



---

**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA**



**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

**“Diseño y Evaluación Teórica y Experimental *in vitro*  
de Compuestos Derivados de Apocinina como  
Posibles Inhibidores de NADPH oxidasa”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN FARMACOLOGÍA**

**PRESENTA:**

**Martha Edith Macías Pérez**

**DIRECTORES DE TESIS**

**D. en C. Martha Cecilia Rosales Hernández**

**D. en C. Federico Martínez Ramos**

JULIO 2011.



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México, D.F. siendo las 15:30 horas del día 28 del mes de Junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de ESM para examinar la tesis titulada:

"Diseño y Evaluación Teórica y Experimental *in vitro* de Compuestos Derivados de Apocinina como Posibles Inhibidores de NADPH oxidasa"

Presentada por el alumno:

Macías  
Apellido paterno

Pérez  
Apellido materno

Martha Edith  
Nombre(s)

Con registro: 

B	0	9	1	7	9	4
---	---	---	---	---	---	---

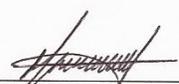
aspirante de:

**Maestría en Ciencias en Farmacología**

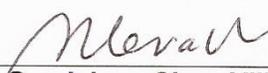
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

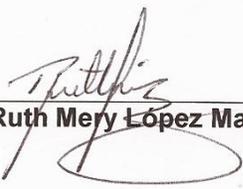
### LA COMISIÓN REVISORA

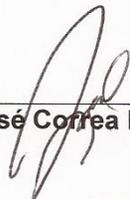
#### Directores de tesis

  
Dra. Martha Cecilia Rosales Hernández

  
Dr. Federico Martínez Ramos

  
Dra. Guadalupe Cleva Villanueva López

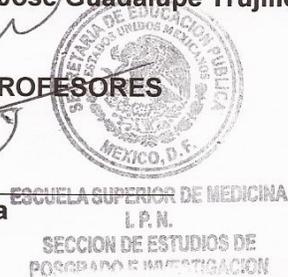
  
Dra. Ruth Mery López Mayorga

  
Dr. José Correa Basurto

  
Dr. José Guadalupe Trujillo Ferrara

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

  
Dr. Eleazar Lara Padilla





**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESION DE DERECHOS**

En la Ciudad de México, D. F., el día 24 del mes mayo del año 2011, el que suscribe **Martha Edith Macías Pérez** alumno del Programa de Maestría en Ciencias en Farmacología con número de registro B091794, adscrito a la **Escuela Superior de Medicina**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dra. Martha Cecilia Rosales Hernández** y del **Dr. Federico Martínez Ramos** y cede los derechos del trabajo intitulado “**Diseño y evaluación teórica y experimental de compuestos derivados de apocinina como posibles inhibidores de NADPH oxidasa**”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [marthita\\_e23@yahoo.com.mx](mailto:marthita_e23@yahoo.com.mx) Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

**Martha Edith Macías Pérez**

Nombre y firma

## ÍNDICE GENERAL

	Pag.
ÍNDICE	3
FIGURAS	4
TABLAS	5
GRÁFICAS	5
ABREVIATURAS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9

## ÍNDICE

<b>Título:</b>	<b>Página</b>
1. Resumen	7
2. Abstract	8
3. Introducción	9
4. Antecedentes	12
4.1. NADPH oxidasa	12
4.1.1. Subunidades de NADPH oxidasa 2	14
2.1.2. Ensamble de NADPH oxidasa 2	19
4.2. Especies Reactivas de Oxígeno	20
4.3. Hipertensión	24
4.4. Inhibidores de NADPH Oxidasa	25
2.4.1. Apocinina	27
5. Justificación del estudio	31
6. Hipótesis	32
7. Objetivo general	33
8. Objetivos particulares	33
9. Material y Métodos	34
9.1. Síntesis de Derivados de Apocinina	34
9.1.1. C1NP1A	34
9.1.2. C1NP2A	35
9.1.3. C1NP1B	36
9.1.4. Anhídrido Pimérico	36
9.1.5. C1NP2B	37
9.2. Caracterización de Derivados de Apocinina	38
9.3. Prueba de DPPH	38
9.4. Obtención de tejidos	40
9.5. Determinación de la actividad enzimática de NADPH oxidasa	41
9.6. Análisis estadístico	43
9.7. Cálculos teóricos	44
10. Resultados	47
11. Conclusiones	69
12. Bibliografía	70
13. Anexo 1	79
14. Anexo 2	80

**ÍNDICE DE FIGURAS:**

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> NADPH oxidasa	<b>12</b>
<b>Figura 2.</b> Presencia de isoformas de NADPH oxidasa en vasos sanguíneos.	<b>14</b>
<b>Figura 3.</b> Subunidades transmembranales de NADPH oxidasa	<b>16</b>
<b>Figura 4.</b> Subunidades citosólicas	<b>17</b>
<b>Figura 5.</b> Regiones autoinhibitorias de p47	<b>18</b>
<b>Figura 6.</b> Producción de ERO	<b>21</b>
<b>Figura 7.</b> Formación de ON	<b>23</b>
<b>Figura 8.</b> Disminución de ON	<b>24</b>
<b>Figura 9.</b> Apocinina	<b>27</b>
<b>Figura 10.</b> Inhibición del ensamble de NADPH oxidasa	<b>28</b>
<b>Figura 11.</b> Formación de dímero de apocinina	<b>29</b>
<b>Figura 12.</b> Síntesis del C1NP1A	<b>34</b>
<b>Figura 13.</b> Síntesis del C1NP2A	<b>35</b>
<b>Figura 14.</b> Síntesis del C1NP1B	<b>36</b>
<b>Figura 15.</b> Síntesis del anhídrido pimélico	<b>37</b>
<b>Figura 16.</b> Síntesis del C1NP2B	<b>37</b>
<b>Figura 17.</b> Caracterización de los compuestos	<b>38</b>
<b>Figura 18.</b> Prueba de DPPH	<b>39</b>
<b>Figura 19.</b> Compuestos sintetizados	<b>47</b>
<b>Figura 20.</b> Espectro de RMN de H <sup>1</sup> del C1NP1A	<b>48</b>
<b>Figura 21.</b> Espectro de RMN de H <sup>1</sup> del C1NP2A	<b>49</b>
<b>Figura 22.</b> Espectro de RMN de H <sup>1</sup> del C1NP1B	<b>50</b>
<b>Figura 23.</b> Espectro de RMN de H <sup>1</sup> del C1NP2B.	<b>51</b>
<b>Figura 24.</b> Espectro de EPR característico de PPH	<b>55</b>
<b>Figura 25.</b> Estructura química del PPH	<b>55</b>
<b>Figura 26.</b> Obtención del área bajo la curva con WINEPR	<b>56</b>
<b>Figura 27.</b> Mecanismo de formación del dímero de apocinina por la enzima MPO.	<b>60</b>
<b>Figura 28.</b> Segmento cristalizado de p47phox.	<b>61</b>
<b>Figura 29.</b> Sitio de unión del Dímero de Apocinina	<b>63</b>
<b>Figura 30.</b> Sitio de unión de los compuestos sintetizados y	<b>64</b>

Apocinina

<b>Figura 31.</b>	Complejo p47phox-p22phox	<b>65</b>
<b>Figura 32.</b>	Alineamientos entre p22 de rata y de humano	<b>67</b>
<b>Figura 33.</b>	Alineamientos entre p247 de rata y de humano	<b>68</b>

**TABLAS:**

<b>Tabla 1</b>	Inhibidores del ensamblaje de NADPH oxidasa	<b>26</b>
<b>Tabla 2</b>	Preparación de muestras con inhibidores conocidos	<b>42</b>
<b>Tabla 3</b>	Preparación de muestras con los compuestos sintetizados.	<b>43</b>
<b>Tabla 4</b>	Solubilidad y puntos de fusión de los compuestos sintetizados	<b>52</b>
<b>Tabla 5</b>	Valores de $K_d$ y $\Delta G$ para los derivados de Apocinina.	<b>65</b>
<b>Tabla 6</b>	Residuos a los que se unen los compuestos diseñados y los sintetizados	<b>66</b>

**Gráficas:**

<b>Gráfica 1.</b>	Reducción de DPPH por los compuestos sintetizados.	<b>53</b>
<b>Gráfica 2.</b>	Área bajo la curva de anión superóxido para los inhibidores conocidos.	<b>57</b>
<b>Gráfica 3.</b>	Área bajo la curva para los compuestos sintetizados.	<b>59</b>

### Abreviaturas:

Nox	NADPH oxidasa
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido reducido
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ON	Oxido Nítrico
MPO	Mieloperoxidasa
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RPE	Resonancia Paramagnética Electrónica
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Anión superóxido
O <sub>2</sub>	Oxígeno molecular
UV	Ultravioleta
DPPH	2-2 difenil-2-Picrilhidrazoilo
PPH	1-hydroxy-4-phosphonoxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin
Kd	Constante de disociación
ΔG	Energía libre de Gibbs
XOD	Xantina Oxidasa
ON sintasa	Oxido Nítrico Sintasa
PRR	Región rica en prolina
SH3	Homología Src 3
Src	Sarcoma de Rous
RAI	Región auto inhibitoria
PX	Homología de phox
TPR	Tetratricopeptidos repetidos
ONOO <sup>•-</sup>	Peroxinitrito
PA	Presión arterial
DPI	Difenilen iodonium
CINP	Compuesto inhibidor de NADPH oxidasa

## 1. Resumen

El estrés oxidativo producido por altas concentraciones de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) derivado de la enzima NADPH oxidasa 2 (Nox2) en el endotelio vascular se ha relacionado con enfermedades cardiovasculares tales como la hipertensión y aterosclerosis en que se observa una disminución de óxido nítrico (ON) por unión con  $O_2^{\cdot-}$ . Por lo que se ha propuesto inhibir a Nox2 para disminuir la concentración de  $O_2^{\cdot-}$  y aumentar la biodisponibilidad de ON para la relajación del endotelio vascular. Actualmente se ha mencionado que la forma dimerica de apocinina, activada por la enzima mieloperoxidasa (MPO), inhibe a Nox2 impidiendo el ensamble de las subunidades que la conforman, sin embargo no ha podido ser utilizado como medicamento debido a que la afinidad de la enzima por apocinina es poca y no toda activa su forma dimérica, además aún no es del todo claro el mecanismo por el cual apocinina inhibe a NADPH oxidasa.

Por estas razones se diseñaron, sintetizaron y evaluaron compuestos derivados de apocinina, con la finalidad de que no requieran ser activados por MPO y que presenten mayor afinidad por NADPH oxidasa que apocinina. Se verificó su formación y pureza por cromatografía en capa fina y se caracterizaron por resonancia magnética nuclear (RMN) de protón ( $^1H$ ) y carbono ( $^{13}C$ ). Se les realizó una prueba de reducción de DPPH para saber si son atrapadores de radicales. La actividad de NADPH oxidasa en presencia de estos compuestos fue evaluada por resonancia paramagnética electrónica (EPR) en homogenizado de arterias aorta de rata wistar macho, utilizando PP-H como atrapador de radicales. Los datos obtenidos mediante EPR se cuantificaron mediante la suma del área bajo la curva de  $O_2^{\cdot-}$  y fueron analizados por un método de análisis de varianza (ANOVA). Un valor de  $p < 0,05$  se considero diferencia significativa entre los diferentes grupos. Se realizó docking, de los compuestos previamente diseñados y optimizados en Gaussian 98 sobre el fragmento cristalizado de la proteína p47phox que es donde se une a p22phox y se menciona se une el dímero de apocinina y los compuestos optimizados para conocer la afinidad de la enzima por los ligandos. Se comparó la homología entre las proteínas de rata y las de humano en ClustalW2 para validar que los resultados obtenidos en homogenizados de aortas de rata sean reproducibles en humanos.

Estos compuestos no resultaron ser atrapadores de radicales, ya que no redujeron el DPPH, pero si disminuyeron el área bajo la curva de  $O_2^{\cdot-}$  de acuerdo a la actividad enzimática medida con EPR, resultando muy buen inhibidor el C1NP2B y en los estudios *in silico* se observó que se unieron a la región de p47phox que se une a p22phox mostrando mayor afinidad C1NP1B y C1NP2B. Por lo tanto, el C1NP2B es el mejor inhibidor y es posible que su mecanismo de acción sea impidiendo el ensamble de las subunidades p47phox y p22phox de Nox2.

## 2. Abstract

The oxidative stress produced by high concentrations of superoxide anion  $O_2^{\cdot-}$  derived from NADPH oxidase 2 (Nox2) in the vascular endothelium has been linked to cardiovascular diseases such as hypertension and atherosclerosis observed a decrease in nitric oxide (NO) by binding with  $O_2^{\cdot-}$ . It has been proposed to inhibit Nox2 to decrease the concentration of  $O_2^{\cdot-}$  and increase the bioavailability of NO to relax the vascular endothelium. Today has been reported that the dimeric form of apocynin, activated by the enzyme myeloperoxidase (MPO), inhibits Nox2 preventing the assembly of its subunits, however, apocynin has not been used as a drug because the affinity of MPO by this is low and not all is active at its dimeric form, furthermore, even it is not clear the mechanism by which NADPH oxidase inhibits apocynin.

For these reasons were designed, synthesized and evaluated compounds derived from apocynin, with the aim of these do not require to be activated by MPO and its affinity for NADPH oxidase could be better than apocynin. The compounds purity was tested by chromatography and their structure were characterized by nuclear magnetic resonance (NMR) of proton ( $^1H$ ) and carbon ( $^{13}C$ ). In order to determinate if the compounds have antioxidant properties a DPPH assay was done. The activity of NADPH oxidase in the presence of these compounds was evaluated by electron paramagnetic resonance (EPR) in aorta homogenate of male wistar rat, using PP-H as a spin trap. The EPR data obtained were quantified by the area under the curve which represent the  $O_2^{\cdot-}$  production and were analyzed by a method of analysis of variance (ANOVA). A value of  $p < 0.05$  was considered significant difference between the groups. We performed docking of the compounds previously designed, first these were optimized with Gaussian 98 and after these were docked on the crystallized fragment of the protein p47phox that contain the segment that it binds to p22phox and is mentioned bound the apocynin dimer. We compared the protein homology between rat and human in ClustalW2 to validate if the results obtained in homogenates of rat aortas are reproducible in humans.

Were found that these compounds not are trapping of radicals and not reduced the DPPH, but decreased the area under the curve of  $O_2^{\cdot-}$  according to the enzymatic activity of NADPH oxidase measured by EPR having the best activity as inhibitor the compound C1NP2B. In the studies in silico was observed that the compounds are recognized in the p47phox region that binds to p22phox, and the compounds that showing higher affinity are C1NP1B and C1NP2B. Therefore, the best inhibitor is C1NP2B and possibly its mechanism of action is preventing the assembly of the subunits p47phox and p22phox of Nox2.

### 3. Introducción

Existen en el organismo varias fuentes de producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), de las cuales la principal es NADPH oxidasa<sup>1-4</sup>, esta enzima es ampliamente distribuida en células endoteliales en donde predomina la isoforma NADPH oxidasa 2 (Nox2)<sup>5</sup>. Se ha reportado que en modelos de hipertensión existe una excesiva producción de anión superóxido en la pared vascular lo que sugiere que esta especie reactiva de oxígeno (ERO) puede estar implicada en la disfunción endotelial durante este padecimiento debido a que el  $O_2^{\cdot-}$ <sup>6-12</sup> muestra gran afinidad por el óxido nítrico (ON) disminuyendo su biodisponibilidad para actuar como vasodilatador y favoreciendo la combinación de ambos para producir peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot-}$ )<sup>13,14</sup>.

Debido a lo anterior se ha propuesto que Nox2 puede ser un blanco terapéutico para el tratamiento de la hipertensión y que esto puede lograrse a través de su inhibición, para lo cual se han propuesto una gran cantidad de compuestos que pueden funcionar como inhibidores de esta enzima. Sin embargo, uno de los inhibidores más estudiados es la apocinina. Proponiéndose diversas teorías por las cuales apocinina podría inhibir a Nox2 pero aún no existe un mecanismo claro de cómo se lleve a cabo esta inhibición<sup>2,15</sup>. Entre las teorías propuestas se ha mencionado que apocinina impide la unión entre las subunidades de Nox2 ya que esta es una proteína oligomérica conformada por 3 subunidades citosólicas (p60phox, p47phox y p40phox) y dos transmembranales (p91phox y p22phox) y que para que pueda catalizar la producción de  $O_2^{\cdot-}$  se requiere que el complejo formado por las subunidades citosólicas se una con las transmembranales, siendo un sitio de unión importante el que se da entre la subunidad citosólica p47phox con la proteína transmembranal p22phox para activar a gp91phox que es la subunidad catalítica. Por lo que se ha propuesto que apocinina se une a la región

de p47phox que se une a p22phox para evitar el ensamblaje de la proteína y con ello la producción de  $O_2^{\cdot-}$ . Sin embargo, existen reportes en los que se menciona que para poder inhibir a Nox2, apocinina necesita dimerizarse mediante una reacción catalizada por MPO y otros reportes en los que se dice que apocinina puede funcionar más bien como antioxidante más que como inhibidor de NADPH oxidasa<sup>2,16-23</sup>.

A pesar de que diversos estudios se han realizado con apocinina como inhibidor de NADPH oxidasa aun no se tiene muy claro su mecanismo de acción y debido a esto tampoco se ha podido utilizar como fármaco<sup>17-24</sup>. Por este motivo resulta de gran importancia el desarrollo de nuevos compuestos capaces de inhibir la función de NADPH oxidasa para disminuir la concentración de  $O_2^{\cdot-}$  contribuyendo al tratamiento de enfermedades cardiovasculares, y el diseño de estos fármacos podría hacerse con base en la estructura de la apocinina.

Por lo anteriormente mencionado, se diseñaron y sintetizaron 4 compuestos derivados de apocinina, 2 éteres (CINP1A y CINP2A) y 2 esterres (CINP1B y CINP2B). Se identificó la formación de estos compuestos mediante cromatografía en capa fina visualizándolos con luz ultravioleta (UV), se caracterizaron mediante resonancia magnética nuclear (RMN) y se verificó su solubilidad y puntos de fusión.

A estos compuestos y a apocinina se les realizó la prueba de DPPH para conocer si presentan propiedades como atrapadores de radicales basándose en el porcentaje de reducción de DPPH, obteniendo que ninguno es atrapador de radicales. Además fueron evaluados y comparados con apocinina mediante estudios *in vitro* e *in silico*, para conocer sus efectos sobre Nox2 y poder elucidar su mecanismo de acción.

Los estudios *in vitro* se realizaron mediante resonancia paramagnética electrónica (EPR) en homogenizado de aorta de ratas macho wistar conteniendo a NADPH oxidasa y utilizando PPH como atrapador de radicales obteniendo espectros de los cuales se graficó el área bajo la curva apoyados en el programa WINEPR. Se observó que tanto apocinina como los compuestos sintetizados redujeron el área bajo la curva de  $O_2^{\cdot-}$ , siendo estadísticamente mejor inhibidor C1NP2B en comparación con apocinina seguido por C1NP2A.

Para los estudios *in silico* se utilizó un fragmento cristalizado de la proteína p47phox que comprende la región con que se une a p22phox y a la región de aminoácidos que se fosforilan (1G2.PDB) y con ayuda del programa autodock 4.05 se hizo interaccionar con los compuestos previamente optimizados. Los resultados obtenidos revelaron que de los compuestos sintetizados C1NP1B y C1NP2B presentan mayor afinidad por Nox2 que apocinina y tienen una Kd menor, sugiriendo que son los compuestos mas apropiados para inhibir a Nox2.

Al observar que ni apocinina ni los compuestos derivados fueron atrapadores de radicales y que si reducen el área bajo la curva de  $O_2^{\cdot-}$  inhibiendo su producción por Nox2 además de presentar afinidad por la región de p47phox que se une a p22phox, consideramos que la teoría acerca de que apocinina impide la unión de p47phox con p22phox para inhibir la función de Nox2 y reducir la concentración de  $O_2^{\cdot-}$  puede considerarse acertada y por lo tanto, los compuestos sintetizados pueden actuar de la misma manera sin ser necesaria su activación por MPO como ocurre con apocinina, ya que incluso se unen al mismo sitio que apocinina y además de que el mejor inhibidor es C1NP2B seguido de C1NP1A coincidiendo con los resultados de docking que indican que los ésteres son los mejores inhibidores, por lo que se cree que deben ser probados *in vivo* en modelos de hipertensión para poder evaluar si tienen algún efecto en la regulación de la presión arterial.

## 4. Antecedentes

### 4.1. NADPH oxidasa

La familia de las enzimas de NADPH oxidasas es la mayor productora de  $O_2^{\cdot-}$  y la principal causante del estrés oxidativo ya que con su actividad ocasionan que otras enzimas se conviertan a un estado productor de ERO para eventualmente inducir cambios fisiológicos que pueden contribuir a la fisiopatología cardiovascular<sup>1-4</sup>.

Una ventaja para el estudio de las NADPH oxidasas, es que a diferencia de otras enzimas como Xantina Oxidasa (XOD) o sintasa de oxido nítrico (ON sintasa), su única función conocida es la producción de  $O_2^{\cdot-}$ , por lo que al interferir en su activación no se alteran otras funciones esenciales para la función celular<sup>24</sup>.

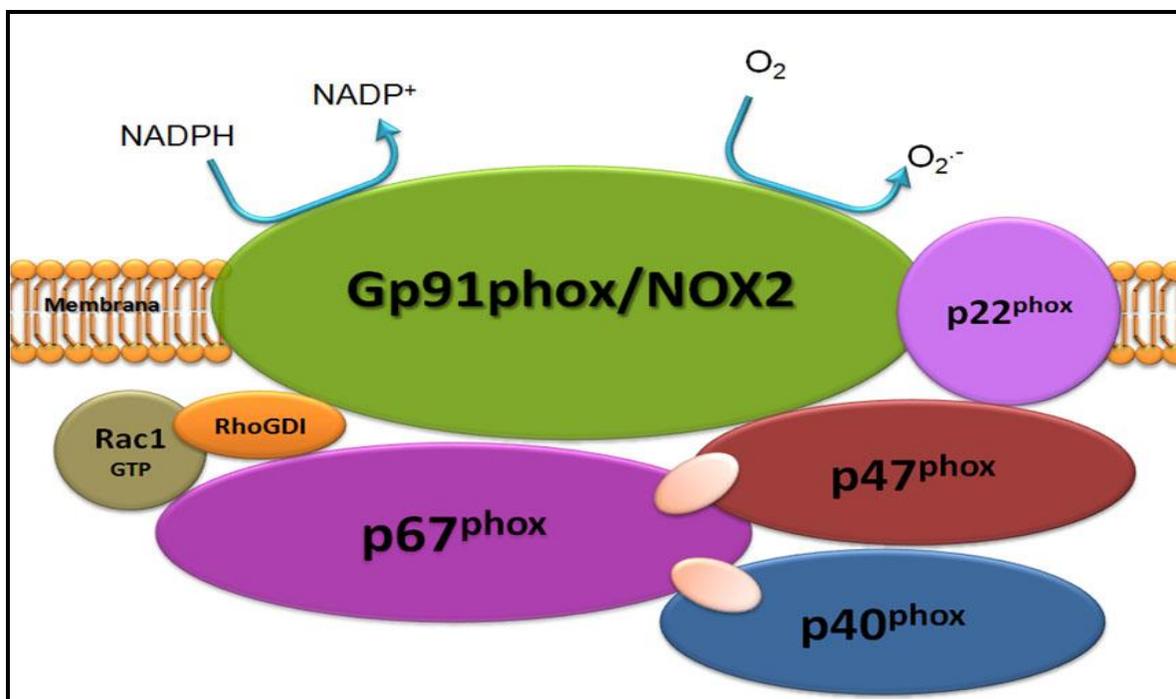


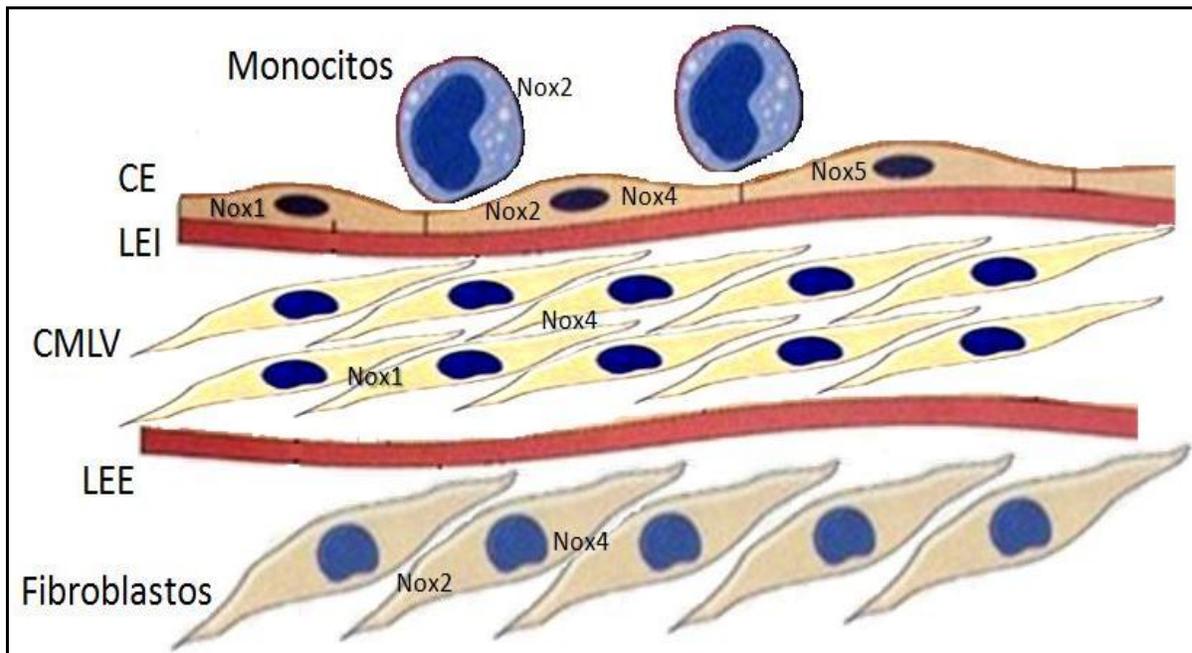
Figura 1: NADPH oxidasa transfiere electrones de NADPH a O<sub>2</sub> para formar O<sub>2</sub><sup>·-</sup>.

La familia de NADPH oxidasa esta formada por complejos enzimáticos donde cada miembro o isoforma se distingue por la expresión de subunidades catalíticas Nox o Duox que se utilizan para transferir electrones de NADPH a oxígeno molecular ( $O_2$ ) para producir el  $O_2^{\cdot-}$  (fig.1)<sup>24-30</sup>.

Hasta ahora, se han identificado 7 miembros de la familia de NADPH oxidasa en mamíferos, incluyendo las oxidasas Nox1 a Nox5 y Duox 1 y 2<sup>2-34</sup>.

Las isoformas Nox1 y Nox2 se caracterizan por requerir la asociación de una pequeña proteína integral de membrana, p22phox, la cual se ha propuesto que actúa estabilizando la proteína Nox dentro de las membranas celulares<sup>2-33</sup> mientras Duox 1 y Duox2 se encuentran en células tiroideas<sup>33</sup>. Nox1 y Nox3 son altamente expresadas en epitelio de colon y en oído interno, respectivamente y su actividad es regulada por la GTPasa Rac 1. Nox2, Nox4 y Nox5 se encuentran ampliamente distribuidas en riñón y células vasculares y sanguíneas y su actividad es independiente de Rac-GTPasa<sup>3,24</sup>.

Cuatro de estas isoformas se encuentran presentes en las paredes de los vasos sanguíneos (fig. 2)<sup>2,4,5,31</sup>, donde cada una de las capas vasculares parece tener una composición especial de NADPH oxidasa, que incluso pueden variar entre especies siendo Nox2 la más abundante en células endoteliales de los vasos sanguíneos, adventicia de vasos conductores y en leucocitos fagocíticos<sup>1-5,13,31-33</sup>. Por su abundancia en células endoteliales de vasos sanguíneos contribuye a la patogénesis de muchas enfermedades cardiovasculares ocasionadas por el estrés oxidativo, entre las que se encuentran aterosclerosis e hipertensión<sup>1-5,31-34</sup>.



**Figura 2.** Presencia de isoformas de NADPH oxidasa en paredes de los vasos sanguíneos<sup>5</sup>.

Sin embargo, a pesar de que la excesiva producción de  $O_2^{\cdot-}$  esta relacionada con padecimientos en el sistema cardiovascular, la deficiencia de Nox2 contribuye a desarrollar enfermedad granulomatosa crónica EGC, caracterizada porque los fagocitos no pueden generar suficiente  $O_2^{\cdot-}$  y disminuye su actividad bactericida. Esto puede conducir a la formación de granulomas en pulmón, hígado, ganglios linfáticos y tracto gastrointestinal, urinario y genital<sup>2</sup>.

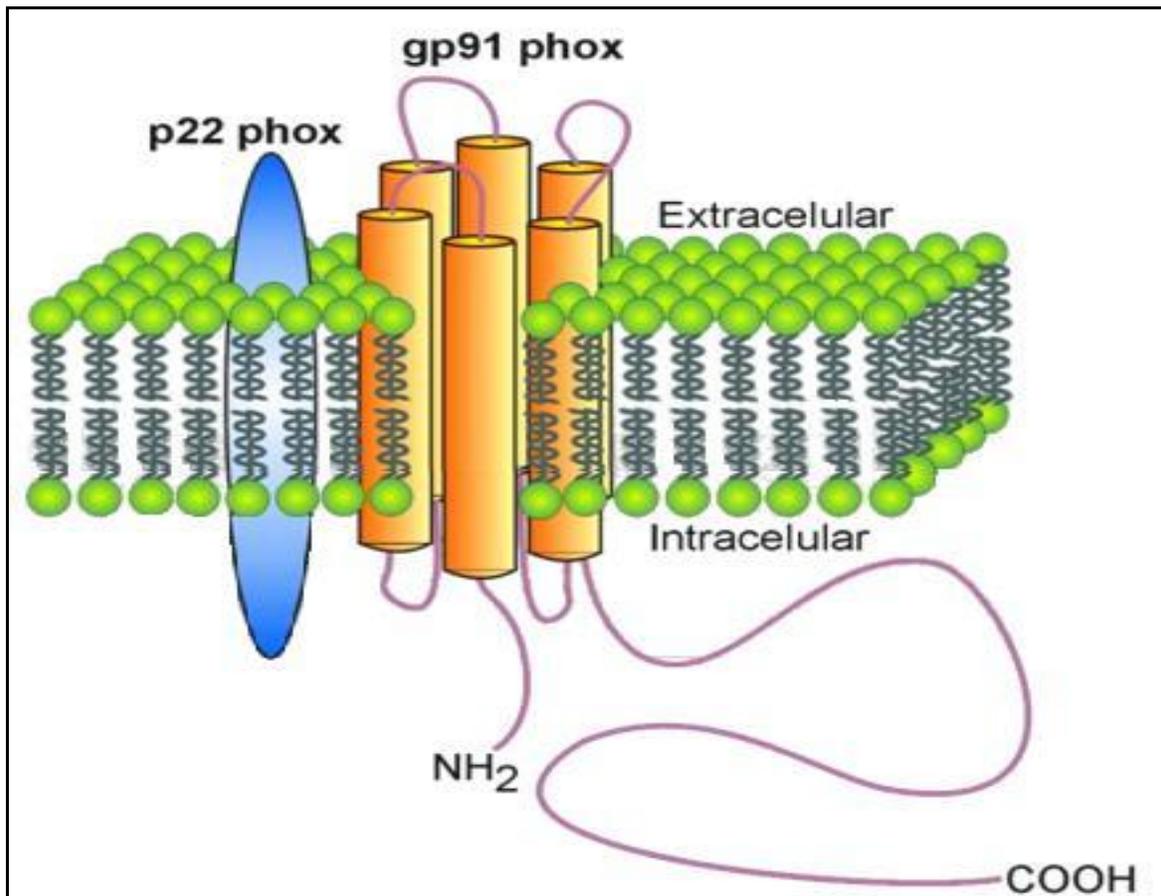
#### 4.1.1. Subunidades de NADPH oxidasa 2:

Las NADPH oxidasas están constituidas por subunidades citoplásmicas y subunidades unidas a membrana. Las 2 proteínas de membrana son gp91phox que es la subunidad catalítica (que es una hemoproteína) y p22phox (22kDa) que es la proteína de unión no catalítica (fig.3). Los componentes citosólicos del complejo pueden incluir un organizador (p47phox o NOXO1), un activador

(p67phox o NOXA1) y otras proteínas (p40phox y Rac). Estas subunidades citosólicas pueden variar con las diferentes isoformas de NOX<sup>1,2,13,35-41</sup>.

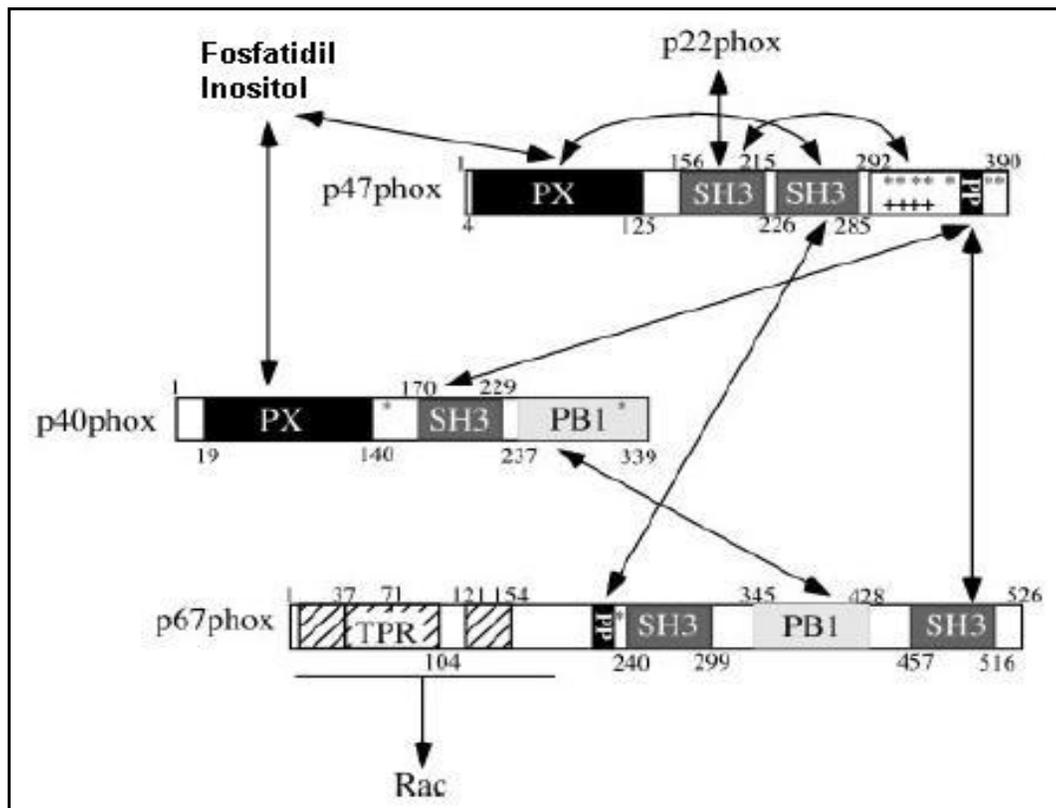
**Nox2/gp91phox:** Es una proteína glicosilada de 570 residuos de aminoácidos con 6 dominios transmembranales y un peso de 65 kDa. Presenta un segmento N-terminal, 6 alfa hélices transmembranales y una región carboxilo terminal citoplasmática que contiene sitios de reconocimiento para FAD y NADPH<sup>2,5,34</sup>. Los electrones son acarreados por NADPH y transferidos inicialmente a FAD y uno de los 2 grupos hemo dentro de los segmentos de los dominios transmembrana de la proteína Nox, los cuales son sostenidos en su lugar por sus cuatro residuos de histidina. El primer grupo hemo esta localizado a través de la terminal citoplásmica de la molécula mientras el segundo grupo hemo esta situado a través de la cara externa. Presumiblemente este hemo externo facilita la transferencia de electrones al oxígeno molecular para generar O<sub>2</sub><sup>-</sup> celularmente o dentro del fagosoma. Se cree que el grupo hemo de la región carboxilo terminal esta involucrado con el establecimiento de la interacción entre Nox2 y p22phox para la estabilizar y fijar a la proteína Nox2 con la membrana<sup>2,36</sup>.

**p22phox:** Esta unida a la membrana (fig.3) y se asocia con Nox1, Nox2 y Nox4 en células vasculares. Posee 195 aminoácidos y tiene un peso molecular aproximado de 21kDa. Presenta un grupo amino citoplásmico terminal, 2 membranas alfa hélices conectadas por asas cortas y un C terminal que se extiende hacia el citoplasma. El amino terminal contiene 2 regiones esenciales en la activación de Nox2 y en su estabilidad en la membrana. Estas regiones participan en la heterodimerización con Nox2. La región carboxilo terminal presenta una región rica en prolina (PRR) que es reconocida en la unión a p47phox. Por lo tanto p22phox es intermediaria porque facilita la interacción de p47phox con gp91phox<sup>1,2,36,37</sup>.



**Figura 3.** gp91phox y p22phox son las subunidades transmembranales de NADPH oxidasa.

**p47phox:** Tiene un peso aproximado de 47kDa y 390 residuos de aminoácidos. Contiene 2 dominios de homología Src 3 SH3 que son regiones conservadas y bien conocidas por su participación en las interacciones proteína-proteína, una región auto inhibitoria (AIR) en la región carboxilo terminal, un dominio de homología de phox (dominio PX) para unirse a fosfoinositol y anclarse a la membrana durante la interacción con p22phox y una región rica en prolina (PRR) similar a la que contiene p22phox en el amino terminal (fig.4.)<sup>2, 38,39,14,40-42</sup>.

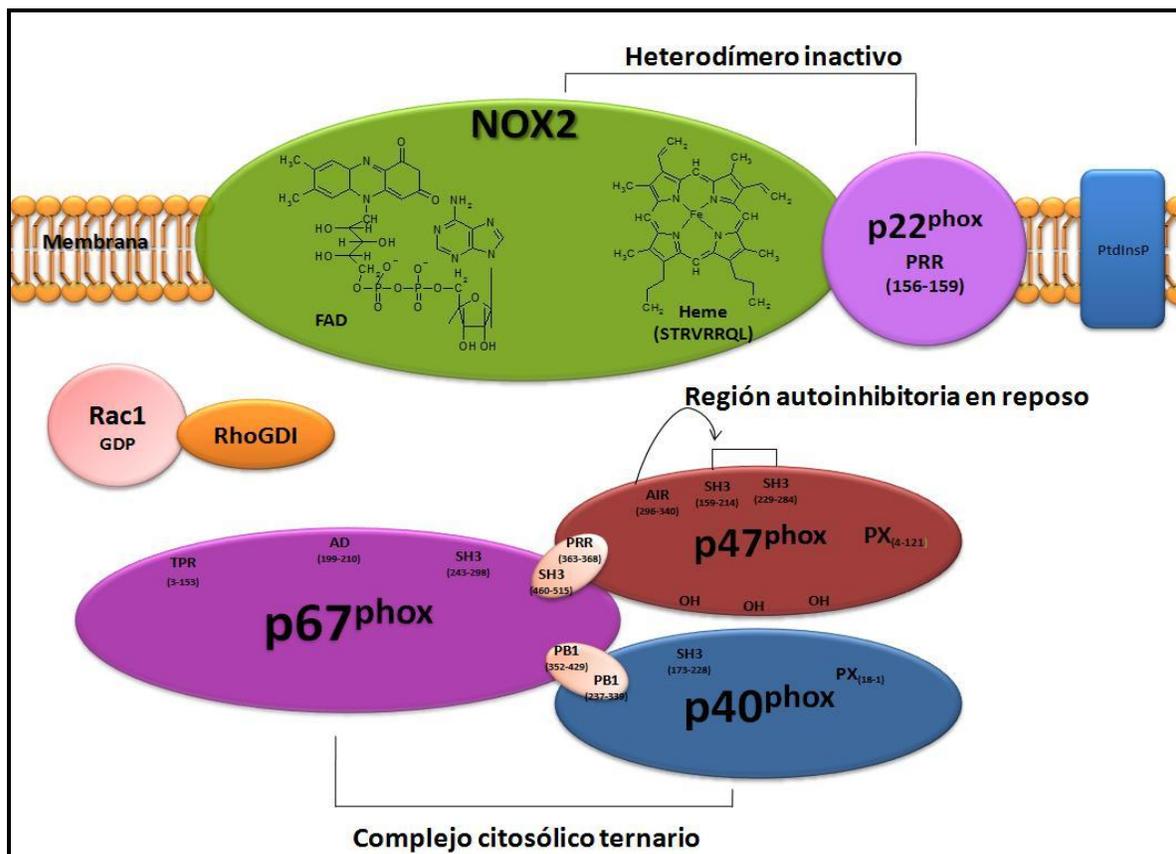


**Figura 4.** Sitios de unión del complejo de proteínas citoplásmicas<sup>41</sup>.

En condiciones de reposo p47 phox es incapaz de unirse a p22phox ya que su región auto inhibitoria (AIR) impide la interacción de los dominios SH3 con la región rica en prolina PRR de p22phox (fig.5). Otra inhibición menos definida se da entre el dominio SH3 del carboxilo terminal de p47phox y el dominio PX para prevenir la unión del dominio PX con los fosfoinosítidos de membrana impidiendo su asociación con la membrana en condiciones de reposo.

En presencia de un estímulo apropiado, los residuos de serina localizados sobre p47phox se fosforilan ayudando a la liberación de los dominios SH3 y PX que se unen a p22phox y a la membrana plasmática respectivamente. Conocer esto es importante, ya que podría permitir inhibir la actividad de Nox2 por

interferencia con la interacción molecular entre p22phox y p47phox a través de pequeños movimientos de péptidos de esta región<sup>2,5,14,38,39,40-45</sup>.



**Figura 5.** En reposo, las regiones autoinhibitorias de p47phox impiden el ensamblaje y activación de NADPH oxidasa.

**p67phox:** Es una proteína de 59.8 kDa compuesta de 526 aminoácidos, contiene en su amino terminal 4 tetratricopeptidos repetidos (TPR) y 2 dominios SH3, uno localizado centralmente y otro cerca del carbono terminal (fig. 4). El segundo dominio de p67phox se une a la región PRR de p47phox. p67phox es una subunidad activadora pero requiere ser activada por la unión de la cinasa Rho que es activada por Rac GTP. De esta manera un dominio específico de p67phox

se une sobre una región específica de Nox2 y permite un cambio conformacional en Nox2 y una inducción de flujo electrónico a través del complejo<sup>2,42-49</sup>.

**p40phox:** Regula positivamente la actividad de NADPH oxidasa. Tiene 339 aminoácidos y un peso molecular de 39kDa y posee un dominio PX en su amino terminal, un dominio SH3 y un dominio PBI. Se asocia con p67phox a través del dominio PBI y con los fosfoinosítidos de membrana a través del dominio PX análogo al de p47phox (fig. 4). p40phox interactúa directamente con la región PRR de p47phox que es relativamente más débil que la de p47phox con p67phox, por lo que p67phox sirve como unión entre p47phox y p40phox por su interacción con ambos. El dominio SH3 de p40phox puede interactuar directamente con las regiones ricas en prolina de p22phox y puede actuar como un organizador alternativo para p47phox en la activación de Nox2 (fig. 4)<sup>2,35,41,42</sup>.

#### 4.1.2. Ensamble de Nox2

Nox2 presente en leucocitos y vasos sanguíneos se encuentra inactiva en condiciones de reposo y puede ser activada por varios agonistas diferentes como fMLP (N-formil-metionina-leucina-fenilalanina), Porbol y zymosan opsonizado, lo que resulta en una generación masiva de  $O_2^{\cdot -}$  (aproximadamente 10 nmol/min/10<sup>6</sup> células).

La activación de gp91phox por p67phox se produce a través de un dominio de activación situada en la región N-terminal de p67phox. Sin embargo, la interacción en este sitio, no es lo suficientemente fuerte para permitir la asociación constante de las dos moléculas y es facilitada por p47phox, que actúa como proteína adaptadora. Esta función de p47phox se rige por fosforilación de serinas, que ocurre durante la activación de la oxidasa. El dominio SH3 bis de p47phox se une a p22phox, mientras que el dominio PX permite el anclaje de p47phox a la

membrana. p67phox interactúa a través de su dominio SH3 con una PRR en p47phox. En consecuencia, p22phox es considerado el principal sitio de acoplamiento de las subunidades citosólicas de NADPH oxidasa 2 y estabiliza a gp91phox<sup>2,14,38,39,40-44</sup>.

Se ha mencionado que una vía de activación es cuando en presencia de grandes cantidades de RAC1 GDP, se une a Rho, ambos participan en la activación de Nox2, y juntos activan a p67phox para que se una a Nox2 y la active, incluso en ausencia de p47phox. In vivo, la traslocación de RAC es independiente de la traslocación de p47phox y p67phox y se lleva a cabo aún en pacientes que carecen de la expresión de subunidades de NADPH oxidasa<sup>2,50-54</sup>.

Cuando las subunidades citosólicas de Nox2 se fosforilan se traslocan hacia las subunidades localizadas en la membrana permitiendo la activación de la enzima y la formación de ROS. En cambio, Nox4 y Nox5 pueden ser independientes de subunidades citosólicas y activarse constitutivamente o regularse por calcio intracelular libre, respectivamente para producir especies reactivas de oxígeno (ERO)<sup>1,2,6-12</sup>.

## 4.2 Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

Las ERO pueden ser producidas por la incompleta reducción del oxígeno molecular a agua mediante procesos endógenos como la cadena respiratoria, ya que el oxígeno es una molécula indispensable para la producción de energía en las células eucariotas. Las ERO incluyen  $O_2^{\cdot -}$  (anión superóxido),  $H_2O_2$  (peróxido de hidrógeno) y  $\cdot OH$  (radical hidroxilo) que pueden salir de la membrana mitocondrial al medio intracelular (fig.6)<sup>2,6-12</sup>.

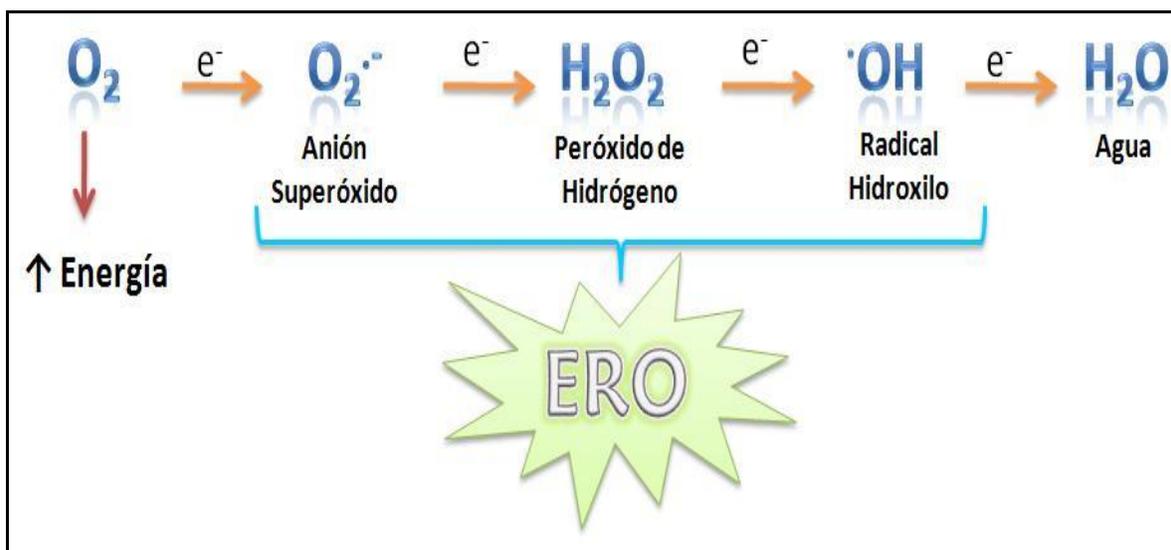


Figura 6. Formación de Especies Reactivas de Oxígeno.

En la vida aeróbica, las células son continuamente expuestas a ERO formadas durante el metabolismo celular normal. Los bajos niveles de ERO intracelular son esenciales para la función fisiológica normal ya que contribuyen a la señalización celular, activan muchas vías intracelulares para cambios en la transcripción genética y alteraciones en la función de proteínas y enzimas específicas, afectando casi todos los aspectos de la función celular<sup>2,7-12</sup> incluyendo expresión genética, proliferación, migración y muerte celular<sup>2,7</sup>, sin embargo, la alta reactividad de estas especies impide su amplia distribución<sup>7-12</sup>. Muchos sistemas enzimáticos, incluyendo la oxido nítrico sintasa (ON sintasa), enzimas de la cadena respiratoria, citocromo p450, xantina oxidasa y NADPH oxidasa, contribuyen a la formación de ERO<sup>7-12</sup>.

La producción excesiva de ERO causa estrés oxidativo el cual representa un importante mecanismo en la patogénesis de muchas enfermedades entre las cuales se encuentran las vasculares tales como hipertensión y aterosclerosis. Sin embargo, las ERO actúan como moléculas de señalización intracelular incluyendo proliferación, apoptosis y supervivencia. Hay evidencia que sugiere que las ERO

pueden regular la vasoconstricción y vasodilatación dependiendo de las ERO formadas. El  $O_2^{\cdot-}$  ha mostrado ser un mediador de la hipertensión y su producción por Nox2 puede ser inducida por factores vasoactivos tales como angiotensina II y endotelina o por acetato de sal de deoxicorticosterona. El  $O_2^{\cdot-}$  también amplifica la hipercontractilidad de vía aérea inducida por alérgenos. En los vasos sanguíneos las fuentes potenciales de ERO incluyen a NADPH oxidasa, ON sintasa, xantina oxidasa, cicloxigenasa y cadena respiratoria mitocondrial. NADPH oxidasa es considerada la mayor fuente de ERO vascular y ha mostrado regular la constricción miogénica y el tono vascular activada por endotelina <sup>11,12,24,25,35,54-57</sup>.

Una de las ERO que mas daño produce y es mas abundante es el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) a pesar de no ser tan reactivo como el  $\cdot OH$  ya que sus efectos involucran la inactivación de moléculas de señalización del óxido nítrico (ON), lo que conduce a la reducción de su biodisponibilidad contribuyendo a la disfunción endotelial, debido a que el oxido nítrico es el principal mediador de la homeostasis vascular<sup>2,6-12</sup>.

El oxido nítrico es producto de la actividad enzimática de la ON sintasa endotelial que se activa por la presencia de ERO (fig. 7) <sup>1,5,56,57</sup>.

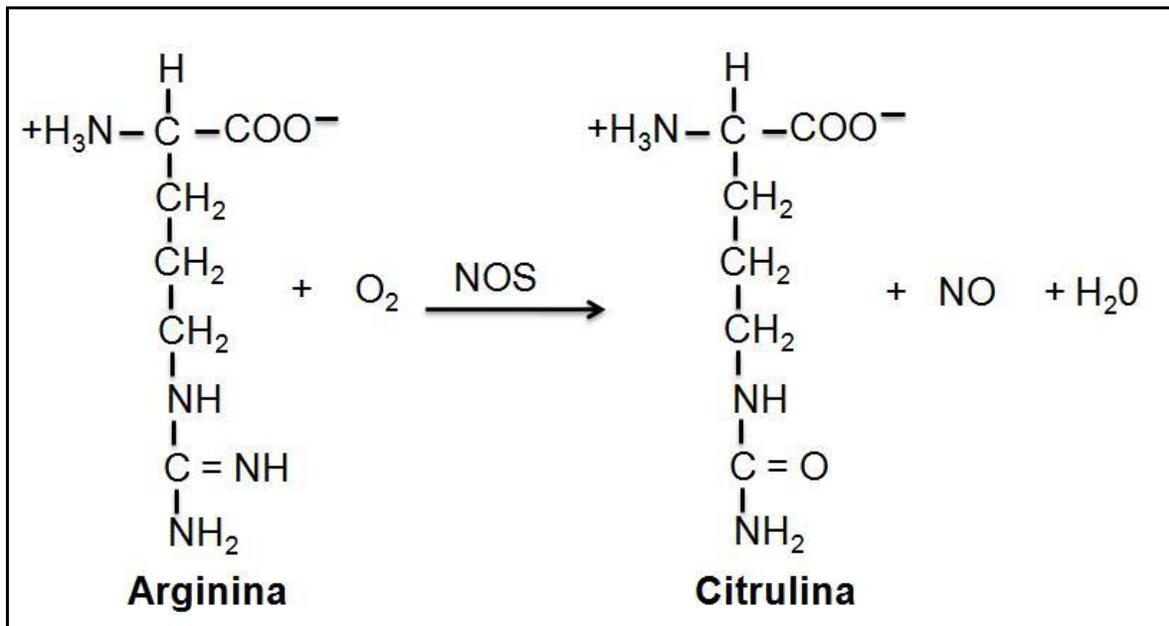


Figura 7: Formación de Oxido Nítrico por medio de la NOS.

Normalmente el oxido nítrico induce la expresión de hemo-oxigenasa 1 (enzima antioxidante) en vasos sanguíneos y modula la función de Nox1 por la vía de la hemo-oxigenasa, lo cual fue asociado con la reducción de la capacidad de generar superóxidos de Nox1<sup>1,5,56</sup>.

La disminución de ON esta implicada en enfermedades cardiovasculares severas ya que al reaccionar con O<sub>2</sub><sup>-</sup> forma peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>) una especie que participa en la señalización redox<sup>13,14</sup>, ocasionando la disminución de ON en endotelio, lo cual se asocia con daño mitocondrial y disfunción endotelial. Esta disfunción endotelial se presenta en enfermedades cardiovasculares, entre las que se encuentra la hipertensión (fig.8)<sup>32,57</sup>.

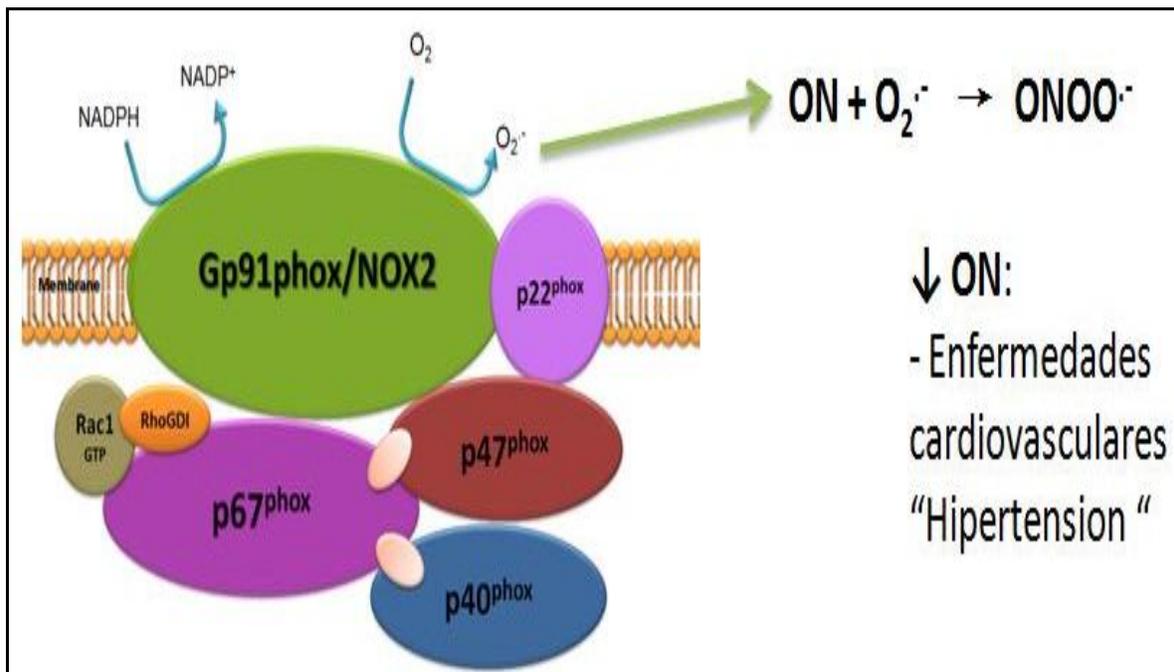


Figura 8. La disminución de oxido nítrico conduce a enfermedades cardiovasculares.

### 4.3 HIPERTENSIÓN:

El aumento de ERO y la consecuente disminución del ON contribuyen al desarrollo de enfermedades cardiovasculares tales como: insuficiencia cardiaca, aterosclerosis, angina de pecho, enfermedad coronaria e hipertensión<sup>55-62</sup>. Estos padecimientos han sido declarados actualmente por la OMS la primera causa de muerte en el mundo debido a que cada año se registran casos de defunciones derivados de estos padecimientos principalmente en países subdesarrollados (<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/index.html>).

La hipertensión se define como una presión arterial (PA) mayor de 140/90 mmHg<sup>21,32,63,63</sup>. Los órganos más afectados por la hipertensión son corazón, riñones y vasos sanguíneos. Ya que en ellos se observa disfunción endotelial por la disminución del ON<sup>55-63</sup>. Esto es de gran importancia ya que el endotelio

desempeña un papel importante en la homeostasis cardiovascular mediante la regulación del tono vascular, además está expuesto a las fuerzas mecánicas y otros factores de riesgo cardiovascular que pueden alterar la estructura y función vascular<sup>55-63</sup>.

Al presentarse una disminución de ON y no haber regulación del tono del músculo liso vascular se dice que hay rigidez arterial. El aumento de la rigidez arterial ha sido considerado un indicador de enfermedad y está asociado con el desarrollo de la hipertensión, así como otros factores de riesgo para enfermedades cardiovasculares. Además, la rigidez arterial se asocia con un mayor riesgo de eventos coronarios y accidentes cerebrovasculares, así como los cardiovasculares y la mortalidad en individuos con hipertensión arterial.

El aumento de la presión arterial en el músculo cardíaco causa su remodelación, cambios en la resistencia arterial coronaria y fibrosis perivascular, que con el tiempo terminan por ocasionar rigidez cardíaca, disfunción diastólica y disfunción sistólica, lo cual favorece la probabilidad de isquemia cardíaca y riesgo de infarto al miocardio, muerte súbita, arritmias e insuficiencia cardíaca<sup>55-63</sup>.

#### **4.4 Inhibidores de NADPH oxidasa**

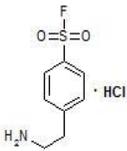
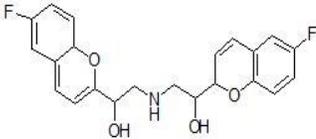
Debido a que la única función conocida de NADPH oxidasa es producción de  $O_2^{\cdot-}$  y no se le conoce ninguna otra función como el resto de las enzimas, se ha vuelto un blanco farmacológico importante<sup>2,16</sup>, por lo cual, partiendo del conocimiento de su estructura, subunidades y activación, se han propuesto diversos mecanismos de inhibición de esta enzima, que son:

a) Influir directamente en la actividad de la oxidasa mediante la transferencia de sus componentes electrónicos.

- b) Disminución de la expresión de una o más de sus subunidades para reducir los niveles de oxidasa capaces de generar  $O_2^{\cdot-}$ .
- c) Modificar postraduccionalmente la oxidasa y/o sus activadores para modular la actividad oxidasa.
- d) Desensamble y/o prevenir el ensamble de la oxidasa.

Algunos de los compuestos que inhiben el ensamble de las subunidades de NADPH oxidasa son: Gp91 dstat, AEBSF, PR-39, Nebivolol (tabla 1) y Apocinina (fig.9)<sup>2</sup>.

**Tabla 1.** Inhibidores del ensamblaje de las subunidades de NADPH oxidasa.

Nombre	Mecanismo de acción	Otros efectos
<b>Gp91 dstat</b> [H]–RKKRRQRRRCSTRIRQL-NH2	Inhibe el ensamble de la oxidasa, inhibiendo la asociación de Nox2 con p47.	No reportado
<b>AEBSF</b> 	Inhibe el ensamble de la oxidasa, inhibiendo la asociación de Nox2 con p47.	No es inhibidor de la serina.
<b>PR-39</b> RRRPRPPYLPRRPPPPFFPPRLPPRIPPGFPP RFPPPRFP	Se une al dominio SH3 de p47phox y previene la unión de p22 phox.	No selectivo, inhibe otras proteínas que tienen dominios SH3.
<b>Nebivolol</b> 	Inhibe la asociación con membrana y la interacción de p67 phox y Rac y disminuye la expresión de la oxidasa. Inhibe la producción de superóxido dependiente de NOX1	Bloqueador de los receptores $\beta$ adrenérgicos.

Uno de los compuestos más ampliamente utilizados en animales de experimentación es apocinina, la cual en algunas fuentes es mencionada como antioxidante o inhibidor de Rho cinasa mientras que en otras se menciona como inhibidor del ensamble de las subunidades de Nox2. Otros compuestos utilizados son: 4-(2-aminoethyl)-benzenesulphonyl fluoride (AEBSF) que bloquea la traslocación de p47phox hacia la membrana e inhibe las serinas proteasas. Difenilén iodonio (DPI) inhibe también otras enzimas como NOS y XO, las colinesterasas y las bombas de calcio internas.

Apocinina, AEBSF y DPI parecen tener poca especificidad como agentes farmacológicos cuando se valida el papel de NADPH oxidasa en alguna función fisiológica o patológica. En contraste, triazol pirimidinas tales como VAS3947 son específicas para NADPH oxidasa, pero no para NOS y XOD y no interfieren con los sistemas de ERO comúnmente utilizados<sup>2,16-23</sup>.

#### 4.4.1. Apocinina (4-hidroxi-3-metoxiacetofenona)

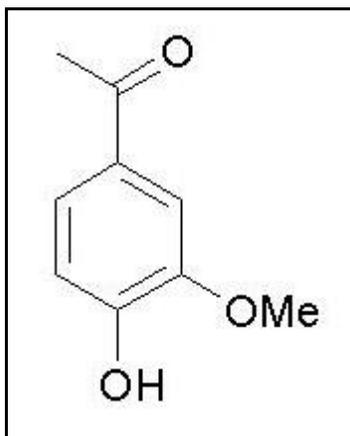
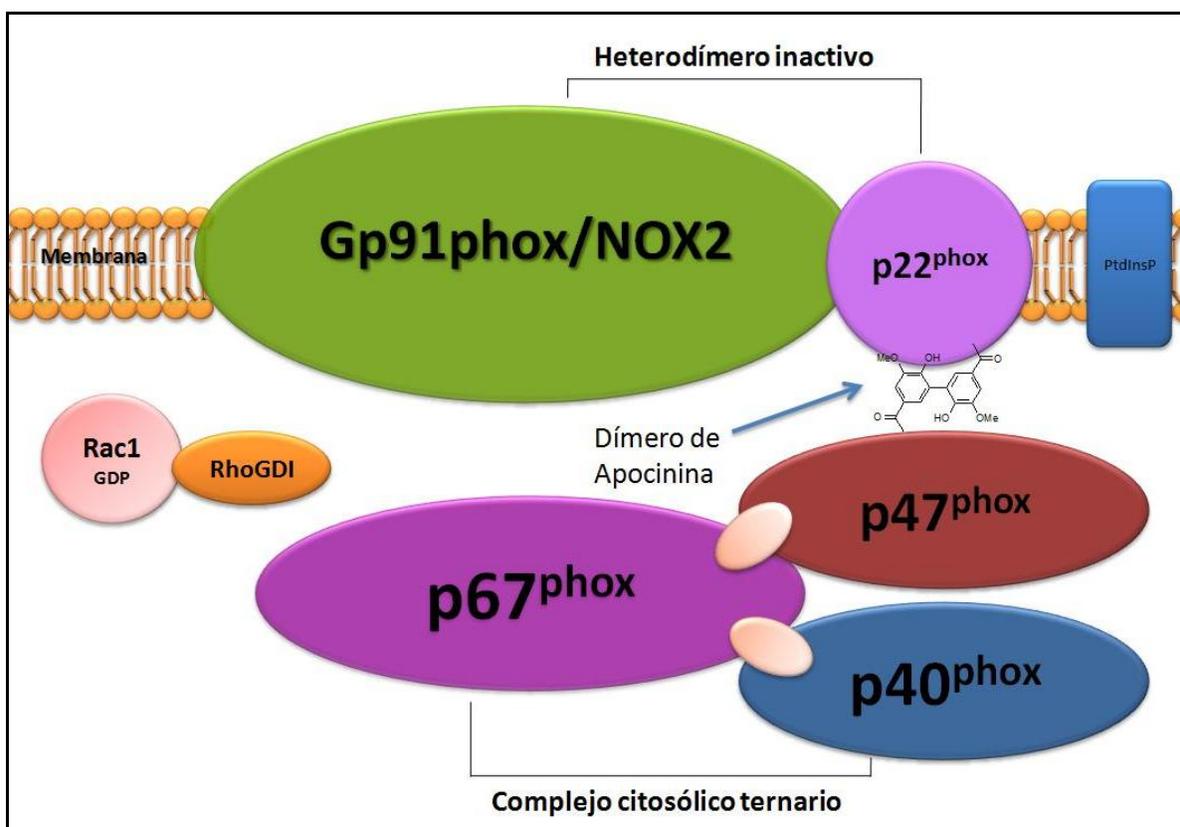


Figura 9. Apocinina.

Su estructura es un catecol orto-metoxi sustituido<sup>2,20</sup> (fig. 9) anteriormente usado para el tratamiento de condiciones inflamatorias. Aislado de las raíces de

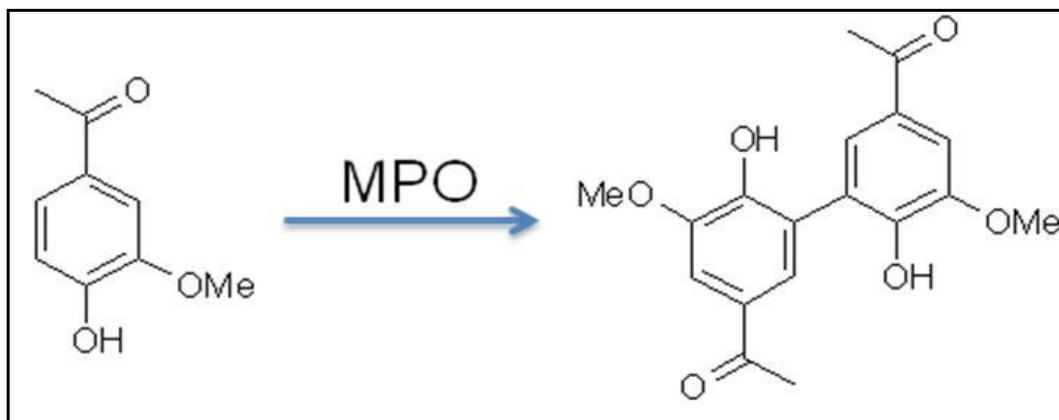
*Apocynum Cannabinum* (cáñamo canadiense) y de la raíz de *Picrohiza Kurroa*, una hierba perenne originaria del Himalaya. Tiene un peso molecular de 166.17 g/mol, es un polvo cristalino amarillo con aroma a vainilla. Soluble en solventes no polares como DMSO, cloroformo y alcoholes<sup>2</sup>.

Apocinina ha ganado reconocimiento como inhibidor de NADPH oxidasa, aunque su mecanismo de acción aún no es bien conocido, sin embargo algunos autores mencionan que el dímero de apocinina previene la asociación de sus subunidades citosólicas con las de membrana para inhibir la actividad de NADPH oxidasa, consiguiendo esto gracias a que se une a p47phox, justo en la región con que se une a p22phox (fig.10)<sup>2,15-23</sup>.



**Figura 10.** Inhibición del ensamblaje de NADPH oxidasa por Apocinina.

Al inhibir el ensamble de NADPH oxidasa se inhibe su función que es la producción de anión superóxido, permitiendo mayor disponibilidad de ON para la relajación del endotelio vascular, lo cual puede contribuir de manera importante al tratamiento de la hipertensión<sup>2,17-23</sup>.



**Figura 11.** El dímero de apocinina se forma por actividad de la enzima MPO formándose un enlace C-C en la posición orto al alcohol.

El dímero de Apocinina es generado por la actividad de la enzima mieloperoxidasa (MPO)<sup>2,17-23</sup> como se observa en la figura 11. Sin embargo, algunas bibliografías reportan que debido a que la enzima MPO no se produce en células endoteliales, no puede formarse el dímero de apocinina y por lo tanto en este tipo de células no puede actuar inhibiendo el ensamble de las subunidades, pero debido a la presencia de un grupo alcohol (-OH) en su estructura podría tener actividad como atrapador de radicales en células endoteliales, además de que proponen que la inhibición de NADPH oxidasa puede deberse a la inhibición de la fosforilación de la cinasa Rho<sup>22</sup>. Otras fuentes bibliográficas mencionan que apocinina no tiene mucha afinidad por la enzima MPO, ya que en experimentos en que recolectaron la orina de las ratas observaron que sólo un 20% de la apocinina adquiere la forma dimérica. Esto ha impedido que apocinina pueda ser

administrada como medicamento antihipertensivo, sólo se ha podido utilizar experimentalmente<sup>2,17-23</sup>.

## 5. Justificación del estudio

Actualmente la hipertensión es un padecimiento crónico considerado un grave problema de salud pública ya que en el año 2008 se reporto que ocupaba el séptimo lugar entre las principales causas de morbilidad en nuestro país ([www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx)), sus causas son múltiples y puede contribuir al desarrollo de algunos padecimientos como aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares e incluso puede causar la muerte, por lo que resulta de gran importancia disponer de medicamentos que permitan un mejor control del padecimiento.

La presencia de altos niveles de  $O_2^{\cdot-}$  en endotelio vascular tiene un amplio efecto oxidante, disminuye la biodisponibilidad del oxido nítrico y permite el desarrollo de padecimientos cardiacos. Su principal fuente es NADPH oxidasa, que produce una gran cantidad de  $O_2^{\cdot-}$  a nivel vascular. Motivo por el cual NADPH oxidasa es un blanco farmacológico importante, ya que al inactivar su función puede disminuir la presencia de ERO y sus efectos en el organismo.

Se han estudiado algunos inhibidores de NADPH oxidasa, entre los cuales se encuentra la Apocinina el cual a pesar de ser un compuesto que ha demostrado funcionar no se ha podido utilizar como fármaco debido a que su activación requiere la intervención de la enzima mieloperoxidasa (MPO) para formar el dímero o radical que inhibe a NADPH oxidasa y además presenta muy poca afinidad por NADPH oxidasa. Debido a esto es importante el desarrollo de derivados de apocinina que no requieran ser activados por la MPO, que presenten mayor afinidad por NADPH oxidasa, aumenten la disponibilidad del oxido nítrico y eviten la vasoconstricción producida por el anión superóxido.

## 6. Hipótesis

Apocinina presenta poca afinidad por NADPH oxidasa y requiere ser activada por la MPO, por este motivo, se espera que al sintetizar los compuestos derivados de apocinina presenten mayor afinidad por NADPH oxidasa, favoreciendo la disminución de  $O_2^{\cdot-}$  y por lo tanto contribuir a una mayor biodisponibilidad de ON.

## 7. Objetivo general

Diseñar, sintetizar y evaluar teórica y experimentalmente compuestos derivados de apocinina como inhibidores de NADPH oxidasa mediante estudios *in silico* e *in vitro*.

## 8. Objetivos particulares

1. Diseñar y sintetizar compuestos derivados de apocinina para evitar el ensamblaje de las subunidades que conforman a NADPH oxidasa inhibiendo su función.
2. Evaluar *in vitro* el efecto inhibitorio de los compuestos sintetizados sobre NADPH oxidasa en arteria aorta de ratas mediante RPE.
3. Evaluar mediante estudios teóricos la interacción de los compuestos diseñados con las subunidad p47phox de NADPH oxidasa.

## 9. MATERIAL Y METODOS:

### 9.1. Síntesis de compuestos derivados de apocinina

#### 9.1.1. CINP1A:

En un matraz bola de 10 ml se agregaron 166 mg (1 mmol) de apocinina, 5 ml de agua desionizada, 141.5 mg (1.5 mmol) de ácido cloroacético, 166 mg (1 mmol) de KI y por último, con agitación, se agregó poco a poco 345.5 mg (2.5 mmol) de  $K_2CO_3$ . Esta mezcla se reflujo durante 4 horas. Después se ajustó el pH (neutro) y se extrajo con acetato de etilo (dos veces). La solución acuosa se acidificó a pH 2, el precipitado formado se filtró y secó al vacío.

El rendimiento del producto obtenido en esta reacción fue de 117 mg (50 %) (fig.12).

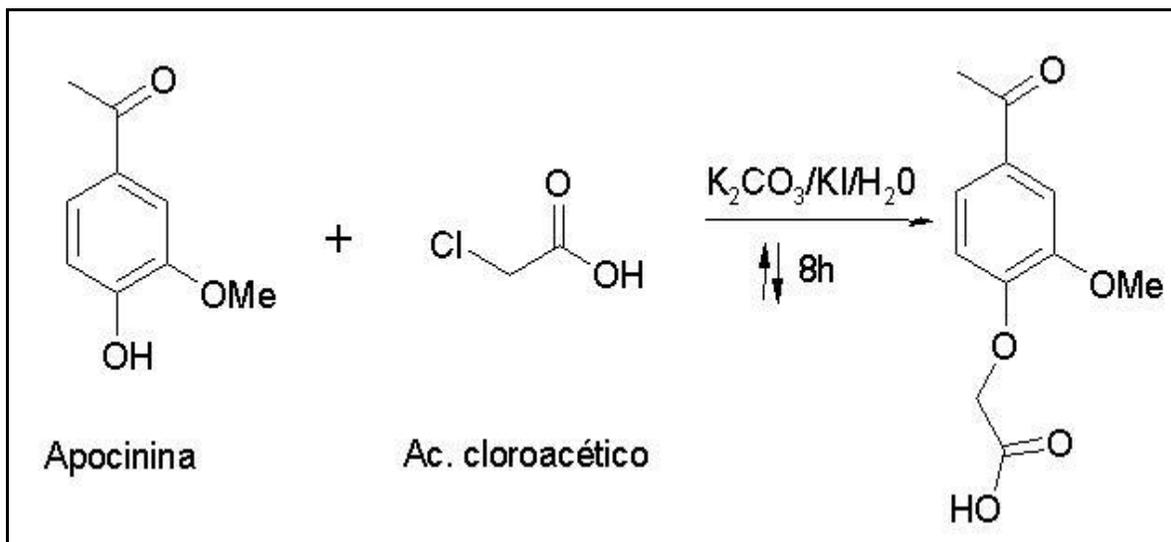


Figura 12. Síntesis del CINP1A.

### 9.1.2. CINP2A:

En un matraz bola de 10 ml se agregaron 166 mg (1 mmol) de apocinina, 0.14 ml (1.5 mmol) de ácido butanóico en 5 ml de etanol absoluto. Se agregaron 208 mg (1.5 mmol) de carbonato de potasio, 249 mg (1.5 mmol) de yoduro de potasio y se refluxó por 18 h. Se evaporó el disolvente y se acidificó a pH aproximado de 4 a 5. Se extrajo con acetato de etilo. Después de evaporar y secar al vacío, se refluxó con NaOH acuoso (10 %) por 30 minutos. Se ajustó el pH a neutro y se extrajo con acetato de etilo (dos veces). Se acidificó el pH a 2 y se extrajo nuevamente con acetato de etilo y se evaporó. Se agregó  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y carbón activado. Se filtró y evaporó al vacío. Se obtuvieron 128 mg (51 %) (fig.13).

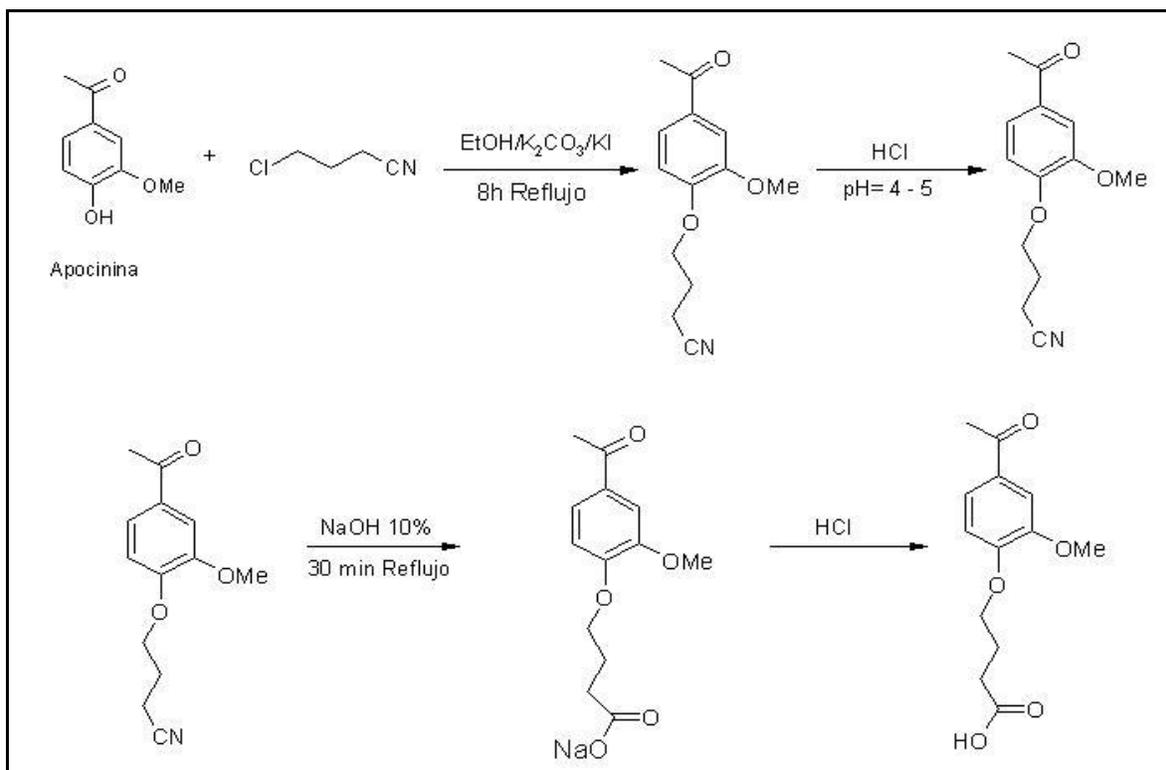


Figura 13. Síntesis del CINP2A.

### 9.1.3. CINP1B:

En un matraz bola de 10 ml se agregaron 830 mg (5 mmol) de apocinina, 855 mg (7.5 mmol) de anhídrido glutárico en 5 ml de DME y 1.4 ml (10 mmol) de TEA. Se reflujo con agitación durante una hora (fig.14).

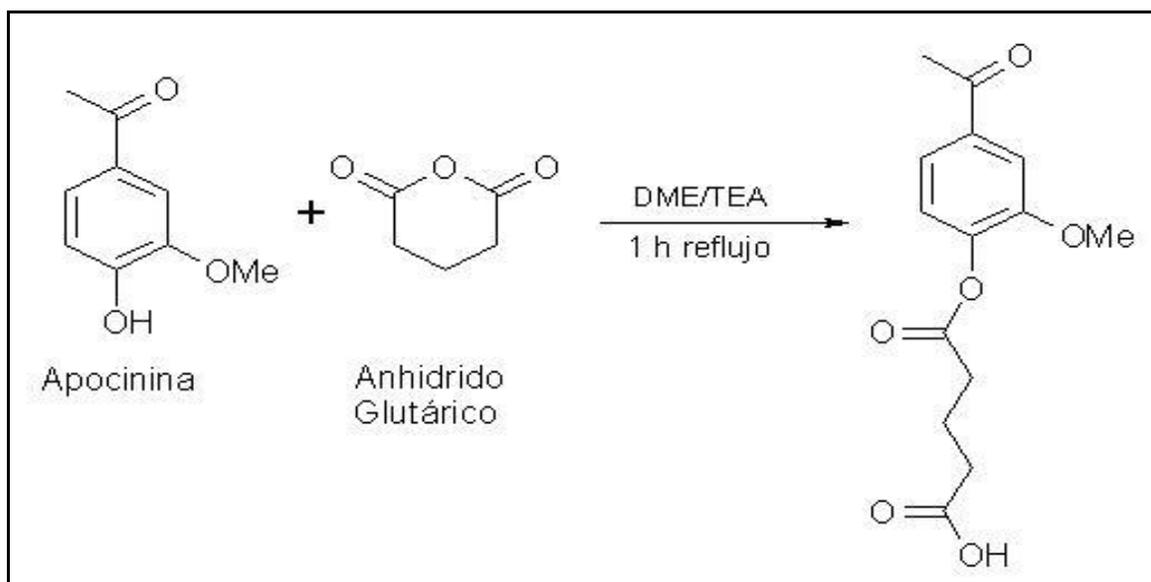


Figura 14. Síntesis del CINP1B.

Se agregó agua, en un embudo de separación, para eliminar la TEA. Se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro, se filtró la fase orgánica y se evaporó el disolvente. El rendimiento fue de 0.87 g (62 %).

### 9.1.4. Anhídrido Pimélico

Se pesaron 4 g de ácido pimélico (25 mmol) en un matraz de 25 ml y se agregaron 5 ml (53 mmol) de anhídrido acético. Se reflujo con baño de agua durante 2 horas a una temperatura de 70 a 80 °C. Se destiló el exceso de anhídrido y se secó al vacío. Se obtuvieron 3.3 g (93 %) (fig.15).

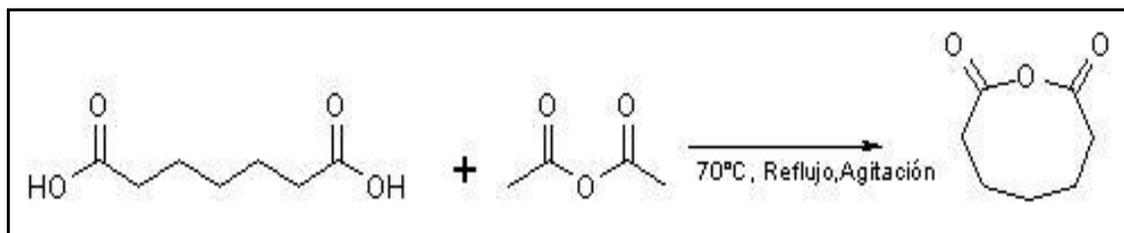


Figura 15. Síntesis del anhídrido pimélico

#### 9.1.5. C1NP2B:

En un matraz de 10 ml se agregaron 166 mg (1 mmol) de apocinina, 284 mg (2 mmol) de anhídrido pimélico, 5 ml de DME y 0.2 3 ml (2 mmol) de TEA. Se agitó durante dos horas a temperatura ambiente (fig.16).

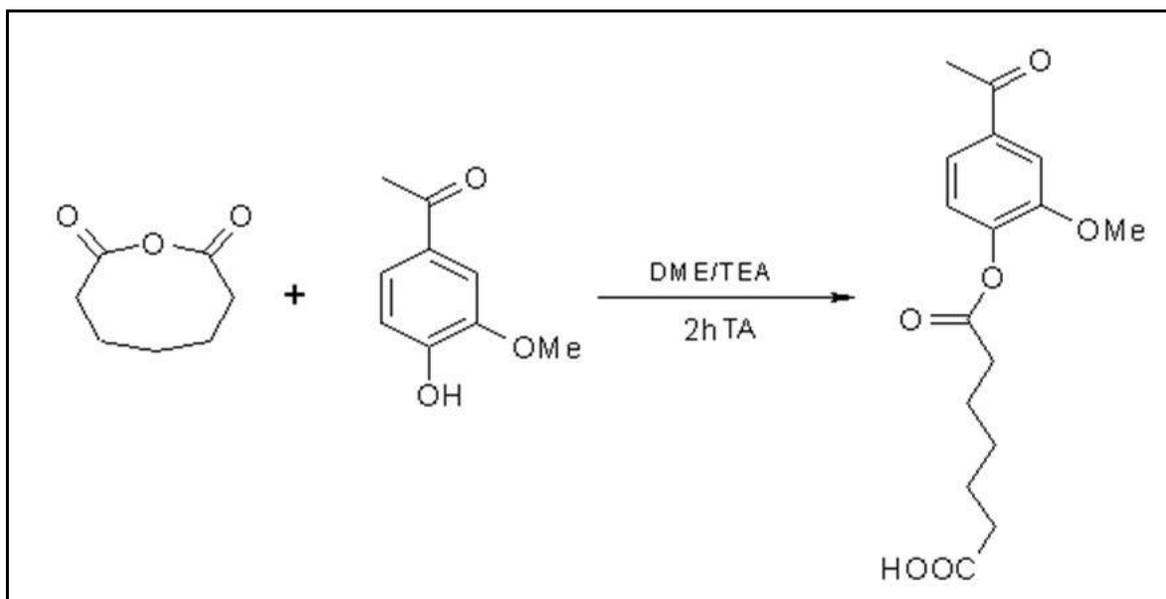


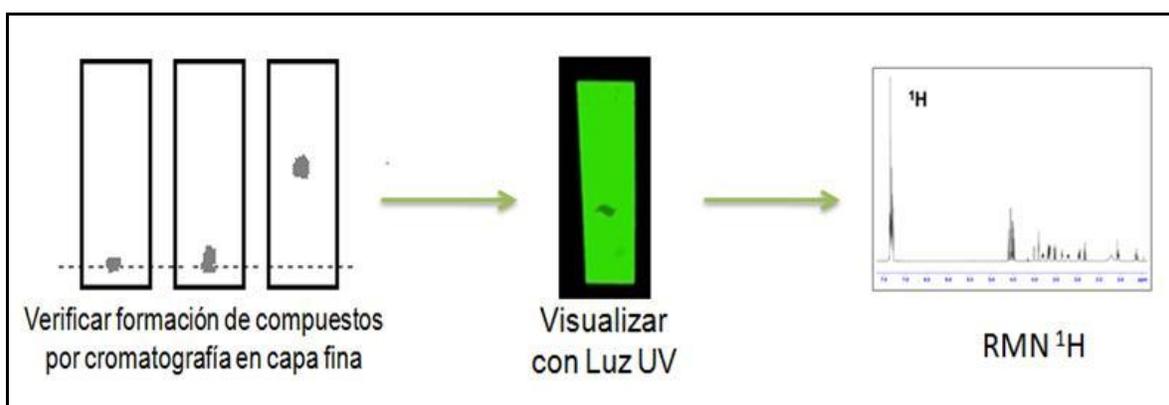
Figura 16. Síntesis del C1NP2B.

Se agregó agua para eliminar la base en un embudo de separación. La fase orgánica se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro, se filtró y se evaporó en el rotavapor. Para

purificarlo se usó cromatografía en columna con sílica gel usando mezcla de hexano/acetato de etilo. El rendimiento fue de 92 mg (30 %).

## 9.2. Caracterización de los compuestos derivados de apocinina

Se verificó la formación y pureza de ambos compuestos por cromatografía en capa fina, la cual se visualizó mediante una lámpara de emisión de luz UV (fig. 17).



**Figura 17.** Caracterización de los compuestos.

La caracterización se llevó a cabo mediante, resonancia magnética nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C con la determinación del punto de fusión de cada compuesto.

## 9.3. Prueba de DPPH

Esta prueba sirve para determinar radicales libres formados indirectamente con la reducción del DPPH. Se realizó con la finalidad de conocer si los compuestos son buenos atrapadores de radicales. En esta prueba el 2-2 difenil-2-Picrilhidrazoilo (DPPH) reacciona con una molécula antioxidante, la cual a través

de su rompimiento hemolítico genera la forma reducida del DPPH (DPPH<sup>•</sup>). La reacción ocurre de la siguiente manera:



**Z<sup>•</sup>** es el radical DPPH; **AH** es la molécula donadora y corresponde a nuestros compuestos: apocinina, CINP1A, CINP2A, CINP1B y CINP2B; **ZH** forma reducida del DPPH; **A** nueva especie radical formada.

La prueba de DPPH se puede ilustrar de la siguiente manera (fig. 18):

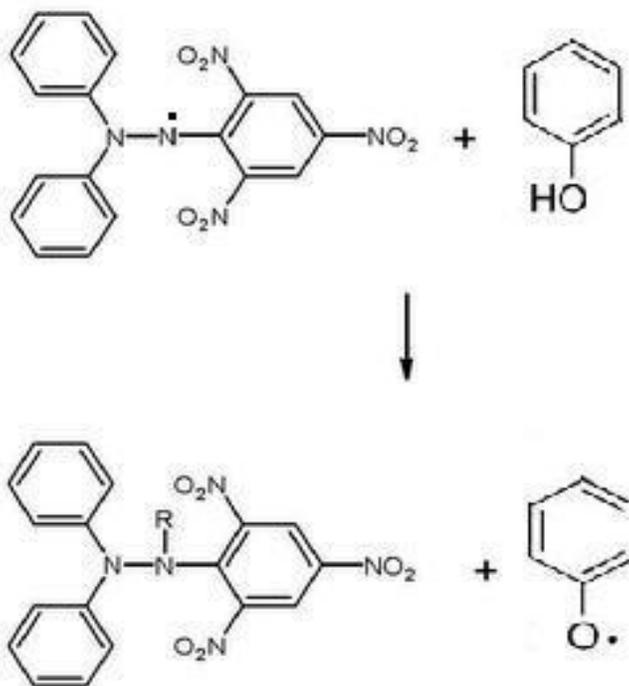


Figura 18. Prueba de DPPH.

Para la realización de esta prueba se preparó una solución  $3 \times 10^{-5}$  M de DPPH y una solución 1mM de Apocinina en DPPH, a partir de la cual se realizaron

9 diluciones con las concentraciones de: 1000, 100, 10, 1, 0.1, 0.01  $\mu\text{M}$ , y para cada compuesto derivado de apocinina se realizó el cálculo mol a mol.

Se realizaron pruebas por triplicado en placas de elisa de la siguiente manera agregando 1 a 1 la solución del compuesto con DMSO, la solución del compuesto con DPPH y la solución de DPPH con DMSO. Se mantuvieron en la oscuridad durante 60 minutos y se midieron a una longitud de 490 nm.

El porcentaje de actividad antioxidante para esta prueba de DPPH se obtuvo utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Actividad antioxidante} = (1 - (A_i - A_j) / A_c) \cdot 100$$

Donde  $A_i$  corresponde al compuesto con DPPH;  $A_j$  al compuesto con DMSO;  $A_c$  es DPPH con DMSO. Se graficaron los datos obtenidos del porcentaje de actividad antioxidante contra la concentración de las soluciones y se compararon<sup>69</sup>.

#### 9.4. Obtención de los tejidos

Para la obtención de las arterias se emplearon ratas wistar macho de 12 semanas. Todos los animales se aclimataron por una semana antes de comenzar los experimentos. Los animales se mantuvieron en un ambiente con temperatura y humedad controladas, con ciclos automáticos de luz y oscuridad de 12/12 horas. El agua y alimento fueron proporcionados *ad libitum*. Cabe señalar que los procedimientos realizados en animales cumplieron con los requerimientos que en materia determinan la NOM-062-ZOO-1999 (especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, sagarpa y la guía para el cuidado y el uso de los animales de laboratorio, National Research Council).

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico (50mg/Kg ip) y se les administró heparina como anticoagulante. (500 U ip). La arteria aorta fue removida después de la toracotomía y se colocó en una solución de Fosfatos pH=7.4 a una concentración de 50µM, se congeló a -80°C para posteriormente ser utilizada en los ensayos de actividad enzimática de NADPH oxidasa.

#### **9.5. Determinación de la actividad enzimática de NADPH oxidasa**

Se juntaron varias arterias aorta y se homogenizaron con 950µl de buffer Tris-Cl pH 7.4 y 50 µl del inhibidor de proteasas (0.1 mmol/L de fenilmetilsulfonil fluoride, 2 µmol/L bestatina, 2 µmol/L leupeptina). Las muestras se centrifugaron a 2700 rpm durante 10 minutos a 4 °C y el sobrenadante se almacenó a -80 °C hasta su uso.

Se determinó la concentración de proteínas con base en el método de Bradford utilizando un Kit de Cayman (Protein Determination Reagent –item No. 704004 y Proteín Determinatióón BSA standard – Item No. 704003).

Preparación de la muestra: 30 µg de la proteína por muestra y 10 µmol/L de porbol, se añaden al buffer de reacción (buffer de fosfato de sodio 50 mM, pH 7.4) conteniendo el atrapador de radicales PP-H (1-hydroxy-4-phosphonooxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidina) (5 mM). Las mediciones se comenzarán por la adición del sustrato 100 µmol/L de NADPH, 100 µmol de NADH en capilares de vidrio de 50µL (Corning). La formación de anión superóxido se determinó mediante la oxidación de PP-H (paramagnético).

Se realizaron algunas variaciones en la preparación de la muestra para determinar algunos parámetros importantes como la producción total de anión

superóxido en la muestra en presencia de cada uno de los componentes. Se prepararon como se indica a continuación (tabla 2):

**Tabla 2:** Preparación de las muestras para conocer la producción de anión superóxido por cada uno de los componentes de la muestra:

<b>Muestra</b>	<b>Contiene</b>	<b>Objetivo</b>
1	Buffer, PP-H	Conocer la señal que produce el PP-H solo.
2	Proteína, Porbol, PP-H, NADH, NADPH, Buffer	Conocer la intensidad de señal de la reacción completa.
3	Proteína, Porbol, PP-H, NADH, Buffer	Conocer si en ausencia de NADPH se produce señal, ya sea porque reacciona con NADH o algún otro componente de la muestra.
4	Proteína, PP-H, Buffer	Conocer si se produce señal aún sin activación de la proteína con Porbol.
5	Proteína, Porbol, PP-H, Buffer	Conocer si hay presencia de señal aún sin NADH y NADPH que son los donadores de protones.

Se mantuvieron en baño maría a aproximadamente 37°C y se realizaron mediciones cada 10 minutos durante 50 minutos para monitorear el avance de la reacción.

Para conocer el efecto de otros inhibidores conocidos como son: Oxopurinol<sup>65-68,70,71</sup> para xantina oxidasa y apocinina<sup>17-22</sup> para NADPH oxidasa, se prepararon las muestras de la siguiente manera (tabla 3).

**Tabla 3:** Preparación de las muestras para conocer el efecto de los inhibidores conocidos.

<b>Muestra</b>	<b>Contiene</b>	<b>Objetivos</b>
1	Proteína, Porbol, PP-H, NADH, NADPH, Buffer	Conocer la intensidad de señal de la reacción completa.
2	Proteína, Porbol, PP-H, NADH, NADPH, Buffer, Oxopurinol	Conocer la intensidad de señal sin presencia del anión superóxido producido por Xantina Oxidasa
3	Proteína, Porbol, PP-H, NADH, NADPH, Buffer, Apocinina	Conocer la intensidad de señal sin presencia del anión superóxido producido por NADPH oxidasa.

Para conocer el efecto de los compuestos derivados de apocinina se adicionaron a la reacción completa mol a mol respecto a apocinina. La actividad de NADPH oxidasa se determinó mediante EPR usando 1-hydroxy-4-phosphonoxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidin (PP-H) como atrapador de radicales<sup>8</sup>. Las mediciones se llevaron a cabo con las siguientes condiciones: Campo 3480 G, ancho de banda 60 G, frecuencia de microondas 9.743 GHz, potencia de microondas 17.390 mW, frecuencia de modulación de campo magnético 86.00 KHz; amplitud de la modulación 1.55 G, constante de tiempo 40.960 ms, detector de la constante de tiempo, 5.243s<sup>65-68,70,71</sup>. Se graficó el área bajo la curva de la concentración de anión superóxido obtenida en cada espectro realizado.

## 9.6. Análisis Estadístico

Los resultados fueron expresados como las medias y el error estándar de estas ( $\pm$  ESM). Los datos obtenidos en los diferentes experimentos fueron analizados estadísticamente mediante un método de análisis de varianza unifactorial (ANOVA) y las medias de los diferentes grupos fueron comparadas

con la prueba de Holm-Sidak. Un valor de  $p < 0.05$  se considera para establecer que existe diferencia significativa entre los diferentes grupos.

### 9.7. Cálculos Teóricos:

Para realizar los cálculos teóricos es necesario tener la proteína cristalizada, ya que los resultados obtenidos se asemejaran más a los experimentales.

Debido a la complejidad de la enzima NADPH oxidasa, no se ha podido obtener la estructura cristalizada de cada una de sus subunidades, por lo cual se eligió el segmento cristalizado más largo. La enzima sobre la cual se realizaron las simulaciones de Docking se obtuvo del Protein Data Bank (PDB) el archivo es 1NG2.pdb, que contiene la porción de p47phox que se une con p22phox además de la región que contiene los residuos de aminoácidos que se fosforilan que son Ser303, Ser304, Ser315, Ser320 y Ser328 abarcando de Ile157 a Leu332. Este segmento se comparo con otro segmento cristalizado que contenía las porciones de p47phox y p22phox, también obtenido del PDB (1WLP.pdb) para poder observar la superficie de unión.

A este archivo se le eliminaron las moléculas de agua y ligandos ajenos a la enzima. Esto se realiza usando el editor de texto WordPad. Después de aislar los ligandos ajenos a la proteína, se adicionan los átomos de hidrógeno, cargas parciales y parámetros de solvatación, utilizando el programa AutoDockTools 1.5.4.

Se determinan los átomos de hidrógeno polares, es decir, aquellos unidos a átomos electronegativos que pueden participar en interacciones por puente de hidrogeno y se adicionaran parámetros de solvatación.

La estructura de los compuestos modelados se construyó utilizando el programa isis/draw y se pre-optimizaron geoméricamente con Hyperchem 6.0 por mecánica molecular (+MM). Posteriormente se utilizó un método semi-empírico (AM1) y finalmente, dichas estructuras se optimizaron usando un método de Teoría de Funciones de la Densidad (DFT) B3LYP/6-31G\* en el programa Gaussian 98 y se convirtieron a formato \*.pdb con el programa Molekel 4.3.

Una vez optimizadas las estructuras se adicionaron cargas parciales de Gasteiger y se definieron los átomos de hidrógeno polares mediante el programa AutoDockTools. Enseguida se especificaron los carbonos aromáticos, se identificaron las porciones rígidas de las moléculas y se especificaron los enlaces que presentan libre rotación.

Los mapas de afinidad atómica se generaron para cada archivo \*.pdbqs de las enzimas, utilizando el programa AutoGrid 3.0. Para cada receptor se generó un mapa de afinidad por cada tipo de átomo generado en los ligandos. En primer lugar se especificó cada uno de los tipos de átomos presentes en los ligandos. Después, a la enzima se le delimitó el volumen a analizar que en este caso fue todo el segmento de la proteína ya que no se conoce el sitio exacto donde se une Apocinina. Esta información se almacenó en un archivo \*.gpf, que es utilizado por el programa AutoGrid para generar los mapas de afinidad. Estos datos fueron utilizados por el programa AutoDock para determinar la afinidad de los inhibidores por la enzima.

La ejecución del programa AutoDock requiere la estructura de la enzima en formato \*.pdbqs con los respectivos mapas de afinidad atómica (\*.gpf), las estructuras de los inhibidores en formato \*.pbdq y un archivo de parámetros \*.dpf. Este último se creó utilizando el programa AutoDockTools. El método a utilizar fue el algoritmo Genético-Lamarckiano implementado en AutoDock, los parámetros a

utilizar fueron los siguientes: 100 corridas, 100 individuos en la población,  $1 \times 10^7$  evaluaciones de energía y en 27000 generaciones. El resto de los parámetros fueron tomados con los valores iniciales propuestos por el programa.

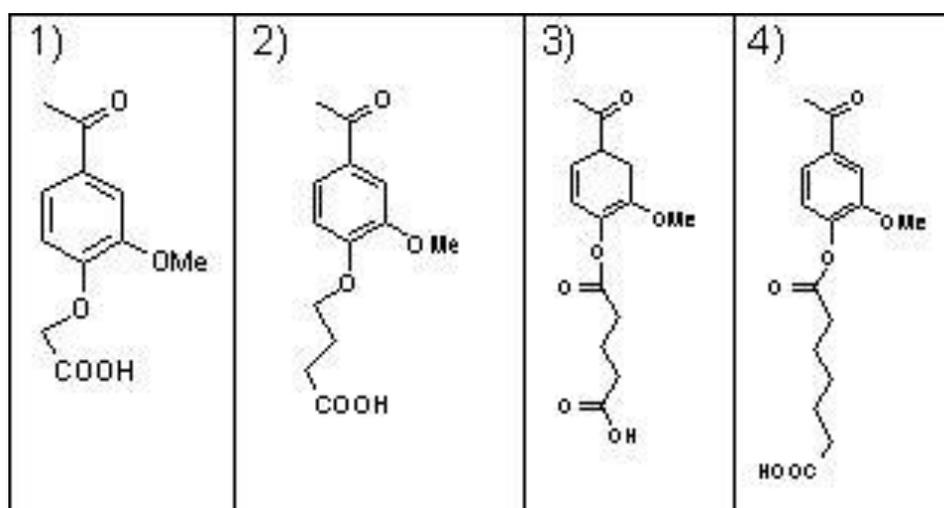
El programa AutoDock generó un archivo de salida \*.dlg el cual contiene las conformaciones y energías libres de unión para cada una de las corridas solicitadas. A esta información se accede con ayuda del programa AutoDockTool. Con este se pueden visualizar las interacciones no covalentes y sus respectivas distancias encontradas. Los complejos tridimensionales receptor-inhibidor fueron visualizados y analizados utilizando el programa VMD.

Para comprobar que los experimentos realizados en el homogenizado de aortas de rata wistar son reproducibles en humanos, se realizó un alineamiento entre las proteínas de rata y de humano. Se obtuvieron las secuencias FASTA de las proteínas p22phox de rata (Q62737|CY24A\_RAT) y humano (P13498|CY24A\_HUMAN) al igual que p47phox de rata y de humano y se alinearon en el servidor ClustalW2 para obtener la homología.

## 10. Resultados y Discusión

### Síntesis química:

Se sintetizaron los compuestos derivados de apocinina, estos fueron: éteres (CINP1A y CINP2A) y esterres (CINP1B y CINP2B) (Figura 22).



**Figura 19.** Compuestos sintetizados a partir de Apocinina.

Éteres 1) CINP1A y 2) CINP2A.

Esteres 3) CINP1B y 4) CINP2B.

En las siguientes figuras se observan los espectros obtenidos mediante RMN para cada uno de los compuestos sintetizados donde en cada espectro se observaron las señales que integran para la estructura de cada uno de los compuestos (Figuras 20, 21, 22, 23).

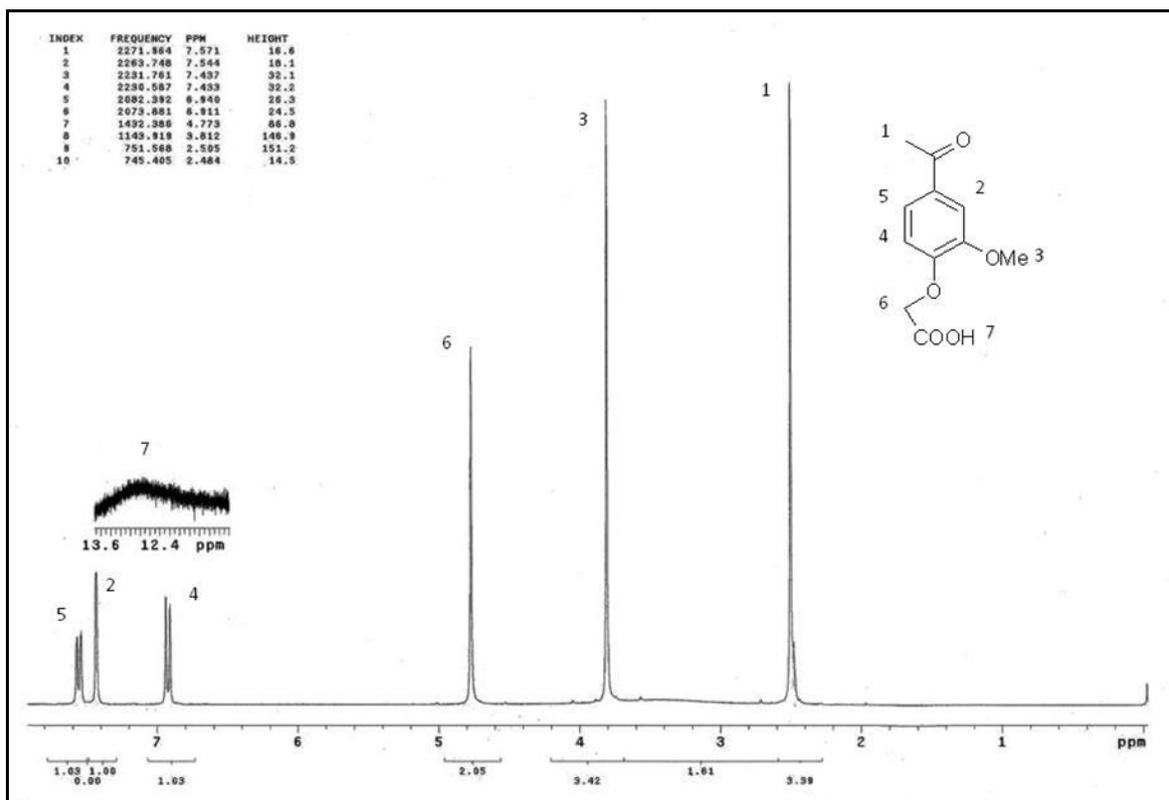


Figura 20. Espectro de RMN de H<sup>1</sup> del CINP1A.

En el espectro correspondiente al CINP1A (fig. 20) observamos entre 12.4 y 13.6 ppm la señal curva característica para el protón (H<sup>1</sup>) del grupo carboxilo (-COOH) asignada con el número 7; los 3 picos localizados de 6.9 a 7.6 ppm integran para los H<sup>1</sup> del grupo aromático, asignados en la estructura con los números 2, 4 y 5; el pico de 4.8 ppm integra para los 2 protones del -CH<sub>2</sub>- marcado con el número 6 en la estructura; mientras que los picos de 3.8 y 2.5 ppm integran para los 3 protones de -O-CH<sub>3</sub> marcado con el número 3 y del -CO-CH<sub>3</sub> marcado con el número 1 (fig. 20).

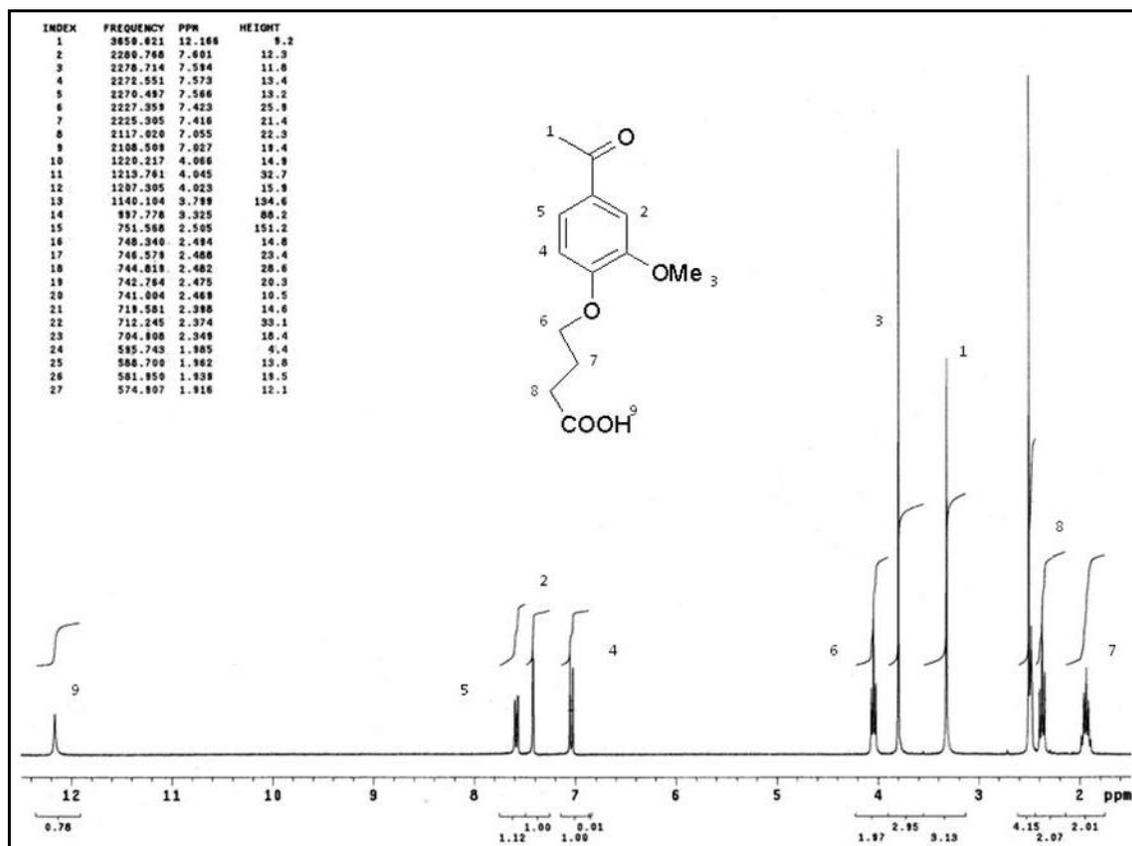


Figura 21. Espectro de RMN de H<sup>1</sup> del CINP2A.

En el espectro correspondiente al CINP2A (fig. 21) la señal curva localizada entre 12.4 y 13.6 ppm integra para el H<sup>1</sup> del carboxilo asignado con el número 9 en la estructura del compuesto; las señales que se encuentran entre 7 y 8 ppm marcadas con los números 2, 4 y 5 corresponden a los H<sup>1</sup> del grupo aromático; los picos de 4, 2 y 2.5 ppm integran para los protones del -CH<sub>2</sub>- de la cadena y están marcados en la estructura con los números 6, 7 y 8. Las señales de 3.8 y 3.2 ppm integran para los grupos -O-CH<sub>3</sub> y -CO-CH<sub>3</sub> asignados en la estructura con los números 3 y 1.

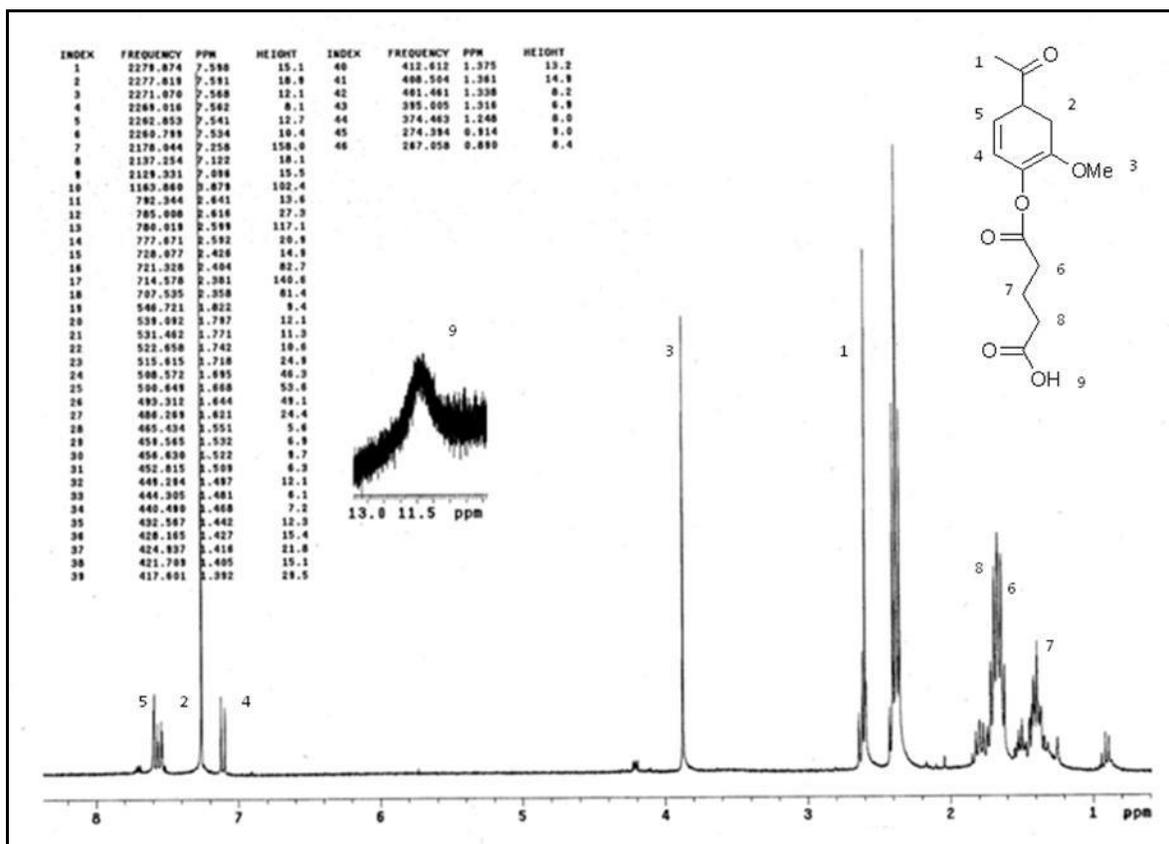


Figura 22. Espectro de RMN de H<sup>1</sup> del CINP1B.

En el espectro correspondiente al CINP1B (fig. 22) se observa la señal curva localizada aproximadamente a 11.5 ppm que integra para el H<sup>1</sup> del -COOH que tiene el número 9 en la estructura del compuesto; las señales que se encuentran entre 7 y 8 ppm corresponden a los H<sup>1</sup> del grupo aromático y están asignados en la estructura del compuesto con los números 2, 4 y 5; el pico de 3.9 ppm integra para los 3 H<sup>1</sup> del -O-CH<sub>3</sub> asignado con el número 3; el pico de 2.6 ppm corresponde al los H<sup>1</sup> de -CO-CH<sub>3</sub> correspondiente al número 1 en la estructura; los picos que se encuentran entre 1 y 2 ppm integran para los -CH<sub>2</sub>- de la cadena y están indicados con los números 6, 7 y 8.

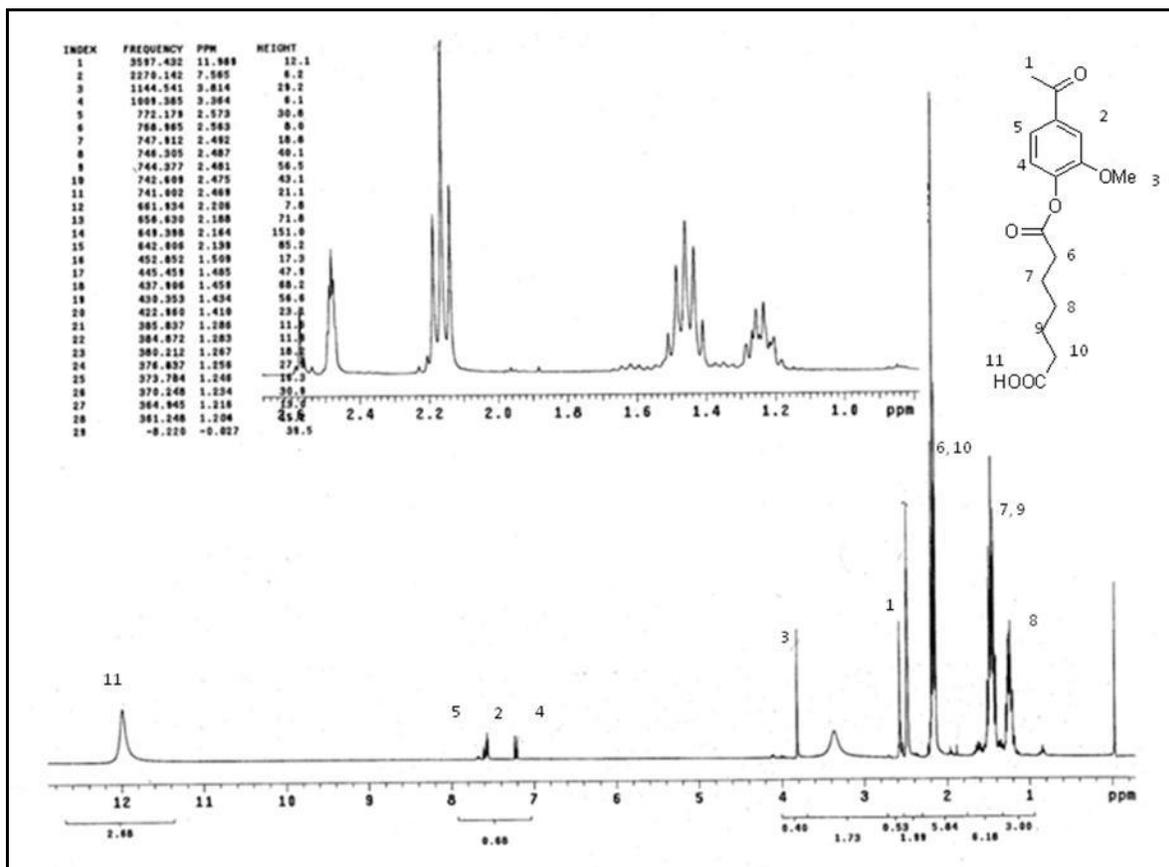


Figura 23. Espectro de RMN de H<sup>1</sup> del CINP2B.

En el espectro de la figura 23 correspondiente al CINP2B se observa en 12 ppm la señal curva que integra para el H<sup>1</sup> del carboxilo que corresponde al número 11 en la estructura del compuesto; las señales que se encuentran entre 7 y 8 ppm corresponden a los H<sup>1</sup> del grupo aromático y están asignados en la estructura del compuesto con los números 2, 4 y 5; en 3.9 ppm se localiza un pico que integra para los 3 H<sup>1</sup> del -O-CH<sub>3</sub> asignado con el número 3; el pico de 2.6 ppm corresponde al H<sup>1</sup> de -CO-CH<sub>3</sub> marcado como número 1 en la estructura; los picos que se encuentran entre 1 y 2.5 ppm integran para los -CH<sub>2</sub>- de la cadena y están asignados en la estructura con los números 6, 7, 8, 9 y 10 (fig. 23).

**Tabla 4:** Solubilidad y puntos de fusión de los compuestos sintetizados.

<b>Compuesto</b>	<b>Solubilidad</b>	<b>Punto de fusión</b>
<b>CINP1A</b>	Acetato de etilo, DME, DMSO, etanol.	140 -142 °C
<b>CINP2A</b>	Acetato de etilo, DME, DMSO, etanol.	160 – 162 °C
<b>CINP1B</b>	Acetato de etilo, DMSO y DME.	70 – 72 °C
<b>CINP2B</b>	Acetato de etilo, DMSO y DME.	74 – 76 °C

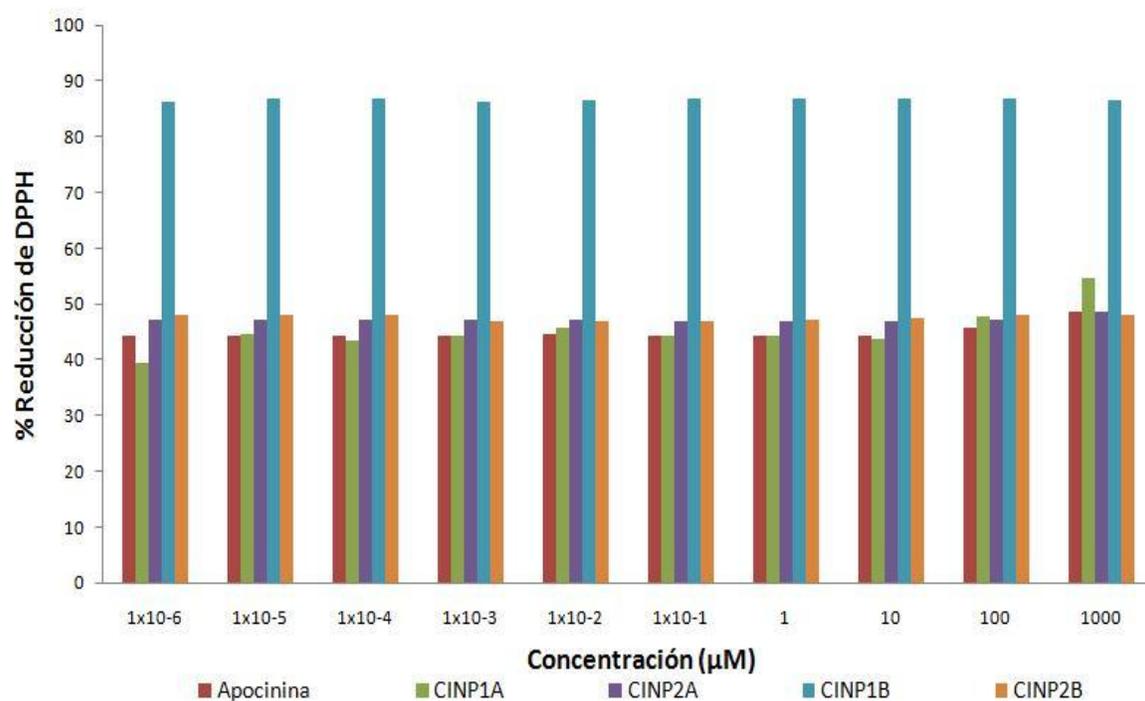
#### **Prueba de DPPH:**

En la gráfica 1 se graficaron los resultados obtenidos en la prueba de DPPH y observamos que apocinina lo reduce un 44.2% en una concentración de  $1 \times 10^{-6} \mu\text{M}$  y un 48.5% a una concentración  $1000 \mu\text{M}$  dando un incremento del 4.3% lo que nos indica que la capacidad de apocinina para reducir al DPPH no aumenta proporcionalmente con el aumento de la concentración ya que si tuviera esta capacidad antioxidante se observaría un mayor incremento en la reducción del DPPH como ha sido reportado en sustancias como flavonoides que si poseen esta actividad<sup>71</sup>.

En la gráfica 1 también podemos observar que los compuestos tuvieron un comportamiento similar al de la apocinina. El compuesto CINP1A incremento de 39.4 a 54.5% su capacidad para reducir al DPPH sólo fue 15.1%. Se observa que el CINP2A sólo aumento un 1.5%, de 47.2 a 48.7% su capacidad de reducción del DPPH.

El CINP2B no incremento su capacidad de reducción del DPPH, se mantuvo en 47.9% (Gráfica 1). Mientras que para el CINP1B se observó que su

capacidad de reducción se mantuvo en 86.7% a pesar del incremento de las concentraciones, sin embargo estos valores son demasiado altos y sugieren que la molécula pudo presentar una transesterificación y descomponerse en apocinina y ácido glutárico debido a la poca estabilidad observada durante las pruebas de solubilidad, en la cual observamos que al disolverlo en el buffer de reacción y otros solventes orgánicos y realizar placas de cromatografía se observaban 2 manchas aparte de la del compuesto y a las 2 horas sólo eran visibles esas 2 manchas indicando la descomposición del compuesto. Sin embargo, aún no es conocido que el ácido glutárico posea capacidad antioxidante ya que no realizamos esta prueba.



**Gráfica 1:** Resultados de la Prueba de DPPH.

Por lo tanto, con ninguno de los compuestos se observó un incremento en el porcentaje de reducción del DPPH con respecto a la concentración de los compuestos, lo que puede indicarnos que los compuestos no reaccionan con

especies reactivas de nitrógeno como el DPPH, a pesar de que se ha mencionado que el grupo alcohol (-OH) presente en la estructura de apocinina le confiere propiedades antioxidantes<sup>22</sup>. Sin embargo, apocinina y los compuestos sintetizados tuvieron resultados similares, aunque los compuestos ya no presentan el grupo alcohol en su estructura al que pueda atribuírsele esta propiedad ya que se utilizó para formar los éteres y esterés. Además al analizar la estructura de la molécula de apocinina podemos observar que el grupo -O-CH<sub>3</sub> que se encuentra en posición orto al alcohol es un fuerte electroatractor que le da estabilidad a la molécula e impide que el grupo alcohol pueda reducir al anión superóxido. Además, cuando realizamos la síntesis de los compuestos también nos dimos cuenta de que apocinina no es muy reactiva por el grupo alcohol, sólo bajo ciertas condiciones que en el caso de la síntesis química fueron reflujo y DMSO como solvente. Por lo tanto, con la prueba de DPPH se puede concluir que apocinina no es una molécula antioxidante<sup>22</sup> y al mismo tiempo podemos considerar que tampoco los compuestos sintetizados tienen actividad antioxidante. Sin embargo, podría ser que apocinina y sus derivados fueran buenos atrapadores de radicales centrados en oxígeno como el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> o el •OH por lo tanto podrían evaluarse mediante reacciones con Xantina/Xantina oxidasa y mediante la reacción de Fenton respectivamente.

### **Actividad Enzimática con EPR**

Una vez sintetizados y caracterizados los compuestos derivados de apocinina se evaluó el efecto inhibitorio sobre la actividad de NADPH oxidasa cuantificando la producción de O<sub>2</sub><sup>•-</sup> mediante RPE. Sin embargo, como la vida media del O<sub>2</sub><sup>•-</sup> es muy corta se empleó PPH como atrapador de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, el cual al reaccionar con el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> nos da un espectro como el de la figura 24, en donde se obtuvieron espectros con 3 señales correspondientes al aducto formado por la interacción entre el electrón desapareado del PP-H y el hidrógeno del O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

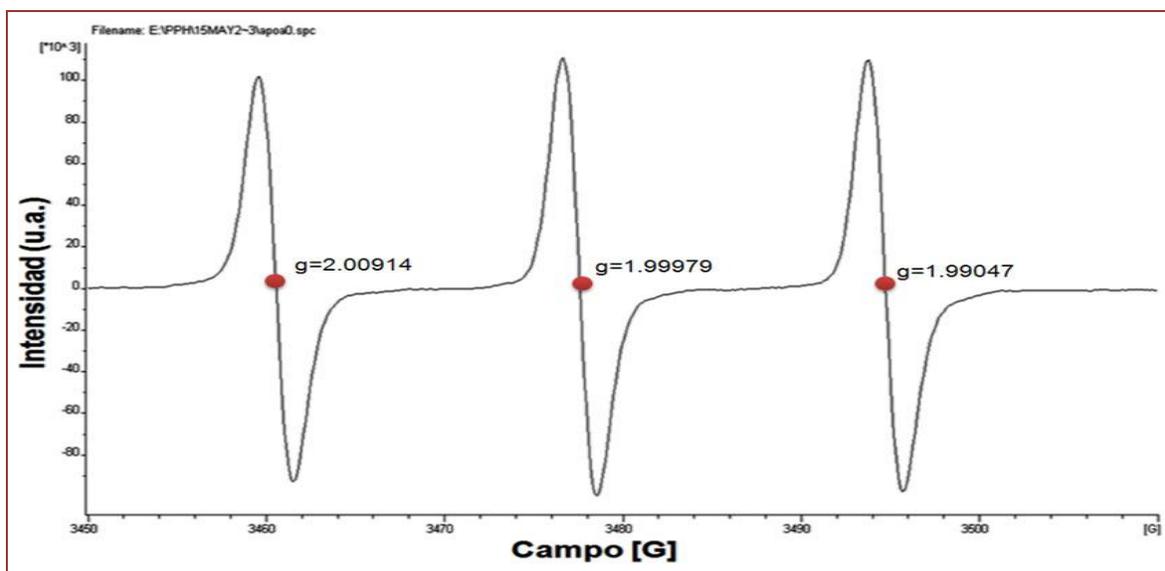


Figura 24: Espectro de EPR característico de PPH.

Se eligió el PP-H como atrapador de radicales (fig. 25) debido a que es específico para  $O_2^{\cdot -}$  y peroxinotrito en reacciones extracelulares *in vitro* e *in vivo*<sup>70</sup>.

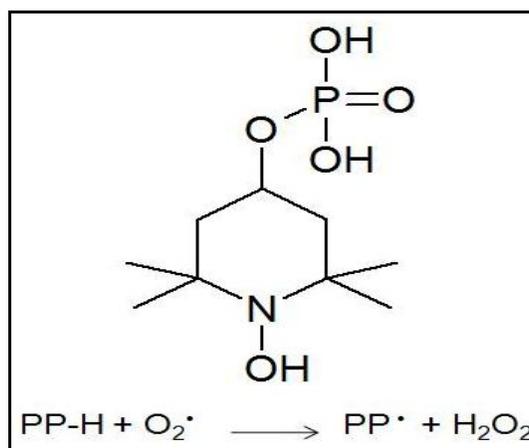


Figura 25. Estructura química del PPH.

Mediante la doble integral de la señal observada en el espectro de la figura 24 es posible obtener el área bajo la curva, la cual es proporcional a la cantidad de radicales libres presentes en la muestra (gráfica 2). En este caso el área bajo la

curva de cada espectro será interpretada como la cantidad de  $O_2^{\cdot -}$  presente en las muestras. De cada espectro se obtienen los valores de g que se localiza en la parte media entre el pico superior y el inferior tal y como se muestra en la figura 24. Para radicales libres se ha reportado que la g debe ser aproximada a 2 ( $g=2.0023$ )<sup>61</sup>, y se obtiene con la ecuación:

$$h\nu = g\beta B_0$$

donde  $h\nu$  = frecuencia;  $g$  = factor g ;  $\beta$  = constante del magnetón de Bohr;  $B_0$  = campo magnético.

Para el cálculo del área bajo la curva de cada pico en cada espectro, utilizamos el programa WINEPR System (fig. 26), el cual nos permite integrar cada pico obteniendo una campana de gauss y nos proporciona el área bajo la curva de cada pico.

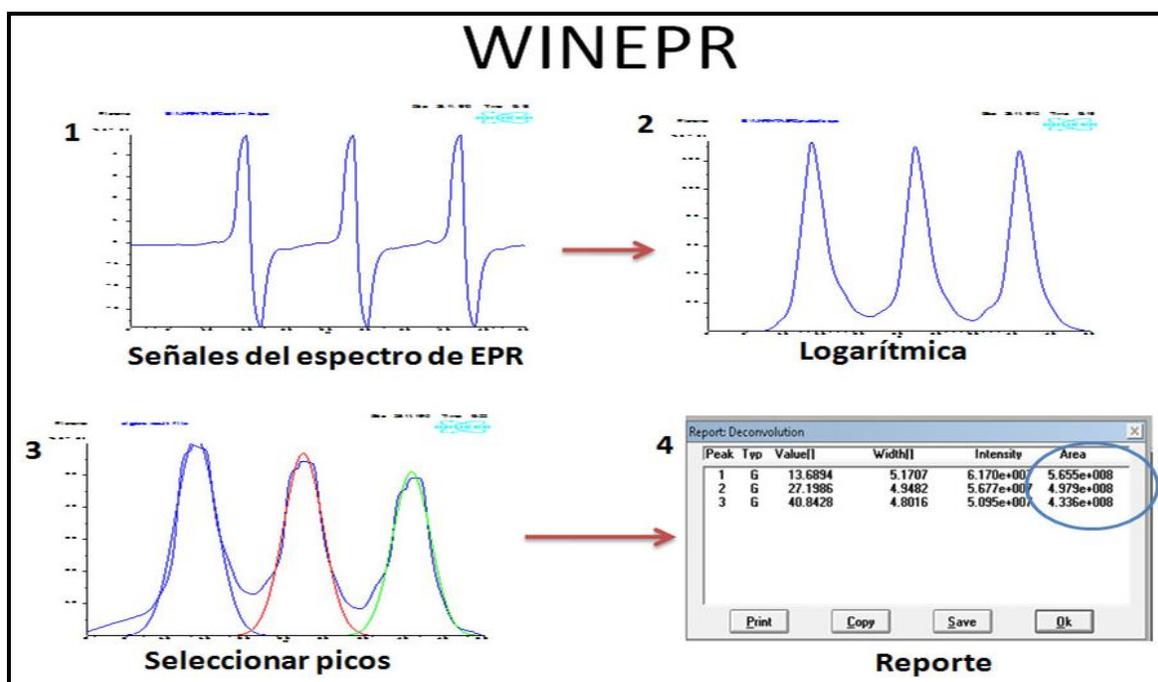
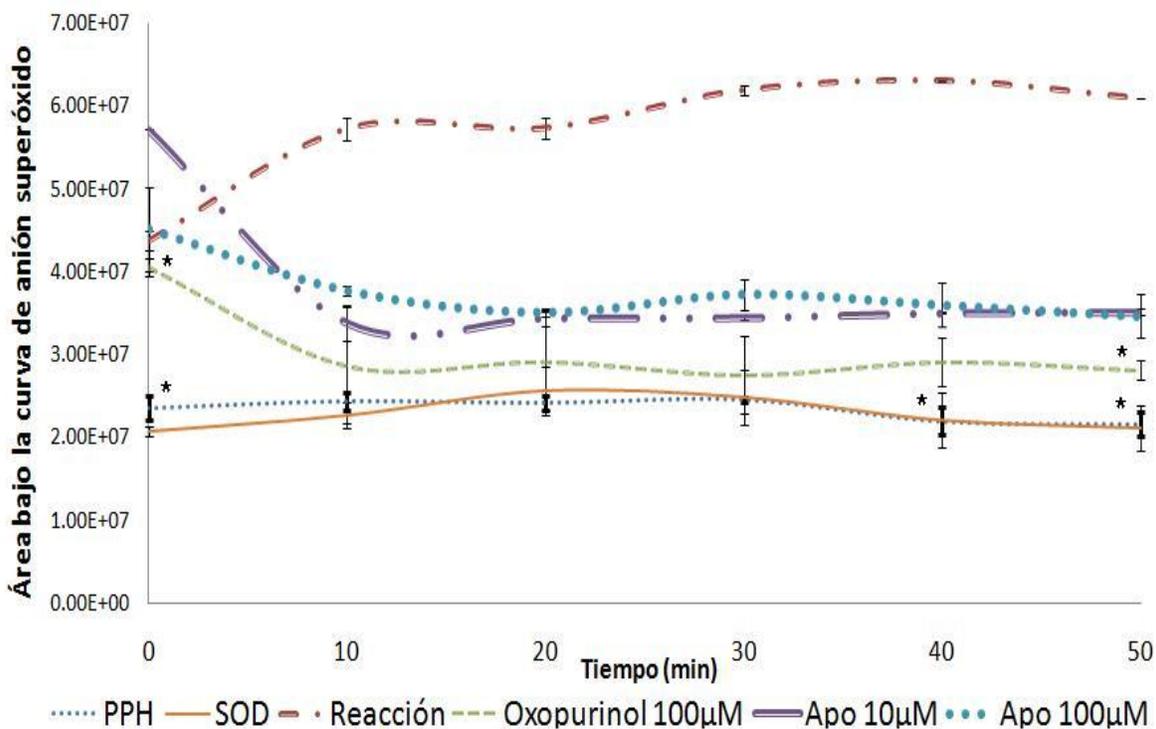


Figura 26. Obtención del área bajo la curva con el programa WINEPR

Con basé a los datos obtenidos de estos experimentos se evaluó la actividad inhibitoria de los compuestos sintetizados sobre NADPH oxidasa adicionando a la mezcla de reacción cantidades equimolares de los compuestos con respecto a la cantidad empleada de apocinina (10µM).



**Gráfica 2.** Resultados de la inhibición de la producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) para los inhibidores conocidos Apocinina y Oxopurinol, además se observa disminución de la reacción cuando se realiza en presencia de la enzima superoxido dismutasa (SOD)  $p < 0.05$  vs. Apocinina.

Debido a que el PPH es un compuesto que se oxida con mucha facilidad se graficó el área bajo la curva (Gráfica 2) que proporciona el PPH sin la enzima y sin inhibidores para estandarizar el área bajo la curva del PPH solo. Posteriormente, se analizó la producción de  $O_2^{\cdot-}$  por la enzima NADPH oxidasa como se muestra en la gráfica 2 observando que esta reacción tuvo mayor área bajo la curva proporcional a la producción de  $O_2^{\cdot-}$ .

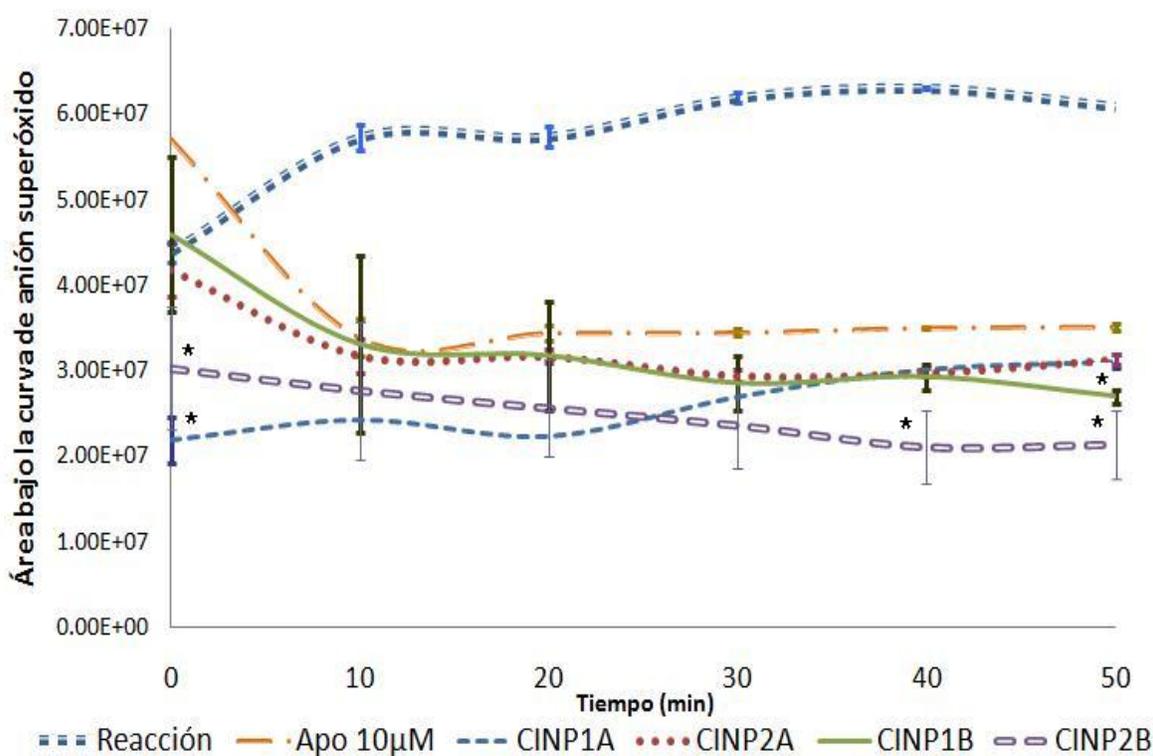
Para corroborar que el incremento del área bajo la curva se debe a la producción de  $O_2^{\cdot-}$  se empleo durante la reacción superoxido dismutasa (SOD) una enzima que utiliza como sustrato al  $O_2^{\cdot-}$  dismutandolo a oxígeno molecular ( $O_2$ ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) disminuyendo la cantidad de  $O_2^{\cdot-}$  disponible para unirse con PP-H. Como puede observarse en la gráfica 2 al adicionar SOD a la reacción la producción de  $O_2^{\cdot-}$  en comparación con la reacción disminuyó hasta ser igual al área bajo la curva de la muestra de DPPH solo.

Por lo tanto, estos resultados nos indican que el área bajo la curva calculada para la reacción si corresponde a la producción de  $O_2^{\cdot-}$ . Una vez realizados los experimentos se evaluó el efecto inhibitorio del oxopurinol y apocinina ya que la producción de  $O_2^{\cdot-}$  puede ser debida a la actividad catalítica tanto de Xantina oxidasa como de NADPH oxidasa y estas enzimas son inhibidas por estos compuestos respectivamente.

Como se muestra en la gráfica 3 al emplear apocinina y oxopurinol disminuyó el área bajo la curva, siendo más notable esta disminución con el oxopurinol. Al emplear una concentración mayor de apocinina (100  $\mu$ M) no muestra diferencia estadística posiblemente debido a que en el homogenizado de proteínas no se encuentra la cantidad suficiente de enzima MPO para poder activar toda la apocinina a su forma dimérica.

Comparados estos resultados obtenidos empleando apocinina como inhibidor con lo reportado por otros autores quienes trabajaron sobre una línea de células endoteliales que sobreexpresan las isoformas Nox1, Nox2 y Nox4 (HEK93) en donde observaron que la producción de  $O_2^{\cdot-}$  medido por quimioluminiscencia no disminuía, consideramos que la diferencia entre sus resultados y estos es debida a que en este proyecto se utilizó homogenizado de arterias aortas que además de contener NADPH oxidasa puede contener MPO atrapada en los tejidos entre

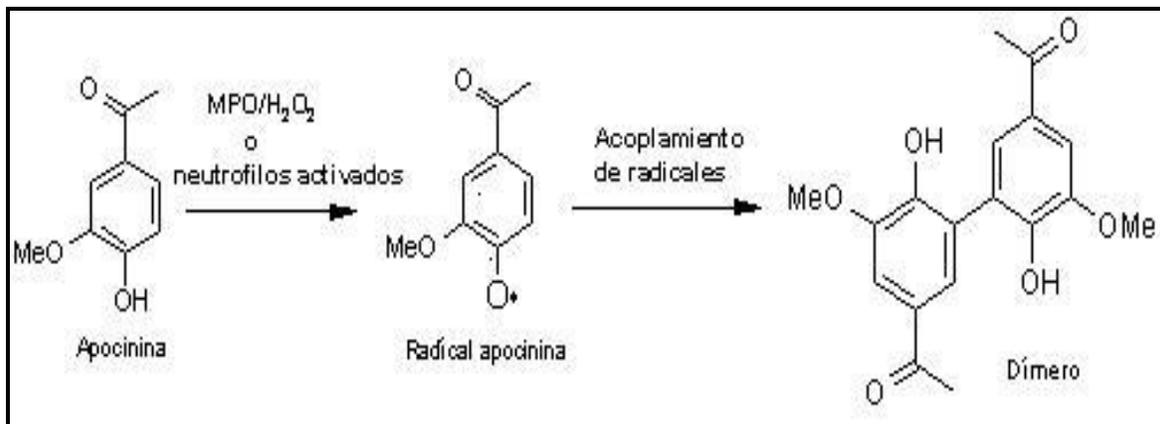
células endoteliales y células musculares, mientras que su cultivo celular no tiene enzima MPO ya que se ha reportado que esta no se expresa en células endoteliales, lo que sugiere que apocinina necesita ser activada por MPO como se menciona en la bibliografía en que propone que la MPO presente en el sistema vascular puede activar a apocinina para ejercer su actividad sobre Nox2 en células endoteliales<sup>58</sup>.



**Gráfica 3.** Resultados de la producción de anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) para los compuestos derivados de Apocinina. \*  $p < 0.05$  vs. Apocinina.

Con respecto a esto ha sido reportado que MPO es capaz de producir el dímero de apocinina, la cual es la forma activa que inhibe a NADPH oxidasa y que el mecanismo por el cual lo hace se muestra en la figura 27. Por lo tanto, los compuestos derivados de apocinina propuestos en esta trabajo no podrían

producir dímeros de apocinina al no tener libre el grupo  $-OH$  de donde es abstraído el H y producido el radical apocinina con base en el oxígeno<sup>58,64</sup>.



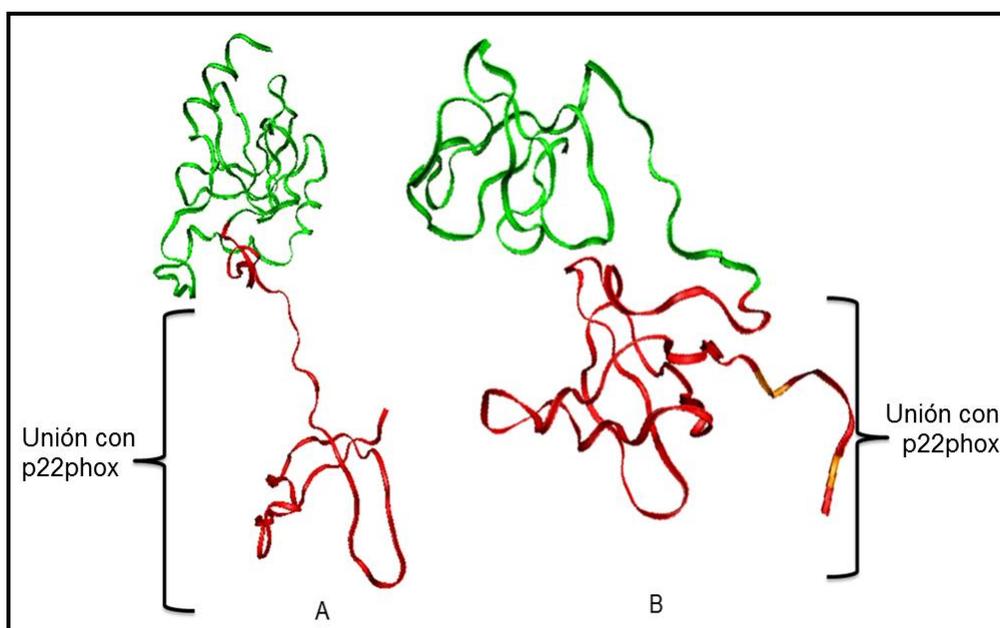
**Figura 27.** Mecanismo de formación del dímero de apocinina por la enzima MPO.

Sin embargo, como se muestra en la gráfica 3 la producción de  $O_2^{\cdot-}$  disminuyó al evaluar cada uno de los compuestos como inhibidor de NADPH oxidasa en comparación con la reacción sin inhibidor observando que el mejor compuesto evaluado fue CINP2B ya que reduce el área bajo la curva de  $O_2^{\cdot-}$  mostrando diferencia significativa estadísticamente comparado con apocinina al tiempo cero, a los 40 y 50 minutos de reacción a diferencia de los otros compuestos, ya que el CINP1A muestra diferencia significativa sólo al tiempo 0 y el CINP1B sólo a los 50 minutos y durante los otros tiempos de reacción no muestran diferencia.

Por lo tanto, el hecho de que los compuestos tengan actividad inhibitoria sobre NADPH oxidasa sugiere que finalmente el  $-OH$  de apocinina no es necesario para que estos compuestos tengan actividad inhibitoria sobre NADPH oxidasa sino más bien la densidad electrónica generada por el grupo éter o éster sea de importancia para la interacción de NADPH oxidasa y los derivados de apocinina. Con la finalidad de conocer como podría llevarse a cado esta interacción se hicieron estudios de docking.

## Docking

Para la realización de los estudios de docking se requiere la proteína cristalizada, sin embargo debido a la estructura tan compleja de NADPH oxidasa no existe hasta la fecha una estructura cristalizada completa de todas sus subunidades, sino que ha sido cristalizadas sus subunidades por segmentos. Debido a esto para realizar el docking se empleó una región cristalizada de la subunidad p47phox (ING2.PDB), que ha sido reportada como importante durante el ensamble de p47phox y p22phox cómo se muestra en la figura 28, donde se muestra la conformación más alargada de p47phox sin unirse a p22phox y una conformación más plegada cuando se encuentra unida a p22phox. Como se ha reportado que el dímero de apocinina puede inhibir el ensamble entre p22phox y p47phox es posible que esta región también sea importante para la unión del dímero de apocinina.



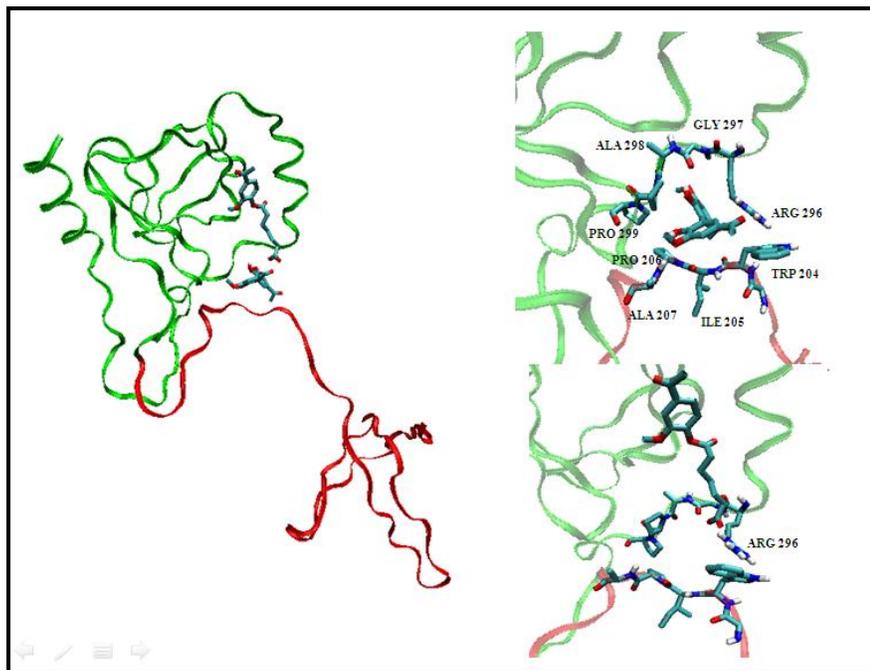
**Figura 28:** Segmento cristalizado de p47phox en que se muestra la región con que se une a p22phox y que es la región en donde se cree que se unen los compuestos para inhibir el ensamble

de estas subunidades. A) segmento de p47phox cristalizado comparado con el B) segmento de p47phox que fue cristalizado en complejo con p22phox (se eliminó el segmento de p22phox) donde se observa el plegamiento de la proteína al ensamblarse.

Autores han reportado que el residuo de aminoácidos de p47phox que va de 156 a 215 es donde se ensambla p22phox (figura 28).

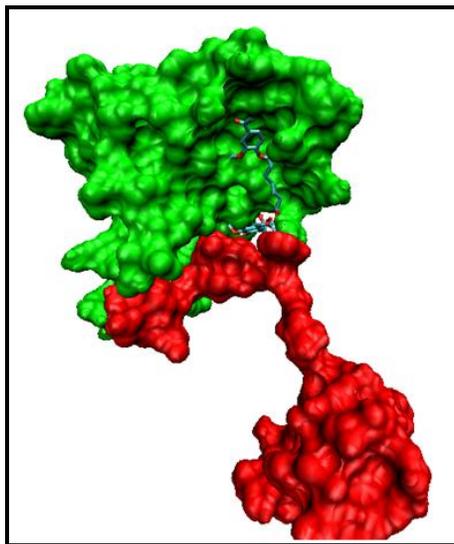
Al analizar las interacciones obtenidas de los estudios de docking entre p47phox y el dímero de apocinina se observa que este es capaz de interactuar con p47phox en la región que contiene los residuos de ARG296, GLY297, ALA298, PRO299 y la que contiene los residuos TRP204, ILE205, PRO206, ALA207 (fig. 29), que aparente mente son importantes porque se unen permitiendo el plegamiento de la proteína p47phox, lo cual puede estar impidiendo que la proteína adquiera la conformación necesaria para unirse a p22phox y de esta manera puede inhibir el ensamble entre ambas subunidades e inhibir la actividad de la enzima.

También se puede observar que los compuestos no se unen a la misma región, pero se unen a una región muy cercana al sitio de unión de apocinina y comparten los mismos aminoácidos, por lo cual podrían estar impidiendo también que la proteína p47phox se pliegue y se una a p22phox.



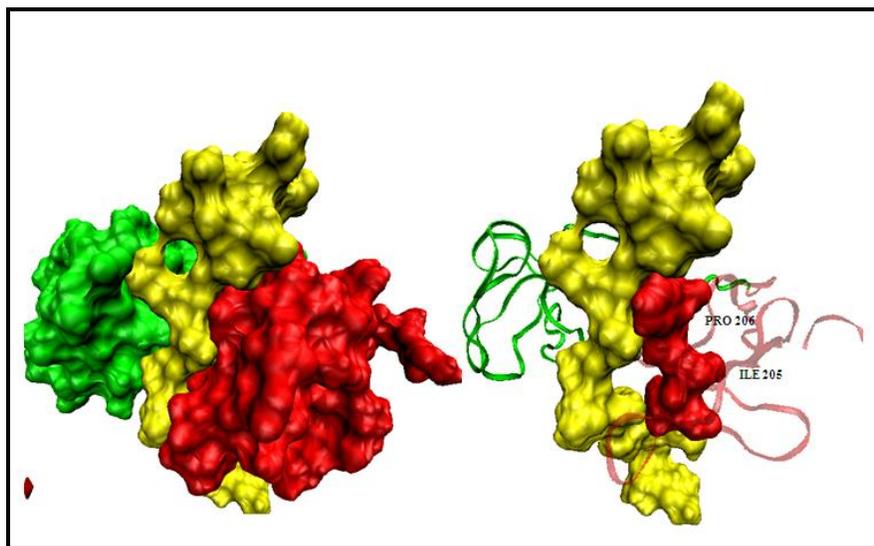
**Figura 29.** A) Sitios de unión de apocinina y los compuestos sintetizados sobre p47phox. B) acercamiento donde se observa que al unirse apocinina a p47phox al parecer impide la unión del segmento que contiene los residuos de ARG296, GLY297, ALA298, PRO299 con el segmento con los residuos TRP204, ILE205, PRO206, ALA207 impidiendo el plegamiento de p47phox para unirse a p22phox. C) los compuestos sintetizados se unen a una región cercana a la que se une apocinina, por lo que también es posible que estén impidiendo el plegamiento de p47phox.

Esto coincide con la bibliografía que menciona que al ser activada p47phox por la unión de p67phox a los residuos Ser303, Ser304, Ser315, Ser320 y Ser328 que se fosforilan exhibe el sitio de unión para p22phox y cuando este sitio es ocupado por p22phox, p47phox lo rodea adquiriendo una conformación que mantendrá a p22phox fijo evitando que se separen fácilmente<sup>14</sup>.



**Figura 30:** Sitio de unión de los compuestos sintetizados y del dímero de apocinina. Se observa que los compuestos sintetizados se unen a p47phox pero en una región diferente a la que se une el dímero de apocinina.

Además los compuestos sintetizados se unen también en la región de p47phox cercana al sitio de unión con p22phox (fig. 30), observándose que se unen todos en la misma región compartiendo los aminoácidos a los que se unen (tabla 5), lo cual indica que probablemente al igual que apocinina impiden que adquiera la conformación necesaria para unirse a p22phox impidiendo que se ensamblen y de la misma manera inhiben la función de Nox2.



**Figura 31:** A) Complejo p22phox-p47phox. B) El dímero de apocinina se une a los residuos PRO206 e ILE205 de p47phox necesarios para la unión con p22phox. Por lo cual es probable que al estar ocupado este sitio por el dímero de apocinina puede impedir que se una p22phox.

**Tabla 5:** Residuos a los que se unen los compuestos diseñados y los sintetizados.

Compuesto	Residuos a los que se une	Puentes de H
Diapocinina	TRP204, PRO206, ALA207, ASP261, ARG296, GLY297, ALA298, PRO299, PRO300.	ALA207:HN, ARG296:HH
Cloroacético	TYR231, LYS258, MET278, LEU280, GLN281, LYS282, ALA290	LYS258:HZ, LYS282:HN, LYS282:HZ
Clorobutanoico	TRP204, ILE205, PRO206, ALA207, ARG296, GLY297, PRO299, PRO300	ALA207:HN, ARG296:HE, ARG296:HH.
Glútarico	LYS258, MET278, LEU280, GLN281, LYS282, ALA290, GLN293	LYS258:HZ, LYS282:HN, LYS282:HZ

Diseño y Evaluación Teórica y Experimental in vitro de Compuestos Derivados de Apocinina como Posibles Inhibidores de NADPH oxidasa

---

Pimélico	TRP264, SER272, MET278, LEU280, GLN281, LYS282, ALA290, GLN293, ILE294, ARG296	LYS282:HN, ARG296:HE, ARG296:HH
----------	--	---------------------------------

En la tabla del Anexo 2 se proporciona la lista de residuos a los que se unen los otros compuestos propuestos y se observa que también son compartidos con los mencionados en la tabla 6.

En la tabla 5 se observan los  $\Delta G$  y  $K_d$  obtenidos por docking para el dímero de apocinina y los nuevos compuestos. El  $\Delta G$  de C1NP1A y C1NP2A es mayor que el de la apocinina mientras de C1NP1B y C1NP2B es menor que el de la apocinina, siendo el menor el  $\Delta G$  del C1NP1B (-7.48Kcal/mol). Mientras comparando las  $K_d$  son mayores las de los éteres y menores las de los ésteres. Esto sugiere que NADPH oxidasa presenta mayor afinidad por C1NP1B y C1NP2B y por lo tanto podemos esperar mayor inhibición de la producción de  $O_2^{\cdot-}$  con estos compuestos, ya que tienen menor  $\Delta G$  y menor  $K_d$ , lo cual coincide con lo observado al evaluar la actividad enzimática con EPR donde se observó que el mejor inhibidor fue el éster C1NP2B.

**Tabla 6.** Valores de  $K_d$  y  $\Delta G$  para los derivados de Apocinina.

Compuesto:	$\Delta G$ (Kcal/mol)	$K_d$ ( $\mu M$ )
Diapocinina	-6.47	18
C1NP1A	-6.13	32.19
C1NP2A	-6.1	33.89
C1NP1B	-7.48	3.32
C1NP2B	-6.99	7.52

En la tabla del Anexo 1 se muestran los valores de  $\Delta G$  y  $K_d$  para algunos compuestos diseñados de los que sugerimos que también pueden tener actividad reduciendo la producción de  $O_2^{\cdot-}$  derivado de Nox2.

Finalmente se realizaron alineamientos de la proteínas p22phox y p47phox de rata que es nuestro modelo de estudio y de humano para conocer si los resultados obtenidos en los experimentos realizados en aortas de ratas se pueden transpolar al humano Observandose que entre p22phox de rata y de humano existe una homología del 90% (fig.32), mientras que entre p47phox de rata y humano existe una homología del 82% (fig.33).

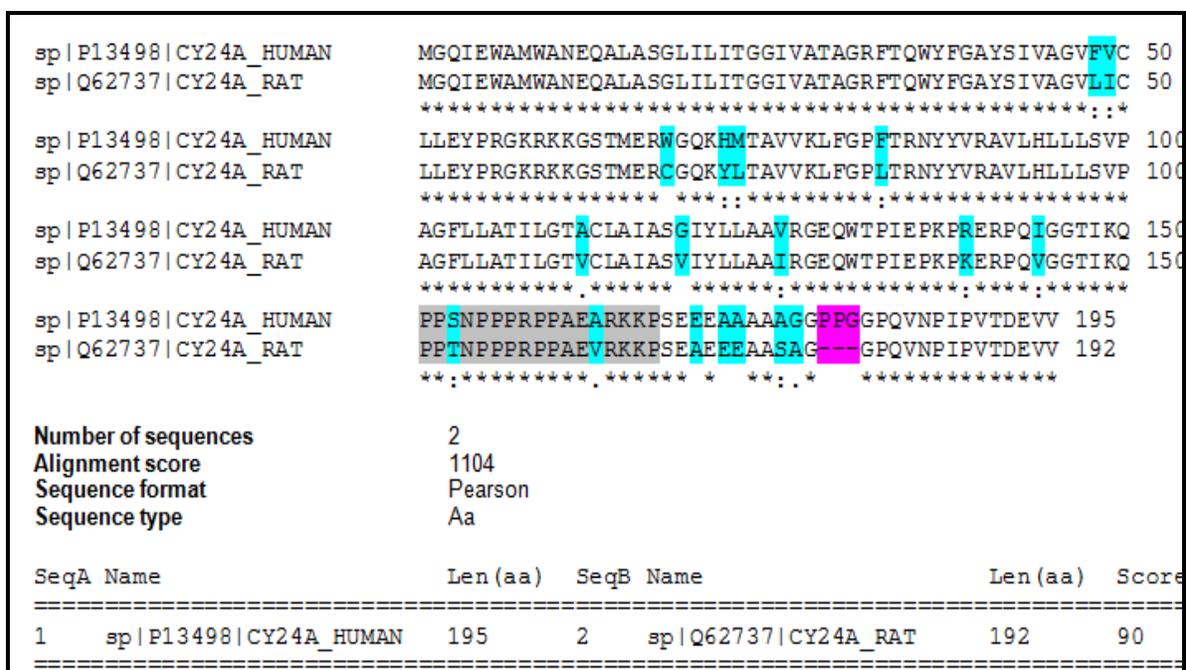


Figura 32. Alineamientos de p22phox de rata y humano.

## Diseño y Evaluación Teórica y Experimental in vitro de Compuestos Derivados de Apocinina como Posibles Inhibidores de NADPH oxidasa



**Figura 33.** Alineamientos de p47phox de rata y humano.

Estas homologías indican que los resultados obtenidos en los experimentos que realizamos en homogenizados de aortas de ratas wistar pueden ser transpolables a humanos por la alta homología que existe entre las proteínas.

## 11. Conclusiones:

Tanto apocinina como los compuestos sintetizados disminuyeron la producción de  $O_2^{\cdot -}$  y como no mostraron actividad antioxidante. La afinidad de la proteína por los C1NP1B y C1NP2B fue mejor que por apocinina, por lo que podemos considerar que su actividad inhibitoria se debe a la inhibición del ensamble de las subunidades p47phox y p22phox de NADPH oxidasa, siendo significativamente mejor inhibidor el compuesto C1NP2B. Por lo tanto, el uso de estos compuestos permite mayor biodisponibilidad de óxido nítrico para la relajación endotelial.

## 12. Bibliografía

1. Chen J.X., Zeng H., Lawrence M.L., Blackwell T.S., Meyrick B. Angiotensin-1-induced angiogenesis is modulated by endothelial NADPH oxidase. *Physiol Heart Circ Physiol*. 2006; 291:1563–1572.
2. Selemidis S., Sobey C.G., Wingler K., Schmidt H. H.H.W., Drummond G.R.. NADPH oxidases in the vasculature: Molecular features, roles in disease and pharmacological inhibition. *Pharmacology and therapeutics*. 2008; 120:254-291.
3. Brandes R.P., Kreuzer J. Vascular NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation. *Cardiovascular Research*. 2005; 65:16– 27.
4. Wind S., Beuerlein K., Eucker T., Müller H., Scheurer P., Armitage M.E., Ho H., Schmidt H., Wingler K. Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors *British Journal of Pharmacology*. 2010; 161:885–898.
5. Singh R., Mailloux R.J., Puiseux-Dao S., Appanna V.D. Oxidative Stress Evokes a Metabolic Adaptation That Favors Increased NADPH Synthesis and Decreased NADH Production in *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of bacteriology*. 2007; 189:6665–6675.
6. Vilenchik M.M., Knudson A.G. Endogenous DNA double-strand breaks, production, fidelity of repair, and induction of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 100:12871–12876.
7. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002; 82:47–95.
8. Koshikawa N., Hayashi J., Nakagawara A., Takenaga K. ROS-Generating Mitochondrial DNA Mutation Upregulates Hypoxia-Inducible Factor-1 Gene Transcription Via Pi3k-Akt/Pkc/Hdac Pathway. *The Journal of Biology Chemistry*. 2009; 1-18.
9. Bae Y.S., Lee J.H., Choi S.H., Kim S., Almazan F., Witztum J.L., Miller J.L.. Macrophages Generate Reactive Oxygen Species in Response to Minimally Oxidized Low-Density Lipoprotein Toll-Like Receptor 4– and Spleen Tyrosine

Kinase-Dependent Activation of NADPH Oxidase 2. *Circulation Research*. 2009; 104:210-218.

10. Tsai M.H., Jiang M.J. Reactive oxygen species are involved in regulating  $\alpha$ 1-adrenoceptor-activated vascular smooth muscle contraction. *Journal of Biomedical Science*. 2010; 17:67.

11. Pickering T.G., Miller N.H., Ogedegbe G., Krakoff L.R., Artinian N. T., Gof D. Call to Action on Use and Reimbursement for Home Blood Pressure Monitoring. (*Hypertension*.2008; 52:10-29.

12. Howell J., Sear J. W., Foex P. Hypertension, hypertensive heart disease and perioperative cardiac risk. *J Anaesth*. 2004; 92: 570-583.

13. Wang W., Pang L., Paladeb P. Angiotensin II Upregulates Ca V 1.2 Protein Expression in Cultured Arteries via Endothelial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Production. *J Vasc Res*. 2011; 48:67-78.

14. Yuzawa, Suzuki N.N., Fujioka Y., Ogura K., Sumimoto H., Inagaki F. A molecular mechanism for autoinhibition of the tandem SH3domains of p47 phox, the regulatory subunit of the phagocyte NADPH oxidase. *Genes to Cells*. 2004; 9:443-456.

15. Ximenes V.F., Kanegae M.P.P., Rissato S.R., Galhiane M.S. The oxidation of apocynin catalyzed by myeloperoxidase: proposal of NADPH oxidase inhibition. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2007; 457:134-141.

16. Stefanska J., Pawliczak R. Apocynin: Molecular Aptitudes. *Mediators of Inflammations*. 2008; 1-10.

17. Lu X., Wan S., Jiang J., Jiang X., Yang W., Yu P., Xu L., Zhang Z., Zhang G., Shan L., Wang Y. Synthesis and Biológico Evaluations of novel Apocynin analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2011;1-8.

18. Simons J.M., Hart B.A.T., Ching T. R. A. M. I. V., Dijk H.V., Labadie R. P. Metabolic Activation of Natural Phenols into Selective Oxidative Brust Agonists by Activated Human Neutrophils. *Free Radical Biology and Medicine*. 1990; 8:251-258.

19. Impellizzeri D., Mazzon E., Esposito E., Paterniti I., Bramanti P., Cuzzocrea S. Effect of Apocynin, an inhibitor of NADPH oxidase, in the inflammatory process induced by an experimental model of spinal cord injury. *Free Radical Research*, 2010; 1–16.
20. Heumüller S., Wind S., Barbosa-Sicard E., Schmidt H.H.W., Busse R., Schröder K., Brandes R.P. Apocynin Is Not an Inhibitor of Vascular NADPH Oxidases but an Antioxidant. *Hypertension*. 2008; 51:211-217.
21. Krakoff, Artinian N.T., Goff D., Pickering T.G., Houston-Miller N., Ogedegbe G., Lawrence R. Society of Hypertension, and Preventive Cardiovascular Nurses Association A Joint Scientific Statement From the American Heart Association, American Call to Action on Use and Reimbursement for Home Blood Pressure Monitoring. *Hypertension* 2008; 52:10-29.
22. Torrance H.L., Benders M.J., Derks J.B., Rademaker C.M.A., Bos A.F., Berg P. D. V., Longini M., Buonocore G., Venegas M.E., Baquero H., Van Bel G. H. A. V. F. Maternal Allopurinol During Fetal Hypoxia Lowers Cord Blood Levels of the Brain Injury Marker S-100B. *Pediatrics* 2009; 124:350-357.
23. O'Toole T.E., Zheng YT, Hellmann J., Conklin D.J., Barski O., Bhatnagar A. Acrolein Activates Matrix Metalloproteinases By Increasing Reactive Oxygen Species In Macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009; 236:194–201.
24. Katsuyama M. NOX/NADPH Oxidase, the Superoxide-Generating Enzyme: Its Transcriptional Regulation and Physiological Roles. *Journal of Pharmacological Sciences*. 2010; 114:134-146
25. Gianni D., Taulet N., DerMardirossian C., Bokoch G.M. c-Src–Mediated Phosphorylation of NoxA1 and Tks4 Induces the Reactive Oxygen Species (ROS)–Dependent Formation of Functional Invadopodia in Human Colon Cancer Cells. *Molecular Biology of the Cell*. 2010; 21:4287–4298.
26. Schlüter T., Steinbach A.C., Steffen A., Rettig R., Grisk O. Apocynin-induced vasodilation involves Rho kinase inhibition but not NADPH oxidase inhibition. *Cardiovascular Research*. 2008; 80:271–279.

27. Hordijk P.L. Regulation of NADPH Oxidases. The Role of Rac Proteins. *Circ Res.* 2006; 98:453-462.
28. Kao Y.Y., Gianni D., Bohl B., Taylor R.M., Bokoch G.M., Identification of a Conserved Rac-binding Site on NADPH Oxidases Supports a Direct GTPase Regulatory Mechanism. *The Journal of Biological Chemistry.* 2008; 283:12736–12746.
29. Bedard K., Krause K.H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87:245–313.
30. Godbole A.S, Lu X., Guo X., Kassab G.S. NADPH oxidase has a directional response to shear stress. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2009; 296:152-158.
31. Choi H., Leto T.L., Hunyady L., Catt K.J., Bae Y.S., Rhee S.G. Mechanism of Angiotensin II-induced Superoxide Production in Cells Reconstituted with Angiotensin Type 1 Receptor and the Components of NADPH Oxidase. *The journal of biological chemistry.* 2008; 283:255–267.
32. Murdoch C.E., Zhang M., Cave A.C., Shah A.M. et al 2006, NADPH oxidase-dependent redox signalling in cardiac hypertrophy, remodelling and failure. *Cardiovascular Research.* 2006; 71:208–215.
33. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev,* 2002, 82, 47–95.
34. Cave A., Grieve D., Johar S., Zhang M., Shah A.M. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species in cardiac pathophysiology. *Phil. Trans. R. Soc.* 2005; 360:2327–2334.
35. Honbou K., Minakami R., Yuzawa S., Takeya R., Suzuki N., Kamakura S., Sumimoto H., Inagaki F. Full-length p40phox structure suggests a basis for regulation mechanism of its membrane binding. *The EMBO Journal.* 2007; 26:1176–1186.
36. Khanna A.K., Pieper G.M. NADPH oxidase subunits (NOX-1, p22phox, Rac-1) and tacrolimus-induced nephrotoxicity in a rat renal transplant model. *Nephrol Dial Transplant.*2007; 22: 376–385.

37. Ogura K., Nobuhisa I., Yuzawa S., Takeya R., Torikai S., Saikawa K., Sumimoto H., Inagaki F. NMR Solution Structure of the Tandem Src Homology 3 Domains of p47*phox* Complexed with a p22*phox*-derived Proline-rich Peptide. *The journal of biological chemistry*. 2006; 281:3660–3668.
38. Kim C., Dinauer M.C. Impaired NADPH oxidase activity in Rac2-deficient murine neutrophils does not result from defective translocation of p47*phox* and p67*phox* and can be rescued by exogenous arachidonic acid. *Leukoc. Biol.* 2006; 79: 223–234.
39. Autore F., Pagano B, Fornili A., Rittinger K., Fraternali F. In Silico Phosphorylation of the Autoinhibited Form of p47*phox*: Insights into the Mechanism of Activation. *Biophysical Journal*. 2010; 99:3716–3725.
40. Durand D., Cannella D., Dubosclard V., Pebay-Peyroula E. Vachette P., Fieschi F. Small-Angle X-ray Scattering Reveals an Extended Organization for the Autoinhibitory Resting State of the p47*phox* Modular Protein. *Biochemistry*. 2006; 45:7185-7193.
41. Massenet C., Chenavas S., Cohen-Addad C., Dagher M.C., Brandolin G., Eva P.P., Fieschi F. Effects of p47*phox* C Terminus Phosphorylations on Binding Interactions with p40*phox* and p67*phox*. *The journal of biological chemistry*. 2005;280:13752–13761.
42. Lapouge K., Smith S.J.M., Groemping Y., Rittinger K. Architecture of the p40-p47-p67*phox* Complex in the Resting State of the NADPH Oxidase. 2002; 277:10121–10128.
43. Groemping Y., Lapouge K., Smerdon S.J., Rittinger K. Molecular Basis of Phosphorylation-Induced Activation of the NADPH Oxidase. *Cell*. 2003; 113: 343-355.
44. Kami K., Takeya R., Sumimoto H., Kohda D. Diverse recognition of non-PxxP peptide ligands by the SH3 domains from p67*phox*, Grb2 and Pex13p. *The EMBO Journal*. 2002; 21:4268-4276.

45. Li J.X., Fieschi F., Paclet M.H., Grunwald D., Champion Y., Gaudin P., Morel F., Stasia M.J. Leu505 of Nox2 is crucial for optimal p67*phox*-dependent activation of the flavocytochrome b558 during phagocytic NADPH oxidase assembly. *Journal of Leukocyte Biology*. 2007; 81:238-249.
46. Yang B., Rizzo V. TNF potentiates protein-tyrosine nitration through activation of NADPH oxidase and eNOS localized in membrane rafts and caveolae of bovine aortic endothelial cells. *Physiol Heart Circ Physiol*. 2007; 292: 954–962.
47. Grizot S., Fieschi F., Dagher M.C., Pebay-Peyroula E. The Active N-terminal Region of p67*phox*. *The journal of biological chemistry*. 2001;276:21627–21631.
48. Berdichevsky Y., Mizrahi A., Ugolev Y., Molshanski-Mor S., Pick E. Tripartite Chimeras Comprising Functional Domains Derived from the Cytosolic NADPH Oxidase Components p47*phox*, p67*phox*, and Rac1 Elicit Activator -independent. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2007; 282:22122–22139.
49. Noda Y., Kohjima M., Izaki T., Ota K., Yoshinaga S., Inagaki F., Ito T., Sumimoto H. Molecular Recognition in Dimerization between PB1 Domains. *The journal of biological chemistry*. 2003; 278:43516–43524.
50. García-Triana B.E., Saldaña-Bernabeu A., García-Piñeiro J.C., Bastarrechea-Milian M. NADPH oxidasa Fagocítica: componentes, ensamblaje y mecanismo de acción. *Rev. Cubana Invest Biomed*. 2010; 20:59-63.
51. Zhang J., Martasek P., Paschke R., Shea T., Masters B.S.S., Kim J.J.P. Crystal Structure of the FAD/NADPH-binding Domain of Rat Neuronal Nitric-oxide Synthase. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001; 276:37506–37513.
52. Mizrahi A., Berdichevsky Y., Ugolev Y., Molshanski-Mor S., Nakash Y., Dahan I., Alloul N., Gorzalczany Y., Sarfstein R., Hirshberg M., Pick E. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase complex: chimeric constructs derived from the cytosolic components as tools for exploring structure-function relationships. *Journal of Leukocyte Biology*. 2006; 79:881–895.
53. Zalba G., Beaumont F.J., San-José G., Fortuño A., Fortuño M.A., Etayo J.C., Díez J. Vascular NADH/NADPH Oxidase Is Involved in Enhanced Superoxide

Production in Spontaneously Hypertensive Rats. *Hypertension*. 2000; 35:1055-1061.

54. Kohen R., Nyska A. Oxidation of biological systems, oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicol Pathol*. 2002; 30:620–50.

55. Feihl F., Liaudet L., Levy B.I., Bernard W. Hypertension and microvascular remodelling. *Cardiovascular Research*. 2008; 78:274–285.

56. Muntner P., Gu D., Wu X., Duan X., Wenqi G., Whelton P.K. Factors Associated With Hypertension Awareness, Treatment, and Control in a Representative Sample of the Chinese Population. *Hypertension*. 2004; 43:578-585.

57. Judkins C.P., Sobey C.G., Dang T.T., Miller A.A., Dusting G.J., Drummond G.R. NADPH-Induced Contractions of Mouse Aorta Do Not Involve NADPH Oxidase: A Role for P2X Receptors. *The Journal of Pharmacology And Experimental Therapeutics*. 2006; 317:644–650

58. Jackson E.K., Gillespie D.G., Zhu C., Ren J., Zacharia L.C., Mi Z. Adrenoceptors Enhance Angiotensin II–Induced Renal Vasoconstriction Role for NADPH Oxidase and RhoA. *Hypertension*. 2008; 51:719-726

59. Selemidis S., Dusting G.J., Peshavariya H., Kemp-Harper B.K., Drummond G.R. Nitric oxide suppresses NADPH oxidase-dependent superoxide production by S-nitrosylation in human endothelial cells. *Cardiovascular Research*. 2007; 75:349–358.

60. Nicholls S.J., Hazen S.L. Myeloperoxidase and Cardiovascular Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005; 25:1102-1111.

61. Jiang F., Roberts S.J., Datla S.R., Dusting G.J.. NO Modulates NADPH Oxidase Function Via Heme Oxygenase-1 in Human Endothelial Cells. *Hypertension*. 2006; 48:950-957.

62. Zalba G., Beloqui O., San José G., Moreno M.U, Fortuño A., Díez J. NADPH Oxidase–Dependent Superoxide Production Is Associated With Carotid Intima-

Media Thickness in Subjects Free of Clinical Atherosclerotic Disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2005; 25:1452-1457.

63. Geiszt M. NADPH oxidases: New kids on the block. *Cardiovascular Research*. 2006; 71:289 – 299.

64. Gupte S., Labinsky N., Gupte R., Csiszar, Ungvari Z., Edwards J.G. Role of NAD(P)H Oxidase in Superoxide Generation and Endothelial Dysfunction in Goto-Kakizaki (GK) Rats as a Model of Nonobese NIDDM. *PLoS ONE*. 2010; 5:1-8.

65. Raghavendran H.R.B., Sathivel A., Devaki T. Antioxidant effect of *Sargassum polycystum* (Phaeophyceae) against acetaminophen induced changes in hepatic mitochondrial enzymes during toxic hepatitis. *Chemosphere*. 2005; 61:276-281.

66. George J., Struthers A. The role of urate and xanthine oxidase in vascular oxidative stress: future directions. *Therapeutics and Clinical Risk Management*. 2009; 5:799–803.

67. Xu X., Hu X., Lu Z., Zhang P., Zhao L, Wessale J.L., Bache R.J., Chen Y. Xanthine Oxidase Inhibition with Febuxostat Attenuates Systolic Overload-induced Left Ventricular Hypertrophy and Dysfunction in Mice. *J Card Fail*. 2008; 14:746–753.

68. Fink B., Dikalov S., Bassenge E. A New Approach for Extracellular Spin Trapping of Nitroglycerin-Induced superoxide radicals both in vitro and in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*. 2000; 28:121-128.

69. Dikalov S., Griendling K.K., Harrison D.G. Measurement of Reactive Oxygen Species in Cardiovascular Studies. *Hypertension*. 2007; 49:1-11.

70. Kazlov A.V., Szalay L., Umar F., Fink B., Kropik K., Nohl H. Redl H., Bahrami S. EPR Analysis Reveals Three Tissues Responding to Endotoxin by Increased Formation of Reactive Oxygen Species. *Free Radical Biology and Medicine*. 2003; 34: 1555-1562.

71. Okawa M., Kinjo J., Nohara T., ONO M. DPPH (1,1-Diphenyl-2-Picrylhydrazyl) Radical Scavenging Activity of Flavonoids Obtained from Some Medicinal Plants. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2001; 24:1202.

### 13. ANEXO I

<b>Compuesto:</b>	<b><math>\Delta G</math> (Kcal/mol)</b>	<b>Kd (<math>\mu\text{M}</math>)</b>
Diapocinina	-6.47	18
Cloroacético	-6.13	32.19
Clorobutanoico	-6.1	33.89
Glútárico	-7.48	3.32
Pimélico	-6.99	7.52
Ftálico	-7.47	3.33
Butanodioico	-6.46	18.33
Decadioico	-6.75	11.32
Etanodioico	-5.79	57.04
Heptanodioico	-6.14	31.73
Hexanodioico	-7.08	6.46
Nonadioico	-7.04	69
Octanodioico	-6.8	34.68
Pentanodioico	-6.31	23.82
Propanodioico	-6.55	15.81
Tereftálico	-7.28	4.61

## 14. ANEXO 2

Compuesto	Residuos a los que se une	Puentes de H
<b>Diapocinina</b>	TRP204, PRO206, ALA207, ASP261, ARG296, GLY297, ALA298, PRO299, PRO300.	ALA207:HN, ARG296:HH
<b>Cloroacético</b>	TYR231, LYS258, MET278, LEU280, GLN281, LYS282, ALA290	LYS258:HZ, LYS282:HN, LYS282:HZ
<b>Clorobutanoico</b>	TRP204, ILE205, PRO206, ALA207, ARG296, GLY297, PRO299, PRO300	ALA207:HN, ARG296:HE, ARG296:HH.
<b>Glútarico</b>	LYS258, MET278, LEU280, GLN281, LYS282, ALA290, GLN293	LYS258:HZ, LYS282:HN, LYS282:HZ
<b>Pimélico</b>	TRP264, SER272, MET278, LEU280, GLN281, LYS282, ALA290, GLN293, ILE294, ARG296	LYS282:HN, ARG296:HE, ARG296:HH
<b>Ftálico</b>	TRP204, PRO206, ALA207, LEU260, ASP261, MET278, GLN293, LYS295, ARG296, PRO299	
<b>Butanodioico</b>	VAL240, GLU244, TRP263, ALA298, PRO299, PRO300, ARG301, SER304,	LYS235:HZ, TYR279:HH, ARG301:HN
<b>Decadioico</b>	TYR231, LYS258, TRP264, SER277, MET278, LEU280, LYS282, GLN293, ILE294, LYS295	LYS258:HZ, LYS282:HZ, LYS295:HN
<b>Etanodioico</b>	LYS235, TYR237, VAL240, GLU244, TRP263, TYR279, ALA298, PRO299,	LYS235:HZ, TYR279:HH,

Diseño y Evaluación Teórica y Experimental in vitro de Compuestos Derivados de Apocinina como Posibles Inhibidores de NADPH oxidasa

---

	PRO300, ARG301	ARG301:HN
<b>Heptanodioico</b>	LEU230, TYR231, TRP264, SER277, MET278, LEU280, GLN281, LYS282, GLN293, ILE294, LYS295,	LYS282:HN, LYS295HN
<b>Hexanodioico</b>	TYR231, TRP264, SER277, MET278, LEU280, GLN281, LYS282, ALA290, ILE294, LYS295, ARG296,	LYS282:HN, LYS295:HN, ARG296:HE
<b>Nonadioico</b>	TYR231, ILE234, TRP264, SER277, MET278, LEU280, GLN281, LYS282, ALA290, GLN293, ILE294, ARG296	LYS282:HN, ARG296:HE, ARG296:HH
<b>Octanodioico</b>	TRP204, ALA207, ASP261, LYS295, ARG296, ARG296	ALA207:HN, LYS295:HZ, ARG296:HE, ARG296:HH
<b>Pentanodioico</b>	TYR231, SER277, MET278, LEU280, GLN281, LYS282, ALA290, GLN293, LYS295, ARG296	LYS295:HN, ARG296:HE
<b>Propanodioico</b>	MET278, LEU280, GLN281, LYS282, ALA290, GLN293	GLN281:HE, LYS282:HN, LYS282:HZ
<b>Tereftálico</b>	SER277, MET278, LEU280, GLN281, LYS282, GLN293, ILE294, LYS295	LYS282:HN, LYS295:HN