Canal de potasio activado por calcio*, de este existen tres subtipos: larga-conductancia ($BK_{Ca^{+2}}$), conductancia pequeña ($SK_{Ca^{+2}}$) y conductancia intermedia ($IK_{Ca^{+2}}$). De estos, el que tiene gran relevancia en el músculo liso vascular es de subtipo $BK_{Ca^{+2}}$, estos canales de potasio son estimulados por la proteína cinasa A, proteína cinasa G, despolarización de la membrana y por el incremento de calcio intracelular (Ledoux *et al.*, 2006).
- *Canales de potasio sensibles a ATP* (K_{ATP}), son de conductancia intermedia, y son inhibidos por ATP, además pueden ser modulados por el pH y los ácidos grasos (Grover *et al.*, 2000).

1.3.2.2 VÍA INHIBICIÓN DE FOSFODIESTERASAS

Las fosfodiesterasas (PDE's) son enzimas que se encuentran en tejido y células de mamíferos, las diferentes isoformas de estas enzimas pueden ser divididas dentro de siete familias, basados sobre su genética y características funcionales. En el músculo liso vascular actúan las PDE's PDE-1, PDE-2, PDE-3 y PDE-5 (Polson *et al.*, 1996). Las PDE's tienen la capacidad de catalizar la hidrólisis de la función fosfato diester de los segundos mensajeros AMPc y GMPc, dando lugar al 5'-AMP y al 5'-GMP que son inactivos para la relajación del músculo liso. La inhibición de estas enzimas hace que se incremente el AMPc ó el GMPc activo dentro de la célula provocando la relajación del músculo liso (Cortijo *et al.*, 2001).

1.3.2.3 VÍA PROSTAGLANDINAS

Los prostanoideos son liberados en respuesta a la inflamación, la liberación de prostaciclina (PGI_2), actúa sobre los receptores de prostanoideos I (IP) acoplados a proteínas G, generando la estimulación de la adenilato ciclasa (AC) que transforma el adenosín trifosfato (ATP) a adenosín monofosfato cíclico (AMPc), provocando el aumento de su concentración intracelular, a si mismo la formación de AMPc estimula a la

proteína cinasa A (PCA), ésta última inhibe a la cadena ligera de miosin cinasa (CLMC), además de aumentar la captación de calcio al retículo sarcoplásmico (RS) (Rembold, 1992; Simmons *et al.*, 2004).

1.3.2.4 VÍA AGONISTAS β -ADRENÉRGICOS

La noradrenalina llega a los β -adrenoreceptores que están acoplados a proteínas G, produciendo la estimulación de la AC y provocando un aumento de la concentración de AMPc, a su mismo la formación de AMPc estimula la PCA, ésta última inhibe a la CLMC, además de aumentar la captación de calcio sobre el RS (Tanaka *et al.*, 2005; Guimaraes *et al.*, 2001).

1.3.2.5 VÍA ÓXIDO NÍTRICO

La L-arginina es un aminoácido que es transformado por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) a L-citrulina y óxido nítrico (NO), este proceso es llevado a nivel endotelial, el NO es un mediador que estimula a la guanilato ciclasa (GC) soluble y esta transforma al guanósín trifosfato (GTP) a guanósín monofosfato cíclico (GMPC) aumentando la concentración de GMPC, al aumentar éste se estimula a la proteína cinasa G (PCG), ésta a su vez incita la captación de calcio sobre el RS (Cohen *et al.*, 2006; Rembold, 1992).

1.3.2.6 VÍA PÉPTIDO NATRIURÉTICO

El péptido natriurético C (PNC) es un péptido compuesto por una cadena de 22 aminoácidos, se acopla al receptor de guanilato ciclasa tipo B (GC-B), lo que ocasiona la activación de la GC particulada, ésta transforma al guanósín trifosfato (GTP) a guanósín monofosfato cíclico (GMPC) aumentando la concentración de GMPC, así mismo con este incremento se estimula a la PCG que incita la captación de calcio sobre el RS (Carvajal *et al.*, 2000; Kimberly *et al.*, 2000).

1.3.3 MECANISMO GENERAL DE CONTRACCIÓN

En este proceso intervienen sobre músculo liso vascular, hormonas, péptidos, enzimas, neurotransmisores y canales iónicos, los cuales actúan incrementando la entrada de calcio extracelular ó activando la salida de calcio del retículo sarcoplásmico, siendo estos los principales mecanismos por los cuales actúan los agentes contráctiles del músculo liso vascular como se puede ver en la Figura 2.

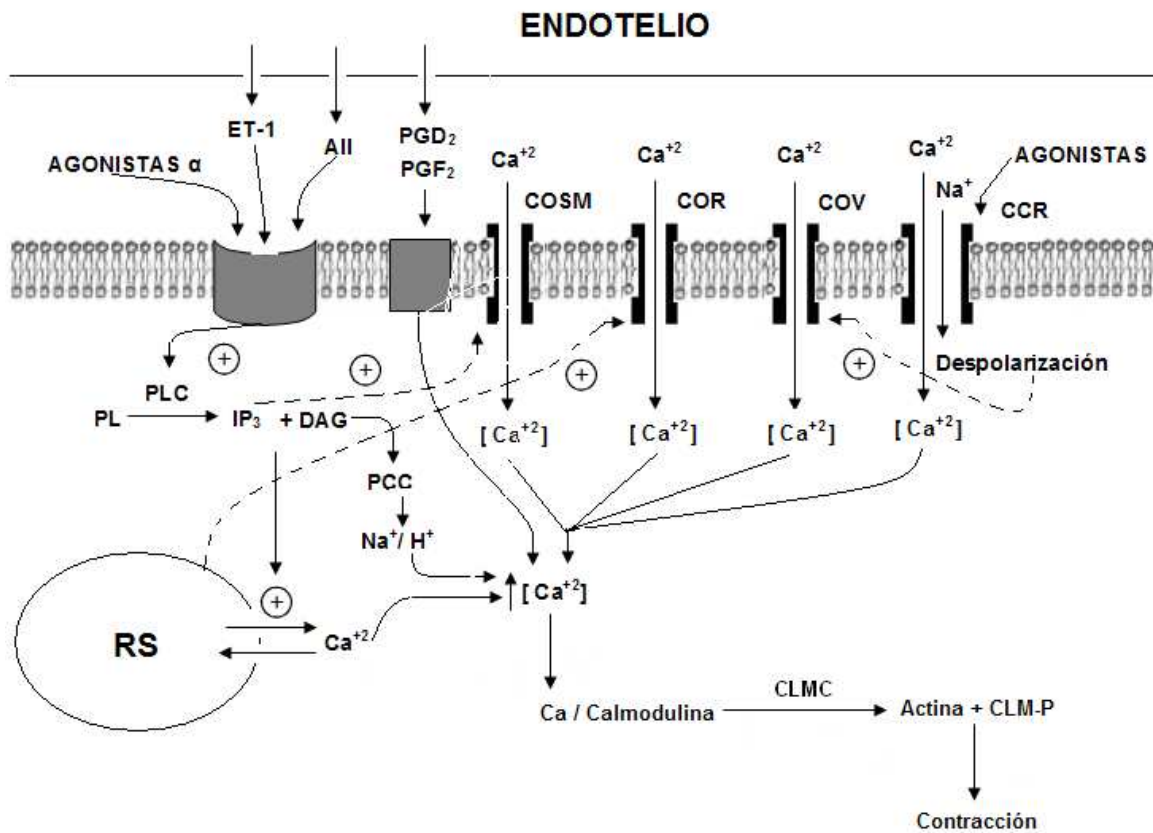


Fig. 2 MECANISMO DE CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO VASCULAR. ET-1= endotelina uno, All= angiotensina dos, PL= fosfatidilinositol, PLC= fosfolipasa C, IP₃= inositol trifosfato, DAG= diacilglicerol, PCC= proteína cinasa C, RS= retículo sarcoplásmico, CLM= cadena ligera de miosina, CLMC= cadena ligera de miosina cinasa, PG= prostaglandina, COSM= canal de calcio operado por segundo mensajero, COR= canal de calcio operado por reservas, COV= canal de calcio operado por voltaje, CCR= canal de calcio controlado por receptores. Modificada de Sanders, 2001.

1.3.3.1 VÍA CANALES DE CALCIO

La activación de los diversos canales de calcio varía en diversos tipos, pero al final lo que se logra es la entrada de calcio extracelular, provocando un aumento de éste en el interior y ocasionando la contracción, a continuación se enlistan los siguientes canales de calcio de relevancia en el músculo liso vascular:

- *Canales de calcio operados por voltaje (COV)*, de este tipo de canales existen seis subtipos, pero el que predomina en el músculo liso es el tipo-L, y son activados por la despolarización de la membrana (Karaki *et al.*, 1997; Godfraind *et al.*, 1986).

- *Canales de calcio operados por reservas (COR)*, son activados debido al agotamiento del calcio intracelular (Parekh *et al.*, 2005).
- *Canales de calcio controlados por receptor (CCR)*, son activados por la unión de alguna hormona ó neurotransmisor agonista (Mc Fadzean *et al.*, 2002).
- *Canales de calcio operados por segundos mensajeros (COSM)*, son activados por inositol fosfato, DAG (Parekh *et al.*, 2005).

1.3.3.2 VÍA ANGIOTENSINA

La angiotensina I (AI) es una hormona heptapeptídica que es regulada por factores como la presión sanguínea y actividad de los nervios simpáticos, es transformada a angiotensina II (AII) mediante la enzima convertidora de angiotensina (ECA), después la AII se une al receptor de angiotensina (AT₁) unidos a proteínas G, éste último a su vez actúa sobre la fosfolipasa C (PLC) activando la hidrólisis del fosfatidilinositol y la formación del inositol trifosfato (IP₃) y la acumulación de diacilglicerol (DAG), el IP₃ actúa como segundo mensajero mediando la liberación del calcio del RS, mientras el DAG activa la proteína cinasa C (PCC), la cual activa el intercambio Na⁺-H⁺ provocando una rápida acidificación del medio seguida de una sostenida alcalinización, esto ocasiona la activación de la bomba Na⁺-Ca²⁺, como consecuencia a todo esto surge un incremento en la concentración intracelular de calcio (Touyz *et al.*, 2000).

1.3.3.3 VÍA ENDOTELINA

La familia de las endotelinas (ET's) está constituida por tres subtipos la ET-1, ET-2 y ET-3. Están conformadas como péptidos compuestos por 21 aminoácidos con pequeñas diferencias en su estructura, la ET-1 es la que se encuentra principalmente en el músculo liso y es sintetizado principalmente en las células del endotelio como respuesta de la regulación de procesos inflamatorios, la ET-1 se acopla a su receptor de tipo A (ET_A) que se encuentra unido a proteínas G, este a su vez actúa sobre la PLC, resultando la hidrólisis del fosfatidilinositol y la formación del IP₃ y la acumulación de DAG (Lipp *et al.*, 2005; Touyz *et al.*, 2000).

1.3.3.4 VÍA RECEPTORES α -ADRENÉRGICOS

Los α -adrenoreceptores se encuentran localizados en la membrana celular y están asociados con proteínas G, éstos son activados por noradrenalina, cuando son activados estimulan la PLC, ésta promueve la hidrólisis de fosfatidilinositol produciendo IP₃ y DAG (Guimaraes *et al.*, 2001; Rembold, 1992).

1.3.3.5 VÍA DERIVADOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

La síntesis de compuestos contráctiles derivados del ácido araquidónico (AA) y las ciclooxigenasas uno y dos, produce como resultado la formación de la prostaglandina tipo D₂ (PGD₂), prostaglandina tipo F_{2 α} (PGF_{2 α}), y tromboxano tipo A₂ (TxA₂). Estos a su vez se unen a sus respectivos receptores, el DP para la PGD₂, FP para PGF_{2 α} , y TP para TxA₂, pero estos desarrollan la función de activar a los receptores de TP, ocasionando un incremento en la concentración intracelular de calcio (Simmons *et al.*, 2004).

1.4 CONTRACCIÓN-RELAJACIÓN EN MÚSCULO LISO DE VÍAS AÉREAS

El músculo liso de vías aéreas es un tejido que comprende desde la tráquea hasta llegar a los bronquiolos, en donde la parte de la tráquea se destaca por ser un tejido fibromusculocartilaginoso, en donde los factores que intervienen en su contracción ó relajación pueden ser variados, estos eventos ocurren cuando existe un aumento ó disminución en los niveles de calcio intracelular.

1.4.1 ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LA CONTRACCIÓN DEL MLA

Las enfermedades relacionadas con la obstrucción del MLA son el asma y la enfermedad pulmonar de obstrucción crónica (EPOC), estas son las dos enfermedades más representativas en estos casos (Cortijo *et al.*, 2001).

1.4.2 MECANISMO GENERAL DE RELAJACIÓN

El proceso de relajación en el MLA a través de las diferentes vías, siempre tiende a reducir los niveles de calcio libre intracelular y afectar la captación de calcio extracelular. Existen tres mecanismos principales, mediante los cuales actúan los relajantes del MLA como se ilustra en la Figura 3, se dan a través del incremento en la concentración de AMPc,

GMPC ó inhibiendo la entrada de calcio extracelular, estos procesos están modulados por hormonas, péptidos, canales iónicos y neurotransmisores.

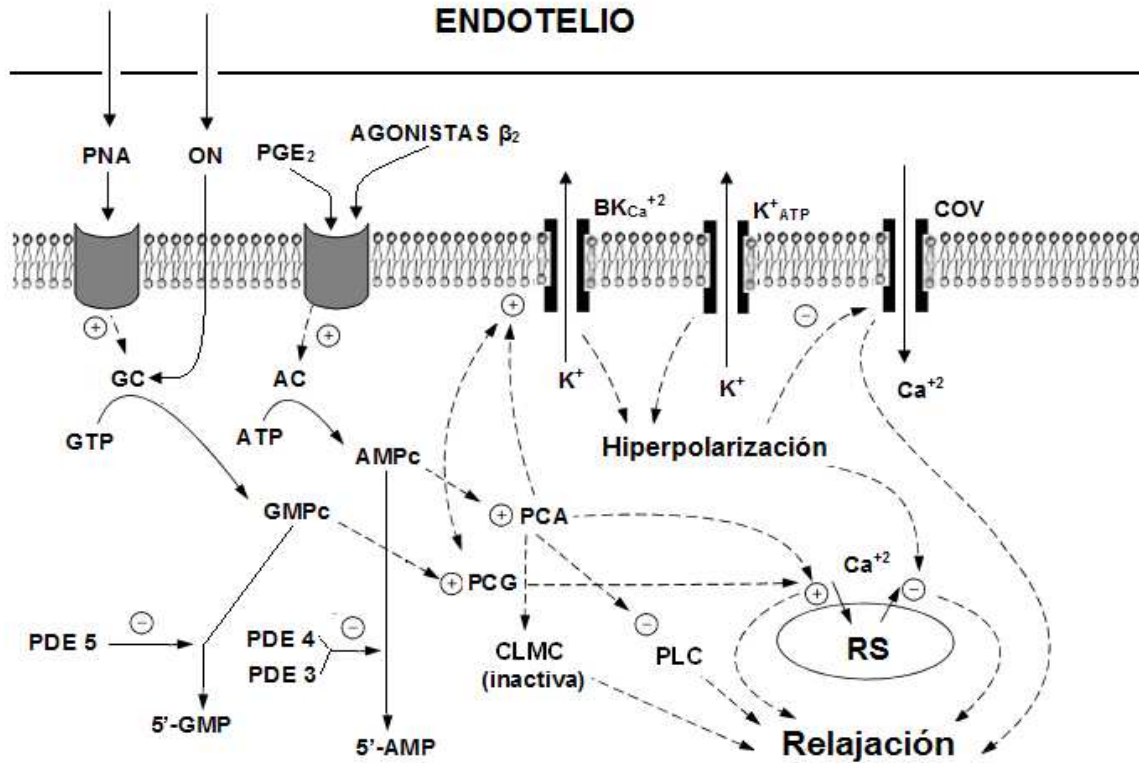


Fig. 3 ESQUEMA DEL MECANISMO DE RELAJACIÓN DEL MÚSCULO LISO TRAQUEAL. COV= canal operado por voltaje, BK_{Ca}⁺²= canal de potasio activado por calcio de larga conductancia, K⁺_{ATP}= canales de potasio sensibles a ATP de intermedia conductancia, RS= retículo sarcoplásmico, PGE₂= prostaglandina E₂, ATP= adenosín trifosfato, AC= adenilato ciclasa, AMPc= adenosín monofosfato cíclico, PCA= proteína cinasa A, PLC= fosfolipasa C, CLM= cadena ligera de miosina, CLM= cadena ligera de miosina cinasa, PNA= péptido natriurético atrial, GTP= guanosín trifosfato, GC= guanilato ciclasa, GMPC= guanosín monofosfato cíclico, PCG= proteína cinasa G, PDE= fosfodiesterasa. Modificado de Thirstrup, 2000.

1.4.2.1 VÍA CANALES DE POTASIO

Estos canales activan la hiperpolarización de la membrana inhibiendo la apertura de los canales de calcio operados por voltaje y como consecuencia evitando la entrada de calcio extracelular (Karaki *et al.*, 1997), existen dos tipos de canales de potasio de gran relevancia en el MLT:

- El que es activado por calcio y es del subtipo de larga-conductancia ($BK_{Ca^{+2}}$), además este canal puede ser modulado por PCA, PCG y despolarización de la membrana (Ledoux *et al.*, 2006).
- El que es sensible a ATP (K_{ATP}), estos canales son de intermedia conductancia, y son inhibidos por ATP, además pueden ser modulados por el pH y los ácidos grasos (Grover *et al.*, 2000).

1.4.2.2 VÍA INHIBICIÓN DE FOSFODIESTERASAS

Las PDE's que actúan en músculo liso traqueal son las PDE-3, PDE-4 y PDE-5. Las PDE-3 y PDE-4 tienen la capacidad de catalizar la hidrólisis de la función fosfato diéster del AMPc y la PDE-5 al GMPc, estas al ser inhibidas contribuyen a que aumente la concentración de AMPc ó GMPc (Thirstrup, 2000).

1.4.2.3 VÍA ACTIVACIÓN DE ADENILATO CICLASA

Estos mecanismos involucran a la prostaglandina E_2 (PGE_2), que actúa sobre los receptores de prostanoideos (EP_2) acoplados a la proteína G (Rembold M., 1992), así mismo los agonistas β_2 -adrenérgicos que llegan a los β_2 -adrenoreceptores que están acoplados a proteínas G (Guimaraes *et al.*, 2001; Thirstrup, 2000), en ambos casos después de acoplarse a sus respectivos receptores provocan la estimulación de la AC que transforma el ATP a AMPc provocando el aumento de su concentración intracelular, a si mismo la formación de AMPc estimula a la PCA, ésta última inhibe a la CLMC, además de aumentar la captación de calcio al RS (Simmons *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2005).

1.4.2.4 VÍA ACTIVACIÓN DE GUANILATO CICLASA

Los mecanismos que activan a la GC se dividen en dos, el mecanismo del óxido nítrico que activa a la GC soluble y el del péptido natriurético auricular (PNA) que activa a la GC particulada. En el primer proceso se comienza con la transformación de la L-arginina a L-citrulina y NO por medio de la enzima NOS, el NO atraviesa la membrana celular para activar a la GC (Cohen *et al.*, 2006), mientras tanto el PNA llega al receptor GC-A causando la activación de la GC (Taniguchi *et al.*, 2006), en ambos mecanismos después de activar a la GC pasan a la transformación del GTP a GMPc aumentando la concentración de GMPc, al aumentar el GMPc se estimula a la PCG, y esta estimula la captación de calcio sobre el RS (Hamad *et al.*, 2003; Kimberly *et al.*, 2000; Barnes *et al.*, 1998).

1.2.3.3 MECANISMO GENERAL DE CONTRACCIÓN

La contracción del músculo puede ser iniciada por una despolarización o una estimulación con agonistas contráctiles, estos a su vez están relacionados con el incremento en los niveles de calcio intracelular. Este incremento origina la formación de un complejo calcio-calmodulina que activa a la cadena ligera de miosina cinasa, después esta sufre una desfosforilación y posteriormente activa a la enzima ATPasa, esta genera la formación de puentes cruzados entre actina y miosina produciendo la contracción como se describe en la Figura 4 (Thirstrup, 2000).

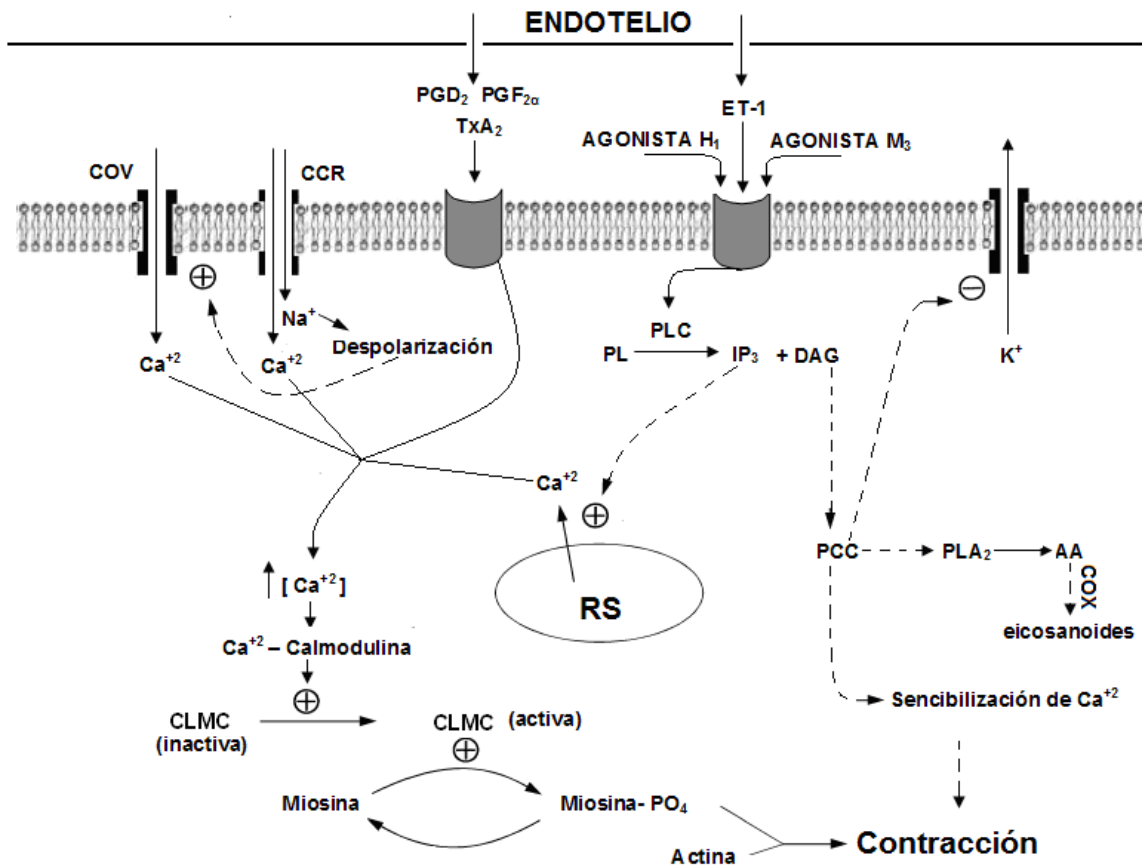


Fig. 4 ESQUEMA DEL MECANISMO DE CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO TRAQUEAL. ET-1= endotelina uno, PL= fosfatidilinositol, PLC= fosfolipasa C, IP₃= inositol trifosfato, DAG= diacilglicerol, PCC= proteína cinasa C, PLA₂= fosfolipasa A₂, COX= ciclooxigenasa, AA= ácido araquidónico, RS= retículo sarcoplásmico, CLMC= cadena ligera de miosina cinasa, PG= prostaglandina, TxA₂= tromboxano tipo A₂, COV= canal de calcio operado por voltaje, CCR= canal de calcio controlado por receptores. Modificado de Thirstrup, 2000.

1.4.3.1 VÍA ACTIVACIÓN DE CANALES DE CALCIO

Existen dos canales principales para activar el flujo de calcio dentro de la célula, el primero es el COV del tipo-L, estos son activados por la despolarización de la membrana (Karaki *et al.*, 1997), el segundo es el CCR, que son activados por la unión de alguna hormona ó neurotransmisor agonista (Mc Fadzean *et al.*, 2002).

1.4.3.2 VÍA DE INACTIVACIÓN DE CANALES DE POTASIO

El canal de potasio de tipo BK_{Ca}^{+2} puede ser inactivado por la PCC, esta proteína evita la apertura del canal que provoca la hiperpolarización de la membrana causando la inhibición del canal de calcio tipo COV (Ledoux *et al.*, 2006).

1.4.3.3 VÍA ACTIVACIÓN DE IP_3

Esta vía puede ser activada por agonistas contráctiles acoplados a receptores muscarínicos (M_3), histamínicos (H_1), ET_A (Barnes *et al.*, 1998). Estos receptores están acoplados a proteínas tipo G, después de ser estimulados por sus respectivos agonistas contráctiles actúa sobre la PLC, resultando la hidrólisis del fosfatidilinositol y la formación del IP_3 y la acumulación de DAG, el IP_3 actúa como segundo mensajero mediando la liberación del calcio del RS, mientras el DAG activa la PCC, esta cumple con dos procesos dentro del citosol, el primero es el incremento en la sensibilidad del calcio y el segundo es la estimulación de la actividad de la fosfolipasa A2 (PLA2), que libera al AA para la síntesis de eicosanoides (Billington *et al.*, 2003; Thirstrup, 2000).

1.4.3.4 VÍA METABOLITOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO

Los compuestos derivados del AA en músculo liso traqueal presentan una alta potencia como compuestos contráctiles en el músculo liso de vías aéreas (Barnes *et al.*, 1998), la formación de prostaglandinas en músculo liso traqueal es más alta en este tejido en comparación a otros (Florio *et al.*, 1994). Los derivados del AA producen las prostaglandina tipo D2 (PGD_2), prostaglandina tipo $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) y tromboxano tipo A_2 (TxA_2), estos a su vez se unen a sus respectivos receptores, pero desarrollan la función de activar a los receptores de TP, ocasionando un incremento en la concentración intracelular de calcio (Page *et al.*, 2001; Mackay *et al.*, 2002).

1.5 FLAVONOIDES

1.5.1 DEFINICIÓN

Los compuestos flavonoides son un grupo de compuestos polifenólicos distribuidos en el reino de las plantas, se conocen acerca de 3000 variedades de estos compuestos, entre algunos de estos compuestos se destacan: flavonas, isoflavonas, flavonoles, flavononas (Raj *et al.*, 2001).

1.5.1.1 FLAVONAS

Las flavonas están constituidos por 15 carbonos en el núcleo básico, el cual consiste en dos anillos aromáticos unidos por tres carbonos, es decir un anillo bencénico condensado con un anillo de 6 miembros, mientras en la posición 2 tienen un anillo bencénico como sustituyente y un doble enlace entre los carbonos 2-3 como se ilustra en la Figura 5 (Tsukayama *et al.*, 2003).

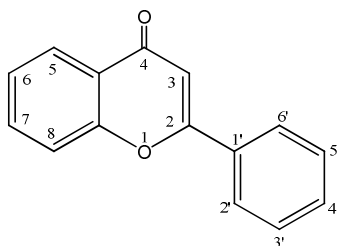


Fig. 5 Estructura general de las flavonas (Raj *et al.*, 2001).

1.5.2 EFECTOS FARMACOLÓGICOS

Los flavonoides presentan amplia variedad de actividades farmacológicas, las principales se encuentran enlistadas en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Efectos farmacológicos de las flavonas.

Uso terapéutico	Flavonoides
Actividad cardiotónica ⁺	Apigenina, Luteolina.
Actividad hepatoprotectora ⁺	Apigenina.
Actividad antioxidante ⁺	Apigenina, Baicaleina.
Actividad antiinflamatoria ⁺	Apigenina, Luteolina.
Actividad antibacterial ⁺	Baicaleina, Crisina.
Actividad antiviral ⁺	Apigenina, Crisina.
Actividad antifúngica ⁺	Apigenina
Actividad relajadora del MLV ⁺	Crisina, Apigenina
Actividad diurética ⁺⁺	Flavonoides
Actividad antiulcerosa ⁺⁺	Flavonoides
Actividad antialérgicas ⁺⁺	Flavonoides

⁺Raj *et al.*, 2001; ⁺⁺Tamotsu *et al.*, 1987.

Otra característica por la que se conoce a los flavonoides es por inhibir enzimas, por nombrar un caso en particular, la apigenina inhibe a las PDE-1, PDE-2 y PDE-3. El efecto encontrado fue de mayor magnitud sobre la PDE/AMPC que sobre la PDE/GMPc en una magnitud del 40% (Raj *et al.*, 2001; Ko *et al.*, 2004). En el Cuadro 2 se encuentran las principales acciones de las flavonas sobre enzimas.

Cuadro 2. Actividad sobre enzimas

Enzima	Acción
Aldosa reductasa*	Inhibe
Xantina oxidasa*	Inhibe
Fosfodiesterasas*	Inhibe
Ca -ATPasa*	Inhibe
Lipooxigenasa*	Inhibe
Ciclooxigenasa*	Inhibe
Fosfolipasa-C.*	Modula

* Raj *et al.*, 2001.

1.5.3 MÚSCULO LISO VASCULAR

Los flavonoides presentan una amplia gama de actividad biológica como vasodilatador (Duarte *et al.*, 2001; Saponara *et al.*, 2006). Compuestos como la morina y miristeina (flavonas) reducen la presión arterial, la frecuencia cardiaca, la hipertrofia cardiaca, la disfunción endotelial además de los efectos vasodilatadores (Duarte *et al.*, 2001).

Este efecto vasodilatador es independiente a la presencia del endotelio (Duarte *et al.*, 2001), además se ha encontrado que los flavonoides reducen la presencia de calcio y tiene efectos inhibitorios sobre las PDE que actúan sobre AMPC y GMPc (Herrera *et al.*, 1996). La crisina (5,7-dihidroxi flavona) y la apigenina (5,7,4'-trihidroxi flavona) tienen actividad vasodilatadora mayor que la actividad relajante de otros compuestos flavonoides como flavonoles y flavononas (Herrera *et al.*, 1996).

Se ha encontrado que la crisina interviene sobre las fosfodiesterasas que actúan sobre el GMPc, y a su vez se ha demostrado que cuando actúa junto con otros bloqueadores de canales de calcio como la nifedipina no se encuentra diferencia en su efecto, por lo que no se le atribuye la propiedad de bloquear los canales de calcio (Herrera *et al.*, 1996; Villar *et al.*, 2004).

De los efectos descritos para la apigenina está la acción sobre los canales de calcio operados por voltaje tipo L y los canales de potasio (Chan *et al.*, 2000; Li *et al.*, 1997). Otro efecto de la apigenina es la acción sobre los receptores de tromboxano que es un agente causante de contracción en el músculo liso (Guerrero *et al.*, 2007). Además inhibe a la proteína cinasa C encargada de la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina lo que provoca la contracción (Zhang *et al.*, 2002).

1.5.4 MÚSCULO LISO DE VÍAS AÉREAS

La naringina presenta acción en el MLA por la activación de los canales de potasio (Saponara *et al.*, 2006), la apigenina al igual que la crisina presentan actividad relajante del músculo liso traqueal (Ko *et al.*, 2003). Al igual que en el músculo liso vascular las flavonas tienen un efecto inhibitorio sobre las PDE's con la consecuente elevación de los niveles intracelulares de AMPc y GMPc para que ocurra un efecto relajante del músculo liso traqueal (Cortijo *et al.*, 2001).

1.6 SÍNTESIS DE FLAVONAS

Existen varias alternativas para construir el sistema base de las flavonas; una de estas secuencias de síntesis consiste en la obtención de la apropiada *o*-hidroxiacetofenona, posteriormente mediante una reacción de condensación tipo aldólica entre la *o*-hidroxiacetofenona y un benzaldehído se obtiene una chalcona, la cual por una ciclización oxidativa de ésta, se obtiene la correspondiente flavona (Gray *et al.*, 2003; Lokhande *et al.*, 2005).

De manera particular la 2-hidroxi-4,6-dimetoxiacetofenona se obtiene mediante la síntesis de Williamson (Figura 6), la cual consiste en una sustitución nucleofílica bimolecular (S_N2), en donde se puede utilizar una diversa gama de reactivos como los halogenuros de alquilo, sulfatos de alquilo ó sulfatos de dialquilo, que reaccionan con un alcoholóido para formar finalmente un éter (McMurry *et al.*, 2001).

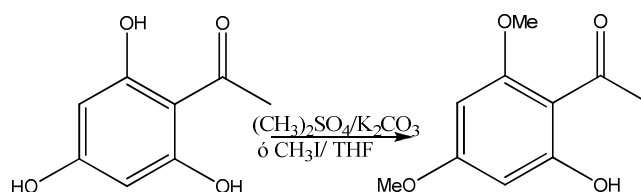


Fig. 6 Reacción de Williamson (Gray *et al.*, 2001).

El segundo paso para la síntesis, es la formación de chalconas, básicamente consiste en su formación por medio de o-hidroxiacetofenonas y benzaldehídos por condensación aldólica, ésta se da cuando un aldehído (con hidrógenos alfa) se trata con una base como el etóxido de sodio ó hidróxido de sodio. Esta es una reacción de condensación rápida y reversible dando como producto un β -hidroxialdehído o aldol. Esta reacción es general para todos los aldehídos y cetonas que tengan un hidrogeno alfa. Posteriormente cuando se encuentra con un exceso de base, el aldol puede sufrir una deshidratación, con lo que se produce un ion enolato que expulsa al grupo saliente (hidroxilo) y así forma el doble enlace entre el carbono alfa y el carbono beta, como se esquematiza en la Figura 7 (Solomons, 2000).

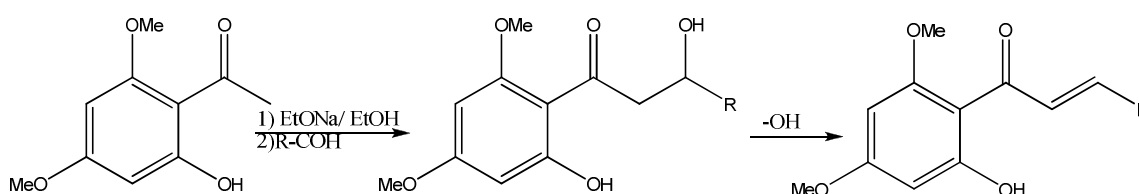


Fig. 7 La reacción de condensación aldólica.

Una vez formada la chalcona, la ruta de síntesis de flavonas es variada, de acuerdo a los sustituyentes requeridos en el producto final. Una de ellas es pasar de chalcona a flavonona y posteriormente a flavona (Figura 8) (Benett *et al.*, 1998), o bien mediante una reacción de condensación (Figura 9) ó por medio de una ciclización oxidativa (Figuras 10, 11).

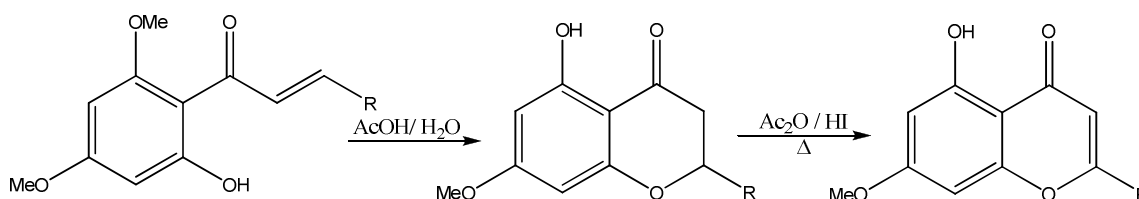


Fig. 8 La reacción para formación de flavonas (Gray *et al.*, 2003).

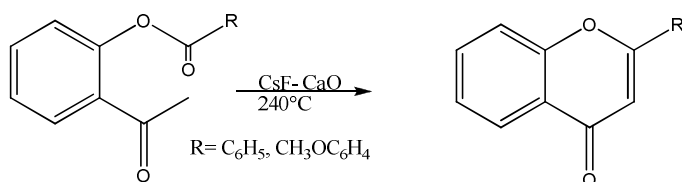


Fig. 9 Reacción de condensación para la formación de flavonas (Villemin *et al.*, 2001).

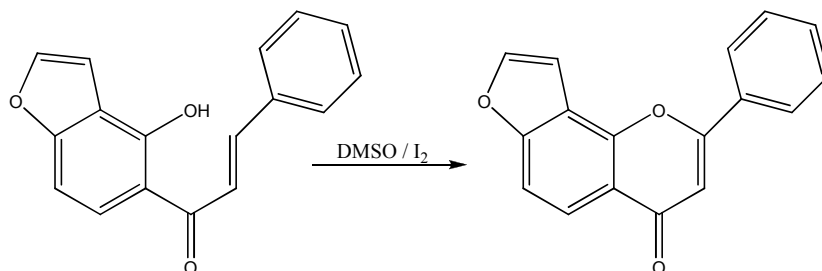


Fig. 10 Reacción de ciclización oxidativa (Sayed *et al.*, 2004; Lokhande *et al.*, 2005).

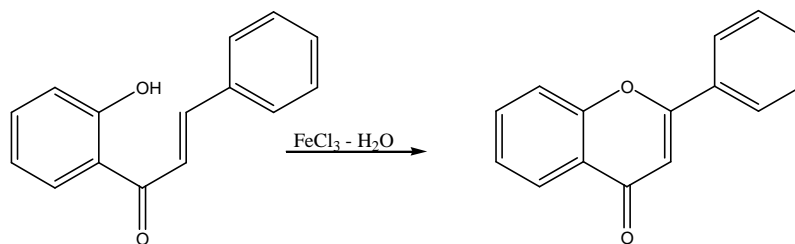


Fig. 11 Reacción de ciclización oxidativa para la síntesis de flavonas (Ahmed *et al.*, 2007).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día los padecimientos como la hipertensión arterial y la enfermedad pulmonar crónica obstructiva (EPOC) por mencionar algunos, son causados por la constricción del músculo liso, los tratamientos que se encuentran hoy en día, no curan la enfermedad solo la controlan acarreado efectos secundarios que limitan su uso, además de no ser eficaces para todo tipo de pacientes. A consecuencia de lo antes expuesto se presenta la necesidad de descubrir nuevos fármacos que presenten nuevas opciones terapéuticas a estos padecimientos, las flavonas como la apigenina y crisina presentaron actividad sobre estos padecimientos, sin embargo para obtenerlos en forma natural mediante extracciones, resulta en un proceso largo y costoso, aunado a que se encuentra en concentraciones muy bajas en la fuente natural. Por lo que es necesario obtener compuestos análogos a la crisina y apigenina mediante una ruta sintética óptima, de corto procedimiento y alto rendimiento químico con el fin de obtener flavonas bioactivas que pudieran ser utilizadas en el tratamiento de las enfermedades contráctiles del músculo liso vascular y músculo liso de vías aéreas.

3. HIPÓTESIS

La síntesis de trimetilapigenina y dimetilcrisina se llevará a cabo a partir de la metilación de 2,4,6-trihidroxiacetofenona por la reacción de Williamson seguida de la condensación aldólica entre 2-hidroxi-4,6-dimetoxiacetofenona y el benzaldehído correspondiente para obtener las chalconas correspondientes, de las cuales se obtendrán las flavonas por ciclización oxidativa. Dichas flavonas presentarán efecto relajante sobre el músculo liso aislado de tráquea de cobayo y de aorta de rata considerando que son compuestos análogos a la apigenina y crisina que poseen esta actividad.

4. OBJETIVO GENERAL

Sintetizar la trimetilapigenina (4',5,7-trimetoxiflavona) y la dimetilcrisina (5,7-dimetoxiflavona) y valorar su actividad relajante sobre el músculo liso traqueal de cobayo y vascular de rata en un sistema in vitro, además de explorar el mecanismo de acción relajante de ambos compuestos en los mismos sistemas biológico.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar la 4',5,7-trimetilapigenina y la 5,7-dimetilcrisina partiendo de 2,4,6-trihidroxiacetofenona.
- Evaluar la actividad relajante de las flavonas sobre MLA en el modelo de tráquea aislada de cobayo.
- Evaluar la actividad relajante de las flavonas sobre MLV en el modelo de aorta aislada de rata.
- Evaluar el efecto inhibitorio de las flavonas sobre las contracciones inducidas con calcio en el tejido en donde su actividad relajante sea mayor.
- Evaluar la inhibición de actividad hidrolítica de fosfodiesterasas sobre AMPc y GMPc para la flavona más potente.

5. METODOLOGÍA

5.1 SÍNTESIS ORGÁNICA

5.1.1 EQUIPOS

La espectrometría de masas (EM), se realizó en un espectrómetro Hewlett-Packard modelo 5890; la espectroscopía de infrarrojo (IR) en un espectrómetro Perkin Elmer modelo 599 y la de Resonancia Magnética Nuclear (^1H y ^{13}C RMN) en los espectroscopios Varian VXR-3005 (300 MHz) y Varian Unity Plus 500 (75 MHz) respectivamente. El punto de fusión no corregido se determinó en un electrothermal Digital IA9100.

5.1.2 ESQUEMA GENERAL DE SÍNTESIS

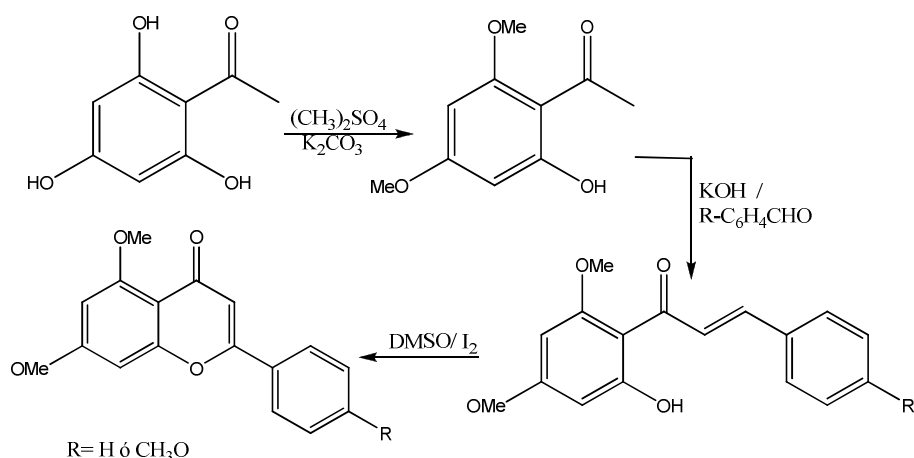


Fig. 12 Ruta general de síntesis para la TMA ò DMC

5.1.3 PROCEDIMIENTO

5.1.3.1 SÍNTESIS DE 2-HIDROXI-4,6-DIMETOXIACETOFENONA

Una disolución de 10 g de 2,4,6-trihidroxiacetofenona (Aldrich), 6 mL de sulfato de dimetilo (Aldrich) y 5 g de carbonato de potasio anhidro (J.T Baker) en 90 mL de tolueno, se agitó mecánicamente y se calentó a temperatura de reflujo por un periodo de 5 horas. Finalizado este tiempo, la disolución se filtró con vacío y el líquido resultante se evaporó a presión reducida en un rotavapor.

El sólido obtenido se disolvió con 25 mL de hexano y se le adicionó carbón activado, se filtró por gravedad y se dejó cristalizar a una temperatura de 4°C.

5.1.3.2 SÍNTESIS DE CHALCONAS

a. 2-HIDROXI-4',4,6-TRIMETOXICHALCONA

A una mezcla de 4.7 g de 2-hidroxi-4,6-dimetoxiacetofenona y 3 mL de 4-metoxibenzaldehído (Merck) se le agregaron 15 mL de una disolución de KOH al 20% en etanol. Se mantuvo en agitación mecánica por un periodo de 72 horas.

Una vez terminada la reacción, se adicionaron 20 mL de agua fría, y posteriormente 20 mL de HCl al 20% para llevar a medio ácido, seguida de tres extracciones colocando 20 mL de acetato de etilo en cada una y colectando la fase orgánica, ésta se secó con sulfato de sodio anhidro, y se filtró. El líquido obtenido se concentró en el rotavapor hasta sequedad, posteriormente al sólido obtenido se le adicionaron 30 mL de hexano y se calentó hasta disolver, así se dejó cristalizar por 24 horas a una temperatura de 4°C.

b. 2-HIDROXI-4,6- DIMETOXICHALCONA

En un matraz balón se colocaron 4.7 g de 2-hidroxi-4,6-dimetoxiacetofenona y se mezclaron con 3 mL de benzaldehído (Merck), se agregaron también 15 mL de una disolución de KOH al 20% en etanol. Se mantuvo en agitación mecánica durante 72 horas a temperatura ambiente.

Una vez terminada la reacción, se adicionaron 20 mL de agua fría, y posteriormente 20 mL de HCl al 20% para llevar a medio ácido, seguida de tres extracciones colocando 20 mL de acetato de etilo en cada una y colectando la fase orgánica, ésta se secó con sulfato de sodio anhidro, y se filtró. El líquido obtenido se concentró en el rotavapor hasta sequedad, posteriormente al sólido obtenido se le adicionaron 30 mL de una mezcla de hexano-acetato de etilo 2:1 y se calentó hasta disolver, así se dejó cristalizar por 24 horas a una temperatura de 4°C.

5.1.3.3 SÍNTESIS DE FLAVONAS

a. TRIMETILAPIGENINA (4',5,7- TRIMETOXIFLAVONA)

Se colocaron en un matraz balón 500 mg de 2-hidroxi-4',4,6-trimetoxichalcona, junto con 15 mL de dimetilsulfóxido (DMSO), 8 mL de agua y tres cristales de yodo (J.T Baker). La mezcla se puso a reflujo con agitación mecánica por una hora en un baño de aceite, se dejó reposar por 48 h. El sólido se filtró con vacío y se lavó con una disolución acuosa de tiosulfato de sodio al 20%. El sólido final se purificó por cristalización con acetato de etilo.

b. DIMETILCRISINA (5,7-DIMETOXIFLAVONA)

Se colocaron en un matraz balón 300 mg de 2-hidroxi-4,6-dimetoxichalcona, junto con 8.5 mL de DMSO, 4 mL de agua y dos cristales de yodo. La mezcla se colocó a reflujo con agitación mecánica por una hora en un baño de aceite, se dejó reposar por 48 h. El sólido se filtró con vacío y se lavó con una disolución acuosa de tiosulfato de sodio al 20%. El sólido final se purificó por cristalización con acetona.

5.2 EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

5.2.1 ANIMALES

Para el modelo de tráquea aislada se utilizaron cobayos machos con un peso promedio de 400-450 g (Biosupply S.A. de C.V.), alimentados con una dieta estándar (Purina Pellets) y con libre acceso de agua.

Para el modelo de aorta aislada fueron utilizadas ratas Wistar machos con peso promedio de 175-200 g (Harlan México, S.A. de C.V.), alimentados bajo una dieta estándar (Purina Pellets) y con libre acceso de agua.

Todos los procedimientos en los que se utilizaron estos animales fueron seguidos de acuerdo con los lineamientos marcados en la Norma Oficial Mexicana 062- ZOO-1999.

5.2.2 FÁRMACOS

Los fármacos cloruro de carbamilcolina (Carbacol), cloruro de acetilcolina, (-)-Norepinefrina (L-Noradrenalina), fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Los fármacos fueron disueltos en agua destilada, las disoluciones fueron preparadas el mismo día del experimento.

5.2.3 MODELO ENZIMÁTICO

Los sustratos 3',5'-AMPc y el 3',5'-GMPc se prepararon a una concentración de 1 mM en disolución reguladora (10 mM Tris-HCl, pH 7.4). La 5'-Nucleotidasa se preparó a 5 KU/ μ L (1U libera 1 pmol de fosfato), en 10 mM Tris-HCl a pH 7.4, 125 mM NaCl, 10% glicerol, 1 mM MgCl₂. El isobutilmetilxantina (IBMX) se preparó a una concentración de 40 μ M en disolución reguladora de 10 mM Tris-HCl, pH 7.4. La trimetilapigenina (TMA) se preparó a una concentración de 300 μ M en una mezcla Acetonitrilo:Agua (1:1). La PDE se preparó a una concentración de 4 mU/ μ L en disolución reguladora (1U transforma 1 nmol de sustrato a 5-nucleotidasa) (BIOMOL GREEN™ QuantiZyme™ Assay System AK-800).

5.2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores de CE₅₀ fueron calculados por el método de regresión lineal (Tallarida, 2000). Los datos se presentan como la media \pm el error estándar de la media de seis animales por grupo como mínimo. Las diferencias significativas entre dos determinaciones se analizaron con una prueba t de Student no pareada. Las diferencias entre varias determinaciones se realizaron utilizando un análisis de varianza de una vía (Montgomery, 1991). El valor del pA'₂ fue calculado de acuerdo con la ecuación de Schild (Tallarida, 2000).

5.2.5 EFECTO RELAJANTE EN EL MÚSCULO LISO TRAQUEAL

Los cobayos se sacrificaron mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (95mg/Kg), posteriormente se realizó la disección de la tráquea, limpiándola del tejido conectivo. El órgano se mantuvo en una disolución de Krebs cuya composición fue: NaCl 27.61 g, KCl 1.4 g, CaCl₂ 2H₂O 1.47 g, MgSO₄ · 7H₂O 1.18 g, NaH₂PO₄ · H₂O 0.662 g, NaHCO₃ 8.4 g y glucosa 7.992 g, esto en 4 L de agua destilada, se mantuvo a temperatura constante de 37 °C, y con burbujeo constante con gas carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂). Posteriormente se fraccionó en ocho anillos

de aproximadamente 2 mm de espesor, cada uno se colocó en una cámara para órgano aislado con 10 mL de disolución Krebs.

Las muestras se suspendieron entre dos ganchos de alambre de nicromel, uno de los extremos se fijó a la cámara y el otro al transductor de fuerza (GRASS FT 03E) conectado a un polígrafo Biopac System que permitió obtener los datos mediante el programa Acqknowledge MP100 versión 3.9.0.

El órgano se sometió a una tensión inicial de 1.5 g y se dejó estabilizar por una hora, se realizaron lavados cada 15 minutos con la disolución Krebs, después de este periodo el tejido se estimuló nuevamente con acetilcolina 3 μ M lavando inmediatamente con disolución de Krebs fresca, a los 30 minutos se contrajo el tejido con carbacol 3 μ M y se procedió a adicionar en concentraciones acumulativas la disolución de apigenina, trimetilapigenina (TMA) y dimetilcrisina (DMC) a las concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ M adicionándolas de menor a mayor concentración.

5.2.6 EFECTO RELAJANTE EN EL MÚSCULO LISO VASCULAR

Las ratas wistar se sacrificaron mediante cámara de gases (CO_2), posteriormente se realizó la disección de la aorta, limpiándola del tejido conectivo. El órgano se mantuvo en una disolución de Krebs cuya composición fue: NaCl 27.61 g, KCl 1.4 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.47 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.18 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.662 g, NaHCO_3 8.4 g y glucosa 7.992 g, esto en 4 L de agua destilada, se mantuvo a temperatura constante de 37°C, y con burbujeo constante de gas carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2). Posteriormente se fraccionó en ocho anillos de aproximadamente 2 mm de espesor, cada uno se colocó en una cámara para órgano aislado con 10 mL de disolución Krebs.

Las muestras se suspendieron entre dos ganchos de alambre de nicromel, uno de los extremos se fijó a la cámara y el otro al transductor de fuerza (GRASS FT 03E) conectado a un polígrafo Biopac System que permitió obtener los datos mediante el programa Acqknowledge MP100 versión 3.9.0.

La preparación se sometió a una tensión inicial de 4 g y se dejó estabilizar por una hora, realizando lavados cada 15 minutos con la disolución de Krebs por este periodo. El tejido se estimuló con noradrenalina 1 μ M durante dos ocasiones en intervalos de 30 minutos. En el primer intervalo se lavó con la disolución de Krebs, en el segundo intervalo se relajó con acetilcolina 1 μ M. La tercera estimulación se realizó

nuevamente con noradrenalina 1 μM y se procedió a relajar con disoluciones de apigenina, trimetilapigenina (TMA) y dimetilcrisina (DMC) a las concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μM adicionándolas de menor a mayor concentración.

5.2.7 EFECTO RELAJANTE EN EL MÚSCULO LISO VASCULAR SIN ENDOTELIO

Para este modelo se siguió el mismo procedimiento de sacrificio de la rata, y aislamiento de la aorta solamente que a cada anillo obtenido se le introdujo un tubo capilar y este se giró manteniendo el anillo fijo con el fin de dañar el endotelio, en la segunda estimulación se relajó con acetilcolina 1 μM (los anillos con una relajación inferior al 80% se clasificaron como sin endotelio). La tercera estimulación se realizó nuevamente con noradrenalina 1 μM y se procedió a relajar con disoluciones de trimetilapigenina (TMA) y dimetilcrisina (DMC) a concentraciones de 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μM adicionándolas de menor a mayor concentración.

5.2.8 EFECTO DE INHIBICIÓN DE ENTRADA DE CALCIO

El sacrificio del animal y el periodo de estabilización del tejido se realizó de la misma forma que en el procedimiento anterior.

A esta muestra, pasada la estabilización del tejido se le estimuló con noradrenalina 1 μM en el minuto 60, y se relajó con lavados de la disolución de Krebs. Posteriormente a los 15 minutos se adicionó la disolución despolarizante de KCl 80 mM la cual contenía: NaCl 3.5 g, KCl 4.46 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.30 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.16 g, NaHCO_3 2.1 g y glucosa 2 g. Finalmente se lavó con la disolución Krebs modificada (sin CaCl_2). Este procedimiento se repitió en cuatro ocasiones, en la última despolarización con la disolución de KCl se colocaron 100 μL de las soluciones de CaCl_2 a las concentraciones de: 0.1, 0.31, 1.0, 3.16, 10 mM, y se adicionaron de menor a mayor concentración. Se siguió el procedimiento de despolarización anterior (1 hora y 4 despolarizaciones). En la última despolarización se colocaron las soluciones de cada una de las flavonas a las concentraciones siguientes: para DMC 0.1, 1, 10, 100 μM , para TMA 20, 40, 80, 316 μM , en cada una de las concentraciones se empleó en una cámara diferente.

5.2.9 EFECTO INHIBITORIO DE FOSFODIASTERASAS (PDE)

La preparación de las muestras se llevó a cabo en una microplaca de 96 pozos, cada prueba se realizó por duplicado, y las pruebas se realizaron en dos ocasiones usando en cada una un sustrato diferente (GMPc ó AMPc), el procedimiento que se llevó a cabo se resume en el Cuadro 3. Al término de la adición de los reactivos se dejó incubando las muestras por 60 minutos a 37 °C. Después del tiempo de incubación, a las muestras se les adicionó 100 μ L de BIOMOL GREEN™ y se agitaron por unos segundos, se esperó 30 minutos para que desarrollara color y se leyeron las absorbancias a una longitud de onda de 620 nm en un lector de placas (BIO-RAD Mod. 680 microplate reader).

Cuadro 3. Preparación de muestras

Reactivos Prueba	Sustrato (0.5 mM)	Disolución Reguladora	5'-nucleotidasa	Prueba	PDE
Control	20 μ L	15 μ L	10 μ L	0 μ L	5 μ L
TMA	20 μ L	5 μ L	10 μ L	10 μ L	5 μ L
IBMX	20 μ L	5 μ L	10 μ L	10 μ L	5 μ L

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS

6.1 SÍNTESIS ORGÁNICA

2-Hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona. Para la síntesis de los compuestos flavonoides se realizó la síntesis de la 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona, en esta reacción de eterificación de Williamson de la 2, 4, 6-trihidroxi-acetofenona. Se obtuvieron 4.9 g (rendimiento del 42%) como un polvo blanco; p.f. 77- 79 °C; R_F 0.64 (Hexano:Acetato de etilo, 3:1). El punto de fusión y el R_F de este compuesto coincidieron con los reportados en la literatura para la 2-hidroxi-4,6-dimetoxi-acetofenona (Gray *et al.*, 2003).

2-Hidroxi-4',4,6-trimetoxichalcona. El siguiente compuesto a sintetizar fue la 2-Hidroxi-4',4,6-trimetoxichalcona, intermediario para la síntesis de la TMA, de esta reacción de condensación aldólica se obtuvieron 2.8 g (rendimiento del 37.2%), de unos cristales amarillos, p.f. 113-114 °C; R_F 0.42 (Hexano: Acetato de etilo, 8.5:1.5); RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 3.84 (s, 3H), 3.86 (s, 3H), 3.92 (s, 3H), 5.97 (d, 1H, J = 2.40 Hz), 6.11 (d, 1H, J = 2.39 Hz), 6.93 (d, 2H, J = 8.85 Hz), 7.57 (d, 2H, J = 8.86 Hz), 7.799(s, 2H), 14.431(s, 1H); RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 192.6, 168.3, 165.9, 162.4, 161.3, 142.5, 130.1, 128.6, 125.1, 114.3, 93.7, 91.2, 55.8, 55.6, 55.4. Las señales obtenidas en el estudio de RMN¹³C son semejantes a las reportadas en la literatura. Con respecto al estudio de RMN¹H las señales coinciden con el número de hidrógenos presentes en la molécula, así como en sus desplazamientos y constantes de acoplamiento, y corresponden a los reportados en la literatura, así también los datos coinciden con los reportados en la literatura sobre el punto de fusión y el R_F (Smith *et al.*, 2007).

2-Hidroxi-4,6-dimetoxichalcona. Este compuesto es el intermediario en la síntesis de la DMC, y se obtuvo 1.93 g (rendimiento del 28.3%), p.f. 102-104 °C, R_F 0.2 (Hexano:Acetato de etilo, 1:2). El punto de fusión y el R_F de este compuesto fueron iguales a los reportados en la literatura (Cabrera *et al.*, 2007).

Trimetilapigenina. La TMA fue la que se logró obtener con un mayor rendimiento mediante la reacción de ciclización oxidativa. Se aislaron 195 mg (rendimiento del 39.31%), de un polvo blanco, p.f. 153-155 °C, R_F 0.10 (Hexano:Acetato de etilo, 1:2); UV: $\lambda_{m\acute{a}x}$. nm (MeOH) 266; IR (KBr): $\nu_{m\acute{a}x}$.(cm⁻¹) 2930.09 C-H de compuestos aromáticos, 1643.37 carbonilo de cetonas, 1605 doble enlace C=C, 831.38 C-C aromáticos; RMN¹H (300 MHz, CDCl₃) δ 3.88 (s, 3H, OCH₃), 3.91 (s, 3H, OCH₃), 3.95 (s, 3H, OCH₃), 6.37 (d,1H,

$J = 2.30$ Hz, H-6), 6.56 (d, 1H, $J = 2.31$ Hz, H-8), 6.59 (s, 1H, H-3), 7.00 (d, 2H, $J = 9.02$ Hz, Ar-H), 7.82 (d, 2H, $J = 9.04$ Hz, Ar-H). RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 177.7, 163.8, 161.9, 160.8, 160.6, 159.8, 127.6, 123.8, 114.3, 109.1, 107.6, 96.0, 92.7, 56.4, 55.7, 55.4; EM(IE) $m/z(\%)$: 312 [100, M⁺], 311(67), 283(35), 266(39), 132(30). Estos resultados corresponden a los reportados en la literatura (Smith *et al.*, 2007).

Dimetilcrisina. En la síntesis de DMC mediante la reacción de ciclización oxidativa, solo se obtuvo un rendimiento del 28.74%, de unos cristales amarillos (80 mg), p.f. 143-145 °C, R_F 0.14 (Hexano:Acetato de etilo, 1:2); UV: $\lambda_{\text{máx.}}$ nm (MeOH) 264.3; IR (KBr): $\nu_{\text{máx.}}$ (cm⁻¹) 2948.29 C-H de compuestos aromáticos, 1621.26 carbonilo de cetonas, 1595.23 doble enlace C=C, 828.03 C-C aromáticos; RMN ¹H (300MHz, CDCl₃) δ 3.86 (s, 3H, OCH₃), 3.93 (s, 3H, OCH₃), 6.18 (d, 1H, $J=2.93$ Hz, H-6), 6.35 (d, 1H, $J=2.17$ Hz, H-8), 6.42 (s, 1H, H-3), 7.60 (m, 3H, Ar-H), 7.63 (m, 2H, Ar-H); RMN¹³C (75 MHz, CDCl₃) δ 176.5, 163.9, 160.8, 159.9, 152.5, 131.9, 130.9, 129.2, 125.6, 114.3, 110.1, 96.0, 92.7, 56.2, 55.6; EM(IE) $m/z(\%)$: 282 [100, M⁺], 268(80), 181(64), 154(46), 105(58). Los resultados coinciden con los reportados (Shin *et al.*, 1999).

Los espectros de IR, RMN, EM y cromatogramas por HPLC se muestran en el apéndice 1.

6.2 EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

6.2.1 EFECTO RELAJANTE EN EL MÚSCULO LISO TRAQUEAL

La apigenina, TMA y DMC presentaron una relajación máxima del 40%, como se muestra en la Figura 13, por lo que no fue posible calcular la CE_{50} . Para la apigenina Ko *et al.* (2003) reporta un valor de CE_{50} de $47.3 \pm 5.7 \mu\text{M}$, sin embargo en nuestro experimento no se reprodujo este resultado, posiblemente por el tratamiento previo con indometacina que dan esos autores a la tráquea con el fin de inhibir las prostaglandinas contráctiles presentes en el endotelio, de tal forma que no afecten el efecto relajante (Ko *et al.*, 2003; Farmer, 1987). El tratamiento previo con indometacina no es determinante para la evaluación del efecto relajante de una sustancia en el modelo de tráquea aislada de cobayo (Sánchez-Mendoza *et al.*, 2007), sin embargo existe la posibilidad de que al no realizar el tratamiento previo con indometacina el efecto relajante de la apigenina se vea disminuido.

Otros estudios en tráquea de cobayos han demostrado que cuando no hay endotelio se incrementa la respuesta relajante del músculo liso traqueal (Farmer, 1987). También se ha encontrado que la producción de PG son significativamente altas en tráquea y tejido bronquial de cobayo comparado con otros animales (Florio *et al.*, 1994). No obstante, se ha reportado que los flavonoides tienen actividad antiinflamatoria inhibiendo la biosíntesis de prostaglandinas (Nijveldt *et al.*, 2001). Por lo que se puede llegar a dilucidar que las prostaglandinas contráctiles alteran el efecto de relajación en el MLA, y por lo mismo para quitar esta interferencia, es necesario retirar el endotelio o preparar la muestra con indometacina, para llegar a tener una respuesta óptima.

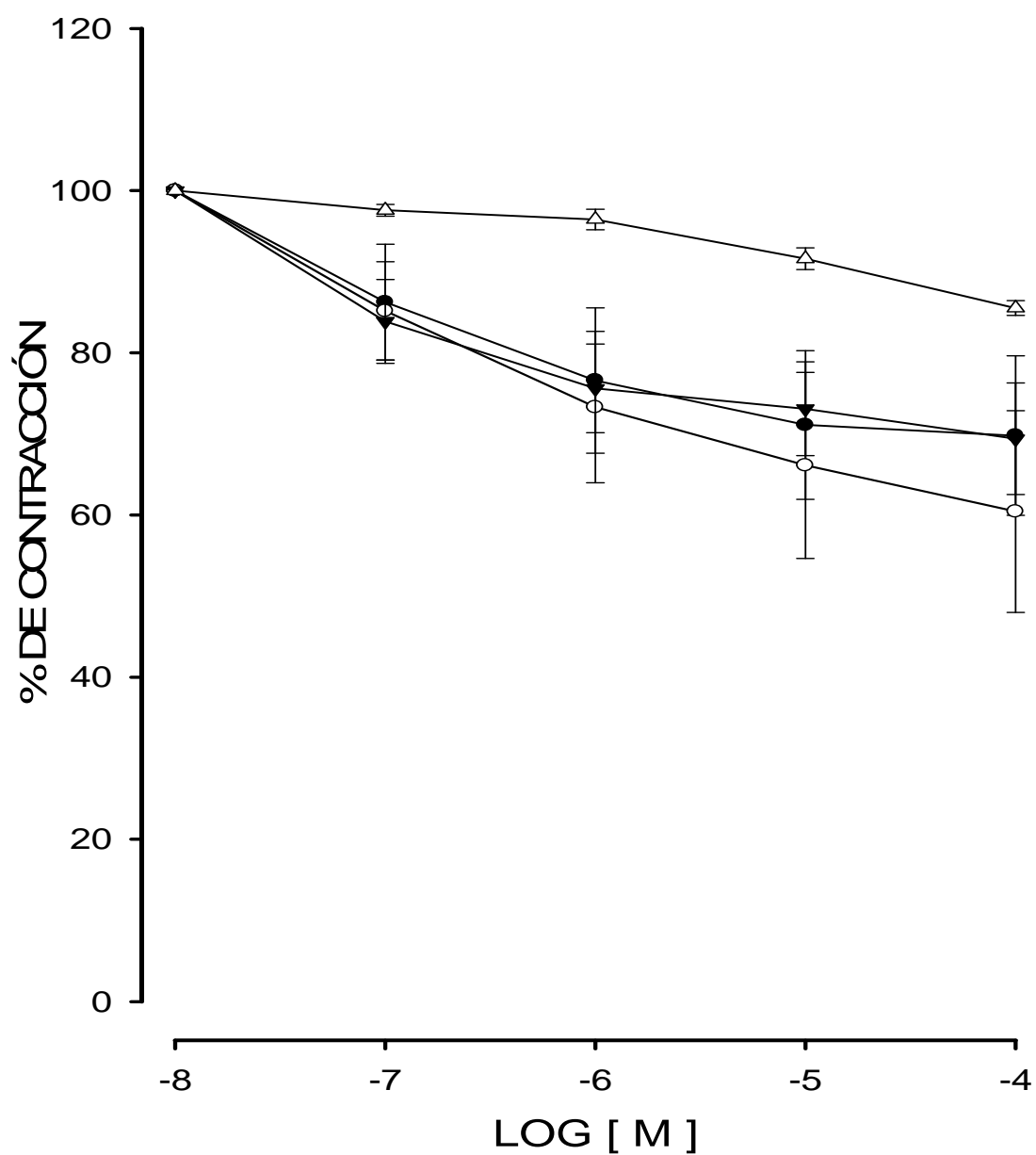


Fig. 13 Efecto relajante en MLT de TMA (○), DMC (●), apigenina (▼), control (Δ). Cada punto representa el promedio de la media \pm EEM de al menos seis repeticiones independientes.

6.2.2 EFECTO RELAJANTE EN EL MÚSCULO LISO VASCULAR

La apigenina mostró un efecto relajante sobre el músculo liso vascular precontraído con noradrenalina 1 μM con endotelio íntegro como se puede observar en la Figura 14 ($\text{CE}_{50} = 1.39 \pm 0.59 \mu\text{M}$). Anteriormente se ha demostrado que la actividad relajante de este flavonoide no es dependiente de endotelio (Zhang *et al.*, 2002).

La DMC y la TMA mostraron un efecto relajante del músculo liso vascular no dependiente de endotelio como se puede observar en la Figuras 15 y 16 respectivamente. La CE_{50} de DMC con endotelio intacto tiene un valor de $\text{CE}_{50} = 6.03 \pm 3.66 \mu\text{M}$ y sin endotelio tiene una $\text{CE}_{50} = 15.64 \pm 12.21 \mu\text{M}$. En tanto que para la TMA con endotelio intacto se obtuvo una $\text{CE}_{50} = 1.16 \pm 0.26 \mu\text{M}$ y sin endotelio de $\text{CE}_{50} = 2.75 \pm 0.86 \mu\text{M}$. El análisis de varianza de una vía, demostró que no existe diferencia significativa entre el efecto relajante de DMC y TMA en el tejido vascular. El análisis estadístico por una t-Student no pareada de la relajación en presencia o ausencia de endotelio demostró que no existe diferencia significativa entre las dos condiciones del tejido, lo cual nos indica que el mecanismo farmacológico de relajación no involucra la activación o aumento de moduladores endoteliales.

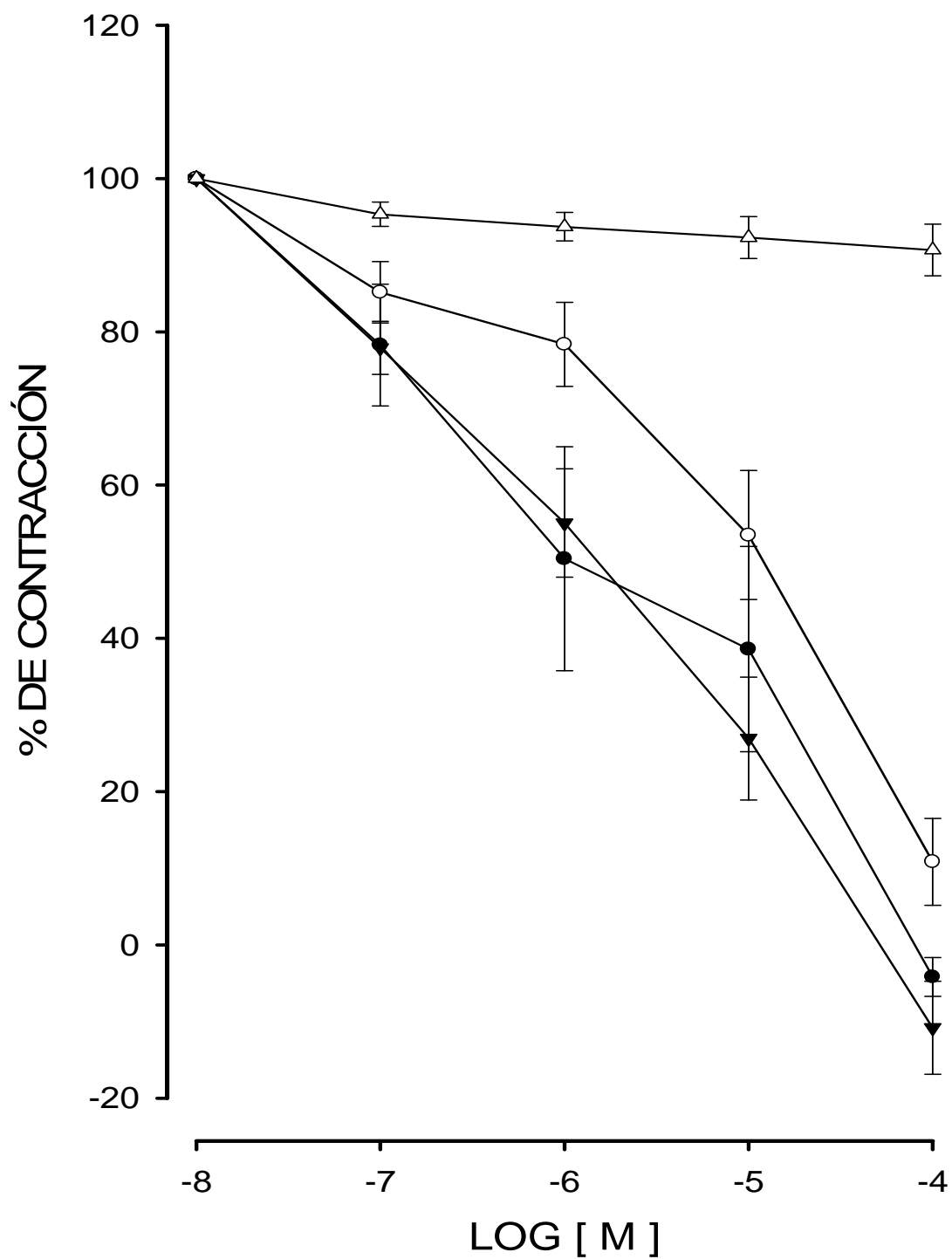


Fig. 14 Efecto relajante en MLV de TMA (▼), DMC (○), apigenina (●), control (Δ). Cada punto representa el promedio de la media \pm EEM de al menos seis repeticiones independientes.

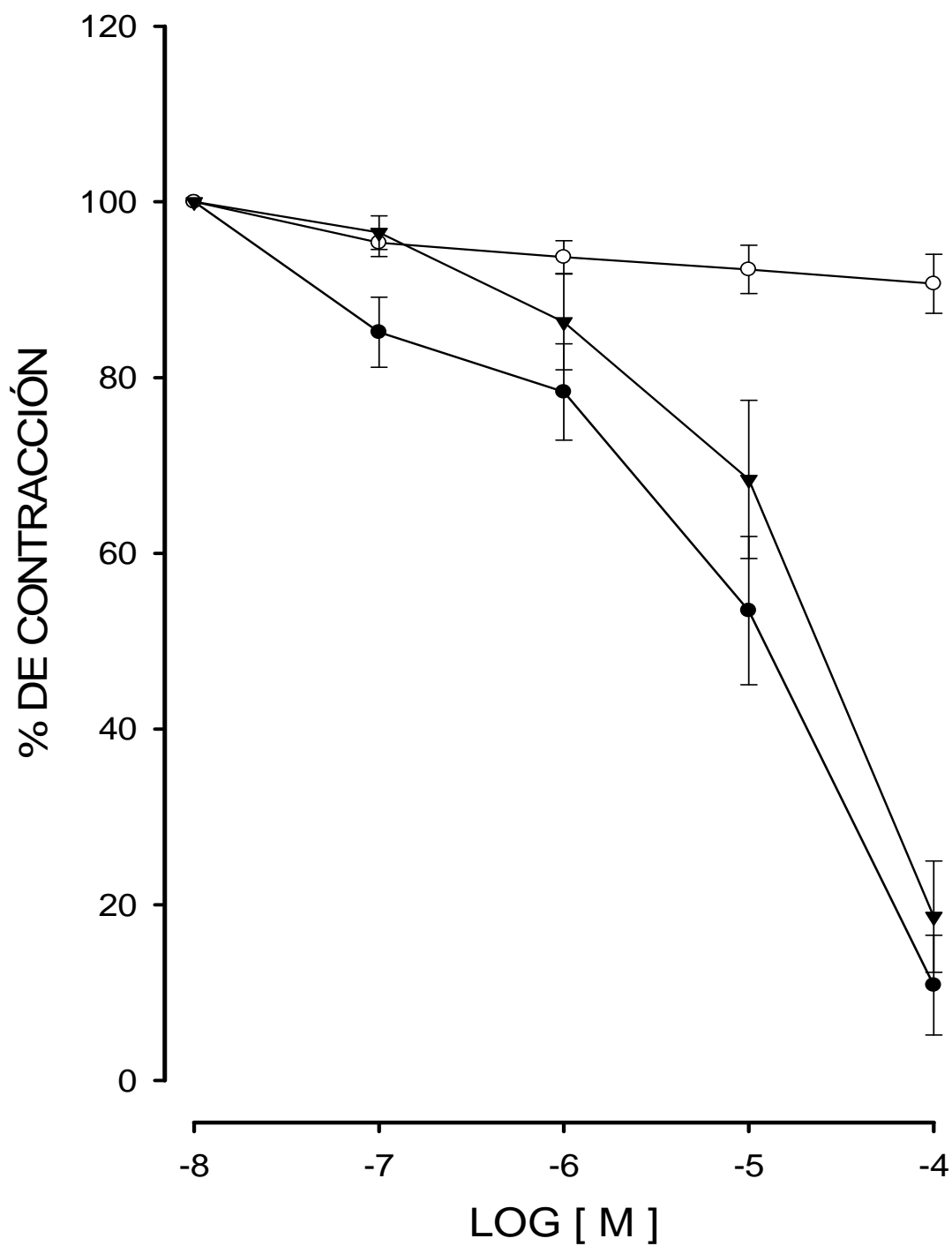


Fig. 15 Efecto relajante en MLV de DMC en presencia (●) ó ausencia (▼) de endotelio, así como su control (○). Cada punto representa el valor de la media \pm EEM de seis repeticiones independientes.

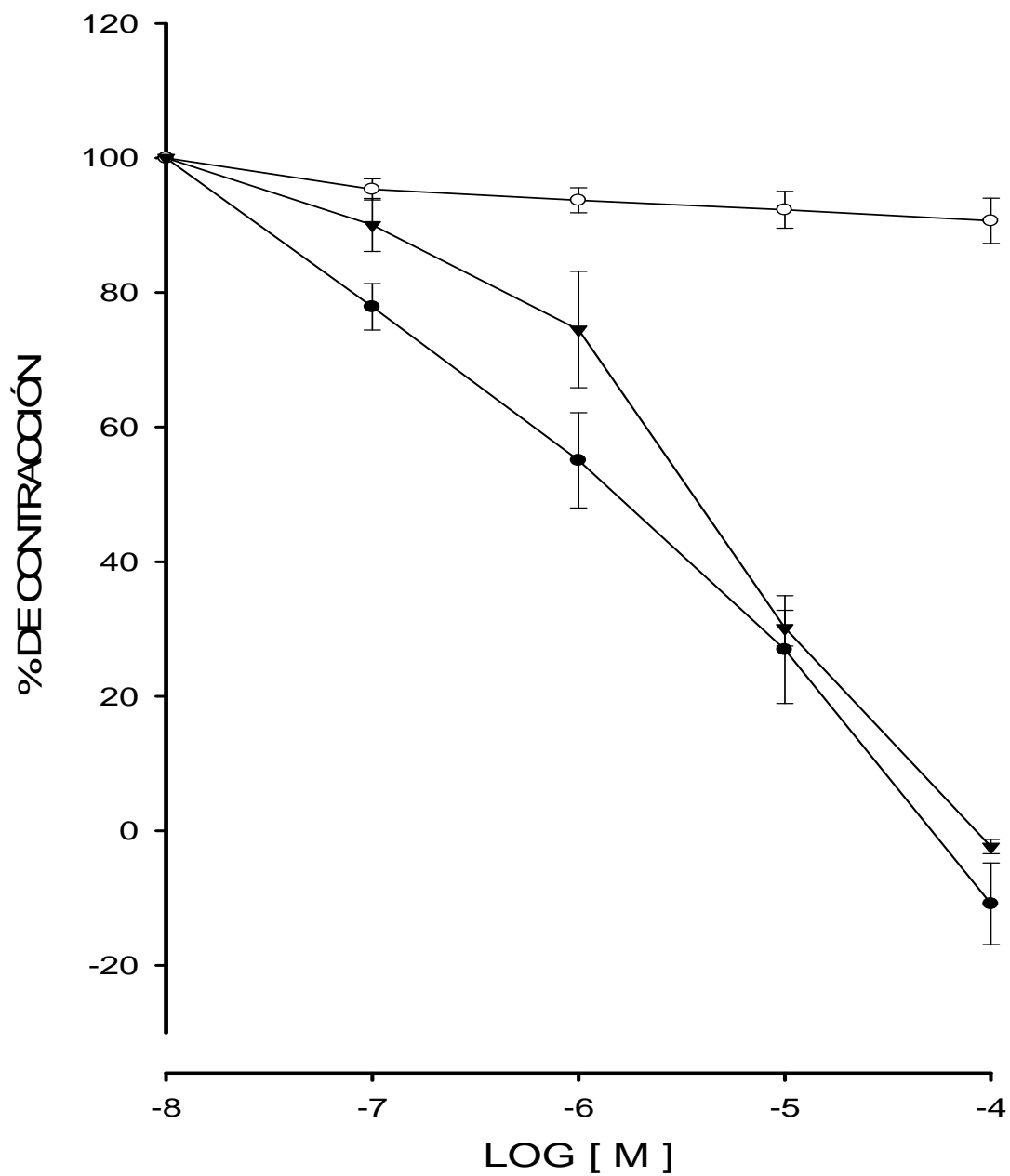


Fig. 16 Efecto relajante en MLV de TMA en presencia (●) ó ausencia (▼) de endotelio, así como su control (○). Cada punto representa el valor de la media \pm EEM de seis repeticiones independientes.

6.2.3 EFECTO DE INHIBICIÓN DE ENTRADA DE CALCIO

La DMC no mostró inhibición de las contracciones inducidas con calcio en aorta de rata como se puede ver en la Figura 17, lo que descarta que el mecanismo de acción relajante de la DMC sobre el MLV sea por la inhibición de la entrada de calcio. Estos resultados son acordes con los reportados por Villar *et al.* (2004) para la crisina que tampoco actúa sobre la entrada de calcio (Villar *et al.*, 2004), por lo tanto la presencia de grupos metoxilos en la DMC no modifica la capacidad de la crisina para inhibir las contracciones inducidas con calcio en MLV.

En tanto que la TMA inhibe las contracciones inducidas con calcio en MLV aislado de rata de una forma antagonista no competitiva (Figura 18). Por la ecuación de Schild se determinó la potencia antagonista de la TMA con un valor de $pA'_2 = 4.337 \pm 1.04$ (Figura 19). Los resultados obtenidos son acordes con lo descrito para la apigenina la cual actúa sobre los canales de calcio (Zhang *et al.*, 2002) y también se ha descrito que actúa activando canales de potasio (Li *et al.*, 1997), que se sabe puede estar relacionado con el efecto de la contracción inducida por calcio. Por otro lado, la introducción de tres metilos al parecer no modifica la actividad de la apigenina.

6.2.4 EFECTO DE INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PDE

La TMA a la concentración de 300 μ M inhibió 74.35% a las fosfodiesterasas cuando se utilizó como sustrato GMPC y provocó una inhibición del 36.86% cuando el sustrato fue AMPc. En tanto que el IBMX (40 μ M), utilizado como inhibidor de referencia, inhibió 78.60 % con el sustrato GMPC y 29.69 % cuando se usó como sustrato AMPc.

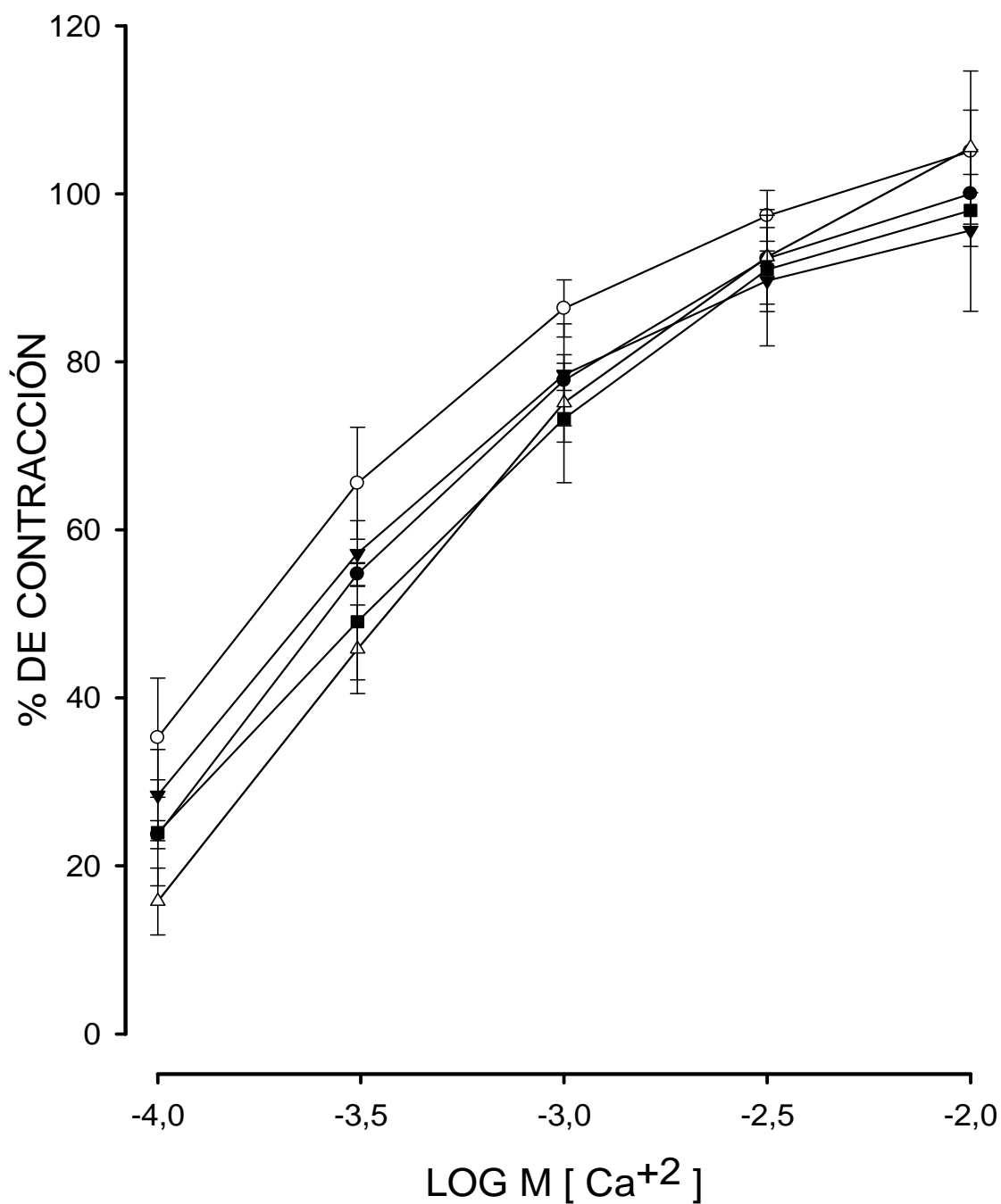


Fig. 17 Efecto inhibitorio de la DMC sobre la entrada de calcio en aorta aislada de rata a concentraciones de 0.1 μM (○), 1 μM (▼), 10 μM (Δ), 100 μM (■), y el control (●). Cada punto representa el valor de la media ± EEM de seis repeticiones individuales.

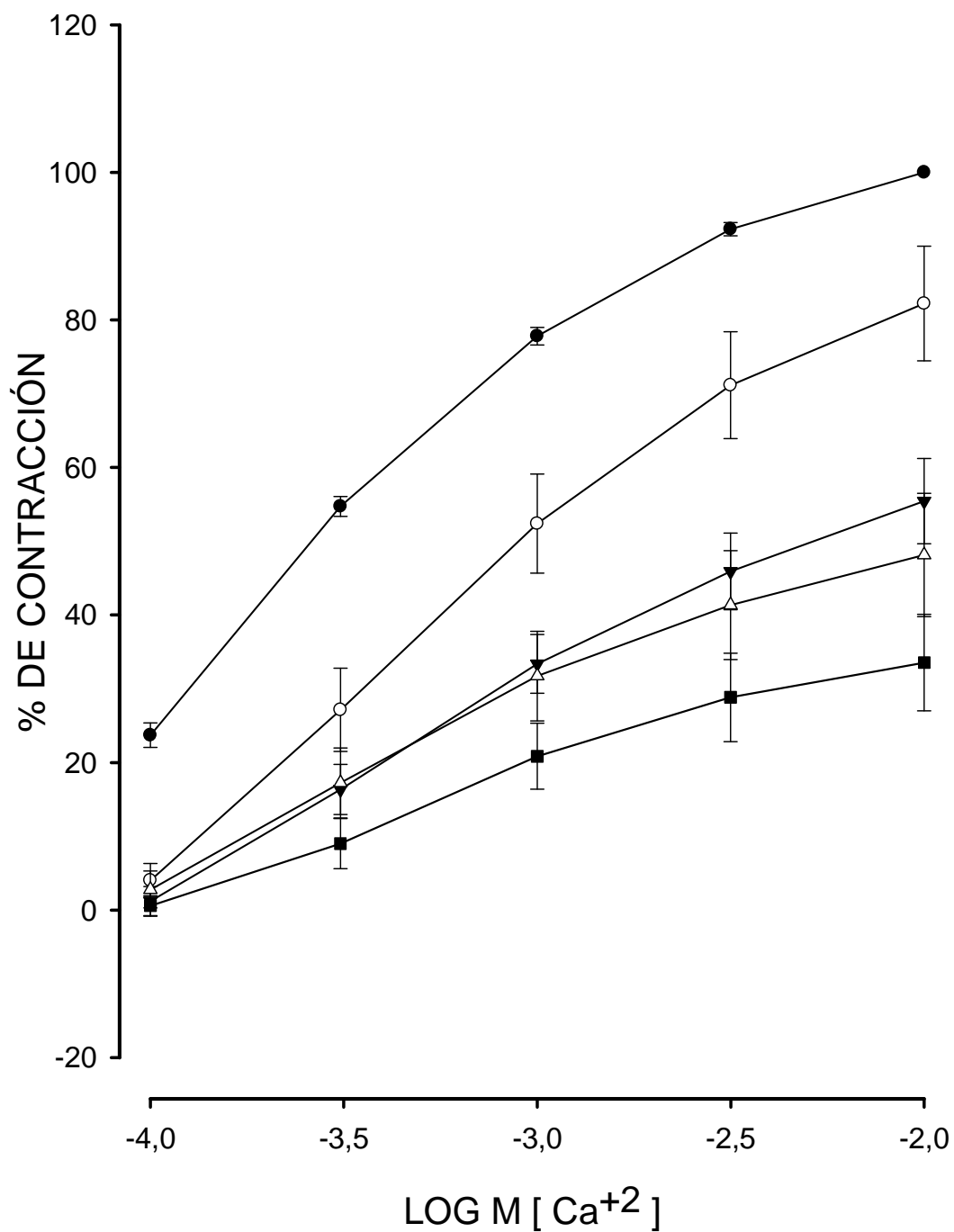


Fig. 18 Efecto inhibitorio de la TMA sobre la entrada de calcio en aorta aislada de rata a concentraciones de 20 μ M (○), 40 μ M (▼), 80 μ M (Δ), 316 μ M (■), y el control (●). Cada punto representa el valor de la media \pm EEM de seis repeticiones individuales.

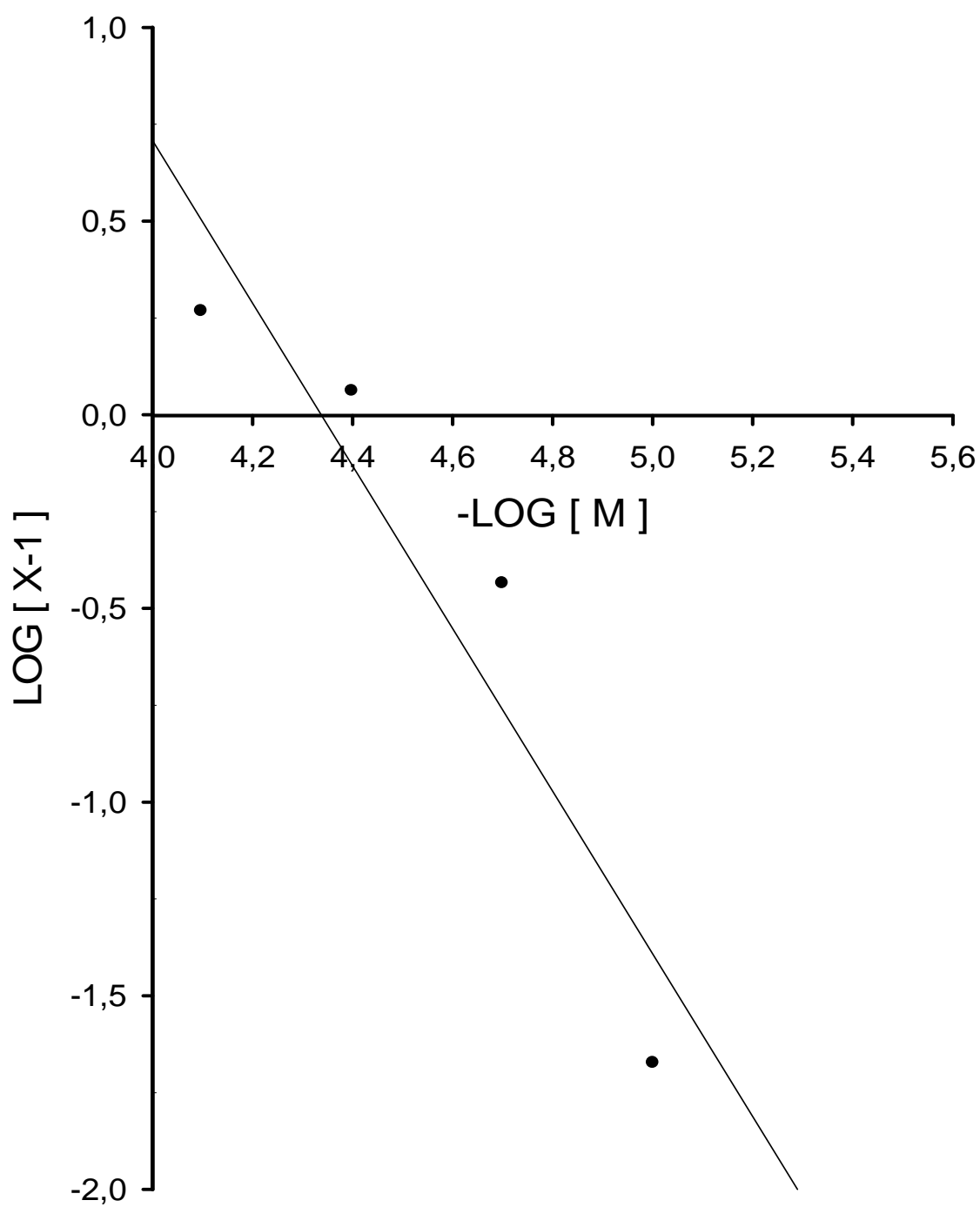


Fig. 19 Gráfica de Schild para el cálculo de pA'_{2} para la TMA.

7. CONCLUSIONES

- Se llevó a cabo la síntesis de 4',5,7-trimetilapigenina y la 5,7-dimetilcrisina.
- La relajación provocada por 4',5,7-trimetilapigenina y la 5,7-dimetilcrisina en el músculo liso vascular ambas flavonas presentaron una relajación superior al 100% con valores de CE_{50} de $1.16 \pm 0.26 \mu M$ y $6.03 \pm 3.66 \mu M$ respectivamente. Este efecto relajante fue independiente de la presencia del endotelio vascular.
- El mecanismo de acción farmacológico relajante en el músculo liso vascular para 4',5,7-trimetilapigenina es por inhibición de fosfodiesterasas y por el antagonismo tipo no competitivo de las contracciones inducidas con calcio, en tanto que la 5,7-dimetilcrisina no inhibió las contracciones inducidas con calcio.
- La relajación provocada por 4',5,7-trimetilapigenina y la 5,7-dimetilcrisina en el músculo liso de vías aéreas fue bajo, menor al 40%.

8. PERSPECTIVAS

- Realizar estudios de estructura actividad que determinen que grupos funcionales dentro de las flavonas son los responsables de la actividad relajante en MLV.
- Determinar si la indometacina es determinante en la actividad relajante de apigenina, TMA y DMC en MLA aislado de tráquea de cobayo.
- Realizar estudios del tipo de canales de calcio que son inhibidos por la TMA.

9. BIBLIOGRAFÍA

Ahmed, N., Dubuc, C., Rousseau, J., van Lier, F. (2007). Synthesis, characterization, and estrogen receptor binding affinity of flavone, indole-, and furan-estradiol conjugates. *Journal of Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17, 3212–3216.

Barnes, P., Chung, F. y Page C. (1998). Inflammatory Mediators of Asthma: *An Update Pharmacological reviews*, 50, 517-572.

Bennett, M., Burke, M., Sullivan, W. (1998). Corrigendum to Aspects of the Algar-Flynn-Oyamada (AFO) Reaction. *Tetrahedron*, 54, 99-110.

Billington, C. y Penn, R. (2003). Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. *Respiratory Research*, 4:2.

Cabrera, M., Simoens, M., Falchi, G., Lavaggi, L., Piro, O., Castellano, E., Vidal, A., Azqueta, A., Monge, A., Cerain, A., Sagrera, G., Seoane, G., Cerecetto, H. y Gonzales, M. (2007). Synthetic chalcones, flavonones, and flavones as antitumoral agents: Biological evaluation and structure-activity relationships. *Journal of Bioorganic and Medical Chemistry*, 15, 3356-3367.

Carvajal, A., Germain, M. y Weiner, P. (2000). Molecular Mechanism of cGMP-Mediated smooth muscle relaxation. *Journal of Cellular Physiology*, 184, 409-420.

Chan, E.C.H., Pannangpetch, P., Woodman, O.L. (2000). Relaxation of flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action and structure-activity relationships. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 35, 326–333.

Cohen, R. y Adachi, T. (2006). Nitric-oxide-induced vasodilatation: Regulation by physiologic S-Glutathiolation and Pathologic Oxidation of the Sarcoplasmic Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase. *Trends Cardiovascular Med*, 16, 109-114.

Cortijo, J., Morcillo, E. (2001). Nuevos avances en medicamentos: Avances en el tratamiento de las enfermedades pulmonares. *Universidad de Valencia*, 313-350.

Duarte, J., Pérez, R., Vargas, F., Ocete, A., Vizcaino, F., Zarzuelo, A., Tamargo, J. (2001). Antihypertensive effects of the flavonoid quercetin in spontaneously hypertensive rats. *British Journal of Pharmacology*, 133, 117-124.

Farmer, S. (1987). Airway smooth muscle responsiveness: modulation by the epithelium. *Trends in Pharmacological Sciences*, 8, 8-10.

Florio, C., Martin, J., Styhler, A. y Heislert, S. (1994). Antiproliferative effect of prostaglandin E2 in cultured guinea pig tracheal smooth muscle cells. *Journal of Physiology Molecular and Cell*, 10, 131-137.

Garcia, V., Arts, I., Sterne, J., Thompson, R., Shaheen, S. (2005). Dietary intake of flavonoids and asthma in adults. *European Respiratory Journal*, 26, 449-452.

Godfraind, T., Miller, R. y Wibo, M. (1986). Calcium Antagonism and Calcium Entry Blockade. *Pharmacological Reviews*, 38, 324-392.

Gray, C., Kaye, P., Nchinda, A. (2003). Chromone Studies. Synthesis and Electron-Impact Mass Spectrometric Studies of 5-Hydroxy-2-isopropyl-7-methoxychromone, a Constituent of the Medicinal Plant *Baekea frutescens*, and Side-Chain Analogues. *Journal of Natural Products*, 66, 1144-1146.

Guerrero, J., Navarro-Nuñez, L., Lozano, M., Martínez, C., Vicente, V., Gibbins, J., Rivera, J. (2007). Flavonoids inhibit the platelet TxA2 signalling pathway and antagonize TxA2 receptors (TP) in platelets and smooth muscle cells. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2, 133-144.

Guimaraes, S. y Moura, D. (2001). Vascular Adrenoceptores: An Update. *Pharmacological Reviews*, 53, 319-356.

Grover, G. y Garlid, K. (2000). ATP-Sensitive Potassium Channels: A Review of their Cardioprotective Pharmacology. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 32, 677-695.

Hamad, A., Clayton, A., Islam, B. y Knox, A. (2003). Guanylyl cyclases, nitric oxide, natriuretic peptides, and airway smooth muscle function. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285, L973-L983.

Herrera, D., Zarzuelo, A., Jiménez, J., Marhuenda, E. y Duarte, J. (1996). Effects of flavonoids on rat aortic smooth muscle contractility: structure-activity relationships. *General Pharmacology*, 27, 273-277.

Karaki, H., Ozaki, H., Hori, M., Mitsui-Saito, M., Miyamoto, S. y Nakazawa, H. (1997). Calcium Movements, Distribution, and Functions in smooth muscle. *Pharmacological Reviews*, 49, 158-211.

Kimberly, L., Pitari, G., Kazerounian, S., Ruiz-Stewart I., Park, J., Schulz, S., Chepenik, K. and Waldman, S. (2000). Guanylyl Cyclases and Signaling by Cyclic GMP. *Pharmacological Reviews*, 52, 375-413.

Ko, W., Liu, P., Chen, J., Leu, I. and Shih, C. (2003). Relaxant effects of flavonoids in isolated guinea pig trachea and their structure-activity relationship. *Planta Medica*, 69, 1086-1090.

Ko, W., Shih, C., Lai, Y., Chen, J. and Huang, H. (2004). Inhibitory effects of flavonoids on phosphodiesterase isozymes from guinea pig and their structure-activity relationships. *Journal of Biochemical Pharmacology*, 68, 2087-2094.

Ledoux, J., Werner, M., Brayden, J. and Nelson, M. (2006). Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. *Journal of Physiology*, 21, 69-78.

Li, Y., Starrett, J., Meanwell, N., Johnson, W., Harte, W., Dworetzky, S., Boissard, C., Gribkoff, V. (1997). The discovery of novel openers of Ca^{2+} -dependent large-conductance potassium channels: pharmacophore search and physiological evaluation of flavonoids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 1, 759-762.

Lin, J., Rexrode, K., Hu, F., Albert, C., Chae, C., Rimm, E., Stampfer, M., Manson, J. (2007). Dietary intakes of flavonols and flavones and coronary heart disease in US women. *American Journal of Epidemiology*, 11, 1305-13.

Lipp, M., Crespo, H., Martínez, J., Sotres-Vega, A. (2005). Sistema endotelina. *Revista del Instituto Nacional de las Enfermedades Respiratorias*, 18, 308-320.

Lokhande, D., Sakate, S., Taksande, K. y Navghare, B. (2005). Dimethylsulfoxide-iodine catalyzed deprotection of 2'-allyloxychalcones: Synthesis of flavones. *Tetrahedron*, 46, 1573-1574.

Mancia, G., Backer, G., Dominiczak, A., Cifkova, R., Fagard, R., Germano, G., Grassi, G., Heagerty, A., Kjeldsen, S., Laurent, S., Narkiewicz, K., Ruilope, L., Rynkiewicz, A., Schmieder, R., Boudier, H., Zanchetti, A. (2007). Guías de práctica clínica para el tratamiento de la hipertensión arterial. *Revista Española de Cardiología*, 60, e1-e94.

Mc Fadzean, I. e Gibson, A. (2002). The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, 135, 1-13.

Mc Kay, S. y Sharma, H. (2002). Autocrine regulation of asthmatic airway inflammation: role of airway smooth muscle. *Respiratory Research*, 3:11.

McMurry, J. (2001). Organic Chemistry. Editorial International Thomson editors S.A. de C.V, México, 5ª edición, pp. 250-268.

Nijveldt, R., Nood, E., Van Hoorn, E., Boelens, P., Van Norren, K. y Van Leeuwen, P. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Journal of Clinical Nutrition*, 74, 418-425.

Page, S., Ammit, A., Black, J. y Armour, C. (2001). Human mast cell and airway smooth muscle cell interactions: implications for asthma. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 281, L1313-L1323.

Parekh, A. y Putney, J. (2005). Store-Operated Calcium Channels. *Physiological Reviews*, 85, 757-810.

Polson, J., Strada, S. (1996). Cyclic nucleotide phosphodiesterases and vascular smooth muscle. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 36, 403-427.

Raj, N., Sripal, R., Chaluvadi, H., Krishna, D. (2001). Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. *Indian Journal of Pharmacology*, 33, 2-16.

Rang, H., Dale, M., Ritter, J., Moore, P. (2004). Farmacología. Editorial Elsevier S.A, España, 5ª edición, pp. 285-304.

Rembold, M. (1992). Regulation of contraction and relaxation in arterial smooth muscle. *Journal of Hypertension*, 20, 129-137.

Sánchez, E., Torres, G., Arrieta, J., Aguilar, A., Castillo, C., Navarrete, A. (2007). Mechanisms of relaxant action of a crude hexane extract of *gnaphalium liebmannii* in guinea pig tracheal smooth muscle. *Journal of Ethnopharmacology*, 111, 142-147.

Sanders, K. (2001). Signal Transduction in Smooth Muscle Invited Review: Mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *Journal of Applied Physiology*, 91, 1438–1449.

Saponara, S., Testai, L., Ippoliti, D., Martinotti, E., Martelli, A., Chericoni, S., Sgaragh, G., Fusi, F., Calderone, V. (2006). (+/-)-Naringenin as large conductance Ca activated K (BK_{Ca}) channel opener in vascular smooth muscle cells. *British Journal of Pharmacology*, 149, 1013-1021.

Sayed, A. (2004). Synthesis and studies of antimicrobial activity of lanceolatin B. *Acta Chimica Slovenica*, 51, 447-452.

Shin, J., Kim, K., Kim, M., Jeong, J. y Kim, B. (1999). Synthesis and hypoglycemic effect of chrysin derivatives. *Journal of Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 9, 869-874.

Smith, J., Maloney, D. y Lannigan, D. (2007). Structural basis for the activity of the RSK-specific inhibitor. *Journal of Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 5018-5034.

Simmons, D., Botting, R. y Hla, T. (2004). Cyclooxygenase Isozymes: The Biology of Prostaglandin Synthesis and Inhibition. *Pharmacological Reviews*, 56, 387–437.

Solomons, G., Fryhle, C. (2000). *Organic Chemistry*. Editorial John Wiley and sons S.A. de C.V, New York, 7^o edition, pp. 360- 420.

Sutthanut, K., Sripanidkulchai, B., Yenjai, C., Jayd, M. (2007). Simultaneous identification and quantitation of 11 flavonoid constituents in *Kaempferia parviflora* by gas chromatography. *Journal of Chromatography*, 1143, 227–233.

Taniguchi, M., Kwak, Y., Jones, K., Warner, D. and Perkins, W. (2006). Nitric oxide sensitivity in pulmonary artery and airway smooth muscle: a possible role for cGMP responsiveness. *American Journal of Physiology Lung Cellular and Molecular Physiology*, 290, L1018–L1027.

Tamotsu, N., Taichi, O., Ushio, S., Tsuyoshi, T., Yukinori, M., Yoshitaka, I. (1987). Inhibition of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate phosphodiesterase by flavonoids. *Chemical and Pharmacology*, 36(2), 654-661.

Tanaka, Y., Takahiro, H. and Koike, K. (2005). New insights into β -adrenoceptors in smooth muscle: Distribution of receptor subtypes and molecular mechanisms triggering muscle relaxation. *Journal of Clinical and Experimental pharmacology and Physiology*, 32, 503-514.

Thirstrup, S. (2000). Control of airway smooth muscle tone: II-pharmacology of relaxation. *Respiratory Medicine*, 94, 519-528.

Thirstrup, S. (2000). Control of airway smooth muscle tone: I-Electrophysiology and contractile mediators. *Respiratory Medicine*, 94, 328-336.

Touyz, M. y Schiffrin, L. (2000). Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells. *Pharmacological Reviews*, 52, 639-672.

Tsukayama, M., Kawamura, T., Takaaki, I., Torii, F. (2003). Improved, rapid and efficient synthesis of polymethoxyflavones under microwave irradiation and their inhibitory effects on melanogenesis. *Journal of Organic Chemistry*, 60, 2775- 2784.

Villar, I., Galisteo, M., Vera, R., Valle, F., Garcia, M., Zarzuelo, A., Duarte, J. (2004). Effects of the Dietary Flavonoid Chrysin in Isolated Rat Mesenteric Vascular Bed. *Journal of Vascular Research*, 41, 509-516.

Villemin, D., Hachemia, M. (2001). Cesium fluoride on calcium oxide as a strongly basic catalyst. Synthesis of flavones and tobacco alkaloids. *Reaction Kinetics and Catalysis Letters*, 72, 3-10.

Webb, R. (2003). Smooth muscle contraction and relaxation. *Advances in Physiology Education*, 27, 201-206.

Zhang, Y., Park, Y., Kim, t., Fang, L., Ahn, H., Hong, J., Kim, Y., Lee, C., Yun, Y. (2002). Endothelium-dependent vasorelaxation and antiproliferative effects of apigenin. *General Pharmacology*, 35, 341-347.

10. APÉNDICE

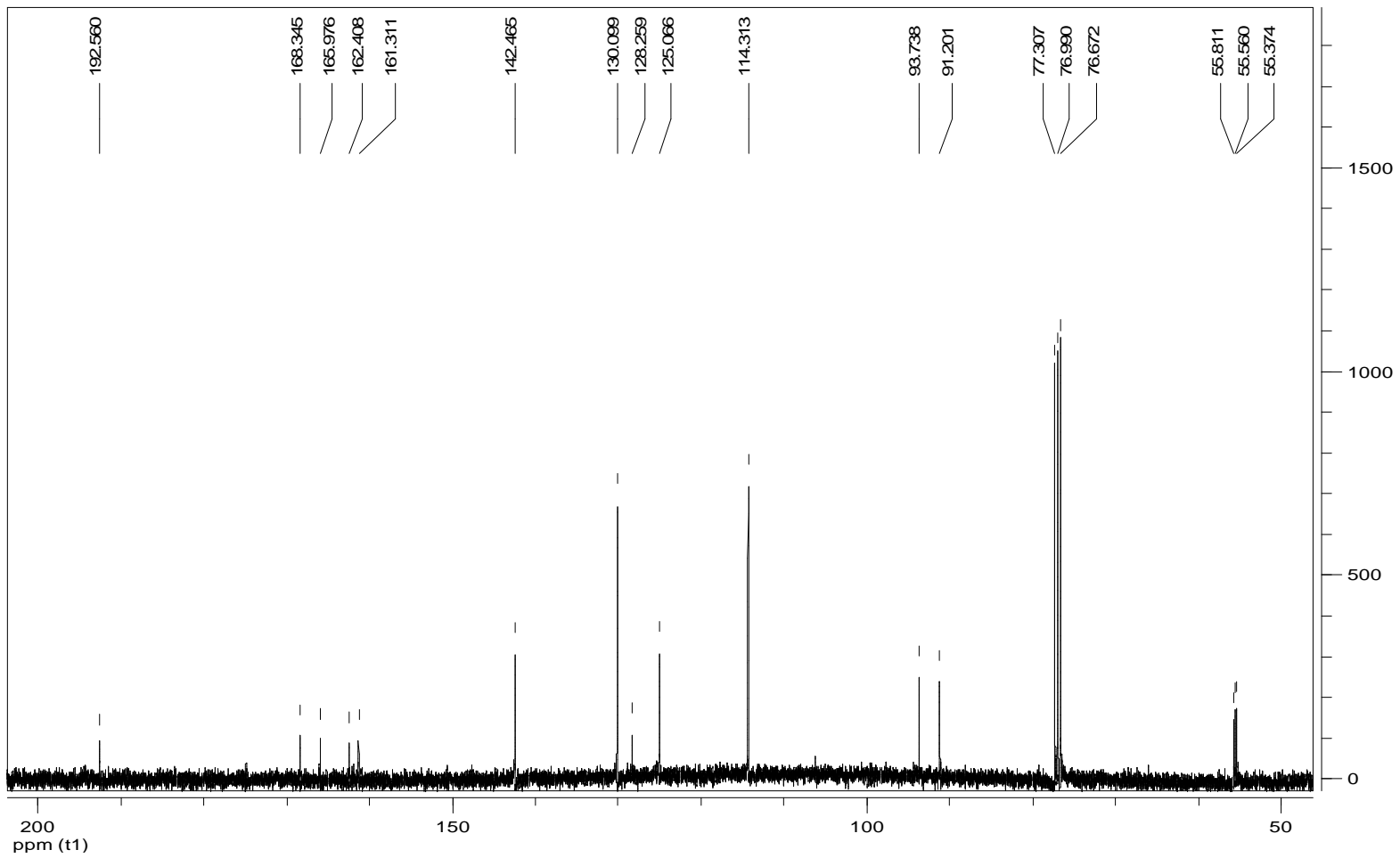


Fig. 1 Espectro de RMN ^{13}C de 2-Hidroxi-4',4,6-trimetoxichalcona.

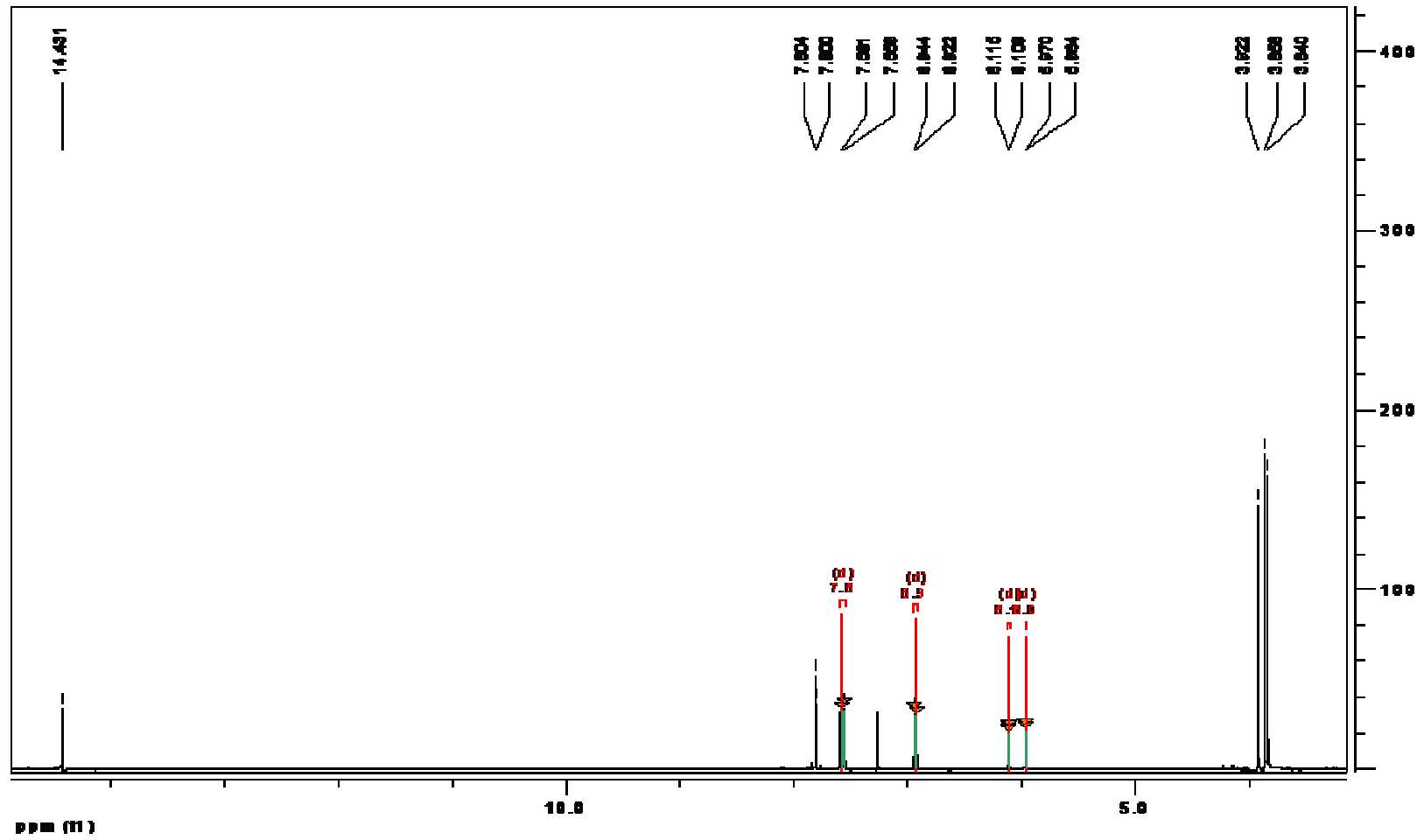


Fig. 2 Espectro de RMN ^1H de 2-Hidroxi-4',4,6-trimetoxichalcona.

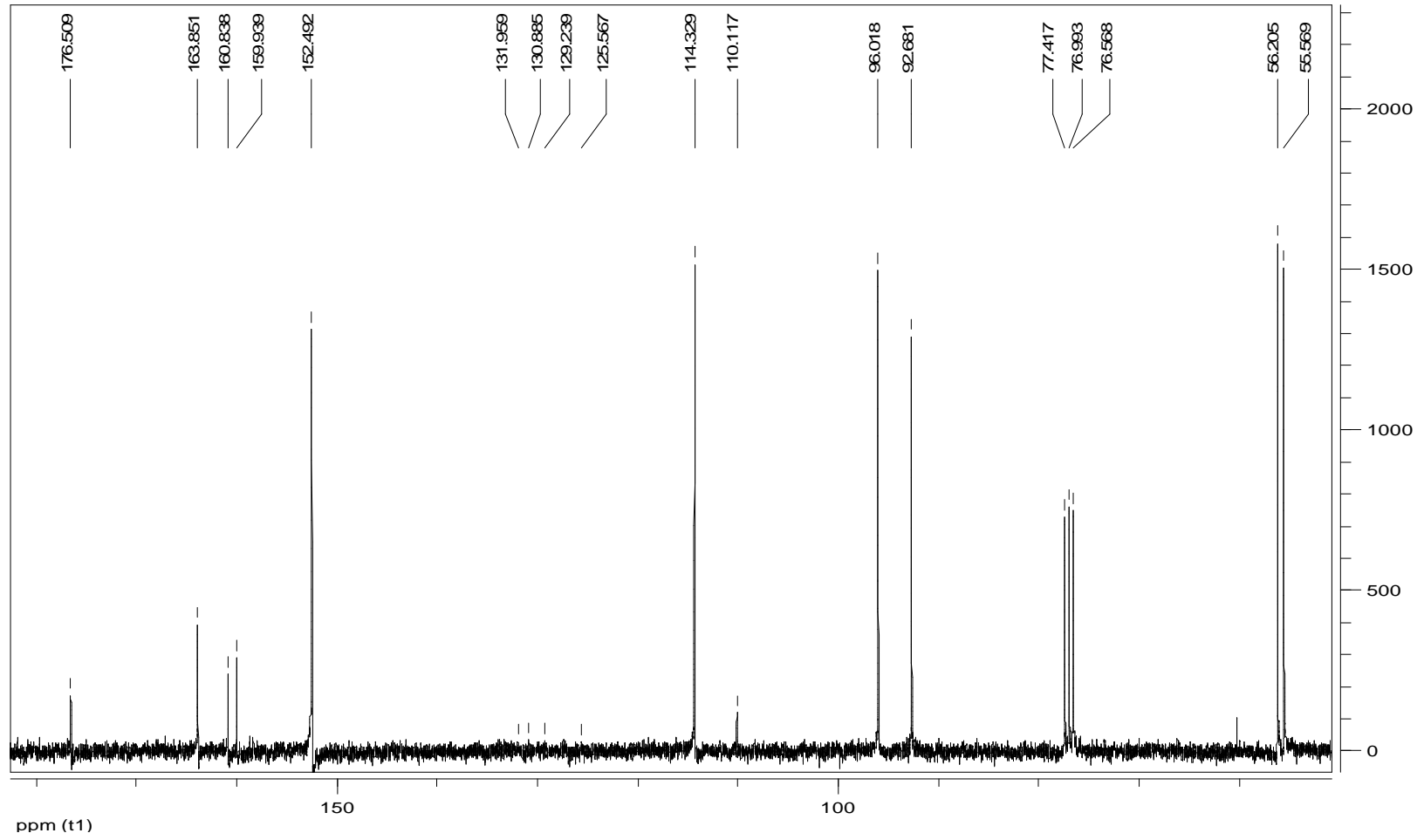


Fig. 3 Espectro de RMN ^{13}C de DMC.

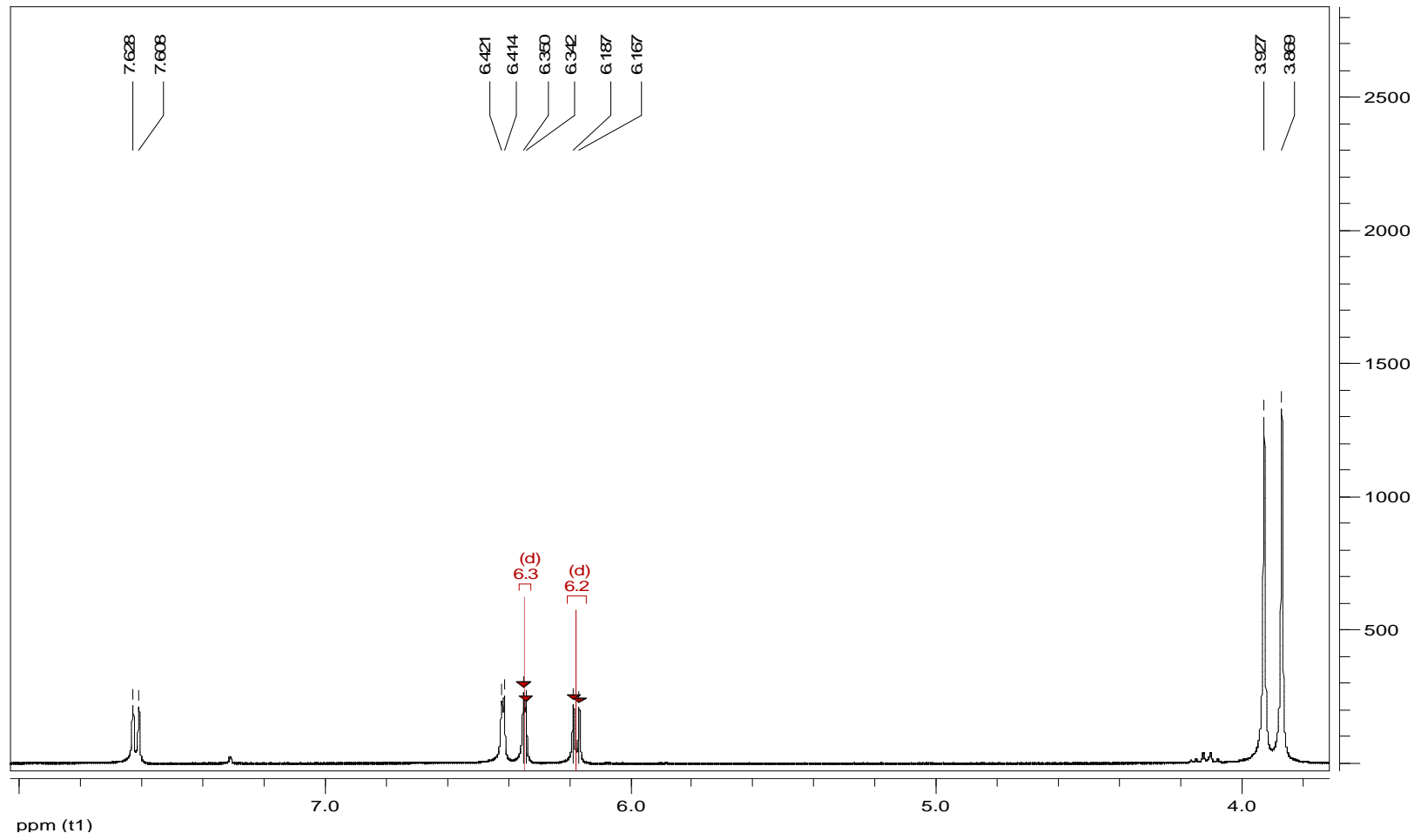


Fig. 4 Espectro de RMN ^1H de DMC.

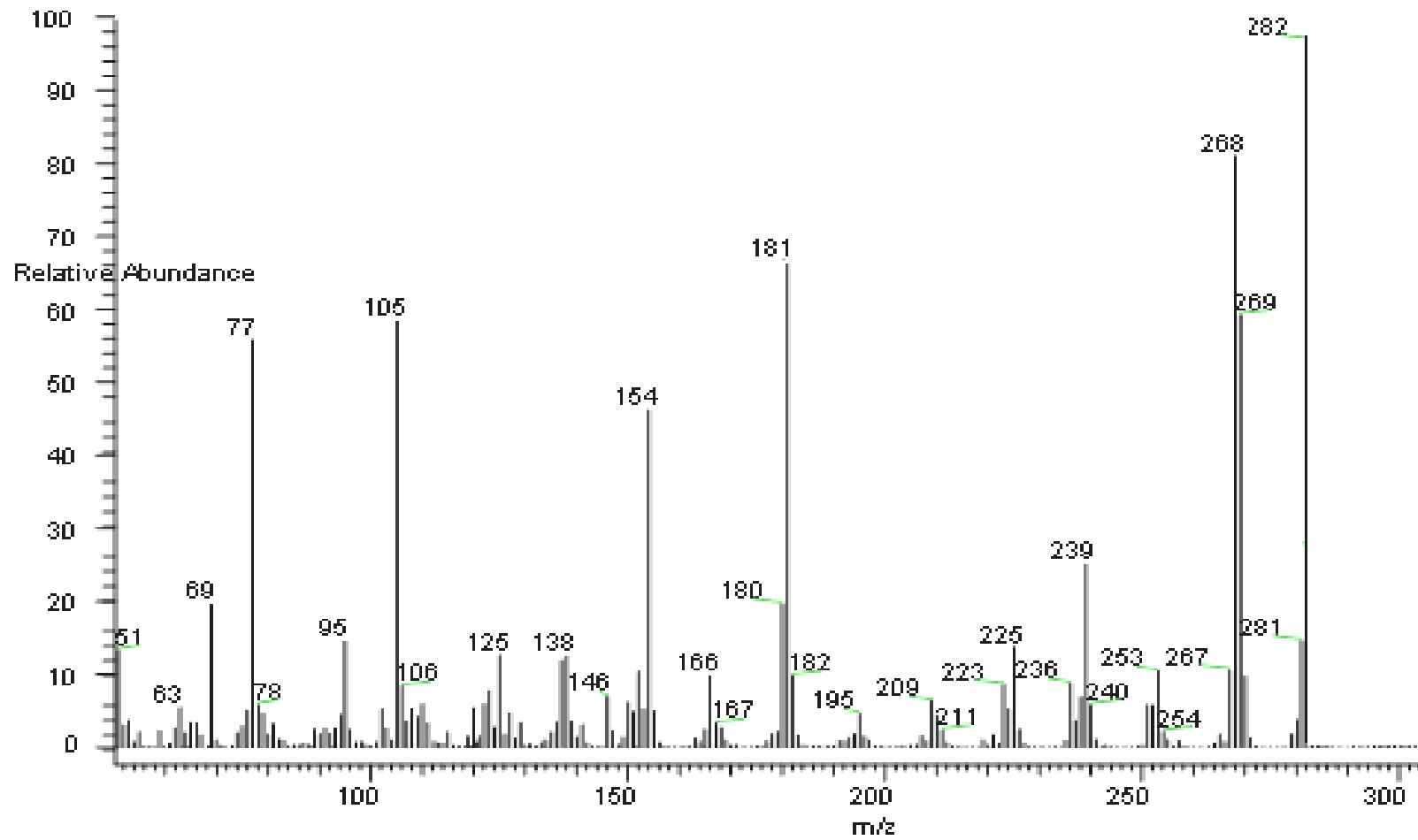


Fig. 5 Espectrometría de Masas (EM) de DMC.

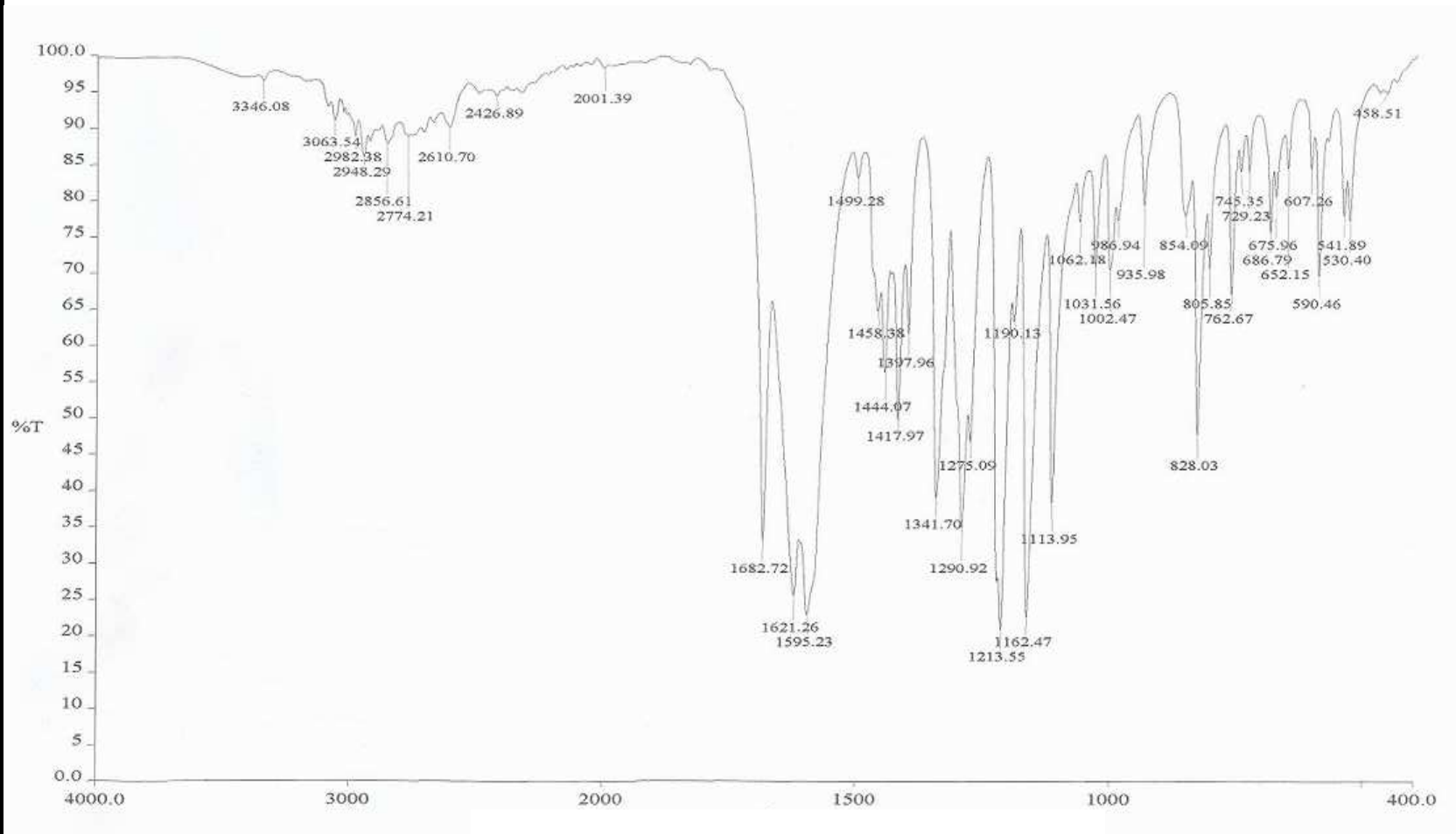


Fig. 6 Espectro IR de DMC.

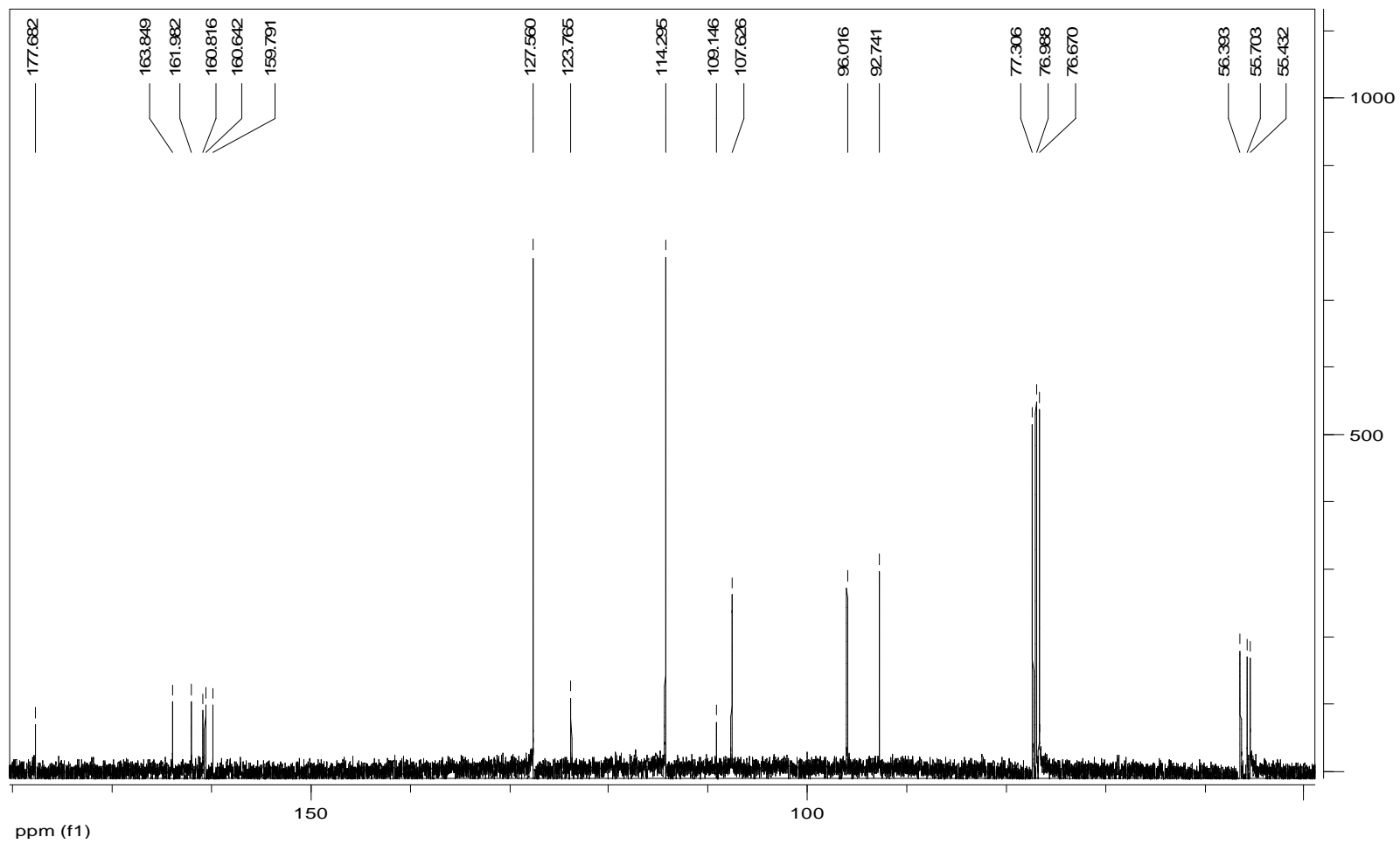
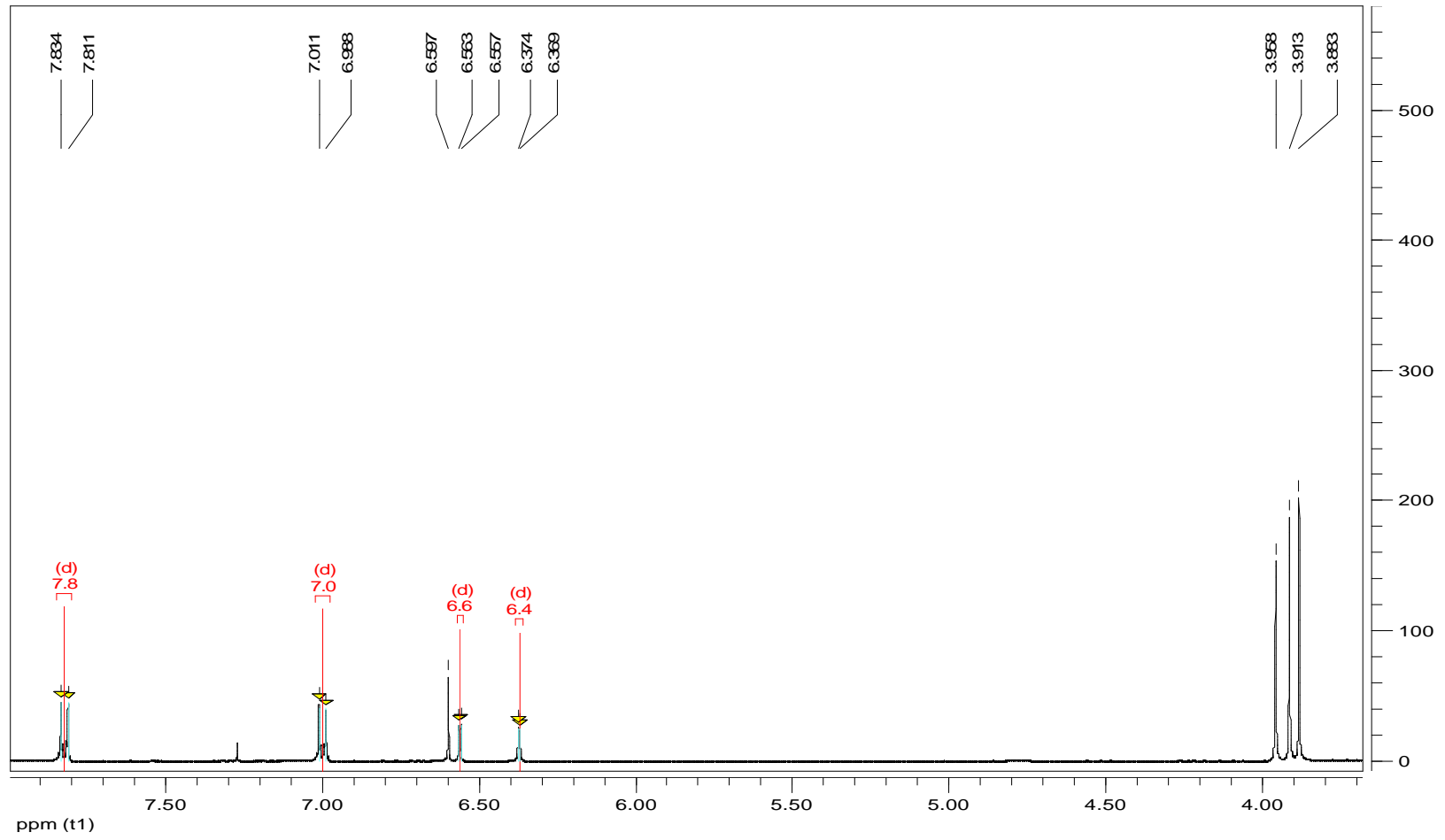


Fig. 7 Espectro de RMN ^{13}C de TMA.

Fig. 8 Espectro de RMN ^1H de TMA.

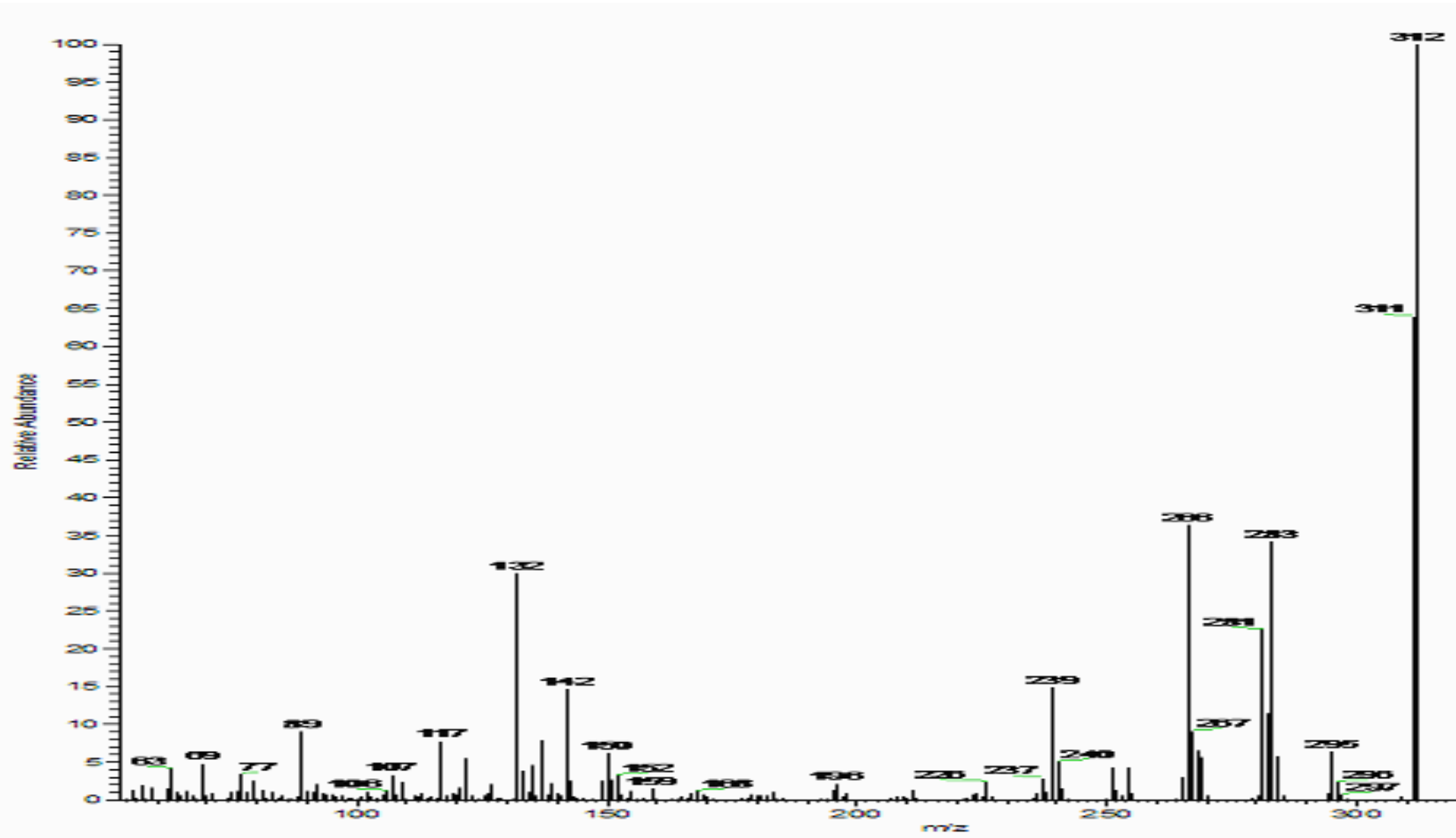


Fig. 9 Espectrometria de Masas (EM) de TMA

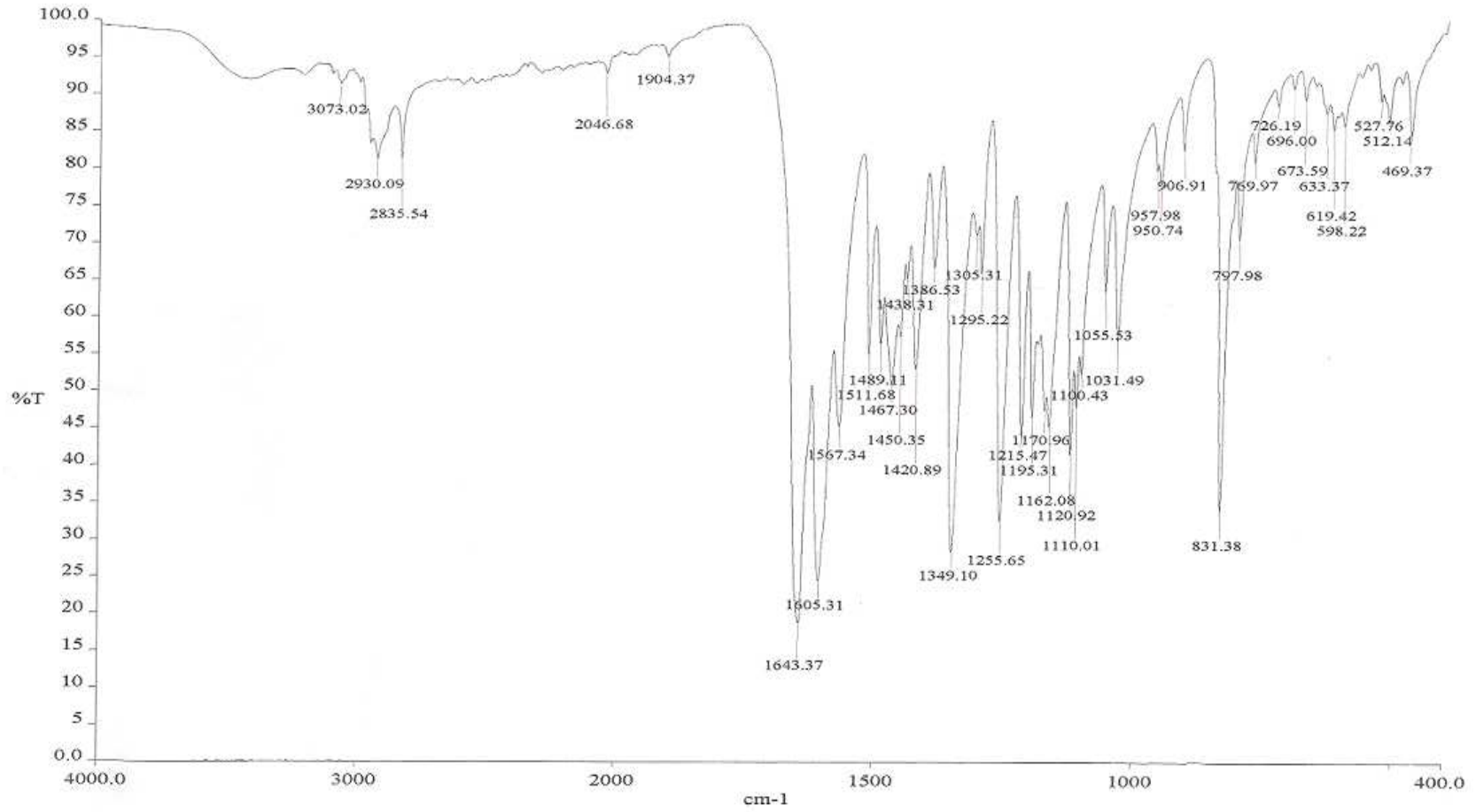


Fig. 10 Espectroscopia IR de TMA.

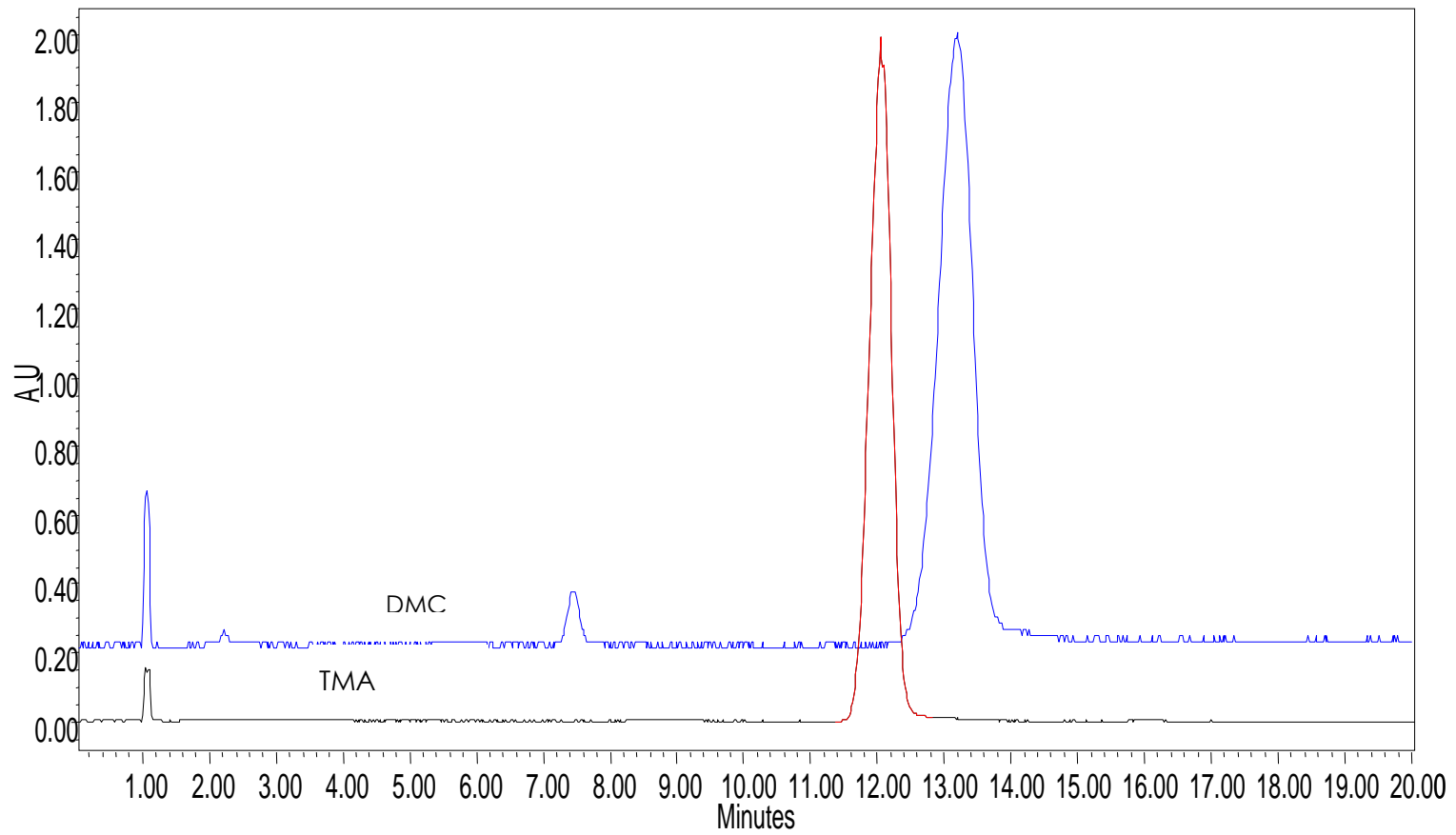


Fig. 11 Cromatograma de TMA y DMC