



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

---

---

*SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y EVALUACIÓN  
FARMACOLÓGICA DE NUEVOS COMPUESTOS CON  
ESTRUCTURA DE 4-ARIL SUSTITUÍDO-2-CIANOIMINO-3,4-  
DIHIDRO-1H-PIRIMIDINA: NUEVOS COMPUESTOS CON  
ACTIVIDAD VASORRELAJANTE*

### TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

LUIS RODRIGO CONTRERAS ROJAS

ASESOR: MC. HULME RÍOS GUERRA



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.

## AGRADECIMIENTOS

- A la UNAM, por permitirme ser tu hijo durante todos estos años y otorgarme la posibilidad de ser un profesionista, siempre con la premisa de beneficiar a nuestra sociedad.
- A mis padres, José Luis Contreras Quiroz y Natividad Rojas Velázquez, por brindarme la oportunidad de estudiar y enseñarme el camino para ser una mejor persona cada día. Su integridad y deseos de superación han sido un ejemplo y motivación para mí.
- A mi hermana, Ana Paulina Contreras Rojas, por tu apoyo incondicional en todo momento. Tú has sido una inspiración a lo largo de mi vida.
- A mi asesor, pero sobre todo mi amigo, Hulme Ríos Guerra por brindarme su confianza a lo largo de estos años, en los cuales, me ha enseñado que las cosas que valen la pena requieren del esfuerzo personal constante y a no desistir a pesar de las complicaciones que se presentan en nuestras vidas.
- A mis sinodales, que además fueron mis maestras a lo largo de la carrera, sus enseñanzas y apoyo los atesoro con gran aprecio.
- A mis amigos Jorge, Luis, Mota, Pablo y Pedro y a mis amigas Ma, Lety, Claudia y Alma, sin ustedes los momentos difíciles no los habría superado, y los buenos no lo hubieran sido tanto.
- A mi querida Myrna Guadalupe Mendoza Gutiérrez, por ser la luz que ilumina mis días, pero sobre todo mis noches.
- Al Dr. Ignacio Valencia Hernández, por su valiosa ayuda durante la fase experimental de esta tesis.
- A la FES Cuautitlán y sus profesores, por darme las herramientas para dedicarme a la vida profesional de QFB.

# ÍNDICE GENERAL

<b>1.- GLOSARIO</b>	<i>i</i>
<b>2.- RESUMEN</b>	<i>iv</i>
<b>3.- MARCO TEÓRICO</b>	
3.1.- Generalidades de la Hipertensión Arterial	<i>1</i>
3.2.- Reacciones Multicomponentes y su Importancia en la Química Medicinal	<i>10</i>
3.3.- Fisiología del Músculo Liso Vascular	<i>32</i>
<b>4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<i>40</i>
<b>5.- HIPÓTESIS</b>	<i>41</i>
<b>6.- OBJETIVOS</b>	<i>42</i>
<b>7.- METODOLOGÍAS</b>	
7.1.- Protocolo de Síntesis de las ACIDHPMs	<i>43</i>
7.2.- Investigación de la Bioactividad de las ACIDHPMs	<i>45</i>
7.3.- Estudio del Mecanismo de Modulación Celular de la ACIDHPM 3	<i>53</i>
7.4.- Expresión y Tratamiento de Datos	<i>60</i>
<b>8.- RESULTADOS</b>	
8.1.- Síntesis Química de las ACIDHPMs	<i>62</i>
8.2.- Investigación de la Bioactividad de las ACIDHPMs	<i>64</i>
8.3.- Estudio del Mecanismo de Modulación Celular de la ACIDHPM 3	<i>67</i>
<b>9.- ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	
9.1.- Síntesis Química de las ACIDHPMs	<i>81</i>
9.2.- Evaluación Farmacológica de la Serie de ACIDHPMs	<i>81</i>
9.3.- Determinación del Mecanismo de Acción de la ACIDHPM 3	<i>83</i>
<b>10.- CONCLUSIONES</b>	<i>100</i>
<b>11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<i>101</i>
<b>12.- APÉNDICE A</b>	<i>105</i>
<b>13.- APÉNDICE B</b>	<i>109</i>
<b>14.- APÉNDICE C</b>	<i>125</i>
<b>15.- APÉNDICE D</b>	<i>131</i>
<b>16.- APÉNDICE E</b>	<i>134</i>
<b>17.- APÉNDICE F</b>	<i>137</i>
<b>18.- APÉNDICE G</b>	<i>141</i>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	ACIDHPMs 1-5 sintetizadas y sus respectivos valores de $E_{max}$	<b>iv</b>
<b>Figura 2</b>	Principales mecanismos reguladores de la tensión arterial	<b>4</b>
<b>Figura 3</b>	Estructura química de los diuréticos utilizados en terapia de la HTA	<b>5</b>
<b>Figura 4</b>	Estructura química de los fármacos simpaticolíticos antihipertensores	<b>6</b>
<b>Figura 5</b>	Fármacos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina	<b>7</b>
<b>Figura 6</b>	Antagonistas de los receptores de Angiotensina II del subtipo $AT_1$	<b>7</b>
<b>Figura 7</b>	Antagonistas de los canales de $Ca^{+2}$	<b>8</b>
<b>Figura 8</b>	Fármacos vasodilatadores de acción directa en músculo liso	<b>9</b>
<b>Figura 9</b>	Representación esquemática de las síntesis divergente convergente	<b>14</b>
<b>Figura 10</b>	Transformaciones divergentes comparadas con una RMC convergente	<b>15</b>
<b>Figura 11</b>	Síntesis de Biginelli típica aplicada a la preparación de DHPMs.	<b>20</b>
<b>Figura 12</b>	Síntesis de Hantzsch para la preparación de Nifedipina	<b>21</b>
<b>Figura 13</b>	Fármacos con núcleo DHPM que presentan actividad farmacológica	<b>22</b>
<b>Figura 14</b>	Nifedipina y homólogos bloqueadores del canal de $Ca^{+2}$	<b>23</b>
<b>Figura 15</b>	DHPM con el grupo $\beta$ -arilaminoetilóxicarbonilo en C-5	<b>24</b>
<b>Figura 16</b>	Moléculas de DHPMs antagonistas del $Ca^{+2}$ con fragmento	<b>24</b>
<b>Figura 17</b>	DHPMs funcionalizadas en N-3 con el fragmento alquilóxicarbonilo	<b>25</b>
<b>Figura 18</b>	DHPMs con actividad antihipertensiva al ser administradas por vía oral	<b>26</b>
<b>Figura 19</b>	Sitio activo en DHP's y DHPM's moduladores del $Ca^{+2}$	<b>27</b>
<b>Figura 20</b>	Aspectos estructurales y configuracionales de las DHPs y DHPMs	<b>28</b>
<b>Figura 21</b>	Actividad farmacológica y potencia de algunas DHPs	<b>29</b>
<b>Figura 22</b>	Reacción general para la síntesis de ACIDHPMs	<b>30</b>
<b>Figura 23</b>	Moléculas de cianoguanidinas agonistas del canal de $K^+_{ATP}$	<b>31</b>
<b>Figura 24</b>	Estructura química de las ACIDHPMs	<b>32</b>
<b>Figura 25</b>	Mediadores constrictores y relajantes derivados del endotelio vascular	<b>34</b>
<b>Figura 26</b>	Mecanismo de contracción del músculo liso	<b>35</b>
<b>Figura 27</b>	Mecanismos que controlan la contracción y relajación del músculo liso	<b>37</b>
<b>Figura 28</b>	Reactivos y condiciones de reacción para la síntesis de las ACIDHPMs	<b>43</b>
<b>Figura 29</b>	Montaje experimental <i>in vitro</i> del tejido aórtico en baño de órgano	<b>47</b>
<b>Figura 30</b>	Registro de la prueba de viabilidad a Fenilefrina	<b>49</b>
<b>Figura 31</b>	Determinación de la presencia de endotelio con Acetilcolina	<b>50</b>
<b>Figura 32</b>	Registro de la relajación inducida por las ACIDHPMs 1-5	<b>52</b>
<b>Figura 33</b>	Centro estereogénico de las ACIDHPMs	<b>99</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	Principales RMCs empleadas a nivel industrial	<b>16</b>
<b>Tabla 2</b>	Algunos compuestos con actividad farmacológica sintetizados mediante RMCs	<b>19</b>
<b>Tabla 3</b>	Moléculas de ACIDHPMs investigadas como posibles agentes con actividad vasorrelajante	<b>51</b>
<b>Tabla 4</b>	Fármacos inhibidores de enzimas COX, NOS y GCs empleados para determinar el mecanismo de acción de la ACIDHPM <b>3</b>	<b>53</b>
<b>Tabla 5</b>	Agentes bloqueadores de diversos receptores empleados para determinar el mecanismo de acción de la ACIDHPM <b>3</b>	<b>55</b>
<b>Tabla 6</b>	Agentes bloqueadores específicos de canales de K <sup>+</sup> empleados para determinar el mecanismo de acción de la ACIDHPM <b>3</b>	<b>59</b>
<b>Tabla 7</b>	Rendimientos y Puntos de Fusión de las ACIDHPMs <b>1-5</b>	<b>62</b>
<b>Tabla 8</b>	Valores de pCl <sub>50</sub> y E <sub>max</sub> determinados experimentalmente para los compuestos sintetizados con núcleo de ACIDHPM	<b>64</b>
<b>Tabla 9</b>	Valores experimentales de pCl <sub>50</sub> y E <sub>max</sub> determinados para la ACIDHPM <b>3</b> en presencia de inhibidores de enzimas COX, NOS y GCs.	<b>67</b>
<b>Tabla 10</b>	Valores experimentales de pCl <sub>50</sub> y E <sub>max</sub> para la ACIDHPM <b>3</b> en presencia de bloqueadores de receptores muscarínicos, histaminérgicos, β-adrenérgicos y canales de Ca <sup>+2</sup> .	<b>69</b>
<b>Tabla 11</b>	Valores experimentales de pCl <sub>50</sub> y E <sub>max</sub> para ACIDHPM <b>3</b> en aortas precontraídas con KCl 20 y 80 mM.	<b>74</b>
<b>Tabla 12</b>	Valores experimentales de pCl <sub>50</sub> y E <sub>max</sub> para ACIDHPM <b>3</b> en presencia de bloqueadores de canales de K <sup>+</sup> (K <sup>+<sub>V</sub></sup> , K <sup>+<sub>IR</sub></sup> , K <sup>+<sub>ATP</sub></sup> y K <sup>+<sub>Ca</sub></sup> )	<b>78</b>

## 1.- GLOSARIO

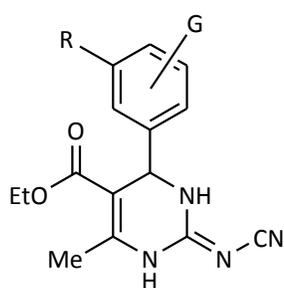
<b>4-AP</b>	4-Aminopiridina
<b>AC</b>	Adenilato Ciclasa
<b>Ach</b>	Acetilcolina
<b>ACIDPMs</b>	4-aril sustituido-2-cianoimino-3,4-dihidro-1 <i>H</i> -pirimidina
<b>AMPC</b>	Monofosfato de Adenosina 3',5' Cíclico
<b>ANOVA</b>	Análisis de Varianza
<b>ARA-II</b>	Antagonistas del receptor de Angiotensina II
<b>CE</b>	Con Endotelio
<b>CI50</b>	Concentraciòn Inhibitoria 50
<b>CLM</b>	Cadena Ligera de Miosina
<b>COX</b>	Ciclooxigenasa
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DEPT</b>	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
<b>DHP</b>	Dihidropiridina
<b>DHPM</b>	Dihidropirimidina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DMSO-d<sub>6</sub></b>	Dimetilsulfóxido Deuterado
<b>EEM</b>	Error Estándar de la Media
<b>EM</b>	Espectrometría de Masas
<b>E<sub>max</sub></b>	Efecto Máximo Producido por el Fármaco
<b>FHDE</b>	Factor Hiperpolarizante Derivado del Endotelio
<b>GC</b>	Gasto Cardiaco
<b>GCp</b>	Guanilato Ciclasa Particulada

<b>GCs</b>	Guanilato Ciclasa Soluble
<b>GMPc</b>	Guanosin 3',5'-fosfato cíclico
<b>GTP</b>	Trifosfato de Guanosina
<b>HTA</b>	Hipertensión Arterial
<b>HTS</b>	Cribado de Alta Eficacia (High Throughput Screening)
<b>H<sub>x</sub></b>	Receptores Histaminérgicos
<b>IE</b>	Impacto Electrónico
<b>IECA</b>	Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina
<b>IP<sub>3</sub></b>	Trifosfato de Inositol
<b>IR</b>	Espectroscopía Infrarrojo
<b>K<sup>+</sup><sub>ATP</sub></b>	Canal de Potasio Sensible a ATP
<b>K<sup>+</sup><sub>Ca</sub></b>	Canal de Potasio Sensible a Calcio
<b>K<sup>+</sup><sub>IR</sub></b>	Canal de Potasio Rectificador de Entrada
<b>K<sup>+</sup><sub>V</sub></b>	Canal de Potasio Sensible al Voltaje
<b>KCLM</b>	Quinasa de las Cadenas Ligeras de Miosina
<b>LEC</b>	Líquido Extracelular
<b>L-NAME</b>	N <sup>o</sup> -nitro-L-arginina metiléster
<b>M<sub>x</sub></b>	Receptores Muscarínicos
<b>NO</b>	Óxido Nítrico
<b>NOS</b>	Oxido Nítrico Sintasa
<b>ODQ</b>	1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona
<b>PA</b>	Presión Arterial
<b>pCl<sub>50</sub></b>	-log Cl <sub>50</sub>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>Phe</b>	Fenilefrina

<b>PKA</b>	Proteínquinasa A
<b>PKG</b>	Proteínquinasa G
<b>PNC</b>	Péptido Natriurético tipo C
<b>RMC</b>	Reacción Multicomponente
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>RPN-B</b>	Receptor del Péptido Natriurético B
<b>RVPT</b>	Resistencia Vasular Periférica Total
<b>SE</b>	Sin Endotelio
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>SNS</b>	Sistema Nervioso Simpático
$t_{1/2}$	Tiempo de vida media
<b>TEA</b>	Tetraetilamonio
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>TP</b>	Receptores de Tromboxano
<b>V<sub>x</sub></b>	Receptores de Vasopresina

## 2.- RESUMEN

En este trabajo de tesis se presentan y discuten los resultados derivados de la investigación de una nueva estrategia de síntesis basada en una reacción multicomponente (RMC) para la preparación de una serie de nuevos compuestos híbridos de Nifenipina (Adalat®) y Pinacidilo (Pindac®), con estructura de 4-aryl sustituido-2-cianoimino-3,4-dihidro-1*H*-pirimidinas (ACIDHPMs 1-5) químicamente estables (Figura 1); además de los estudios farmacológicos *in vitro* de estos compuestos empleando el modelo experimental de órgano aislado para evaluar la bioactividad vasorrelajante y mecanismo de mediación celular de esta nueva familia de compuestos químicos.



ACIDHPM	R	G	E <sub>max</sub> <sup>∇</sup>
1	H	H	77.69 ± 1.71
2	H	3-F	83.22 ± 1.01
3	H	2-CF <sub>3</sub>	101.83 ± 2.15
4	H	3-CF <sub>3</sub>	98.10 ± 2.50
5	NO <sub>2</sub>	2-OCHF <sub>2</sub>	83.85 ± 5.27

<sup>∇</sup> Respuesta vasorrelajante, expresada como porcentaje de relajación

**Figura 1.** ACIDHPMs 1-5 sintetizadas y sus respectivos valores experimentales de E<sub>max</sub> determinados, previa contracción con Phe (10<sup>-6</sup> M), en anillos aórticos desnudos de endotelio mediante el protocolo de órgano aislado.

Los compuestos sintetizados resultan moléculas particularmente atractivas, desde el punto de vista Químico su síntesis representa un desafío para el Químico Medicinal

además del interés que pudieran representar para el Farmacólogo como una herramienta farmacológica o posible agente de utilidad clínica puesto que su estructura química posee los fragmentos farmacofóricos de la Nifedipina, un compuesto cabeza de serie de la clase de las 1,4-dihidropiridinas (1,4-DHPs) de probada utilidad terapéutica, la cual media su actividad biológica a través del bloqueo selectivo de los canales de calcio  $\text{Ca}^{+2}$  tipo L en el músculo liso vascular; y del Pinacidilo en el que el grupo *N*-cianoguanidilo es responsable de su actividad y que se ha encontrado en diversas estructuras de fármacos activadores del canal de potasio dependientes de ATP ( $\text{K}_{\text{ATP}}^{+}$ ) o con otras aplicaciones terapéuticas.

De esta manera, la modificación estructural de estos fármacos ha sido objeto de amplias investigaciones por parte de los Químicos Medicinales y los Farmacólogos en la búsqueda de nuevas moléculas que representen una nueva opción terapéutica con propiedades farmacocinéticas, farmacodinámicas y fisicoquímicas mejoradas para las enfermedades cardiovasculares.

Al respecto, los resultados farmacológicos preliminares de esta investigación relacionados a la bioactividad de las ACIDHPMs **1-5** nos muestran que estas moléculas exhiben un efecto vasorrelajante importante ( $E_{\text{max}}$ , Figura 1). Sin embargo, de la serie de compuestos estudiados la ACIDHPM **3** mostró las mejores propiedades farmacológicas (potencia y eficacia), lo que nos condujo a seleccionarla como la molécula tipo para investigar el mecanismo de señalización celular involucrado en el efecto vasorrelajante observado.

Los resultados productos de esta investigación presentan evidencias que apoyan un mecanismo biológico dual de mediación celular para la ACIDHPM **3**, mediante la modulación los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  de tipo L y la activación de los canales de potasio

sensibles al voltaje ( $K^+_v$ ). Estos resultados demuestran que la ACIDHPM **3** representa una nueva molécula particularmente interesante que bien puede ser una alternativa estructural como cabeza de serie en la investigación de nuevos compuestos con actividad selectiva sobre los canales de  $K^+_v$  de utilidad terapéutica, o bien, como herramienta farmacológica, y aún más alentadores son estos resultados si consideramos que actualmente se conocen muy pocas estructuras o agentes químicos que presenten este perfil farmacológico.

## **3.- MARCO TEÓRICO**

### **3.1.- Generalidades de la Hipertensión Arterial**

Actualmente en México las enfermedades crónico-degenerativas son los padecimientos que predominan entre la población adulta, éstas constituyen las principales causas de mortalidad general. La diabetes, las dislipidemias y la hipertensión arterial destacan entre estos padecimientos por su elevada prevalencia y graves complicaciones como son las enfermedades del corazón, las neoplasias, la enfermedad cerebrovascular y las nefropatías. La hipertensión arterial (HTA) es uno de los principales problemas de salud prevalentes en la población mexicana. Al respecto, la más reciente Encuesta Nacional de Salud, realizada en el año 2000, señala que aproximadamente 30% de los adultos mayores de 20 años padecen de algún grado de HTA, por lo cual se le considera, por su frecuencia y la gravedad de sus complicaciones, como un problema muy grave de salud pública [Secretaría de Salud, 2007].

La HTA se define como un aumento sostenido de la presión arterial<sup>1</sup> (PA)  $\geq 140/90$  mmHg, es decir, 140 mmHg (presión sistólica o por contracción del corazón) sobre 90 mmHg (presión diastólica o por reimpulso de las arterias). El riesgo de una enfermedad cardiovascular, letal o no, es más bajo con presiones arteriales sistólicas menores de 120 mmHg y presión arterial diastólica inferior a 80 mmHg; estos riesgos aumentan de manera progresiva con presiones sistólicas y diastólicas más altas. Cabe mencionar que diversos estudios clínicos clasifican la gravedad de la HTA en base a la presión diastólica, los aumentos progresivos de la sistólica predicen de manera similar fenómenos

---

<sup>1</sup> Es la presión que soportan las paredes de los vasos sanguíneos arteriales al fluir la sangre a través de ellos.

cardiovasculares adversos, ya que en cada nivel de presión diastólica, los riesgos son más altos con cifras más altas en la presión sistólica [Brunton, Lazo, & Parker, 2005].

Los niveles de HTA se diferencian en: *Hipertensión ligera* (140-159/90-99 mmHg), *Hipertensión moderada* (160-179/100-109 mmHg) e *Hipertensión grave o maligna* ( $\geq 180/\geq 110$  mmHg) [Abadal, 2007]. Asimismo, la HTA se puede clasificar en base a la causa que la origina:

*Hipertensión arterial secundaria.* Es la hipertensión de causa conocida, se encuentra aproximadamente entre el 5 y el 10% del total de los hipertensos. En algunos casos, el control de la causa que la origina puede curarse. Los factores que la generan pueden ser la carga de volumen con aumento del líquido extracelular (LEC), la vasoconstricción que da un aumento de la resistencia vascular periférica total<sup>2</sup> (RVPT) o la combinación de sobrecarga de volumen y vasoconstricción.

*Hipertensión arterial primaria (idiopática o esencial).* La padece aproximadamente del 90 al 95% de los hipertensos. Este término significa simplemente que no se conoce causa orgánica evidente. La etiopatogenia no se conoce aún, pero los distintos estudios indican que los factores genéticos y ambientales juegan un papel importante en el desarrollo de la HTA primaria [Secretaría de Salud, 2001].

La HTA puede ser dañina por efectos primarios, debido al aumento del trabajo del corazón y lesión de las propias arterias por la presión excesiva; ya que la tensión arterial persistentemente elevada produce hipertrofia del ventrículo izquierdo y de la media de las arterias de resistencia, con estrechamiento de la luz. El riesgo coronario es paralelo al

---

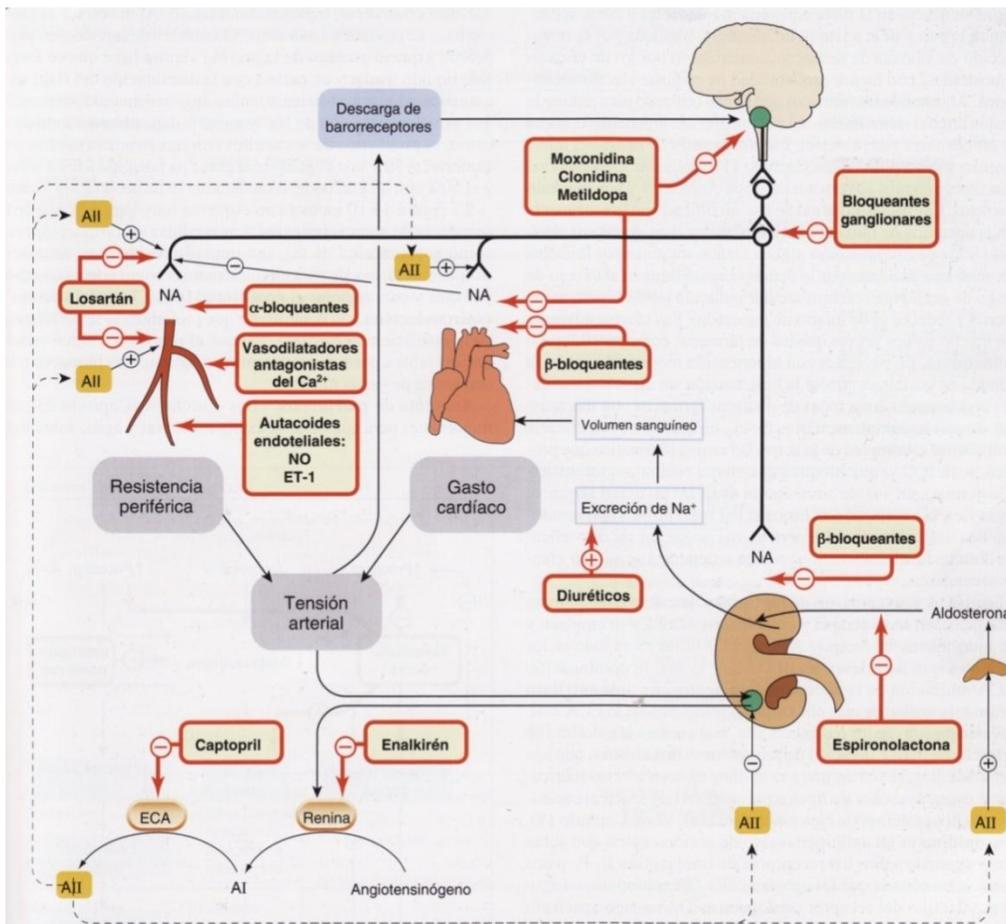
<sup>2</sup> Es la dificultad para el curso de la sangre a través de los vasos de la gran circulación.

aumento de la hipertrofia del tejido muscular; igualmente se desarrolla isquemia del ventrículo izquierdo, a medida que aumenta la HTA, ésta puede ser suficientemente peligrosa para que la persona sufra angina de pecho. La presión muy elevada en las arterias coronarias desarrolla arteriosclerosis coronaria de manera que los pacientes pueden morir por oclusión coronaria; asimismo la PA elevada puede ocasionar daños a nivel de la pared arterial, induciendo diversas consecuencias dependiendo del territorio arterial lesionado: si es cerebral, generará un accidente vascular cerebral; si es coronario provocará infarto de miocardio o fallo del corazón; si es a nivel de riñón conducirá a insuficiencia renal [Abadal, 2007].

Debido a que la PA es el producto del gasto cardiaco (GC) por la RVPT, resulta evidente que el aumento de cualquiera de estos dos factores puede provocar HTA. Sin embargo, en la mayor parte de los casos de HTA se comprueba que la RVPT está muy aumentada, mientras que el GC se conserva casi normal, lo que se ha interpretado como indicio que la HTA se origina por algún factor primario que aumenta la resistencia. El incremento de la RVPT pone en marcha varias respuestas fisiológicas del sistema cardiovascular, el sistema nervioso y el riñón, de tal manera que se producen ciertos circuitos estímulo-repuesta, los cuales son los objetivos primordiales de la acción farmacológica; los principales sistemas que controlan la tensión arterial y que son objetivo de los fármacos empleados en la HTA son el sistema nervioso simpático (SNS), el sistema renina-angiotensina-aldosterona y los autocoides derivados del endotelio tónicamente activo [Rang, Dale, Ritter, & Moore, 2004].

La terapia farmacológica empleada para el tratamiento de la HTA involucra fármacos estructuralmente diversos, que disminuyen la PA por su acción en la RVPT, el GC o ambos. Los diversos fármacos empleados en la terapéutica de la HTA pueden

disminuir el GC al inhibir la contractilidad miocárdica o disminución de la presión del llenado ventricular, la anterior se puede obtener mediante acciones en el tono venoso o el volumen sanguíneo a través de los efectos renales (Figura 2). En el caso de los fármacos que actúan sobre la RVPT, éstos la pueden reducir al actuar en el músculo liso a fin de relajar los vasos de resistencia o al interferir con la actividad de los sistemas que causan constricción de los mismos.

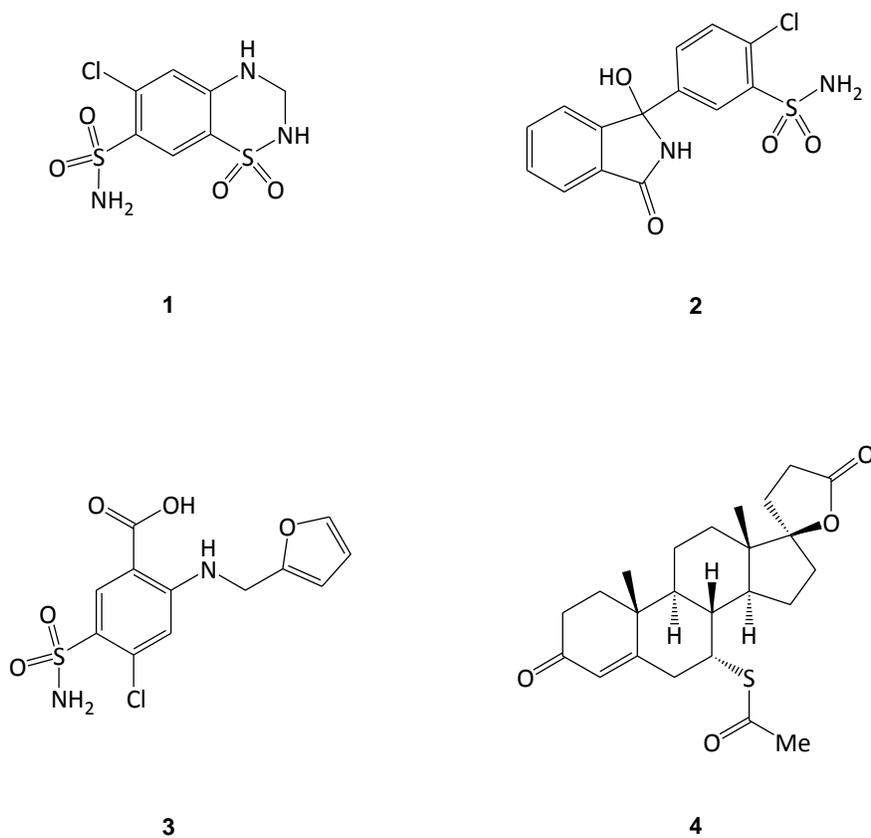


**Figura 2.** Principales mecanismos reguladores de la tensión arterial y sitios de acción de los agentes antihipertensivos de uso terapéutico más común. (Angiotensina I, AI; Angiotensina II, AII; Enzima Convertidora de la Angiotensina, ECA; Endotelina-1, ET-1; Noradrenalina, NA; Óxido Nítrico, NO).

En la clínica se emplean alguno o algunos de los siguientes tipos de fármacos:

I. *Diuréticos* (Figura 3) representados por:

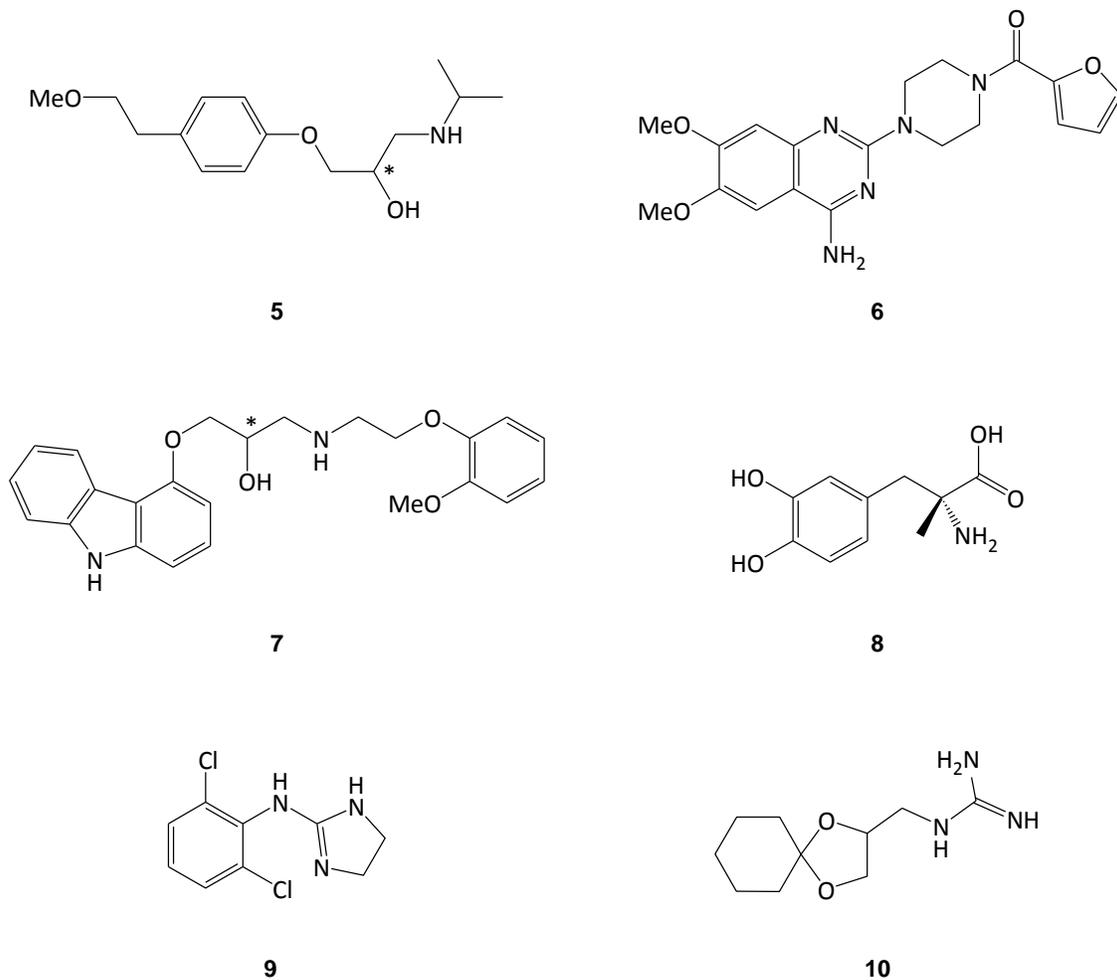
- a) Los Tiazídicos y fármacos relacionados, p. ej. Hidroclorotiazida (**1**), Clortalidona (**2**).
- b) Los diuréticos de asa como la Furosemida (**3**) y
- c) Los diuréticos ahorradores de  $K^+$ , p. ej. Espironolactona (**4**).



**Figura 3.** Estructura química de los diuréticos utilizados en terapia de la HTA, estos agentes han mostrado mayor eficacia cuando se emplean en la terapia combinada.

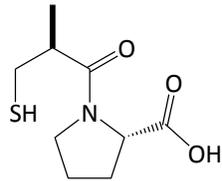
II. *Simpaticolíticos* (Figura 4), ejemplificados por:

- a) Antagonistas adrenérgicos  $\beta$  ( $\beta$ -bloqueadores) como el Metoprolol (**5**).
- b) Antagonistas adrenérgicos  $\alpha$  ( $\alpha_1$ -bloqueadores), tales como la Prazosina (**6**).
- c) Antagonistas adrenérgicos mixtos ( $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos), p. ej. el Carvedilol (**7**)
- d) Fármacos de acción central, como la Metildopa (**8**) y la Clonidina (**9**) y
- e) Bloqueadores de neuronas adrenérgicas, p. ej. el Guanadrel (**10**).

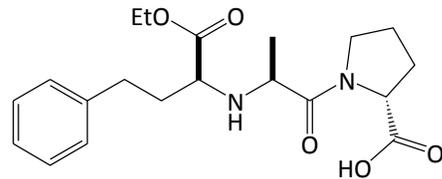


**Figura 4.** Estructura química de los fármacos simpaticolíticos antihipertensores. Los más empleados en esta clase son los antagonistas de los receptores adrenérgicos  $\alpha$  y  $\beta$ .

III. *Inhibidores de la Enzima Convertidora de Angiotensina (IECA, Figura 5)*, como el Captoprilo (**11**) y el Enalaprilo (**12**).



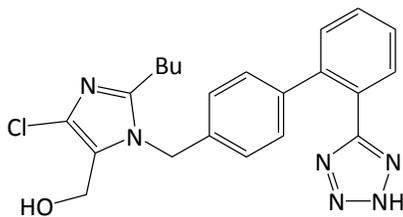
**11**



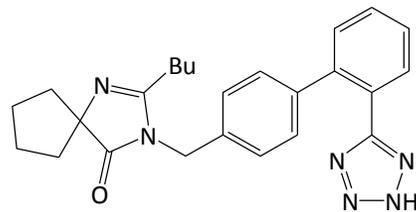
**12**

**Figura 5.** Fármacos inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina, muy útiles en la terapia de la HTA.

IV. *Antagonistas del receptor de Angiotensina II AT<sub>1</sub> (ARA-II, Figura 6)*, representados por el Losartán (**13**) e Irbesartán (**14**).



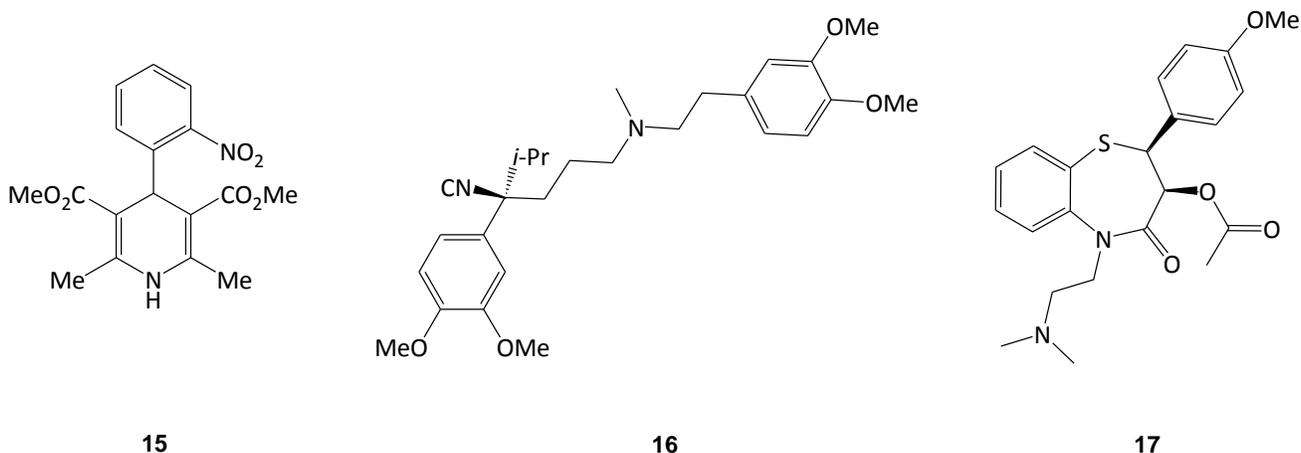
**13**



**14**

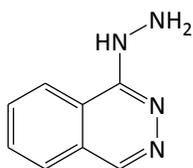
**Figura 6.** Antagonistas de los receptores de Angiotensina II del subtipo AT<sub>1</sub>, con actividad vasorrelajante sobre músculo liso.

V. *Bloqueadores del canal de Ca<sup>+2</sup>* (Figura 7), como lo son la Nifedipina (**15**), el Verapamilo (**16**) y el Diltiazem (**17**).

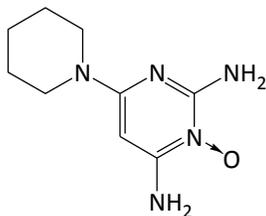


**Figura 7.** Antagonistas de los canales de Ca<sup>+2</sup>. Estos fármacos bloquean la entrada de Ca<sup>+2</sup> al impedir la apertura de los canales de Ca<sup>+2</sup> regulados por el voltaje tipo L.

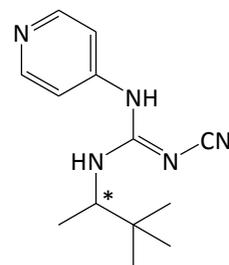
VI. *Vasodilatadores directos de la fibra muscular lisa arterial* (Figura 8). En este grupo se encuentra la Hidralacina (**18**) y los activadores del canal de K<sup>+</sup>, tales como el Minoxidilo (**19**) y el Pinacidilo (**20**). Los activadores del canal de K<sup>+</sup> aumentan la permeabilidad de la membrana para el K<sup>+</sup>, lo que hace que se hiperpolaricen las células y se desactiven los canales de Ca<sup>+2</sup> dependientes del voltaje.



18



19



20

**Figura 8.** Fármacos vasodilatadores de acción directa en músculo liso usados en la clínica. La Hidralacina provoca vasodilatación mediante un mecanismo desconocido, mientras que el Pinacidilo y el Minoxidilo inducen hiperpolarización de la membrana celular a través de la modulación de canales de  $K^+$ .

A pesar de la disponibilidad de esta gran diversidad de agentes farmacológicos antihipertensivos, en la clínica no se recomienda, el empleo de fármacos para el control de la HTA moderada ; por lo general el tratamiento consiste en medidas no farmacológicas tales como la prescripción de ejercicio físico para el paciente, disminución en la ingesta de sal y de las grasas saturadas e incremento de frutas y fibra en la dieta y reducción del consumo del alcohol, posteriormente se recurre, de manera de manera progresiva ,al tratamiento farmacológico, comenzando por los de eficacia demostrada y con menores efectos secundarios [Rang, Dale, Ritter, & Moore, 2004]. En casos de pacientes con HTA grave se emplean tratamientos terapéuticos que incluyen diversos tipos de fármacos; en este sentido, la Química Medicinal desempeña un papel trascendental en el diseño racional y síntesis de nuevos fármacos más potentes a fin de reducir los efectos adversos generados durante la administración farmacológica.

### 3.2.- Reacciones Multicomponentes y su Importancia en la Química Medicinal

La Química Medicinal desempeña una función medular en el diseño, modelado, síntesis y descubrimiento de nuevas entidades químicas, así como de su optimización y desarrollo como potenciales fármacos para el tratamiento de diversas enfermedades [Nogrady & Weaver, 2005]. Uno de sus objetivos fundamentales es la investigación de nuevos fármacos más potentes, con actividad bioespecífica y menos tóxicos en su acción terapéutica. Sin embargo, la investigación biomédica no solo está condicionada por estas premisas, sino que se deben tener en cuenta otros aspectos dentro de los cuales podemos destacar, además de las consideraciones económicas, los intereses científico y terapéutico que justifiquen el desarrollo de un nuevo fármaco frente a otros ya existentes con similares aplicaciones terapéuticas [Delgado, Minguillón, & Joglar, 2003]. Para cumplir con estos objetivos, el Químico Medicinal debe diseñar y sintetizar nuevas moléculas, determinar la manera en que éstas pueden interactuar con las macromoléculas biológicas, establecer la relación existente entre su estructura y su actividad biológica, además de determinar sus propiedades farmacocinéticas, farmacodinámicas y toxicológicas.

Para generar estas nuevas moléculas, los investigadores recurren a diversas estrategias como la mejora de fármacos ya existentes, el cribado (*screening*) de familias enteras de moléculas o el diseño racional de nuevas moléculas. La mejora de fármacos involucra la modificación estructural de fármacos ya conocidos, con la finalidad de optimizar tanto el perfil terapéutico o toxicológico, así como las propiedades fisicoquímicas del fármaco. Por su parte, el cribado comprende un conjunto de ensayos biológicos que permiten evaluar de modo preliminar el perfil farmacológico de una molécula o conjunto de moléculas; para ello se pueden emplear modelos en animales (*in vivo*), ensayos farmacológicos en órganos o tejidos aislados (*in vitro* ó *ex vivo*) o ensayos en los que se

evalúa directamente la actividad en dianas como enzimas o receptores de membrana [Delgado, Minguillón, & Joglar, 2003]. El diseño racional de nuevos fármacos implica el entendimiento de la enfermedad a nivel molecular, es decir, de los receptores o macromoléculas que intervienen en el padecimiento; tal comprensión facilita el diseño de nuevos fármacos que actúen en estas dianas. Para llevar a cabo el diseño racional es necesaria la identificación de las macromoléculas biológicas involucradas en la enfermedad, de igual forma, es conveniente que éstas hayan sido purificadas, caracterizadas y que su estructura tridimensional haya sido establecida previamente, para que, mediante la ingeniería de moléculas orgánicas, se generen nuevos ligandos de mayor afinidad para estas dianas que provoquen el efecto terapéutico deseado. Una vez identificados los receptores involucrados, es necesario desarrollar un método de diseño de moléculas con probable actividad farmacológica, de manera que estos nuevos agentes sean capaces de unirse a tales receptores y puedan inducir el efecto biológico deseado [Nogrady & Weaver, 2005].

En este sentido, el Método del Multíforo se considera una herramienta importante para el diseño de nuevos fármacos, siendo aplicable a cualquiera de las estrategias previamente mencionadas, debido a que este método asume que las moléculas con actividad terapéutica están conformadas por subunidades bioactivas o bióforos; de modo que un fármaco invariablemente está constituido de diversos bióforos y por ende adquiere la denominación de multíforo [Nogrady & Weaver, 2005]. El bióforo más importante dentro de la estructura de un fármaco es el farmacóforo, el cual está constituido por un subconjunto de átomos de la molécula que permiten un enlace energéticamente favorable con algún sitio receptor, provocando la respuesta biológica benéfica<sup>3</sup> [Nogrady & Weaver,

---

<sup>3</sup> Existen otras porciones de la molécula del fármaco que determinan las propiedades metabólicas y tóxicas del mismo, estos fragmentos se denominan metabóforos y toxicóforos, respectivamente.

2005]. El método del multíforo se puede aplicar previa síntesis de nuevos candidatos bioactivos, así como a moléculas ya sintetizadas y con actividad biológica probada, debido a que mediante los estudios de estructura-actividad biológica se pueden discernir los fragmentos que constituyen al farmacóforo y, posteriormente, se puede rediseñar la molécula para mejorar su perfil farmacológico. Del mismo modo, este método permite, mediante la sustitución de uno o varios átomos distintos al fragmento farmacofórico, mejorar ciertas propiedades fisicoquímicas y biológicas de las moléculas, conservando el efecto farmacológico deseado.

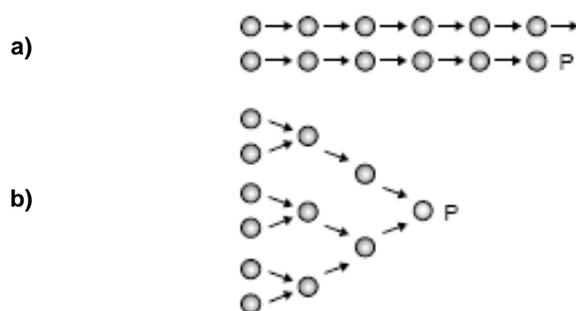
Sin embargo, el método del multíforo aplicado al diseño de nuevos fármacos requiere de un largo proceso, debido a que, por lo general, para llegar al desarrollo de un candidato final son necesarias múltiples evaluaciones, reevaluaciones y rediseños de la molécula investigada. Este proceso comprende cinco etapas:

- 1) El diseño o identificación del compuestos cabeza de serie (prototipo).
- 2) La síntesis e investigación biológica preliminar del compuesto cabeza de serie.
- 3) La optimización del compuesto cabeza de serie en la fase farmacodinámica.
- 4) La optimización del compuesto cabeza de serie en las fases farmacocinéticas y farmacéuticas.
- 5) Las evaluaciones preclínica y clínica del análogo optimizado del compuesto prototipo.

Una vez que se ha identificado un compuesto cabeza de serie, el diseño y la síntesis de compuestos análogos son los aspectos de mayor relevancia, ya que permitirán una exploración sistemática del compuesto cabeza de serie, estableciendo de esta

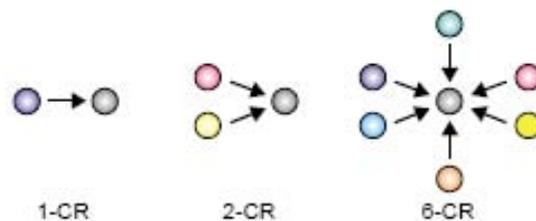
manera, las bases posteriores de la farmacomodulación o modificación molecular. Esto, con el objetivo de mejorar las propiedades farmacológicas en los congéneres del cabeza de serie. Además, es posible, en la mayoría de las veces, obtener compuestos más simples que conserven o mejoren la actividad del compuesto cabeza de serie y que se generen mediante rutas sintéticas comunes o aproximaciones combinatorias de las mismas, con el consecuente ahorro de tiempo y dinero [Delgado, Minguillón, & Joglar, 2003].

En este sentido, durante la planeación de la ruta de síntesis para la preparación de la molécula o familia de moléculas de interés, el Químico Orgánico plantea diversas rutas de síntesis para la obtención de las moléculas de interés a partir de reactivos fácilmente disponibles. La ruta de síntesis planteada puede ser divergente (o lineal) o convergente, en la síntesis divergente el producto de la síntesis de la última etapa de reacción es el reactivo del siguiente proceso de síntesis, de manera que la ruta sintética se lleva a cabo de manera secuencial. Por otra parte, la síntesis mediante reacciones convergentes aborda la síntesis de la molécula objetivo vía la preparación inicial de múltiples intermediarios reactivos que finalmente reaccionan para formar la molécula deseada en la última etapa de reacción (Figura 9) [Dömling A., 2002]. Puesto que la eficiencia total de una reacción está determinada por el número de etapas involucradas, las síntesis convergentes proporcionan mayores eficiencias y, por lo tanto, son preferidas en relación a las síntesis divergentes.



**Figura 9.** Representación esquemática de una síntesis divergente (a) y una síntesis convergente (b).

Por esta razón, el Químico ha desarrollado nuevas reacciones convergentes más eficientes que no involucren procesos múltiples y que, en el mejor de los casos, generen rendimientos altos. En este sentido, las Reacciones Multicomponentes (RMCs) se presentan como una estrategia de síntesis química muy apropiada y poderosa, éstas se caracterizan por una reacción única, en donde reaccionan más de tres reactivos para generar uno o más productos (Figura 10). Los reactivos pueden ser diferentes moléculas o, en ciertos casos, los diversos grupos funcionales de moléculas iguales [Ugi, Dömling, & Hörl, 1994]. En una RMC se hacen reaccionar varios reactivos, mediante una secuencia lógica de reacción, para formar productos complejos. Una síntesis multicomponente ideal involucra la adición de todos los reactivos y catalizadores de manera simultánea en el seno de la reacción, originando como resultado que los reactivos se combinen de manera única y ordenada bajo las mismas condiciones de reacción [Dömling, 2006]. De este modo, una RMC es una serie de eventos mono o bimoleculares que reaccionan de manera secuencial hasta llegar a un último paso que genera el producto de reacción. Todos estos procesos son altamente eficientes debido a que suscitan una complejidad molecular al dar origen a más de dos enlaces químicos en cada reacción particular.



**Figura 10.** La transformación química de uno (1-CR) o dos (2-CR) componentes para formar un producto se considera como una síntesis divergente comparada con una RMC que involucra más de tres componentes (6-CR).

Algunas de las principales RMCs empleadas en la actualidad a nivel industrial (Tabla 1) se remontan a mediados y finales del siglo XIX, tal es el caso de la síntesis de Strecker (1850) para la generación de  $\alpha$ -aminonitrilos y que se ha empleado para la producción de aminoácidos, la síntesis de Dihidropiridinas (DHPs) de Hantzsch (1882) o la síntesis de Biginelli (1891) para la formación de Dihidropirimidinas (DHPMs), asimismo en el siglo XX podemos mencionar como ejemplos notables la reacción de Passerini (1921) y la reacción de Ugi (1959). Sin embargo, durante la segunda mitad del siglo XX se dejó de lado la investigación de nuevas RMCs, retomándose su desarrollo con la aparición de la biología molecular y el cribado de alta eficacia.

**Tabla 1.** Principales RMCs empleadas a nivel industrial.

<i>Síntesis</i>	<i>Reacción General</i>
A. Strecker	$  \begin{array}{c} R_1 \\ \diagdown \\ N \\ \diagup \\ R_2 \\   \\ H \end{array} + \begin{array}{c} O \\    \\ R_3 - C - R_4 \end{array} + HCN \longrightarrow \begin{array}{c} R_2 \\   \\ R_1 - N \\   \\ C \\ / \quad \backslash \\ R_3 \quad CN \\   \\ R_4 \end{array}  $
A. R. Hantzsch	$  NH_3 + \begin{array}{c} H \\   \\ R - C = O \end{array} + 2 \begin{array}{c} O \\    \\ R_1 - C - CH_2 - C - O - R_2 \\    \\ O \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} R \\   \\ R_2OOC - C = C - COOR_2 \\   \quad   \\ R_1 \quad NH \\   \quad   \\ R_1 \quad R_1 \end{array}  $
P. Biginelli	$  \begin{array}{c} O \\    \\ NH_2 - C - NH_2 \end{array} + \begin{array}{c} R \\   \\ R_1 - C - CH_2 - C - O \\    \\ O \end{array} + \begin{array}{c} R_2 \\   \\ C = O \\   \\ H \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} R_2 \\   \\ R - C = C - NH \\   \quad   \\ R_1 \quad H \\   \quad   \\ \quad C = O \end{array}  $
M. Passerini	$  R_1 - NC + \begin{array}{c} O \\    \\ R_2 - C - OH \end{array} + \begin{array}{c} O \\    \\ R_3 - C - R_4 \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} H \\   \\ R_1 - N - C - R_3 - R_4 - C - O - R_2 \\    \\ O \end{array}  $
I. K. Ugi	$  R_1 - NC + \begin{array}{c} O \\    \\ R_2 - C - R_3 \end{array} + R_4 - NH_2 + \begin{array}{c} O \\    \\ R_5 - C - OH \end{array} \longrightarrow \begin{array}{c} O \\    \\ R_5 - C - N - R_3 - R_2 - C - H \\   \quad   \quad   \\ R_4 \quad O \quad R_1 \end{array}  $

En virtud de la aparición del método de cribado de alta eficacia (HTS) ampliamente usado por las compañías farmacéuticas para la investigación de nuevos compuestos orgánicos bioactivos; el Químico Medicinal enfrenta el reto de generar grandes bibliotecas de moléculas que cubran la demanda de nuevos compuestos para ser evaluados mediante esta técnica. Al respecto, las RMCs se han convertido en una poderosa

estrategia de síntesis para la construcción de moléculas orgánicas estructuralmente simples o complejas con perfiles farmacológicos diversos. La síntesis multicomponente, aplicada a la investigación de nuevos compuestos bioactivos, presenta como preeminencia el desarrollo de nuevos protocolos de síntesis con características quimio-, regio- y estereoselectivos, además de que poseen cualidades altamente deseables como tiempos de reacción cortos, reacciones eficientes y simples, de fácil aislamiento y purificación, la omisión de reactivos y disolventes tóxicos, así como la disminución de los desechos resultantes de tales procesos [Kolb, Beck, Almstetter, Heck, Herdtweck, & Dömling, 2003].

Por lo tanto, el desarrollo y aplicación de las RMCs es una parte integral del trabajo de cualquier laboratorio de investigación dedicado a la búsqueda de nuevos fármacos, teniendo en cuenta que éstas han contribuido de manera trascendental a la preparación de nuevos compuestos bioactivos de aplicación terapéutica, al descubrimiento de nuevos compuestos cabeza de serie, a la optimización del compuesto cabeza de serie o la producción de los análogos optimizados. Las RMCs aplicadas en el ámbito de la Química Medicinal proporcionan ventajas importantes como:

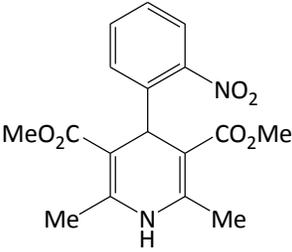
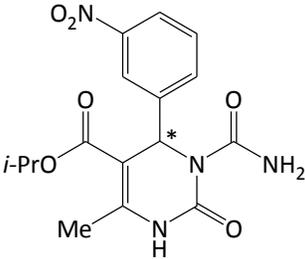
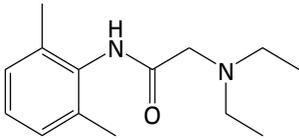
- Las rutas sintéticas para la transformación de los grupos funcionales de una molécula o síntesis de moléculas orgánicas son más simples en relación con las síntesis lineales.
- Menor generación de subproductos, las reacciones son más limpias en relación a las síntesis químicas tradicionales.

- Por lo general, las RMCs son procesos en solución que permiten un seguimiento de reacción simple, lo que conlleva a la reducción de los costos de automatización del proceso.
- Reducen los tiempos de evaluación farmacológica de las moléculas de interés debido a que las transformaciones químicas sobre los compuestos cabeza de serie implican procesos cortos y simples.
- Admiten la construcción de moléculas, ya sea cabeza de serie o análogos, con propiedades fisicoquímicas altamente deseables desde el punto de vista farmacológico; p. ej.  $\log P$ , peso molecular, enlaces de hidrógeno, refractividad molar, enlaces rotatorios y área polar superficial.
- Los costos de producción a nivel industrial de un fármaco que se prepare mediante RMCs pueden disminuir en gran medida en comparación con una ruta de síntesis lineal, permitiendo grandes ahorros para las compañías farmacéuticas.
- Una característica importante de las RMCs, particularmente en el área de la Química Medicinal, es la posibilidad de preparar moléculas con los grupos farmacofóricos deseados mediante la incorporación de pequeños fragmentos a partir de los reactivos, lo que permite preparar familias enteras de moléculas con diversos fragmentos estructurales con la simple variación de los reactivos. Esta estrategia permite disponer de una biblioteca de moléculas de forma rápida, mismas que serán evaluadas para identificar el fragmento farmacofórico

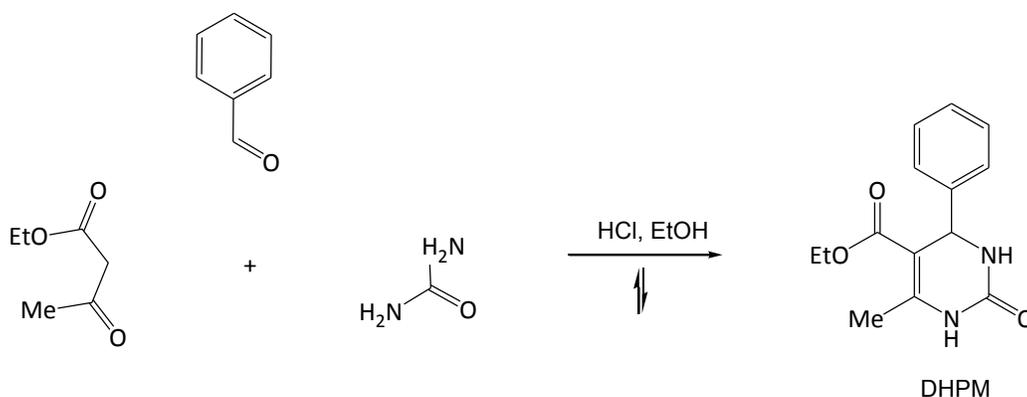
que proporcione a la molécula un mejor desempeño farmacológico [Zhu & Bienaymé, 2005].

Dentro de las RMCs empleadas para la obtención de fármacos podemos citar a las síntesis de Hantzsch, la síntesis de Ugi y la síntesis de Biginelli (Tabla 2). Siendo esta última una de las RMCs más estudiadas en el área de la Química Medicinal para la preparación de moléculas con estructura de Dihidropirimidinas (DHPMs), esto a pesar de que se han reportado otros métodos de síntesis.

**Tabla 2.** Algunos compuestos con actividad farmacológica sintetizados mediante RMCs.

<i>Reacción</i>	<i>Estructura</i>	<i>Bioactividad</i>
Hantzsch	 <p><b>Nifedipina</b></p>	Antihipertensivo
Biginelli	 <p><b>SQ 32926</b></p>	Antihipertensivo
Ugi	 <p><b>Xilocaina</b></p>	Anestésico local

La síntesis de la molécula de DHPM, mediante las condiciones de Biginelli, se basa en una reacción de condensación entre la urea, el aril aldehído y el acetoacetato de etilo (Figura 11).

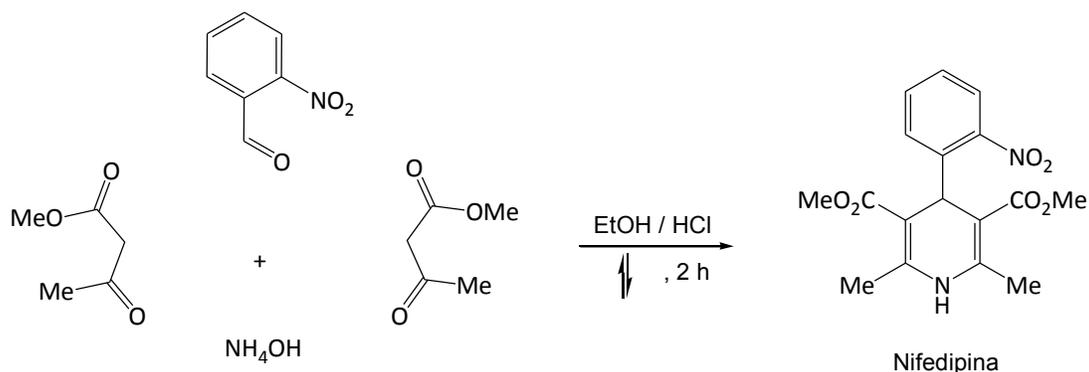


**Figura 11.** Síntesis de Biginelli típica aplicada a la preparación de moléculas con estructura de DHPMs.

El interés farmacológico que se derivó a fines del siglo XX (1980s) en este tipo de estructura se debe, principalmente a que las DHPMs poseen el mismo fragmento farmacofórico que la Nifedipina, una DHP moduladora de los canales de Ca<sup>+2</sup> tipo L, con aplicación terapéutica en el área cardiovascular y preparada mediante la síntesis de Hantzsch (Figura 12) [Kappe, 2000].

La Nifedipina pertenece al grupo de las 4-aril-1,4-dihidropiridinas (1,4-DHPs), las cuales son el grupo más estudiado de moduladores de los canales de Ca<sup>+2</sup> de naturaleza orgánica; y han sido empleados para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tales como hipertensión, arritmias cardíacas o angina de pecho [Kappe, 2000],

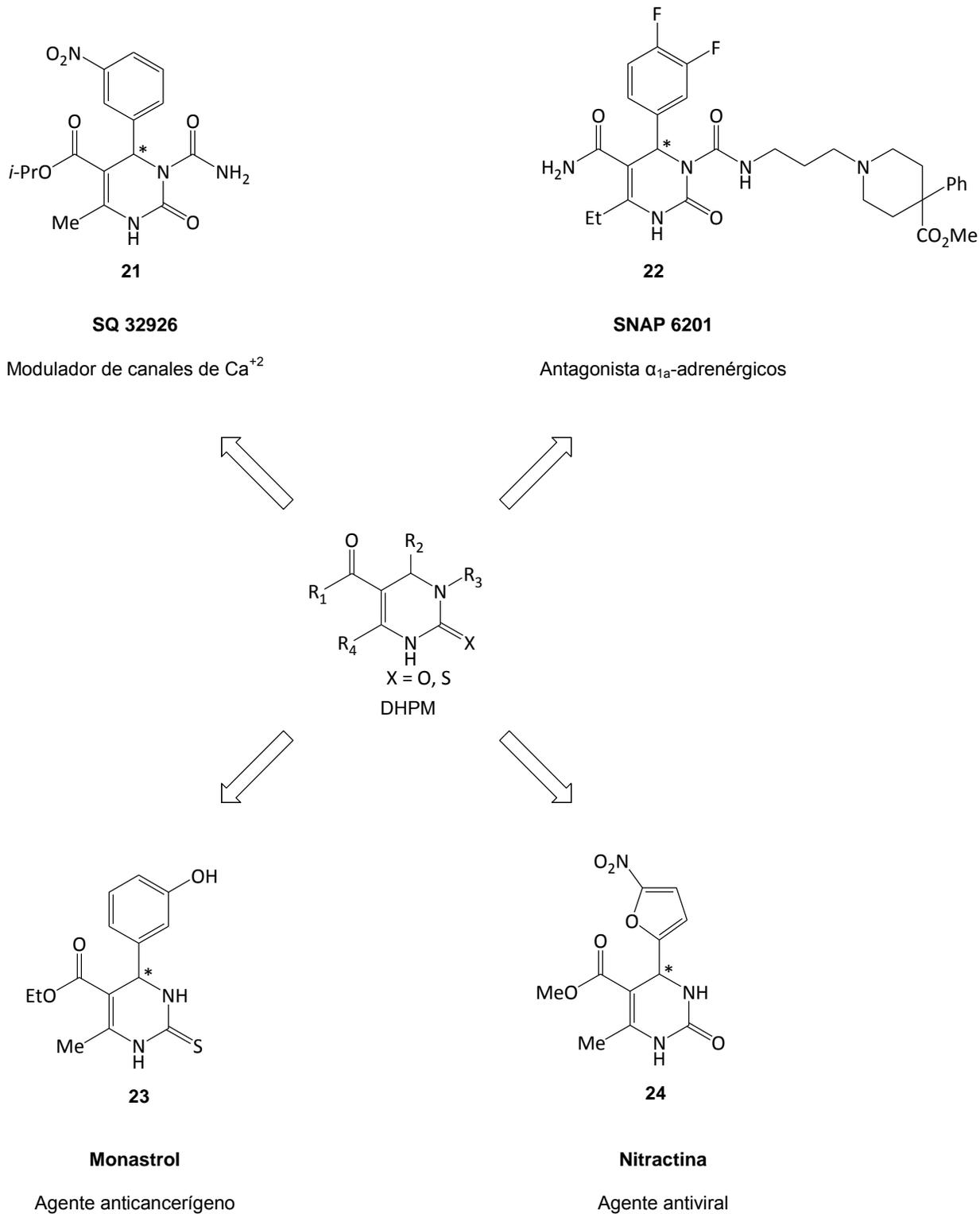
actualmente son exploradas como moduladores de canales de  $K^+$ , inhibidores de enzimas y bloqueadores de apetito.



**Figura 12.** Síntesis de Hantzsch para la preparación de Nifedipina.

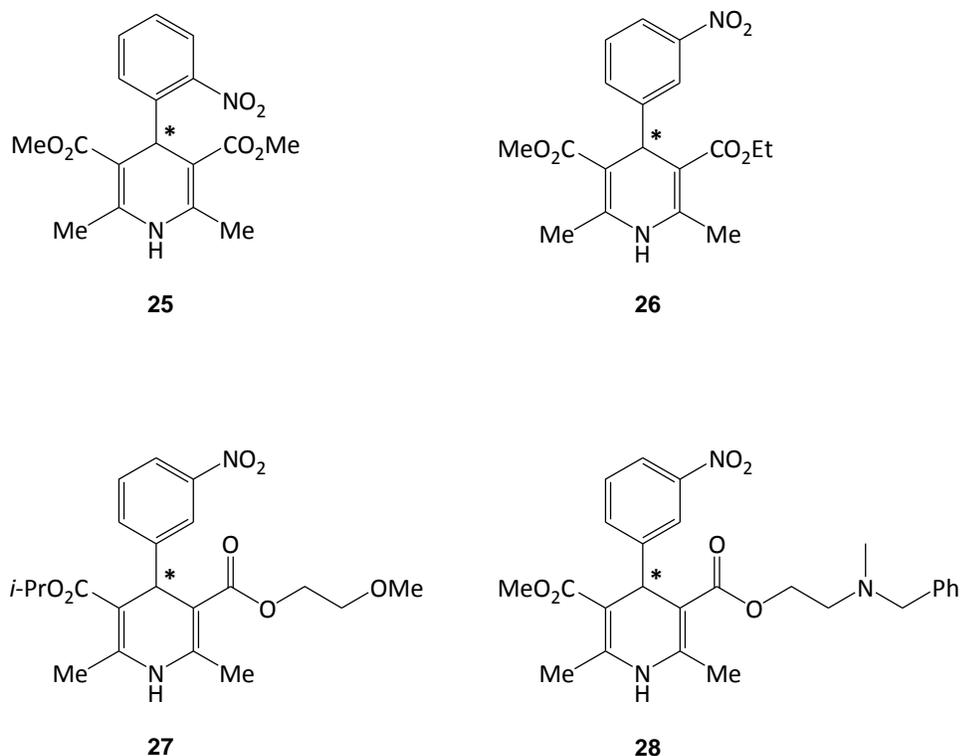
Por su parte, se han descubierto nuevas y diversas propiedades farmacológicas de los derivados de las DHPMs (Figura 13), los cuales han sido empleadas como moduladores de los canales de  $Ca^{+2}$  (**21**), como antagonistas de los receptores  $\alpha_{1a}$ -adrenérgicos acoplados a proteínas G (**22**), como agentes inhibidores de la kinesina mitótica (**23**) y como agentes antivirales (**24**) [Zhu & Bienaymé, 2005].

Actualmente este núcleo representa uno de los quimiotipos más prolíficos en el descubrimiento de nuevos fármacos, al conferir una elevada potencia farmacológica a las diversas moléculas. Se tiene la expectativa de que en el futuro se descubrirán nuevas DHPMs con importantes propiedades biológicas empleando como herramientas la química combinatoria, así como el HTS.



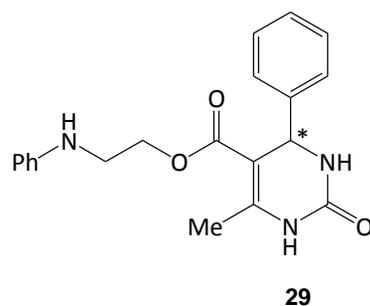
**Figura 13.** Fármacos con núcleo DHPM que presentan actividad farmacológica.

En este sentido, existe un amplio interés por el estudio de las DHPMs debido a que éstas pueden presentar un perfil farmacológico análogo al de Nifedipina (**25**) y sus homólogos Nitrendipina (**26**), Nimodipina (**27**) y Nicardipina (**28**) (Figura 14).



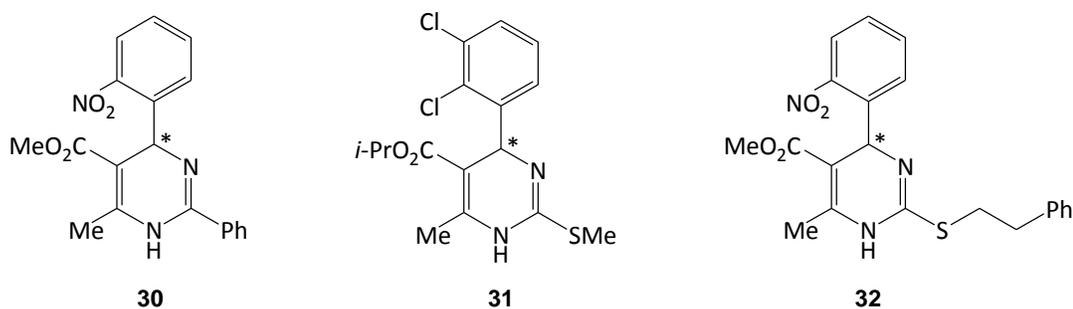
**Figura 14.** Nifedipina (**25**) y algunos de sus homólogos activos bloqueadores de los canales de Ca<sup>+2</sup>.

La actividad cardiovascular de las DHPMs fue reportada por vez primera en 1978 por Khanina et al., quienes reportaron que ciertas DHPMs con un grupo β-arilaminoetilóxicarbonil sobre el C-5 (**29**) presentaban moderada actividad hipotensora (Figura 15).



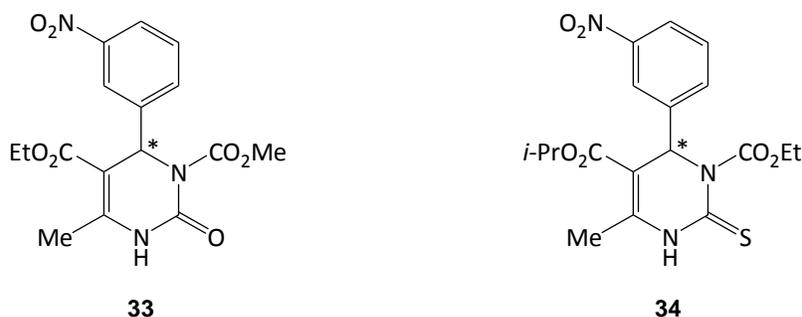
**Figura 15.** DHPM con el grupo  $\beta$ -arilaminoetilóxicarbonilo en C-5 con actividad cardiovascular.

A mediados de la siguiente década, el interés se centró en el estudio de moléculas del tipo 5-alquilóxicarbonilo-4-aril-1,4-dihidropirimidina (**30**, **31** y **32**) (Figura 16), las cuales presentaban un perfil farmacológico similar al de las DHPs bloqueadoras de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$ , sin embargo, estos análogos presentaban la inconveniencia de que a pesar de ser potentes bloqueadores del  $\text{Ca}^{+2}$ , la mayoría carecían de actividad antihipertensiva significativa en los estudios *in vivo* [Kappe, 2000].



**Figura 16.** Moléculas de DHPMs antagonistas del  $\text{Ca}^{+2}$  con fragmento alquilóxicarbonilo en el C-5.

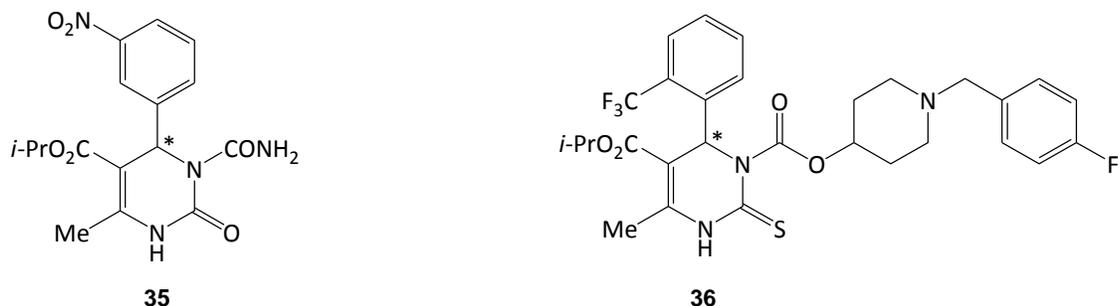
Posteriormente, mediante modificaciones estructurales en el anillo DHPM se generaron moléculas funcionalizadas con un grupo alquilóxicarbonilo sobre el *N*-3 (**33**), lo cual les confería una acción vasodilatadora más potente y duradera en comparación con las 1,4-DHPs. Sin embargo, por medio del estudio en modelos *in vivo* se estableció que la acción hipotensiva se desencadenaba muy lentamente en comparación con las DHPs. Entre los compuestos más potentes derivados de las DHPMs con este grupo funcional en *N*-3 encontramos el derivado de tiourea reportado por Atwal (**34**), el cual a pesar de provocar actividad biológica análoga a las 1,4-DHPs, carecía de actividad antihipertensiva *in vivo*. La falta de actividad *in vivo* de estos derivados (Figura 17), se atribuye a su transformación eficiente (efecto del primer paso) para generar nuevos metabolitos que no exhiben actividad antihipertensiva.



**Figura 17.** DHPMs funcionalizadas en *N*-3 con el fragmento alquilóxicarbonilo.

Ulteriormente, nuevas modificaciones en el sustituyente sobre el *N*-3 condujeron al desarrollo de nuevas moléculas con acción antihipertensiva prolongada vía administración oral, p. ej. SQ 32926 (**35**), SQ 32547 (**36**). El SQ 32926, suministrado por esta vía, muestra una mayor actividad antihipertensiva en comparación con el compuesto **34** debido a que el fragmento de la urea le confiere una mayor estabilidad química mejorando

su biodisponibilidad, asimismo, posee una mayor potencia y duración de efecto que la Nifedipina como agente antihipertensivo, las cuales pueden compararse con la Amlodipina, una DHP de larga duración [Kappe, 2000]. De igual manera se han establecido propiedades farmacológicas similares para la molécula SQ 32547 (Figura 18).



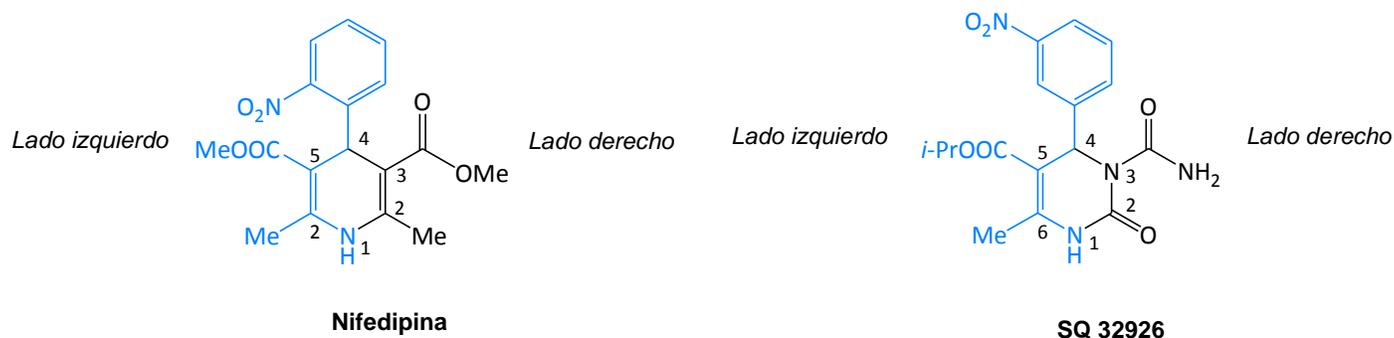
**Figura 18.** DHPMs con actividad antihipertensiva vía administración oral.

El empleo de la Nifedipina en el tratamiento de la hipertensión presenta importantes desventajas como tiempos de vida media ( $t_{1/2}$ ) en plasma relativamente cortos debidos a su rápida oxidación a la correspondiente piridina inactiva farmacológicamente, además de ser un compuesto altamente fotosensible, característica que compromete su estabilidad durante la exposición a la luz, dando como resultado su transformación en compuestos que poseen una mucho menor potencia como agentes antagonistas del  $\text{Ca}^{+2}$  [Hayase, Inagaki, & Abiko, 1995].

Por estas razones, es altamente deseable la investigación y síntesis de nuevas moléculas con propiedades químicas y farmacológicas mejoradas. Para tal efecto, las DHPMs resultan ser excelentes candidatas por su mayor estabilidad química y perfil farmacológico análogo a las 1,4-DHPs. Debido a que las DHPMs presentan grandes

similitudes estructurales con las 1,4-DHPs, se sabe que éstas presentan afinidad por la porción externa del canal de  $\text{Ca}^{+2}$ .

A este respecto, se han presentado evidencias que el fragmento farmacofórico, presente tanto en las moléculas de 1,4-DHPs y DHPMs, se sitúa entre los átomos *N*-1, *C*-6, *C*-5 y *C*-4<sup>4</sup> (Figura 19) [Rovnyak, et al., 1995].



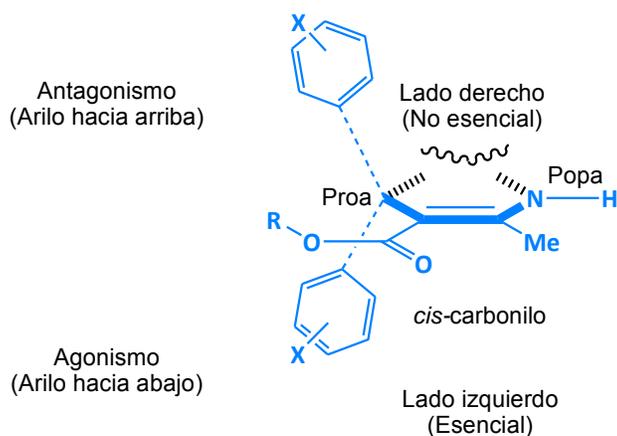
**Figura 19.** Sitio activo (azul) en DHPs y DHPMs moduladores del  $\text{Ca}^{+2}$ .

Rovnyak *et al.* proponen que la acción moduladora (agonista o antagonista) en el canal de  $\text{Ca}^{+2}$  depende de la configuración absoluta en *C*-4 (R/S); observando a las DHPs o DHPMs desde la *posición de bote* (Figura 20)<sup>5</sup>. Los enantiómeros que presenten el grupo arilo orientado hacia arriba pseudoaxialmente exhibirán actividad antagonista del  $\text{Ca}^{+2}$  (**37** y **39**), mientras que los enantiómeros con el grupo arilo con orientación hacia abajo pseudoaxialmente mostrarán actividad agonista (**38** y **40**). En este mismo sentido,

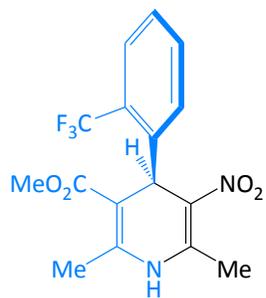
<sup>4</sup> En el caso de las DHPs asimétricas, la molécula se orienta de manera que en el lado izquierdo se presente el grupo (*C*-3 o *C*-5) cuya interacción con el receptor sea más fuerte.

<sup>5</sup> Se orienta al anillo de 1,4 DHP o DHPM de manera que se observe la molécula de *N*-1 (popa) hacia *C*-4 (proa), de esta manera quedan definidos los lados izquierdos y derecho de las moléculas.

también se considera trascendental la presencia del fragmento alquilóxicarbonilo con el grupo carbonilo dispuesto en una orientación *cis* (con respecto al doble enlace en C-5 y C-6 en la DHP) para la máxima afinidad de estos compuestos con el receptor, lo que influye directamente en la óptima actividad (potencia) moduladora del canal de  $\text{Ca}^{+2}$  (Figura 21) [Rovnyak, et al., 1995]. Por su parte, Rovnyak *et. al.* establecen que en la acción moduladora de canal de  $\text{Ca}^{+2}$ , solo son esenciales las interacciones del lado izquierdo de las DHPs y DHPMs, mientras que las interacciones del lado derecho no presentan mayor relevancia con respecto a la actividad biológica, estas conclusiones ofrecen una explicación para entender las similitudes en los perfiles farmacológicos entre DHPs y DHPMs como moduladores del canal de  $\text{Ca}^{+2}$ .



**Figura 20.** Aspectos estructurales, conformacionales y configuracionales de las DHPs y DHPMs para la actividad biológica.

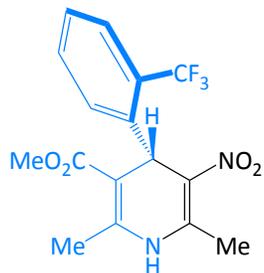


37

**R-(+)Bay K 8644**

Antagonista potente

(CE<sub>50</sub> = 33 nM)

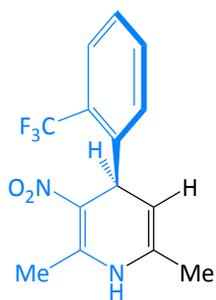


38

**S-(-)Bay K 8644**

Agonista potente

(CE<sub>50</sub> = 14 nM)

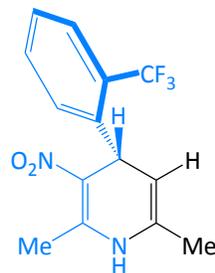


39

**S-(-)Bay K 8644(C<sub>5</sub>H)**

Antagonista débil

(CE<sub>50</sub> = 10400 nM)



40

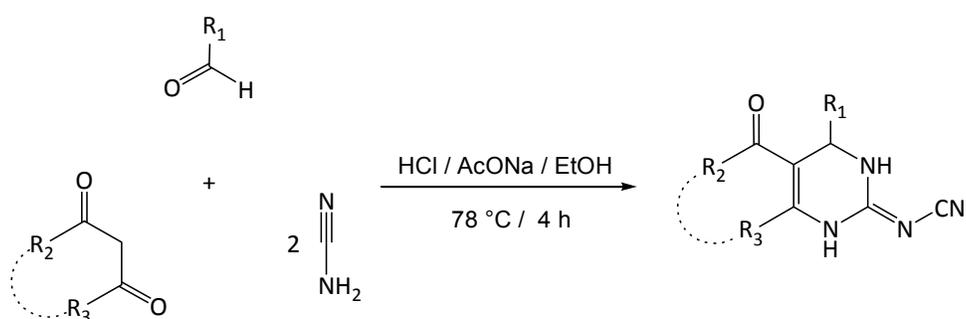
**R-(+)Bay K 8644(C<sub>5</sub>H)**

Agonista débil

(CE<sub>50</sub> = 3240 nM)

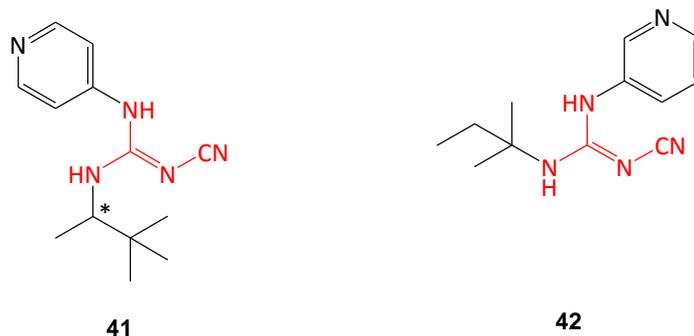
**Figura 21.** Actividad farmacológica y potencia de algunas DHPs en función de la configuración absoluta sobre el C-4 y el sustituyente sobre el C-3 en el lado izquierdo de las moléculas.

Por lo anterior, se establece que el fragmento del núcleo de la DHPM constituido por los átomos C-2 y N-3 no es importante para la actividad farmacológica como moduladores del  $\text{Ca}^{+2}$ , por lo que resulta atractiva la funcionalización del C-2 con fragmentos estructurales farmacológicamente activos con propiedades semejantes que coadyuven la actividad de estos compuestos. En este sentido, recientemente se ha publicado un nuevo protocolo de síntesis de compuestos con estructura de 4-aryl sustituido-2-cianoimino-3,4-dihidro-1*H*-pirimidinas (ACIDHPMs) (Figura 22) mediante el cual se puede funcionalizar, de manera apropiada, el C-2 con un grupo cianoguanidino [Hulme, et al., 2008].



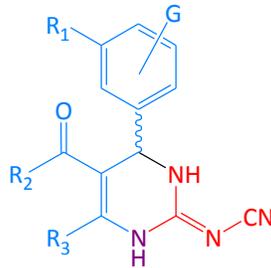
**Figura 22.** Reacción general para la síntesis de ACIDHPMs, basada en un protocolo de RMC.

El grupo cianoguanidino se encuentra presente en algunos compuestos con actividad agonista del canal de  $\text{K}^+_{\text{ATP}}$  como el Pinacidilo (**41**) y el P1075 (**42**). Estos dos fármacos pertenecen al grupo de las piridilcianoguanidinas y presentan acción relajante a nivel del músculo liso e inducen hipotensión (Figura 23) [Lange, Löffler-Walz, Englert, Hambrock, Russ, & Quast, 2002].



**Figura 23.** Moléculas de cianoguanidinas agonistas del canal de  $K^+_{ATP}$ , (el fragmento *N*-Cianoguanidilo se resalta en color rojo).

Las ACIDHPMs son compuestos estructuralmente análogos a las DHPMs, con la variante estructural del grupo *N*-cianoguanidilo en C-2, lo que los convierte en compuestos híbridos formados por los grupos farmacofóricos de las 1,4-DHPs con actividad antagonista del canal de  $Ca^{+2}$  y el fragmento *N*-cianoguanidilo de las cianoguanidinas agonistas del canal de  $K^+_{ATP}$  (Figura 24), ambos con efecto vasorrelajante con actividad a nivel de músculo liso vascular. Por lo tanto, las ACIDHPMs se presentan como excelentes candidatas para su estudio farmacológico como agentes vasorrelajantes si consideramos que el método de síntesis multicomponente recientemente desarrollado para su obtención es simple y rápido. En conclusión, podemos postular que las ACIDHPMs (**43**) presentarán propiedades farmacológicas prometedoras como nuevos agentes con acción vasorrelajante.



43

**Figura 24.** Estructura química de las ACIDHPMs. Los fragmentos farmacofóricos comunes a las 1,4-DHPs y a las cianoguanidinas se muestran en azul y rojo, respectivamente.

### 3.3.- Fisiología del Músculo Liso Vascular

El aparato cardiovascular se encarga de transportar los nutrientes,  $O_2$  y agua a todos los tejidos y órganos que constituyen nuestro organismo, asimismo, recoge las sustancias de desecho, como  $CO_2$  y diversos productos finales del metabolismo celular, para su posterior eliminación. Este sistema está constituido por el corazón y una compleja red de vasos (arterias, capilares y venas) por los cuales viaja la sangre, que es el vehículo a través del cual viajan todas estas sustancias.

La sangre se impulsa con cada latido desde el ventrículo izquierdo del corazón hacia a la aorta, la cual es el tronco principal del que procede el sistema arterial sistémico. Desde la aorta, la sangre fluye hacia los órganos a través de arterias conductoras hasta finalizar en arteriolas y capilares, donde tiene lugar el intercambio de gases y nutrientes. Los capilares se van agrupando para formar vénulas y venas cada vez más grandes, que

conducen la sangre, a través de la vena cava, hasta el corazón derecho, para después ser enviada a los pulmones y regresar al corazón nuevamente oxigenada.

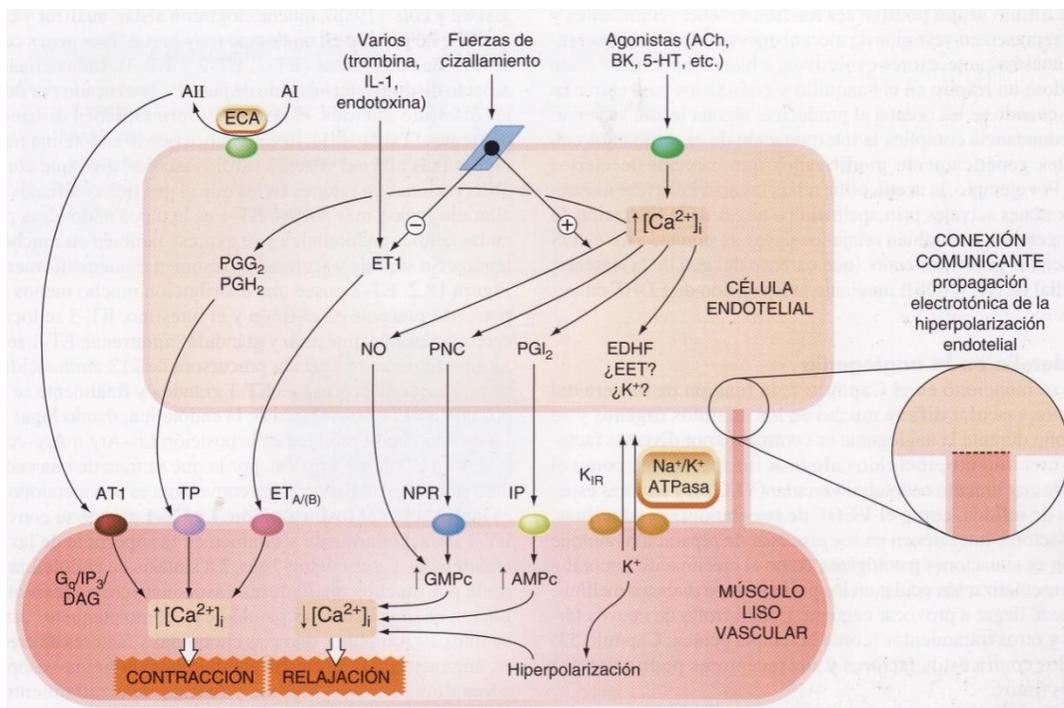
Las arterias son tubos elásticos que tienen la capacidad de distenderse al recibir la sangre impulsada por el corazón y de contraerse para reimpulsarla hacia delante. Esta capacidad de distenderse y contraerse la exhiben debido a que sus paredes están formadas de fibras musculares de tipo liso y de fibras elásticas. Las grandes arterias del cuerpo tienen un alto contenido de fibras elásticas, mientras que las arterias de menor tamaño tienen más fibras musculares. La capacidad de dilatarse y de contraerse de las arterias permite que la sangre bombeada por el corazón alcance a llegar a los tejidos más alejados al ser reimpulsada. La fuerza con la que el corazón envía la sangre al sistema arterial más el reimpulso que recibe de las arterias, por sus propiedades elásticas-constrictoras, mantiene su presión a un nivel tal que llega con suficiente fuerza a los capilares. Las arteriolas y las arterias musculares pequeñas son los principales vasos de resistencia de la circulación.

El tono vascular<sup>6</sup> es el más importante factor determinante en la resistencia al flujo sanguíneo de la circulación, por lo cual, desempeña un papel vital en la regulación en la presión sanguínea. La regulación de la actividad contráctil del músculo liso vascular es dependiente de una serie de complejos estímulos vasoconstrictores y vasodilatadores que están interrelacionados como hormonas circulantes, neurotransmisores, presión sanguínea y factores derivados del endotelio. Con respecto a estos últimos, cabe mencionar, que en la función de los vasos sanguíneos, la participación del endotelio vascular es de suma importancia, ya que este recubrimiento endotelial produce sustancias

---

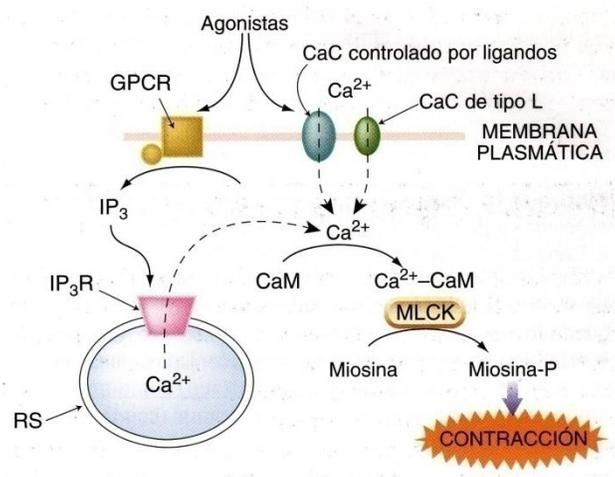
<sup>6</sup> Es la actividad contráctil de las células musculares lisas vasculares que forman las paredes e arterias y arteriolas.

que modulan el tono del músculo liso subyacente. Las células endoteliales liberan numerosas sustancias vasoactivas (Figura 25) que pueden generar relajación o constricción, entre estas entidades vasoactivas sobresalen los prostanooides ( $\text{PGI}_2$ ,  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGG}_2$ ,  $\text{PGH}_2$ ), el óxido nítrico ( $\text{NO}$ ), péptidos (PNC, la adrenomedulina, la angiotensina II y la endotelina) y factores hiperpolarizantes (FHDE). Esto mediadores derivados del endotelio se producen con la finalidad de mantener un equilibrio homeostático entre la vasoconstricción y la vasorrelajación. Todas estas señales son integradas por las células musculares vasculares a fin de determinar la actividad de su aparato contráctil y, de esta manera, el diámetro y la resistencia hidráulica del vaso sanguíneo.



**Figura 25.** Mediadores constrictores y relajantes derivados del endotelio vascular, estas sustancias generadas por las células endoteliales mantienen un equilibrio homeostático de la contracción y relajación del músculo liso de los vasos sanguíneos.

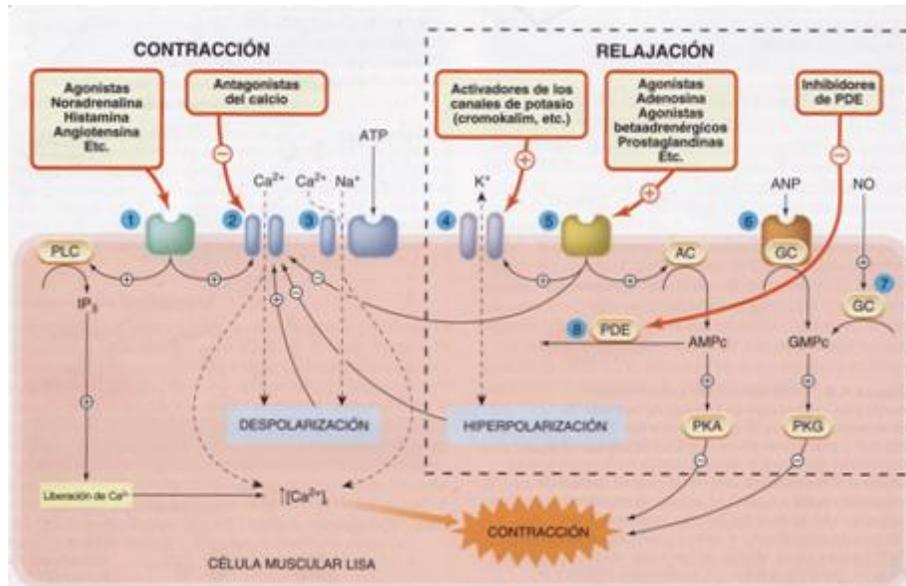
El proceso de contracción de las células musculares lisas está regulado principalmente por la activación, ya sea mecánica o mediada por receptores, de las proteínas contráctiles miosina y actina. Asimismo, variaciones en el potencial de membrana resultantes del disparo de los potenciales de acción o por la activación de los canales iónicos sensibles al estiramiento pueden desencadenar la contracción de la célula muscular lisa (Figura 26). Para que el proceso contráctil ocurra, la quinasa de cadenas ligeras de miosina (KCLM), la cual se activa al unirse con la  $\text{Ca}^{+2}$ -calmodulina, debe fosforilar a la cadena ligera de miosina (CLM), permitiendo, de esta manera, la interacción molecular de la miosina y la actina. Asimismo, una segunda enzima, la miosina fosfatasa, es capaz de invertir la fosforilación, lo que conlleva a la relajación del músculo. La KCLM y la miosina fosfatasa ejercen un efecto equilibrado, favoreciendo la contracción y la relajación, respectivamente; ambas enzimas están reguladas por nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc).



**Figura 26.** Mecanismo de contracción del músculo liso, en este proceso es primordial el incremento de la concentración  $\text{Ca}^{+2}$  en el interior de la célula.

Al igual que en otro tipo de células musculares, las células de músculo liso vascular emplean como factor detonante para la contracción al  $\text{Ca}^{+2}$ , el aumento de la concentración intracelular de este ion  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  debido a diversos estímulos, genera que el  $\text{Ca}^{+2}$  se combine con la calmodulina, formándose el complejo  $\text{Ca}^{+2}$ -calmodulina activador de la KCLM. La entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de los canales iónicos de la membrana plasmática y la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  de reservorios intracelulares (retículos sarcoplásmicos) son la mayor fuente del factor detonante. Algunos agonistas como la norepinefrina y la endotelina se unen a los receptores acoplados a proteínas G estimulando, de esta manera, la actividad de la fosfolipasa C. Esta enzima es la encargada de catalizar la formación del trifosfato de inositol ( $\text{IP}_3$ ) y del diacilglicerol (DAG). La unión del  $\text{IP}_3$  a los receptores del retículo sarcoplásmico ocasiona la liberación de  $\text{Ca}^{+2}$  hacia el citosol celular. El DAG, junto con el  $\text{Ca}^{+2}$ , activa a la proteínquinasa C (PKC), la cual fosforila a proteínas diana específicas; por lo general, la PKC tiene efectos que promueven la contracción, tal es el caso de la fosforilación que realiza en los canales tipo L de  $\text{Ca}^{+2}$  (Figura 27) [Webb, 2003].

Asimismo, la relajación en el músculo liso se genera como resultado de la eliminación de los estímulos contráctiles o por la acción directa de sustancias que estimulan la inhibición del mecanismo contráctil (Figura 27). El proceso de relajación involucra la disminución de  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  y el aumento de la actividad de la fosfatasa de la CLM.



**Figura 27.** Mecanismos que controlan la contracción y relajación del músculo liso, en estos procesos están mediados por aumentos y disminución de  $[Ca^{+2}]_i$ , así como la actividad de diversas enzimas.

La entrada y salida de otros iones a través de los canales iónicos son fundamentales para determinar el potencial de membrana de las células musculares lisas, este potencial de membrana, junto con la concentración intracelular de  $[Ca^{+2}]_i$ , modula la entrada y liberación de  $Ca^{+2}$  a través de los canales iónicos, así como la sensibilidad la maquinaria contráctil a  $Ca^{+2}$ .

En las células musculares lisas, el potencial de acción se origina en los canales de  $Ca^{+2}$  de tipo L, el cual es la más importante vía de entrada de  $Ca^{+2}$ , asimismo, muchas de las células musculares lisas poseen canales catiónicos controlados por ligandos, los cuales permiten la entrada de  $Ca^{+2}$  cuando responden a diversos transmisores.

El músculo liso vascular expresa en su membrana plasmática diversos canales iónico, entre ellos encontramos cuatro o más tipos de canales de  $K^+$  ( $K^+_{V}$ ,  $K^+_{Ca}$ ,  $K^+_{ATP}$ ,  $K^+_{IR}$ ), uno o dos tipos de canales de  $Ca^{+2}$  dependientes del voltaje, dos o más tipos de canales de  $Cl^-$ , canales de  $Ca^{+2}$  sensibles a la concentración de  $Ca^{+2}$  de los reservorios intracelulares y canales catiónicos activados por la tensión o estiramiento. Todos estos canales iónicos pueden estar involucrados en la regulación del tono vascular.

Los canales de  $K^+$  son las principales vías de conducción iónica en las células musculares vasculares; su actividad es determinante para la regulación del potencial de membrana, en consecuencia, el tono vascular. El gradiente electroquímico de iones  $K^{+7}$  ocasiona que al abrirse (activarse) los canales de  $K^+$ , este catión difunda hacia el exterior de la célula (eflujo), lo que genera una hiperpolarización de la membrana, mientras que el cierre de los canales de  $K^+$  genera el efecto contrario. Durante la hiperpolarización de la membrana que los canales de  $Ca^{+2}$  dependientes del voltaje se cierran, disminuyendo la entrada de  $Ca^{+2}$  a la célula, lo que genera vasodilatación. De igual manera, la despolarización de la membrana, conlleva a la apertura de éstos, permitiendo la entrada de  $Ca^{+2}$  y se genera contracción muscular. Los canales de  $Ca^{+2}$  sensibles al voltaje tipo L y sensibles a las DHPs, son los canales dominantes en las células de la musculatura vascular desempeñando un papel trascendental en la reactividad miogénica y vasomotora [Jackson, 2000].

El potencial de membrana no solo regula la apertura o cierre de los canales de  $Ca^{+2}$  sensibles al voltaje, asimismo, es determinante en la liberación de  $Ca^{+2}$  inducido por  $IP_3$  de los reservorios intracelulares, así como en la sensibilidad a  $Ca^{+2}$  por parte de la maquinaria contráctil. A este respecto, el papel de canales de  $K^+$  es trascendental, debido

---

<sup>7</sup> La concentración de  $K^+$  intracelular [ $K^+$ ]<sub>i</sub> es 140-150 mM, mientras que la extracelular [ $K^+$ ]<sub>o</sub> es 2.4-5 mM.

a su dominancia para determinar el potencial de membrana, y en consecuencia, del tono vascular. En este sentido, los compuestos bioactivos que bloquean la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  del tipo L (p. ej. dihidropiridinas), así como los fármacos activadores del canal de  $\text{K}^{+}$  (p. ej. cianoguanidinas), desde el punto de vista farmacológico, se presentan como importantes alternativas para producir relajación del músculo liso vascular, y por consecuencia, en el tratamiento de enfermedades como la HTA.

## 4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El presente proyecto de investigación busca llevar a cabo la síntesis de una serie de compuestos con estructura de ACIDHPM a través un protocolo de RMCs, donde los compuestos de interés presenten en su estructura molecular el fragmento farmacofórico de la 1,4-DHP, así como el del cianoguanidino, previo postulación de que las moléculas que exhiben estos farmacóforos poseerán propiedades bioactivas como agentes vasorrelajantes. Para validar o descartar esta premisa, se realizarán los ensayos farmacológicos respectivos empleando un modelo de órgano aislado en anillos aórticos de rata, mismos que permitirán, según el caso, dilucidar, mediante el protocolo experimental apropiado, el mecanismo de mediación celular implicado en el proceso de vasorrelajación inducida por la ACIDHPM.

## 5.- HIPÓTESIS

Si se sintetizan compuestos híbridos químicamente estables como las 4-aril sustituido-2-cianoimino-3,4-dihidro-1*H*-pirimidinas que combinen los fragmentos farmacofóricos de las 1,4-dihidropiridinas y de las cianoguanidinas de probada actividad clínica como antagonistas del los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  y activadores de loa canales de  $\text{K}^{+}_{\text{ATP}}$  respectivamente, entonces, los nuevos compuestos mediarán su actividad farmacológica como agentes vasorrelajantes actuando en estas mismas dianas biológicas de manera sinérgica, potenciada o a través de mecanismos alternos.

## 6.- OBJETIVOS

### Objetivo General

Llevar a cabo la síntesis vía Reacciones Multicomponentes (RMCs) de una serie de nuevos compuestos con núcleo de 4-aril sustituido-2-cianoimino-3,4-dihidro-1*H*-pirimidina con potencial actividad farmacológica. Las moléculas obtenidas, previa caracterización, serán evaluadas como agentes vasorrelajantes empleando un modelo *in vitro* de órgano aislado. Aquella molécula que presente un mejor perfil farmacológico como vasodilatante será empleada para discernir el mecanismo probable de acción mediante el cual induce los procesos de mediación celular involucrados en el proceso de relajación.

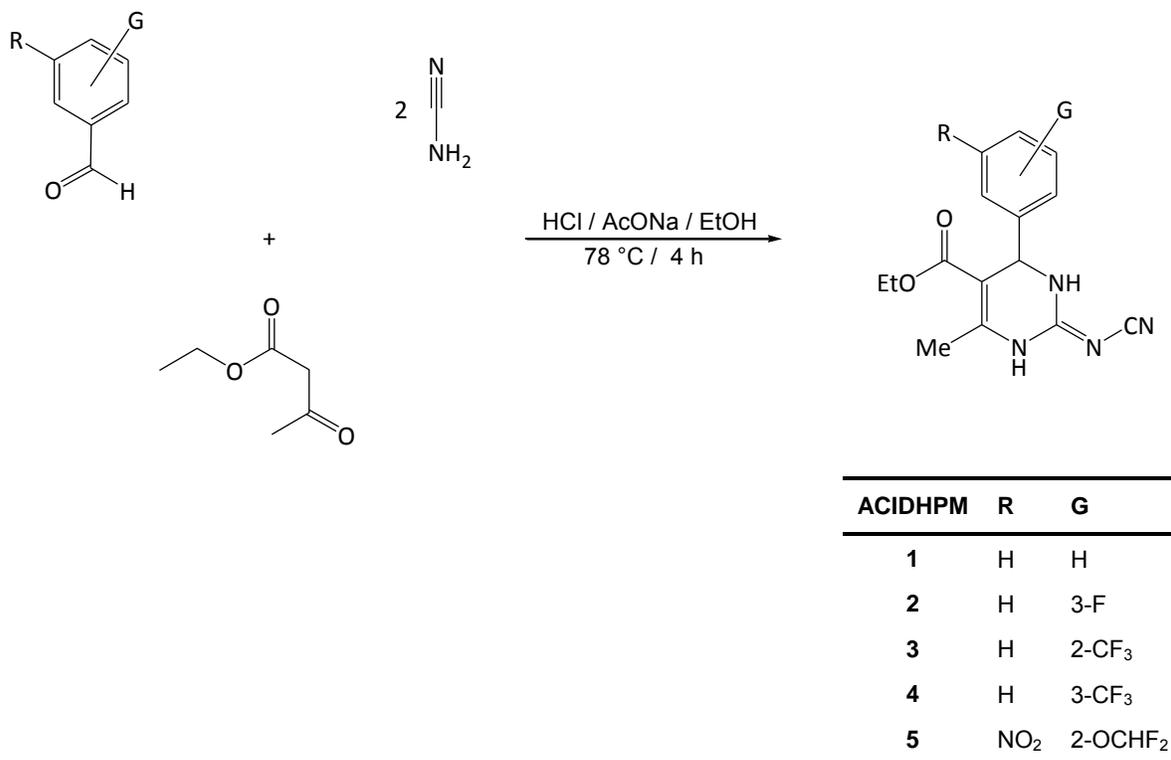
### Objetivos Particulares

- Efectuar la síntesis, aislamiento y purificación de una serie de compuestos con estructura de 4-aril sustituido-2-cianoimino-3,4-dihidro-1*H*-pirimidina empleando el protocolo de síntesis de RMCs.
- Llevar a cabo la caracterización de las moléculas previamente obtenidas empleando métodos espectroscópicos como: Espectrometría de Masas (EM), Espectroscopía Infrarrojo (IR) y Resonancia Magnética Nuclear (RMN).
- Investigar el perfil farmacológico de estas moléculas empleando un modelo *in vitro* para órganos aislados (anillos de aorta de rata).
- Proponer el probable mecanismo de mediación celular involucrado utilizando el compuesto de óptimo perfil farmacológico, mediante el empleo de agentes bloqueadores de receptores e inhibidores enzimáticos celulares con mecanismos conocidos.

## 7.- METODOLOGÍAS

### 7.1.- Protocolo de Síntesis de los Compuestos 4-Aril sustituido 2-Cianoimino-3,4-Dihidro-1*H*-Pirimidinas (ACIDHPMs)

La síntesis de las ACIDHPMs (1-5, Figura 28) se realizó bajo el protocolo de RMCs recientemente investigado y dado a conocer por nuestro equipo de trabajo. Éste se basa en la reacción de 1 eq. del aldehído aromático correspondiente, 2 eq. de cianamida y 1 eq. de acetoacetato de etilo [Hulme, et al., 2008]. Todos los reactivos empleados, excepto el 2-difluorometoxi-5-nitrobenzaldehído que se preparó de acuerdo a un método reportado previamente en la literatura [Yagupolskii, et al., 1999] y los solventes fueron de grado reactivo adquirido de Sigma-Aldrich S.A. y se emplearon sin mayor tratamiento.



**Figura 28.** Reactivos y condiciones de reacción para la síntesis de las ACIDHPMs 1-5.

### 7.1.1.- Procedimiento general de síntesis

En un matraz de bola de 100 mL, provisto de un sistema de condensación, agitación y manta de calentamiento, se colocaron 24 mmol del arenocarbaldehído correspondiente, 24 mmol de acetoacetato de etilo, 48 mmol de cianamida (solución acuosa al 50%), 24 mmol de acetato de sodio y 0.5 mL de ácido clorhídrico concentrado (37%), disueltos en 20 mL etanol. Esta suspensión se mantuvo a temperaturas de reflujo y agitación moderada durante 4 horas. Al término de este tiempo, se concentró el crudo de reacción, se filtró, y el producto sólido aislado se recristalizó de etanol, para obtener los compuestos puros (ACIDHPM 1-5).

Las moléculas se caracterizaron empleando diversos métodos físicos y espectroscópicos. En lo que respecta a las propiedades físicas, la pureza de los compuestos se verificó por cromatografía de capa fina de sílice gel Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Darmstadt, Germany) y los puntos de fusión correspondientes se determinaron utilizando un equipo Fisher-Johns. Por su parte, los datos espectroscópicos de IR, RMN ( $H^1$ ,  $C^{13}$ ) y EM (IE), se obtuvieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 1600, en un equipo Varian Mercury 300 y en un espectrómetro MStation JMS-700 JEOL, respectivamente.

## **7.2.- Investigación de la Bioactividad de las ACIDHPMs**

### **7.2.1- Animales de Experimentación**

Para los experimentos farmacológicos de relajación vascular en anillos aórticos se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 12 a 14 semanas de edad con un peso de  $225 \pm 25$  gramos, suministradas por el Bioterio del Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional. La comida y agua se proporcionaron *ad libitum* para todos los animales. Todos los procedimientos descritos se llevaron a cabo de acuerdo con los Principios Rectores del Comité Consultivo de Investigaciones Médicas de la OMS (Crónica de la OMS 39: 5560, 1985) y a las Normas Internacionales para la investigación biomédica con animales de la OPS (Bol Of Sanit Panam 108(5-6), 1990) que incluye los antedichos Principios Rectores de la OMS.

### **7.2.2.- Obtención de los Tejidos**

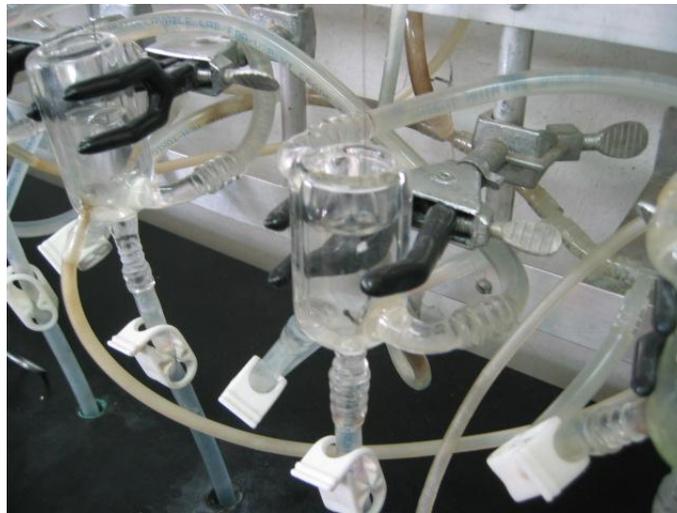
Los animales, previamente anestesiados con éter etílico, se sacrificaron por dislocación cervical. Posteriormente, se extrajo la porción de la aorta torácica comprendida entre el arco aórtico y el diafragma de las ratas, ésta se colocó inmediatamente en una solución de Krebs, pH 7.4, de composición definida (118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.027 mM EDTA y 11.7 mM Glucosa) con burbujeo constante de gas carbógeno (O<sub>2</sub>, 95 % y CO<sub>2</sub>, 5 %). La arteria disecada se limpió de tejido conectivo y graso, para seccionarla transversalmente en anillos de 3 a 5 milímetros de longitud. Durante todo el proceso de

disección, los tejidos permanecieron bañados en solución de Krebs a 4 °C sobre una placa de Petri. Para trabajar la aorta desnuda de endotelio, éste se removió frotando pequeñas tiras de algodón humedecidas con solución Krebs contra la superficie interna de los anillos.

### **7.2.3.- Montaje Experimental**

Los anillos aórticos se montaron en copas de Allhin para órganos aislados de 10 mL de capacidad que contenían solución de Krebs regulada a una temperatura de 37 °C, mediante una bomba termostática (TECTRON 4373200) e irrigada continuamente con un flujo constante de gas carbógeno (Figura 29-a). La colocación se realizó introduciendo a través del lumen del anillo de aorta dos alambres finos de acero inoxidable, uno de los cuales se fijó a la copa de Allhin (Figura 29-b y 29-c) y el otro se conectó al transductor isométrico de 50 gramos TSD125 (BIOPAC Systems, Inc.). La señal de fuerza isométrica fue amplificada y convertida de analógica a digital utilizando un equipo de adquisición de datos MP-100 (BIOPAC Systems, Inc.) y registrada en un ordenador mediante el software AcqKnowledge v3.8.2 (BIOPAC Systems, Inc.).

Los anillos aórticos se sometieron a una tensión basal inicial de 4.0 gramos, seguido de un periodo de estabilización de 60 minutos. Durante este tiempo se realizaron cambios repetidos de la solución nutritiva cada 20 minutos y reajustes de la tensión basal cuando fue necesario. [Pérez-Vizcaíno, Duarte, & Tamargo, 1991].



**Figura 29.** La imagen superior es una perspectiva del equipo experimental y la inferior un acercamiento de la copa de Allhin, donde se muestra el montaje experimental *in vitro* del tejido aórtico en baño de órgano aislado.

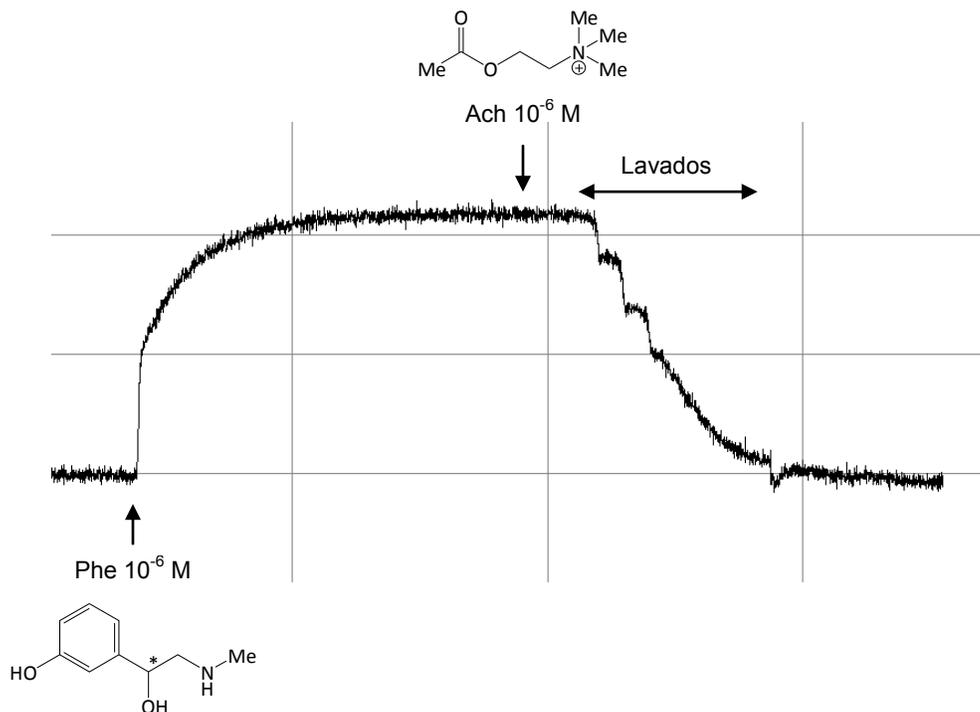
#### **7.2.4.- Preparación de las Soluciones Experimentales y de ACIDHPMs**

Todas las soluciones de las ACIDHPMs, Indometacina, Nifedipina y Glibenclamida se prepararon el mismo día del experimento en soluciones concentradas iniciales de concentración  $10^{-1}$  M en dimetilsulfóxido (DMSO) y fueron diluidas a las demás concentraciones experimentales empleando para ello agua doblemente destilada inmediatamente antes de ser utilizadas. En el caso del ODQ, se preparó inicialmente en una solución concentrada de  $10^{-1}$  M, a continuación, se dividió en alícuotas de 20  $\mu$ M que se congelaron a  $-80$  °C, conservándose de esta manera hasta su utilización. Previo al experimento las alícuotas se descongelaron y se diluyeron con DMSO en la primera dilución y en  $H_2O$  doblemente destilada a partir de la segunda dilución. Las concentraciones finales del DMSO en los baño de órganos se mantuvieron menores al 0.1%, por lo cual no afectaron la respuesta vascular. Todos los demás compuestos se disolvieron y diluyeron en agua doblemente destilada.

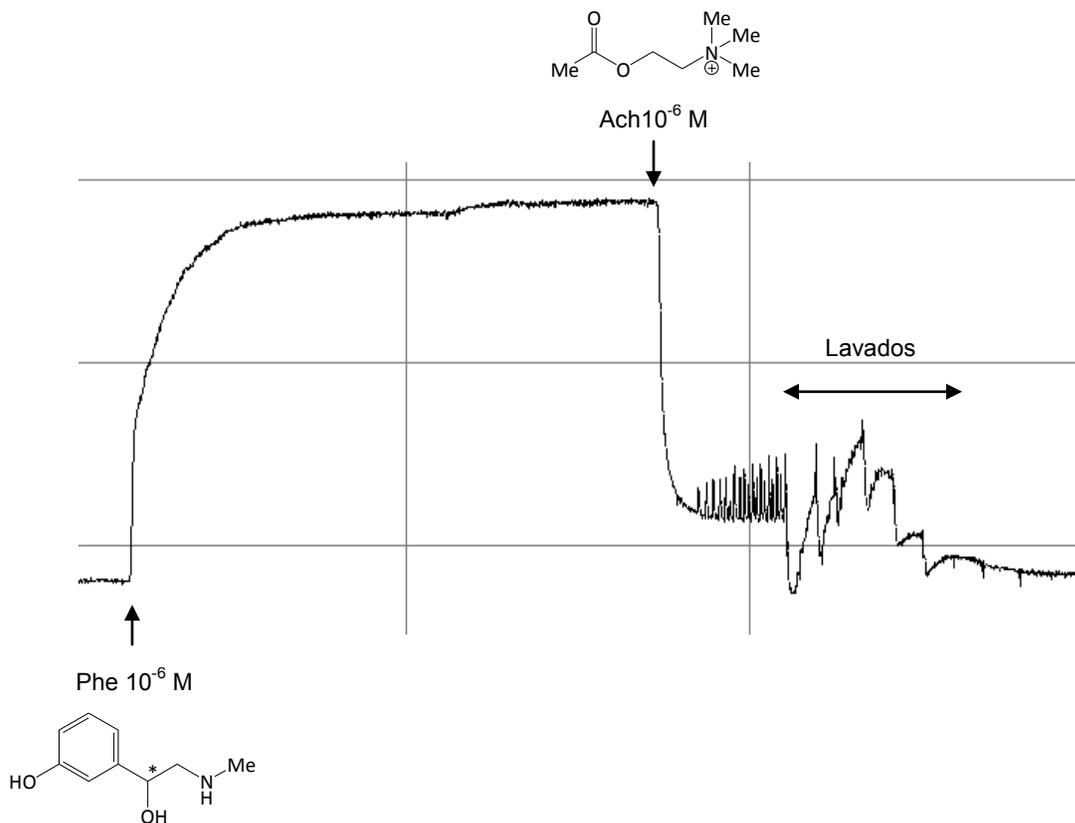
#### **Prueba de Viabilidad y Presencia de Endotelio**

Una vez acoplado y estabilizado, el anillo vascular se contrajo con 100  $\mu$ L de fenilefrina (Phe,  $10^{-6}$  M, Figura 30), considerándose viable el tejido si después de su estimulación y posterior estabilización, se alcanzó una diferencia de tensión mínima de 1.6 g con respecto a la basal. Para evidenciar la presencia o ausencia del endotelio, posterior a la adición de Phe, se agregaron 100  $\mu$ L de acetilcolina (Ach,  $10^{-6}$  M, Figura 31). Los anillos desnudos de endotelio no muestran ningún efecto relajante, mientras que los anillos con endotelio respondieron a este estímulo. Para los propósitos de este estudio, únicamente se consideraron con endotelio aquellos anillos aórticos que previa

estimulación con Ach presentaron una relajación superior al 70 % del incremento de la tensión con Phe [Russell & Watts, 2000]. Una vez comprobada, según el caso, la presencia o ausencia de endotelio, las preparaciones se lavaron con solución Krebs para permitir el retorno a la tensión basal, reajustándola en el caso de que fuera necesario. Para el inicio del protocolo experimental correspondiente se requirió de un tiempo estabilización adicional de 30 minutos.



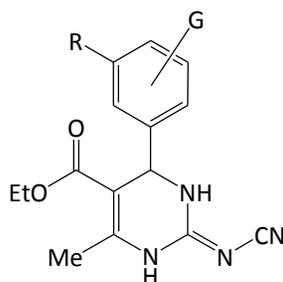
**Figura 30.** Registro de la prueba de viabilidad a Phe  $10^{-6}$  M y determinación de la ausencia de endotelio con Ach  $10^{-6}$  M en anillos de aorta de rata. . La Phe, agonista de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, induce contracción en músculo liso vascular al activar la producción de trifosfato de inositol ( $IP_3$ ) y generar así liberación de  $Ca^{+2}$  del retículo sarcoplásmico.



**Figura 31.** Registro de la prueba de viabilidad a Phe  $10^{-6}$  M y determinación de la presencia de endotelio con Ach  $10^{-6}$  M en anillos de aorta de rata. La Ach produce vasodilatación por su acción en las células endoteliales liberando óxido nítrico (NO), esta molécula que actúa como un segundo mensajero activa al guanilato ciclasa soluble (GCs) para aumentar la producción de monofosfato cíclico de Guanosina (GMPc).

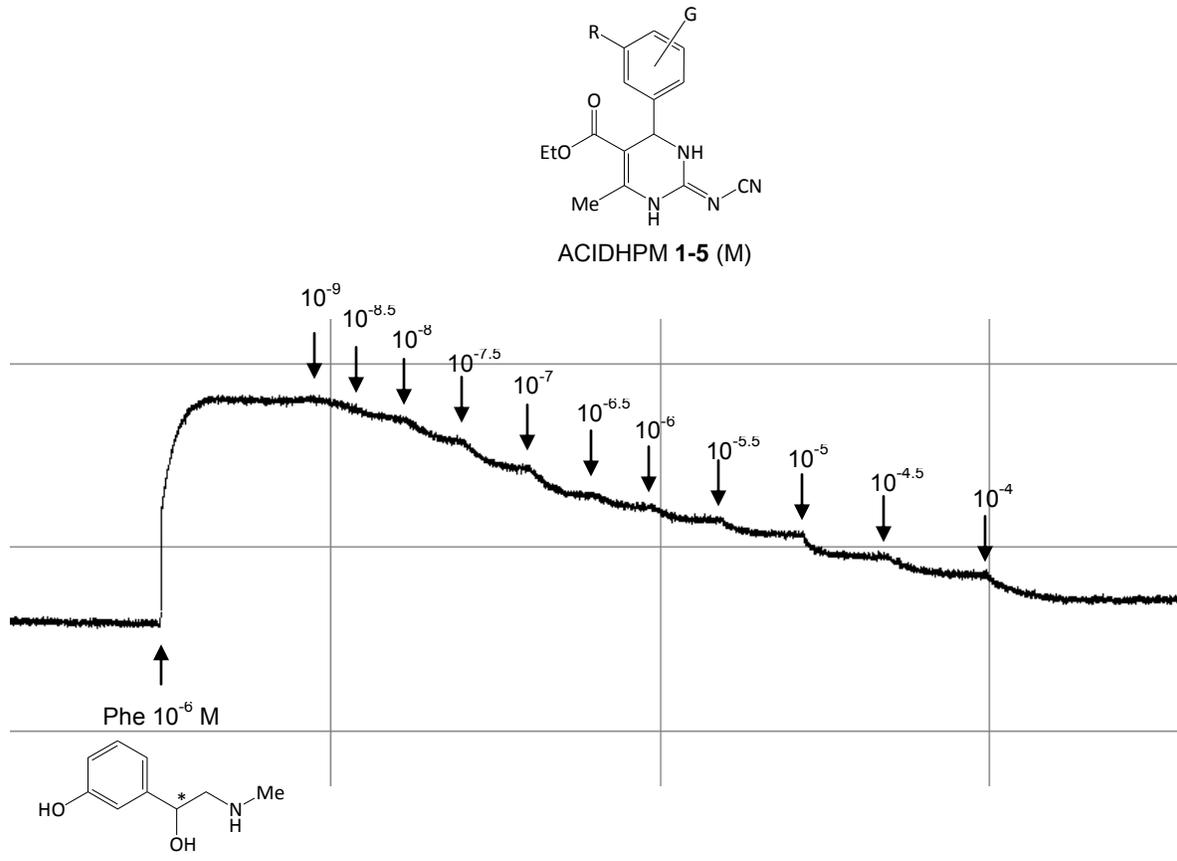
### 7.2.5.- Investigación Farmacológica de la Fioactividad de las ACIDHPMs 1-5

Para investigar los posibles efectos relajantes de las ACIDHPMs (Tabla 3) se construyeron curvas concentración-respuesta empleando anillos aórticos de rata con y sin endotelio, según el caso, precontraídos con 100  $\mu\text{L}$  de Phe ( $10^{-6}$  M). Una vez alcanzado el efecto contráctil máximo y en condiciones de equilibrio, se añadieron concentraciones acumulativas ( $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M) de los compuestos de interés (Figura 32) [Tanaka, et al., 2006].



**Tabla 3.** Moléculas de ACIDHPMs investigadas como posibles agentes con actividad vasorrelajante.

R	G	Nombre
H	H	2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-fenil-3,4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM 1)
H	3-F	2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(3-fluorofenil)-3,4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM 2)
H	2-CF <sub>3</sub>	2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(2-trifluorometilfenil)-3,4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM 3)
H	3-CF <sub>3</sub>	2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(3-trifluorometilfenil)-3,4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM 4)
NO <sub>2</sub>	2-OCHF <sub>2</sub>	2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(2-difluorometoxi-5-nitrofenil)-3,4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM 5)



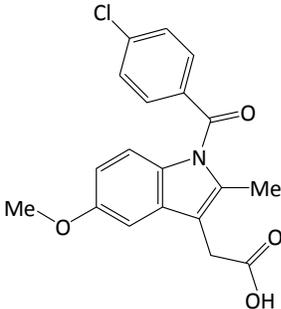
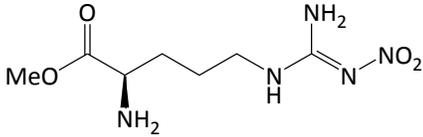
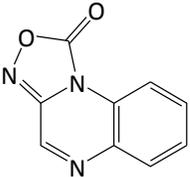
**Figura 32.** Registro de la relajación inducida por las ACIDHPMs 1-5 en anillos de aorta de rata precontraídos con Fenilefrina  $10^{-6}$  M.

### 7.3.- Estudio del Mecanismo de Modulación Celular de la ACIDHPM 3

#### 7.3.1.- Incubación con Inhibidores Específicos de Enzimas Moduladoras del Efecto Vasorrelajante

Para determinar la posible vía de señalización mediadas por la ACIDHPM 3, se construyeron curvas concentración respuesta ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M) en anillos aórticos, incubados (30 minutos), previo a la adición de Phe ( $10^{-6}$  M), con fármacos de actividad inhibitora conocida (Tabla 4), p. ej. Indometacina ( $10^{-6}$  M), N<sup>ω</sup>-nitro-L-arginina metiléster (L-NAME) ( $10^{-6}$  M), y 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-ona (ODQ) ( $10^{-5}$  M).

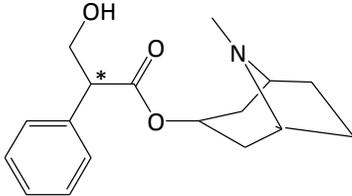
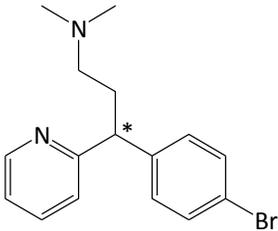
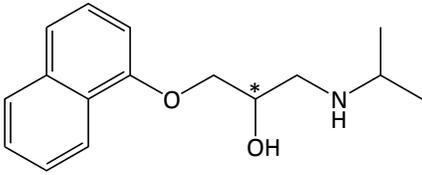
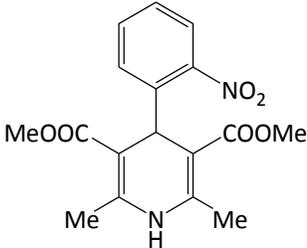
**Tabla 4.** Fármacos inhibidores de enzimas COX, NOS y GCs empleados para determinar el mecanismo de acción de la ACIDHPM 3.

<b>Fármaco</b>	<b>Estructura</b>	<b>Bioactividad (M)</b>
Indometacina		Inhibidor de la COX ( $10^{-6}$ )
L-NAME		Inhibidor de la NOS ( $10^{-6}$ )
ODQ		Inhibidor de la GCs ( $10^{-5}$ )

### **7.3.2.- Incubación con Antagonistas Específicos de Receptores Modulares del Efecto Vasorrelajante**

Para descartar o confirmar la participación de los receptores muscarínicos, histaminérgicos ( $H_1$ ),  $\beta$ -adrenérgicos y canales de  $Ca^{+2}$ , en el mecanismo de vasorrelajación inducido por la ACIDHPM **3**; los anillos de aorta, con endotelio o denudado, se incubaron durante 20 minutos, previo a la adición de Phe ( $10^{-6}$  M), con bloqueadores de receptores específicos: Atropina ( $10^{-6}$  M), Bromfeniramina ( $10^{-6}$  M), Propranolol ( $10^{-6}$  M) y Nifedipina ( $10^{-6}$  M) (Tabla 5). Una vez alcanzada la respuesta contráctil máxima y en equilibrio, se adicionaron concentraciones acumulativas de la ACIDHPM **3** ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M).

**Tabla 5.** Agentes bloqueadores de diversos receptores empleados para determinar el mecanismo de acción de la ACIDHPM 3.

<i>Fármaco</i>	<i>Estructura</i>	<i>Antagonismo (M)</i>
Atropina		Receptores muscarínicos (M) ( $10^{-6}$ )
Bromfeniramina		Receptores histaminérgicos (H <sub>1</sub> ) ( $10^{-6}$ )
Propranolol		Receptores $\beta$ -adrenérgicos ( $10^{-6}$ )
Nifedipina		Canal de Ca <sup>+2</sup> ( $10^{-6}$ )

### **7.3.3.- Efecto de la ACIDHPM 3 en la Respuesta Contráctil Inducida por una Alta Concentración de K<sup>+</sup> (80 mM) en una Solución de Krebs Libre de Ca<sup>+2</sup>.**

Para determinar si la relajación inducida por la ACIDHPM 3 está mediada por su capacidad de modular el influjo de Ca<sup>+2</sup> al interior de la célula a través de los canales de Ca<sup>+2</sup> controlados por el voltaje, se procedió a realizar curvas concentración respuesta a CaCl<sub>2</sub> en baño de solución de Krebs libre de Ca<sup>+2</sup> y K<sup>+</sup> 80 mM (Krebs despolarizante). Después de realizar la prueba de viabilidad en los anillos aórticos, con endotelio intacto y denudados, y transcurrido el tiempo de estabilización tras los lavados, se procedió a incubar los tejidos en solución de Krebs libre de Ca<sup>+2</sup> y con una concentración 80 mM de K<sup>+</sup>, la elevada concentración de K<sup>+</sup> se obtuvo reemplazando el NaCl por la cantidad equivalente de KCl en la solución de Krebs y mantener la osmolaridad fisiológica, asimismo se omitió el CaCl<sub>2</sub> en la preparación de la solución. Se realizaron una serie de lavados con Krebs despolarizante a los anillos, hasta que la contracción generada por las alta concentración de K<sup>+</sup> se atenuó y la tensión regresó a la basal. Una vez estabilizado el registro de la tensión en la basal, se procedió a elaborar la curva concentración-respuesta a CaCl<sub>2</sub>, para ello se adicionaron concentraciones acumulativas de CaCl<sub>2</sub> (0.1, 0.31, 1.0, 3.1 y 10 mM). Al término de la elaboración de la curva, se realizaron varios lavados a los anillos aórticos con solución de Krebs normal, una vez que la tensión regresó y se estabilizó en la basal, se realizó el protocolo anteriormente descrito para la elaboración de las curvas concentración-respuesta en presencia de la ACIDHPM 3, con la modificación de que, posteriormente a la estabilización de la tensión en Krebs despolarizante, los tejidos se incubaron durante 20 minutos en presencia de la ACIDHPM 3 a tres diferentes concentraciones (10<sup>-9</sup>, 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-4</sup> M), para finalmente iniciar las adiciones de CaCl<sub>2</sub>. Para cada concentración de la ACIDHPM 3 se emplearon los mismos anillos aórticos,

obteniéndose cuatro curvas para cada anillo, es decir, sin la ACIDHPM **3** y en presencia de la ACIDHPM **3** a tres diferentes concentraciones ( $10^{-9}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-4}$  M)

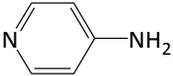
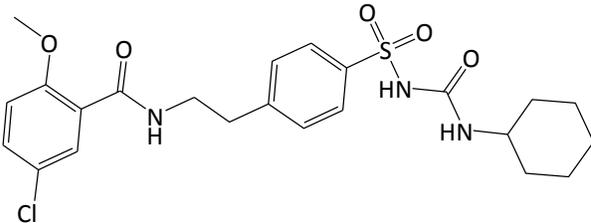
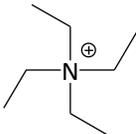
#### **7.3.4.- Relajación Inducida por la ACIDHPM 3 en Anillos de Aorta Precontraídas con $K^+$ 20 y 80 mM.**

Para determinar si los canales de  $K^+$  están involucrados en la relajación inducida por la ACIDHPM **3**, se generaron curvas concentración-respuesta en aortas precontraídas mediante una concentración única de 20 u 80 mM de  $K^+$  en la solución de Krebs isotónica. Las elevadas concentraciones de  $K^+$  se obtuvieron reemplazando el NaCl por la cantidad equivalente de KCl para obtener concentraciones de 20 y 80 mM en la solución de Krebs y mantener la osmolaridad fisiológica [Cerón, Cremonez, Bendhack, & Tedesco, 2001]. Una vez realizada la prueba de viabilidad en los anillos aórticos y, transcurridos el tiempo de estabilización tras los lavados de los mismos con solución de Krebs normal, se procedió a reemplazar la solución de Krebs normal de los baños de los órganos con la solución isotónica de Krebs 20 u 80 mM de KCl. Al alcanzar la estabilización de la respuesta contráctil generada por KCl se agregó Phe ( $10^{-6}$  M). Alcanzada una nueva estabilización se agregaron concentraciones acumulativas de la ACIDHPM **3** ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M). Antes de añadir una nueva concentración se espera a la estabilización de la relajación que se ha desencadenado con la concentración previa de la ACIDHPM **3**.

### **7.3.5.- Efecto de Diversos Agentes Bloqueadores Específicos de los Canales de K<sup>+</sup> en la Relajación Inducida por la ACIDHPM 3.**

Los anillos de aorta, con endotelio intacto o denudados del mismo, se incubaron durante 20 minutos, previo a la adición de Phe ( $10^{-6}$  M), en presencia de diversos los bloqueadores: 4-Aminopiridina (4-AP) ( $5 \times 10^{-3}$  M), Ba<sup>+2</sup> ( $10^{-4}$  M), Glibenclamida ( $10^{-6}$  M) y Tetraetilamonio (TEA) ( $10^{-3}$  M) (Tabla 6); una vez alcanzada la meseta en la respuesta contráctil se adicionan concentraciones acumulativas de la ACIDHPM-3 ( $10^{-9}$ - $10^{-4}$  M). Lo anterior resulta apropiado para discernir el tipo de canal de K<sup>+</sup> (K<sup>+<sub>v</sub></sup>, K<sup>+<sub>IR</sub></sup>, K<sup>+<sub>ATP</sub></sup> y K<sup>+<sub>Ca</sub></sup>) está involucrado en el mecanismo de vasorrelajación inducido por la ACIDHPM 3 [Nelson & Quayle, 1995].

**Tabla 6.** Agentes bloqueadores específicos de canales de K<sup>+</sup> empleados para determinar el mecanismo de acción de la ACIDHPM 3.

<i>Compuesto</i>	<i>Estructura</i>	<i>Bloqueo (M)</i>
4-AP		Canal K <sub>v</sub> <sup>+</sup> (5 x 10 <sup>-3</sup> )
Ba <sup>+2</sup>	Ba <sup>+2</sup>	Canal K <sub>IR</sub> <sup>+</sup> (10 <sup>-4</sup> )
Glibenclamida		Canal de K <sub>ATP</sub> <sup>+</sup> (10 <sup>-6</sup> )
TEA		Canal de K <sub>Ca</sub> <sup>+</sup> (10 <sup>-3</sup> )

#### 7.4.- Expresión y Tratamiento de Datos.

Las respuestas en la tensión vascular generadas por las concentraciones acumulativas de los compuestos se expresaron en curvas concentración-respuesta, siendo la respuesta el porcentaje de relajación producida la ACIDHPM, es decir, la inhibición del efecto contráctil previamente generado. El porcentaje de relajación se calculó considerando la máxima tensión generada por el agente vasoconstrictor (Phe o la alta concentración de KCl), previa a la adición de los vasorrelajantes, como 0% de relajación, y la recuperación completa a la tensión basal, previa a la adición del agente vasoconstrictor, como 100% de relajación. Las curvas se ajustaron a la ecuación:

$$y = \frac{\min + (E_{\max} - \min)}{1 + \left( \frac{x}{(CI_{50})^{-n}} \right)}$$

Donde:

- min Relajación mínimo observado en la curva.
- $E_{\max}$  Efecto máximo obtenida por el fármaco.
- $CI_{50}$  Concentración Inhibitoria 50 del efecto contráctil.
- $n$  Pendiente de Hill, pendiente de la curva en su punto medio.
- $x$  Concentración empleada del fármaco en cada punto de la curva
- $y$  Relajación generado en cada concentración  $x$

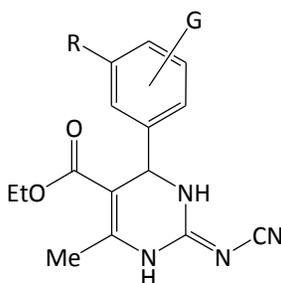
Asimismo, se determinaron el valor del efecto máximo ( $E_{\max}$ , relajación máxima obtenida por el fármaco para este estudio) y la concentración inhibitoria 50 ( $CI_{50}$ ), que se define como la concentración del fármaco necesaria para disminuir en 50% la contracción

inducida por el agente vasoconstrictor a partir de las medias de los resultados individuales de cada tejido. El  $CI_{50}$  fue expresado como  $pCI_{50}$  ( $-\log CI_{50}$ ). Todos los resultados se expresaron como media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media (EEM) de un mínimo de 3 anillos aórticos.

Para comparar los valores obtenidos entre los diferentes grupos se emplearon las pruebas de *t de student* y Análisis de Varianza (ANOVA) de dos vías seguida de la prueba de Holm-Sidak de comparaciones múltiples, considerándose diferencias significativas cuando  $P < 0.05$ . El tratamiento de los datos se efectuó mediante los programas de ordenador Microsoft Office Excel 2007, SigmaPlot 11.0 (SPSS Inc.) SigmaStat 3.1 (SPSS Inc.).

## 8.- RESULTADOS

### 8.1.- Síntesis Química de los Compuestos 4-Aril sustituido 2-Cianoimino-3,4-Dihidro-1*H*-Pirimidinas (ACIDHPMs)



**Tabla 7.** Rendimientos y Puntos de Fusión de las ACIDHPMs 1-5.

Compuesto	R	G	Rendimiento (%)	Punto de Fusión (°C)
ACIDHPM 1	H	H	35	258-260
ACIDHPM 2	H	3-F	30	270-273
ACIDHPM 3	H	2-CF <sub>3</sub>	33	208-211
ACIDHPM 4	H	3-CF <sub>3</sub>	27	266-269
ACIDHPM 5	NO <sub>2</sub>	2-OCHF <sub>2</sub>	57	249-251

En la Tabla 7 se presentan rendimientos obtenidos en la síntesis de las ACIDHPMs **1-5**, asimismo se puede apreciar que los rendimientos para las ACIDHPM **1-4** son similares, por otro lado, en la obtención de la ACIDHPM **5** se obtuvo el rendimiento más alto, siendo éste casi el doble del obtenido para las otras ACIDHPMs.

De igual manera, la Tabla 7 nos proporciona los puntos de fusión que presentaron las ACIDHPMs **1-5**, éstos varían para cada molécula debido a los distintos sustituyentes del arilo en C-4 que cada molécula presenta. La ACIDHPM **3** requirió la menor temperatura para pasar del estado sólido al líquido, mientras que las otras ACIDHPMs ostentaron puntos de fusión similares. Los puntos de fusión son de vital importancia ya que nos sirven para determinar si el compuesto presenta impurezas o si se tiene a las moléculas puras.

Los resultados de la caracterización por métodos espectroscópicos de las ACIDHPMs **1-5** se encuentran en el Apéndice A. Los Espectros de RMN y de EM se localizan en los Apéndices B y C, respectivamente.

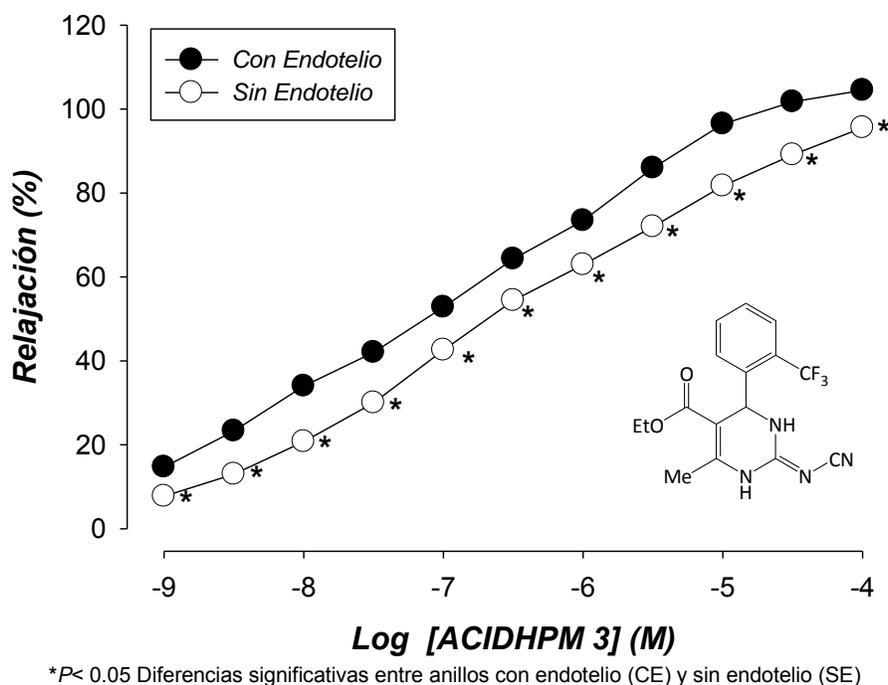
**8.2.- Investigación de la Bioactividad de las 4-Aril sustituido 2-Cianoimino-3,4-Dihidro-1H-Pirimidinas (ACIDHPMs)**

**Tabla 8.** Valores de  $pCl_{50}$  y  $E_{max}$  determinados experimentalmente para los compuestos sintetizados con núcleo de ACIDHPM.

Compuesto		Parámetro	
		$pCl_{50}$	$E_{max}$ (%)
ACIDHPM 1	CE	$6.98 \pm 0.03$	$74.84 \pm 0.68$
	SE	$7.66 \pm 0.14$	$77.69 \pm 1.71$
ACIDHPM 2	CE	$5.47 \pm 0.04$	$76.79 \pm 1.16$
	SE	$5.45 \pm 0.03$	$83.22 \pm 1.01$
ACIDHPM 3	CE	$6.84 \pm 0.14$	$110.22 \pm 2.63$
	SE	$6.70 \pm 0.09$	$101.83 \pm 2.15$
ACIDHPM 4	CE	$5.21 \pm 0.03$	$82.67 \pm 1.34$
	SE	$4.98 \pm 0.04$	$98.10 \pm 2.50$
ACIDHPM 5	CE	$5.62 \pm 0.06$	$67.19 \pm 1.43$
	SE	$5.11 \pm 0.16$	$83.85 \pm 5.27$

En la Tabla 8 se muestran los resultados obtenidos en la evaluación de la bioactividad de las ACIDHPMs 1-5 como agentes vasorrelajantes. Los valores de  $pCl_{50}$  nos proporcionan información acerca de la potencia del fármaco respecto a su actividad, en este caso vasorrelajante. Por otra parte, los valores de  $E_{max}$  nos ayudan a evaluar la eficiencia con la cual se genera la actividad farmacológica. En la tabla 8 se aprecia que la ACIDHPM 1 fue la que presentó el más óptimo  $pCl_{50}$ , asimismo la ACIDHPM 3 fue la que produjo el efecto vasorrelajante de manera más eficaz.

**Gráfica 1.** Curvas concentración-respuesta de la relajación inducida por ACIDHPM 3.



La Gráfica 1 nos muestra la curva concentración-respuesta para la acción vasorrelajante inducida por la ACIDHPM 3 en los anillos aórticos, con endotelio (CE) y denudados de (SE) precontraídos con Phe  $10^{-6}$  M. Las curvas generadas en los anillos CE

y SE presentan variaciones en sus trayectorias, sin embargo en ambos casos se obtuvo el 100 % de relajación.

Las curvas concentración-respuesta obtenidas de la evaluación farmacológica de las ACIDHPMs **1**, **2**, **4** y **5** como agentes vasorrelajantes se encuentran localizadas en el Apéndice D.

### 8.3.- Resultados del Estudio del Mecanismo de Modulación Celular de la ACIDHPM 3

#### 8.3.1.- Incubación con Inhibidores Específicos de Enzimas Modulares del Efecto Vasorrelajante

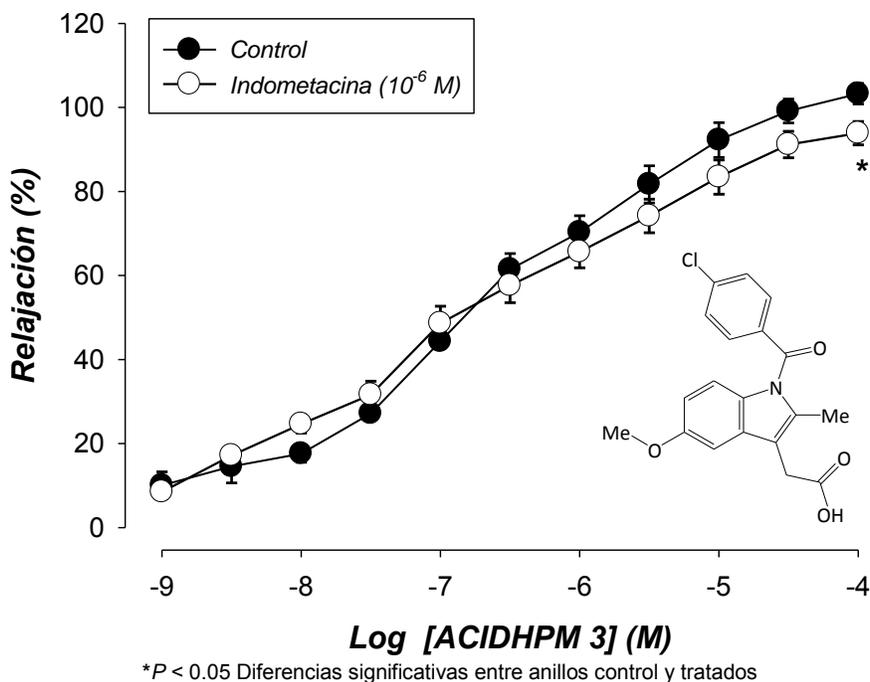
**Tabla 9.** Valores experimentales de  $pCl_{50}$  y  $E_{max}$  determinados para la ACIDHPM 3 en presencia de inhibidores de enzimas COX, NOS y GCs.

INHIBIDOR		Control		Tratado	
		$pCl_{50}$	$E_{max}$ (%)	$pCl_{50}$	$E_{max}$ (%)
Indometacina	CE	$6.59 \pm 0.10$ (3) <sup>Y</sup>	$105.73 \pm 2.31$ (3)	$6.94 \pm 0.23$ (4)	$99.07 \pm 3.50$ (4)
	SE	$6.44 \pm 0.19$ (3)	$105.89 \pm 5.19$ (3)	$6.10 \pm 0.07$ (3)	$105.06 \pm 2.29$ (3)
L-NAME	CE	$6.30 \pm 0.11$ (3)	$107.62 \pm 2.86$ (3)	$6.68 \pm 0.08$ (3)	$102.46 \pm 1.86$ (3)
ODQ	SE	$6.09 \pm 0.21$ (3)	$101.646 \pm 5.97$ (3)	$6.49 \pm 0.38$ (3)	$111.44 \pm 8.79$ (3)

<sup>Y</sup>Número de experimentos (n). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  Diferencias significativas entre grupo control y grupo tratado

La Tabla 9 nos muestra los valores experimentales obtenidos de  $pCl_{50}$  y  $E_{max}$  obtenidos de las curvas concentración-respuesta generadas para discernir el mecanismo de mediación celular involucrado en la respuesta relajante inducida por la ACIDHPM 3. Los valores experimentales de ambos parámetros se expresan para el grupo control, es decir, sin inhibidor enzimático, así como para el grupo tratado, en el cual los anillos aórticos se incubaron en presencia de los distintos inhibidores. Los valores experimentales obtenidos ( $pCl_{50}$  y  $E_{max}$ ) entre los grupos control y los tratados no presentaron diferencias estadísticamente significativas.

**Gráfica 2.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos CE incubados con Indometacina.



La Gráfica 2 nos muestra las curvas concentración-respuesta, para la vasorrelajación producida por la ACIDHPM 3, generadas en anillos de aorta CE para los grupos control y tratado (anillos incubados con Indometacina). Las trayectorias de ambas curvas son muy similares, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa únicamente en el último punto de ambas curvas.

Las curvas concentración-respuesta obtenidas de la evaluación farmacológica de la ACIDHPM 3 en presencia de los bloqueadores enzimáticos Indometacina (SE), L-NAME (CE) y ODQ (SE), se encuentran en el Apéndice E.

### 8.3.2.- Incubación con Bloqueadores Específicos de Receptores Moduladores del Efecto Vasorrelajante

**Tabla 10.** Valores experimentales de  $pCl_{50}$  y  $E_{max}$  para la ACIDHPM **3** en presencia de bloqueadores de receptores muscarínicos, histaminérgicos,  $\beta$ -adrenérgicos y canales de  $Ca^{+2}$ .

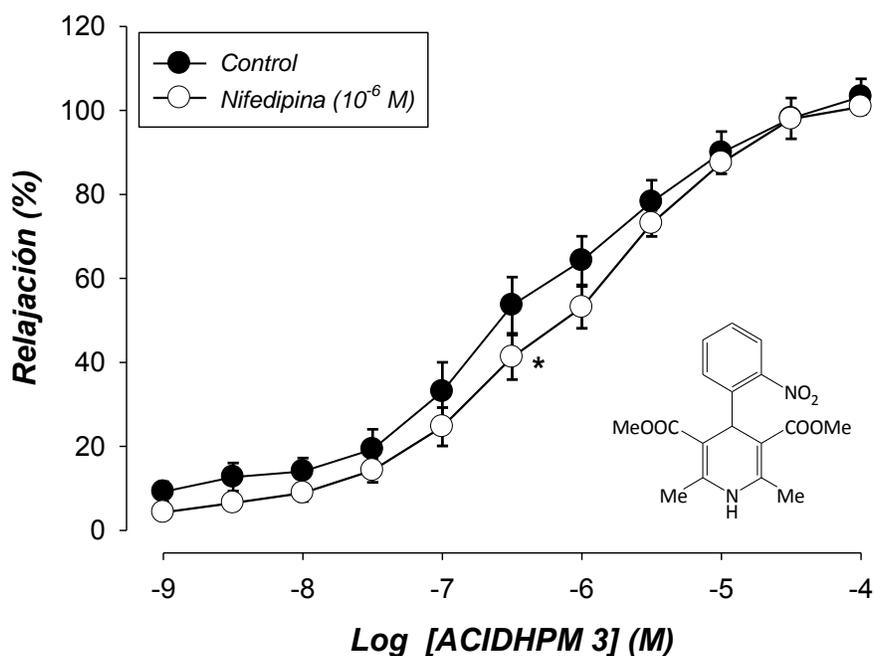
BLOQUEADOR		Control		Tratado	
		$pCl_{50}$	$E_{max}$ (%)	$pCl_{50}$	$E_{max}$ (%)
Atropina	CE	$6.22 \pm 0.10$ (4) <sup>†</sup>	$109.35 \pm 2.63$ (4)	$6.34 \pm 0.17$ (3)	$106.53 \pm 3.72$ (3)
	SE	$6.66 \pm 0.21$ (5)	$100.30 \pm 3.82$ (5)	$6.97 \pm 0.07$ (4)	$100.12 \pm 1.28$ (4)
Bromfeniramina	CE	$6.66 \pm 0.07$ (3)	$105.98 \pm 1.67$ (3)	$6.83 \pm 0.15$ (5)	$108.18 \pm 2.84$ (5)
	SE	$6.66 \pm 0.24$ (4)	$102.74 \pm 4.92$ (4)	$6.70 \pm 0.21$ (4)	$99.47 \pm 4.40$ (4)
Propranolol	CE	$6.94 \pm 0.14$ (3)	$106.94 \pm 2.37$ (3)	$6.68 \pm 0.10$ (3)	$107.10 \pm 2.16$ (3)
	SE	$6.22 \pm 0.16$ (3)	$101.83 \pm 4.25$ (3)	$6.32 \pm 0.38$ (3)	$107.12 \pm 4.05$ (3)
Nifedipina	CE	$6.29 \pm 0.12$ (4)	$105.47 \pm 3.43$ (4)	$6.07 \pm 0.06$ (4)	$104.03 \pm 2.08$ (4)
	SE	$6.42 \pm 0.15$ (4)	$102.48 \pm 3.68$ (4)	$5.63 \pm 0.08^{**}$ (3)	$103.16 \pm 3.01$ (3)

<sup>†</sup>Número de experimentos (n), \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , Diferencias significativas entre grupo control y grupo tratado

La Tabla 10 nos muestra los valores experimentales de  $pCl_{50}$  y  $E_{max}$  para la ACIDHPM **3** en presencia de diversos bloqueadores de conocidos receptores

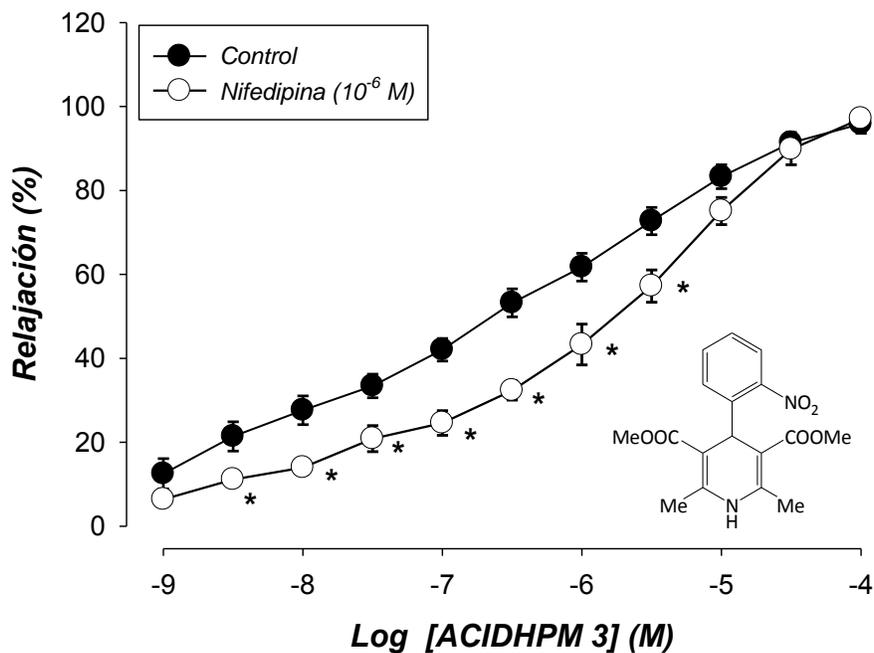
involucrados en el mecanismo e vasorrelajación. Los valores fueron obtenidos a partir de las diversas curvas concentración-respuesta en anillos CE y SE. Podemos apreciar que en el caso de los bloqueadores Atropina, Bromfeniramina y Propranolol los valores obtenidos no presentan diferencias significativas entre los grupos control y tratado, tanto para los anillos CE y denudados (SE). Sin embargo, en el caso de los anillos SE incubados con Nifedipina, el  $pCI_{50}$  del grupo tratado mostró diferencia estadísticamente significativa con respecto al control; por otro lado, en  $E_{max}$  de estos anillos no generó diferencia al compararlo con el  $E_{max}$  obtenido para el grupo control. Con respecto a los anillos CE incubados con este último bloqueador, los valores experimentales obtenidos no presentan diferencia con los de los del grupo control.

**Gráfica 3.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos CE incubados con Nifedipina.



\* $P < 0.05$  Diferencias significativas entre anillos control y tratados

**Gráfica 4.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos SE incubados con Nifedipina.



\* $P < 0.05$  Diferencias significativas entre anillos control y tratados

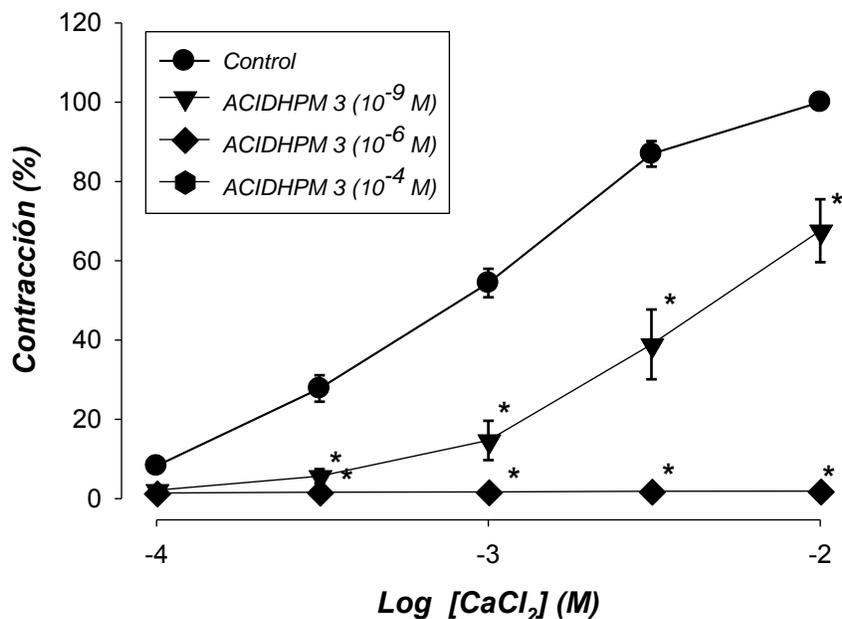
La Gráfica 3 muestra las curvas concentración-respuesta generadas para la relajación inducida por la ACIDHPM 3 en anillos CE controles e incubados con Nifedipina. Las trayectorias de ambas curvas son muy equivalentes, con una ligera variación significativa en la trayectoria en el punto central de ambas. En el caso de la Gráfica 4, vemos que la curva generada por los anillos SE incubados con Nifedipina se encuentra desplazada hacia la derecha, lo que genera diferencias significativas, asimismo en las últimas tres concentraciones de ACIDHPM 3 ( $10^{-5}$ - $10^{-4}$  M), la curva de los anillos tratados se empalma con la curva obtenida por los controles. Lo anterior es congruente con los

valores que encontramos en la Tabla 10 en donde el  $pCl_{50}$  presentó diferencia significativa, pero el  $E_{max}$  no as presentó.

Las curvas concentración-respuesta obtenidas de la evaluación farmacológica de la ACIDHPM 3 en presencia de los bloqueadores Atropina, Bromfeniramina y Propranolol se localizan en el Apéndice F.

### 8.3.3.- Efecto de la ACIDHPM 3 en la Respuesta Contráctil Inducida por una Alta Concentración de $K^+$ (80 mM) en una Solución de Krebs Libre de $Ca^{+2}$

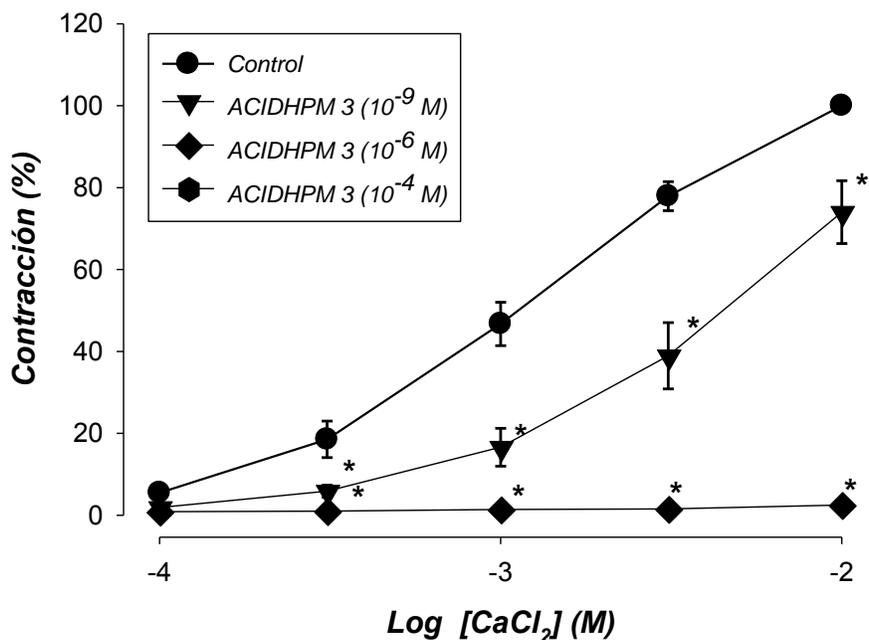
**Gráfica 5.** Curva concentración-respuesta a  $CaCl_2$  en anillos CE incubados en Krebs despolarizante y ACIDHPM 3.



\* $P < 0.05$  Diferencias significativas entre anillos control y tratados

Las Gráficas 5 y 6 muestran las curvas concentración-respuesta de la contracción generada por la adición de  $\text{CaCl}_2$  a los anillos CE y SE en ausencia (control) e incubación con la ACIDHPM 3 a distintas concentraciones. En ambos casos, las curvas generadas en los anillos incubados con la ACIDHPM 3 presentaron diferencias significativas con respecto a las curvas control en las concentraciones posteriores a la primera adición de  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-4}$  M). Asimismo, en las curvas generadas en presencia de la ACIDHPM 3  $10^{-6}$  y  $10^{-4}$  M se aprecia nula respuesta contráctil al estímulo con  $\text{CaCl}_2$ .

**Gráfica 6.** Curva concentración-respuesta a  $\text{CaCl}_2$  en anillos SE incubados en Krebs despolarizante y ACIDHPM 3.



\* $P < 0.05$  Diferencias significativas entre anillos control y tratados

### 8.3.4.- Relajación Inducida por la ACIDHPM 3 en Aortas Precontraídas con K<sup>+</sup>

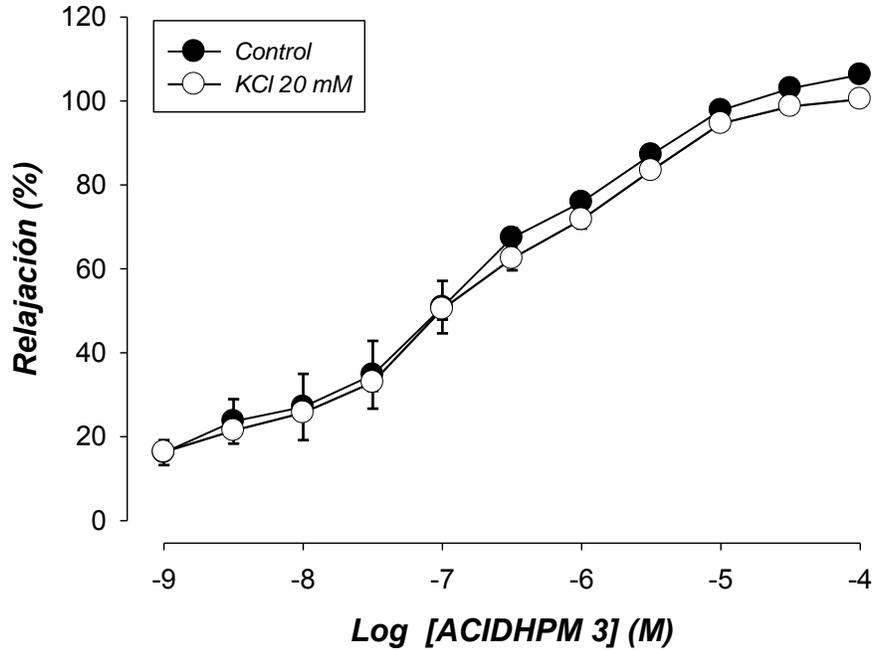
**Tabla 11.** Valores experimentales de pCl<sub>50</sub> y E<sub>max</sub> para ACIDHPM 3 en aortas precontraídas con KCl 20 y 80 mM.

BLOQUEADOR		Control		Tratado	
		pCl <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)	pCl <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)
KCl 20 mM	CE	6.64 ± 0.13 (3) <sup>†</sup>	108.71 ± 2.89 (3)	6.64 ± 0.06 (4)	102.93 ± 1.29 (4)
	SE	6.76 ± 0.29 (3)	104.50 ± 5.52 (3)	6.44 ± 0.15 (4)	97.03 ± 4.24 (4)
KCl 80 mM	CE	6.60 ± 0.07 (3)	106.78 ± 1.78 (3)	5.73 ± 0.11** (3)	86.51 ± 3.31** (3)
	SE	6.58 ± 0.27 (4)	101.31 ± 5.24 (4)	4.94 ± 0.07** (4)	58.01 ± 1.97** (4)

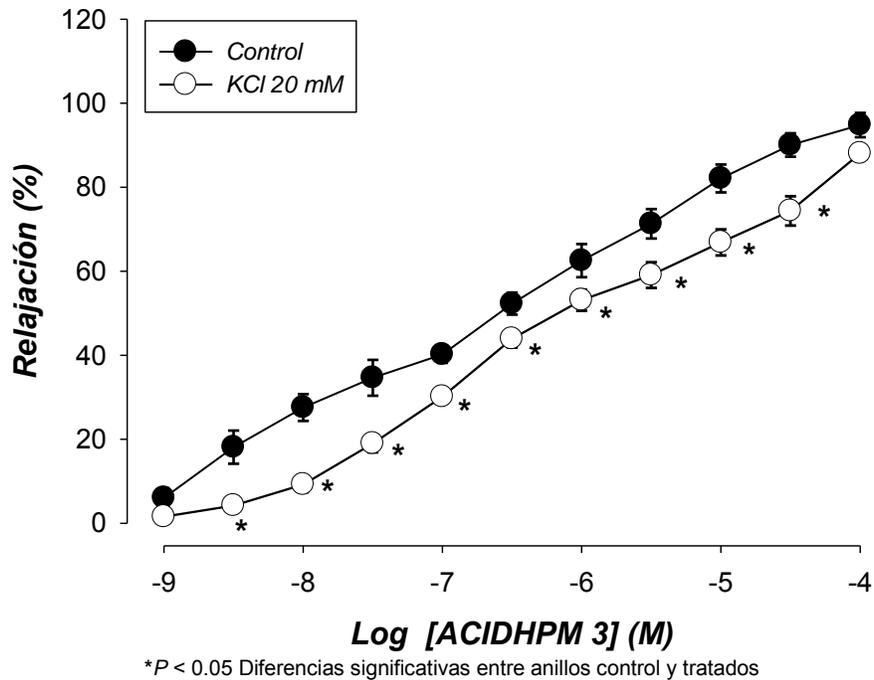
<sup>†</sup>Número de experimentos (n), \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, Diferencias significativas entre grupo control y grupo tratado

La Tabla 11 contiene los valores experimentales de pCl<sub>50</sub> y E<sub>max</sub> determinados a partir de las curvas concentración-respuesta para la relajación inducida por la ACIDHPM 3 en anillos, CE y SE, precontraídos con Phe 10<sup>-6</sup> M y KCl (20 u 80 mM) (tratados) y únicamente con Phe 10<sup>-6</sup> M (controles). Los anillos que fueron contraídos con KCl 80 mM obtuvieron valores de pCl<sub>50</sub> y E<sub>max</sub> que presentaron diferencias significativas con respecto a sus controles, en discrepancia con los anillos contraídos con KCl 20 mM.

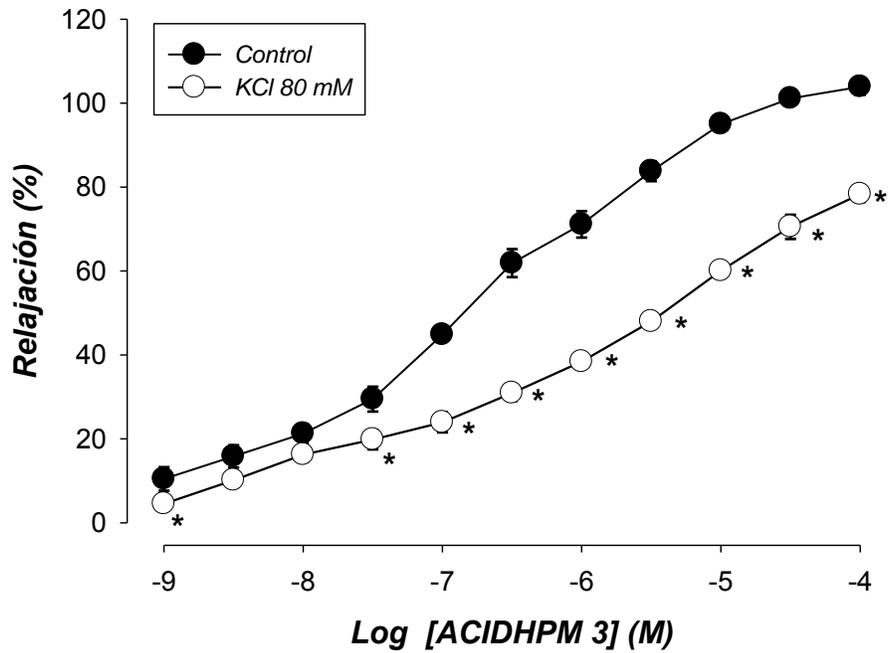
**Gráfica 7.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos CE precontraídos con KCl 20mM.



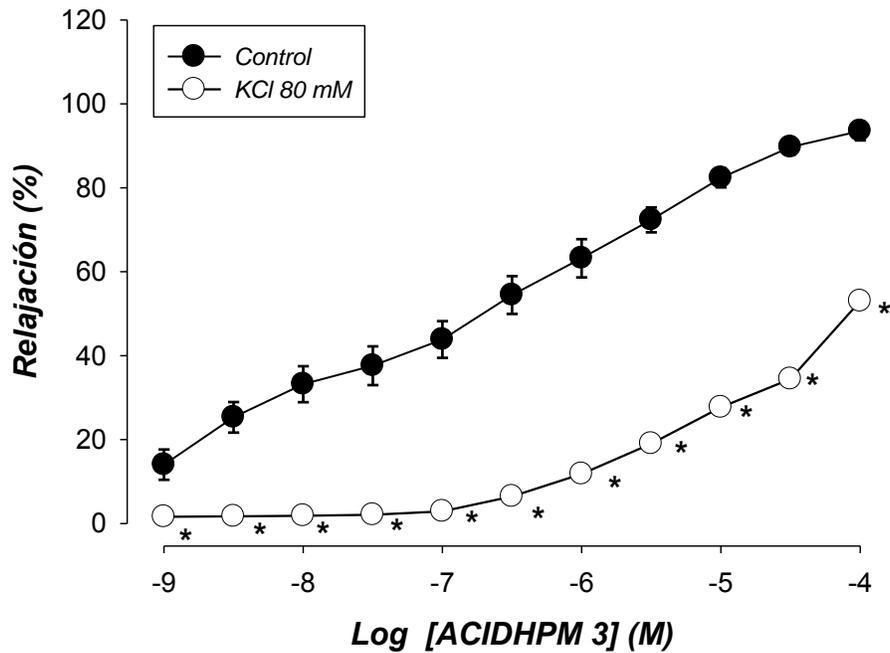
**Gráfica 8.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos SE precontraídos con KCl 20mM.



**Gráfica 9.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos CE precontraídos con KCl 80mM.



**Gráfica 10.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos SE precontraídos con KCl 80mM.



\* $P < 0.05$  Diferencias significativas entre anillos control y tratados

La Gráficas 7 y 8 muestra las curvas concentración-respuesta para la relajación inducida por la ACIDHPM **3** en anillos CE y SE precontraídos con KCl 20 mM, podemos apreciar que en el caso de la curva obtenida en anillos CE las trayectorias de ambas (control y tratado) están superpuestas, por lo que no existe diferencia significativa entre ellas. En el caso de los anillos SE, existen diferencias significativas a lo largo de la trayectoria de la curva del grupo tratado, al ser comparada con la del grupo control, sin embargo, estas diferencias no generaron divergencias en los valores de  $pCl_{50}$  y  $E_{max}$ , entre los dos grupos, obtenidos a partir de ellas y expresados en la Tabla 11..

Por otra parte, las Gráficas 9 y 10 presentas las curvas generadas en anillos CE y SE, respectivamente, contraídos con KCl 80 mM. En ambos casos, las curvas de los anillos tratados se encuentran desplazadas hacia la derecha en relación a sus respectivos controles; asimismo, podemos apreciar que en el caso de la curva de anillos SE la máxima relajación alcanzada es de alrededor del 60%, mientras que en los anillos CE este valor es ligeramente menor al 90%.

**8.3.5.- Efecto de diversos Agentes Bloqueadores Específicos de los Canales de K<sup>+</sup> en la Relajación Inducida por la ACIDHPM 3**

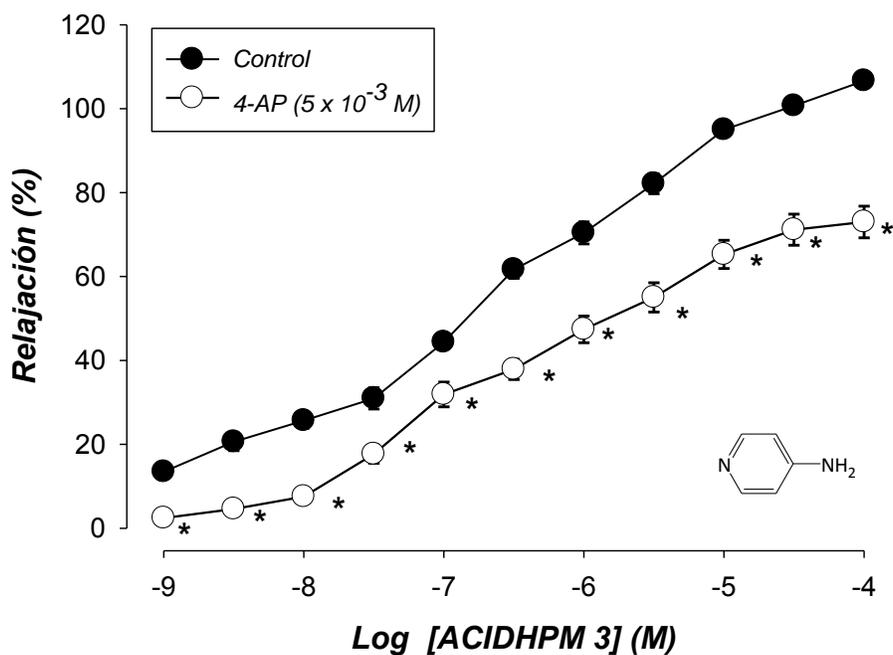
**Tabla 12.** Valores experimentales de pCl<sub>50</sub> y E<sub>max</sub> para ACIDHPM 3 en presencia de bloqueadores de canales de K<sup>+</sup> (K<sup>+</sup><sub>V</sub>, K<sup>+</sup><sub>IR</sub>, K<sup>+</sup><sub>ATP</sub> y K<sup>+</sup><sub>Ca</sub>).

BLOQUEADOR CANAL DE K <sup>+</sup>		Control		Tratado	
		pCl <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)	pCl <sub>50</sub>	E <sub>max</sub> (%)
4-AP	CE	6.44 ± 0.06 (4) <sup>†</sup>	110.55 ± 1.73 (4)	5.94 ± 0.03** (5)	72.20 ± 2.61** (5)
	SE	6.74 ± 0.25 (4)	103.15 ± 4.45 (4)	5.07 ± 0.32** (4)	85.50 ± 1.03** (4)
Ba <sup>+2</sup>	CE	6.63 ± 0.06 (3)	99.78 ± 1.35 (3)	6.95 ± 0.12 (4)	98.90 ± 1.89 (4)
	SE	6.58 ± 0.27 (4)	101.31 ± 5.52 (4)	6.29 ± 0.40 (4)	104.06 ± 10.13 (4)
Glibenclamida	CE	6.46 ± 0.08 (3)	107.06 ± 1.94 (3)	6.45 ± 0.12 (3)	111.11 ± 3.16 (3)
	SE	6.45 ± 0.14 (5)	99.68 ± 3.75 (5)	6.11 ± 0.12 (4)	98.99 ± 4.05 (4)
TEA	CE	6.86 ± 0.11 (4)	104.37 ± 2.02 (4)	6.97 ± 0.09 (4)	107.90 ± 1.58 (4)
	SE	6.27 ± 0.24 (4)	104.92 ± 7.33 (4)	6.63 ± 0.26 (3)	109.24 ± 6.46 (3)

<sup>†</sup>Número de experimentos (n), \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, Diferencias significativas entre grupo control y grupo tratado

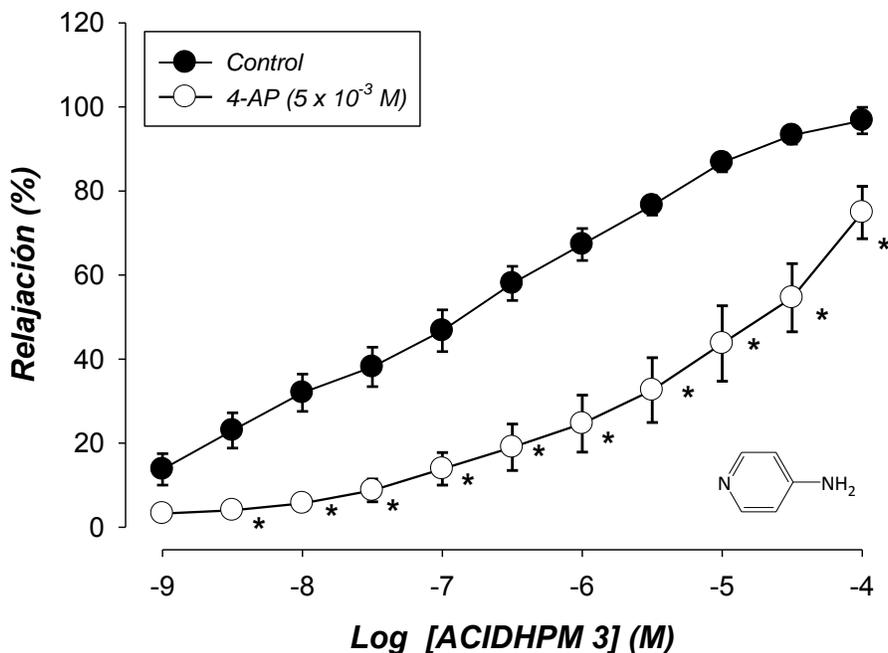
En la Tabla 12 se reportan los valores de  $pCl_{50}$  y  $E_{max}$  de las curvas concentración-respuesta para la relajación inducida por la ACIDHPM 3 en anillos CE y SE incubados en presencia de diversos bloqueadores de los diferentes tipos de canal de  $K^+$  expresados en el músculo liso vascular. En el caso de  $Ba^{+2}$ , Glibenclamida y TEA, los resultados obtenidos no presentan diferencias significativas al compararlos con sus respectivos controles. Por otro lado, los anillos CE y SE incubados con 4-AP nos proporcionaron valores experimentales, tanto  $pCl_{50}$  como  $E_{max}$  que difieren con sus controles.

**Gráfica 11.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos CE incubados con 4-AP.



\* $P < 0.05$  Diferencias significativas entre anillos control y tratados

**Gráfica 12.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos SE incubados con 4-AP.



$P < 0.05$  Diferencias significativas entre anillos control y tratados

Las Gráficas 11 y 12 muestran las curvas concentración-respuesta de la relajación inducida por la ACIDHPM 3 en anillos CE y SE, respectivamente. En ambas gráficas, las curvas obtenidas de los anillos incubados con 4-AP están desplazadas hacia la derecha respecto a sus curvas control asimismo, podemos apreciar que existen diferencias estadísticamente significativas a lo largo de todos los puntos que generan la trayectoria de estas curvas.

Las curvas concentración-respuesta obtenidas de la evaluación farmacológica de la ACIDHPM 3 en anillos previa incubación en bloqueadores específicos  $Ba^{+2}$ , Glibenclamida y TEA de canales de  $K^{+}$  se localizan en el Apéndice F.

## 9.- ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 9.1.- Síntesis Química de los Compuestos 4-Aril sustituido 2-Cianoimino-3,4-Dihidro-1H-Pirimidinas (ACIDHPMs)

Los resultados correspondientes a la caracterización de las ACIDHPMs **1-5** obtenidas mediante la síntesis multicomponente empleada, son congruentes con los resultados reportados por Hulme, R. *et al.* para los compuestos obtenidos en el presente trabajo (Tabla 8 y Apéndice A). Asimismo, los espectros de RMN de  $H^1$  y  $C^{13}$  (Apéndice B) y de EM (Apéndice C), nos proporcionaron evidencia suficiente de que los compuestos sintetizados corresponden efectivamente a las entidades químicas deseadas con núcleo de ACIDHPM **1-5**.

### 9.2.- Evaluación Farmacológica de la Serie de ACIDHPMs 1-5

La investigación preliminar de la actividad farmacológica vasorrelajante de los compuestos de interés ACIDHPM **1-5**, en anillos aórticos de rata con endotelio intacto y denudado, precontraídos con Phe ( $10^{-6}$  M), se basó en la construcción de las curvas concentración-respuesta (Gráficas 1, 13-16). Los resultados derivados de este estudio permiten establecer, por una parte, que todos los compuestos evaluados presentaron actividad vasorrelajante, sin embargo, los valores de  $E_{max}$  y  $pCI_{50}$  determinados a partir de estas curvas demuestran que la naturaleza química y la posición de los sustituyentes presentes en el grupo fenilo enlazado al C-4 del núcleo DHPM modulan, de manera

importante, la potencia y la eficacia de estos compuestos, y por la otra que la relajación inducida por estos agentes es independiente de la presencia o ausencia de endotelio en los anillos, a pesar de ligeras discrepancias que se observan [Wu, Lin, Lin, Shen, Chiang, & Chen, 2001]. Finalmente, a la luz de estos resultados, se puede concluir que de la serie de moléculas evaluadas el compuesto ACIDHPM **3** se presenta como el compuesto con mejores propiedades en su acción vasorrelajante, al respecto es importante mencionar que fue el compuesto con mayor eficacia como se demuestra en su respuesta máxima al efecto vasodilatador (Tabla 8).

Es importante resaltar que los compuestos que presentaron mayor eficacia en su actividad farmacológica, poseen uno o más átomos de Flúor en el anillo aromático (ACIDHPM **2**, **3** y **4**), a diferencia de la ACIDHPM **5**, la cual contiene un grupo -NO<sub>2</sub>.

Asimismo, los valores obtenidos de pCl<sub>50</sub>, los cuales nos proporcionan información de la potencia de los compuestos, nos muestran que tanto los compuestos ACIDHPM **1** y ACIDHPM **3**, presentaron las mayores potencias en su actividad farmacológica. De igual manera que en la eficacia, el sustituyente del anillo aromático parece determinar la potencia de los compuestos.

En el caso de la potencia, podemos observar que el orden de óptima actividad difiere en relación a la eficacia, en este sentido, el sustituyente que genera la mayor potencia es el fenilo (ACIDHPM **1**), recordando que la potencia de un fármaco está determinada por la afinidad del compuesto hacia el receptor, sin embargo a pesar de su mayor afinidad, la respuesta máxima generada fue menor que el de la ACIDHPM **3**. Por tal motivo, se consideró apropiado estudiar el mecanismo de acción en la respuesta vasorrelajante para el compuesto ACIDHPM **3**.

### **9.3.- Determinación del mecanismo de acción de la ACIDHPM 3**

Para determinar el mecanismo involucrado en la relajación inducida por la ACIDHPM 3 en musculo liso vascular, se procedió a realizar curvas concentración- respuesta en presencia de diversos agentes de acción conocida, inhibidores de enzimas y bloqueadores de receptores celulares, para anillos aórticos con endotelio o denudados de éste. Asimismo, se realizaron protocolos, previamente reportados, para determinar si el efecto de la ACIDHPM 3 está mediado por la participación de los canales de  $Ca^{+2}$  y  $K^{+}$  sensibles a voltaje.

#### **9.3.1.- Importancia de los Factores Derivados del Endotelio en la Mediación Celular de la ACIDHPM 3**

En las curvas concentración-respuesta para la ACIDHPM 3 (Gráfica 1) podemos apreciar que existen pequeñas diferencias entre las respuestas generadas en anillos intactos y denudados, sin embargo, los anillos denudados presentaron relajación que nos indica que el efecto generado por la ACIDHPM 3 es independiente de endotelio. Para sustentar esta premisa se construyeron curvas concentración-respuesta con inhibidores enzimáticos Indometacina y L-NAME y los bloqueadores Atropina y Bromfeniramina que anulan los factores producidos por el endotelio vascular.

Al respecto, es bien conocido que el recubrimiento endotelial de las células lisas musculares genera sustancias que modulan el tono del músculo liso subyacente (Figura 25). Estas sustancias pueden actuar con vasodilatadores o vasoconstrictores, en el caso de las sustancias vasodilatadoras se conocen al óxido nítrico (NO), antes denominado

Factor Relajante Derivado de Endotelio, los Prostanoides y el Factor Hiperpolarizante Derivado del Endotelio (FHDE).

El NO se libera del endotelio por activación de enzimas de óxido nítrico sintasa (NOS) la cual cataliza el último paso de conversión de la L-arginina a NO. La producción de NO se activa al elevarse los niveles de  $[Ca^{+2}]_i$  en las células endoteliales, esta elevación se produce debido a la activación de una amplia gama de receptores de las células endoteliales, entre los que encontramos a los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos, de Histamina ( $H_1$ ) y de Vasopresina ( $V_1$ ).

Por estas razones, para determinar si el efecto relajante de la ACIDHPM **3** está mediado por el NO liberado de endotelio, se construyó la curva concentración-respuesta previa incubación del tejido aórtico con L-NAME ( $10^{-6}$  M) [Gonzales, Carter, & Kanagy, 2000], un análogo sintético de la L-arginina que inhibe la enzima NOS. Los resultados de las aortas incubadas con L-NAME y las controles nos muestran que la relajación inducida por la ACIDHPM **3** no involucra la activación de la NOS y la consecuente producción de NO, ya que no hubo diferencia significativa en los valores de  $E_{max}$  y  $pCI_{50}$  (Tabla 9; Gráfica 18). Únicamente se construyeron curvas en anillos CE, ya que la NOS no se encuentra presente en las células musculares lisas.

Por su parte, para discernir si la relajación producida por la ACIDHPM **3** está mediada por los efectos de los prostanoides vasodilatadores, y a su vez eliminar los efectos de los vasoconstrictores, generados por la ciclooxigenasa (COX) en endotelio y en célula muscular lisa se incubaron los tejidos con Indometacina ( $10^{-6}$  M), un potente inhibidor de la COX *in vitro* [Gonzales, Carter, & Kanagy, 2000]. La COX se encarga de la síntesis de prostanoides, los cuales regulan las respuestas vasculares. En el caso del

endotelio vascular, la COX produce prostaciclina ( $PGI_2$ ) la cual produce relajación en músculo liso; las células endoteliales también sintetizan, mediante la COX, prostaglandinas  $E_2$  ( $PGE_2$ ) que son vasodilatadores directos. Asimismo, en la vía sintética de las anteriores prostaglandinas, se generan los intermediarios endoperóxidos  $PGG_2$  y  $PGH_2$ , los cuales son factores vasoconstrictores generados en endotelio y que ejercen su efecto contráctil a través de los receptores de tromboxano (TP) en músculo liso vascular. Igualmente se sabe que a nivel de miocito, el ácido araquidónico intracelular participa como un segundo mensajero en mecanismos involucrados en la contracción del músculo liso vascular, ya que en la vía metabólica catalizada por COX, el ácido araquidónico es precursor de prostaglandinas y tromboxanos, los cuales son producidos en respuesta a estímulos de naturaleza física o química, y que pueden modular el tono basal vascular [Davis & Hill, 1999].

De los resultados experimentales obtenidos (Tabla 9) se puede concluir que la relajación provocada por el compuesto ACIDHPM **3** no está mediada por los productos vasodilatadores generados por la COX a nivel de endotelio, curva generada en anillos con endotelio (Gráfica 2) o a nivel de célula muscular lisa, curva generada en anillos sin endotelio (Gráfica 17).

Para determinar si la relajación inducida por la ACIDHPM **3** está mediada por la activación de los receptores muscarínicos ( $M_3$ ) en endotelio, se realizó la curva concentración-respuesta previa incubación de los anillos durante 20 minutos con Atropina ( $10^{-6}$  M), un antagonista no selectivo de los receptores muscarínicos (M) [Chen & Suzuki, 1989]. La activación de los receptores muscarínicos a nivel arterial genera vasodilatación, lo anterior a consecuencia de que en las células del endotelio vascular la activación de los receptores muscarínicos ( $M_3$ ) genera un incremento en la concentración de  $[Ca^{+2}]_i$ , con lo

cual se induce un aumento de la  $\text{Ca}^{+2}$ -calmodulina y se activa la NOS para producir NO que actúa en las células musculares lisas. Asimismo, la activación de los receptores muscarínicos ( $\text{M}_3$ ) por agonistas, como Ach, induce vasorrelajación, a pesar de la inhibición completa de la síntesis de NO. Esta vasorrelajación se acompaña de una alteración en el potencial de membrana de las células del músculo liso vascular generando una hiperpolarización dependiente de endotelio; estas respuestas hiperpolarización-relajación se deben a la liberación del FHDE, cuya identidad química es aún incierta; sin embargo, se sabe que su síntesis está condicionada a estímulos generados por agonistas y que la hiperpolarización que provoca es generada por un aumento de la conductancia del  $\text{K}^+$  de la membrana, dando lugar a la vasorrelajación.

En base a los resultados obtenidos para esta curva (Gráfica 20), se puede concluir que la relajación inducida por la ACIDHPM **3** no está mediada por la activación de los receptores ( $\text{M}_3$ ), como tampoco involucra la producción de FHDE por activación de este receptor, ya que los valores de  $E_{\text{max}}$  y  $\text{pCI}_{50}$  (Tabla 10) no presentan diferencias significativas entre los grupos control y tratados con Atropina. Asimismo, las curvas construidas bajo este mismo protocolo en anillos sin endotelio (Gráfica 21), nos permite descartar la participación de los receptores M a nivel de célula muscular lisa en el proceso de vasodilatación, ya que tampoco se encontraron diferencias significativas (Tabla 10).

Para descartar la participación de los receptores histaminérgicos  $\text{H}_1$  de endotelio en la vasorrelajación generada por la ACIDHPM **3** se construyó la curva concentración-respuesta incubando previamente los anillos con Bromfeniramina ( $10^{-6}$  M), un potente antagonista de los receptores histaminérgicos  $\text{H}_1$ . La activación de los receptores  $\text{H}_1$  de endotelio por histamina producen vasodilatación, lo anterior debido a que tal activación desencadena una serie de respuestas celulares del endotelio que resultan en la

producción de los tres factores relajantes: NO, PGI<sub>2</sub> y el FHDE. La síntesis de estos tres factores relajantes producidos en endotelio, por activación de los receptores de H<sub>1</sub>, está mediada por un aumento de la concentración de [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub>. [Huang, Chu, Chen, & Jen, 2000]. Nuevamente, mediante este protocolo experimental se puede descartar la activación de los receptores H<sub>1</sub> en endotelio por la ACIDHPM **3** y, asimismo la producción de los tres distintos factores relajantes producidos por el endotelio vascular, ya que la curva generada en anillos con endotelio (Gráfica 22) no muestra diferencias significativas entre los grupos control y tratado (Tabla 10). De igual forma, la curva generada en anillos sin endotelio (Gráfica 23), nos indica que tampoco el mecanismo de relajación involucra los receptores H<sub>1</sub> en miocitos vasculares.

Como se estableció desde un principio, los principales factores vasodilatadores derivados en células endoteliales vasculares involucran el NO, los prostanoïdes (PGI<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub>) y el FHDE; sin embargo existe una cuarta sustancia el Péptido Natriurético tipo C (PNC), el cual se libera en el endotelio y presenta efectos vasodilatadores. Este péptido se genera en las células endoteliales por incremento de la [Ca<sup>+2</sup>]<sub>i</sub> en ellas y se libera hacia las células musculares, en donde activa el Receptor del Péptido Natriurético B (RPN-B). El RPN-B está directamente ligado a la Guanilato Ciclasa particulada (GCp), distinta a su isoforma soluble (GCs) [Rang, Dale, Ritter, & Moore, 2004]. La unión del PNC con el RPN-B tiene como consecuencia la formación de GMPc por activación de la GCp produciendo relajación. Este mecanismo puede ser el que genere las diferencias entre la relajación inducida por la ACIDHPM **3** entre los anillos con endotelio y denudados de este tejido; sin embargo, a la luz de los resultados obtenidos y analizados previamente se puede establecer que la relajación inducida por la ACIDHPM **3** es independiente del endotelio vascular, ya que se inhibió la liberación de factores, así como la activación de diversos receptores endoteliales que conllevarían a la relajación del músculo liso vascular.

De igual manera, existe otro factor que pudo variar las respuestas entre los anillos con endotelio y denudados de éste, la remoción mecánica del endotelio, la cual genera daño en la capa de células musculares adyacentes [Taylor, Southerton, Weston, & Baker, 1988], dando como resultado que éstas vacíen su contenido, incluyendo la alta concentración de  $[K^+]_i$  hacia las otras células circundantes, generando, de esta manera, un aumento en la concentración de  $[K^+]_o$  con la consecuente despolarización de la membrana [Chen & Suzuki, 1989]. Esta despolarización provoca un mayor flujo de  $Ca^{+2}$  al interior de las células musculares al abrirse los canales de  $Ca^{+2}$ , dando como resultado un aumento en la  $[Ca^{+2}]_i$  y generando una mayor contracción de la célula de la inducida únicamente por la Phe ( $10^{-6}$  M), por lo cual se pueden obtener divergencias en la respuesta vasorrelajante a la ACIDHPM 3.

### **9.3.2.- Inhibición y Bloqueo de dianas Celulares en Músculo Liso Involucradas en la Relajación Muscular**

Para evaluar si la ACIDHPM 3 induce relajación mediante la activación de la GCs, los tejidos se incubaron con  $10^{-5}$  M de ODQ, un inhibidor selectivo de esta enzima. El NO activa la GCs al combinarse con su grupo hemo, la activación de la GCs conlleva a un aumento en la producción de GMPc a partir de GTP (trifosfato de guanosina), el GMPc activa a la proteínquinasa G (PKG) y en altas concentraciones puede activar la proteínquinasa A (PKA); se sabe que la PKG es capaz de mimetizar las acciones de la PKA, sin embargo el mecanismo por el cual genera vasorrelajación es aún incierto. Asimismo, el aumento del GMPc activa a la miosina fosfatasa, enzima encargada que revierte el proceso de fosforilación de la cadena ligera de miosina (CLM), favoreciendo la

relajación del músculo liso [Hennan & Diamond, 2001]. El BAY41-2272, una pirazolopiridina, activa la GCs en un sitio independiente al del NO, por lo cual al poseer cierta similitud estructural, decidimos evaluar si la ACIDHPM **3** inducía vasorrelajación activando esta vía. No se realizó la curva en anillos CE, debido a que este tejido produce NO al ser estimulado con Phe ( $10^{-6}$ ) y podría interferir en los resultados obtenidos en esta curva.

Los resultados de este estudio (Tabla 9), conducen a descartar que la ACIDHPM **3** active directamente la GCs, debido a que la curva obtenida en anillos sin endotelio (Gráfica 19) no muestran diferencia entre los grupos tratado y el control.

Por otra parte, para evaluar si la relajación generada por la ACIDHPM **3** está mediada por la activación de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos presentes en las células del músculo liso vascular, así como en las células del endotelio vascular, se procedió a elaborar la curva concentración-respuesta, previa incubación de los anillos en presencia del  $\beta$ -bloqueador Propranolol ( $10^{-6}$  M) [Gray & Marshall, 1992]. Los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos, presentes en músculo liso vascular, al ser activados por algún agonista provocan vasorrelajación, esta relajación está mediada por la activación de la adenilato ciclasa (AC), enzima responsable de la generación de AMPc (monofosfato de adenosina 3',5' cíclico) a partir de ATP; el AMPc, a su vez, se encarga de activar la proteínquinasa A (PKA), ésta última encargada de fosforilar e inactivar a la quinasa de cadenas ligeras de miosina (KCLM), impidiendo que se lleve a cabo la fosforilación de la CLM necesaria para la contracción. Este proceso es el causante de la relajación del músculo liso mediado por los agonistas de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos; asimismo, se ha reportado que la activación de este tipo de receptores a nivel de endotelio es responsable de producir vasorrelajación en músculo liso de aorta de rata, ya que su activación genera un

incremento del AMPc, que induce la activación de la NOS y producción de NO para producir relajación en la célula del músculo liso vascular [Gray & Marshall, 1992].

A partir de los resultados obtenidos, tanto en anillos con endotelio y sin endotelio (Tabla 10), podemos concluir que la relajación inducida por la ACIDHPM **3** no está mediada por la activación de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en músculo liso vascular (Gráfica 25), como tampoco a nivel de endotelio (Gráfica 24) ya que no encontramos diferencias entre los grupos controles y tratados en ambos tejidos. En el caso de los anillos CE, los resultados son congruentes con los análisis previos, respecto a que la ACIDHPM **3** no induce vasorrelajación por la activación de la producción de NO por el endotelio vascular.

Para evaluar la participación de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  sensibles a voltaje tipo L en la relajación inducida por la ACIDHPM **3** se construyó la curva concentración-respuesta después de incubar los anillos aórticos con Nifedipina ( $10^{-6}$  M), un antagonista de canales de  $\text{Ca}^{+2}$ , durante 20 minutos [Shum, Le, Jones, Gurney, & Sasaki, 2003]. Los antagonistas del  $\text{Ca}^{+2}$  impiden la difusión de este ion al interior de la célula a través del poro del canal abierto al fijarse directamente en el canal, son inhibidores selectivos de los canales tipo L de  $\text{Ca}^{+2}$ , estos canales son los encargados principales de la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  al interior de las células musculares lisas. Al bloquear la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  disminuye la concentración de  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  y se produce vasorrelajación.

Con los datos obtenidos en las curvas generadas en anillos sin endotelio (Gráfica 4), podemos validar que la relajación inducida por la ACIDHPM **3** involucra el bloqueo de estos canales, ya que existen diferencias significativas entre los grupos control y tratado respecto a su  $\text{pCl}_{50}$  (Tabla 10). Estos resultados nos indican que la Nifedipina, un potente

antagonista de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$ , probablemente se une al mismo receptor que la ACIDHPM 3. Esto es posible si recordamos que la ACIDHPM 3 contiene en su estructura al grupo farmacofórico de la Nifedipina, el cual se une al canal de  $\text{Ca}^{+2}$  y ejerce acción bloqueadora en el canal [Rovnyak, et al., 1995]. Sin embargo, la inhibición del efecto vasorrelajante de la ACIDHPM 3, solo se ve afectada en cuanto a su potencia y no en cuanto a la eficacia del compuesto, ya que los valores de  $E_{\text{max}}$  alcanzados al final de la curva (Tabla 10) no generan diferencia con los valores de eficacia de obtenidos en los controles (Gráfica 4). Lo anterior, se puede atribuir a que el bloqueo del canal de  $\text{Ca}^{+2}$  por Nifedipina conlleva por sí mismo a una disminución en la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  con la consecuente relajación.

Otro aspecto relevante, es que en los anillos con endotelio (Gráfica 3), las curvas de los anillos controles y tratados no presentan diferencias significativas (Tabla 10). Esto se puede explicar teniendo en cuenta que al incubar los anillos con endotelio en Nifedipina se estimula la producción de NO endotelial [Ding & Vaziri, 2000] igualmente se incrementa la biodisponibilidad de NO mediante mecanismos antioxidantes [Berkels, Egink, Marsen, Bartels, Roesen, & Klaus, 2001], en este sentido, podemos pensar que el incremento de NO impactó en la relajación de los anillos tratados y enmascaró la ocupación de los canales en los cuales actúa la ACIDHPM 3.

### **9.3.3.- Efecto de la ACIDHPM 3 en la Respuesta Contráctil Inducida por una Alta Concentración de $\text{K}^+$ (80 mM) en una Solución de Krebs libre de $\text{Ca}^{+2}$**

Para esclarecer la participación de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  sensibles al voltaje, procedimos a realizar curvas concentración-respuesta incubando los tejidos, tanto con

endotelio como denudados, en soluciones libres de  $\text{Ca}^{+2}$  y con alta concentración de  $\text{K}^+$  (80 mM) (Krebs despolarizante) para después adicionar la ACIDHPM **3** a diferentes concentraciones ( $10^{-9}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-4}$  M) y finalmente producir contracciones con  $\text{CaCl}_2$  (0.1 a 10.0 mM). Al realizar los lavados con la solución de Krebs despolarizante eliminamos el  $[\text{Ca}^{+2}]_o$ , asimismo, aumentamos la concentración de  $[\text{K}^+]_o$  lo que generó despolarización de la membrana celular, la cual a su vez activo los canales los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  del tipo L; sin embargo, al eliminar el  $[\text{Ca}^{+2}]_o$ , no hay flujo hacia el interior de la célula de este ion y no se genera contracción de la célula muscular por aumento del  $[\text{Ca}^{+2}]_i$ . Una vez que al realizar un lavado con Krebs despolarizante no se generó un aumento en la tensión de los anillos, se procedió a realizar la contracción con  $\text{CaCl}_2$ . Las contracciones generadas por las adiciones acumulativas de  $\text{Ca}^{+2}$  se deben a que en cada adición se incrementa la concentración de  $[\text{Ca}^{+2}]_i$  ya que el flujo hacia el interior de la célula ocurre debido a que por la despolarización de la membrana, los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  sensibles a voltaje permanecen abiertos y permiten la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$ . Una vez realizada la curva sin incubar los tejidos en ACIDHPM **3** (control), se procedió a realizar el mismo protocolo, incubando los tejidos en este compuesto. En el caso de las curvas generadas bajo la incubación de ACIDHPM **3** ( $10^{-9}$  M), las contracciones generadas por el  $\text{CaCl}_2$  disminuyeron significativamente, tanto en anillos con endotelio como en anillos denudados (Gráficas 5 y 6). Estos resultados reflejan que el mecanismo de acción de la ACIDHPM **3** involucra la inhibición de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  de tipo L, lo cual está en concordancia con el estudio anterior, en el cual empleamos Nifedipina ( $10^{-6}$  M) como agente bloqueador de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$ , en los anillos denudados de endotelio y que observamos un desplazamiento hacia la derecha en la curva concentración-respuesta.

Al emplear concentraciones de  $10^{-6}$  y  $10^{-4}$  M de la ACIDHPM **3**, observamos una abolición completa de la contracción generada por la adición de  $\text{CaCl}_2$  (Gráficas 5 y 6).

Este efecto nos proporciona evidencia importante de que la ACIDHPM **3** actúa inhibiendo la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  a través de los canales de tipo L. Se ha reportado que la Nifedipina en concentraciones similares ( $10^{-7}$  M) empleada bajo un protocolo parecido anula de manera completa la contracción a  $\text{CaCl}_2$ , ya que no permite la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$  al interior de la célula a través de los canales tipo L [Leung, Yao, Lau, Ko, Lu, & Huang, 2005]. Nuevamente, con estos resultados experimentales, podemos corroborar el bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  tipo L por parte de la ACIDHPM **3**, lo cual podemos explicar si consideramos su estructura en la cual está incorporado el grupo farmacofórico de las 1,4-DHPs bloqueadoras de este tipo de canales.

#### **9.3.4.- Relajación Inducida por la ACIDHPM 3 en Aortas Precontraídas con $\text{K}^+$ .**

Para determinar si el efecto vasorrelajante de la ACIDHPM **3** involucra la participación de los canales de  $\text{K}^+$ , se realizaron las curvas concentración-respuesta, empleando como agente contráctil altas concentraciones de KCl (20 y 80 mM). Se sabe que un aumento de la concentración de  $\text{K}^+$  extracelular  $[\text{K}^+]_o$  provoca una contracción en las células musculares lisas vasculares mediante la despolarización de la membrana celular, la cual a su vez activa los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  activados por voltaje, como los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  del tipo L, permitiendo la entrada de  $\text{Ca}^{+2}$ , lo que genera contracción de la célula muscular. Cuando se empleó KCl 20 mM como agente contráctil podemos observar que en los anillos desnudos de endotelio, se observaron diferencias en la respuesta obtenida en comparación con los controles (Gráfica 8), los cuales únicamente fueron contraídos con Phe ( $10^{-6}$  M), sin embargo, al ajustar la curva a la ecuación descrita en la metodología, no encontramos diferencias significativas en los valores de  $\text{pCl}_{50}$  y  $E_{\text{max}}$  (Tabla 11). Asimismo, en las curvas obtenidas en presencia de endotelio y contraídas con

la misma concentración de KCl (20 mM), apreciamos que no existen diferencias en las trayectorias de las mismas (Gráfica 7). Podemos adjudicar este comportamiento en los anillos con endotelio, debido a que el incremento de concentración de  $[K^+]_o$ , en rangos de concentración hasta 25 mM, puede estimular a las células endoteliales para que produzcan sustancias vasodilatadoras, mecanismo que ha sido estudiado en arteria femoral de canes [Lacy, Pilkington, Hanvesakul, Fish, Boyle, & Thurston, 2000]. Al adicionar esta concentración de  $K^+$  de forma extraluminal, se especula que las terminaciones de los nervios perivasculares pudieran producir algún mediador que actúa en endotelio y estimula la producción de factores vasorrelajantes que ejercen su efecto en el músculo liso [Rubanyi & Vanhoutte, 1988]. Así, la actividad de los factores relajantes por el endotelio en el músculo liso se adiciona a los ejercidos por la ACIDHPM **3**, lo que hace que no existan diferencias en las curvas de los anillos controles y tratados (Tabla 11), en discrepancia con los resultados observados en los anillos denudados del endotelio vascular.

En el caso de las curvas generadas por los anillos estimulados con KCl 80 mM, con endotelio como denudados, la relajación inducida por la ACIDHPM **3** fue atenuada de manera significativa. Los valores experimentales de  $pCl_{50}$  y  $E_{max}$  (Tabla 11) de los grupos tratados mostraron diferencia significativa con respecto a los controles. Asimismo, en la trayectoria de las curvas generadas por la relajación de la ACIDHPM **3** en aortas contraídas con KCl 80 mM se aprecia la disminución marcada de su efecto vasodilatador (Gráficas 9 y 10).

De acuerdo con los resultados obtenidos por las curvas generadas por la contracción con KCl 20 y 80 mM, podemos establecer que la ACIDHPM **3** es un activador de los canales de  $K^+$ , ya que los compuestos que relajan una arteria contraída por un

pequeño incremento en la concentración de  $[K^+]_o$  (20 mM), pero que su efecto vasorrelajante se ve afectado por la contracción de las arterias con una alta concentración de  $[K^+]_o$  (80 mM), pueden ser considerados como activadores del canal de  $K^+$  [Nelson & Quayle, 1995]. El hecho de que la ACIDHPM 3 tenga actividad sobre los canales de  $K^+$  es consistente con la estructura de este compuesto, ya que contiene al grupo *N*-cianoguanidino, el cual lo podemos encontrar en fármacos activadores del canal de  $K^+_{ATP}$  como el pinacidilo y el P1075 [Lange, Löffler-Walz, Englert, Hambrock, Russ, & Quast, 2002].

### **9.3.5.- Efecto de Diversos Agentes Bloqueadores Específicos de los Canales de $K^+$ en la Relajación Inducida por la ACIDHPM 3**

Una vez determinado que el efecto vasorrelajante de la ACIDHPM 3 está mediado por la activación del canal de  $K^+$ , se procedió a realizar curvas en presencia de bloqueadores específicos para los diversos tipos de canales de  $K^+$  que se han identificado en la membrana de las células de músculo liso arterial ( $K^+_v$ ,  $K^+_{IR}$ ,  $K^+_{ATP}$  y  $K^+_{Ca}$ ).

Los canales de  $K^+$  sensibles a voltaje ( $K^+_v$ ) son activados por la despolarización de la membrana, la cual puede ser inducida por la presurización o la acción de vasoconstrictores, con el fin de atenuar esta despolarización. Para establecer si los canales de  $K^+_v$  son activados por la ACIDHPM 3, se incubaron los tejidos con 4-AP a una concentración de  $5 \times 10^{-3}$  M, el cual es el bloqueador más selectivo que se conoce para este tipo de canales [Nelson & Quayle, 1995]. En las curvas obtenidas de los tejidos tratados con endotelio y denudados (Gráficas 11 y 12), podemos observar una marcada disminución del efecto vasorrelajante, ya se aprecia un desplazamiento de

aproximadamente 2 unidades logarítmicas hacia la derecha de las curvas de los tratados respecto a sus controles, lo que nos indica diferencias en el  $pCl_{50}$  lo cual comprobamos al realizar el análisis estadístico para este parámetro (Tabla 12); de igual manera el  $E_{max}$  se encuentra disminuido respecto a los controles (Tabla 12). Estos resultados sugieren que la ACIDHPM **3** ejerce su efecto relajante mediante activación de los canales de  $K^+_v$ .

Los de  $K^+$  rectificadores de entrada ( $K^+_{IR}$ ) son canales cuya función es regular el potencial de acción en reposo de las células musculares lisas, previniendo la hiperpolarización de la membrana a valores más negativos que la  $E_K$  (-84 mV) y minimizar la pérdida de  $K^+$  celular [Nelson & Quayle, 1995]. Estos canales hacen pasar más fácilmente corrientes de  $K^+$  hacia el interior de la célula que hacia fuera en gradientes iónicos fisiológicos, pero aumentan su conductancia a este ión con el incremento de  $[K^+]_o$  [Jackson, 2000]. Para descartar su participación en el mecanismo mediado por la ACIDHPM **3**, se incubaron los anillos aórticos con  $Ba^{+2}$  ( $10^{-4}$  M), concentración en la cual este ion realiza un bloqueo selectivo de los canales  $K^+_{IR}$  [Sobey, 2001].

Al analizar las curvas y parámetros obtenidos de los anillos incubados en  $Ba^{+2}$ , resulta claro que la relajación inducida por la ACIDHPM **3**, no involucra los canales de  $K^+_{IR}$ , ya que las trayectorias obtenidas en los controles y los tratados son muy similares (Gráficas 26 y 27) y no hay diferencia significativa en los parámetros  $E_{max}$  y  $pCl_{50}$  obtenidos de ellas (Tabla 12).

Por su parte, los canales de  $K^+$  sensibles a ATP ( $K^+_{ATP}$ ) son canales que pueden cerrarse por acción del ATP intracelular, por lo cual en condiciones normales fisiológicas, su apertura es poco probable [Sobey, 2001], asimismo, estos canales responden a cambios en el estado del metabolismo celular, así como a ciertos vasodilatadores

endógenos [Nelson & Quayle, 1995]. La mayoría de los fármacos conocidos como activadores del canal de  $K^+$  tienen su sitio de acción en los canales de  $K^+_{ATP}$  (minoxidilo, pinacidilo, cromakalim, nicorandil).

Para evaluar si la ACIDHPM **3** media su actividad a través de este mismo mecanismo, los anillos se incubaron con Glibenclamida ( $10^{-6}$  M), una sulfonilurea que inhibe completamente las corrientes de  $K^+$  generadas por el canal de  $K^+_{ATP}$ . Apartir de los resultados obtenidos, se concluye que el efecto activador de la ACIDHPM **3** en canales de  $K^+$  no involucra a la activación del canal de  $K^+_{ATP}$ , ya que en la curvas generada en anillos con y sin endotelio (Gráficas 28 y 29) la trayectoria y parámetros obtenidos a partir de ella (Tabla 12), no se presentaron diferencias significativas.

Los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{+2}$  ( $K^+_{Ca}$ ) son canales que pueden activarse por el  $[Ca^{+2}]_i$  o por la despolarización de la membrana, es decir, por el voltaje. Para discernir si estos canales median la relajación inducida por la ACIDHPM **3**, incubamos los tejidos con TEA ( $10^{-3}$  M), considerando que a esta concentración el TEA realiza un bloqueo selectivo para los canales de  $K^+_{Ca}$  sin bloquear los otros canales de potasio ( $K^+_v$ ,  $K^+_{IR}$ ,  $K^+_{ATP}$ ) [Sobey, 2001]. Del análisis de las curvas obtenidas bajo este protocolo (Gráficas 30 y 31) se deduce que las curvas de los grupos controles y tratados no presentan diferencias en ningún punto de las trayectorias, así como los valores de  $E_{max}$  y  $pCI_{50}$  no presentan diferencias significativas (Tabla 12), lo cual nos confirma que los  $K^+_{Ca}$  no intervienen en el mecanismo de relajación inducida por la ACIDHPM **3**.

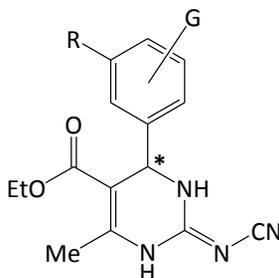
Una vez analizados los datos de las curvas obtenidas en presencia de los bloqueadores de los diversos tipos de canales de  $K^+$ , se puede concluir que la ACIDHPM **3** actúa mediante la activación de los canales de  $K^+_v$ . En principio se pudo haber sugerido

que la activación de canales de  $K^+$  por parte de este compuesto estaría mediada por los canales de  $K^+_{ATP}$ , ya que, la ACIDHPM **3** posee en su estructura el fragmento *N*-cianoguanidino, el cual está presente en la estructura de fármacos que actúan a nivel de este canal como el pinacidilo y el P1075 [Lange, Löffler-Walz, Englert, Hambrock, Russ, & Quast, 2002]. Sin embargo, nuestros resultados sugieren que el efecto vasorrelajante está mediado por los canales de  $K^+_v$ . A este respecto, podemos suponer que la activación de los  $K^+_v$  no está mediada necesariamente el grupo farmacofórico *N*-cianoguanidino, sino por el segmento de la estructura del anillo DHPM similar a las 1,4-DHPs, ya que se sabe que algunas 1,4-DHPs como la Nifedipina y la Nicardipina son capaces de realizar bloqueos sobre los canales de  $K^+_v$  [Gutman, et al., 2005], asimismo el BAY 8644 también es capaz de bloquear corrientes de  $K^+_v$  4.3 [Hatano, Ohya, Giles, & Imaizumi, 2003]. Sin embargo todos estos compuestos presentan actividad bloqueadora en este tipo de canales, lo que nos lleva al razonamiento de que la unión a los  $K^+_v$  está mediada por la estructura similar a la Nifedipina, pero que parte de la estructura de la ACIDHPM **3**, probablemente la comprendida por el *N*-cianoguanidino, de alguna manera se involucra en la unión con los receptores activadores de los canales  $K^+_v$ .

Es importante señalar, que de acuerdo a los resultados y análisis previamente descritos, estamos en presencia de un compuesto con un perfil farmacológico dual y aditivo como vasorrelajante, ya que ejerce efectos como bloqueador de los canales de  $Ca^{+2}$  de tipo L y activador de los canales de  $K^+_v$ . Asimismo, debemos recordar que en la fisiología de la célula muscular, la activación de los canales de  $K^+$  y, por tanto, la salida de este ion, genera una hiperpolarización de la membrana celular, lo que genera que los canales de  $Ca^{+2}$  tipo L se cierren y se inhiba la entrada de  $Ca^{+2}$  a la célula, generándose así la relajación celular [Rang, Dale, Ritter, & Moore, 2004]. Por lo que la misma activación de los canales de  $K^+_v$  puede generar el cierre de los canales de  $Ca^{+2}$  tipo L,

pero además, la ACIDHPM **3** bloquea directamente este canal, lo cual fue confirmado con las curvas concentración-respuesta a  $\text{CaCl}_2$  obtenidas en Krebs despolarizante e incubación a diversas concentraciones de la ACIDHPM **3**, ya que este protocolo se ha empleado específicamente para discernir si un fármaco es bloqueador del canal de  $\text{Ca}^{+2}$  de tipo L [Wu, Lin, Lin, Shen, Chiang, & Chen, 2001]. Asimismo, los resultados obtenidos colocan a la ACIDHPM **3** como un nuevo fármaco cabeza de serie en la investigación de compuestos que activen los  $\text{K}^+_v$  debido a los escasos compuestos con tal perfil farmacológico. De igual manera, resulta conveniente realizar estudios de electrofisiología para determinar la variación en las corrientes de  $\text{Ca}^{+2}$  y  $\text{K}^+$ , generadas en la relajación inducida por la ACIDHPM, para esclarecer con mayor precisión el mecanismo de acción involucrado en tal efecto.

Finalmente, el futuro estudio de las ACIDHPMs como agentes vasorrelajantes mediante la activación de los  $\text{K}^+_v$  debe contemplar el discernimiento de la familia de este tipo de canales de  $\text{K}^+$  involucrada en este proceso. Asimismo, resulta atractiva la síntesis enantioselectiva, debido que las ACIDHPMs exhiben en su estructura un centro estereogénico (Figura 33), para posteriormente, evaluar cual de sus enantiómeros (R/S) presenta la mayor potencia en la bioactividad relajante o, por otra parte, establecer si uno de sus enantiómeros genera la activación, mientras que el otro genere el bloqueo de estas dianas celulares.



**Figura 33.** Centro estereogénico de las ACIDHPMs; mediante la síntesis enantioselectiva se pueden generar moléculas vasorrelajantes de mayor potencia.

## 10.- CONCLUSIONES

1. Se logró sintetizar compuestos con núcleo de ACIDHPM mediante una síntesis multicomponente, asimismo, se comprobó la identidad química de estas moléculas generadas en virtud de los resultados obtenidos en su caracterización.
2. Mediante los estudios de órgano aislado, para lo cual se emplearon anillos de aorta previamente precontraídos, se comprobó que las ACIDHPMs **1-5** presentan propiedades farmacológicas como agentes vasorrelajantes.
3. Se encontró que la ACIDHPM **3** ejerce su efecto vasorrelajante mediante dos mecanismos diferentes que generan relajación, el bloqueo de los canales de  $\text{Ca}^{+2}$  tipo L, así como la activación de los canales de  $\text{K}^+$ <sub>v</sub> sensibles a voltaje. Este último mecanismo, coloca a la ACIDHPM **3** como un compuesto innovador en el área de los fármacos activadores de los canales de  $\text{K}^+$ .

## 11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abadal, L. T. (2007). *Hipertensión arterial*. México: Edikamed. pc 1-30.
2. Atwal, K. S., Rovnyak, G. C., Kimball, S. D., Floyd, D. M., Moreland, S., Swanson, B. N., Gougoutas, J. Z.; Schwartz, J., Smillie, K. M., and Malley; F. (1990). Dihydropyrimidine Calcium Channel Blockers. 2. 3-Substituted-4-aryl-1,4-dihydro-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic Acid Esters as Potent Mimics of Dihydropyridines. *J. Med. Chem.*, *33*, 2629-2635.
3. Atwal, K. S., Swanson, B. N., Unger, S. E., Floyd, D. M., Moreland, S., Hedberg, A., and O'Reilly, B. C. (1991). Dihydropyrimidine Calcium Channel Blockers. 3. 3-Carbamoyl-4-aryl-1,2,3,4-tetrahydro-6-methyl-5-pyrimidinecarboxylic Acid Ester as Orally Effective Antihypertensive Agents. *J. Med. Chem.*, *34*, 806-811.
4. Berkels, R., Egink, G., Marsen, T., Bartels, H., Roesen, R., and Klaus, W. (2001). Nifedipine Increases Endothelial Nitric Oxide Bioavailability by Antioxidative Mechanisms. *Hypertension*, *37*, 240-245.
5. Block, J., and Beal, J. (2004). *Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry* (11 ed.). USA: Lippincott Williams and Wilkins. pc 43-60.
6. Brunton, L., Lazo, J., and Parker, K. (2005). *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (11 ed.). USA: McGraw-Hill. pc 845-865.
7. Cerón, P. I., Cremonez, D. C., Bendhack, L. M., and Tedesco, A. C. (2001). The Relaxation Induced by S-Nitroso-Glutathione and S-Nitroso-N-Acetylcysteine in Rat Aorta Is Not Related to Nitric Oxide Production. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, *298*, 686-694.
8. Chen, G., and Suzuki, H. (1989). Some Electrical Properties of the Endothelium-Dependent Hyperpolarization Recorded from Rat Arterial Smooth Muscle Cells. *J. Physiol.*, *410*, 91-106.
9. Davis, M. J., and Hill, M. A. (1999). Signaling Mechanisms Underlying the Vascular Myogenic Response. *Physiol. Rev.*, *79*, 387-423.
10. Delgado, A., Minguillón, C., and Joglar, J. (2003). *Introducción a la Química Terapéutica* (2 ed.). Madrid, España: Díaz de Santos. pc 97-142.
11. Ding, Y., and Vaziri, N. (2000). Nifedipine and Diltiazem but Not Verapamil Up-Regulate Endothelial Nitric-Oxide Synthase Expression. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, *292*, 606-609.
12. Dömling, A. (2006). Recent Developments in Isocyanide Based Multicomponent Reactions in Applied Chemistry. *Chem. Rev.*, *106*, 17-89.

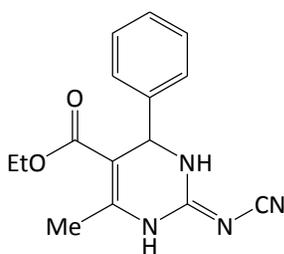
13. Dömling, A. (2002). Recent Advances in Isocyanide-based Multicomponent Chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 6, 306-313.
14. Gonzales, R., Carter, R., and Kanagy, N. (2000). Laboratory Demonstration of Vascular Smooth Muscle Function Using Rat Aortic Ring Segments. *Advan. Physiol. Educ.*, 24, 13-21.
15. Gray, D., and Marshall, I. (1992). Novel Signal Transduction Pathway Mediating Endothelium-dependent  $\beta$ -adrenoceptor Vasorelaxation in Rat Thoracic Aorta. *Br. J. Pharmacol.*, 107, 684-690.
16. Gutman, A., Chandy, G., Grissmer, S., Lazdunski, L., Mckinnon, D., Pardo, L., Robertson, G., Rudy, B., Sanguinetti, M., Stuhmer, W., and Wang, X. (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and Molecular Relationships of Voltage-Gated Potassium Channels. *Pharmacol. Rev.*, 57, 473-508.
17. Guyton, A. (1971). *Tratado de Fisiología Médica* (4 ed.). México: Interamericana. pp 320-347.
18. Hatano, N., Ohya, S. M., Giles, W., and Imaizumi, Y. (2003). Dihydropyridine  $\text{Ca}^{2+}$  Channel Antagonists and Agonists Block Kv4.2, Kv4.3 and Kv1.4  $\text{K}^+$  Channels Expressed in HEK293 Cells. *Br. J. Pharmacol.*, 139, 533-544.
19. Hayase, N., Inagaki, S., and Abiko, Y. (1995). Effects of Photodegradation Products of Nifedipine: the Nitroso-derivative Relaxes Contractions of the Rat Aortic Strip Induced by Norepinephrine and Other Agonists. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 275, 813-821.
20. Hennen, J., and Diamond, J. (2001). Effect of NO Donors on Protein Phosphorylation in Intact Vascular and Nonvascular Smooth Muscles. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 280, 1565-1580.
21. Huang, T., Chu, T., Chen, H., and Jen, C. (2000). Heterogeneity of  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  Signaling in Intact Rat Aortic Endothelium. *The FASEB Journal*, 14, 797-804.
22. Hulme, R., Zamora, O. D., Mota, E. J., Pastén, M. A., Contreras-Rojas, R., Miranda, R., Valencia-Hernández, I., Correa-Basurto, J., Trujillo-Ferrara, J., and Delgado, F. (2008). Cyanamide: a convenient building block to synthesize 4-aryl-2-cyanoimino-3,4-dihydro-1H-pyrimidine systems via a multicomponent reaction. *Tetrahedron*, 64, 3372-3380.
23. Jackson, W. (2000). Ion Channels and Vascular tone. *Hypertension*, 35, 173-178.

24. Kalant, H. (2002). *Principios de farmacología médica* (6a. ed.). México. Oxford University Press. pc 433-450.
25. Kappe, C. O. (2000). Biologically Active Dihydropyrimidines of the Biginelli-Type. A literature Survey. *Eur. J. Med. Chem*, 35, 1043-1052.
26. Kolb, J., Beck, B., Almstetter, M., Heck, S., Herdtweck, E., and Dömling, A. (2003). New MCRs: The First 4-Component Reaction Leading to 2,4-Disubstituted Thiazoles. *Molecular Diversity*, 6, 297-313.
27. Lacy, P., Pilkington, G., Hanvesakul, R., Fish, H., Boyle, J., and Thurston, H. (2000). Evidence against Potassium as an Endothelium-derived Hyperpolarizing Factor in Rat Mesenteric Small Arteries. *Br. J. Pharmacol.*, 129, 605-611.
28. Lange, U., Löffler-Walz, C., Englert, H. C., Hambrock, A., Russ, U., and Quast, U. (2002). The Stereoisomers of a Pinacidil Analog Open or Close Cloned ATP-sensitive K<sup>+</sup> Channels. *J. Biol. Chem.*, 277, 40196-40205.
29. Leung, F., Yao, X., Lau, C., Ko, W., Lu, L., and Huang, Y. (2005). Raloxifene Relaxes Rat Intrarenal Arteries by Inhibiting Ca<sup>2+</sup> Influx. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 289, F137-F144.
30. Nelson, M., and Quayle, J. (1995). Physiological Roles and Properties of Potassium Channels in Arterial Smooth Muscle. *Am. J. Physiol.*, 268, C799-C822.
31. Nogrady, T., and Weaver, D. (2005). *Medicinal Chemistry* (3 ed.). New York, USA: Oxford University Press. pc 107-182.
32. Pérez-Vizcaíno, F., Duarte, J., and Tamargo, J. (1991). Effects of Flecainide on Isolated Vascular Smooth Muscle on Rat. *Br. J. Pharmacol.*, 104, 103-107.
33. Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., and Moore, P. K. (2004). *Farmacología* (5 ed.). España: Elsevier. pc 264-305.
34. Rovnyak, G. C., Kimball, S. D., Beyer, B., Cucinotta, G., DiMarco, J. D., Gougoutas, J., Hedberg, A., Malley, M., McCarthy, J. P., Zhang, R., and Moreland, S. (1995). Calcium Entry Blockers and Activators: Conformational and Structural Determinants of Dihydropyrimidine Calcium channel Modulators. *J. Med. Chem*, 38, 119-129.
35. Rubanyi, G., and Vanhoutte, P. (1988). Potassium-induced Release of Endothelium-derived Relaxing Factor from Canine Femoral Arteries. *Circ. Res.*, 62, 1098-1103.
36. Russell, A., and Watts, S. (2000). Vascular Reactivity of Isolated Thoracic Aorta of the C57BL/6J Mouse. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 294, 598-604.

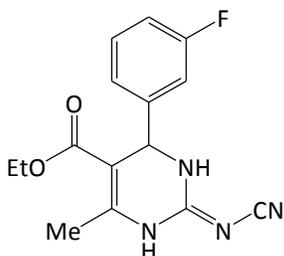
37. Secretaría de Salud. (2001). *Programa de Acción: Enfermedades Cardiovasculares e Hipertensión Arterial*. México. pc 15-27.
38. Secretaría de Salud. (2007). *Programa Nacional de Salud 2007-2012. Por un México Sano: Construyendo Alianzas*. México. pc 28-68.
39. Seiden, J., Platoshyn, O., Bakst, A., McDaniel, S., and Yuan, J. (2000). High K<sup>+</sup>-Induced Membrane Depolarization Attenuates Endothelium-Dependent Pulmonary Vasodilation. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 278, 261-267.
40. Shum, W., Le, G., Jones, R., Gurney, A., and Sasaki, Y. (2003). Involvement of Rho-kinase in Contraction of Guinea-pig Aorta Induced by Prostanoid EP3 Receptor Agonists. *Br. J. Pharmacol.*, 139, 1449-1467.
41. Sobey, C. (2001). Potassium Channel Function in Vascular Disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 21, 28-38.
42. Tanaka, Y., Tang, G., Takizawa, K., Otsuka, K., Eghbali, M., Song, M., Nishimaru, K., Shigenobu, K., Koike, K., Stefan, E., and Toro, L. (2006). Kv Channels Contribute to Nitric Oxide- and Atrial Natriuretic Peptide-Induced Relaxation of a Rat Conduit Artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 317, 341-354.
43. Taylor, S., Southerton, J., Weston, A., and Baker, J. (1988). Endothelium-dependent Effects of Acetylcholine in Rat Aorta: A Comparison with Sodium Nitroprusside and Cromakalim. *Br. J. Pharmacol.*, 94, 853-863.
44. Tietze, L. F., and Rackelmann, N. (2004). Domino Reactions in the Synthesis of Heterocyclic Natural Products and Analogs. *Pure Appl. Chem.*, 76, 1967-1983.
45. Ugi, I., Dömling, A., and Hörl, W. (1994). Multicomponent Reactions in Organic Chemistry. *Endeavour*, 18, 115-122.
46. Webb, R. (2003). Smooth Muscle Contraction and Relaxation. *Advan. Physiol. Educ.*, 27, 201-206.
47. Wu, B., Lin, R., Lin, C., Shen, K., Chiang, L., and Chen, I. (2001). A Xanthine-based KMUP-1 with Cyclic GMP Enhancing and K<sup>+</sup> Channels Opening Activities in Rat Aortic Smooth Muscle. *Br. J. Pharmacol.*, 134, 265-274.
48. Yagupolski, L. M., Antepohl, W., Artunc, F., Handrock, R., Klebanov, B. M., Maletina, I., Marxen, B., Petko, K. I., Quast, U., Vogt, A., Weiss, C., Zibold, J., and Herzig, S. (1999). Vasorelaxation by New Hybrid Compounds Containing Dihydropyridine and Pinacidil-Like Moieties. *J. Med. Chem.*, 42, 5266-5271.
49. Zhu, J., and Bienaymé, H. (2005). *Multicomponent Reactions*. Alemania: WILEY-VCH Verlag GmbH and Co. KGaA pc 311-396.

## ***12.- APÉNDICE A***

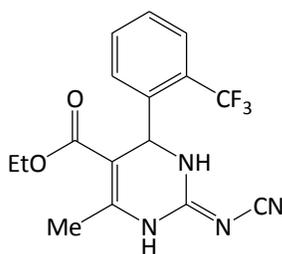
## Datos Espectroscópicos de las ACIDHPMs 1-5



**2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-fenil-3,4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM 1):** RMN  $H^1$  (300 MHz; DMSO- $d_6$ /TMS):  $\delta$  1.09 (t,  $J = 7.0$  Hz, 3H), 2.30 (s, 3H), 4.01 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 5.25 (s, 1H), 7.23-7.40 (m, 5H), 9.14 (s, 1H), 10.16 (s, 1H); RMN  $C^{13}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ /TMS):  $\delta$  14.0, 17.3, 53.2, 59.7, 101.2, 116.5, 126.4, 127.9, 128.7, 143.2, 146.0, 154.8, 164.7; IR (KBr) 1641 (C=N), 1679 (C=O), 2174 (C $\equiv$ N), NH (3297)  $cm^{-1}$ ; EM  $m/z$  284; HRMS (IE, 70 eV): Encontrado 284.1282; Calculado para  $C_{15}H_{16}O_2N_4$ : 284.1273.



**2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(3-fluorofenil)-3,4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM 2):** RMN  $H^1$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ /TMS):  $\delta$  1.08 (t,  $J = 7.2$  Hz, 3H), 2.30 (s, 3H), 4.10 (q,  $J = 7.2$  Hz, 2H), 5.27 (s, 1H), 7.19 (d,  $J = 8.4$  Hz, 2H), 7.57 (d,  $J = 8.0$  Hz, 2H), 9.33 (bs, 2H); RMN  $C^{13}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ /TMS):  $\delta$  14.0, 17.3, 52.8, 59.8, 100.5, 113.3 (2JCF = 21.6 Hz), 114.7 (2JCF = 20.4 Hz), 116.3, 122.4, 130.8 (3JCF = 7.9 Hz), 145.9, 146.7, 154.7, 163.7 (1JCF = 275.0 Hz), 164.5; IR (KBr) 1641 (C=N), 1679 (C=O), 2174 (C $\equiv$ N), NH (3297)  $cm^{-1}$ ; EM  $m/z$  302; HRMS (IE, 70 eV): Encontrado 302.1197; Calculado para  $C_{15}H_{15}O_2N_4F$ : 302.1179.



**2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(2-trifluorometilfenil)-3,4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM 3):** RMN  $H^1$  (300 MHz,

DMSO- $d_6$ /TMS):  $\delta$  0.91 (t,  $J = 7.2$  Hz), 2.38 (s, 3H), 3.89 (q,  $J =$

7.2 Hz, 2H), 5.70 (s, 1H), 7.46-7.58 (m, 2H), 7.66-7.76 (m, 2H),

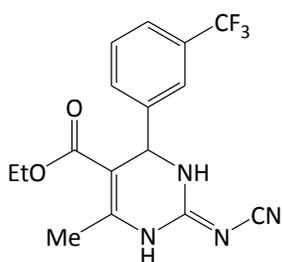
8.61 (s, 1H), 10.28 (s, 1H); RMN  $C^{13}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ /TMS):  $\delta$

13.6, 17.8, 50.7, 60.5 101.4, 115.2, 124.2 ( $^1J_{CF} = 272.1$  Hz), 126.5 ( $^3J_{CF} = 5.7$  Hz), 127.1

( $^2J_{CF} = 30.6$  Hz), 128.3, 128.9, 133.3, 139.2, 145.5, 154.2, 164.0; IR (KBr) 1641 (C=N),

1679 (C=O), 2174 (C $\equiv$ N), NH (3297)  $cm^{-1}$ ; EM  $m/z$  352; HRMS (IE, 70 eV): Encontrado

352.1140; Calculado para  $C_{16}H_{15}O_2N_4F_3$ : 352.1147.



**2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(3-trifluorometilfenil)-3,4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM 4):** RMN  $H^1$  (300 MHz,

DMSO- $d_6$ /TMS):  $\delta$  1.05(t,  $J = 7.0$  Hz, 3H), 2.32 (s, 3H), 3.99 (q,  $J =$

7.0, 2H), 5.35 (s, 1H), 7.50-7.71 (m, 4H), 9.22 (bs, 1H), 10.15

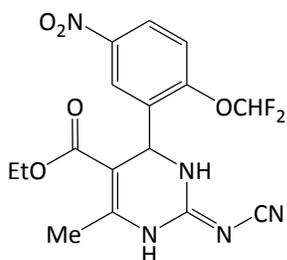
(bs, 1H); RMN  $C^{13}$  (75 MHz, DMSO- $d_6$ /TMS):  $\delta$  13.8, 17.3, 53.1,

59.8, 100.3, 116.2, 123.5 ( $^3J_{CF} = 4.5$  Hz), 124.1 ( $^3J_{CF} = 3.45$  Hz), 129.0 ( $^2J_{CF} = 31.7$  Hz),

130.1, 130.4, 144.5, 146.8, 154.6, 164.4; IR (KBr) 1641 (C=N), 1679 (C=O), 2174 (C $\equiv$ N),

(3297)  $cm^{-1}$ ; EM  $m/z$  352; HRMS (IE, 70 eV): Encontrado 352.1134; Calculado para

$C_{16}H_{15}O_2N_4F_3$ : 352.1147.



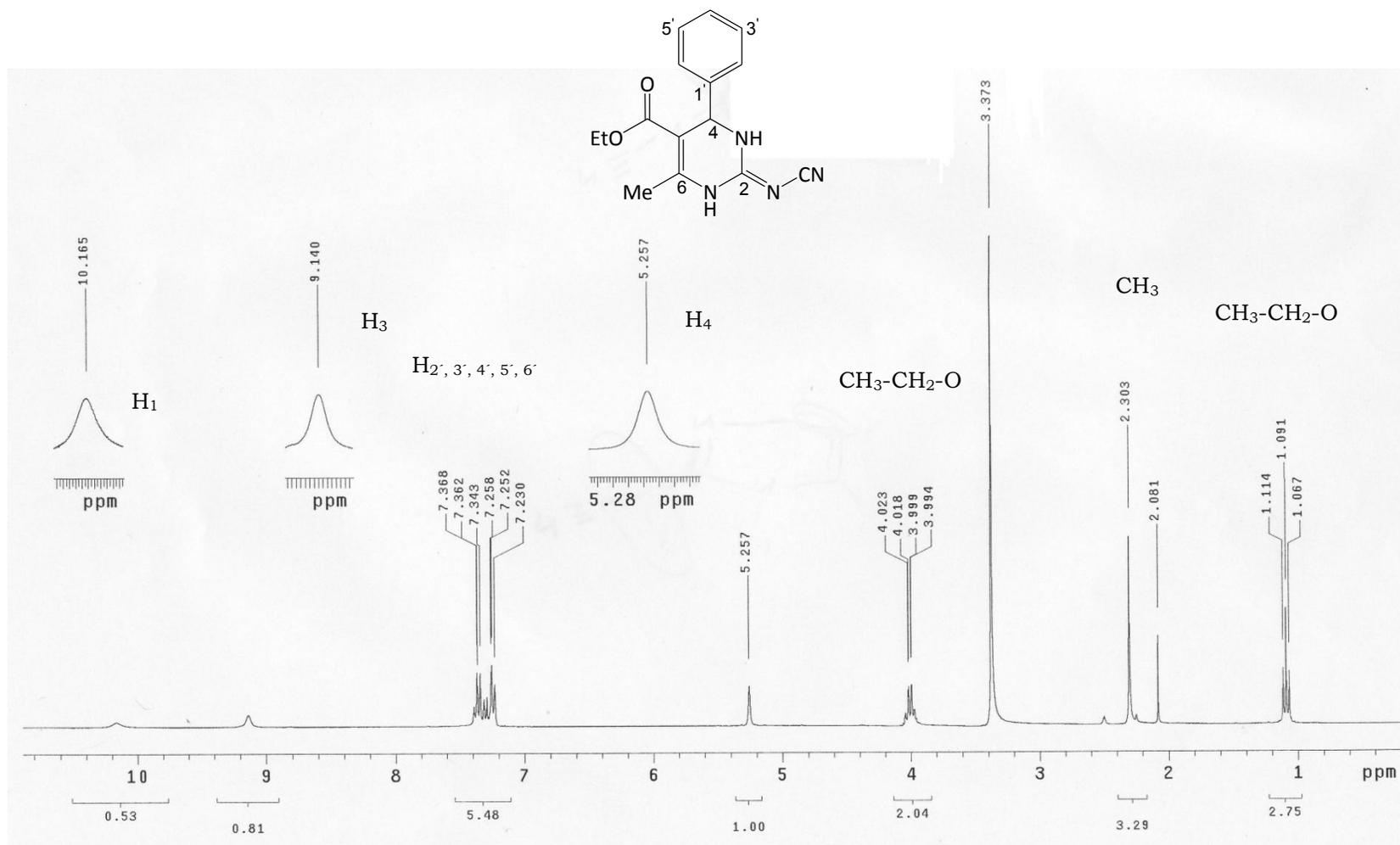
**2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(2-difluorometoxi-5-nitrofenil)-3,4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM 5): RMN  $H^1$**

(300 MHz, DMSO- $d_6$ /TMS):  $\delta$  1.02 (t,  $J = 6.9$  Hz, 3H), 2.27 (s, 3H), 3.91 (q,  $J = 7.0$  Hz, 2H), 5.59 (s, 1H), 7.43 (d,  $J = 9.0$  Hz, 1H), 7.50 (dd,  $^2J_{HF} = 73.5, 72.9$  Hz, 1H), 8.08 (d,  $J = 3.0$  Hz, 1H),

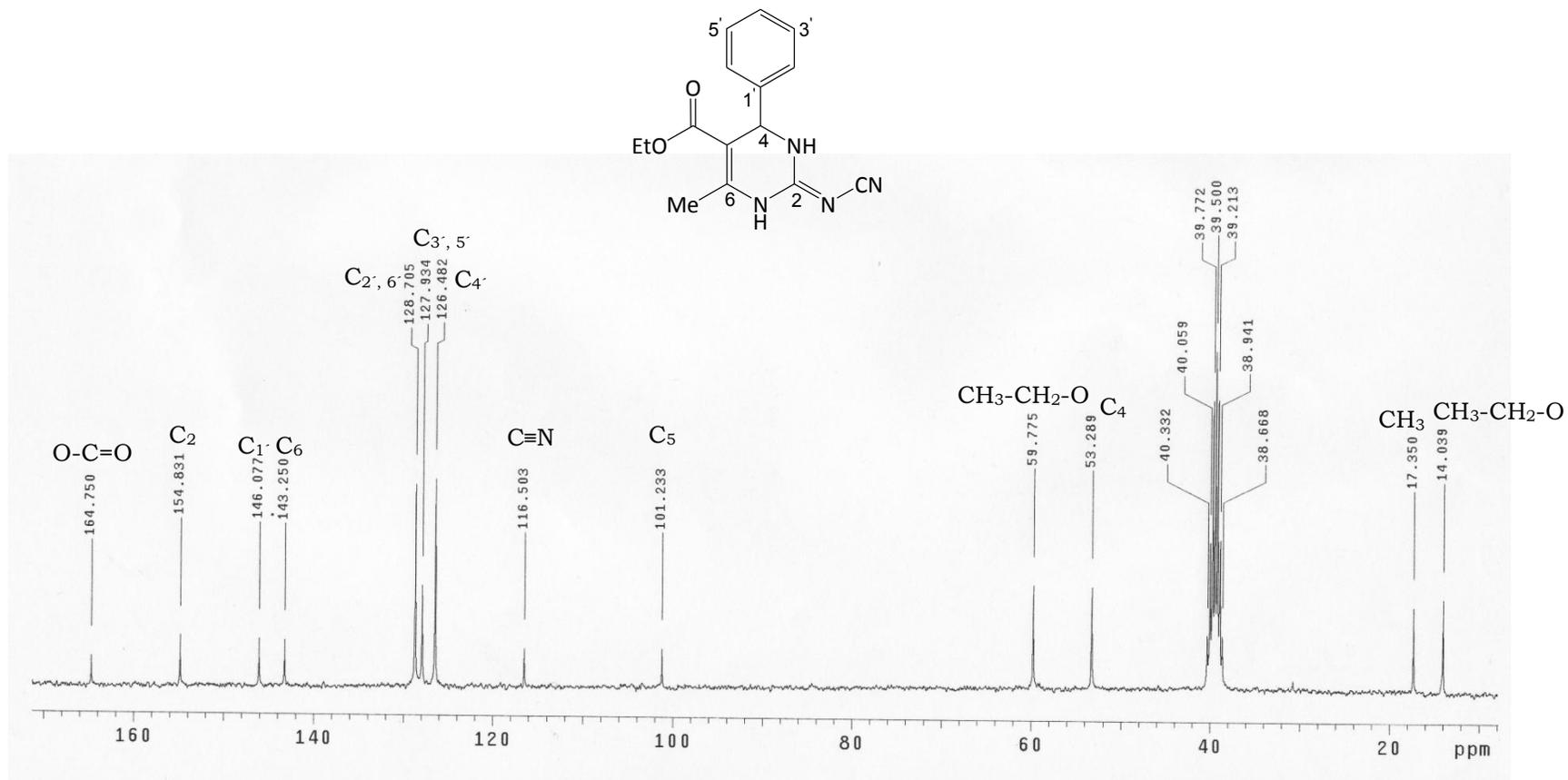
8.29 (dd,  $J = 9.0, 2.7$  Hz, 1H), 8.97 (bs, 1H), 10.28 (bs, 1H); **RMN  $C^{13}$**  (75 MHz, DMSO- $d_6$ /TMS):  $\delta$  13.6, 17.1, 51.1, 59.5, 97.7, 115.7 (t,  $^1J_{CF} = 257.3$  Hz), 116.1, 117.0, 125.2, 125.9, 133.6, 143.1, 147.2, 153.9, 154.1, 164.1; **IR** (KBr) 1641 (C=N), 1679 (C=O), 2174 (C $\equiv$ N), (3297)  $cm^{-1}$ ; **EM**  $m/z$  395; HRMS (IE, 70 eV): Encontrado 395.1041; Calculado para  $C_{16}H_{15}O_5N_5F_2$ : 395.1041.

## **13.- APÉNDICE B**

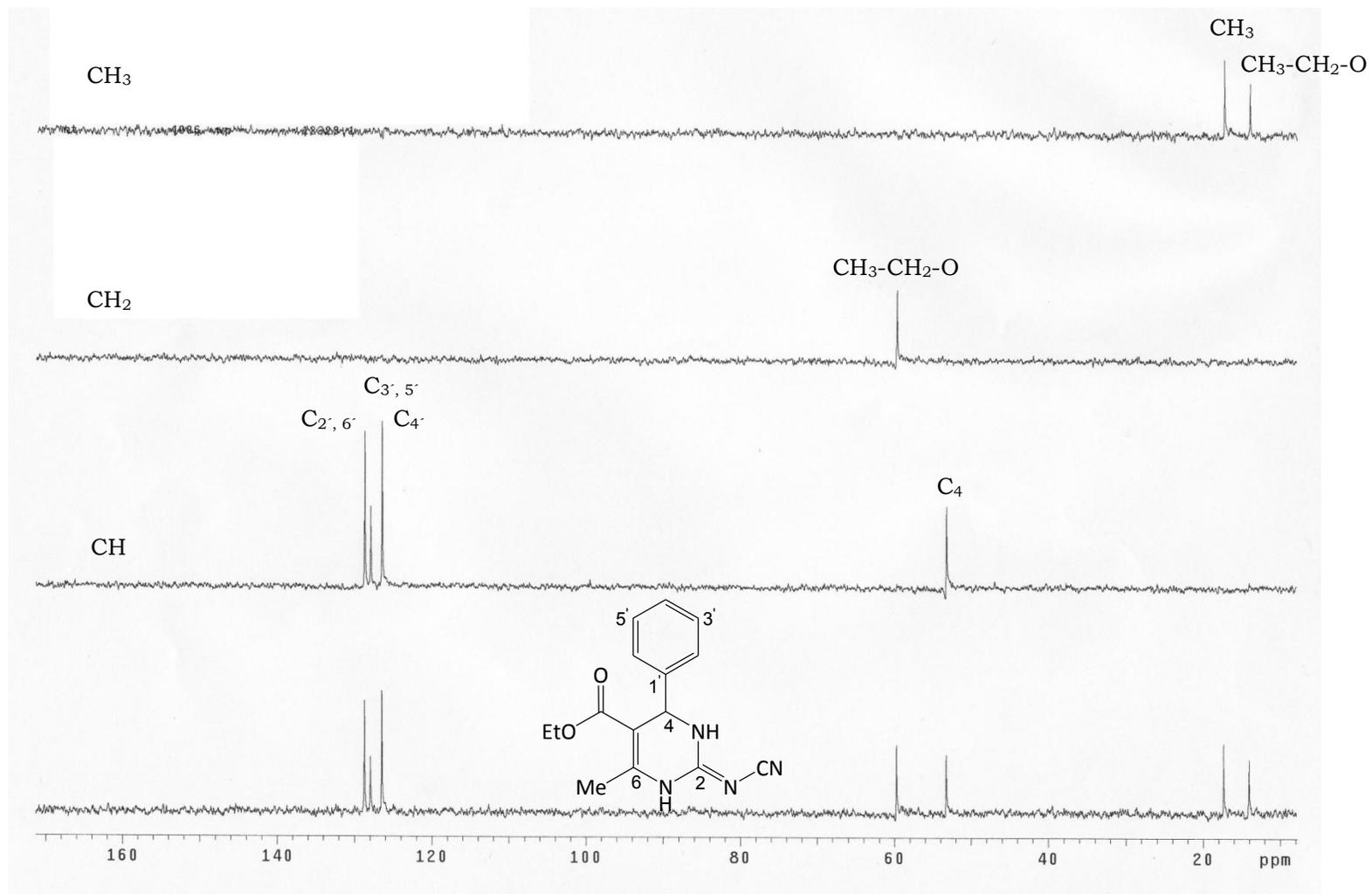
**Espectro 1.** Espectro de RMN H<sup>1</sup> a 300 MHz en DMSO-d<sub>6</sub>/TMS del compuesto 2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-fenil-3, 4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM 1).



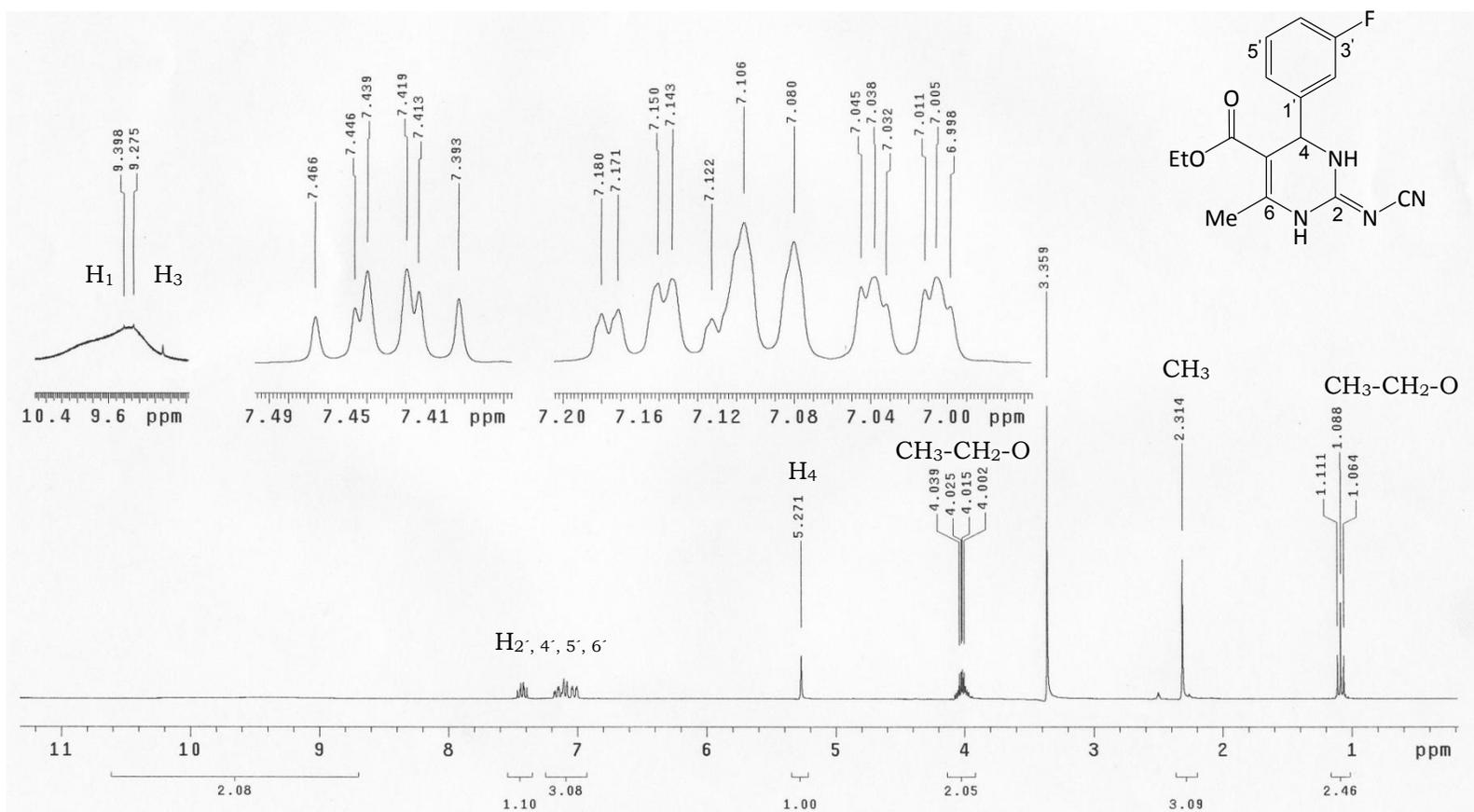
**Espectro 2.** Espectro de RMN C<sup>13</sup> a 75 MHz en DMSO-d<sub>6</sub>/TMS del compuesto 2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-fenil-3, 4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM 1).



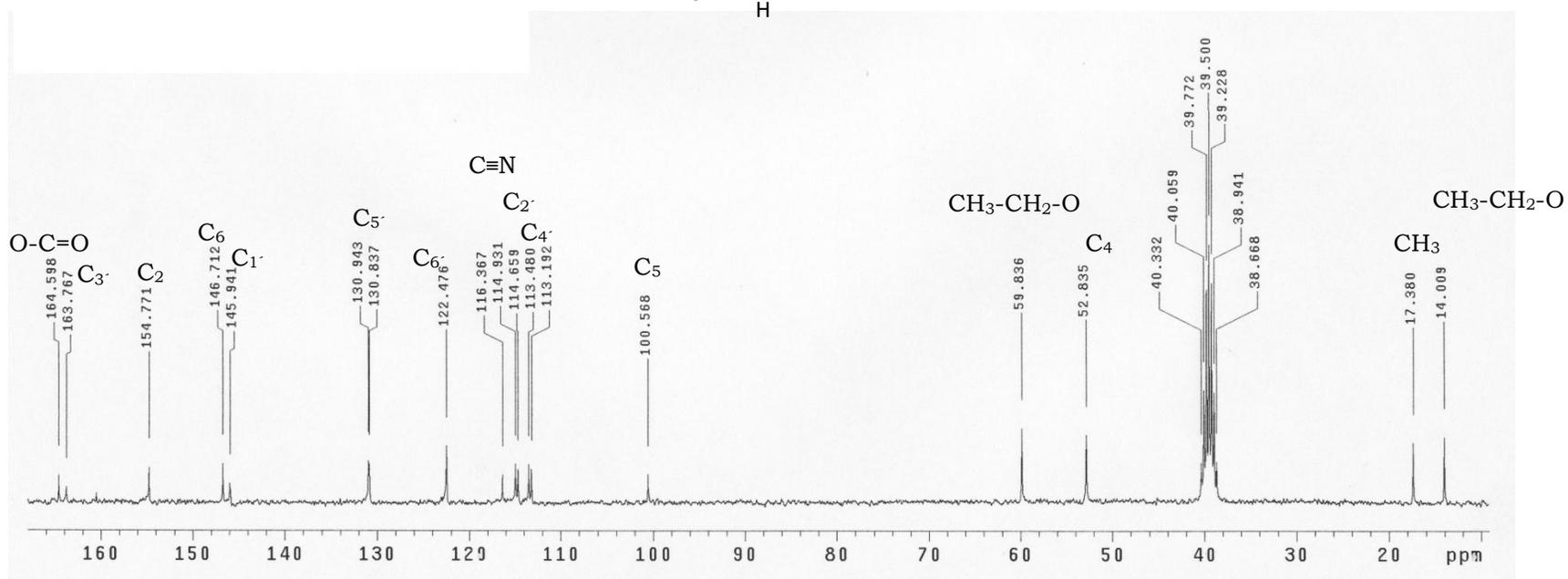
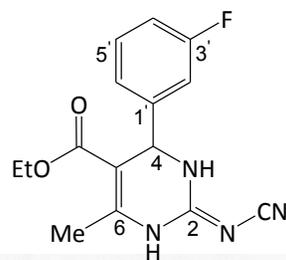
**Espectro 3.** Espectro DEPT del compuesto 2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-fenil-3, 4-dihidro-1*H*-pirimidina (ACIDHPM 1).



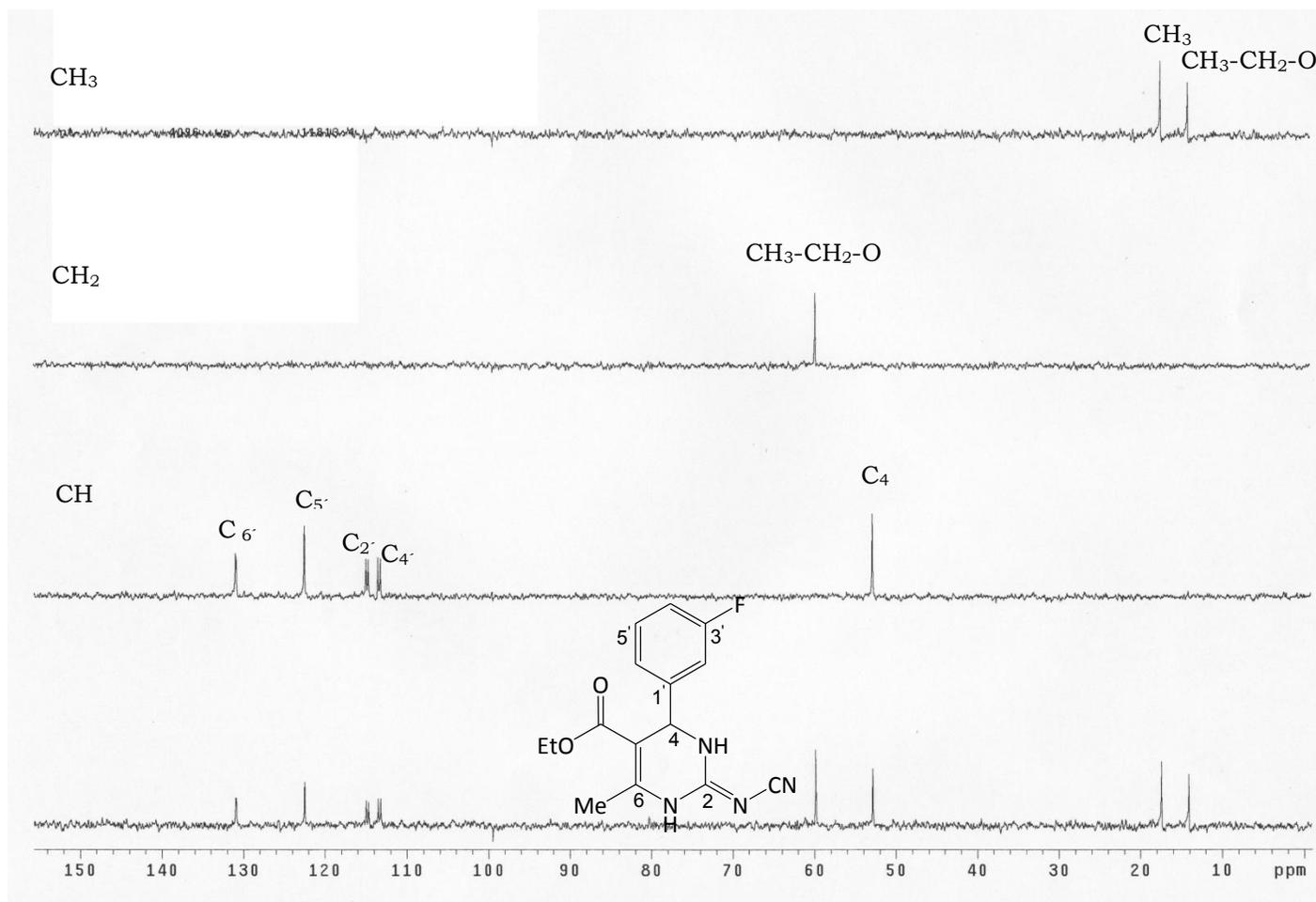
**Espectro 4.** Espectro de RMN H<sup>1</sup> a 300 MHz en DMSO-d<sub>6</sub>/TMS del compuesto 2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(3-fluorofenil)-3, 4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM 2).



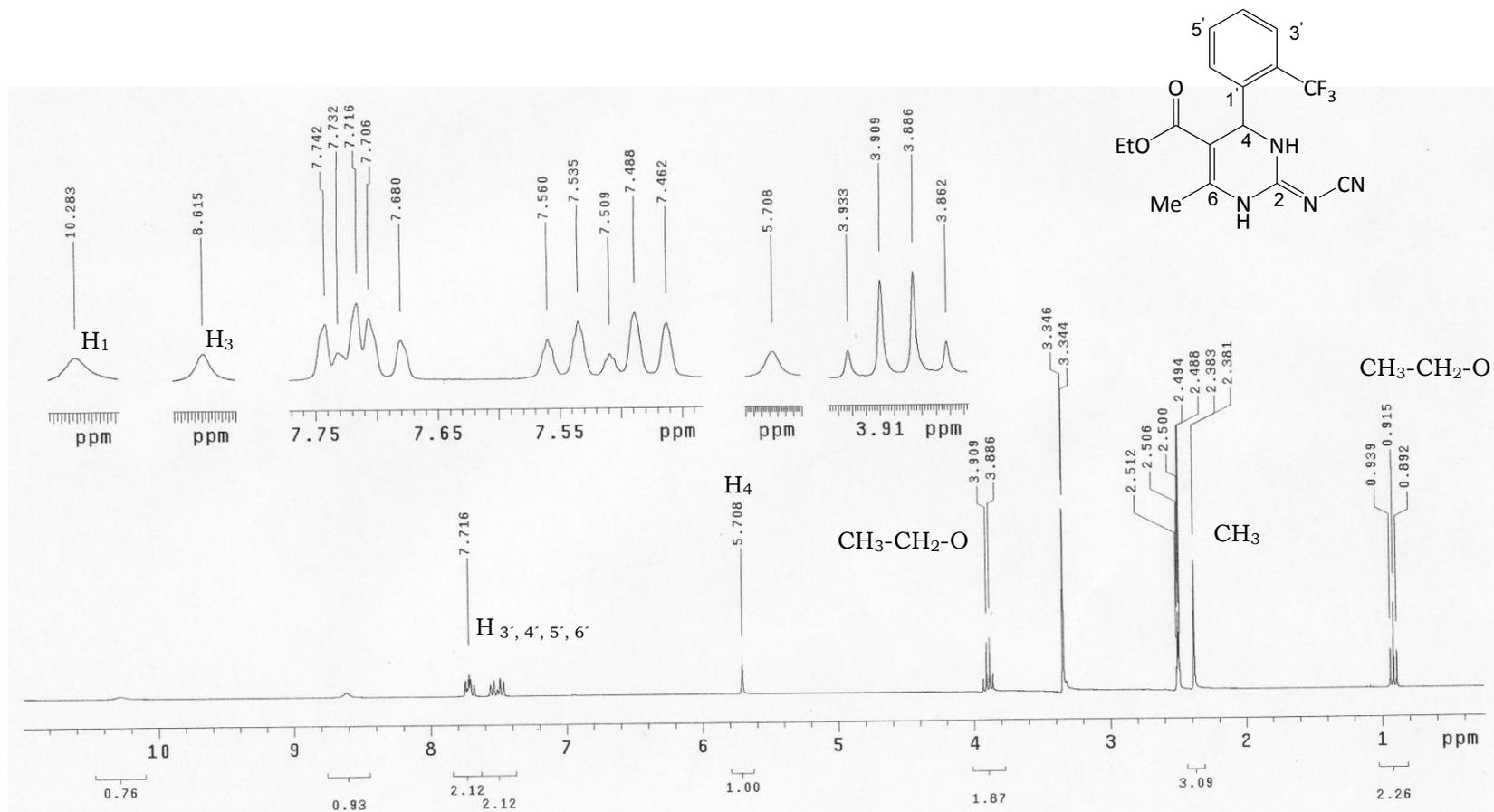
**Espectro 5.** Espectro de RMN  $C^{13}$  a 75 MHz en DMSO- $d_6$ /TMS del compuesto 2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(3-fluorofenil)-3, 4-dihidro-1*H*-pirimidina (ACIDHPM 2).



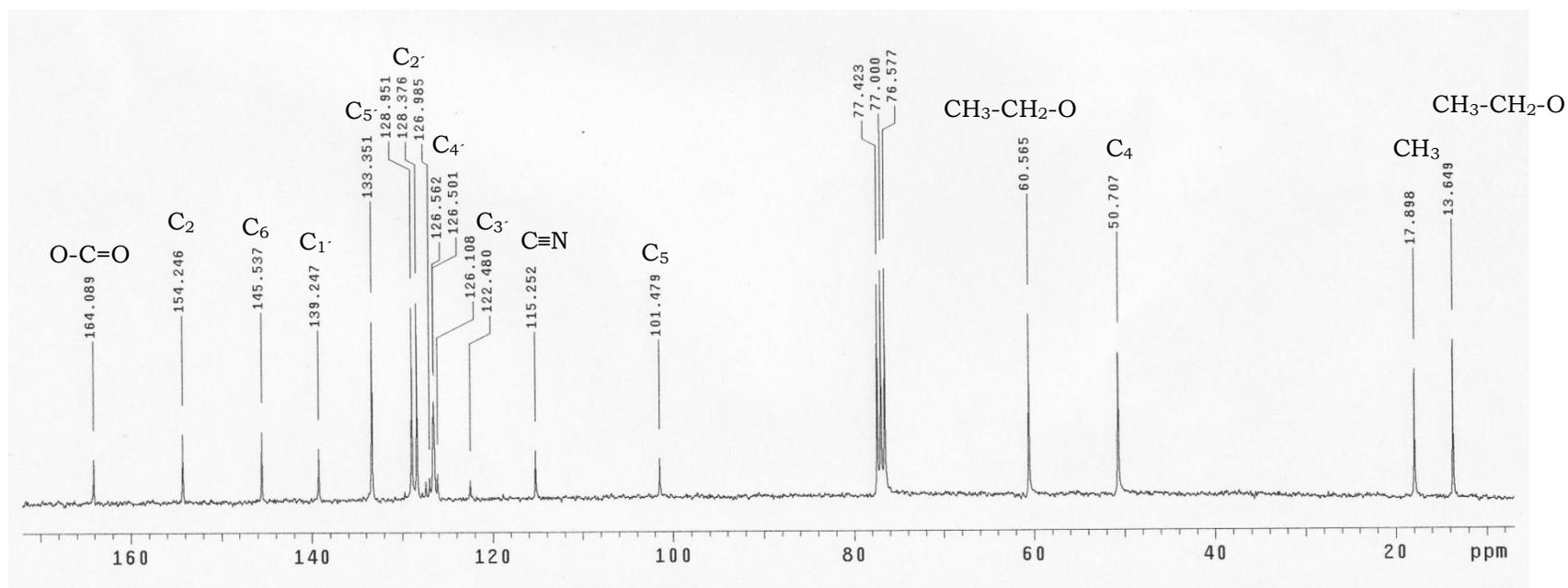
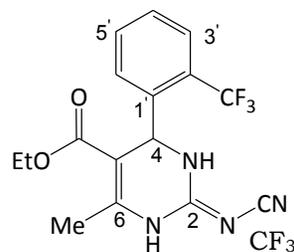
**Espectro 6.** Espectro DEPT del compuesto 2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(3-fluorofenil)-3, 4-dihidro-1*H*-pirimidina (ACIDHPM 2).



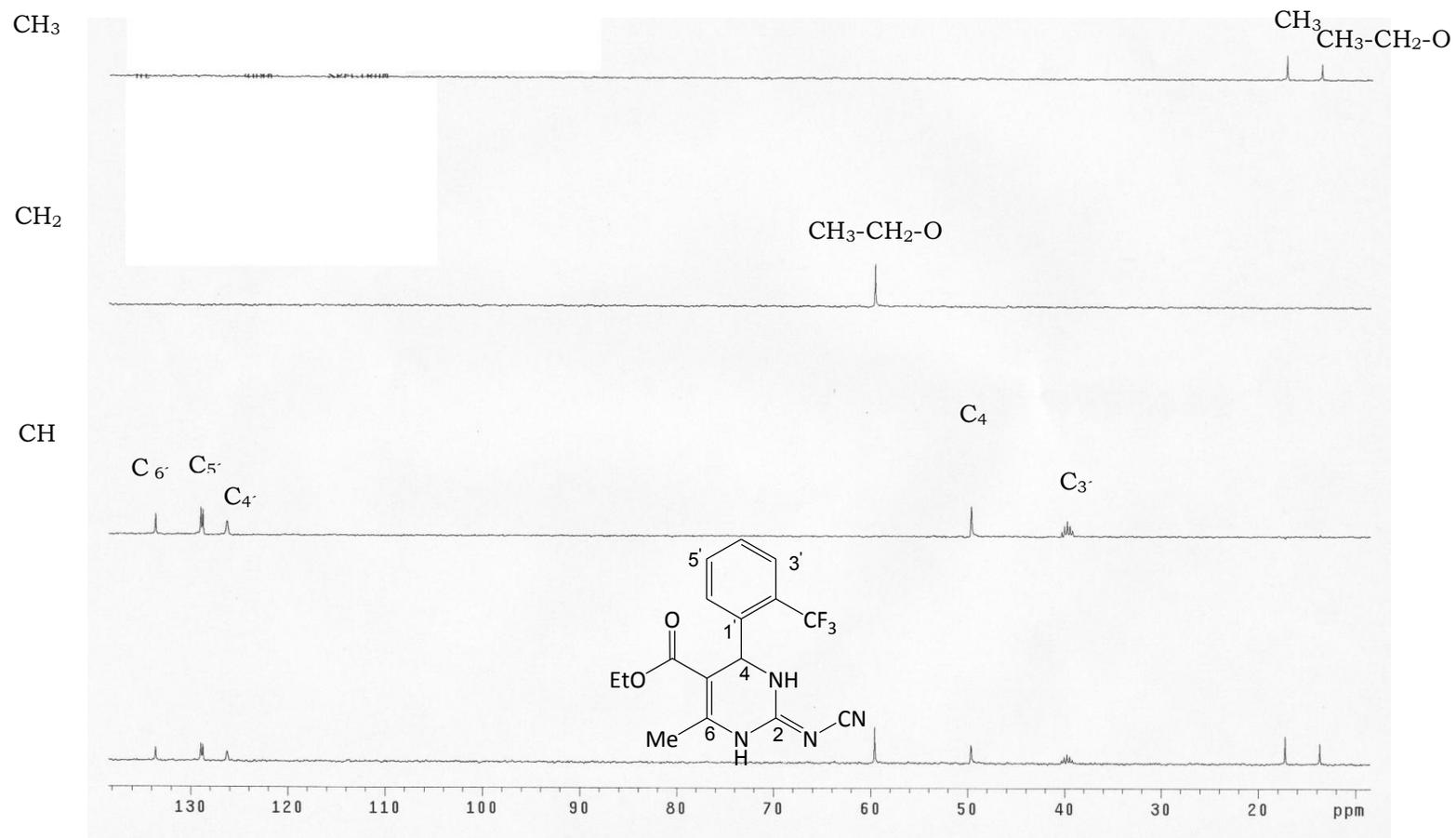
**Espectro 7.** Espectro de RMN H<sup>1</sup> a 300 MHz en DMSO-d<sub>6</sub>/TMS del compuesto 2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(2-trifluorometilfenil)-3,4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM **3**).



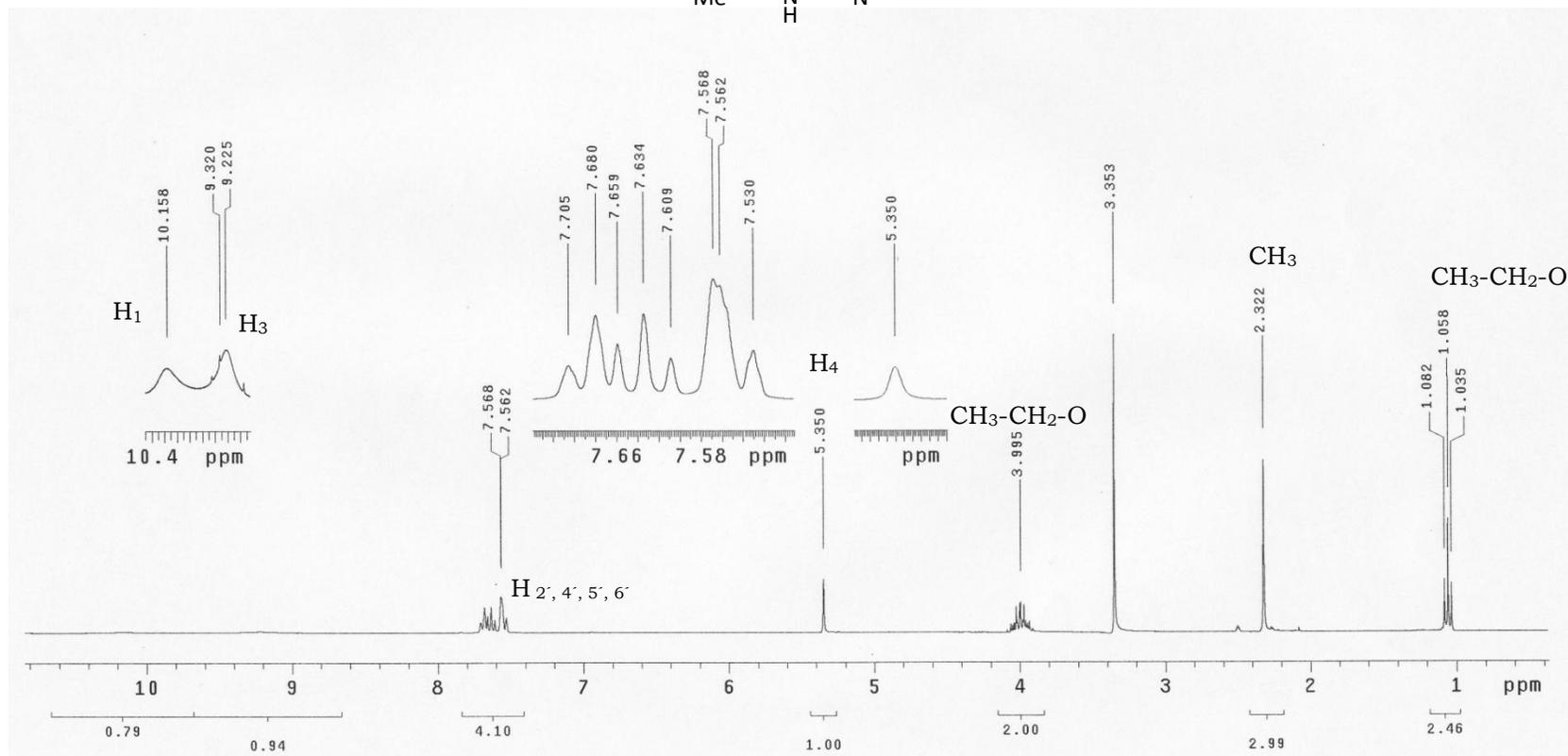
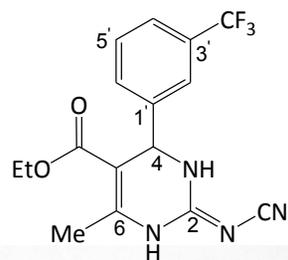
**Espectro 8.** Espectro de RMN  $C^{13}$  a 75 MHz en  $DMSO-d_6/TMS$  del compuesto 2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(2-trifluorometilfenil)-3,4-dihidro-1*H*-pirimidina (ACIDHPM **3**).



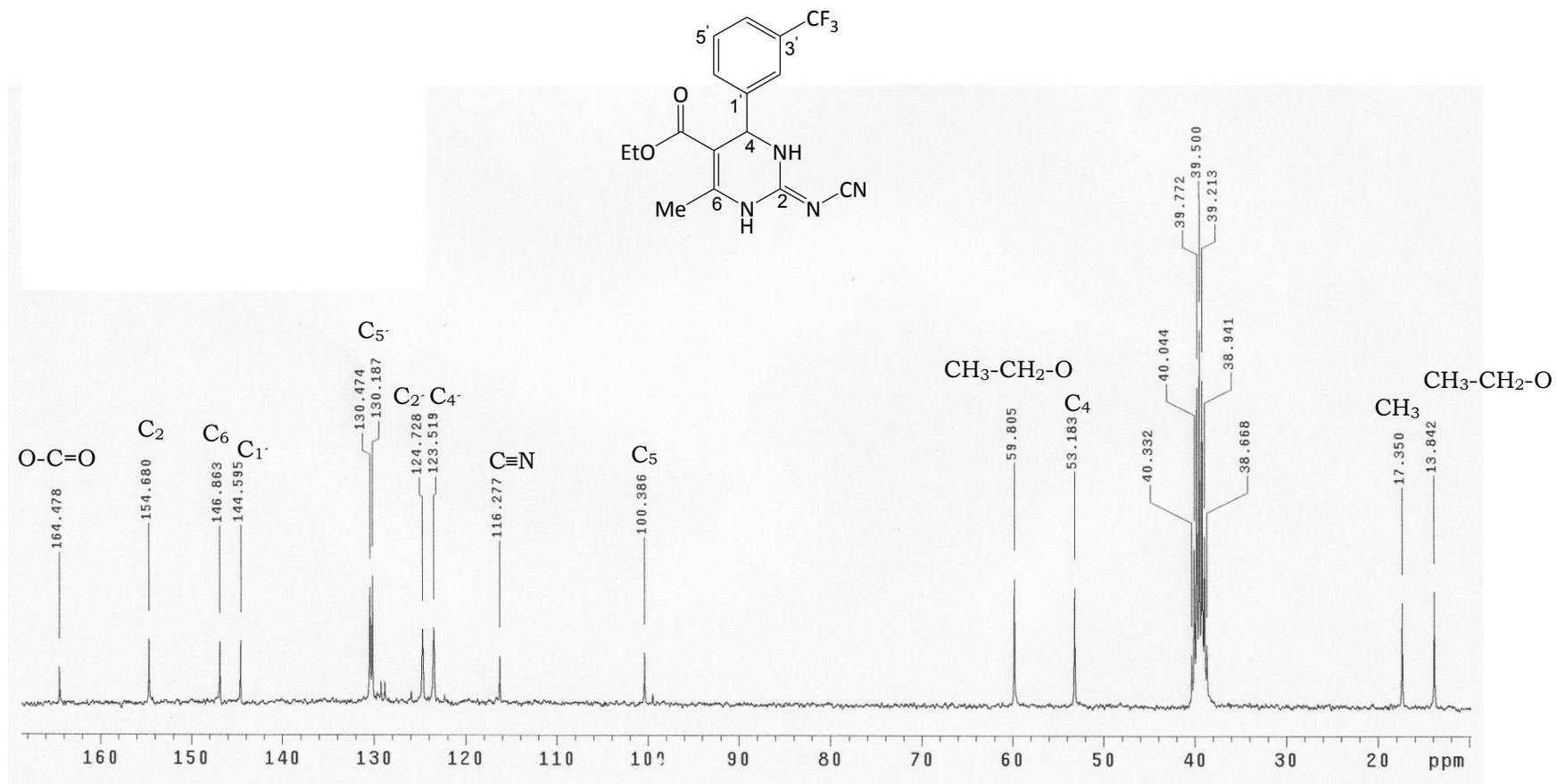
**Espectro 9.** Espectro DEPT del compuesto 2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(2-trifluorometilfenil)-3,4-dihidro-1*H*-pirimidina (ACIDHPM 3).



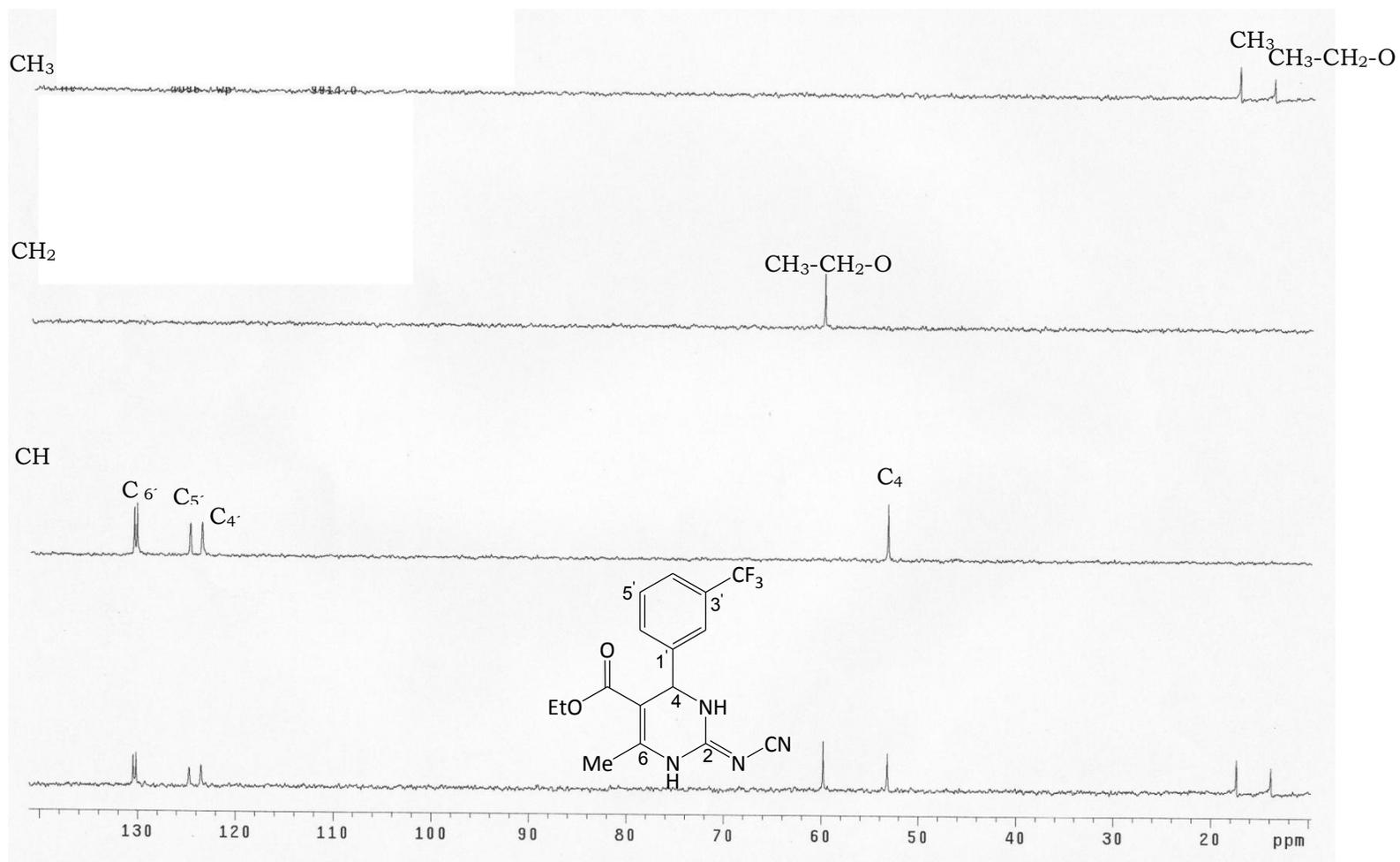
**Espectro 10.** Espectro de RMN H<sup>1</sup> a 300 MHz en DMSO-d<sub>6</sub>/TMS del compuesto 2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(3-trifluorometilfenil)-3,4-dihidro-1*H*-pirimidina (ACIDHPM 4).



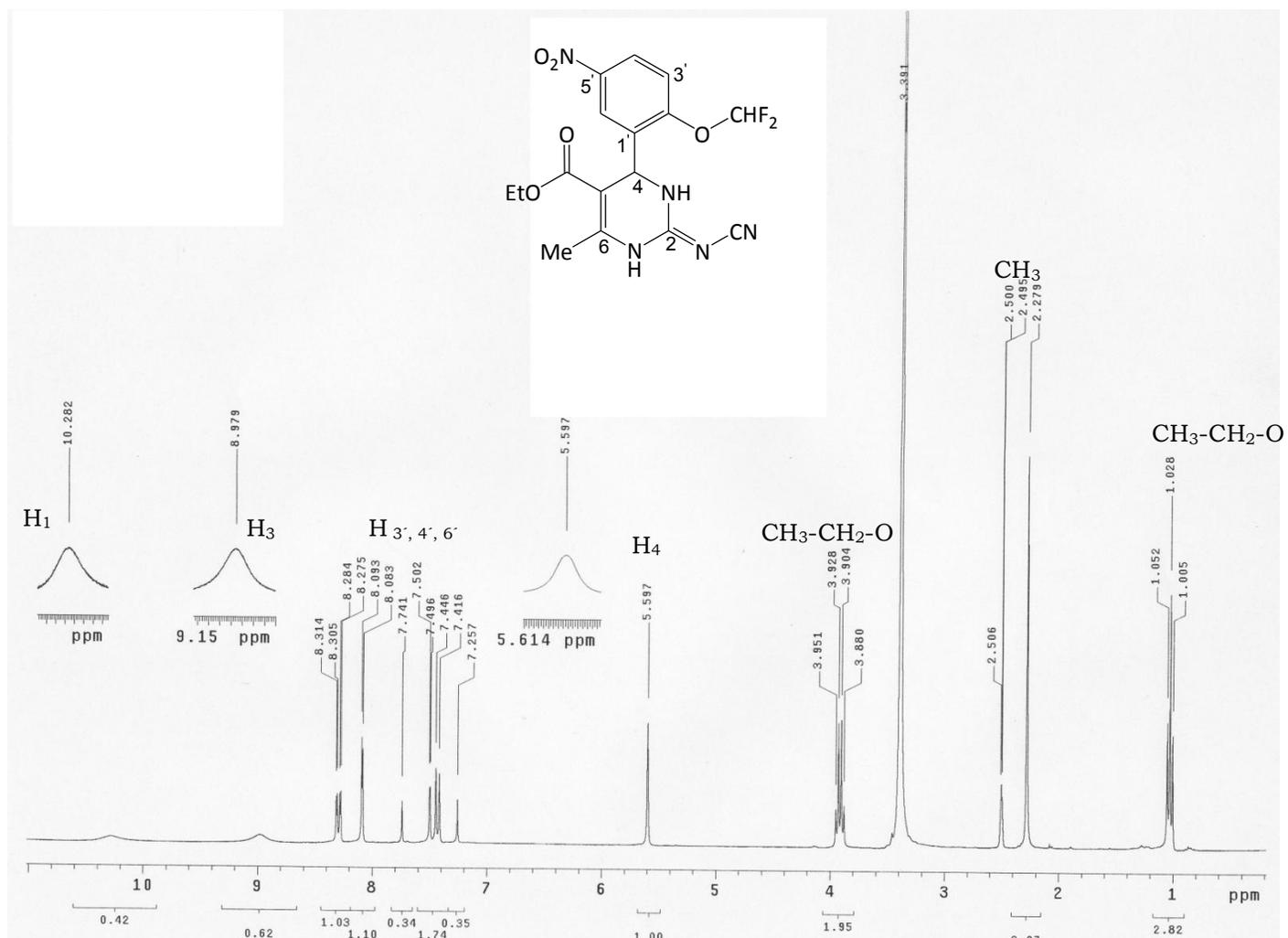
**Espectro 11.** Espectro de RMN  $C^{13}$  a 75 MHz en DMSO- $d_6$ /TMS del compuesto 2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(3-trifluorometilfenil)-3,4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM 4).



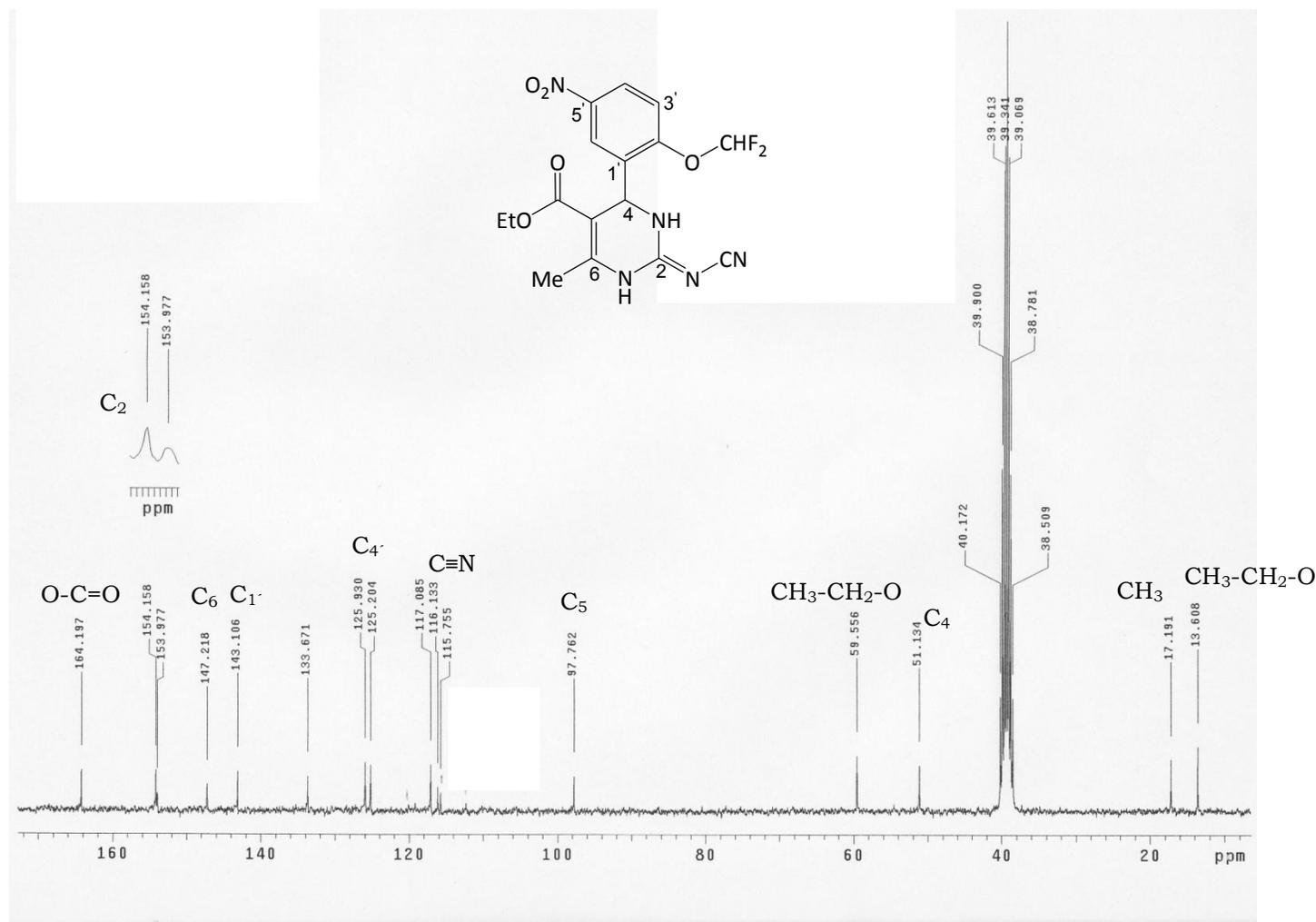
**Espectro 12.** Espectro DEPT del compuesto 2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(3-trifluorometilfenil)-3,4-dihidro-1*H*-pirimidina (ACIDHPM 4).



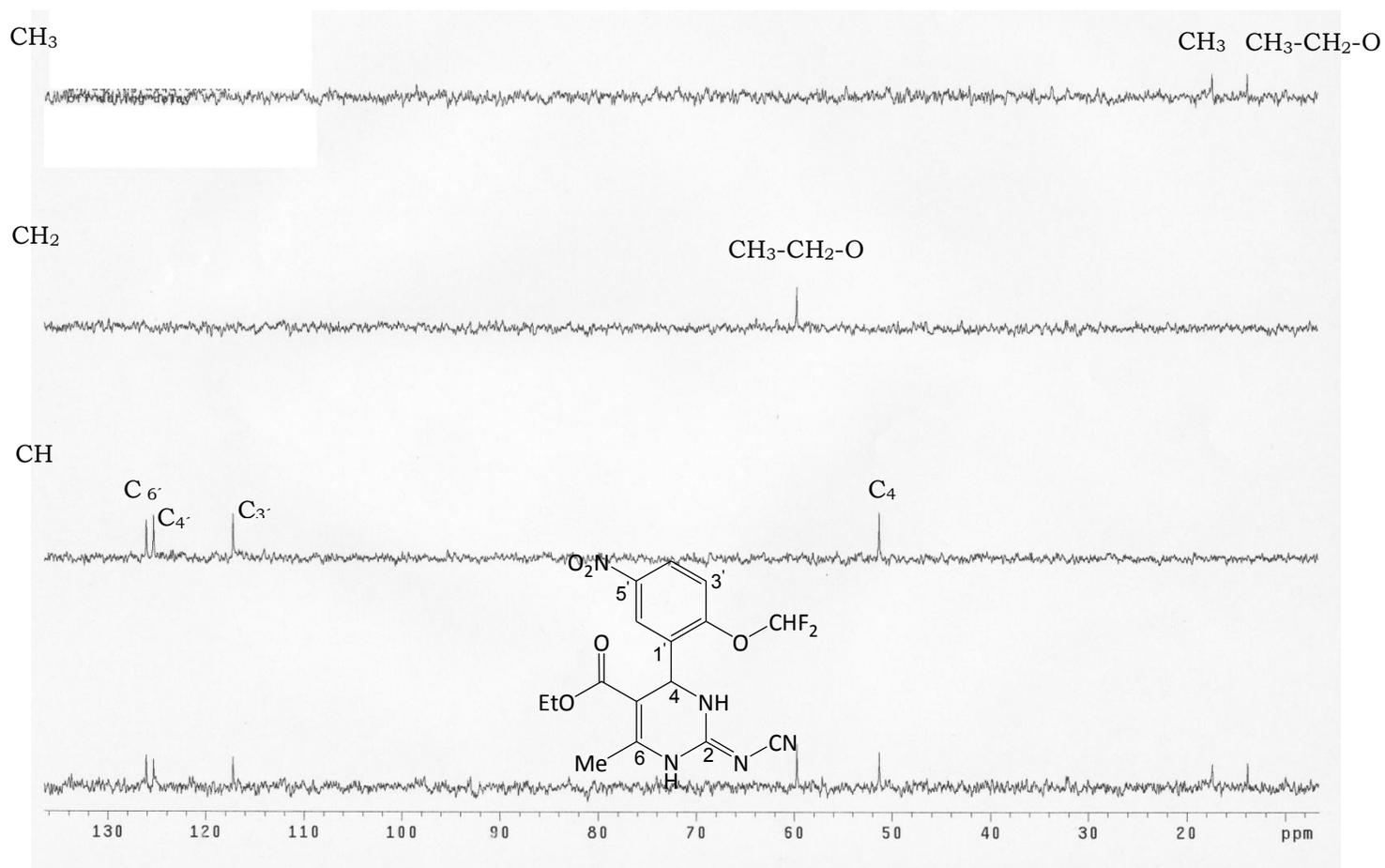
**Espectro 13.** Espectro de RMN H<sup>1</sup> a 300 MHz en DMSO-d<sub>6</sub>/TMS del compuesto 2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(2-difluorometoxi-5-nitrofenil)-3,4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM 5).



**Espectro 14.** Espectro de RMN C<sup>13</sup> a 75 MHz en DMSO-d<sub>6</sub>/TMS del compuesto 2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(2-difluorometoxi-5-nitrofenil)-3,4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM 5).

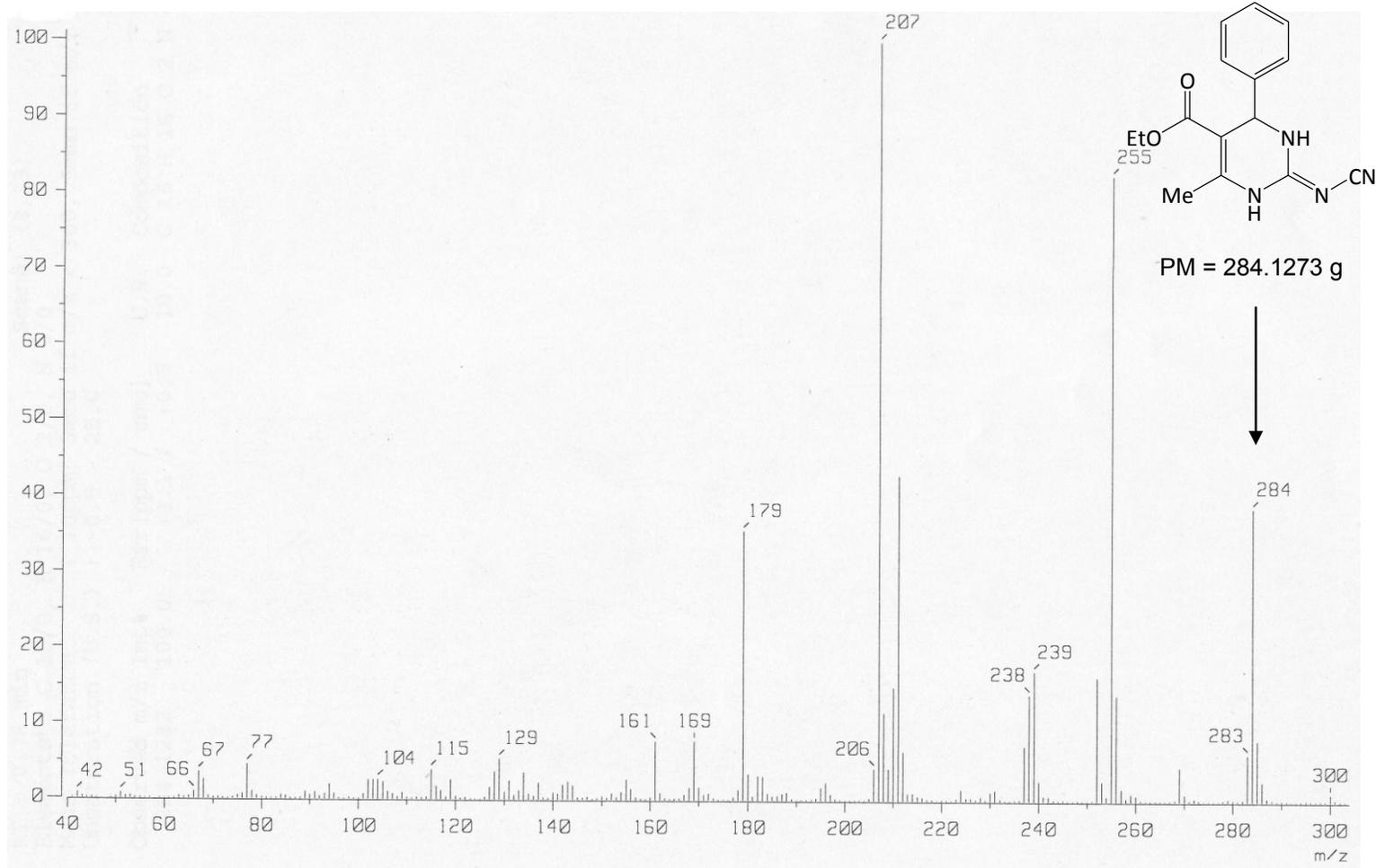


**Espectro 15.** Espectro DEPT del compuesto 2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(2-difluorometoxi-5-nitrofenil)-3,4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM 5).

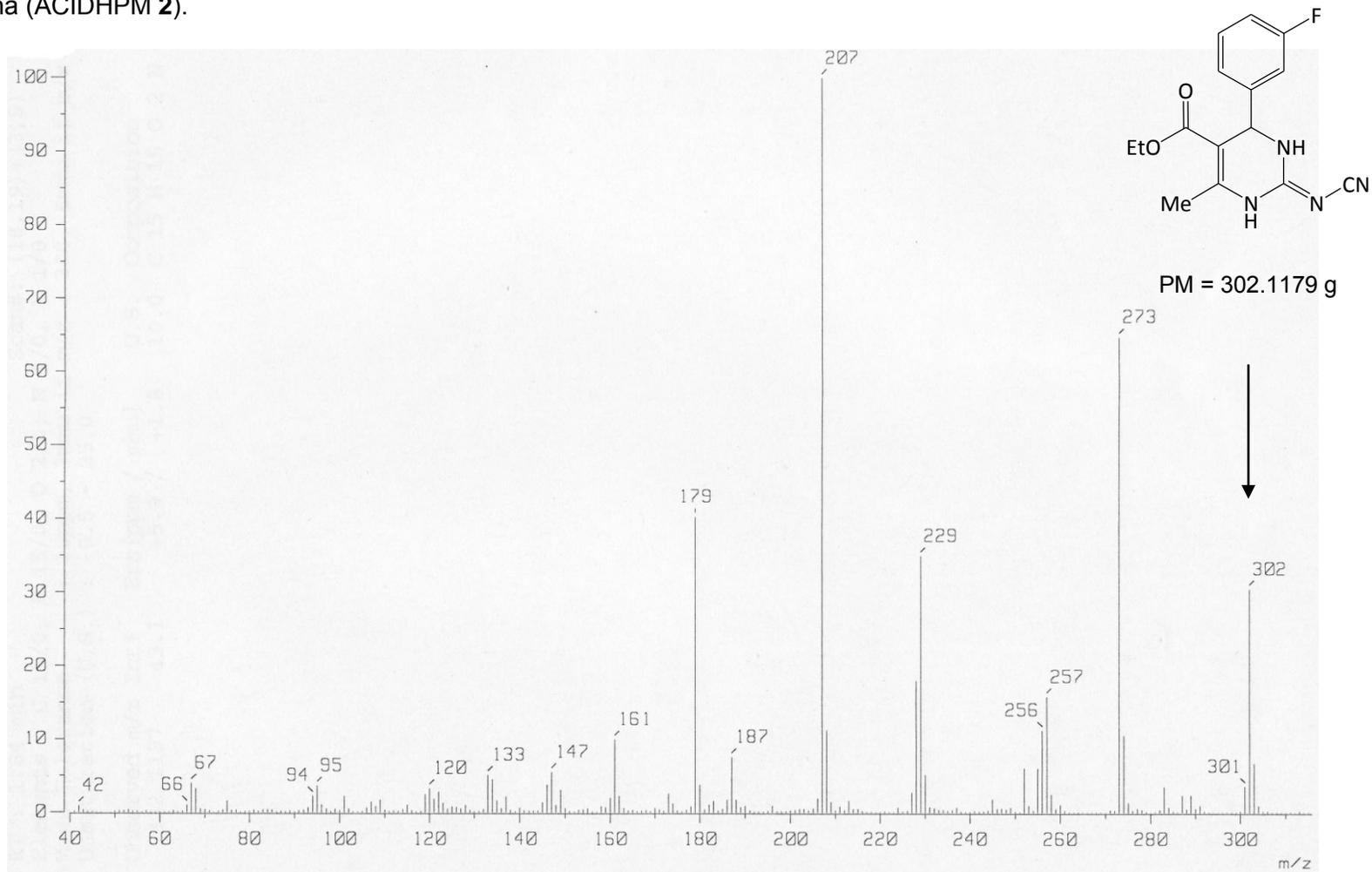


## ***14.- APÉNDICE C***

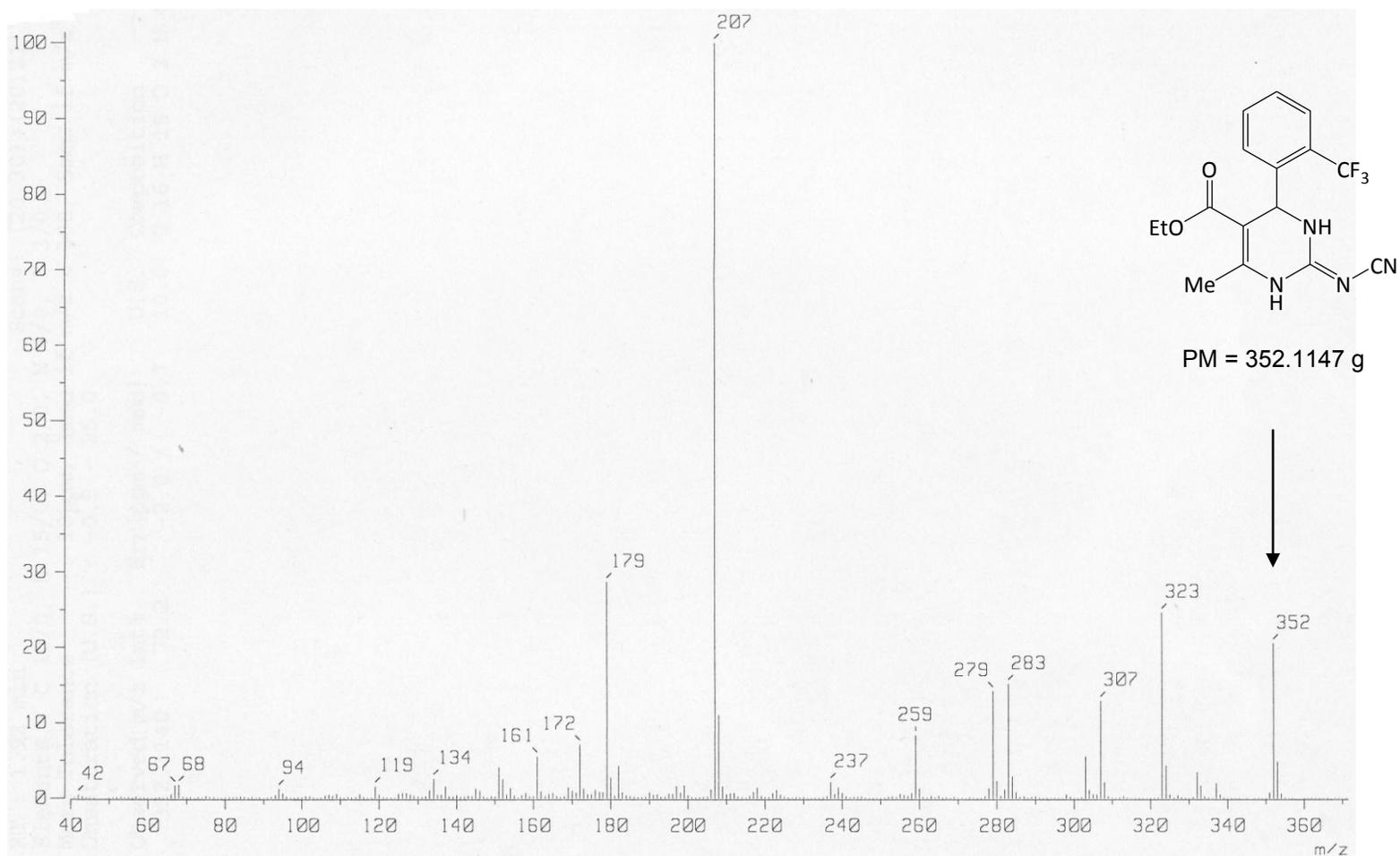
**Espectro 16.** Espectro de Masas obtenido por IE del compuesto 2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-fenil-3,4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM 1).



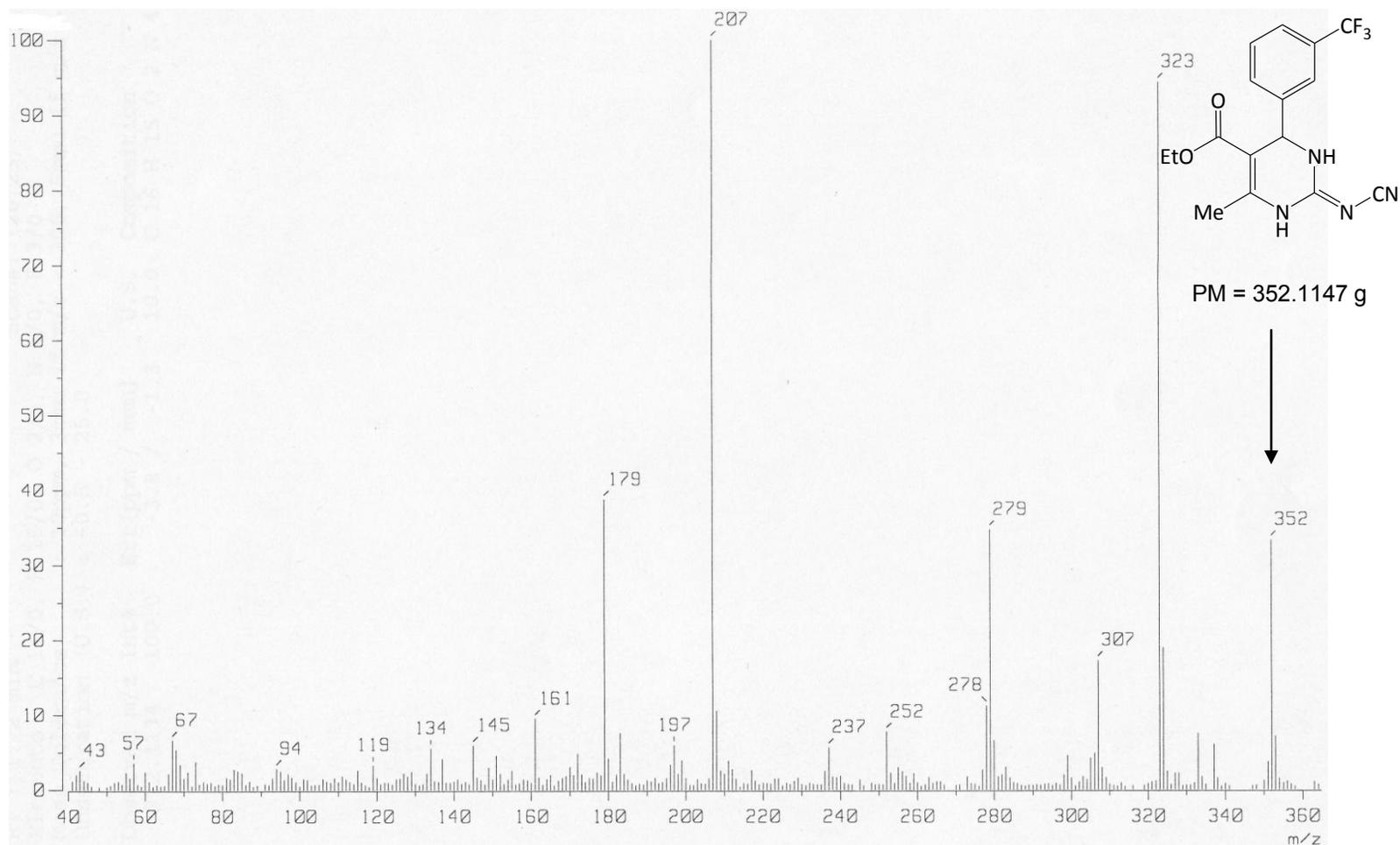
**Espectro 17.** Espectro de Masas obtenido por IE del compuesto 2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(3-fluorofenil)-3,4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM 2).



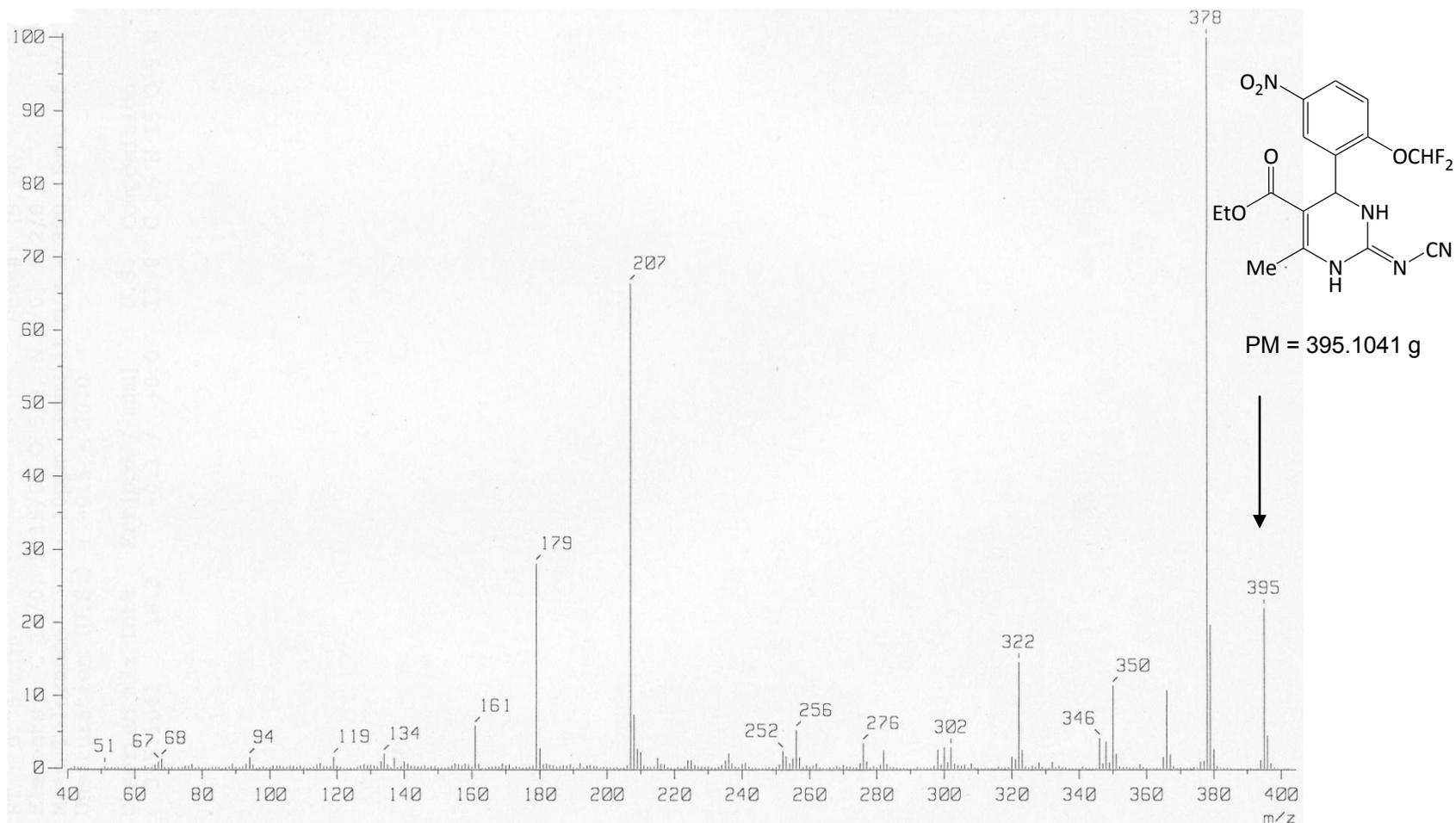
**Espectro 18.** Espectro de Masas obtenido por IE del compuesto 2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(2-trifluorometilfenil)-3,4-dihidro-1H-pirimidina (ACIDHPM 3).



**Espectro 19.** Espectro de Masas obtenido por IE del compuesto 2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(3-trifluorometilfenil)-3,4-dihidro-1*H*-pirimidina (ACIDHPM 4).

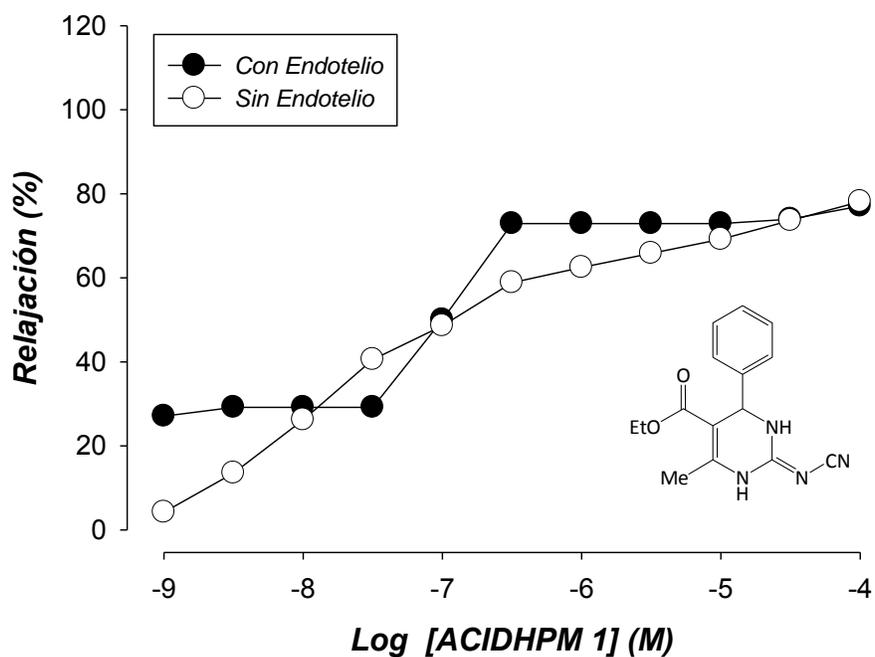


**Espectro 20.** Espectro de Masas obtenido por IE del compuesto 2-cianoimino-5-etoxicarbonil-6-metil-4-(2-difluorometoxi-5-nitrofenil)-3,4-dihidro-1*H*-pirimidina (ACIDHPM 5).

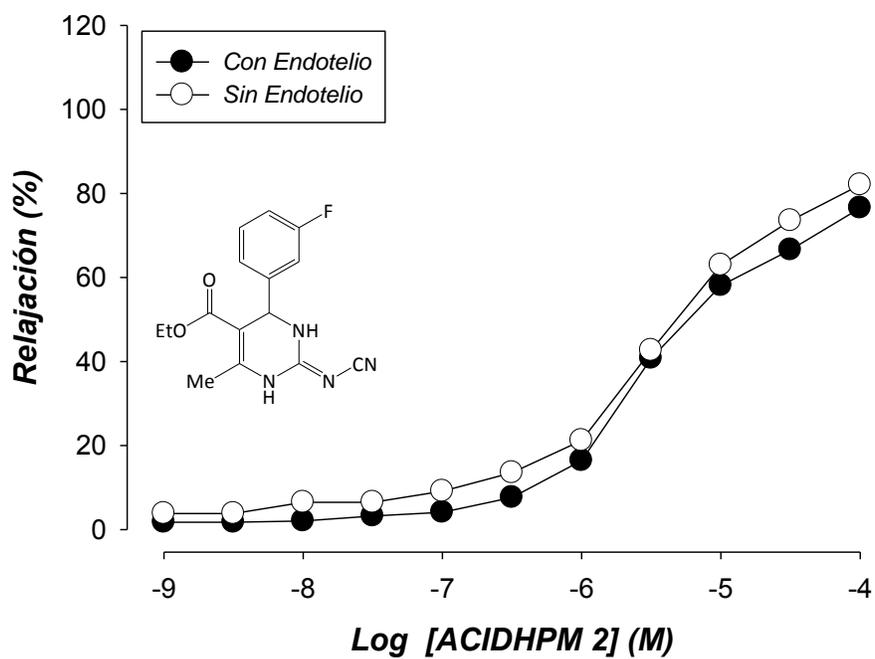


## ***15.- APÉNDICE D***

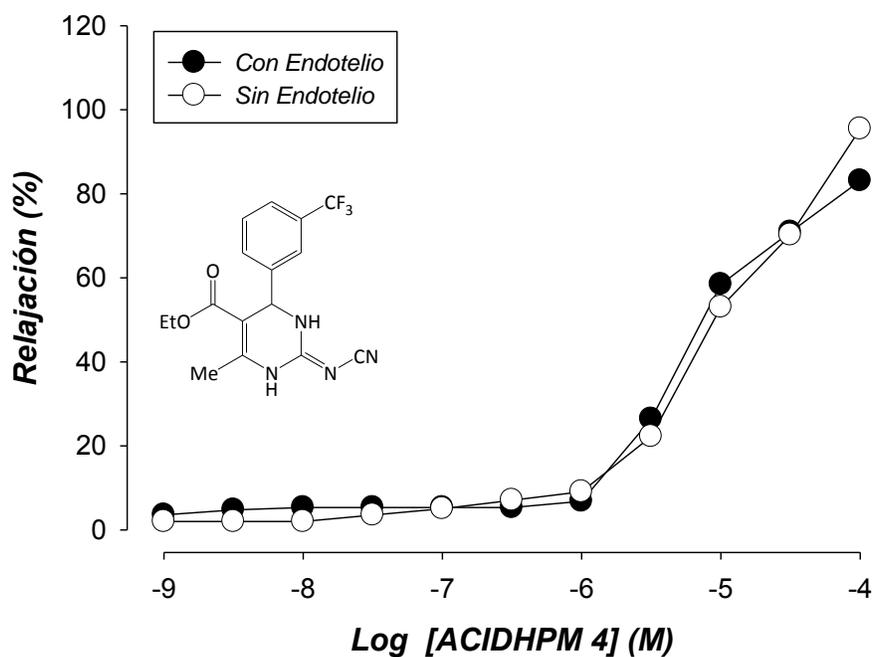
**Gráfica 13.** Curvas concentración-respuesta de la relajación inducida por ACIDHPM 1.



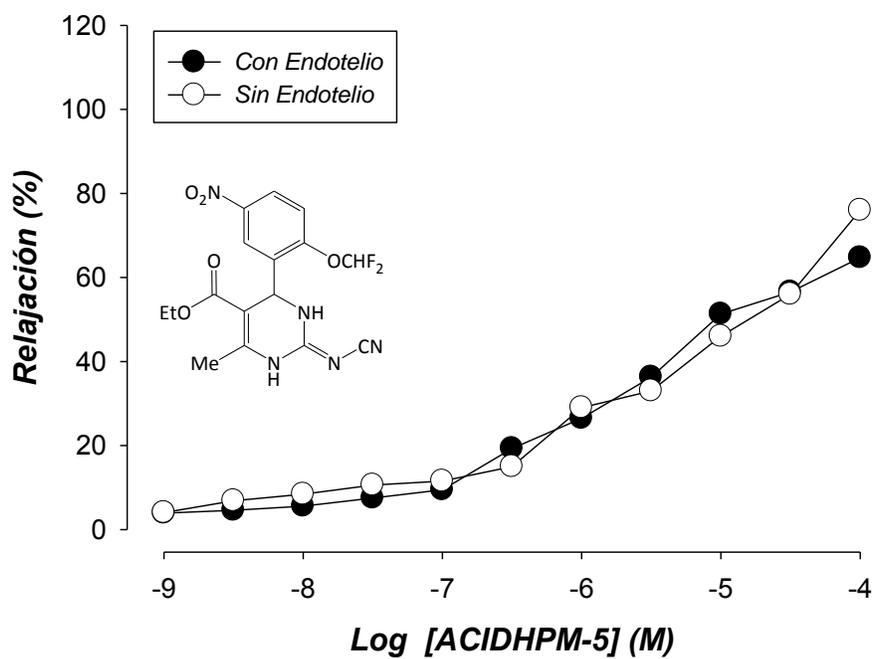
**Gráfica 14.** Curvas concentración-respuesta de la relajación inducida por ACIDHPM 2.



**Gráfica 15.** Curvas concentración-respuesta de la relajación inducida por ACIDHPM 4.

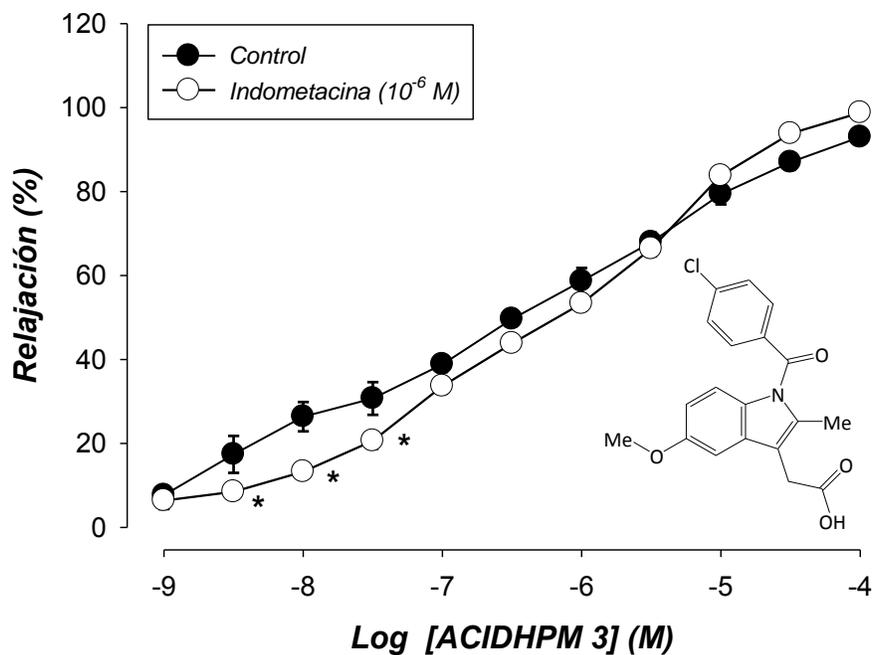


**Gráfica 16.** Curvas concentración-respuesta de la relajación inducida por ACIDHPM 5.

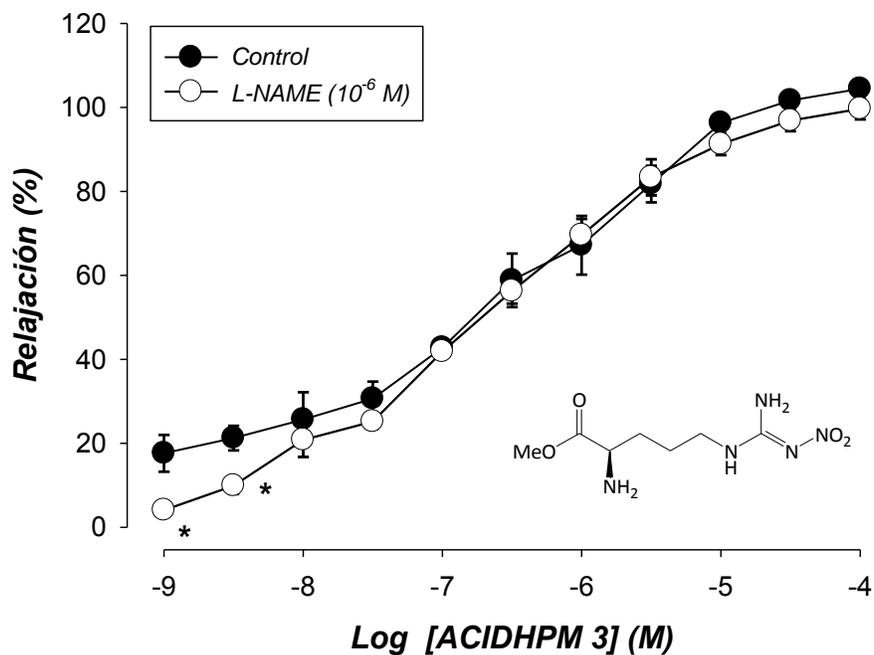


## **16.- APÉNDICE E**

**Gráfica 17.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos SE incubados con Indometacina.

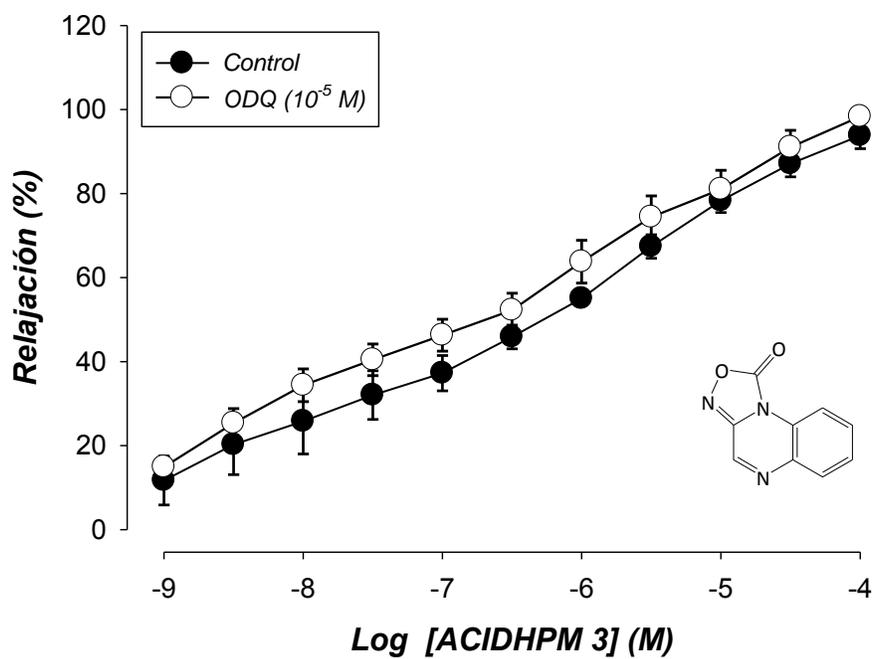


**Gráfica 18.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos CE incubados con L-NAME.



\*P < 0.05 Diferencias significativas entre anillos control y tratados

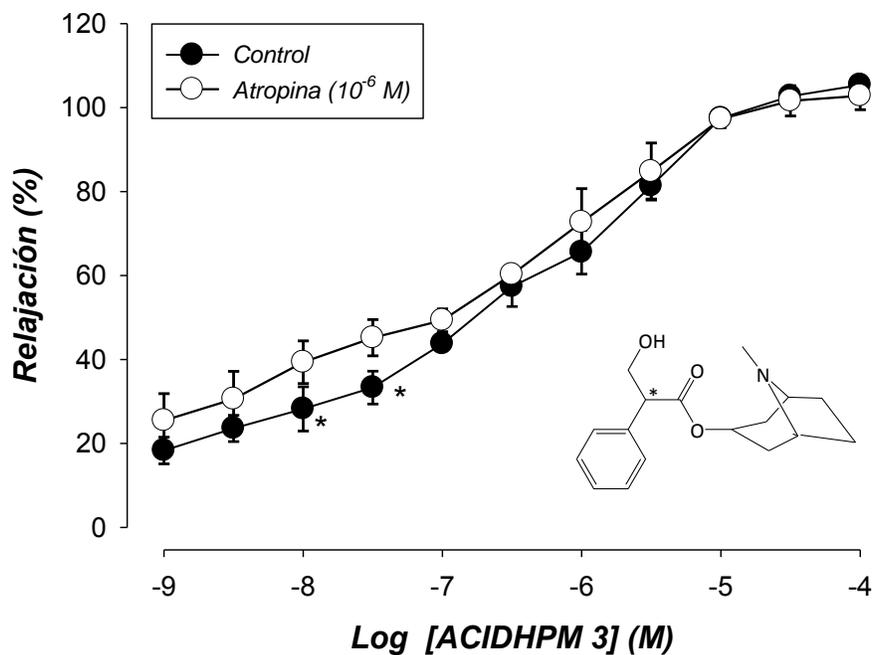
**Gráfica 19.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos SE incubados con ODQ.



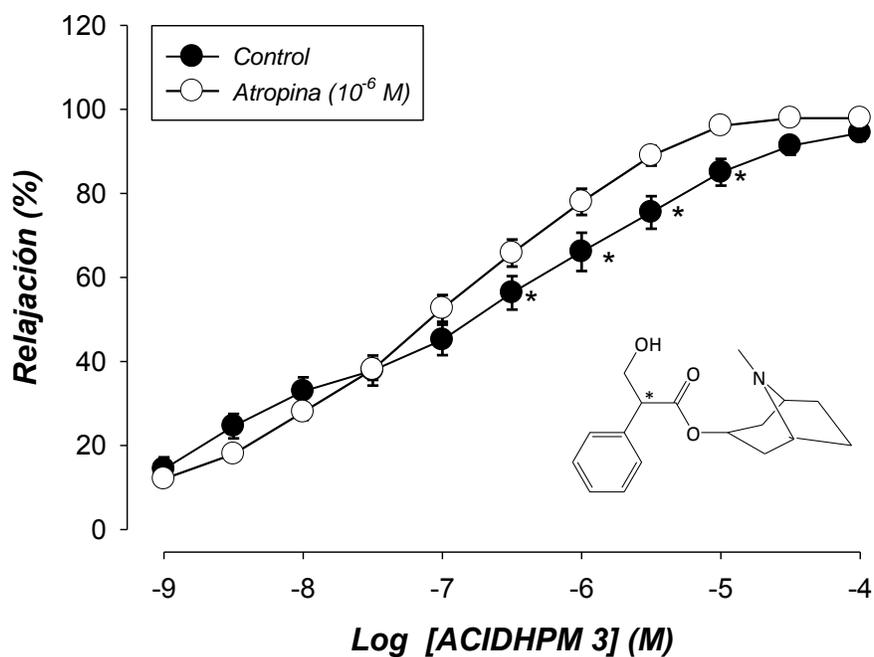
\* $P < 0.05$  Diferencias significativas entre anillos control y tratados

## ***17.- APÉNDICE F***

**Gráfica 20.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos CE incubados con Atropina.

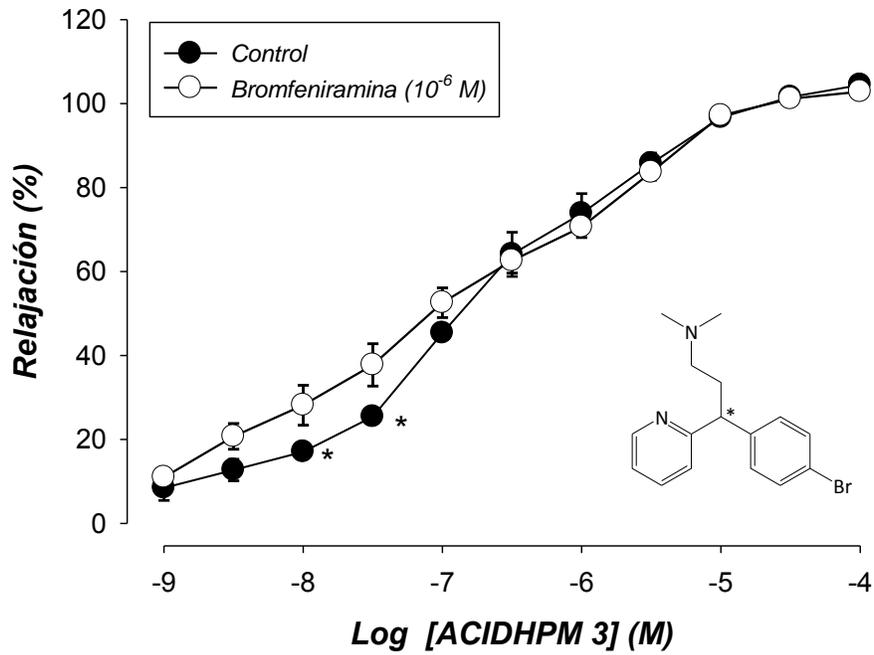


**Gráfica 21.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos SE incubados con Atropina.

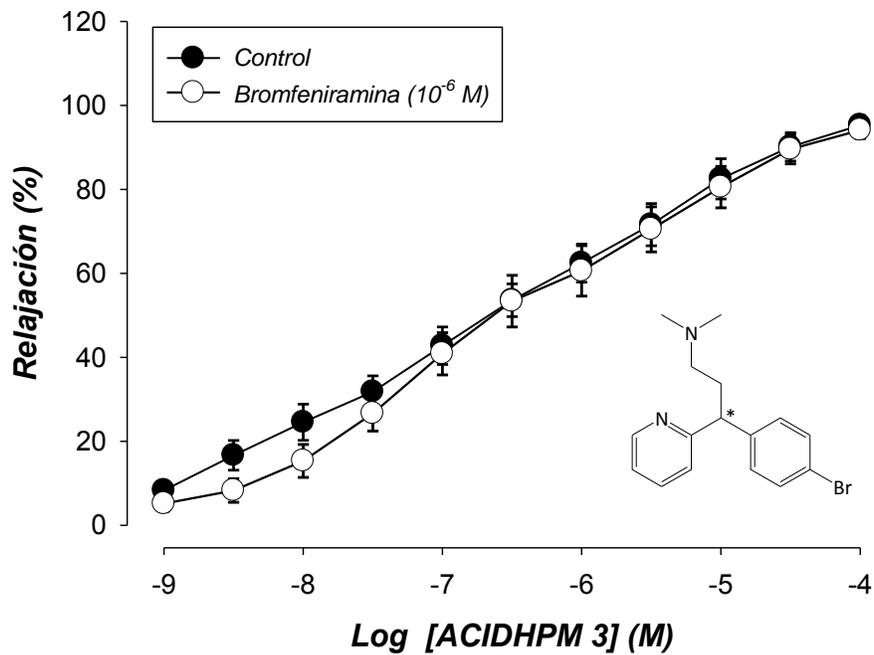


\*P < 0.05 Diferencias significativas entre anillos control y tratados

**Gráfica 22.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos CE incubados con Bromfeniramina.

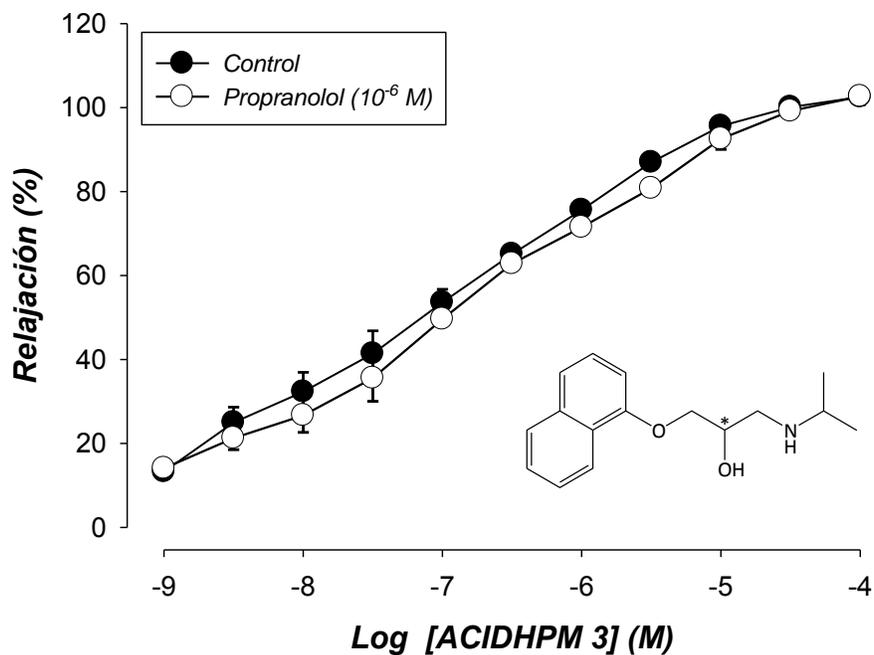


**Gráfica 23.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos SE incubados con Bromfeniramina.

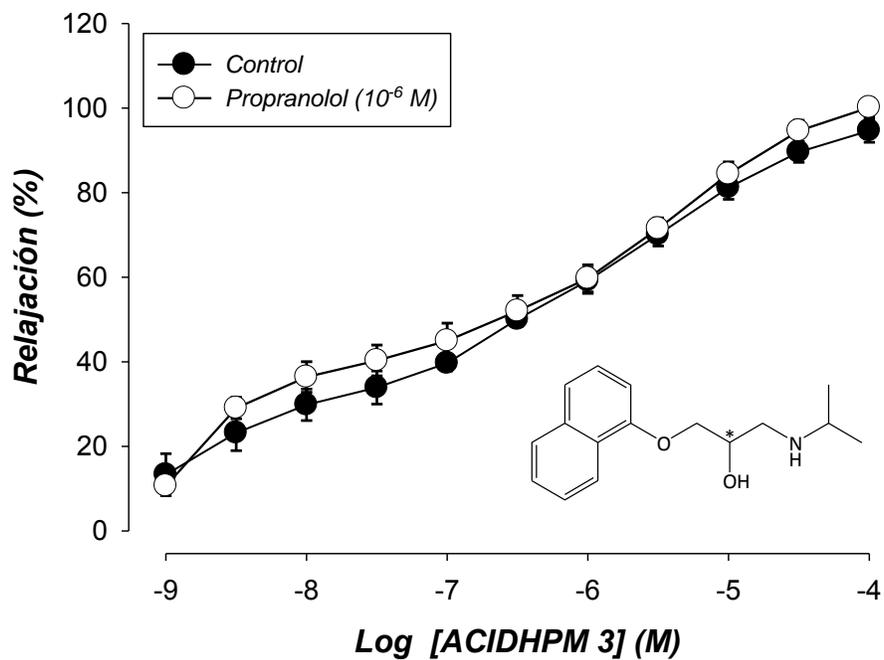


\*P < 0.05 Diferencias significativas entre anillos control y tratados

**Gráfica 24.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos CE incubados con Propranolol.

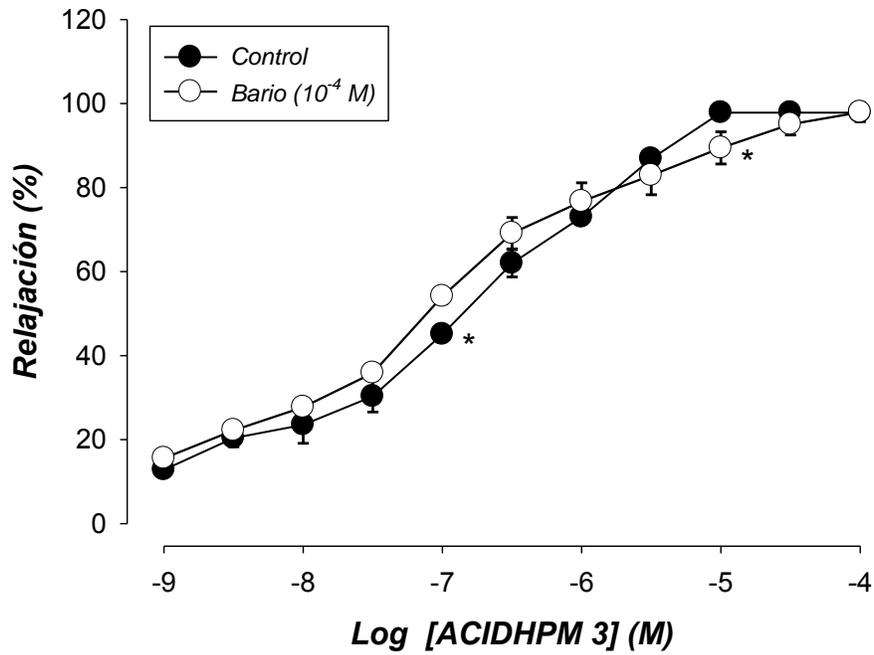


**Gráfica 25.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos SE incubados con Propranolol.

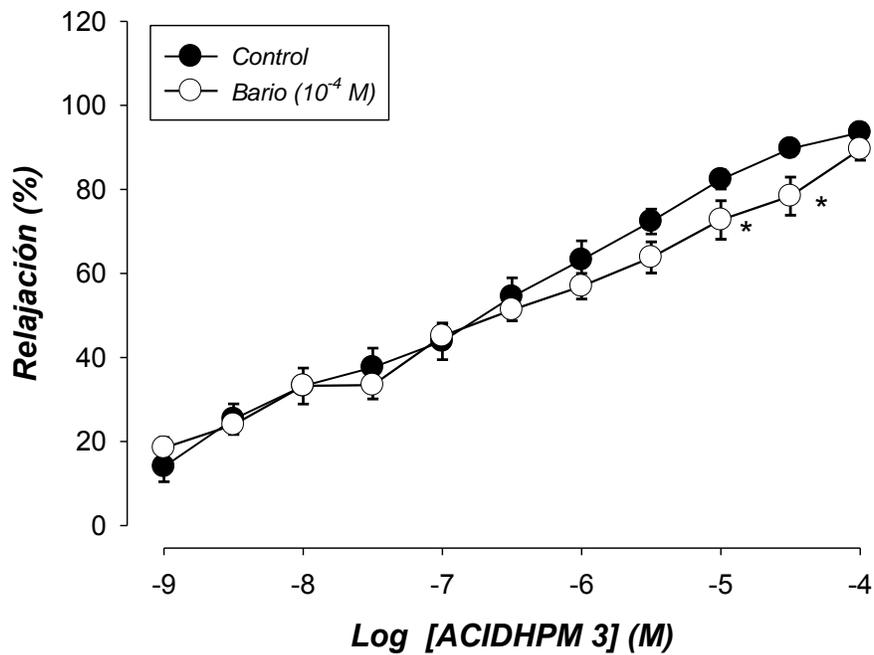


## **18.- APÉNDICE G**

**Gráfica 26.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos CE incubados con Bario.

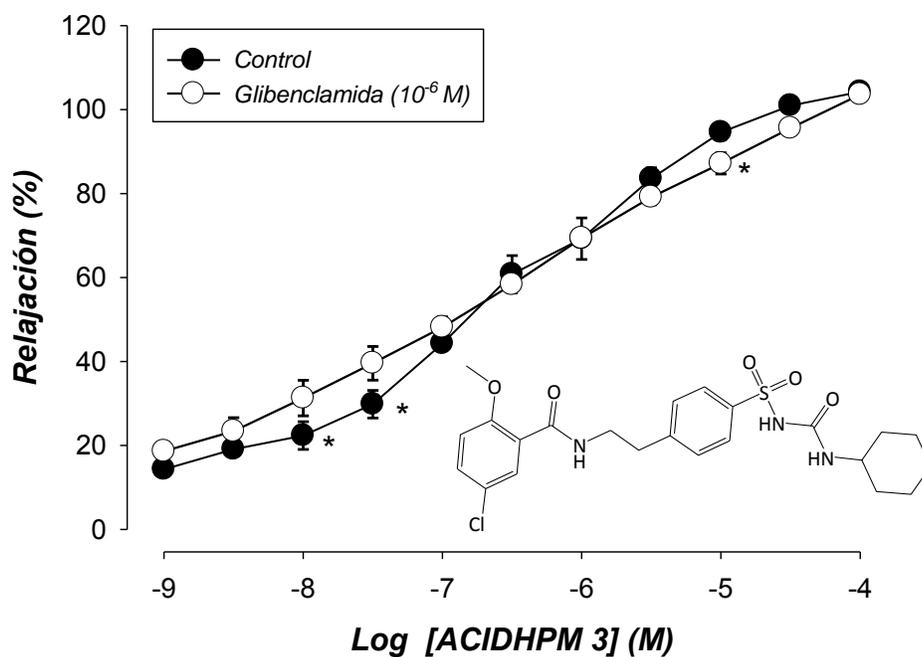


**Gráfica 27.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos CE incubados con Bario.

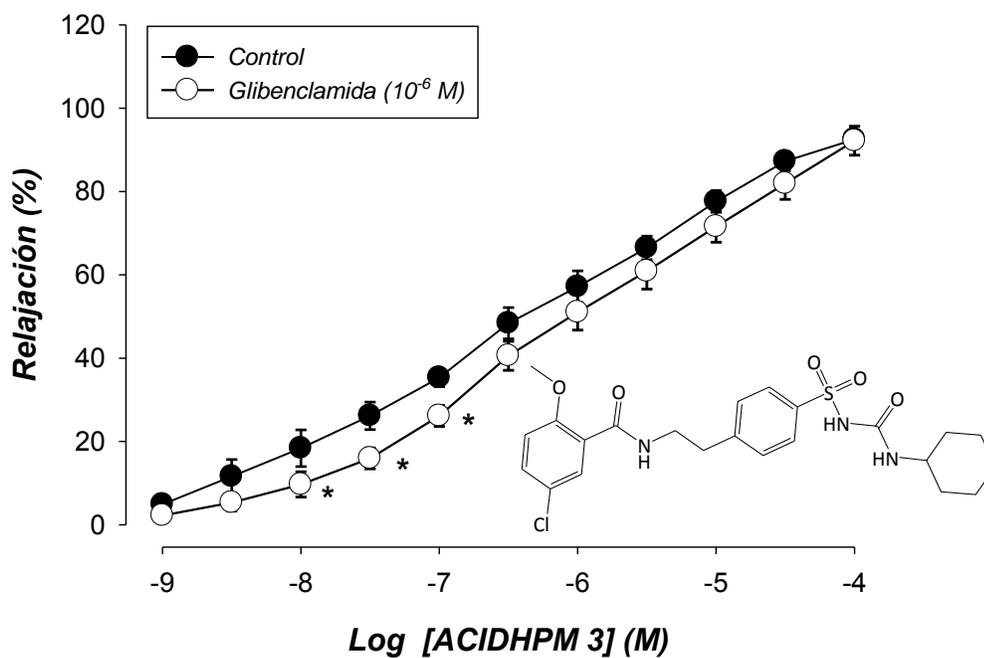


\* $P < 0.05$  Diferencias significativas entre anillos control y tratados

**Gráfica 28.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos CE incubados con Glibenclamida.

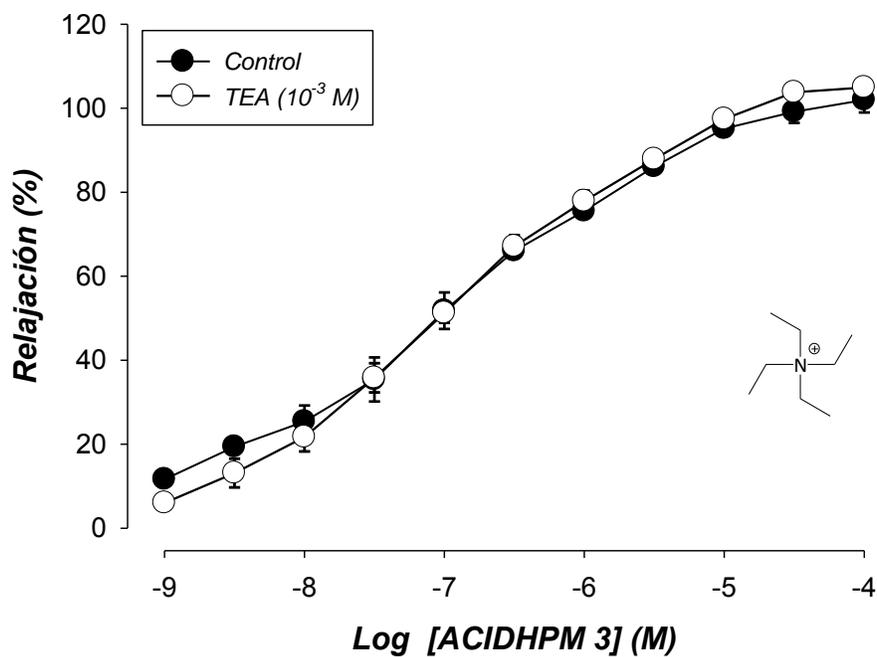


**Gráfica 29.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos SE incubados con Glibenclamida.



\*P < 0.05 Diferencias significativas entre anillos control y tratados

**Gráfica 30.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos CE incubados con TEA.



**Gráfica 31.** Curva concentración-respuesta a ACIDHPM 3 en anillos SE incubados con TEA.

