



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

---



FACULTAD DE FARMACIA

**“DETERMINACIÓN DEL EFECTO  
ANTIALÉRGICO, TOXICOLÓGICO Y  
FARMACOCINÉTICO DE 6-HIDROXIFLAVONA  
PARA SU POTENCIAL DESARROLLO COMO  
FÁRMACO ANTIASMÁTICO”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN FARMACIA**

**PRESENTA**

**M.F. ANGÉLICA FLORES FLORES**

**DIRECTORES DE TESIS**

**DR. SAMUEL ENOCH ESTRADA SOTO**

**DR. JULIO CÉSAR RIVERA LEYVA**

**CUERNAVACA MORELOS, 2018**

*“El mayor de los éxitos es  
llevar una vida de pasión,  
curiosidad, generosidad  
y humildad”*

---

## AGRADECIMIENTOS

A **CONACyT** por la beca otorgada (44358) para la realización de este proyecto durante el período 2014-2018 y por el impulso al desarrollo de profesionales en la ciencia y tecnología.

Este proyecto fue apoyado en parte por las Becas internas de la Facultad Farmacia (UAEM), así como de SEP-CONACyT Ciencia Básica (subvención 167044 y 256197).

Al **Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER)** por las instalaciones prestadas del laboratorio de hiperreactividad bronquial para la realización del modelo *in vivo* de asma en cobayo con clave de proyecto (B1-6).

Al **Centro Estatal de Transfusiones de Sangre** del Estado de Morelos por la donación de las muestras de plasma humano utilizadas para el proyecto de Farmacocinética, permitiendo reducir el uso de animales para esta investigación.

A la **Facultad de Farmacia** por la oportunidad de formarme con la visión de un Farmacéutico y por el uso de sus instalaciones para el desarrollo del proyecto.

A la **Dra. Blanca Bazán Perkins** por brindarme la confianza y permitirme estar en su laboratorio aprendiendo desde otra perspectiva el proyecto como colaboradora para la evaluación *in vivo* en el INER.

A la **Dra. Sara García Jiménez** por su colaboración en la elaboración del análisis bioquímico del estudio de toxicidad.

---

A las Histopatólogas **Guadalupe Hiriart Valencia** y **Erika Liliana Monterrubio Flores** por su ayuda y enseñanza en los cortes histológicos en el laboratorio de patología experimental del INER.

Al **Dr. Rogelio Hernández Pando** por la ayuda en la interpretación de los cortes histológicos del ensayo de toxicidad.

Al **Dr. Cesar Millan Pacheco** por su colaboración en el modelo *in silico* y por hacer que este trabajo sea multidisciplinario.

Al **Dr. Julio Rivera Leyva** por ayudarme en la parte de la cromatografía y brindarme de sus conocimientos a lo largo del proyecto.

Al **Dr. Samuel Estrada Soto** por su apoyo en la elaboración de este proyecto y por mi formación como parte de su grupo de trabajo.

Al **comité tutorial** por todas sus aportaciones durante la evaluación de este proyecto integrado por Dra. Leticia Moreno Fierro, Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez, Dr. Julio César Rivera Leyva y Dr. Samuel Enoch Estrada Soto.

Al **comité revisor** por todos los comentarios para mejorar el manuscrito integrado por Dra. Blanca Bazán Perkins, Dra. Judith González Christen, Dr. Sergio Montes López, Dr. Rogelio Hernández Pando, Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez, Dr. César Millán Pacheco y Dr. Germán Bernal Fernández.

---

## INDICE GENERAL

### I. INDICE DE FIGURAS

### II. INDICE DE TABLAS

### III. LISTA DE ABREVIATURAS

<i>1. MARCO TEÓRICO</i> .....	2
1.1 Asma .....	1
1.2 Epidemiología .....	2
1.3 Clasificación del asma .....	3
1.4 Mecanismos inmunológicos del asma alérgica .....	4
1.4.1 Sensibilización a un alérgeno .....	5
1.4.2 Fase temprana .....	7
1.4.3 Fase tardía .....	7
1.5 Pletismografía .....	8
1.6 Tratamiento farmacológico .....	10
1.7 Estudios preclínicos .....	14
1.8 Validación de procesos .....	14
1.8.1 Cromatografía por HPLC .....	15
<i>2. ANTECEDENTES</i> .....	18
2.1 Flavonoides .....	19
2.1.1. Farmacocinética de flavonoides .....	20
2.1.2. Antecedentes de 6-hidroxi flavona .....	23
<i>3. JUSTIFICACIÓN</i> .....	26
<i>4. HIPÓTESIS</i> .....	28
<i>5. OBJETIVOS</i> .....	30
5.1. Objetivo general .....	31
5.2. Objetivos particulares .....	31
<i>6. METODOLOGÍA</i> .....	32
6.1. Reactivos .....	33

---

---

6.2. Acoplamiento molecular .....	33
6.3. Animales .....	34
6.4 Modelo experimental de asma agudo .....	35
6.4.1 Obtención de lavado bronqueoalveolar .....	37
6.4.2 Conteo celular .....	37
6.4.3 Cuantificación de TXB2 en LBA.....	38
6.5 Toxicidad aguda.....	39
6.6 Estudio toxicológico subcrónico de 6-hidroxi flavona .....	39
6.7 Histología convencional .....	40
6.6. Cromatografía líquida de alta resolución.....	41
6.6.1. Instrumento.....	41
6.6.2. Condiciones cromatográficas .....	41
6.6.3. Preparación de estándar interno (EI).....	41
6.6.4. Método de extracción de 6-hidroxi flavona en plasma .....	42
6.6.5. Curva de calibración .....	42
6.6.6. Validación del método analítico de 6-hidroxi flavona .....	43
6.6.7. Especificidad.....	43
6.6.9. Precisión .....	43
6.6.10. Exactitud.....	44
6.6.11. Sensibilidad .....	44
6.7. Estudio farmacocinético de 6-hidroxi flavona .....	44
6.7.1. Cirugía en vena caudal .....	45
6.7.2. Toma de muestras.....	45
6.8. Análisis estadístico .....	46
<i>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</i>	<i>47</i>
7.1. Acoplamiento molecular .....	48
7.2. Modelo alérgico .....	52
7.3. Estudio toxicológico agudo .....	59
7.4. Estudio de toxicidad subagudo .....	61
7.5. Desarrollo del método analítico.....	65
7.5.1. Condiciones cromatográficas óptimas .....	65

---

7.5.2. Selectividad .....	66
7.5.3. Linealidad .....	67
7.5.4. Precisión y exactitud del método.....	69
7.5.5. Porcentaje de recobro.....	70
7.6. Comportamiento de farmacocinética .....	70
8. <i>CONCLUSIONES</i> .....	73
9. <i>PERSPECTIVAS</i> .....	75
10. <i>REFERENCIAS</i> .....	77
11. <i>ANEXOS</i> .....	84

## I. INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Interacción del asma y su fisiopatología.....	2
Figura 2. Proceso de sensibilización al alérgeno de las vías respiratorias. CPA, célula presentadora de antígeno, FcεRI, receptor de IgE de alta afinidad, MHCII, molécula de histocompatibilidad clase II, TCR, receptor de célula T.....	6
Figura 3. Pletismografía barométrica. ....	9
Figura 4. Parámetros medidos en pletismografía .....	10
Figura 5. Estructura base de los flavonoides. ....	20
Figura 6. Metabolismo de flavonas . ....	22
Figura 7. Patrón de farmacóforo hipotético con 6-OHF .....	24
Figura 8. Modelo experimental en cobayos.....	36
Figura 9. Cirugía en vena caudal de rata para el estudio de farmacocinética. ....	45
Figura 10. Representación de la señal de transducción de la vía involucrada en la relajación del músculo liso de la vía aérea.....	49
Figura 11. a) La sintasa de óxido nítrico endotelial humano se muestra en la imagen con grupos hemo (rojo), 3-bromo-7-nitroindazol (verde) y b) 6-OHF (azul), más cerca del sitio de enlace utilizado en este trabajo (imágenes creadas con Visual Molecular Dynamics). Las figuras inferiores son diagramas de interacciones, tri y bi dimensionales para 3-bromo-7-nitroindazol (a) y 6-OHF (b) .....	51
Figura 12. a) El modelo de canal de calcio humano de tipo L se muestra en una imagen con nifedipina (verde) y b) 6-OHF (azul), más cerca del sitio de enlace utilizado en este trabajo (imágenes creadas con Visual Molecular Dynamics). Las figuras inferiores son diagramas de interacciones , tri y bi dimensionales para nifedipina (a) y 6-OHF (b) (imágenes generadas con Maestro por Schrodinger,2018).....	52
Figura 13. Efecto de 6-hidroxi flavona sobre OVA aerosolizada induciendo broncoconstricción aguda en cobayos sensibilizados. Los resultados son presentados como el promedio $\pm$ EEM de una $n=9$ animales por grupo con una $**p<0.01$ y $***p<0.001$ análisis con ANOVA de una vía y prueba post hoc Tukey. Ib=índice de broncoobstrucción, OVA= modelo de asma,6-OHF (1) 30 mg/kg; (2) 50 mg/kg y (3) 90 mg/kg. ....	54
Figura 14. a) Sección del pulmón mostrando el bronquiolo de cobayo con y sin tratamiento de 6-OHF, b) Conteo celular de LBA de cobayo. Los resultados son presentados como el promedio $\pm$ EEM conteo de 6 laminillas por grupo con una $*p<0.05$ no significativa en el	



análisis con ANOVA de una vía y prueba post hoc Tukey. OVA= Modelo de asma, 6-OHF (1) 30 mg/kg; (2) 50 mg/kg.....	55
Figura 15. a) Niveles de IgG1 e b) IgE específicos <b>contra</b> ovoalbúmina en suero de cobayos. Los resultados son presentados como el promedio $\pm$ EEM 5 muestras por grupo con una $*p<0.05$ análisis con ANOVA de una vía y prueba post hoc Tukey. OVA= Modelo de asma, 6-OHF (2) 50 mg/kg. ....	56
Figura 16. Cuantificación de serotonina en LBA de cobayos. Los resultados son presentados como el promedio $\pm$ EEM de 5 muestras por grupo con un análisis de ANOVA de una vía y prueba post hoc Tukey . OVA=Modelo de asma, 6-OHF (2) 50mg/mL. ....	57
Figura 17. Cuantificación de Tromboxanos B <sub>2</sub> . Los resultados son presentados como el promedio $\pm$ EEM 5 muestras por grupo con una $*p<0.05$ análisis con ANOVA de una vía y prueba post hoc Turkey. OVA= Modelo de asma, 6-OHF (2) 50mg/kg. ....	59
Figura 18.Efecto de 6-hidroxiflavona en el cambio de peso de ratones en el periodo de administración. Los resultados son presentados como el promedio $\pm$ EEM 3 animales por grupo con una $*p<0.05$ análisis con ANOVA de una vía y prueba post hoc Tukey. ....	61
Figura 19. Peso relativo de a) corazón, b) riñón, c) pulmón e d) hígado en animales sham o sin tratamiento, vehículo y tratados con 6-hidroxiflavona a una dosis diaria de 50 mg/kg durante 28 días cada barra representa $\pm$ EEM de 3 animales por grupo.....	63
Figura 20. 1Determinación de transaminasas de animales sham, vehículo y tratados con 6-hidroxiflavona a una dosis de 50 mg/kg durante 28 días cada barra representa $\pm$ EEM de 3 animales por grupo. ....	64
Figura 21. Histología de pulmón, hígado, corazón y riñón de ratones tratados durante 28 días con la administración repetida DE 6-OHF.representativo de cada grupo de animales con tratamiento, sham, y vehículo ( Soln. de NaHCO <sub>3</sub> al 5%). Tinción de eosina-hematoxilina. ....	65
Figura 22. Linealidad del sistema.....	67
Figura 23.Linealidad del método en plasma humano .....	68
Figura 24.Linealidad del método en plasma de rata.....	69
Figura 25. Concentración de 6-OHF en plasma de rata a través del tiempo. ....	71

**II. INDICE DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Tratamiento farmacológico para asma.....	11
<b>Tabla 2.</b> Curva de calibración .....	42
<b>Tabla 3.</b> Exposición aguda de 6-hidroxi flavona a diferentes dosis.....	60
<b>Tabla 4.</b> Precisión y exactitud del método analítico .....	69
<b>Tabla 5.</b> Porcentaje de recobro.....	70
<b>Tabla 6.</b> Parámetros farmacocinéticos de 6-OHF en ratas wistar después de una administración oral de 50 mg/kg.....	71

---

## III. LISTA DE ABREVIATURAS

6-OHF	6-hidroxi flavona
$\alpha$	Selectividad
ALP	Fosfatasa alcalina
Cds	Célula dendrítica
CETS	Centro estatal de transfusiones sanguíneas
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
$C_{m\acute{a}x}$	Concentración máxima
CPA	Célula presentadora de antígeno
CV	Coefficiente de variación
Cys-LT	Cisteinil leucotrienos
DL <sub>50</sub>	Dosis letal media
FcEr1	Receptor de alta afinidad
GHS	Sistema globalmente armonizado
IB	Índice de bronco-obstrucción
IgE	Inmunoglobulina E
IL	Interleucina
INER	Instituto nacional de enfermedades respiratorias
JNK	c-Jun N-terminal quinasa
K	Factor de retención
LBA	Lavado bronquio alveolar
MHCII	Complejo de histocompatibilidad principal clase II
N	Eficiencia
NOS	Óxido nítrico sintasa
OVA	Ovoalbúmina
PAS	Ácido periódico shiff
PFE	Pico de flujo espiratorio
PFI	Pico de flujo inspiratorio
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandina H <sub>2</sub>
R	Resolución
ROC	Canales de calcio operado por receptor
SAR	Relación estructura actividad biológica
TCR	Receptor de células T
Te	Tiempo total espiratorio
Th	Células T
$T_{m\acute{a}x}$	Tiempo máximo
TMR	Tiempo medio de residencia

TPSA	Área superficial polar
Tr	Tiempo total de relajación
Treg	Células T reguladoras
TSLP	Linfopoyetina estromal tímica
TXB <sub>2</sub>	Tromboxanos B <sub>2</sub>
VOC	Canales de calcio dependientes de voltaje

# *RESUMEN*

---

En México, el asma es una de las enfermedades respiratorias que más afectan a niños, jóvenes y adultos y, aunque normalmente se puede controlar, existen pacientes que continúan con síntomas a pesar de estar en tratamiento, por lo que persiste la necesidad de generar nuevos tratamientos para una de las enfermedades respiratorias no transmisibles más importantes en el mundo. Por lo tanto; en esta investigación nos enfocamos en la propuesta de un tratamiento para el asma alérgica, derivado de un metabolito de tipo flavonoide, llamado 6-hidroxi flavona . Se realizaron estudios preclínicos de 6-hidroxi flavona que incluyeron estudios *in silico* con la finalidad de saber si ésta participaba como regulador en el proceso de broncoconstricción, y teniendo como antecedente su efecto sobre la musculatura lisa de la tráquea en un modelo *ex vivo* de rata, se logró predecir que 6-OHF bloquea el canal de calcio ROC (Canales de calcio operado por receptor) y VOC (Canales de calcio dependientes de voltaje), y podría interactuar con cavidades de unión que acceden al sitio catalítico, y esta interacción puede activar a eNOS. Por otro lado, en un modelo *in vivo* en cobayo se demostró que disminuye el índice de broncoconstricción ante un reto con ovoalbúmina y un posible mecanismo dirigido hacia la disminución de TXB<sub>2</sub> ; además, se probó que 6-hidroxi flavona no presenta efectos de toxicidad a dosis de hasta 2000 mg/kg de peso en un modelo de toxicidad aguda y subcrónica en murinos, ya que no se presentaron daños macroscópicos, como son cambios físicos, ni microscópicos en alguno de los órganos estudiados a

---

través de análisis bioquímicos o histológicos que muestren cambios en citoestructura aparente. Finalmente, se pudo describir de manera general el comportamiento farmacocinético que esta molécula podría tener. Es por esto que, 6-hidroxiavona promete ser un potencial fármaco para el asma alérgica y conseguir una mejor calidad de vida en los pacientes.

---

*ABSTRACT*

---



In Mexico, asthma is one of the respiratory diseases that more than children, young people and adults, although it can usually be controlled, there are patients who continue with the symptoms despite being in treatment, so the need for the new services. Treatments for a noncommunicable respiratory disease more important in the world. Therefore; In this research we focus on the proposal of a treatment for allergic asthma, derived from a flavonoid-type metabolite, called 6-hydroxyflavone. Preclinical studies of 6-hydroxyflavone were carried out that included studies *in silico* in order to know if it participated as a regulator in the process of bronchoconstriction, and having its antecedent effect on the musculature. It can be predicted that 6-OHF calcium channel ROC and VOC, and could interact with binding pockets that access the catalytic site, and this interaction can activate eNOS. On the other hand, in an *in vivo* model in guinea pigs it was shown that the bronchoconstriction index has improved when an ovalbumin retouched and a possible mechanism aimed at decreasing TXB<sub>2</sub>; In addition, it was proved that 6-hydroxyflavone does not present toxicity effects at a dose of up to 2000 mg / kg in a model of acute and subchronic toxicity in murine, and that it does not realize macroscopic some of the organs studied through of biochemical or histological analysis showing changes in the apparent cyto-structure. Finally, the pharmacokinetic behavior that this molecule could have was described in a general way. That is why, 6-hydroxyflavone promises to be a potential for the treatment of health and the achievement of a better quality of life in patients.

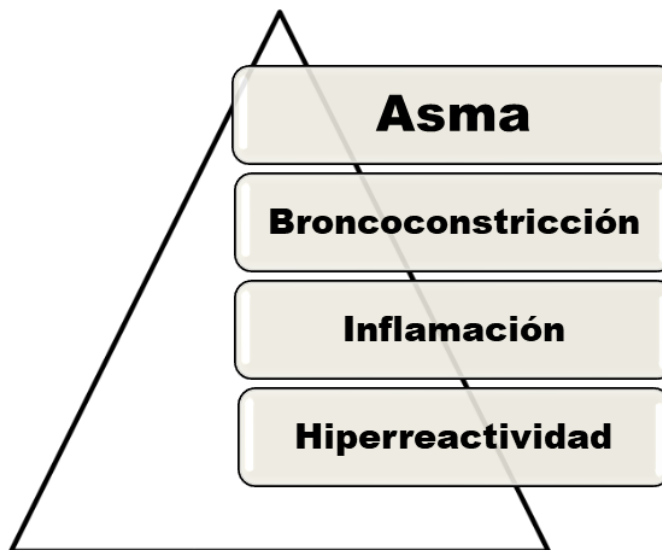
---

# *1. MARCO TEÓRICO*

---

## 1.1 Asma

El asma es una enfermedad heterogénea y variable y por lo tanto compleja, su definición ha ido cambiando por tener un conocimiento limitado de sus mecanismos fisiopatológicos e inmunológicos; sin embargo, de acuerdo a la iniciativa global del asma (GINA) la define como una enfermedad inflamatoria caracterizada por la obstrucción de flujo aéreo en la que determinadas células y mediadores celulares desempeñan un papel importante para el desarrollo de una crisis de asma (GINA, 2018; Russell y Brightling, 2017). Los síntomas producidos pueden ser sibilancias, opresión en el pecho, falta de aire y tos con una obstrucción reversible de las vías aéreas acompañado de hiperreactividad; cada uno de estos síntomas los provocan otros procesos como la inflamación de las vías aéreas, hiperrespuesta y remodelado que conducen a una triada para el asma y que pueden variar entre cada paciente (figura 1). Algunos otros factores suelen estar involucrados como las infecciones de vías aéreas, respuesta alérgica mediada por la inmunoglobulina E, exposición a contaminantes, ejercicio, estrés y la estimulación de nervios sensoriales y colinérgicos (Russell y Brightling, 2017).



**Figura 1.** Interacción del asma y su fisiopatología (figura propia).

## 1.2 Epidemiología

En los últimos años se ha observado un incremento en la prevalencia del asma y enfermedades alérgicas en diferentes ciudades alrededor del mundo. La OMS (2018) estima que existen 235 millones de pacientes con asma y según sus estimaciones de hace 3 años 383,000 personas murieron por dicha enfermedad. Por otro lado, la Iniciativa Global del Asma (GINA) estima que habrá un incremento de 100 millones de personas con asma para el 2025. Sin embargo, cuando se aborda el tema de epidemiología resulta complicado ya que es una enfermedad poco reportable debido a que existen diferencias en el protocolo de diagnóstico para asma (ejemplo de la variación es por definición, resultados, cantidad de datos entre otros) (Subbarao, Mandhane y Sears, 2009). Lo dicho hasta aquí supone que el incremento en la incidencia del asma en los últimos años y variación geográfica se debe a diferentes factores como el cambio climático ya que, los desencadenantes ambientales pueden afectar en diferentes momentos de la vida de un paciente

asmático, o bien el género, ya que estudios han demostrado que los hombres padecen asma antes de entrar a la adolescencia pero en las mujeres predomina una alta prevalencia en la edad adulta a diferencia de los hombres; entre otros factores el consumo de tabaco en el embarazo, nutrientes de la dieta en el embarazo, estrés, uso de antibióticos e infecciones, exposición a animales entre otros. Por lo tanto, la variación en la prevalencia del asma se le atribuye a que es una enfermedad multifactorial (Subbarao, Mandhane y Sears, 2009;Forno y Cols., 2015; Rosser y Cols., 2014).

### **1.3 Clasificación del asma**

El asma es una enfermedad multifactorial por lo que existen diversos criterios para ser clasificada; por su frecuencia y gravedad con estas características se clasifica en asma intermitente y asma persistente (leve, moderada y grave) en esta clasificación se evalúa la frecuencia de los síntomas y la función pulmonar (Salas, Fernandez y Almeida; 2009). De acuerdo a su etiología se clasifica en extrínseca mediada por inmunoglobulina E (IgE), extrínseca no mediada por IgE, intrínseca del adulto, ocupacional, con intolerancia a antiinflamatorios no esteroidales y producida por ejercicio; esta clasificación se basa en el mecanismo productor o el que desencadena el asma (Mapp y Cols.,1999;Calvo;1995 ). Sin embargo, en recientes años se ha despertado el interés de obtener una clasificación basada en sus fenotipos y endotipos, los cuales cada vez van evolucionando en las investigaciones en los aspectos genéticos y sus posibles biomarcadores ayudando al paciente e identificando lo que a cada uno de ellos podría beneficiarles en la elección de un tratamiento (Funk; 2014; Bostantzoglou y Cols., 2015).En este contexto, el fenotipo

ayuda a describir las características observables (clínicas, morfológicas, bioquímicas y respuesta al tratamiento) sin una relación con la fisiopatología pero teniendo una relación con los genes y el ambiente; permitiendo clasificarla como asma alérgica, asma no alérgica, asma de fase tardía, asma con limitación de flujo aéreo y asma con obesidad (Hirose y Horiguchi; 2015, GINA,2018). Por otro lado, el endotipo define una vía biológica hablando de su etiología y mecanismo fisiopatológico que ayudara a explicar las características observables del fenotipo (Agache y Akdis; 2016). Se han propuesto diferentes endotipos con suficientes evidencias estos circunscriben a características clínicas, biomarcadores, fisiología del pulmón, genéticas, histopatología, epidemiología y la respuesta al tratamiento y con base en esto, que se clasifica como asma alérgica, asma intrínseca, asma neutrofilica, asma intolerante a aspirina y asma con presencia de remodelación de vías aéreas (Svenningsen y Nair;2017;Singh, Shah y Singh; 2016 ; Lötvall y Cols., 2017).

#### **1.4 Mecanismos inmunológicos del asma alérgica**

El término “alergia” en 1906 fue acuñado por Clemens von Pirquet para distinguir a individuos que desarrollan signos y síntomas de reactividad o reacciones de hipersensibilidad cuando se exponen a ciertas sustancias (Galli y Cols., 2008).

Los desórdenes alérgicos suelen asociarse a la producción de IgE específica de alérgenos y expansión de poblaciones de células T específicas de alérgenos. La IgE es producida tanto por las células plasmáticas en los ganglios linfáticos que drenan el sitio de entrada del antígeno, como por las células plasmáticas en el sitio de la reacción alérgica, donde los centros germinativos se desarrollan dentro del tejido inflamado (Galli y Cols., 2008; Murphy Kenneth, Travers Paul, 2008).

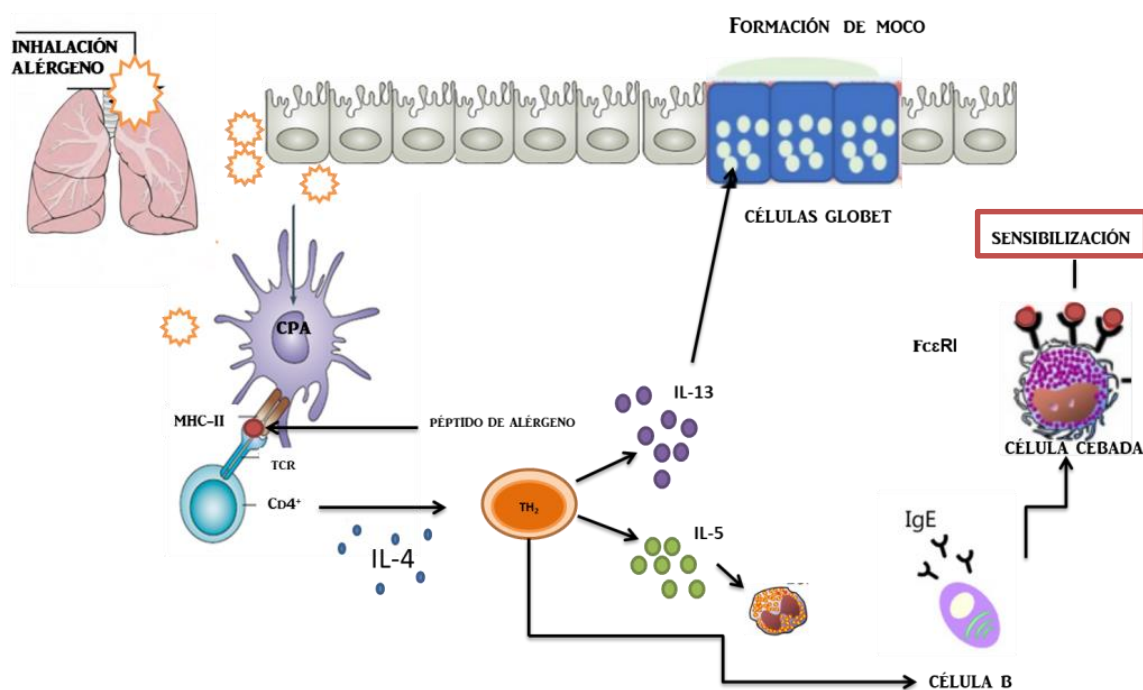
Antes de examinar los mecanismos inmunológicos es importante aclarar qué es un alérgeno; existen dos tipos principales de alérgenos. El primero involucra cualquier sustancia medioambiental no infecciosa puede inducir la producción de IgE y en la que la reexposición posterior a esa sustancia induzca una reacción inflamatoria. Los alérgenos comunes derivan de pólenes de hierba, árboles, ácaros, partículas fecales, ciertos alimentos, látex, algunas medicinas y venenos de insectos. El segundo, tiene que ver con un agente o sustancia ambiental no infecciosa que puede inducir una respuesta inmune adaptativa asociada con inflamación local, pero se piensa que ocurre independientemente de IgE (Galli y Cols., 2008).

En el asma alérgica existe un proceso de inflamación y se clasifica en tres fases: Sensibilización al alérgeno, reacciones de fase temprana, y reacciones de fase tardía, las cuales se describen a continuación (Galli y Cols., 2008).

#### **1.4.1 Sensibilización a un alérgeno**

La sensibilización alérgica de los individuos susceptibles depende de varios factores genéticos y ambientales (Custovic y Simpson.; 2004). Por lo tanto, existen diferentes teorías sobre el desarrollo de enfermedades alérgicas; el inicio de una respuesta alérgica en general ocurre cuando existe la exposición a un alérgeno y se da la captura y procesamiento del mismo por las células dendríticas (CDs) a péptidos, las CDs son las principales células presentadoras de antígeno (CPA) y se encuentran justo debajo de la capa epitelial de las vías respiratorias (Murphy, Travers y Alport; 2008). Posteriormente, se hace la presentación del antígeno y se une a las moléculas de histocompatibilidad clase II (MHCII) e interactúan en conjunto la

expresión del complejo de receptor TCR/CD3, las moléculas estimuladoras (CD) CD28 y CD80 (B7-1) o CD86 (B7-2) sobre las células T naive CD4<sup>+</sup> dependiendo de las señales de las citocinas liberadas dará origen a una respuesta de células T (Th) Th1, Th2, Th9, Th17 o Treg (figura 2) (Galli y Cols., 2008; Mullane, 2011). Si se da una respuesta Th2 principalmente interleucina 4 y 13 (IL-4 e IL-13) llevaran a cabo una diferenciación de los linfocitos B productoras de inmunoglobulina E (IgE) y que finalmente al estar recién sintetizada se une a receptores de alta afinidad (FcεRI) en la superficie de la célula cebada induciendo una sensibilización (figura 2) (Egawa y Bhattacharya; 2019; Murphy, Travers y alport; 2008).



**Figura 2.** Proceso de sensibilización al alérgeno de las vías respiratorias. CPA, célula presentadora de antígeno, FcεRI, receptor de IgE de alta afinidad, MHCII, molécula de histocompatibilidad clase II, TCR, receptor de célula T. (figura propia)



### 1.4.2 Fase temprana

Las reacciones de fase temprana ocurren minutos después de ser expuesto un individuo sensibilizado a un alérgeno y se refleja con la secreción de mediadores que son liberados de las células dendríticas y la reacción puede ser localizada o sistémica (Galli y Cols., 2008). Cuando se entrecruzan las moléculas adyacentes de IgE por alérgenos bivalentes o multivalentes, la unión a FcεRI (receptor de IgE alta afinidad) activan un complejo proceso de señalización secretando productos activos: gránulos citoplasmáticos, mediadores derivados de lípidos y citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento, entre otros productos (Galli y Cols., 2008; Passalacqua y Ciprandi, 2008). Por otra parte, las citocinas responsables de la hiperplasia de las células cebadas y los eosinófilos son la citocina IL-5 y IL 9. A su vez, la IL-13 regula la proliferación de células calciformes, seguido por la inducción a la producción de moco y mucina, las cuales son proteínas e importantes marcadores en el asma alérgica (Kubo, 2017). En consecuencia la liberación de todos estos mediadores antes mencionados; se contribuye a los signos y síntomas agudos asociados con las reacciones de fase temprana, que cambian de acuerdo al sitio de reacción e incluyen vasodilatación, permeabilidad vascular incrementada, contracción del músculo liso bronquial y un incremento en la secreción de moco así como los nervios sensoriales y nociceptores que inducen la tos, hinchazón y estornudos (Galli y Cols., 2008; Weersink y Cols., 1994).

### 1.4.3 Fase tardía

Las reacciones de fase tardía suceden después de las 2 a las 6 h de exposición al alérgeno y se caracteriza por la hipersecreción de moco. Asimismo,

inician esta reacción las células cebadas residentes activadas por IgE y alérgenos o de células T que suelen reconocer péptidos derivados de alérgenos. Las reacciones de fase tardía son consecuencia de la liberación de mediadores por las células cebadas durante las reacciones de fase temprana (Galli y Cols., 2008; Weersink y Cols., 1994). Los principales mecanismos involucrados son; IL-4, IL-5, IL-13, eotaxinas, leucotrienos,  $\text{tNF}\alpha$ , factor estimulante de colonias de granulocitos, neuropéptidos, moléculas de adhesión y factor de crecimiento transformante alfa. Éstos ocasionan, igualmente, reacción en la vía aérea superior manifestada por congestión e hiperreactividad nasal y en la vía aérea inferior provocando broncoconstricción prolongada, incremento de hiperreactividad de la vía aérea y remodelación de la misma (Busse y Rosenwasser;2003; Galli y Cols. 2008).

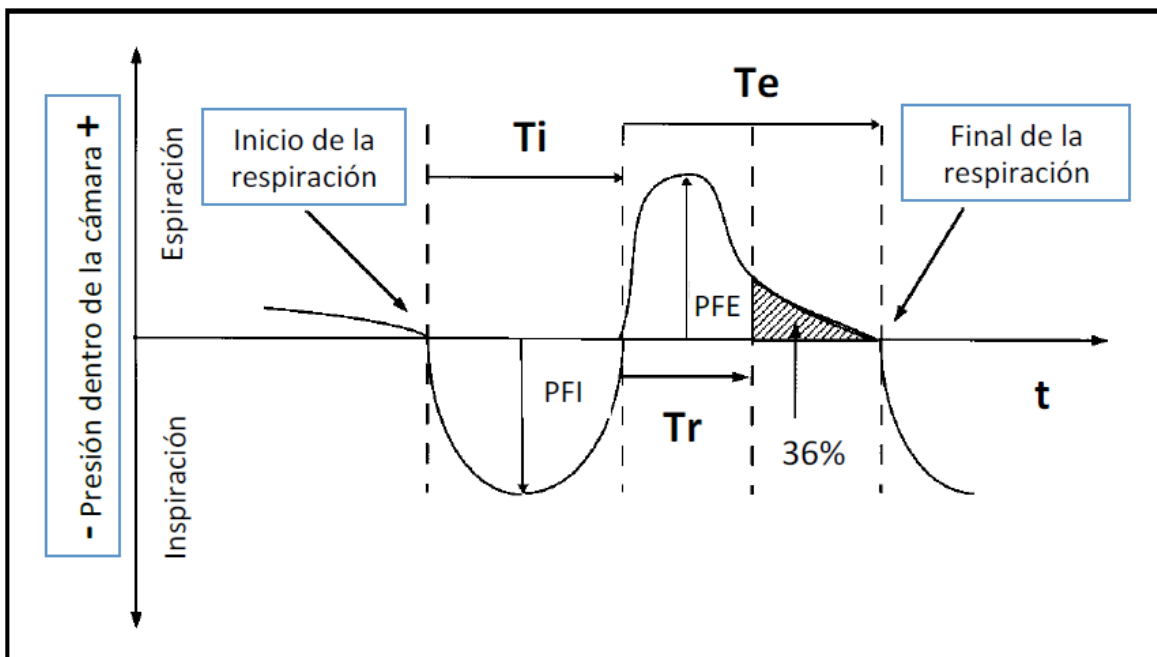
### **1.5 Pletismografía**

Es una prueba de función respiratoria que mide el volumen de gas intratorácico y la resistencia específica de la vía aérea. Cuando se hace la medición de la función pulmonar depende de la distensibilidad e integridad de la musculatura respiratoria. El método fue descrito por Bert (1878), Gad (1881) y Pflüger (1882) en el siglo XIX, y realizada como una caja de volumen constante en la década de 1950 por DuBois, Mattys y Ulmer (Guerrero-zúñiga y Cols., 2016; Sorichter y Cols., 2011). Por lo que se refiere a la medición, se encuentra fundamentada en la Ley de Boyle-Mariotte que indica que el volumen de un gas es inversamente proporcional a la presión a la que está sujeto en condiciones isotérmicas (figura 3).



**Figura 3.** Pletismografía barométrica. Neumowiki (2015).

El principio de la pletismografía se divide en dos,: la del equipo y la de la medición. Por un lado, se utiliza una cámara hermética y durante la medición la caja se cierra con el individuo dentro estabilizando la presión interna para equilibrar los pequeños cambios de presión haciendo uso de un transductor para medir la presión que existe dentro de la caja siendo relativa a la del ambiente. En este sentido, el principio de la medición se basa en detectar los cambios de presión en la caja determinando el volumen de pulmón estático y la resistencia de flujo de aire (Ramos-Ramírez y Cols., 2013; Sorichter y Cols., 2011). Para calcular el valor de índice de broncoobstrucción el programa utiliza la siguiente fórmula (Vargas y Cols., 2010) (figura 4):



**Figura 4.** Parámetros medidos en pleтымografía .Ramos- Ramirez (2013).

$$\dot{I}B = ((T_e - T_r) / T_r) (PFE / PFI)$$

$\dot{I}B$ = Índice de bronco-obstrucción

$T_e$ = Tiempo total espiratorio (s)

$T_r$ = Tiempo total de relajación (s)

PFE= Pico de flujo espiratorio (presión pasiva máxima, cmH<sub>2</sub>O)

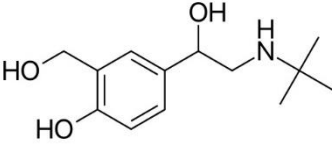
PFI= Pico de flujo inspiratorio (presión negativa máxima, cmH<sub>2</sub>O)

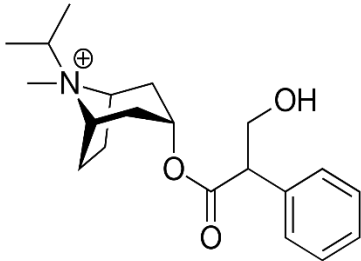
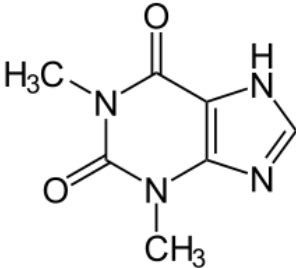
## 1.6 Tratamiento farmacológico

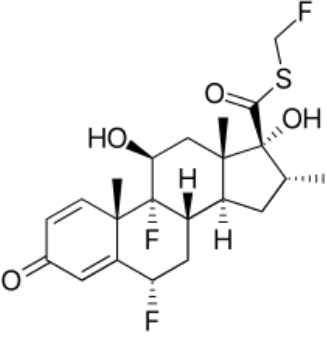
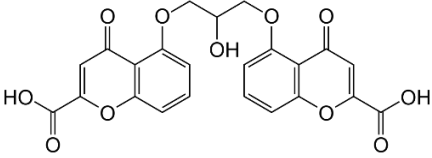
La falta de cumplimiento de las indicaciones terapéuticas en asma es un factor importante para el control de la enfermedad y puede traer como consecuencia el agravamiento de los síntomas, las pérdidas económicas para el paciente y el incremento de los gastos de los servicios de salud, así como un posible deterioro de

la calidad de vida del paciente y su familia (Nélida, 2001). Actualmente, dos tipos de fármacos son utilizados en el tratamiento de la obstrucción de vías aéreas los broncodilatadores que inmediatamente revierten la obstrucción de vías aéreas, por la relajación del músculo liso y controladores o antiinflamatorios que tienen una respuesta mediante la inhibición de la infiltración y activación de células inflamatorias así como su síntesis o liberación de mediadores inflamatorios (Barnes, 2012; Mali y Dhake, 2011)(Tabla 1).

**Tabla 1.** Tratamiento farmacológico para asma (Barnes, 2012; Katzung y Cols., 2012)

Broncodilatadores	Fármacos	Mecanismo de acción
<b>Selectivos <math>\beta_2</math>-adrenérgicos</b>	<p>Acción corta: albuterol, levalbuterol,<sup>®</sup>- enantiomero de albuterol, metaproterenol, terbutalina y pirbuterol.</p> <p>Acción larga: salmeterol (parcial) y formoterol (completo).</p>	Estimulación directa de receptores $\beta_2$ en el músculo liso de las vías aéreas. Se activa adenilato ciclasa al estimular a la proteína G e incrementar AMPc conduciendo a una relajación.
	 <p>The chemical structure of Salbutamol is shown, featuring a benzene ring with a hydroxyl group at the 3-position and a hydroxymethyl group at the 4-position. A side chain is attached at the 1-position, consisting of a chiral carbon with a hydroxyl group, a propyl chain, and a tert-butylamino group.</p>	
	<b>Salbutamol</b>	

<p><b>Antimuscarínicos</b></p>	<p>Bromuro de ipratropio</p> 	<p>Antagoniza los efectos de acetilcolina al bloquear los receptores muscarínicos colinérgicos.</p>
<p><b>Metilxantinas</b></p>	<p>Teofilina</p> 	<p>Inhibiendo nucleótidos cíclicos (PDEs) que conlleva a incremento de AMPc y GMPc</p>
<p><b>Antinflamatorios</b></p>	<p><b>Fármacos</b></p>	<p><b>Mecanismo de acción</b></p>
<p><b>Corticoesteroides</b></p>	<p>Dipropionato de beclometasona, acetónido de triamcinolona, flunisolida, budesonida, propionato de fluticasona, mometasona.</p>	<p>Entran a la célula y se unen a los receptores de glucocorticoides, se transportan al núcleo y se unen a secuencias específicas, pueden inhibir factores de transcripción como NF-κB y activador de proteína-1 que regulan la expresión de genes</p>

 <p>Fluticasona</p>	<p>inflamatorios.</p>
<p><b>Cromonas</b></p> <p>Cromolín</p> 	<p>Inhibición en la liberación de mediadores inflamatorios, inhibición de la degranulación de la célula cebada.</p>
<p><b>Inhibidores de IgE</b></p> <p>Omalizumab.</p>	<p>Es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante actúa uniéndose a IgE y bloquea su activación (Unión a FcεRI sobre las células cebadas) inhibe célula cebada, interleucina, cys-LT y prostaglandinas.</p>
<p><b>Antagonistas del receptor de leucotrienos</b></p> <p>Zafirlukast, montelukast y pranlukast</p>	<p>Antagoniza de manera competitiva el receptor de cisteinil leucotrienos (cys-LT).</p>

### 1.7 Estudios preclínicos

La farmacología ha jugado un rol importante en el desarrollo de productos naturales para hacer terapias más efectivas y seguras, pero hasta ahora sigue siendo un reto producir nuevas clases de terapias antiasmáticas (Barnes, 2006). Por lo tanto, la seguridad farmacológica es uno de los estudios más importantes, ya que predice si el fármaco que se administrará en humanos o animales, puede ser peligroso y prevenir que esto ocurra. En este sentido; compuestos líderes son sometidos a pruebas preclínicas de toxicidad, efecto *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*, así como estudios de farmacocinética, con los cuales podemos conocer el curso temporal de las concentraciones, la cantidad de fármaco y sus metabolitos en los fluidos biológicos, tejidos y excretas (Magos y Lorenzana; 2009). En este contexto, es importante el conocimiento del comportamiento farmacocinético porque permite optimizar los tratamientos asegurándonos que las concentraciones de fármacos se encuentran dentro del margen terapéutico con el objetivo de obtener la máxima eficacia y la mínima incidencia de eventos adverso (Pugsley y Cols., 2008).

### 1.8 Validación de procesos

La validación de procesos, según lo define la FDA (Administración de Medicamentos y Alimentos), es establecido por la evidencia documentada que provee un alto grado de seguridad en un proceso específico, promueve un producto que cumple con las especificaciones y características de calidad establecidas (Ahuja y Dong; 2005).



### 1.8.1 Cromatografía por HPLC

La cromatografía es una técnica que se ha descrito desde 1903 y se utilizó hasta 1931; su fundamento se basa en la separación de los componentes de una mezcla transportados de una fase móvil a través de una fase estacionaria (Torres de Young;1928).

Algunos de los descriptores comunmente utilizados para reportar las características de una columna cromatográfica, el sistema y la separación del analito son :

**a) Factor de retención ( $k$ )** hace referencia a una de las capacidades de la columna para retener las muestras inyectadas y separar eficazmente los componente de la muestra (Verma y Santoyo; 2007).

**b)**

$$k = \frac{t_r - t_o}{t_o}$$

$t_r$  es el tiempo de retención del analito

$t_o$  es el tiempo de retención del analito no retenido

**b) Eficiencia ( $N$ )** es la medida del grado de dispersión del pico en una columna en particular y mide el número de platos teóricos de la columna permitiendo que un soluto se equilibre entre la fase estacionaria y móvil (Verma y Santoyo; 2007). calculandolo de la siguiente manera:

$$N=16 (t_R/w)^2$$

$t_R$  = tiempo de retención

$w$  = ancho del pico

**c) Selectividad ( $\alpha$ )** es la habilidad de sistema cromatográfico para discriminar dos diferentes analitos medido por los tiempos de retención (Kazakevich y LoBrutto, 2006)

$$\alpha = k_2 / k_1$$

$K_2$  = Factor de retención del analito 2

$K_1$  = Factor de retención del analito 1

**d) Resolución (R)** es una medida combinada de la separación de dos compuestos que incluyen la dispersión del pico y selectividad.

$$R = 2 \frac{t_2 - t_1}{w_2 - w_1}$$

$t$  = tiempo de retención

$w$  = ancho del pico

**e) Linealidad** se refiere a la proporcionalidad entre la concentración de analito y su respuesta. Además, se determina el **rango lineal**, es decir, el intervalo comprendido entre la concentración mínima y máxima de analito por el cual el método ha sido probado y dentro del cual se efectúa el dosaje por interpolación en una curva estándar. Es así como se preparan cinco diluciones de un estándar comprendiendo

los ambitos estimados de trabajo con un exceso de al menos 50% sobre el limite superior e inferior (Quatrocchi y Andrizzi, 1992).

**f) Precisión** esta relacionada con la dispersión de las medidas alrededor de su valor medio o central y corresponde al grado de concordancia entre ensayos individuales cuando el método se aplica repetidamente a multiples alicuotas de muestra homogénea. Para poder expresarla matemáticamente como desviación estándar,  $\sigma$ , o coeficiente de variación (CV) (Quatrocchi y Andrizzi, 1992).

**g) Exactitud** también conocida como error sistemático o tendencia corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero (Quatrocchi y Andrizzi, 1992).

**h) Sensibilidad** corresponde a la minima cantidad de analito que puede producir un resultado significativo. Para evaluar la sensibilidad se definen los siguientes parámetros(Quatrocchi y Andrizzi, 1992).

**i) Limite de detección** corresponde a la menor concentración de analito que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse en la muestra (Quatrocchi y Andrizzi, 1992).

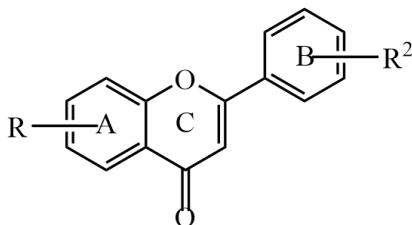
**j) Limite de cuantificación** corresponde a la menor concentración de analito que puede determinarse con presición y exactitud (Quatrocchi y Andrizzi, 1992).

## *2. ANTECEDENTES*

## 2.1 Flavonoides

Los flavonoides son compuestos polifenólicos que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza; se han logrado identificar a 9000 flavonoides y derivados, pero no de todos se conoce su actividad biológica (Tian, Qing y Kai; 2018). La ruta biosintética de la cual derivan son del ácido shikímico responsable de la secuencia de carbonos C<sub>6</sub> – C<sub>3</sub> que da origen al anillo B; mientras que la cadena lateral de la estructura de un flavonoide proviene de la ruta del acetato malonato para formar el anillo A como se muestra en la figura 5 (Crozier, Jaganath y Clifford; 2009).

Los flavonoides han despertado un gran interés en el ámbito científico porque se les atribuye diversos efectos benéficos para la salud, como antioxidante, anti-alérgico, anti-inflamatorio, antihepatotóxico, antiulcerativo, anticancerígeno, antimutagénico, antiobesidad, antidiabético, antiespasmódico (Carlo y Cols; 1999), actividad antiviral y protección contra eventos cardiovasculares, efecto broncodilatador agudo, vasorrelajante, antidiabético, antioxidante, antiaterogénico, entre otros; los diferentes efectos farmacológicos que se les atribuyen suele deberse a sus tipos de sustituyentes en la estructura química y se cree que algunos flavonoides al ser similares en sus estructuras químicas pueden entrecruzarse en sus vías de acción y por lo tanto generarse multibeneficios en la salud (Lin y Cols., 2008; Moon, Wang, Morris 2006 y Shi y Cols., 2009).



**Figura 5.** Estructura base de los flavonoides.

### 2.1.1. Farmacocinética de flavonoides

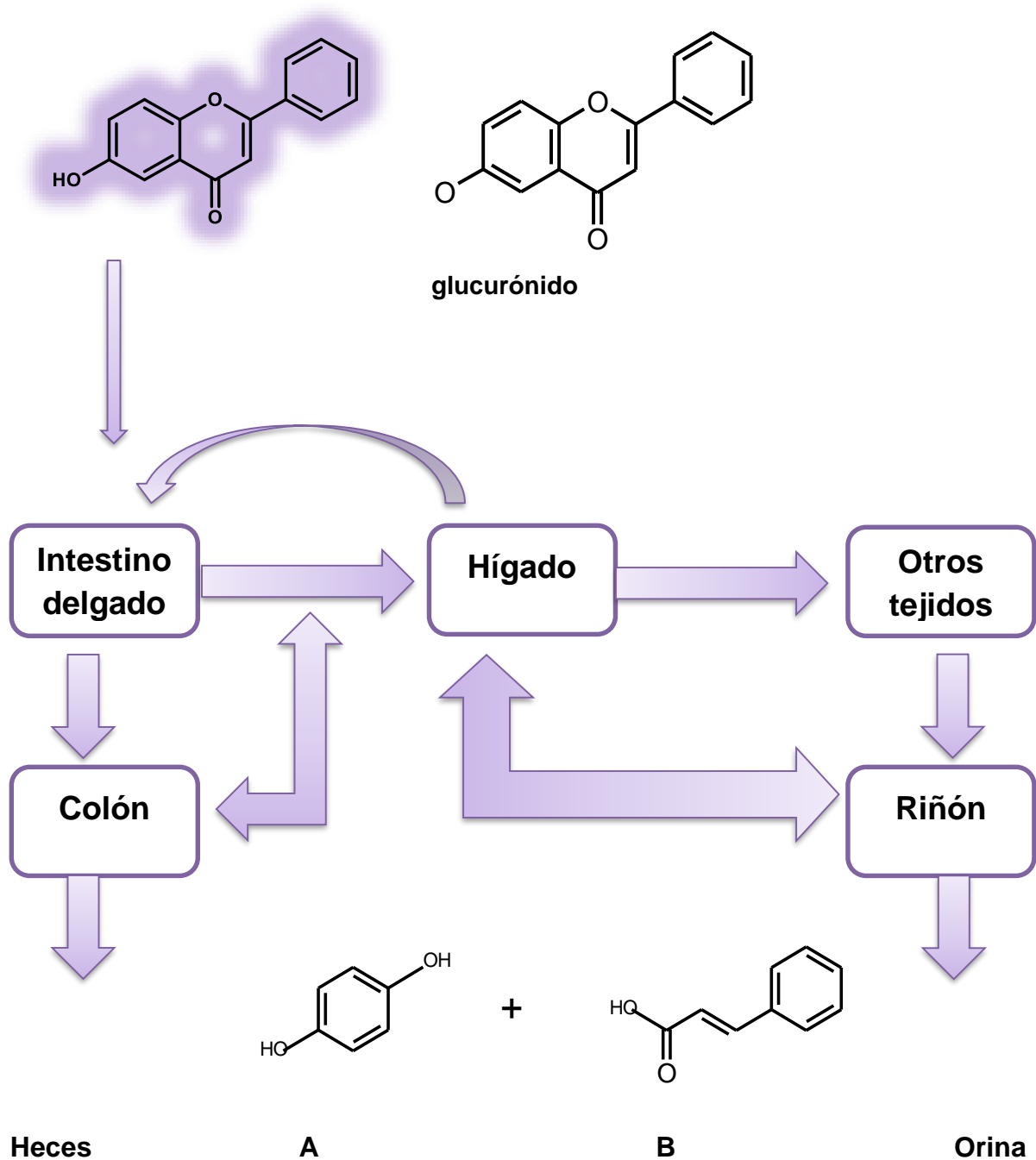
El metabolismo de los flavonoides sigue siendo incierto, sin embargo, a lo largo de los años y mediante diferentes estudios se ha observado que los flavonoides que no absorbibles son los conjugados con un azúcar llamados glucósidos y únicamente las agliconas penetran la barrera intestinal. Antes de ser absorbido un flavonoide es escindido, y resultando por una parte su aglicona y por otro su glucósido; es importante mencionar que la aglicona puede tardar hasta 3 horas en ser absorbida. Es por esto que, en promedio las concentraciones pico de los flavonoides se da a las 1.75 horas según la literatura (Isaac y Cols., 2009).

En el metabolismo de los flavonoides se consideran dos compartimentos, el primero consiste en de tejidos tales como intestino delgado, hígado y riñones y el segundo se le considera al colon. Por lo tanto, flavonoides que no se absorben en el intestino delgado y que se absorben y secretan en la bilis se encontraran en el colón (figura 6).

Los flavonoides sufren metabolismo de primer paso y suelen ser excretados por la bilis y aunque se reabsorben ya no tienen funcionalidad. Su biodisponibilidad es de 1.5% y su transformación es en el hígado mediante las reacciones de fase I en

donde se adicionan o exponen grupos polares y en el colon mediante la fase II donde la microbiota degrada los flavonoides no absorbidos y pueden ser conjugados con glicina, ácido glucurónico y sulfatos (Crozier y Cols., 2009; Isaac y Cols., 2009) .

El metabolismo de los flavonoides puede darse en diferentes órganos que incluye al intestino delgado, hígado, riñones y algunos lo pueden hacer en el colon cada uno de ellos utiliza enzimas capaces de llevar a caba la biotransformación de los diferentes flavonoides y si la estructura presenta grupos hidroxilo se pueden conjugar con glicina, sulfato o ácido glucurónico (figura 6) (Hollman;2004). Adicionalmente; el metabolismo que se da en el colon es bacterial, se debe a microorganismos que se encuentran en la flora fecal responsables de la hidrolisis de glicosidos de flavonoides y de glucurónidos y sulfatos de flavonoides (Walle;2004); posteriormente, degradaran el esqueleto de la estructura del flavonoide en productos fenólicos y ácidos carboxílicos dependerá del tipo de flavonoide ; para el caso de flavonas y flavanonas producirá ácido fenilpropiónico. Finalmente, estos ácidos fenilcarboxílicos estarán sujetos a la degradación bacteriana y enzimas de transformación en los tejidos del cuerpo (Hollman ; 2004).

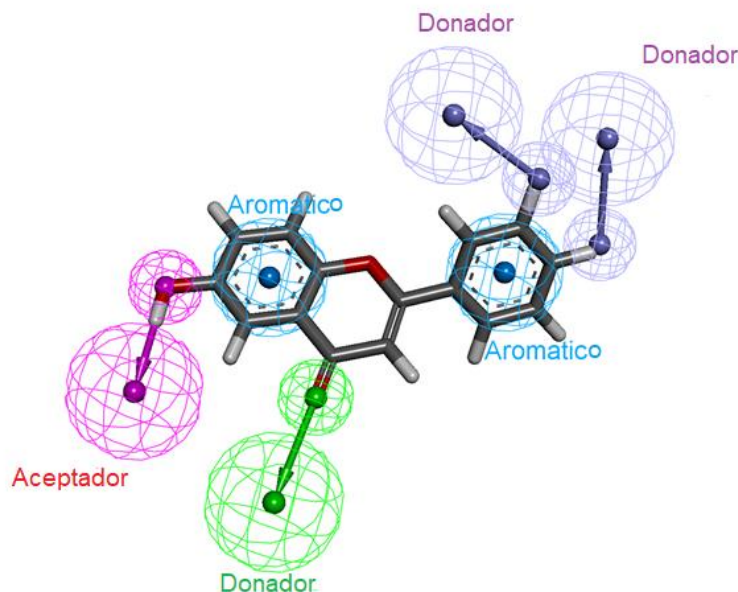


*Figura 6. Metabolismo de flavonas modificado de Hollman (2004).*



### 2.1.2. Antecedentes de 6-hidroxi flavona

En un estudio de flavonoides relacionados estructuralmente se mostró un efecto relajante significativo sobre la contracción inducida por carbacol, un agonista de los receptores colinérgicos sobre los anillos de tráquea de rata exceptuando los derivados isoprenilados y glicosilados (Flores y Cols; 2018). Los resultados indicaron que 6-hidroxi flavona (6-OHF) era una de las flavonas con mayor actividad relajante, inclusive más activa que el control positivo (teofilina). Por otro lado, mediante un análisis SAR (Relación Estructura Actividad) se demostró que la presencia de sustituyentes aceptores o donadores de puentes de hidrógeno en la posición C-6, la sustitución del anillo B en la posición C-4', 5' y C-6' y manteniendo la doble ligadura del anillo C de la posición C-2 y C-3 podrían mejorar el efecto relajante *ex vivo*. Así mismo, al determinar algunas propiedades fisicoquímicas como TPSA (Área Superficial Polar) y el Log P, se hizo el diseño de un farmacóforo con las características mínimas necesarias, y 6-hidroxi flavona cumplió con estas características (figura7). Por lo tanto; se determinó el mecanismo de acción *ex vivo* de 6-OHF sugiriendo que su efecto relajante puede ser mediado por un posible bloqueo de canales de calcio en el músculo liso de la tráquea de rata (Flores y Cols; 2018).



**Figura 7.** Patrón de farmacóforo hipotético con 6-OHF extraído de Flores-Flores (2018)

En un estudio reportado por Wang y Cols. En el 2015 probaron a diecinueve flavonas mono, di y polihidroxiladas sobre célula mesangial de rata para demostrar su efecto antiinflamatorio y utilizaron como estimulador a lipopolisacárido (LPS) y encontraron que 6-OHF y 4',6-dihidroxi-flavona son potentes agentes antiinflamatorios. También, se tienen reportadas algunas otras actividades de 6-OHF como su efecto en la diferenciación de osteoblastos en células MC3T3; donde los resultados mostraron que esta flavona estimula la actividad de fosfatasa alcalina (ALP), AKT y quinasas serina/treonina, quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK  $\frac{1}{2}$ ) y la vía de señalización de quinasa c-Jun N-terminal (JNK)(Lai y Cols., 2014). Finalmente, se ha demostrado, que flavonoides como 6-OHF presentan una inhibición de CYP2C9 no competitiva; y presenta un efecto ansiolítico sobre receptores GABA<sub>A</sub> (Wang y Cols., 2008).

Flavonoides relacionados estructuralmente a 6-OHF han mostrado también han demostrado actividades importantes relacionadas a este estudio, como es el caso de naringenina que mostró una actividad expectorante; la chalcona de naringenina ha demostrado suprimir los síntomas asmáticos por la inhibición de la producción de células CD4 y hesperidina que al ser administrada oralmente a ratones BALB/c, mostró que suprime la infiltración de eosinófilos, inflamación de las vías aéreas y la hiperrespuesta, esto ocurrió por la supresión en la producción de IL-5,IL-17 e IgE específica a OVA (Iwamura y Cols., 2010; Kim y Lee, 2011; Lin y Cols., 2008). Es por esto, que se propone en este proyecto a 6-OHF como candidato por presentar antecedentes relacionados que sugieren su potencial desarrollo como un fármaco antiasmático.

# *3. JUSTIFICACIÓN*

Actualmente la investigación científica en México se ha vuelto primordial para poder desarrollar productos innovadores en el ámbito farmacéutico. Por lo tanto, es importante fundamentar esta investigación en tres puntos relevantes.

El primero radica en el impacto que han tenido los productos naturales en la última década, como una alternativa en el tratamiento de múltiples enfermedades y han sabido venderse al público como buenos nutracéuticos. Sin embargo, muchos de ellos carecen de estudios científicos que los sustenten. Es por ello, que para esta investigación se eligió a una flavona que de acuerdo a la literatura presenta efectos vasorrelajantes de la musculatura lisa de las vías aéreas, efectos sobre la mucosidad de vías respiratorias y efectos expectorantes, entre otros. En este sentido, el segundo punto relevante es que debido a que la enfermedad es compleja y variable entre cada individuo es difícil tener un diagnóstico acertado, por lo que se recurre a una politerapia que incluye antiinflamatorios y broncodilatadores, sin embargo; esto afecta al paciente evitando que se adhiera totalmente al tratamiento. Finalmente, se sabe que el mercado de antialérgicos y antiasmáticos representan el 60% y como tratamientos más novedosos se encuentran los anticuerpos monoclonales; sin embargo, la principal desventaja de ellos son las reacciones adversas que presentan y en algunos casos las vías de administración. Por lo tanto, es aquí donde yace el interés por demostrar la seguridad de un tratamiento con 6-hidroxiavona sin posibles efectos adversos, eficacia y un efecto dual para el tratamiento de asma alérgica.

## *4. HIPÓTESIS*

Con base en los antecedentes mencionados, el flavonoide 6-hidroxiavona mostrará una actividad antiasmática significativa además de una seguridad farmacológica que permitirá su potencial desarrollo como fármaco experimental para el tratamiento de asma alérgica.

## *5. OBJETIVOS*



### 5.1. Objetivo general

Realizar estudios preclínicos (farmacocinéticos, farmacodinámicos y toxicológicos) de 6-OHF para su potencial desarrollo como fármaco antiasmático experimental.

### 5.2. Objetivos particulares

5.2.1 Establecer el modo de unión por acoplamiento molecular de 6-OHF con canales de calcio y la enzima eNOS.

5.2.2 Determinar el efecto de 6-OHF sobre la hiperreactividad bronquial en un modelo de asma aguda en cobayo.

5.2.3 Determinar el efecto antialérgico de 6-OHF en un modelo *in vivo* en cobayo.

5.2.4 Determinar la DL<sub>50</sub> de 6- OHF en un modelo de toxicidad aguda en murino.

5.2.5 Determinar los posibles efectos tóxicos de 6-OHF en un modelo de toxicidad subcrónica en murino.

5.2.6 Desarrollar y validar el método analítico de 6-OHF por cromatografía líquida de alta resolución.

5.2.7 Describir el comportamiento farmacocinético de 6-OHF utilizando un método analítico por cromatografía líquida de alta resolución.

# *6. METODOLOGÍA*

## 6.1. Reactivos

Para el desarrollo de esta investigación se utilizó 6-hidroxi flavona como fármaco en estudio y crisina como estándar interno en el estudio de cromatografía líquida de alta resolución, ambos se adquirieron de Sigma Aldrich México. El metanol grado HPLC que se utilizó fue marca J. Baker. El material biológico de plasma humano fue donado por el Centro Estatal de Transfusiones Sanguíneas (CETS) por la responsable sanitaria Yadira Lilian Bejar Ramírez (Anexo I).

## 6.2. Acoplamiento molecular

Se utilizaron como blanco de referencia (2003) la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) [1M9R, PDB] (Berman y Cols., 2000) y el canal de calcio de tipo L humano, modelado por Lipkind y Fozzard (2003). La validación del acoplamiento para cada objetivo se realizó utilizando moléculas previamente unidas o acopladas. La estructura de 3-bromo-7-nitroindazol unida a la estructura cristalográfica, 1M9R, se usó para eNOS. La nifedipina se usó como el ligando del canal de calcio de tipo L humano. La nifedipina y 6-OHF se construyeron usando el software MarvinSketch por ChemAxon (2018). Las coordenadas de 3-bromo-7-nitroindazol se obtuvieron a partir de la estructura cristalográfica, 1M9R.

Los experimentos de acoplamiento se dirigieron al sitio de unión conocido de cada objetivo. eNOS el centro de cuadrícula se ubicó en las coordenadas (24.16,12.55,30.29) con un tamaño de 14x14x24 Å<sup>3</sup>, esta casilla fue suficiente para cubrir los sitios S, M, C2 y C1 como lo muestran Rios y Cols. (2012). El centro de la rejilla del canal de calcio de tipo L estaba en (0,0,0) con un tamaño de 22.50x22.50x22.50 Å<sup>3</sup>. Todos los cuadros de cuadrícula tenían un espacio de malla

de 1 Å. Todos los sistemas fueron preparados usando el software Pymol 2.1.0 por Schrodinger (2010) y el complemento Autodock vina para Pymol (Seeliger y Groot, 2010). Se utilizó el software Autodock Vina (Trott y Olson, 2010) para llevar a cabo todos los estudios de acoplamiento. Se llevaron a cabo 100 ejecuciones de acoplamiento independiente para cada ligando.

Todas las imágenes se realizaron usando el programa VMD (Humphrey y Cols., 1996) y los mapas de interacción proteína-ligando se crearon con el software Maestro por Schrodinger (2018). Este experimento *in silico* se hizo con la colaboración del Dr. César Millan Pacheco.

### **6.3. Animales**

Para el diseño experimental de toxicidad aguda y subcrónica que se planteó, se utilizaron ratones machos de la cepa Balb/c (20-30g) que se mantuvieron en condiciones de bioterio con aserrín estéril y agua purificada. Para el estudio de farmacocinética se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar fueron alimentadas con dieta comercial y con libre acceso a agua. Los animales se mantuvieron a  $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$  en un ciclo de 12 horas. Asimismo, en este estudio se utilizaron cobayos (*Cavia porcellus*) machos de la cepa HsdPoc:DH de Harlan México con pesos aproximados entre 350 a 400 g al inicio del protocolo. Los cobayos se mantuvieron en condiciones convencionales de temperatura, humedad y alimentación en el bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER). Las condiciones consistieron en aire acondicionado filtrado, una temperatura  $21 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 50 a 60% de humedad, 12/12 horas de ciclo luz y oscuridad y cama esterilizada. Los animales se alimentaron con croquetas para cobayo (Harlan, S.A de C.V.) y agua

esterilizada *ad libitum*. Para el uso de cobayos el protocolo del proyecto se sometió a un comité ético y científico del INER, el protocolo fue aprobado y le fue asignado el código B01-16 (ANEXO II).

#### **6.4 Modelo experimental de asma agudo**

##### **Día 1: Sensibilización antigénica**

En el día 1 se clasifican a los animales en diferentes grupos (Naive , OVA , OVA+vehículo, OVA + 6-OHF (1) 30 mg/kg, OVA + 6-OHF (2) 50mg/kg y OVA + 6-OHF (3) 90 mg/kg, todos los grupos de animales fueron sensibilizados con ovoalbúmina (OVA) por vía intraperitoneal y subdérmica mediante una inyección que contenía 0.5 mL de una solución de OVA (10 mg/mL) marca Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, E.U. e hidróxido de aluminio (1 mg/mL) (figura 8) marca J.T. Baker, NJ, E.U., disueltos en solución salina fisiológica (SSF) ; el grupo naive solo fue nebulizado con SSF (Modificado de Ramos- Ramírez; 2013).

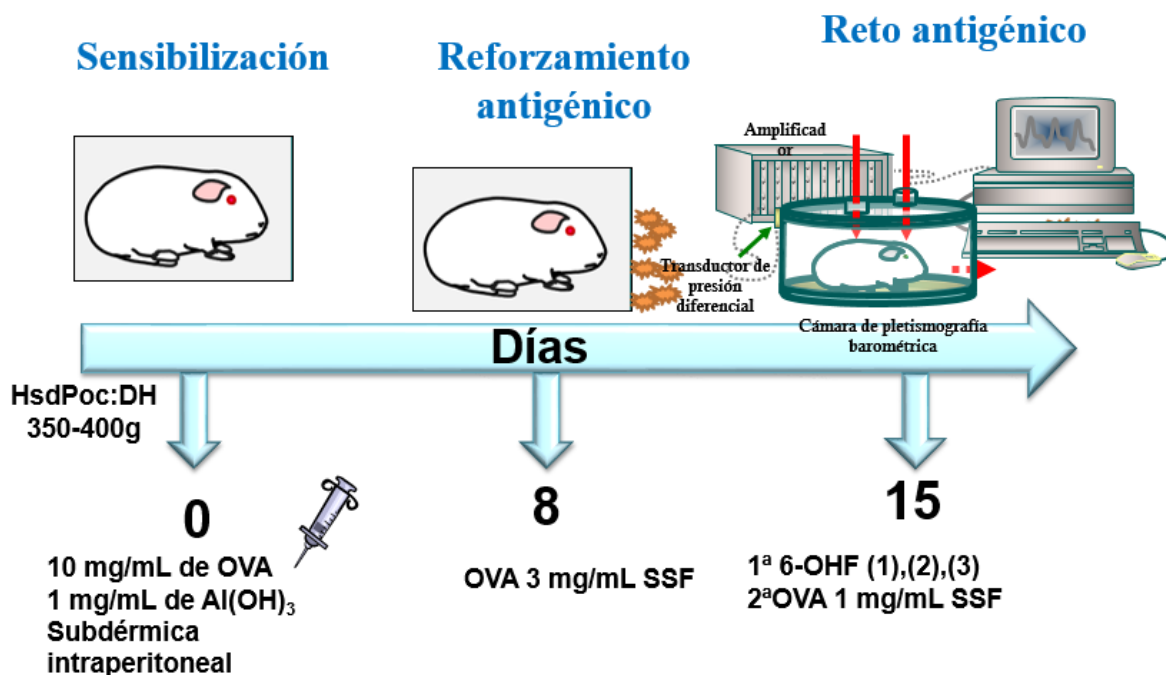
##### **Día 8: Refuerzo antigénico**

El día ocho se administraron aerosoles de OVA a los diferentes grupos. Los cobayos fueron colocados por separado dentro de una cámara provista de flujo de aire continuo (10 mL/s) y que no modifica la señal respiratoria durante el experimento. La OVA fue nebulizada (3 mg/mL en SSF) durante 5 minutos con un nebulizador US-Bennett (flujo de 2 ml/min) (figura 8). Este nebulizador produce una mezcla de partículas en donde el 44% es menor a 4  $\mu\text{m}$  de diámetro, el 38% de 4 a 10  $\mu\text{m}$  y el 18% mayor a 10  $\mu\text{m}$ . 5 minutos antes y durante una hora posterior al

refuerzo antigénico se evaluó la función pulmonar de los cobayos mediante pletismografía barométrica para animales en libre movimiento (Buxco Electronics Inc., Troy, NY, E.U.).

### Día 15: Bronco-obstrucción

La bronco-obstrucción fue medida usando un pletismógrafo de cuerpo completo (Buxco, Sharon, ct). Se administró, vía intraperitoneal en los cobayos del grupo OVA + 6-OHF (1),(2) y (3) diferentes dosis (30, 50 y 90 mg/kg) según correspondía utilizando como vehículo propilenglicol al 10%, la suspensión formada se administró 45 minutos antes de retar a los animales con ovoalbúmina (OVA) nebulizada (figura8). Los cobayos se retaron durante 1 minuto con OVA nebulizada y el valor de Penh o índice de bronco-obstrucción (iB) más alto se consideró como el 100%.



**Figura 8.** Modelo experimental en cobayos. Figura propia.

#### 6.4.1 Obtención de lavado bronqueoalveolar

Los cobayos fueron sobredosificados con una inyección vía intraperitoneal de pentobarbital sódico (28 mg/Kg) para inducir paro cardiorrespiratorio. Posteriormente, se realizó una incisión en la piel a la altura del cuello y hasta el abdomen, para exponer la caja torácica y localizar cuidadosamente la tráquea. A través de una incisión de la tráquea se introdujo una cánula por donde se administraron 5 mL de SSF estéril mantenida a 37°C. La solución se recuperó lentamente por medio de la cánula introducida después de un minuto. Este procedimiento se repitió y el fluido obtenido se mezcló con el primero. La mezcla se centrifugó durante 10 minutos a 1500 rpm a una temperatura de 4°C en una centrifuga (Hettich-Zentrifuge, Tuttlingen, Alemania), el sobrenadante se recuperó y se almacenó en alícuotas de 2 mL a -70°C para su posterior análisis (Ramos-Ramírez y Cols., 2013)

#### 6.4.2 Conteo celular

El sedimento celular obtenido del lavado bronquio alveolar (LBA) fue resuspendido en 1mL de solución salina fisiológica (SSF). Posteriormente, se tomaron 10 µL de la muestra de LBA y se mezclaron con 40 µL de colorante azul de Tripán al 0.4% (Sigma, E.U.), la mezcla se depositó en una cámara de Neubauer para hacer el conteo directo de las células en 25 cuadros. El valor obtenido se multiplicó por el factor de dilución 5 y por el factor de la cámara de 10,000 expresado como el número de células por mililitro de LBA. El volumen celular se ajustó hasta obtener 1 millón de células por mililitro adicionando 1 mL de SSF, de esta solución se tomaron 50 µL y se depositaron en un citospin a 3000 revoluciones por 5 minutos

esta es una centrifuga cuya función principal es producir una monocapa de células sobre un portaobjetos obteniendo un botón celular, el cual, fue teñido con la técnica de Romanowsky para realizar el conteo diferencial. Para esta tinción se utilizaron una mezcla de violeta y azul de metileno con eosina (Laboratorios Wescor, Hematology Reagent ABC, E.U.). La tinción permite distinguir la forma, tamaño y contorno de hematíes, núcleos, citoplasma y granulaciones, es así como los macrófagos, linfocitos, neutrófilos y monocitos adquieren colores púrpura y azules mientras que los gránulos de los núcleos de eosinófilos adquieren colores naranjas y rojos y se contaron un mínimo de 200 células en un aumento de 100X en un microscopio Olympus (Ramírez, 2013).

#### **6.4.3 Cuantificación de TXB<sub>2</sub> en LBA**

El tromboxano B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>) es un producto hidrolizado estable del TXA<sub>2</sub> inestable, que a su vez es derivado de PGH<sub>2</sub> la cual es sintetizada a partir del ácido araquidónico a través de la vía de las ciclooxygenasas.

Para la cuantificación de tromboxanos se utilizó el LBA con la técnica de Elisa doble sándwich utilizando un kit marca Mybiosource (MBS2600544). El proceso del ensayo consistió en unir el anticuerpo específico a la fase sólida.. Se hacen lavados para retirar a los anticuerpos sin combinar y algunas impurezas presentes y se cubre el resto de los sitios de unión con proteínas irrelevantes. Se añade el anticuerpo biotina para combinarlo con el complejo inmune. Se lava el anticuerpo de biotina sin combinar. Se añade la peroxidasa de rábano para marcar las avidinas e incorporarlas con el anticuerpo de biotina. Se lava y finalmente, se añade el sustrato (ácido sulfúrico 2M) para colorear y se calcula la concentración.



En cada pozo de la placa de Elisa se agregaron 100  $\mu$ L de cada muestra y para los blancos se utilizó diluyente del estándar y se dejó reaccionando a 37°C durante 90 minutos, posteriormente se hizo 3 lavados y se agregó el anticuerpo biotinilado, se dejó 37°C por 60 minutos y se lavó 3 veces, posteriormente, se añadió la enzima y se mantuvo a 37°C por 30 minutos, consecuentemente, se lavó cinco veces y se añadió el agente colorante y se metió a la incubadora durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, se detuvo la reacción con el agente C y se tomó lectura dentro de los primeros 10 minutos a 450 y 630 nm. Para la curva control se agregaron 300  $\mu$ L para concentraciones de 2000, 1000, 500, 250, 125, 62.5 y 31.2 pg/ mL.

### **6.5 Toxicidad aguda**

La determinación de la toxicidad aguda se realizó con base a la Guía 425 de la organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (Guidelines, 2008). Se utilizaron 12 ratones macho de la cepa Balb/c. Se formaron cuatro grupos cada uno con 3 ratones, se administraron vía intragástrica las siguientes dosis de 6-OHF 5, 50, 300 y 2000 mg/kg de peso. Se monitoreó la mortalidad y las reacciones tóxicas que podrían presentarse durante las primeras cinco horas y posteriormente a las 24 h, 48 h y 14 días.

### **6.6 Estudio toxicológico subcrónico de 6-hidroxi flavona**

Este estudio fue conducido conforme a la Guía de la organización para la Cooperación y el desarrollo Económico (Guidelines, 2008b). Se utilizaron ratones machos de la cepa Balb/c, se administraron vía intragástrica dos grupos de 8 roedores cada uno, durante 28 días cada 24 horas, el primer grupo fue tratado con vehículo (agua y propilenglicol al 10%) y el segundo tratado con una dosis

exploratoria de 50 mg/kg/día de 6-OHF. Finalmente, un tercer grupo llamado control no tuvo manipulación. Posterior a los 28 días de tratamiento, los animales fueron anestesiados con Pentobarbital, y por punción cardíaca se obtuvo la sangre de los animales, posteriormente, los mismos fueron sacrificados para obtener los órganos seleccionados (corazón, hígado, riñón y pulmón) para ser perfundidos. La sangre y los tejidos fueron utilizados para hacerles un perfil bioquímico y para observar posibles efectos tóxicos producidos por el tratamiento mediante estudios histopatológicos.

### **6.7 Histología convencional**

Para la autopsia, se disectaron los órganos de los cobayos del modelo *in vivo* de asma alérgica de cada grupo y del estudio de toxicidad subcrónica los órganos se aislaron por perfusión de los diferentes grupos de ratón. Las muestras de tejido se fijaron en formol al 10% y posteriormente, debido a que una gran parte del tejido está constituido por agua, se aplica una serie gradual de soluciones acuosas de mayor a menor agente deshidratante (alcohol 70°, 96°, 100° y xilol). A fin de que se puedan obtener cortes suficientemente finos para ser observados al microscopio, los tejidos fueron incluidos y envueltos por parafina para facilitar los cortes del tejido en el micrótopo con cortes de 3 µm. Finalmente, se tiñeron con hematoxilina y eosina, Peryódico-Schiff (PAS). Las tinciones de los diferentes órganos aislados se realizaron en colaboración con las histopatologas Guadalupe Hiriart Valencia y Erika Liliana Monterrubio Flores. El patólogo Dr. Rogelio Hernández Pando, cegado a los tratamientos, realizó el examen histopatológico con un microscopio óptico [Zeiss 40X].

## **6.6. Cromatografía líquida de alta resolución**

### **6.6.1. Instrumento**

Para la validación del método analítico de 6-OHF se utilizó un equipo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución PerkinElmer y un detector UV-Vis, una columna C-18 (4.6 mm x 250 nm), tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$  (marca Waters), se utilizó un software TotalChrom, UV-vis 24001 PC (SHIMADZU), centrifuga mini spin (Eppendorf), agitador vórtex (Daigger), sonicador (Cole-Parmer) y un medidor de pH (conductronic).

### **6.6.2. Condiciones cromatográficas**

Se utilizó una fase móvil de 600 mL de volumen final MeOH : H<sub>2</sub>O<sub>ac</sub> (v/v) con una proporción de 65 : 35, se prepararon 210 mL de agua acidificada con ácido fosfórico a un pH de 2.5 y se mezcló con 390 mL de MeOH, se filtró la fase móvil al vacío con una membrana de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$ . Finalmente, se sometió a un proceso de sonicación durante 30 minutos para degasificar la fase móvil; pasando este tiempo se colocó en el reservorio del CLAR para ser utilizada.

### **6.6.3. Preparación de estándar interno (EI)**

Se pesaron 5 mg de crisina que se utilizó como estándar interno (EI) y se diluyó en 5 mL de MeOH (1 mg/mL). Para la solución de trabajo se tomaron 2 mL del stock y se aforó a 50 mL con ACN con una concentración final del EI en condiciones de trabajo de 40  $\mu\text{g/mL}$ .

#### 6.6.4. Método de extracción de 6-hidroxi flavona en plasma

Para la extracción de 6-hidroxi flavona en plasma se utilizó acetonitrilo por el método de precipitación de proteínas, en un tubo eppendorf se tomaron 300  $\mu\text{L}$  de las diferentes concentraciones de la curva de la tabla 2 y se le adicionaron 300  $\mu\text{L}$  de acetonitrilo el cual ya contenía el estándar interno (crisina 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), obteniendo un volumen final de 600  $\mu\text{L}$  de cada concentración. Posteriormente, se formaron dos fases cada muestra se mezcló en un vortex durante 2 min, las muestras fueron colocadas en una centrifuga mini spin y fueron centrifugadas a 10,000 rpm durante 15 minutos para separar la fase con 6-hidroxi flavona, se decantó la muestra a otro tubo eppendorf y se inyectaron en el cromatógrafo.

#### 6.6.5. Curva de calibración

Tabla 2. Curva de calibración

Concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Stock de 6-OHF (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ( $\mu\text{L}$ )	plasma ( $\mu\text{L}$ )	Volumen total ( $\mu\text{L}$ )	Estándar interno (crisina) (40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) (soln. trabajo) ( $\mu\text{L}$ )
<b>2.5</b>	1.25	487.5	500	300
<b>5</b>	2.5	475	500	300
<b>10</b>	5	450	500	300
<b>20</b>	10	490	500	300
<b>40</b>	20	480	500	300
<b>60</b>	30	470	500	300
<b>80</b>	40	460	500	300

### 6.6.6. Validación del método analítico de 6-hidroxi flavona

Algunos parámetros de la validación analítica son:

**6.6.7. Especificidad:** La especificidad fue investigada por la comparación de muestras blanco de diferentes animales con la solución estándar.

**6.6.8. Linealidad:** Para definir la relación matemática entre concentración y respuesta se inyectó la curva de calibración en solución y lo mismo se realizó con la matriz biológica (plasma) por triplicado con un coeficiente de variación mayor o igual a 0.99.

### 6.6.9. Precisión

**a) Repetibilidad:** Se analizó en un mismo día por cuadruplicado tres concentraciones conocidas baja (7 µg/mL) media (30 µg/mL) y alta (70 µg/mL) y diferentes a las de la curva de calibración. El coeficiente no debe ser mayor que el 15%.

**b) Reproducibilidad:** Se analizaron por duplicado durante tres días tres concentraciones conocidas. El coeficiente de variación no debe ser mayor a 15%.

**6.6.10. Exactitud** Para determinar la exactitud del método se determinó el valor promedio de las determinaciones en cada nivel de concentración de los datos de repetibilidad y reproducibilidad los cuales deben estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de concentración.

**6.6.11. Sensibilidad**

**a) Límite de cuantificación** se analizaron por quintuplicado la concentración más baja del rango de trabajo. Se consideró válido como límite de cuantificación porque su valor promedio cayó dentro del  $\pm 20\%$  valor nominal con un coeficiente de variación no mayor a 20%.

**b) Límite de detección** se determinó la concentración a la cual la señal del compuesto por analizar en la matriz y que se pueda distinguir de los niveles de ruido o de una muestra libre del compuesto de interés.

**6.7. Estudio farmacocinético de 6-hidroxi flavona**

Previo al estudio de farmacocinética se validó el método analítico de cromatografía líquida de alta resolución de acuerdo a la NOM-177-SSA1-1998 con algunas modificaciones.

Se formaron dos grupos de 6 ratas; las ratas fueron anestesiadas con éter etílico. Al grupo de tratamiento se le administró una dosis de 50 mg/kg vía oral utilizando como vehículo propilenglicol 10%; para el desarrollo de los estudios farmacocinéticos, se requirió de la canulación previa de los animales por la vena caudal y la toma de muestras.

### 6.7.1. Cirugía en vena caudal

Para el desarrollo de los estudios farmacocinéticos, se canuló a los animales por la vena caudal como se muestra en la figura 9, con material previamente desinfectado, se colocó un catéter PE (combinación de PE-10 y PE-50), se mantuvo heparinizada con una solución de 20 UI /mL; y se detuvo con un alfiler plano en la vena caudal para la posterior toma de muestras (Balla y Cols., 2014).



**Figura 9.** Cirugía en vena caudal de rata para el estudio de farmacocinética.

### 6.7.2. Toma de muestras

Se tomaron muestras sanguíneas de 0.4 mL que se colocaron en tubos con heparina (100  $\mu$ L de heparina a una concentración de 100 UI/mL) y se evaporó a 50°C durante 4 horas para obtener una concentración final de heparina de 10 UI para

no diluir la muestra. Se recolectaron muestras de sangre en los siguientes tiempos: 0, 15, 30, 45, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 240, 300, 360, 480 min. Las muestras se centrifugaron a 15000 rpm durante 10 min para separar el plasma. El sobrenadante de las muestras se conservó en congelación a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis por CLAR utilizando el método de extracción ya mencionado anteriormente (Marghade y Cols., 2012).

### **6.8. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos en el efecto *in vivo* y toxicológico fueron expresados como la media de  $n=9, 6, \text{ y } 3$  animales  $\pm$  EEM. El análisis estadístico fue realizado en el programa GraphPad Prism 5, estableciendo una diferencia estadística significativa entre las diferencias de las medias de  $*p < 0.05$ ,  $**p < 0.01$ ,  $***p < 0.001$  mediante un ANOVA de una vía y una prueba post hoc de Tukey. Finalmente, los resultados obtenidos del estudio de farmacocinética se evaluaron con el software Winolin versión 2.0.



# *7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN*

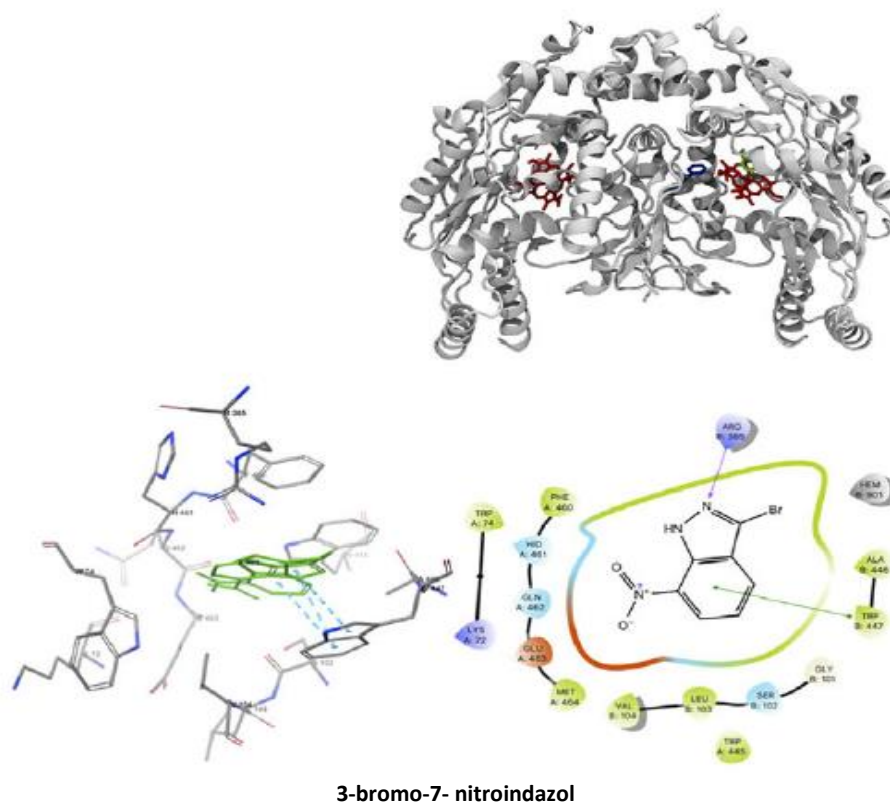
### 7.1. Acoplamiento molecular

Con la finalidad de saber si 6-OHF participaba como regulador en el proceso de broncoconstricción y teniendo como antecedente su efecto sobre la musculatura lisa de la tráquea en un modelo *ex vivo* de rata reportado en el 2018 (Flores y Cols., 2018), y considerando que 6-OHF presenta una actividad relajante sobre anillos de tráquea a través de su efecto con un bloqueo de canales de calcio y la producción de óxido nítrico (NO) y GMPc (figura 10). Por lo tanto, se decidió investigar de forma *in silico* la interacción de la flavona con los canales de calcio y la eNOS. Los resultados del docking de 6-OHF contra óxido nítrico sintasa y canales de calcio tipo L mostraron que, en ambos casos, puede unirse con una afinidad de unión mayor a los ligandos utilizados como referencias. Para eNOS, 6-OHF presentó una energía de afinidad de unión de  $-8.9 \pm 0.0$  kcal / mol frente a  $-7.36 \pm 0.05$  kcal / mol para 3-bromo-7-nitroindazol (ligando cocristalizado).

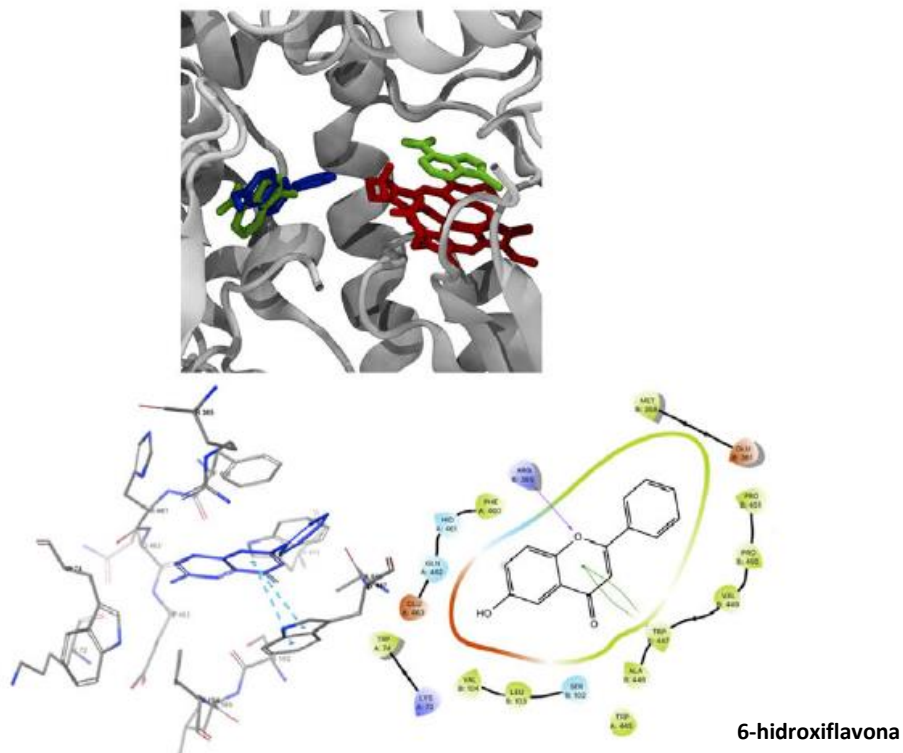
El acoplamiento de eNOS con 6-OHF mostró que se unía casi en la misma posición que el 3-bromo-7-nitroindazol utilizando interacciones similares. La energía de afinidad de unión más baja de 6-OHF podría atribuirse a una mejor interacción de apilamiento con el aminoácido Trp447 y una gran superficie de interacción de van der Waals en comparación con 3-bromo-7-nitroindazol, como se observa en el mapa de interacción (figura 11). El 3-bromo-7-nitroindazol y 6-OHF interactuaron con casi los mismos residuos. Sin embargo, 6-OHF tuvo interacciones con cinco residuos adicionales (Val449, Pro450, Pro451, Glu361 y Met355) que el 3-bromo-7-nitroindazol no puede alcanzar debido a su tamaño molecular más corto.



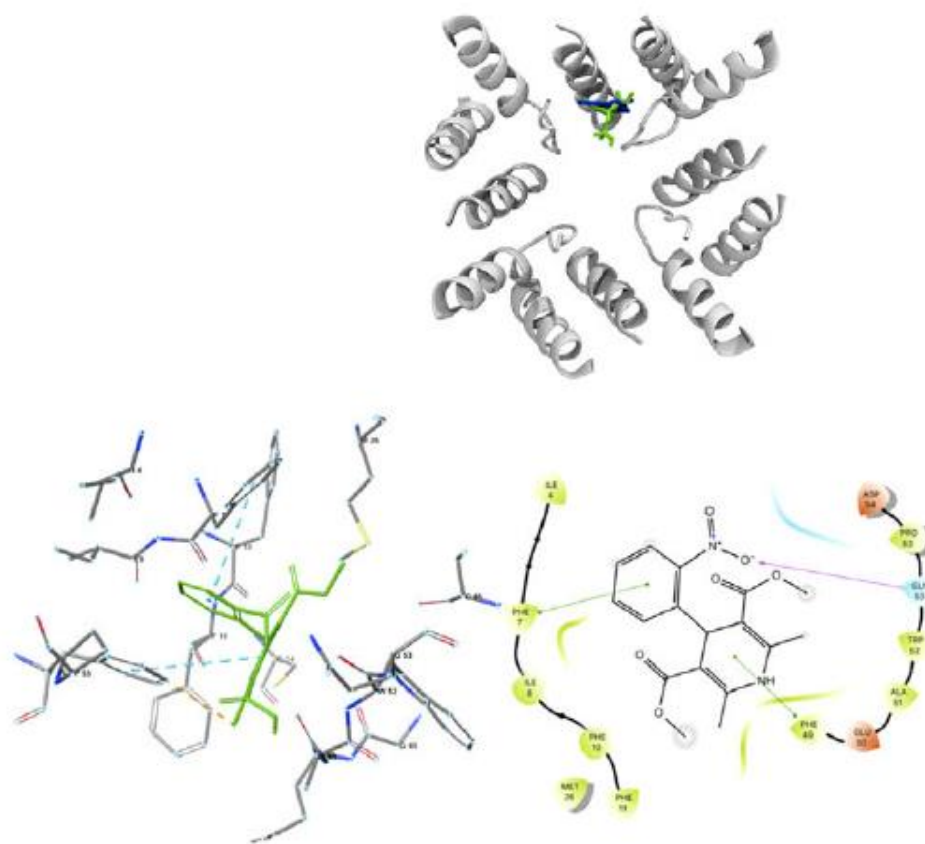
a)



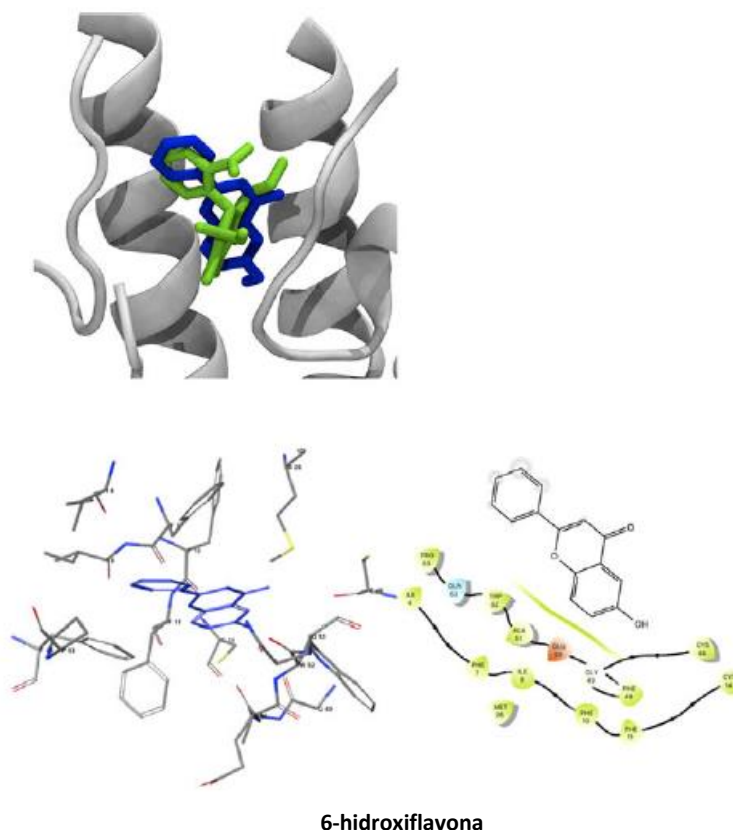
b)



**Figura 11. a)** La sintasa de óxido nítrico endotelial humano se muestra en la imagen con grupos hemo (rojo), 3-bromo-7-nitroindazol (verde) y **b)** 6-OHF (azul), más cerca del sitio de enlace utilizado en este trabajo (imágenes creadas con Visual Molecular Dynamics). Las figuras inferiores son diagramas de interacciones, tri y bi dimensionales para 3-bromo-7-nitroindazol (a) y 6-OHF (b) (imágenes generadas con Maestro por Schrodinger 2018). Flores-Flores (2018).



nifedipina



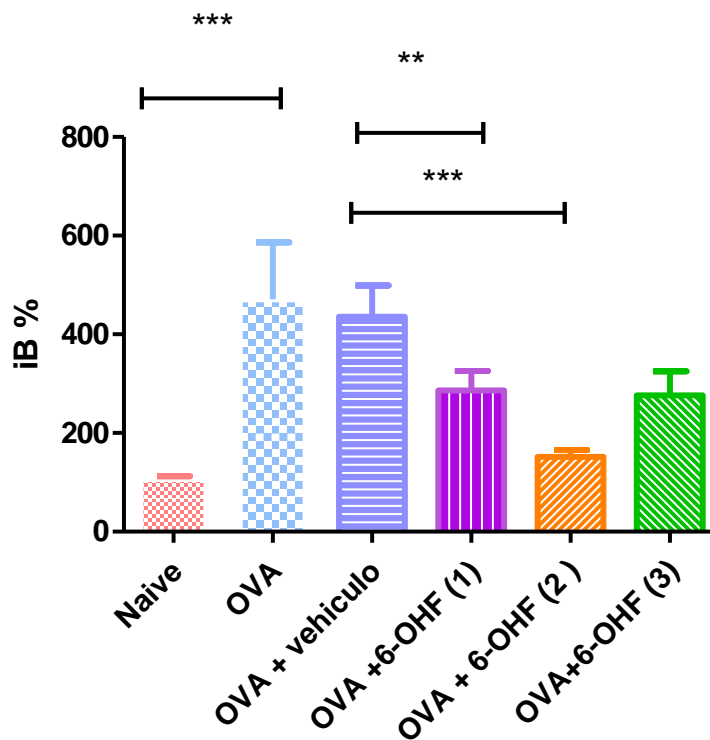
**Figura 12. a)** El modelo de canal de calcio humano de tipo L se muestra en una imagen con nifedipina (verde) y **b)** 6-OHF (azul), más cerca del sitio de enlace utilizado en este trabajo (imágenes creadas con Visual Molecular Dynamics). Las figuras inferiores son diagramas de interacciones, tri y bi dimensionales para nifedipina (a) y 6-OHF (b) (imágenes generadas con Maestro por Schrodinger, 2018). Flores-Flores (2018).

## 7.2. Modelo alérgico

Se sabe que el músculo liso de las vías aéreas tiene un rol importante en la broncoconstricción aguda, en donde el patrón circunferencial se ve reducido en el diámetro luminal de la vía aérea causando bronco-obstrucción del flujo aéreo, opresión del pecho y sibilancia comúnmente asociada con el asma (Doeing y Solway, 2013). Estos síntomas son inducidos por alérgenos resultado de la liberación de mediadores de la célula cebada que incluyen histamina, triptasa, leucotrienos y

prostaglandinas que logran contraer el músculo liso de las vías aéreas (Habibian y Cols.,2018). Tomando en cuenta informes previos donde se describió la eficacia de los flavonoides como fármacos antiasmáticos experimentales (Tanaka y Takahashi, 2013 Wang y Cols., 2017; Goszcz y Cols., 2017) y el efecto relajante demostrado por 6-OHF (Flores-Flores y Cols., 2018), decidimos explorar el posible efecto antiasmático de este flavonoide en la bronco-obstrucción alérgica inducida por OVA en el modelo de cobayo.

En la figura 13 se muestra el efecto de 6-OHF ante la bronco-obstrucción inducida por OVA (1mg/mL); para el grupo naive (grupo que no fue sensibilizado) se determinó un índice de bronco-obstrucción (iB) de  $115 \pm 9 \%$ ; para el modelo de asma , de asma con vehículo se obtuvieron incrementos del  $423 \pm 68\%$  y del  $433 \pm 103 \%$ ,respectivamente. Los grupos tratados con 6-hidroxiflavona se observa una disminución a las dosis de 30, 50 y 90 mg/kg, obteniéndose un iB de  $215 \pm 16\%$  ,  $162 \pm 20\%$  iB de  $281 \pm 51\%$ , respectivamente en estos datos podemos establecer que 6-OHF fue capaz de disminuir la bronco-obstrucción inducida por OVA de una manera significativa y dependiente de la dosis (30 y 50 mg / kg), sin embargo, el efecto a 90 mg / kg fue menos eficiente que 50 mg / kg.



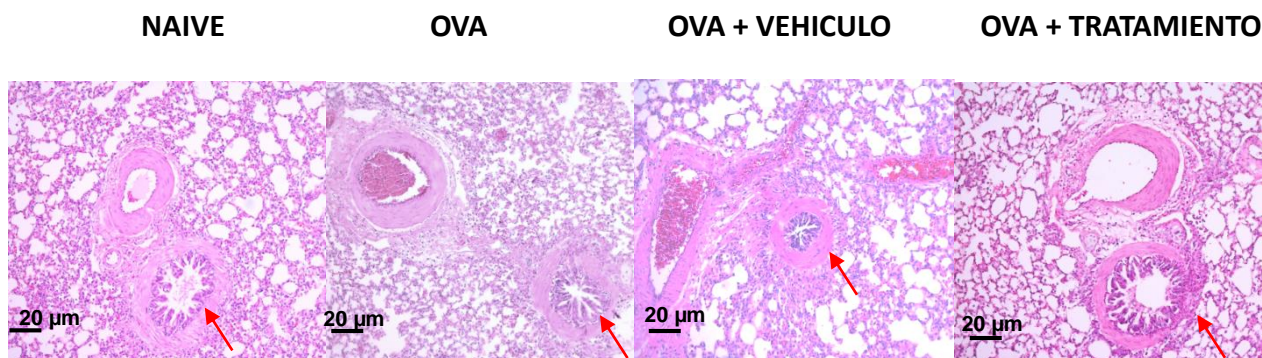
**Figura 13** Efecto de 6-hidroxi flavona sobre OVA aerosolizada induciendo broncoconstricción aguda en cobayos sensibilizados. Los resultados son presentados como el promedio  $\pm$  EEM de una  $n=9$  animales por grupo con una  $**p<0.01$  y  $***p<0.001$  análisis con ANOVA de una vía y prueba post hoc Tukey. Ib=índice de broncoobstrucción, OVA= modelo de asma, 6-OHF (1) 30 mg/kg; (2) 50 mg/kg y (3) 90 mg/kg.

Después de los ensayos *in vivo*, los cobayos fueron sacrificados de forma inmediata el día del ensayo y se recolectaron muestras de pulmón y LBA con la finalidad de observar los cambios estructurales y el reclutamiento de leucocitos hacia las vías aéreas, debido a que es un proceso importante en el desarrollo de la respuesta alérgica. En las micrografías (figura 14a) se observan los bronquiolos de los diferentes grupos, al hacer la comparación del grupo tratado con el grupo naive, el vehículo y el modelo de asma, se puede observar que 6-OHF produce una apertura significativa de los bronquiolos, lo que sugiere una importante acción antiasmática de 6-OHF. Finalmente, al hacer el conteo diferencial en las muestras de LBA mediante la técnica de Romanowsky no se observaron cambios significativos

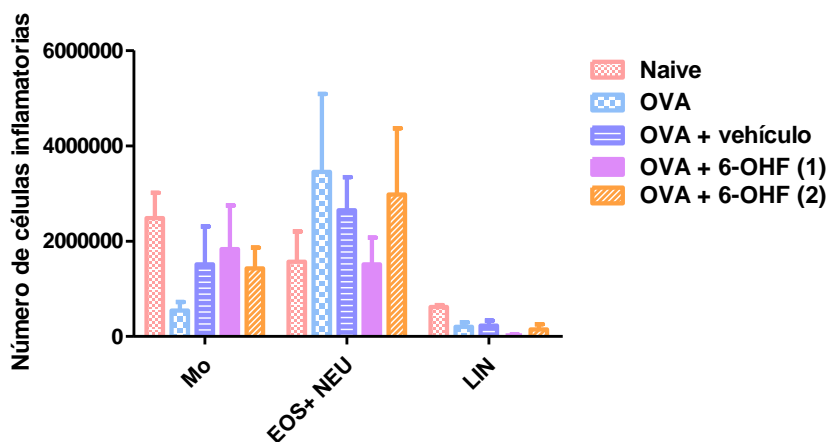


entre los mismos (figura 14b). La bronco-obstrucción disminuida inducida por el flavonoide podría estar relacionada con la inhibición en la degranulación de los mastocitos, la disminución de los niveles de IgE, IL-5, IL-4 e IL-13 (Tanaka y Takahashi, 2013), sin embargo se necesitan más experimentos para determinar el modo de acción inmunológico de 6-OHF.

a)

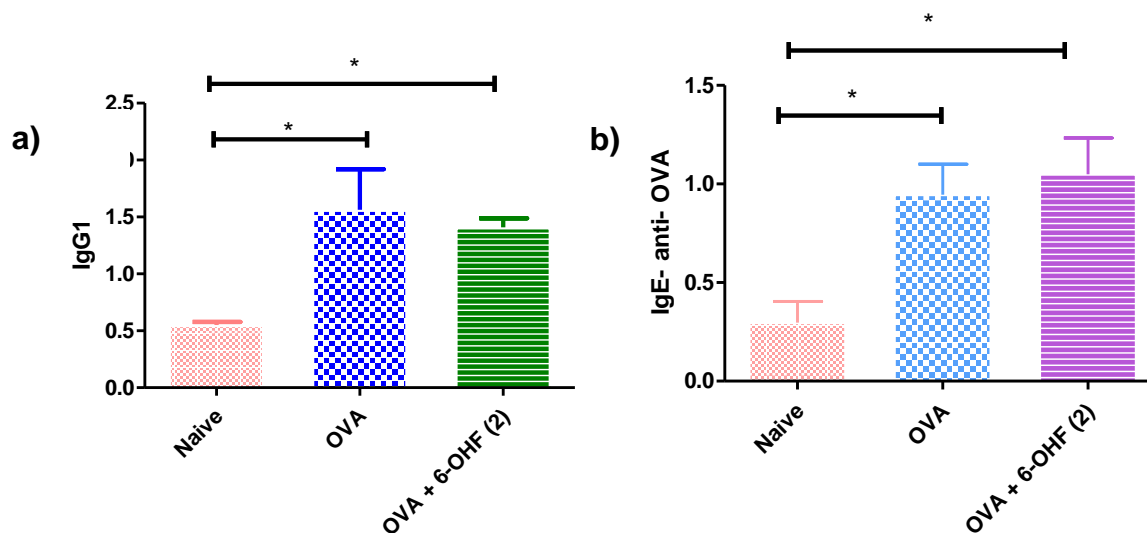


b)



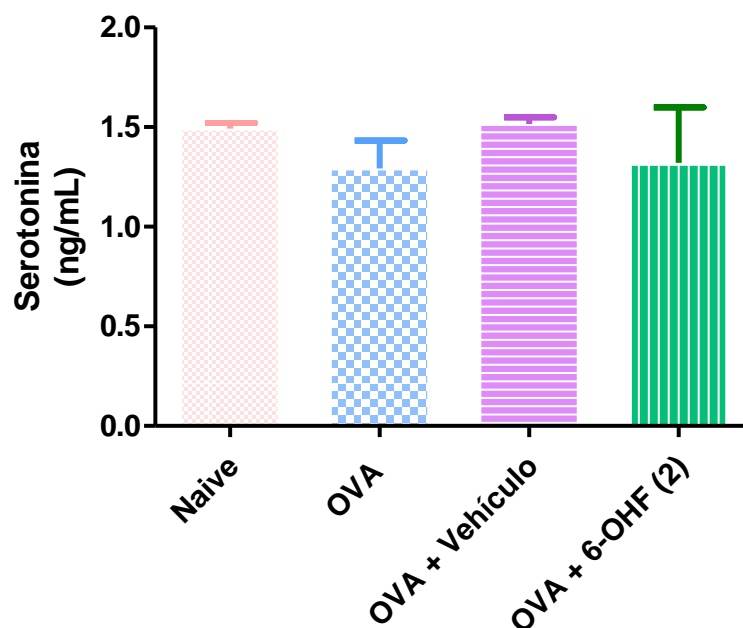
**Figura 14.** a) Sección del pulmón mostrando el bronquiolo de cobayo con y sin tratamiento de 6-OHF, b) Conteo celular de LBA de cobayo. Los resultados son presentados como el promedio  $\pm$  EEM conteo de 6 laminillas por grupo con una  $*p < 0.05$  **no significativa en el análisis con ANOVA de una vía y prueba post hoc Tukey.** **OVA= Modelo de asma, 6-OHF (1) 30 mg/kg; (2) 50 mg/kg.**

Existen evidencias de relación entre alérgenos y el asma en algunas especies como el ratón, rata y cobayo y la asociación con las inmunoglobulinas IgE e IgG1 con las reacciones alérgicas (A.E. y Mills., 2001; Meryl y Cols.,1991). Por lo tanto, para determinar si los cobayos utilizados estaban sensibilizados a la OVA y si el tratamiento estaba actuando mediante la inhibición de la producción de alguna de ellas, mediante ELISA se cuantificaron cada una de estas inmunoglobulinas en suero extraído de los cobayos de experimentación . Los niveles de IgG1 fueron similares en el grupo del modelo de asma (OVA) y el grupo con tratamiento (OVA + 6-OHF) como se muestra en la figura 15a y asimismo para los niveles de IgE (figura 15b); estos resultados indican que los animales si se encontraban sensibilizados, pero con el tratamiento no se observaron cambios, por lo tanto la 6-OHF no actúa sobre alguna de estas inmunoglobulinas (A.E. y Mills., 2001; Meryl y Cols.,1991).



**Figura 15.** a) Niveles de IgG1 e b) IgE específicos contra ovoalbúmina en suero de cobayos. Los resultados son presentados como el promedio  $\pm$  EEM 5 muestras por grupo con una \* $p < 0.05$  análisis con ANOVA de una vía y prueba post hoc Tukey. OVA= Modelo de asma, 6-OHF (2) 50 mg/kg.

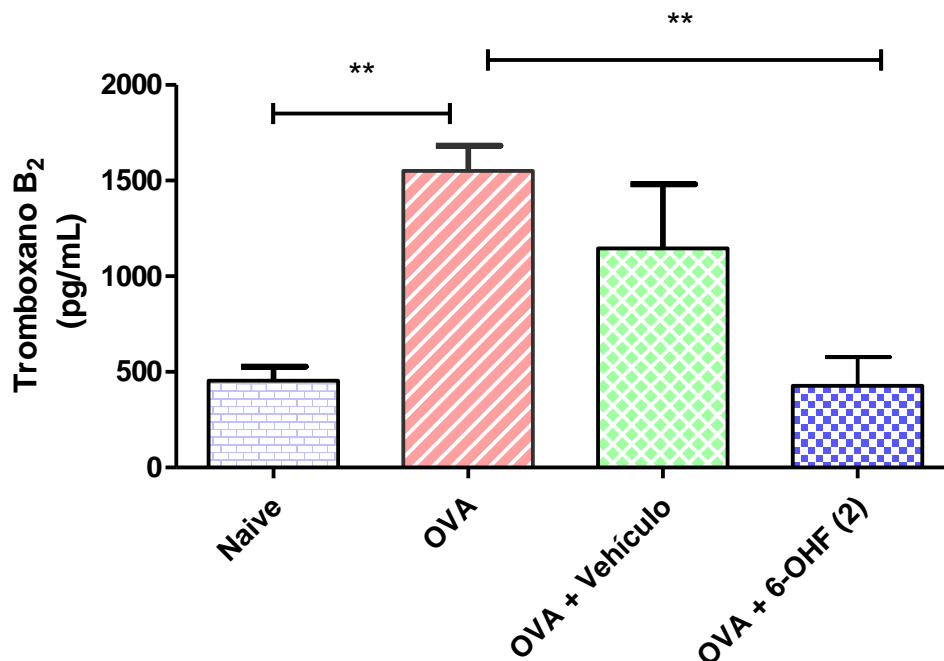
En humanos, la serotonina juega un rol importante en la función pulmonar sobre las vías aéreas; *in vitro causa* constricción y relajación de bronquios y bronquiolos derivados de cobayo, y esto dependerá de la concentración utilizada (Cazzola y Matera; 2001). En este sentido, se cuantificaron los niveles de serotonina en LBA de cobayo y no se observaron cambios significativos entre los grupos, indicando que el efecto no sigue este mecanismo de acción (figura 16).



**Figura 16.** Cuantificación de serotonina en LBA de cobayos. Los resultados son presentados como el promedio  $\pm$  EEM de 5 muestras por grupo con un análisis de ANOVA de una vía y prueba post hoc Tukey. OVA=Modelo de asma, 6-OHF (2) 50mg/mL.

La constricción de las vías aéreas puede ser activada por la interacción de ligandos con receptores que actúan sobre el músculo liso de las vías aéreas, o indirectamente por activación de los nervios que regulan este tono. Durante el asma esta mediada por la liberación de histamina y metabolitos derivados del ácido araquidónico como los tromboxanos. El troboxano  $A_2$  es uno de los

broncoconstrictores más potentes y esta actividad se presenta en diferentes especies incluyendo humanos, perros, gatos, cobayos y roedores (Cyphert JM y Cols.,2012). Para determinar si estos productos celulares estaban siendo producidos o se estaba evitando su secreción durante la respuesta alérgica, se cuantificó los niveles de troboxano A<sub>2</sub> midiéndolo como troboxano B<sub>2</sub> en los LBA de cobayos. En la figura 17 se puede observar que el grupo administrado con ovoalbúmina produjo un claro aumento en la producción de tromboxanos B<sub>2</sub> en comparación con el grupo Naive; por otro lado, la administración del vehiculo se puede observar que mantuvo altos los niveles de tromboxanos B<sub>2</sub>. En contraste, el tratamiento con 6-OHF a una dosis de 50 mg/kg disminuyo de forma significativa los niveles de tromboxanos B<sub>2</sub> en comparación con el grupo de OVA y los mantuvo similar al grupo control. Estos resultados nos sugieren que 6-OHF esta quizás actuando sobre la síntesis de estos derivados del ácido araquidónico evitando su producción, y por lo tanto, disminuyendo la bronco-obstrucción (Cyphert JM y Cols.,2012).



**Figura 17.** Cuantificación de Tromboxanos B<sub>2</sub>. Los resultados son presentados como el promedio  $\pm$  EEM 5 muestras por grupo con una  $*p < 0.05$  análisis con ANOVA de una vía y prueba post hoc Turkey. OVA= Modelo de asma, 6-OHF (2) 50mg/kg.

### 7.3. Estudio toxicológico agudo

Para los estudios preclínicos en el desarrollo de fármacos experimentales, es necesario determinar la eficacia y seguridad en su uso. Con la finalidad de observar el daño potencial y los posibles efectos tóxicos visibles, se desarrolló la evaluación de la toxicidad aguda de 6-hidroxi flavona en un modelo animal experimental siguiendo lo que se recomienda en la OECD con algunas modificaciones para establecer su seguridad o potencial toxicidad de 6-OHF. Los flavonoides actualmente tienen un alto impacto con diferentes efectos biológicos, los cuales dependen de su estructura química debido a la presencia de varios sustituyentes como glucósidos, ésteres, amidas e hidroxilos entre otros, que modulan la polaridad, toxicidad y

acciones extra o intracelulares de estos compuestos (Goszcz y Cols., 2017; Harbone y Williams, 2000; Flores y Cols., 2018). En la tabla 3 se observan las diferentes dosis de flavonoide utilizadas para la administración a cada grupo formado por 3 animales tras la administración de cada una de las dosis, observándose las primeras 5 h, 24 h, 48 h y 14 días, posterior a la administración.

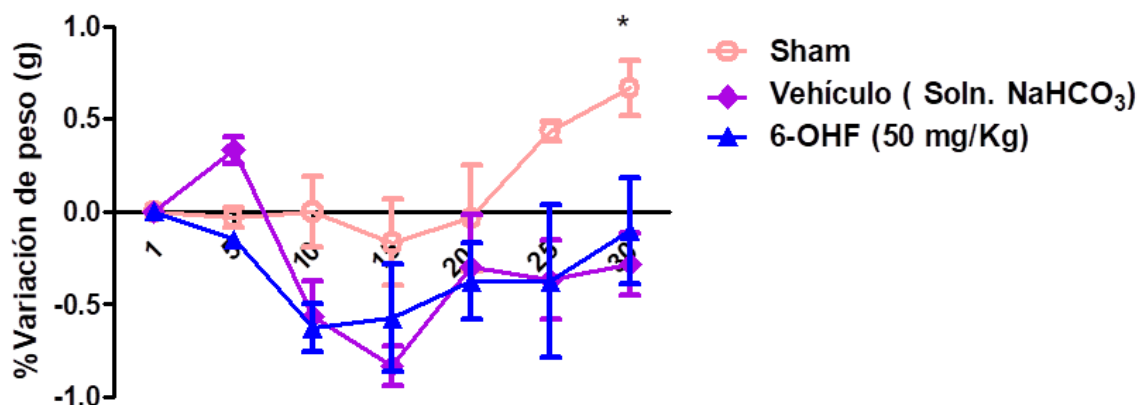
**Tabla 3.** Exposición aguda de 6-hidroxiflavona a diferentes dosis

Dosis (mg/kg)	Grupos por animal	Cambio de peso	Mortalidad
5	3	NO	0/3
50	3	NO	0/3
300	3	NO	0/3
2000	3	NO	0/3

Los ratones administrados a dosis inferiores a 2000 mg/kg no presentaron ninguna reacción tóxica visible (temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargo etc.) tampoco se observaron cambios físicos en piel, pelaje, ojos o membranas de mucosas y no hubo muerte de algún animal; con estos resultados la  $DL_{50}$  determinada en ratones administrada vía oral se estimó como superior a 2000 mg/Kg, lo cual permitió clasificarla de acuerdo a la clasificación de la OECD y a la SGA (Sistema Globalmente Armonizado de clasificación y etiquetado de productos químicos) en la categoría 4, la cual la describe como un compuesto con toxicidad aguda relativa baja pero que en ciertas circunstancias podría suponer un peligro para una población vulnerable.

#### 7.4. Estudio de toxicidad subagudo

Para el estudio subagudo se utilizaron ratones Balb/c, los cuales en un esquema de tratamiento fueron administrados cada 24 horas durante 28 días con la dosis exploratoria de 50 mg/Kg de 6-OHF y se pesaron cada 5 días hasta el día del sacrificio.



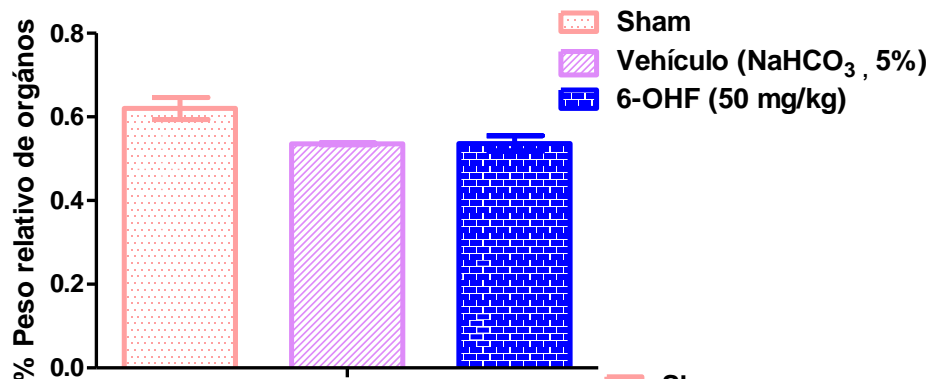
**Figura 18.** Efecto de 6-hidroxi flavona en el cambio de peso de ratones en el periodo de administración. Los resultados son presentados como el promedio  $\pm$  EEM 3 animales por grupo con una  $*p < 0.05$  análisis con ANOVA de una vía y prueba post hoc Tukey.

En la figura 18 podemos observar la ausencia similar de toxicidad respecto al consumo de agua y alimento sin cambios en el peso de los animales que fueron tratados con 6-OHF. Sin embargo, al final del estudio subcrónico los animales del grupo sham mostraron un aumento de peso en comparación con los tratados con 6-OHF, es probable se deba al manejo de los diferentes grupos durante su administración con 6-OHF.

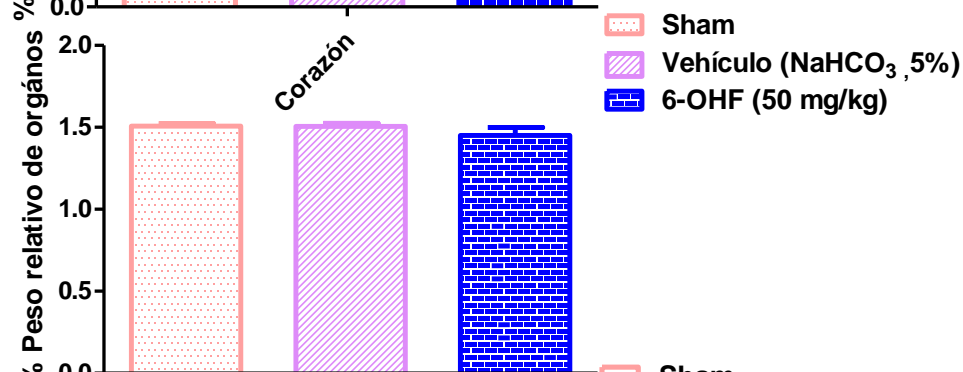
Posterior al tratamiento de 28 días, los animales fueron sacrificados para la extracción de órganos y el análisis de parámetros bioquímicos de la sangre; se aislaron los siguientes órganos: corazón, riñón, pulmón e hígado, órganos

metabólicamente y fisiológicamente importantes. En la figura 19 podemos observar el porcentaje de peso relativo de cada órgano y grupo; no se observan diferencias de pesos de manera significativa, lo que indica que no existen efectos inflamatorios en los diferentes órganos como consecuencia del tratamiento o señales de toxicidad.

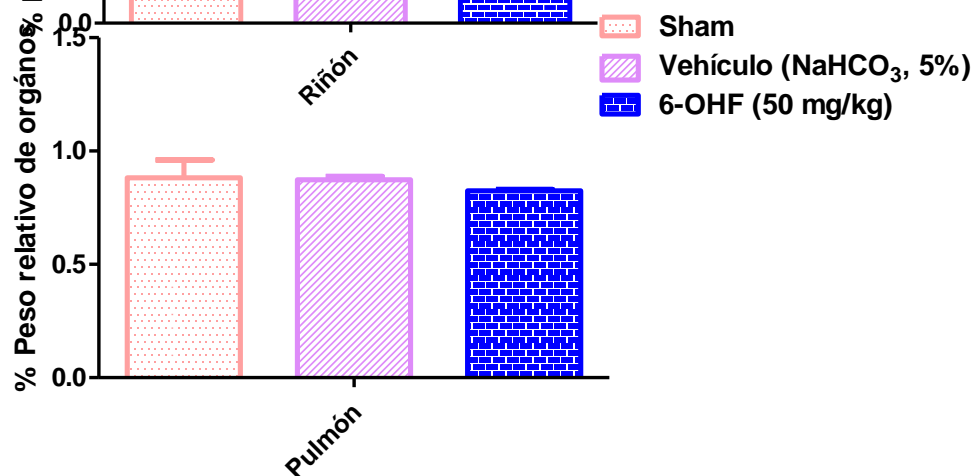
a)



b)

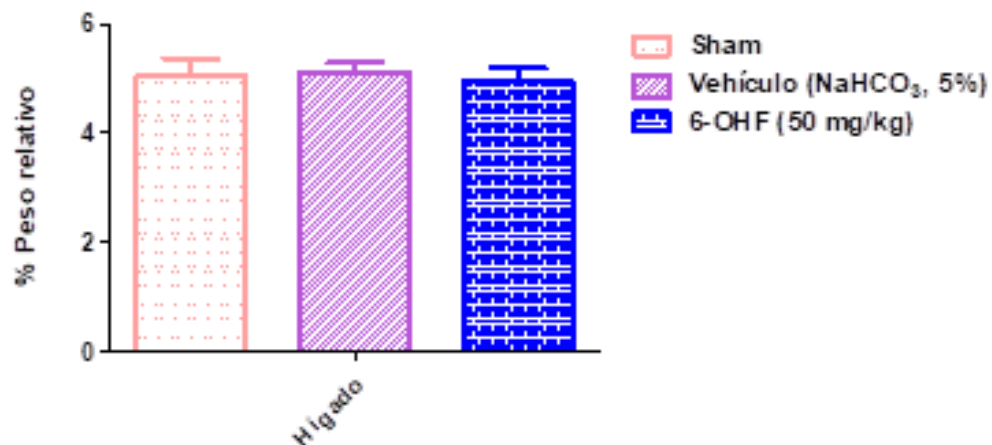


c)



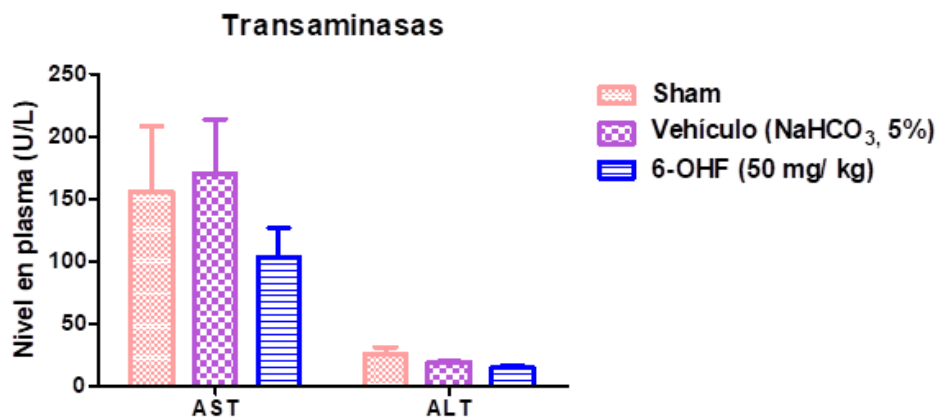


d)



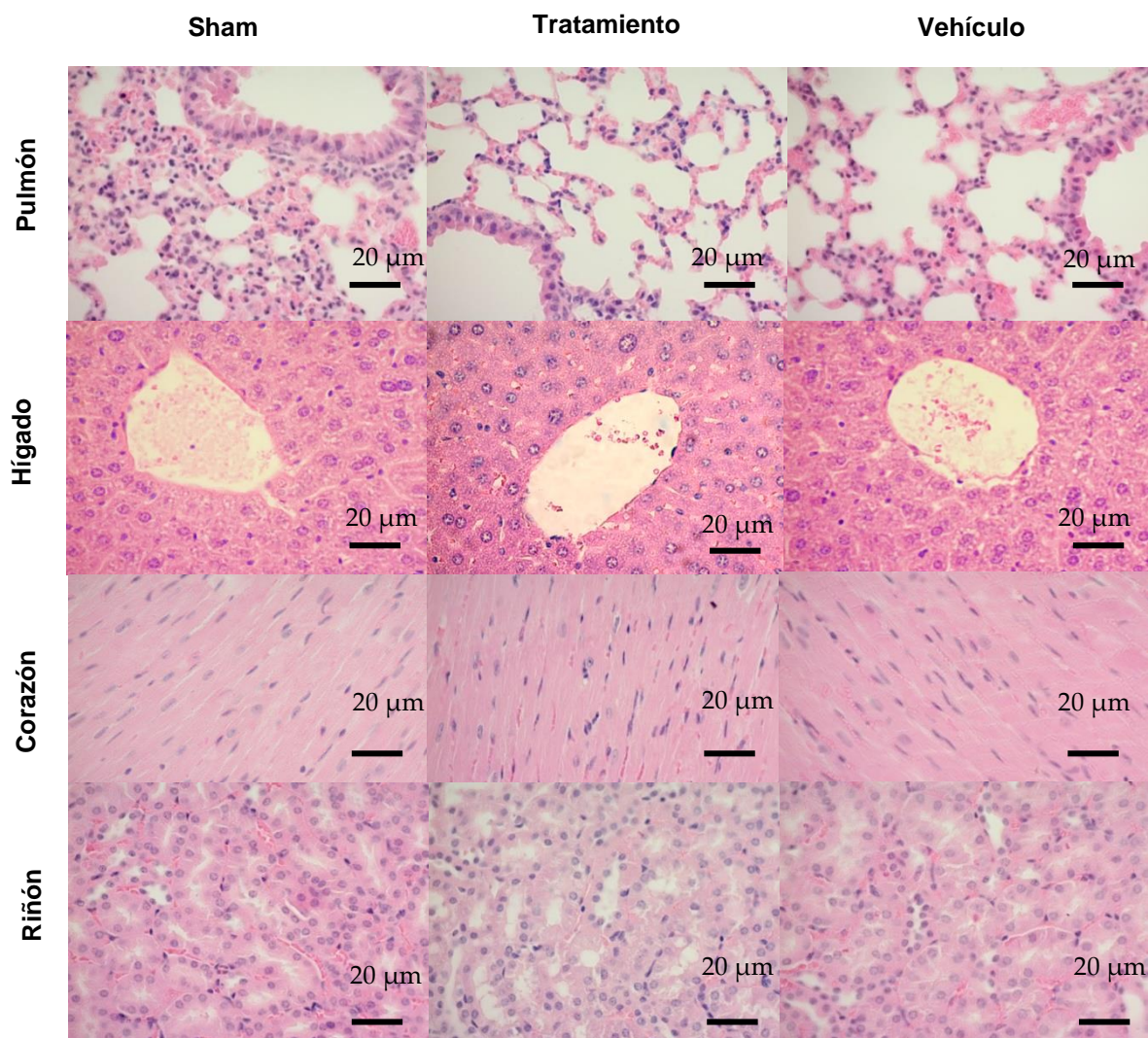
**Figura 19.** Peso relativo de a) corazón, b) riñón, c) pulmón e d) hígado en animales sham o sin tratamiento, vehículo y tratados con 6-hidroxi flavona a una dosis diaria de 50 mg/kg durante 28 días cada barra representa  $\pm$  EEM de 3 animales por grupo.

Por otro lado, con la sangre que se obtuvo de la punción cardíaca de cada animal, se realizó un análisis bioquímico de transaminasas, enzimas indicadoras de daño celular en diferentes tejidos. Las transaminasas son enzimas que catalizan la transferencia reversible de un grupo entre un aminoácido y un cetoácido. Esta función es esencial para la producción de los aminoácidos necesarios para la síntesis de proteínas en el hígado. La *aspartato aminotransferasa* (AST) se localiza principalmente en corazón, hígado y el tejido muscular. Por otro lado, la *alanina aminotransferasa* (ALT) se localiza fundamentalmente a nivel citosólico en el hepatocito, lo que explica una mayor especificidad en daño hepático (García y Zurita; 2018). En la figura 20 se muestra el perfil bioquímico del estudio de toxicidad subaguda, y no se observan cambios en el nivel plasmático entre los grupos, esto nos sugiere que el tratamiento de 6-OHF no produce daño hepático y se corrobora con la histología.



**Figura 20.4** Determinación de transaminasas de animales sham, vehículo y tratados con 6-hidroxi flavona a una dosis de 50 mg/kg durante 28 días cada barra representa  $\pm$  EEM de 3 animales por grupo.

En la figura 21 se muestra la comparación entre las preparaciones histológicas del grupo control, vehículo y con 6-OHF como tratamiento; el análisis histológico mostró que la administración diaria de 6-OHF no provoca alteraciones patológicas. No hay presencia de daño a nivel del miocardio, los pulmones, en el tejido de riñón sin cambio aparente del corpúsculo renal, túbulos proximal y distal entre los grupos, y finalmente en el tejido del hígado se observa íntegro y sin signos de necrosis o inflamación.



**Figura 21.** Histología de pulmón, hígado, corazón y riñón de ratones tratados durante 28 días con la administración repetida DE 6-OHF. representativo de cada grupo de animales con tratamiento, sham, y vehículo ( Soln. de NaHCO<sub>3</sub> al 5%). Tinción de eosina-hematoxilina.

## 7.5. Desarrollo del método analítico

### 7.5.1. Condiciones cromatográficas óptimas

Para obtener las condiciones cromatográficas óptimas (tabla 4) en el desarrollo del método analítico de 6-OHF, se hicieron diferentes pruebas en el equipo

de cromatografía Líquida de Alta Resolución marca Perkin-Elmer, con un software TotalChrom, con una columna C-18 marca waters, utilizándose distintas proporciones de disolventes para la fase móvil como metanol, agua y agua acidificada y diferentes flujos (0.5 mL/min, 0.7 mL/min y 1 mL/min).

Tabla 4. Condiciones cromatográficas

<b>Columna</b>	Waters C-18
<b>Fase móvil</b>	MeOH : H <sub>2</sub> O ac (65:35)
<b>pH</b>	2.5
<b>Flujo</b>	0.7 mL/min

Con estas condiciones se observó una buena resolución en la señal de 6-OHF y del estándar interno (crisina) y con un tiempo de retención de 6 min y 8.17 min, respectivamente. Finalmente, para elegir la longitud de onda se llevó a cabo un barrido en UV-vis y se eligió la longitud de onda de 205 nm (Anexo III).

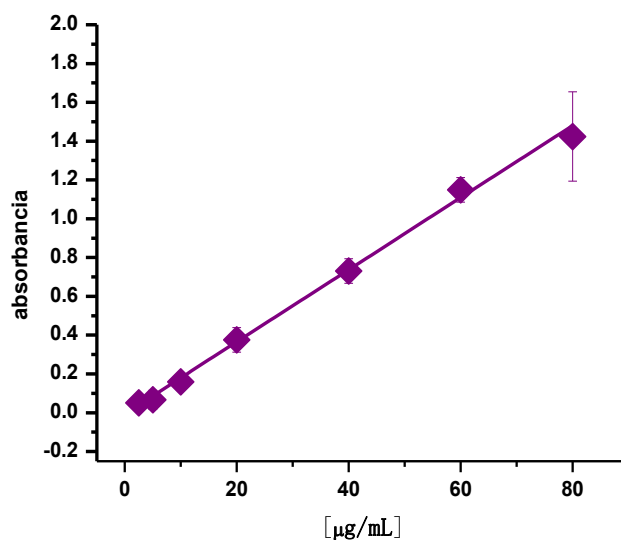
### 7.5.2. Selectividad

La selectividad se analizó inyectando al cromatógrafo una muestra de 6-OHF con el estándar interno (crisina) y muestras blanco de plasma humano y de plasma de rata con la finalidad de observar que no se tenga un compuesto que interfiera en el tiempo de retención de 6-hidroxiflavona. No existieron interferencias de sustancias endógenas en el plasma que interfieran en el mismo tiempo de retención de los analitos y el estándar interno, por lo tanto; el método es selectivo.

### 7.5.3. Linealidad

#### 7.5.3.1. Linealidad del sistema y del método

Para la linealidad del sistema, se tomaron los resultados de una curva por duplicado de un día, representativos del análisis de tres días. Se analizó una curva en solución con diferentes concentraciones (2.5, 5, 10, 20, 40, 60 y 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de 6-OHF con la señal representativa del estándar interno (EI) con una concentración de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (figura 22).



**Figura 22.** Linealidad del sistema

Para la linealidad del método se tomaron los resultados de una curva en plasma humano por duplicado de un día, representativos del análisis de tres días (figura 23). En plasma humano con las diferentes concentraciones (2.5, 5, 10, 20, 40, 60 y 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de 6-OHF con la señal representativa del EI con una concentración de 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; se obtuvo una  $r=0.995$ . del promedio de 3 días

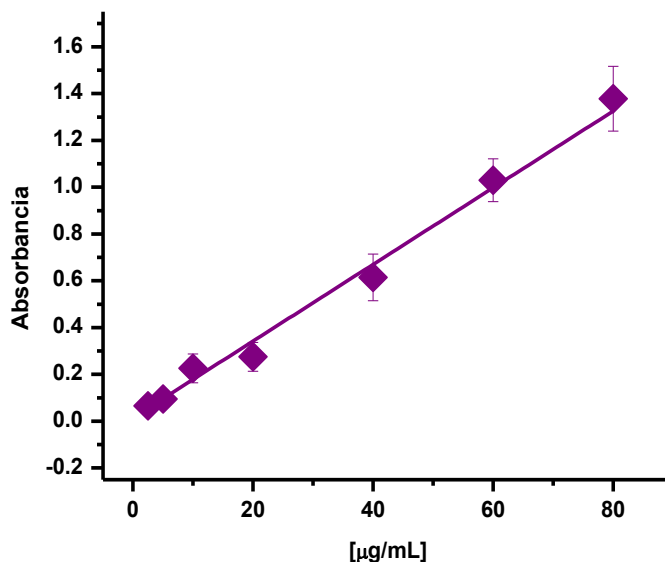


Figura 23. Linealidad del método en plasma humano

Finalmente, para la linealidad del método se tomaron los resultados de una curva por duplicado de un día, representativos del análisis de tres días. Se analizó una curva en plasma de rata con las diferentes concentraciones (2.5, 5, 10, 20, 40, 60 y 80 µg/mL) de 6-OHF con un volumen final de 500 µL para disminuir el uso del plasma de rata debido a su escasez y dificultad de adquisición. De la curva se obtuvo una  $r=0.996$ . Por lo tanto, con este análisis en plasma de rata se decidió utilizar para todo el estudio plasma humano ya que mostro una buena linealidad (figura 24) (tabla 5). Finalmente, al hacer el análisis para detectar el límite de detección y cuantificación se observó que el LD es de 1.31 y el LC DE 3.98 (µg/mL).

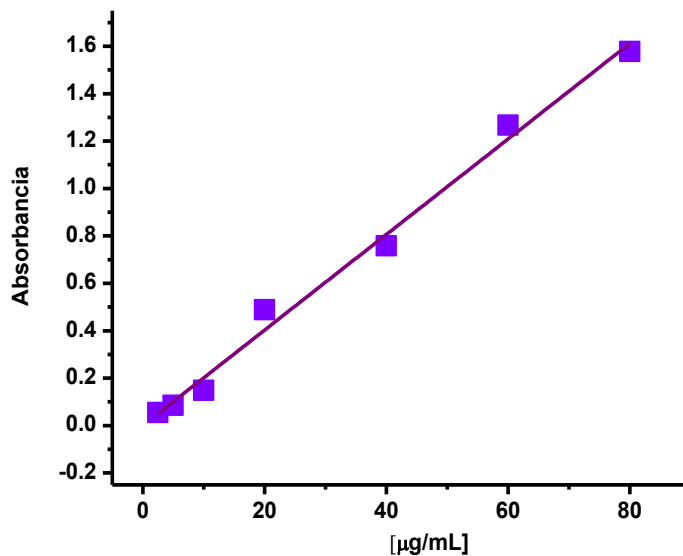


Figura 24. Linealidad del método en plasma de rata

Tabla 5. Resultado del estudio de linealidad

Parámetros	CLAR	Límites
Ecuación de la recta		$y = mx + a$
Coficiente	$\geq 0.9959$	$\geq 0.9990$
DE	0.002	$\leq 2\%$
CV	0.2	$\leq 2\%$

#### 7.5.4. Precisión y exactitud del método

Tabla 6. Precisión y exactitud del método

Concentración	(7 µg/mL)	(30 µg/mL)	(70 µg/mL)	Limites
<b>Repetibilidad</b>				
(día 1) cv%	8.85	6.65	5.51	$\geq 15\%$
<b>Repetibilidad</b>				
(día 2) cv%	9.22	7.61	5.07	$\geq 15\%$
<b>Exactitud</b>				
Desv. Abs.(%)	15.36	12.40	14.38	$\geq 15\%$

De acuerdo a los resultados podemos observar que el método analítico cumple con los requisitos de precisión y exactitud ya que el promedio de sus coeficientes de variación porcentual (CV%) se encuentran dentro del rango sugerido por la NOM-177-SSA1-2013.

#### 7.5.5. Porcentaje de recobro

El efecto de la matriz utilizada de la cuantificación de las muestras de tres concentraciones fue observado en un rango de 97- 106% los datos se muestran en la tabla 7.

**Tabla 7.** Porcentaje de recobro

concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	% Recobro								Promedio
	1	2	3	4	5	6	7	8	
7	72.74	80.02	66.04	60.08	134.86	142.88	100.89	121.03	97.32
30	98.01	106.42	90.28	100.17	100.99	91.11	80.44	83.37	93.85
70	113.22	104.49	104.49	114.12	114.21	89.17	100.69	108.97	106.17

#### 7.6. Comportamiento de farmacocinética

El desarrollo del método fue aplicado para determinar todos los análisis después de la administración oral de 50 mg /Kg de 6-OHF, con los resultados se construyó una gráfica de tiempo vs concentración plasmática que se muestra en la figura 25, donde se observa una rápida absorción con un pico máximo a la primera media hora y una eliminación lenta.

Los datos mostrados en la figura 25 fueron analizados mediante un modelo no compartimental en el programa WinNonlin® versión 2.0 con un promedio de 6 perfiles (ANEXO IV), en el cual se obtuvieron varios parámetros farmacocinéticos de interés (tabla 8), como; una concentración máxima ( $C_{\text{máx}}$ ) de 14.82  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a un tiempo ( $T_{\text{máx}}$ )



de 21 min; un tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ) de 66.26 min; un área bajo la curva del primer momento de tiempo cero a infinito ( $ABC_{M \int 0-t}$ ) de  $730.07 \mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$ , un tiempo medio de residencia (TMR) de 81.14 min; una constante de eliminación de  $0.02 \text{ min}^{-1}$ , que describe la razón por la cual 6-OHF se elimina lentamente del organismo a través del tiempo.

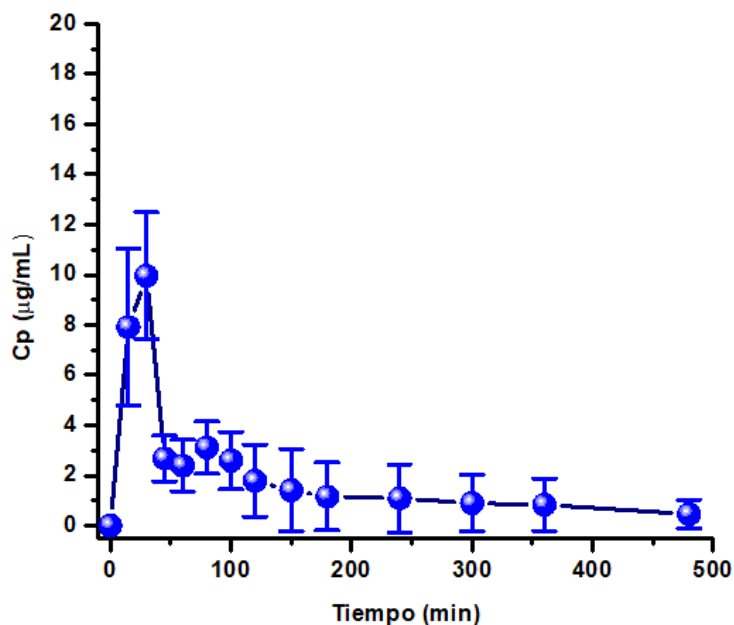


Figura 25. Concentración de 6-OHF en plasma de rata a través del tiempo.

**Tabla 8.** Parámetros farmacocinéticos de 6-OHF en ratas wistar después de una administración oral de 50 mg/kg.

Parámetro	Valor	Unidades
r	0.95	
$T_{\max}$	21.00	min
$C_{\max}$	14.82	$\mu\text{g/mL}$
ke	0.02	$\text{min}^{-1}$
$t_{1/2}$	66.26	min
$ABC_{\text{INF}}$	730.07	$\mu\text{g/mL}\cdot\text{min}$

<b>Vd/F</b>	6576.24	mL/ $\mu$ g
<b>Cl/F</b>	88.88	mL/min/ $\mu$ g
<b>MRT<sub>INF</sub></b>	81.14	min

## *8. CONCLUSIONES*

- El estudio *in silico* predijó que 6-OHF bloquea el canal de calcio ROC y VOC, y podría interactuar con las cavidades de unión que acceden al sitio catalítico, y esta interacción puede activar eNOS.
- El estudio farmacológico mostró que la actividad antialérgica de la muestra de prueba está relacionada con una disminución en la producción de tromboxanos B<sub>2</sub>.
- 6-OHF mostró seguridad en su uso basado en los estudios de toxicidad aguda y subcrónica. Se estableció que la DL<sub>50</sub>, por vía oral, podría estar entre 2000 y 5000 mg/kg, ubicándose en la categoría 4 según la GHS.
- El estudio farmacocinético de 6-OHF mostró rápida absorción en roedores. Esto hace suponer que en animales superiores y/o seres humanos su comportamiento puede favorecer a un efecto inmediato en respuesta a una crisis de asma alérgica.

## *9. PERSPECTIVAS*

- Con base a los resultados del estudio *in vivo* determinar el mecanismo inmunológico de 6-OHF como antialérgico y extrapolar un estudio crónico.
- Hacer uso de la tecnología farmacéutica para mejorar la solubilidad de 6-OHF.
- Realizar los estudios de formulación necesarios para obtener una forma farmacéutica de 6-OHF con las mejores propiedades biofarmacéuticas como medicamento para el tratamiento de asma alérgica.
- Proponer los estudios en fase clínica de 6-OHF mediante la colaboración del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias para el acceso a pacientes.

## *10. REFERENCIAS*

- Ahuja, S., Dong, W.M.2005.*Handbook of pharmaceutical analysis by HPLC*. United Kingdom.Elsevier.
- Balla, D.Z., Schwarz, S., Wiesner, H.M., Hennige, A.M., Pohmann, R. 2014. Monitoring the stress-level of rats with different types of anesthesia: a tail-artery cannulation protocol. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, 70, 35–9.
- Barnes, P.J. 2012. Drugs for airway disease. *Medicine (Baltimore)*, 40, 228–237.
- Barnes, P.J., 2006. Drugs for asthma. *Br. J. Pharmacol.*, 147, 297–303.
- Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N, Weissig, H., Shindyalov, I.N., Bourne, P.E. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res.* 28, 235-242.
- Bostantzoglou, C., Delimpoura, V., Samitas K., Zervas, E., Kannies, F., Gaga M. 2015. Clinical asthma phenotypes in the real world: opportunities and challenges. *Breathe*,11, 186-193.
- Busse, W.W., Rosenasser, L.J.2003. Mechanisms of asthma. *J Allergy Clin. Immunol.*, 111, 799-804.
- Criée,C.P.,Sorichter, S., Smith, H.J., Kardos, P., Merget, R., Heise,...Mitfessel, H. 2011. Body plethysmography e Its principles and clinical use. *Respir Med.*,105, 959-71. doi:10.1016/j.rmed.2011.02.006
- Giulia, D.C.,Mascolo, N., Angelo, A.I., Capasso, F.1999. Flavonoids : Old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs.*Life Sciencies*, 65, 337–353.
- Calvo, M. Clasificación del asma bronquial. *Neumología pediátrica*, 66-68. Recuperado de <http://www.neumologia-pediátrica.cl/wp-content/uploads/2017/06/ClasificacionAsma.pdf>
- Cazzola, M., Matera, M., G.2000. 5HT modifiers as a potential treatment of asthma *Trends Pharmacol Sci.* 21.13-6.
- Crozier, A., Jaganath, I.B., Clifford, M.N. 2009. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat. Prod. Rep.* 26, 1001.
- Custovic A, Simpson A.2004.Environmental allergen exposure, sensitisation and asthma: from whole populations to individuals at risk. *Thorax* ,59,825-827.



- Cyphert, J. M., Allen, I.C., Church, R.J., Latour, A.M., Snouwaert, J.N., Coffman, T.M., Koller, B.H. 2012. Allergic inflammation induces a persistent mechanistic switch in thromboxane-mediated airway constriction in the mouse. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 302. 140-151.
- Doering, D.C., Solway, J. 2013. Airway smooth muscle in the pathophysiology and treatment of asthma. *physiology in medicine*. 114.834-843.
- Egawa, T., Bhattacharya, D. 2019. Regulation of metabolic supply and demand during B cell activation and subsequent differentiation. *Current Opinion in Immunology*, 57, 8-14.
- García, M.M., Molina, Z. Transaminasas: valoración y significancia clínica. *Asociación Española de Pediatría*. 267- 275. Recuperado de <https://www.aeped.es/sites/default/files/documentos/transaminasas.pdf>
- Flores-Flores, A., Hidalgo-Figueroa, S., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., Bazán-Perkins, B., Navarrete-Vazquez, G., Estrada-Soto, S. 2018. Relaxant effect of structurally related flavonoids on isolated tracheal rat rings: a SAR study. *Med Chem Res*. 27.122-127.
- Forno, E., Gogna, M., Cepeda, A., Yañez, A., Solé D., Cooper, P., Avila, L., Soto, Q. M., Castro R. J., Celedón, J.C. 2015. Asthma in Latin America. *Thorax* 0, 1–8.
- Funk, L.R. 2014. Asthma Phenotypes: An Approach to the Diagnosis and Treatment of Asthma. *J Allergy Clin Pract*, 2, 682-685.
- Galli, S.J., Tsai, M., Piliponsky, A.M. 2008. The development of allergic inflammation. *Nature*. 454, 445–54.
- Global Initiative for Asthma (GINA), (2018). Global strategy for asthma management and prevention. Recuperado de <https://ginasthma.org/2018-gina-report-global-strategy-for-asthma-management-and-prevention/>
- Guerrero, Z. S., Vázquez, G. J.C., Gochicoa, R.L. Cid, J.S., Benítez P. R., Torre, B. L., 2016. Pletismografía corporal: recomendaciones y procedimiento. *Thorax*. 75, 296–307.
- Goszcz, K., Duthie, G.G., Stewart, D., Leslie, S., J., Megson, I.L. 2017. Bioactive polyphenols and cardiovascular disease: chemical antagonists, pharmacological agents or xenobiotics that drive an adaptive response?. *Br J Pharmacol* 11:1209-1225
- Guidelines O. 2008a. Oecd guidelines for the testing of chemicals. 425, 1–73. Recuperado de <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264071049->

en.pdf?expires=1539640209&id=id&accname=ocid44017949&checksum=9387BB7AF912C154918F5CA0D7F76329

- Guidelines O. 2008b. Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents.407. 1-13. Recuperado de [https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents\\_9789264070684-en#page13](https://read.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-407-repeated-dose-28-day-oral-toxicity-study-in-rodents_9789264070684-en#page13)
- Habibian, R.,Delirez, N., Abbas, F. A. 2018. The effects of bone marrow- derived mesenchymal stem cells on ovalbumin-induced allergic asthma and cytokine responses in mice. *Iranian journal of basic medical sciences*.21.483-488.
- Hirose, M. y Horiguchi T. 2017. Asthma phenotypes. *J Gen Fam Med.*, 18, 189-194.
- Hollman, P. 2004. Absorption, Bioavailability, and Metabolism of Flavonoids. *Pharmaceutical Biology*. 42. 74-83.
- Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K. 1996. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J Mol Graph* ,14,33–38.
- Isaac, C., Jiménez, E., Yane, E., Martínez ,C., Fonseca, J.G. 2009. Artemisa Flavonoides y sus acciones antioxidantes. *Rev Fac Med UNAM*. 52, 73–75.
- Iwamura, C., Shinoda, K., Yoshimura, M., Watanabe, Y., Obata, A., Nakayama ,T. 2010. Naringenin chalcone suppresses allergic asthma by inhibiting the type-2 function of CD4 T cells. *Allergol. Int*. 59, 67–73.
- Katzung, B., Masters, S., Trevor A. 2012. Basic and Clinical Pharmacology, Immunopharmacology. United States. Ed. The McGraw-Hill.
- Kazakevich, Y., LoBrutto, R. 2006. HPLC for Pharmaceutical Scientists, HPLC for Pharmaceutical Scientists. Recuperado de doi:10.1002/9780470087954
- Kim, S. H., Kim B. K., Lee, Y.C. 2011. Antiasthmatic effects of hesperidin, a potential Th2 cytokine antagonist, in a mouse model of allergic asthma. *Mediators Inflamm*.2011.1-12.
- Kubo, M. 2017. Innate and adaptive type 2 immunity in lung allergic inflammation. *Immunol. Rev*. 278. 162–172. doi:10.1111/imr.12557
- Lai, C.H., Wu, Y.W., Yeh, S.D., Lin, Y.H., Tsai, Y.H. 2014. Effects of 6-Hydroxyflavone on Osteoblast Differentiation in MC3T3-E1 Cells. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med*. 924560.
- Lin, B., Li, P., Wang, Y. ,Peng, W., Wu, Z., Su, W., Ji, H. 2008. The expectorant activity of naringenin. *Pulm. Pharmacol. Ther*. 21, 259–63.

- Lipkind, G.M., Fozzard, H.A. 2003. Molecular modeling of interactions of dihydropyridines and phenylalkylamines with the inner pore of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel. *Mol Pharmacol.* 63.499-511
- Lötvall, J. Cezmi, A.A., Bacharier L.B.,Bjermer,L.,Casale,T.B.,Custovic,A., Lemanske,R.F.,Wardlaw,A.J., R.,Wenzel, E.S. and Paul A. Greenberger.2011.Asthma endotypes: A new approach to classification of disease entities within the asthma syndrome. *J Allergy Clin immunol*,127, 355-60.
- Magos, G.G.A.,Lorenza Jiménez M. 2009.Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. *Rev Fac Med UNAM*,52, 260-264.
- Mali, R.G., Dhake, A.S. 2011. A review on herbal antiasthmatics. *Orient. Pharm. Exp. Med.* 11. 77–90.
- Mapp,C.,Boschetto, P.,Miotto, D., De Rosa, E., M Fabbri L. 1999. Mechanisms of occupational asthma. *Annals of allergy, asthma & immunology*, 83, 645-664.
- Marghade, S., Musmade, P.B., Moorkoth, S. 2012. High-Performance Liquid Chromatographic Assay for Ziprasidone in Plasma Samples: Application to Pharmacokinetic Studies in Rats. *J. Chromatogr. Sci.* 50, 902–908.
- Meryl, K., Ruzhi, J., Bennedsen, M., Vaughan, F., 1991. Production and isolation of guinea pig IgE antibody.*J. of Immunological methods*.139,123-134.
- Moon, Y.J., Wang, X., Morris, M.E. 2006. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. *Toxicol. In Vitro.* 20, 187–210.
- Mullane, K. 2011. Asthma translational medicine: report card. *Biochem. Pharmacol*, 82, 567–85.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M. 2008. Inmunobiología de Janeway. United States, Ed.The Mc Graw Hill.
- Nélida. 2001. Cumplimiento de las Estrategias Terapéuticas en Asma Compliance of the Therapeutic Strategies in Asthma 1–6.
- Ober, C. Yao, T.C. 2011. The Genetics of Asthma and Allergic Disease: a 21st Century Perspective. *Immunol Rev*, 242, 10–30. doi:10.1111/j.1600-065X.2011.01029.x.The
- Organización Mundial de la Salud.Temas de salud. Consultado 31agosto 2017. Recuperado de <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/asthma>

- Passalacqua, G., Ciprandi, G. 2008. Allergy and the lung. *Clin. Exp. Immunol*, 153, 12–6.
- Platts, M. T. EA. 2001. The Role of Immunoglobulin E in Allergy and Asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 164. S1-S5.
- Pugsley, M.K., Authier, S., Curtis, M.J. 2008. Principles of Safety Pharmacology. *Br. J. Pharmacol*. 154, 1382–1399.
- Quatrocchi, A. O., Andrizzi, A. S., L.F.R., 1992. Introducción a la HPLC Aplicación y práctica. Argentina, Buenos aires.
- Ramírez, R.P y García Z. E.A. (2013). Análisis de la respuesta inmune asociada al proceso inflamatorio de las vías aéreas en un modelo de asma alérgica en cobayo. (Tesis Doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México.
- Ramos, R. P., Campos, M.G., Martínez, C.E., Bazán, P. B., García, Z.E. 2013. Antigen-induced airway hyperresponsiveness in absence of broncho-obstruction in sensitized guinea pigs. *Exp. Lung Res*. 39, 136–145.
- Rios, M.Y., López-Martínez, S., López-Vallejo F., Medina-Franco, JL, Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., Navarrete-Vazquez, G., Hidalgo-Figueroa, S., Hernández-Abreu, O., Estrada-Soto, S. 2012. Vasorelaxant activity of some structurally related triterpenic acids from *Phoradendron reichenbachianum* (Viscaceae) mainly by NO production: ex vivo and in silico studies. *Fitoterapia*, 83, 1023-1029.
- Rosser, F.J., Forno, E., Cooper, P.J., Celedón, J.C. 2014. Asthma in hispanics: An 8-year update. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 189, 1316–1327.
- Russell, R., Brightling, C. 2017. Pathogenesis of asthma: implications for precision medicine. *Clin. Sci.*, 131, 1723–1735.
- Schrödinger Release 2018-2: Maestro, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2018.
- Singh, J., Shah, R., Singh, D. 2016. Inundation of asthma target research: Untangling asthma riddles. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 41, 60–85.
- Schrödinger L. 2010. The PyMOL Molecular Graphics System, Version 2.1.0.
- Seeliger, D., de Groot, B.L. 2010. Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *J Comput Aided Mol Des*, 24, 417-422.

- Svenningsen, S. y Nair, P. 2017. Asthma Endotypes and an Overview of Targeted Therapy for Asthma. *Frontiers in Medicine*, 4, 1-10.
- Tian-yang W., Qing L., Kai-shun B. 2018. Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *AJPS*, 13, 12-23.
- Trott, O., Olson AJ. 2010. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem* 31:455-461.
- Tanaka, T., Takahashi, R. 2013. Flavonoids and asthma. *Nutrients*, 5, 2128-2143.
- Torres de Young, S. 1928. Introducción a la cromatografía. Bogotá, Ed. Universidad Nacional.
- Zeinali, M., Rezaee, S.A., Hosseinzadeh, H. 2017. An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances. *Biomed Pharmacother*, 92, 998–1009.
- Vargas, M.H., Sommer, B., Bazán, P.B., Montaña, L.M. 2010. Airway responsiveness measured by barometric plethysmography in guinea pigs. *Vet. Res. Commun.*, 34, 589–596.
- Verma, S. P., Santoyo E. 2007. High-Performance Liquid and Ion Chromatography: Separation and Quantification Analytical Techniques for Rare Earth Elements. *Geostandards and Geoanalytical Research*, 31, 161-184.
- Walle, T. 2004. Absorption and metabolism of flavonoids. *Free Radic Bio Med*, 7, 829-37.
- Wang, F., Xu, Z., Ren, L., Tsang, S.Y., Xue, H. 2008. GABAA receptor subtype selectivity underlying selective anxiolytic effect of baicalin. *Neuropharmacology*, 55, 1231–1237.
- Wang, X., Wang, Z., Sidhu, P.S., Desai, U.R., Zhou, Q. 2015. 6-Hydroxyflavone and Derivatives Exhibit Potent Anti-Inflammatory Activity among Mono-, Di- and Polyhydroxylated Flavones in Kidney Mesangial Cells. *PLoS One*, 10, 1-11.
- Weersink, E.J.M., Posta, D.S., Aalbers, R., de Monchy, J.G.R. 1994. Early and late asthmatic reaction after allergen challenge. *Respir. Med.*, 88, 103–114.

## *11. ANEXOS*



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

Av. Universidad 1001 Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.  
C.P. 62210 Tel. (01 777) 329 7089 y 329 7000 Ext. 3365



Cuernavaca, Morelos a 08 de Abril de 2017.

**DRA. YADIRA LILIAN BEJAR RAMIREZ**

**RESPONSABLE SANITARIO DEL CET**

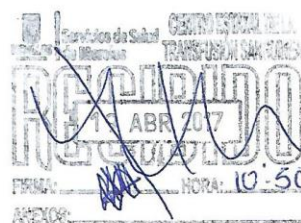
**PRESENTE**

Por medio de la presente, solicito a usted nos pueda hacer la donación de 1 unidad de plasma humano por mes, ya que se utilizarán en el montaje de técnicas analíticas de nuevas moléculas bioactivas a través de la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución. Esta solicitud se hace debido a que el material biológico mencionado se utilizará como parte del proyecto de tesis de Doctorado de la alumna Angélica Flores Flores con número de matrícula 1020120501 de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Adicionalmente, nos permitirá minimizar la utilización y el sacrificio de animales de experimentación. Por su atención gracias.

**ATENTAMENTE**

**"POR UNA HUMANIDAD CULTA"**

**Dr. Samuel Enoch Estrada Soto**  
Profesor-Investigador Titular C de Tiempo  
Completo



**ANEXO I.** Donación de plasma humano por el centro estatal de transfusiones sanguíneas de Morelos.

**SALUD**  
SECRETARÍA DE SALUD



**INER** INSTITUTO NACIONAL  
DE ENFERMEDADES  
RESPIRATORIAS  
ISMAEL COSÍO VILLEGAS  
**COMITÉ DE INVESTIGACIÓN**

México D. F. a 18 de Enero de 2016  
INER/CI/008/16

Dra. Blanca Margarita Bazán Perkins  
Investigador Principal

Asunto: DICTAMEN DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN.  
**APROBACIÓN.**

Título del Proyecto: EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA Y FISIOLÓGICA DE DERIVADOS DE FLAVONOIDES, NIFEDIPINA Y TEOFILINA EN UN MODELO DE ASMA ALÉRGICA EN EL COBAYO.

Código asignado por el Comité: **B01-16**


Le informamos que su proyecto de referencia ha sido evaluado por el Comité y las opiniones acerca de los documentos presentados se encuentran a continuación:

	Nº y/o Fecha Versión	Decisión
Protocolo	Versión 1, Noviembre 2015	APROBADO

Este protocolo tiene vigencia de enero 2016 a enero 2019.

En caso de requerir una ampliación, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte de progreso al menos 30 días antes de la fecha de término de su vigencia. El Comité dispone en su página electrónica de un formato estándar que podrá usarse al efecto. Lo anterior forma parte de las obligaciones del Investigador las cuales vienen descritas al reverso de esta hoja.

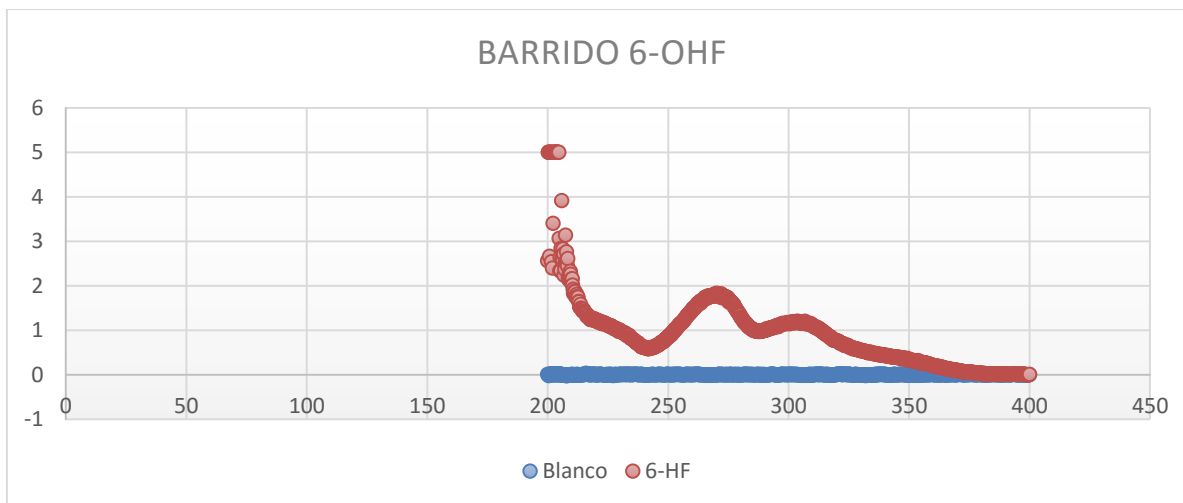
Atentamente

  
Dr. Joaquín Zúñiga Ramos  
Presidente del Comité

Calzada de Tlalpan No. 4502, Col. Sección XVI, Deleg. Tlalpan, México, D.F., C.P. 14080  
Tel. (55) 54 87 17 00 - www.iner.salud.gob.mx

**ANEXO II.** Autorización del proyecto por parte del comité de ética del INER.





**ANEXO III.** Espectro de UV- Visible para la elección de la longitud de onda.



Tiempo	Concentración plasmática (Cp)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	3.527	10.954	0	18.585	0	22.323	7.913
30	3.840	1.534	6.018	6.025	18.354	12.25	21.647	9.952
45	1.991	1.653	6.997	0.886	3.487	2.057	1.86	2.676
60	3.542	1.978	7.152	0.75	2.724	0.815	1.471	2.388
80	2.715	2.145	7.856	0.49	2.383	0.294	0.926	3.116
100	3.311	2.940	5.979	0.317	0	0.241	0	2.593
120	0	0.750	2.221	0.252	0	0.078	0	1.786
150	0	0	1.873	0	0	0	0	1.410
180	0	0	1.103	0	0	0	0	1.158
240			0.43	0	0	0	0	1.086
300			0.412	0	0	0	0	0.900
360			0.178	0	0	0	0	0.836
480			0.0287	0	0	0	0	0.457

Perfiles	1	2	3	4	5	6	promedio
<b>r</b>	0.9588	0.9877	0.9377	0.9609	0.9891	0.91	0.96
<b>T<sub>máx</sub></b>	15	30	15	30	15	30.0	22.50
<b>C<sub>máx</sub></b>	10.95	6.025	18.59	12.25	22.32	10.0	13.36
<b>ke</b>	0.01	0.01	0.01	0.04	0.02	0.04	0.02
<b>t<sub>1/2</sub></b>	59.48	38.91	65.08	17.07	34.48	155.2	61.70
<b>ABC<sub>INF</sub></b>	993.47	149.59	901.64	242.27	768.52	744.4	633.32
<b>Vd</b>	4318.58	18766.54	5206.91	5083.32	3236.65	15035.7	8607.96
<b>CI</b>	50.33	334.22	55.45	206.38	65.06	67.2	129.8
<b>MRT<sub>INF</sub></b>	88.13	55.54	64.85	37.48	31.60	183.7	76.9

**ANEXO IV.** Perfiles del estudio de farmacocinética con un análisis no compartimental.

## RESEARCH ARTICLE

# Functional mechanism of tracheal relaxation, antiasthmatic, and toxicological studies of 6-hydroxyflavone

Angélica Flores-Flores<sup>1†</sup> | Samuel Estrada-Soto<sup>1</sup>  | César Millán-Pacheco<sup>1</sup> | Blanca Bazán-Perkins<sup>2,3</sup> | Rafael Villalobos-Molina<sup>4,5</sup> | Leticia Moreno-Fierros<sup>4</sup> | Rogelio Hernández-Pando<sup>6</sup> | Sara García-Jiménez<sup>1</sup>  | Julio César Rivera-Leyva<sup>1</sup>

Enabling Technologies		Strategy, Management & Health Policy	
Hit, Lead & Candidate Discovery	Preclinical Research & Development	Clinical Research	Post-Market Research

<sup>1</sup>Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos, Mexico

<sup>2</sup>Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Ciudad de México, Mexico

<sup>3</sup>Escuela de Medicina y Ciencias de la Salud, Tecnológico de Monterrey, Ciudad de México, Mexico

<sup>4</sup>Unidad de Biomedicina, FES-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlalnepantla, Estado de México, Mexico

<sup>5</sup>Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

<sup>6</sup>Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Ciudad de México, Mexico

## Correspondence

Samuel Estrada-Soto, Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av. Universidad 1001, Col. Chamilpa, 62209 Cuernavaca, Morelos, Mexico  
Email: enoch@uaem.mx

## Funding information

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Grant/Award Numbers: 167044 and 256197

## Abstract

Previously, we described tracheal rat rings relaxation by several flavonoids, being 6-hydroxyflavone (6-HOF) the most active derivative of the series. Thus, its mechanism of action was determined in an ex vivo tracheal rat ring bioassay. The anti-asthmatic effect was assayed in in vivo OVALbumin (OVA)-sensitized guinea pigs. Finally, the toxicological profile of 6-HOF was studied based on Organization of Economic Cooperation and Development guidelines with modifications. 6-HOF-induced relaxation appears to be related with receptor-operated calcium channel and voltage-operated calcium channel blockade as the main mechanism of action, and also through the production of relaxant second messengers NO and cGMP. Molecular docking supports that 6-HOF acts as calcium channel blocker and by activation of nitric oxide synthase. In addition, the in vivo anti-asthmatic experiments demonstrate the dose-dependent significant anti-allergic effect of 6-HOF induced by OVA, with best activity at 50 /kg. Finally, toxicological studies determined a LD50 > 2,000 mg/kg and, after 28 day of treatment with 6-HOF (50 mg/kg) by intragastric route, mice did not exhibit evidence of any significant toxicity. In conclusion, experiments showed that 6-HOF exerts significant relaxant activity through calcium channel blockade, and possibly, by NO/cGMP-system stimulation on rat trachea, which interferes with the contraction mechanism of smooth muscle cells in the airways. In addition, the flavonoid shows potential anti-asthmatic properties in an anti-allergic pathway. Furthermore, because the pharmacological and safety evidence, we propose this flavonoid as lead for the development of a novel therapeutic agent for the treatment of asthma and related respiratory diseases.

## KEYWORDS

6-hydroxyflavone, allergy, asthma, calcium channel blockade, toxicology, tracheal relaxation

**Abbreviations:** 2-AP, 2-aminopyridine; 6-HOF, 6-hydroxyflavone; AHR, airway hyperresponsiveness; ALT, alanine aminotransferase; ANOVA, analysis of variance; ASM, airway smooth muscle; AST, aspartate aminotransferase; CaCl<sub>2</sub>, calcium chloride; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; cGMP, cyclic guanosine monophosphate; CRC, concentration–response curve; DMSO, dimethyl sulfoxide; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; EPO, eosinophil peroxidase; H&E, hematoxylin and eosin; HDL, high-density lipoprotein cholesterol; IgE, immunoglobulin E; IL, interleukin; KCl, potassium chloride; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, potassium phosphate monobasic; L-NAME, N(ω)-nitro-L-arginine methyl ester; MgSO<sub>4</sub>, magnesium sulfate; NaCl, sodium chloride; NaHCO<sub>3</sub>, sodium bicarbonate; NO, nitric oxide; NOS, nitric oxide synthase; ODQ, 1H-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-a]quinoxalin-1-one; OECD, Organization for Economic Cooperation and Development; OVA, ovalbumin; PKA, protein kinase A; ROC, receptor-operated calcium channels; ROW, relative organ weight; SEM, standard error of the mean; sGC, soluble guanylyl cyclase; SOCE, store-operated calcium entry; VOC, voltage-operated calcium channels.

<sup>†</sup>Taken in part from the PhD Dissertation of A. Flores-Flores.

## 1 | INTRODUCTION

Allergic asthma is a chronic airway inflammatory disease that manifests itself as recurrent reversible bronchoconstriction and airway hyperresponsiveness (AHR) (GINA, 2017). It is associated with changes in the levels of eosinophils, mast cells, lymphocytes, cytokines, and other inflammatory cell products. Currently, asthma therapy lacks satisfactory success because of the adverse effects of bronchodilators and anti-inflammatory drugs, and patients resort to alternative medicine to treat their asthma (GINA, 2017). In this regard, research for novel active plant compounds has increased, considering that natural products offer a structural diversity with different pharmacological effects and specific mechanisms of action, and in several cases, that are accompanied by multitarget interactions. A clear example are flavonoids, which are small molecules, and their classification depends on patterns of substitution in the heterocyclic ring, such as chalcones, flavones, flavonols, flavanols, flavans, flavanones, anthocyanidins, and isoflavonoids, and their different structures lead to changes in bioactivity and metabolism (Havsteen, 2002; Wen et al., 2017). Recent reports show that more than 9,000 flavonoids possess important effects, including antiviral/bacterial, antidiabetic, anticancer, antiaging (Wang, Li, & Bi, 2018), anti-allergic, anti-hepatotoxic, and antispasmodic activities, and protection against cardiovascular events (Harborne & Williams, 2000; Havsteen, 2002; Torres-Piedra et al., 2011; Wang et al., 2018; Wen et al., 2017). Also, they demonstrate vasorelaxant, antioxidant, antiatherogenic, and bronchodilatory activities, among others (Harborne & Williams, 2000; Tanaka & Takahashi, 2013; Torres-Piedra et al., 2011). In addition, flavonoids have been suggested as having anti-inflammatory properties, which avoid damage induced by neutrophils as the central cell in the acute inflammatory process (Zeinali, Rezaee, & Hosseinzadeh, 2017). Moreover, the anti-allergic activity of fisetin was shown to inhibit the degranulation of immunoglobulin E (IgE)/Ag-stimulated RBL-2H3 cells in a dose-dependent manner (Jo & Park, 2017). In addition, in an ovalbumin (OVA)-sensitized mouse model, apigenin, when administered intraperitoneally (i.p.) at 5 or 10 mg/kg before the last OVA challenge, resulted in a significant inhibition of asthmatic reactions, such as serum IgE elevation, eosinophil accumulation, IL-4, IL-5, and eosinophil peroxidase activity in BALF, as well as AHR. Thus, the aim of this study was to expand previous findings, emphasizing whether **6-HOF** causes tracheal relaxation and to characterize the putative pharmacological mechanisms responsible for such an effect. In addition, we sought to establish the *in vivo* antiasthmatic effect in an OVA-induced allergic model and the toxicological profile of **6-HOF** in acute and sub-chronic mouse models.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Chemicals and drugs

Carbamoylcholine chloride (carbachol), theophylline, glibenclamide, 2-aminopyridine, *N*( $\omega$ )-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), 1*H*-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one (ODQ), indomethacin, Iso-proterenol, Nifedipine, CaCl<sub>2</sub>, 6-hydroxyflavone (**6-HOF**), KCl, OVA,

aluminum hydroxide, dimethyl sulfoxide, and propylenglycol were purchased from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO). All other reagents were of analytical-grade and from a local source. Stock solutions of **6-HOF** were formulated utilizing distilled water and were freshly prepared on the same day of experimentation.

### 2.2 | Animals

Male Wistar rats (weighing 250–300 g) and male ICR mice (weighing 25–30 g) were obtained from FESI Bioterium, Universidad Nacional Autónoma de México. Male, outbred guinea pigs (weighing 350–400 g) were purchased from Harlan-México (strain HsdPoc:DH). The animals were maintained under filtered, air-conditioned, 12-/12-hr light/dark cycles at  $21 \pm 1$  °C and at 50–70% humidity and were fed sterilized pellets (Purina Chow or 2040 Harlan Teklad Guinea Pig Diet) and water *ad libitum*.

All of the animals' procedures were conducted in accordance with our Federal Regulations for Animal Experimentation and Care (SAGARPA, NOM-062-ZOO-1999, México) and were approved by the Scientific and Bioethics Committee of the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias with assigned code B01-16.

### 2.3 | Isolated thoracic tracheal rat ring model

The Wistar rats were killed by cervical dislocation. The trachea was dissected and cleaned of connective tissue and mucus, and immediately sectioned into rings 4–5-mm in length (each containing 2–3 cartilaginous rings). Then, tissue segments were mounted on stainless steel hooks under an optimal tension of 2 g in 10-ml organ baths containing warmed (37 °C) and oxygenated (O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>, 95:5) Krebs solution (composition, mM: NaCl, 118; KCl, 4.7; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; NaHCO<sub>3</sub>, 25.0, and glucose, 11.1, pH 7.4). Changes in tension were recorded by Grass-FT03 force transducers (Astromed, West Warwick, RI) connected to an MP100 Analyzer (Biopac Instruments, Santa Barbara, CA) as described (Estrada-Soto et al., 2012). After equilibration, the rings were contracted by carbachol (1  $\mu$ M) and washed every 40 min for 2 hr. After contraction with carbachol, the test samples (**6-HOF**, vehicle, and positive control) were added at the bath in a volume of 100  $\mu$ L; then, cumulative concentration-response curves (CRC) were obtained for each ring. The relaxant effect of the test samples was determined by comparing the muscular tone of the contraction before and after addition of the test materials. Muscular tone was calculated from the tracings using Acknowledge software (Biopac®).

#### 2.3.1 | Determination of the underlying functional mode of action of 6-HOF on tracheal rat rings

The following *ex vivo* experiments were carried out:

- For interaction with the cholinergic receptors, CRC were obtained with carbachol (0.006–540  $\mu$ M) after the tissues were incubated with 47 or 84.14  $\mu$ M of **6-HOF** during 15 min. The carbachol-contraction effect was determined by comparing the contraction induced by carbachol in the absence and presence of **6-HOF**.

- For interaction with the  $\beta$ -adrenergic receptor, tissues were preincubated during 15 min with Isoproterenol (10  $\mu$ M;  $\beta$ -adrenergic agonist), and the maximal relaxing effect of **6-HOF** was compared in the absence and presence of Isoproterenol.
- To establish a possible interaction of **6-HOF** with the L-type calcium channel, tracheal rings were washed with Krebs solution, then rinsed with a solution containing KCl (80 mM). Once a plateau was attained, CRC of **6-HOF**-induced relaxation were obtained by adding cumulative concentrations of the compound to the bath.
- To determine whether the inhibition of extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  influx was involved in **6-HOF**-induced relaxation, the experiments were carried out in  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs solution. Tracheal rings were washed with  $\text{Ca}^{2+}$ -free Krebs solution containing KCl (80 mM) (15 min), and cumulative CRC for  $\text{CaCl}_2$  were obtained in the absence of **6-HOF** (control group) or after a 15-min incubation with **6-HOF** (26.3, 47, 84.14, and 149.88  $\mu$ M). Finally, the contractile effect induced by  $\text{CaCl}_2$  was compared in the absence and presence of **6-HOF**.
- For disruption of the NO/cGMP pathway, the tissues were incubated with L-NAME (10  $\mu$ M, NOS inhibitor) or ODQ (10  $\mu$ M, sGC inhibitor) during 15 min, and immediately, **6-HOF** was added at different concentrations and cumulative CRC were obtained.

## 2.4 | Docking studies

Human endothelial nitric oxide synthase (eNOS) (1M9R, PDB code; Berman et al., 2000) and human L-type calcium channel, modeled by Lipkind and Fozzard (2003), were used as reference target. Docking standardization for each target was carried out utilizing previously bound or docked molecules, that is, the 3-bromo-7-nitroindazole structure bound to the crystallographic structure, 1M9R, was employed for NOS. Nifedipine was used for the human L-type calcium channel ligand. Nifedipine and **6-HOF** were constructed using MarvinSketch by ChemAxon (2018). 3-Bromo-7-nitroindazole coordinates were obtained from the crystallographic structure, 1M9R. A validated protocol was used to reproduce correctly the docking root-mean-square deviation (RMSD) between 3-bromo-7-nitroindazole and 1M9R crystal ligand. The RMSD obtained was  $2.66 \pm 0.49$  Å by 100 independent docking experiments.

Docking experiments were directed to the known binding site of each target. The NOS grid-box center was located at (24.16, 12.55, 30.29) with a size of  $14 \times 14 \times 24$  Å<sup>3</sup>; this box was sufficient to cover S, M, C2, and C1 sites, as reported by Ríos et al. (2012). The L-type calcium channel grid center was at (0, 0, 0) with a size of  $22.50 \times 22.50 \times 22.50$  Å<sup>3</sup>. All grid boxes had 1 Å of grid spacing. All systems were prepared utilizing PyMol 2.1.0 by Schrödinger (2010) and the Autodock Vina plug-in for PyMol (Seeliger & de Groot, 2010). Autodock Vina (Trott & Olson, 2010) software was used to conduct all docking studies; 100 independent docking runs for each ligand were performed.

All images were performed using Visual Molecular Dynamics (Humphrey, Dalke, & Schulten, 1996), and protein–ligand interaction maps were created with Maestro (Schrödinger, 2018).

## 2.5 | In vivo experiments in the guinea pig asthma model induced by an OVA-sensitization procedure

On Day 1, the guinea pigs received a mixture of 60  $\mu$ g/ml of OVA with aluminum hydroxide (1 mg/ml) dispersed in saline solution via both i.p. (0.5 mg/ml) and subdermal (s.d.) (0.5 mg/ml) injections. Antigen sensitization was reinforced 8 days later with OVA aerosol (3 mg/ml) delivered during 5 min. The aerosols were produced by a US-1 Bennett Nebulizer (flow, 2 ml/min; Multistage Liquid Impinger; Burkard Manufacturing Co., Rickmansworth, Hertfordshire, UK), releasing mixed particles <4  $\mu$ m (44%), 4–10  $\mu$ m (38%), and > 10  $\mu$ m (18%) in size. On Day 15, guinea pigs that developed immediate airway obstruction (the asthma model) after antigen challenge during 1 min with OVA aerosol (1 mg/ml) were used for **6-HOF** and vehicle treatments. Additional control groups of non-sensitized guinea pigs were included.

## 2.6 | Barometric plethysmography

Inhalation challenges were carried out by using a barometric plethysmograph to record acute airway obstructive response to the antigen immediately after OVA delivery. We utilized whole-body single-chamber plethysmography for freely moving animals (Buxco Electronics, Inc., Troy, NY) to evaluate pulmonary function according to the principles previously described.

## 2.7 | Determination of bronchial obstruction

**6-HOF** was tested at different doses (30, 50, and 90 mg/kg), or propylenglycol (10%) was injected i.p. into animals 45 min before the OVA aerosol challenge. Guinea pigs were challenged for 1 min, and bronchial obstruction was recorded for one additional minute for each increasing dose of aerosolized OVA or saline aerosol. The highest value on the bronchial obstruction (iB) index obtained during each OVA challenge was expressed as a percentage of the baseline iB value exhibited after saline challenge, to determine the potential bronchodilatory effect of **6-HOF**.

## 2.8 | Toxicological studies

### 2.8.1 | Acute oral toxicity test

The acute toxicity study for **6-HOF** was carried out to evaluate any possible toxicity. The experiment was conducted in accordance with the recommendation of Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) Guideline 425 (OECD, 2008). For this purpose, three male ICR mice (weighing 25–30 g), orally administered with gradual doses (5, 50, 300, and 2,000 mg/kg body weight), were used. After treatment, the animals were carefully observed for signs of toxicity, mortality, and general behavior for 4 hr. Animals were also monitored for 14 days after treatment.

### 2.8.2 | Sub-chronic toxicity study

The sub-chronic experiment was carried out using repeated doses of **6-HOF** (Hernández-Vázquez et al., 2017; Parasuraman, 2011). Two independent groups of six male ICR mice (weighing 25–30 g each) were administered daily with **6-HOF** (50 mg/kg) oral dose by gavage

for 28 days, and the control group received saline solution. All animals survived until the end of the observation period. Visible and transitory signs of toxicity were carefully observed during the first 4 hr following each administration, as well as at 8 and 12 hr afterward. Changes in body weight were monitored daily during the entire study.

### 2.8.3 | Relative organ weight

The weight of the organs of all of the mice was recorded at the end of the experiment. The kidneys, liver, lungs, and heart of each mouse in the experimental and control groups were collected and weighed. Relative organ weight (ROW) was calculated as follows:  $ROW = (\text{organ weight/body weight}) \times 100$ .

### 2.8.4 | Determination of biochemical parameters

Blood was collected by cardiac puncture. The blood sample was maintained at room temperature for 30 min for it to clot. Afterward, the test tube containing the clotted blood sample was centrifuged at 10,000 rpm for 10 min to obtain serum. The serum was used for the biochemical tests. The values of blood glucose, cholesterol, triglycerides, HDL, ALT, and AST were determined following standard laboratory procedures.

### 2.8.5 | Histopathological examination

A complete necropsy was performed on each animal, in which a careful macroscopic observation inspected for the presence or absence of anatomic abnormalities was carried out, comparing treated and control groups. Tissue samples that were collected from the lungs, liver, kidneys, and heart of each animal were fixed immediately by immersion in 10% buffered formalin, then routinely processed and embedded in paraffin. The paraffin-embedded tissues were sectioned at a width of 4–5  $\mu\text{m}$ , mounted on glass slides, and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Histological slides were examined with a conventional light microscope (Zeiss 40 $\times$ ).

## 2.9 | Statistical analysis

Pharmacological data was analyzed by two-way analysis of variance and post hoc Tukey and Dunnett tests. The difference was considered significant with a  $p$  value of  $<.05$ . All values were expressed as the mean  $\pm$  the standard error of the mean. CRC were plotted, and the obtained experimental data were adjusted by a nonlinear curve-fitting program (ORIGIN 8.0).

## 3 | RESULTS AND DISCUSSION

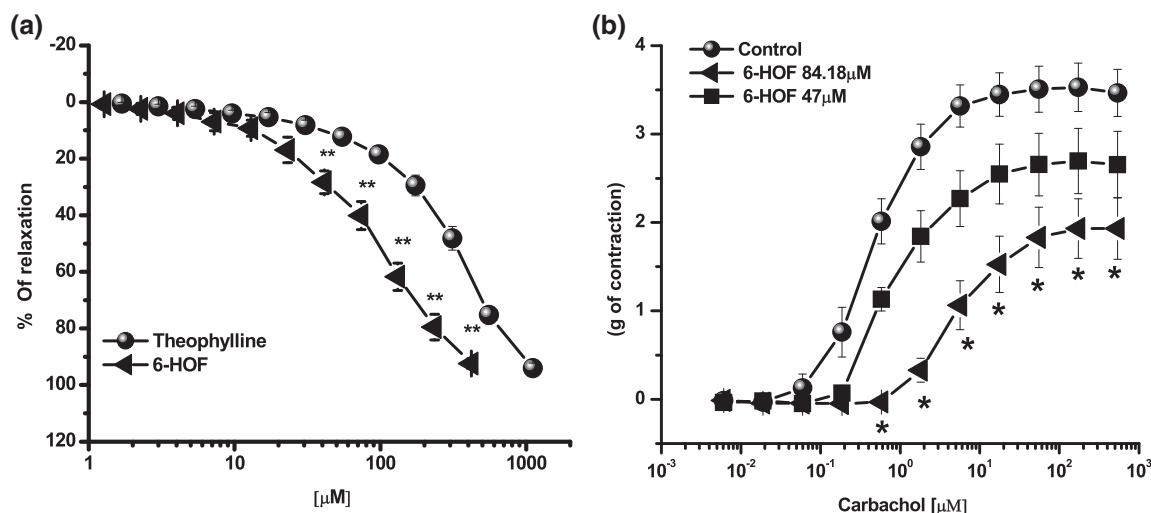
Natural products are an important source for discovery and development of new drugs with novel therapeutic targets for more specific treatments and less adverse effects. Within this context, flavonoids are privileged scaffolds that possess several activities and mechanisms of action (Goszcz, Duthie, Stewart, Leslie, & Megson, 2017; Harborne & Williams, 2000; Wang et al., 2018). In previous reports, the potential effect of flavonoids as antiasthmatic drugs, especially those possessing powerful antioxidant, anti-allergic, anti-inflammatory, immune-modulating, and airway smooth muscle relaxant effects, have

been described (Flores-Flores et al., 2018; Goszcz et al., 2017; Tanaka & Takahashi, 2013; Wang et al., 2018). The majority of these induce their antiasthmatic effect via the inhibition of the release of chemical mediators, the synthesis of Th2 type cytokines such as interleukin (IL)-4 and IL-13, and CD40 ligand expression by high-affinity IgE receptor-expressing cells such as mast cells and basophils (Tanaka & Takahashi, 2013). They also inhibit IL-4-induced signal transduction and affect the differentiation of naïve CD4+ T cells into effector T cells through their inhibitory effect on the activation of the aryl hydrocarbon receptor (Tanaka & Takahashi, 2013). Various studies of flavonoids in asthmatic animal models have demonstrated the beneficial effects of luteolin, apigenin, and fisetin, among others (Tanaka & Takahashi, 2013). They significantly suppressed OVA-induced airway bronchoconstriction and AHR in Balb-c mice. It is well known that several antiasthmatic drugs have exhibited an adverse effect and/or they cannot efficiently control the disease and its related symptoms. Thus, for treatment, the combinatorial therapeutic strategy with bronchodilators and anti-inflammatory drugs is required. Within this context, our research group is dedicated to discovering and developing new dual drugs that are capable of treating asthma from the bronchodilatory and anti-inflammatory points-of-view. Thus, in the current work, we describe how **6-HOF** induced its relaxant effect on tracheal rat rings (underlying the functional mode of action), as well as its significant suppression of OVA-induced airway bronchoconstriction in a guinea pig model.

### 3.1 | Tracheal relaxation and its underlying mechanism of action: functional and in silico experiments

In a previous work (Flores-Flores et al., 2018), the authors described that **6-HOF** induced significant relaxation on isolated tracheal rat rings precontracted with carbachol. In fact, **6-HOF** was the most potent compound of the entire series studied; thus, in the current investigation, **6-HOF** induced significant concentration-dependent relaxation that was more potent than that of the positive control (theophylline) (Figure 1a). Moreover, preincubation with 47 and 84.14  $\mu\text{M}$  of **6-HOF** diminished, and in nonparallel and concentration-dependent manners, the contractions induced by carbachol and significantly depressed the maximal response (Figure 1b). Recent results suggest that the flavonoid-relaxant effect could be produced by a noncompetitive antagonism by means of cholinergic-receptor allosteric-site interaction and/or by a functional antagonism associated with a  $\beta$ -adrenoceptor agonism, second-messenger accumulation, and/or calcium channel blockade (Alemán-Pantitlán et al., 2016; Sánchez-Recillas et al., 2014). Therefore, we decided to elucidate the functional mode of action of **6-HOF** as a functional antagonist on those targets.

Asthma is characterized by excessive airway smooth muscle (ASM) contraction. ASM contraction is dependent on the phosphorylation of the regulatory myosin light-chain mediated by myosin light-chain kinase, which is in turn activated by the binding of calmodulin and calcium (Chen & Sanderson, 2017; Pfitzer, 2001). Hence, an increase of intracellular calcium concentration ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) induces the contraction of ASM; in this regard, the flavonoid relaxed the contraction induced by KCl 80 mM (Figure 2a), similar to Nifedipine (an L-

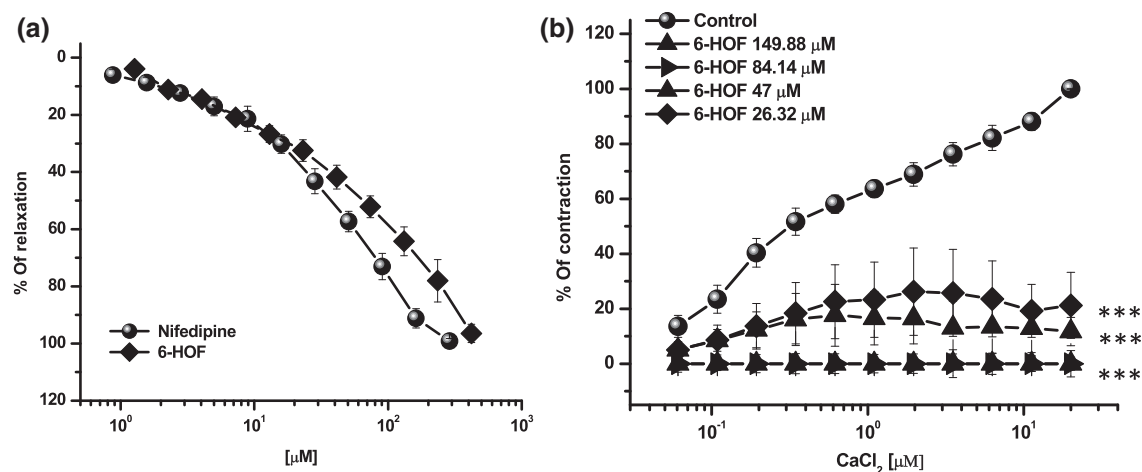


**FIGURE 1** (a) Relaxing concentration–response curves (CRC) of 6-hydroxyflavone (**6-HOF**) on tracheal rat rings contracted with carbachol (1  $\mu\text{M}$ ). (b) CRC of carbachol in the absence and presence of increasing concentrations of **6-HOF**. Data are expressed as the mean  $\pm$  the standard error of the mean of six experiments (\*\* $p < .01$ ; \*\*\* $p < .05$ )

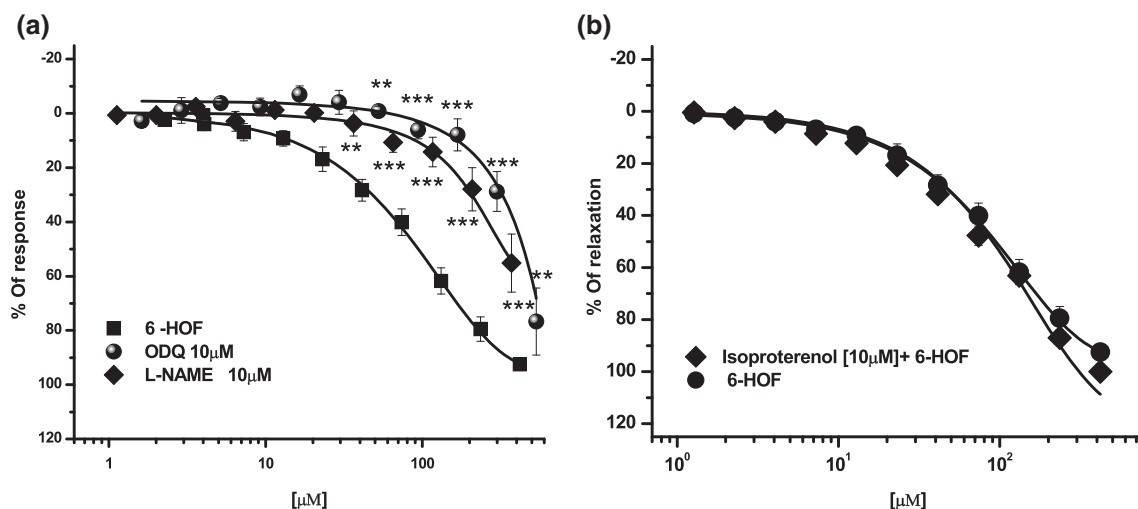
type calcium channel blocker), employed as positive control; while the  $\text{CaCl}_2$ -induced contraction was significantly reduced by the **6-HOF** (Figure 2b), suggesting that the flavonoid acts as a calcium channel blocker (Godfraind, 2017). The contraction of smooth muscle induced by high  $\text{K}^+$  is dependent on the entry of  $\text{Ca}^{2+}$  into the cells through voltage-operated calcium channel (VOC) cell-membrane depolarization, while inhibition of high  $\text{K}^+$ -induced contraction is because of the result of blocked  $\text{Ca}^{2+}$  entry through these VOC (Ghayur, Gilani, Khan, Amor, & Choudhary, 2006; Godfraind, 2017; Yagi, Kuwahara, & Tsu-bone, 2002). Morel and Godfraind described that, in the presence of dihydropyridines,  $\text{KCl}$ -dependent contraction is lowered as a function of the concentration of the blocker and duration of the depolarization, implying that membrane potential is involved in dihydropyridine action, such as that revealed by Nifedipine (Figure 2a) (Morel & Godfraind, 1987). Thus, a variety of  $\text{Ca}^{2+}$  entry pathways are proposed to contribute to  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis in ASM contraction, including VOC, receptor-operated  $\text{Ca}^{2+}$  channels (ROC) and reverse-mode  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchangers (Chen & Sanderson, 2017). However, the most important

$\text{Ca}^{2+}$  influx pathway coupled with  $\text{Ca}^{2+}$  loss from sarcoplasmic reticulum is probably that of store-operated calcium entry (SOCE). SOCE has been recently identified as a  $\text{Ca}^{2+}$  influx pathway in ASM contraction (Chen & Sanderson, 2017). Because **6-HOF** was capable of relaxing the contraction induced by  $\text{KCl}$  80 mM, and to avoid  $\text{CaCl}_2$ - and carbachol concentration-dependent contractions, the data suggested that flavonoid might obstruct both ROC and VOC (Godfraind, 2017). However, it is necessary to conduct more experiments to discard or include the participation of SOCE.

However, the role of second messengers NO, cGMP, and cyclic adenosine monophosphate (cAMP) production and/or accumulation and potential  $\beta$ -adrenoceptor agonism by **6-HOF** as relaxant mechanism was investigated. In the presence of L-NAME (an unspecific NOS inhibitor) and ODQ (a specific soluble guanylyl-cyclase inhibitor), **6-HOF** relaxant curves were significantly displaced to the right and the efficacies were drastically diminished (Figure 3a), indicating that a second mechanism of action is involved in **6-HOF** actions, such as possible increases of NO/cGMP (Chen & Ko, 2017). Recent



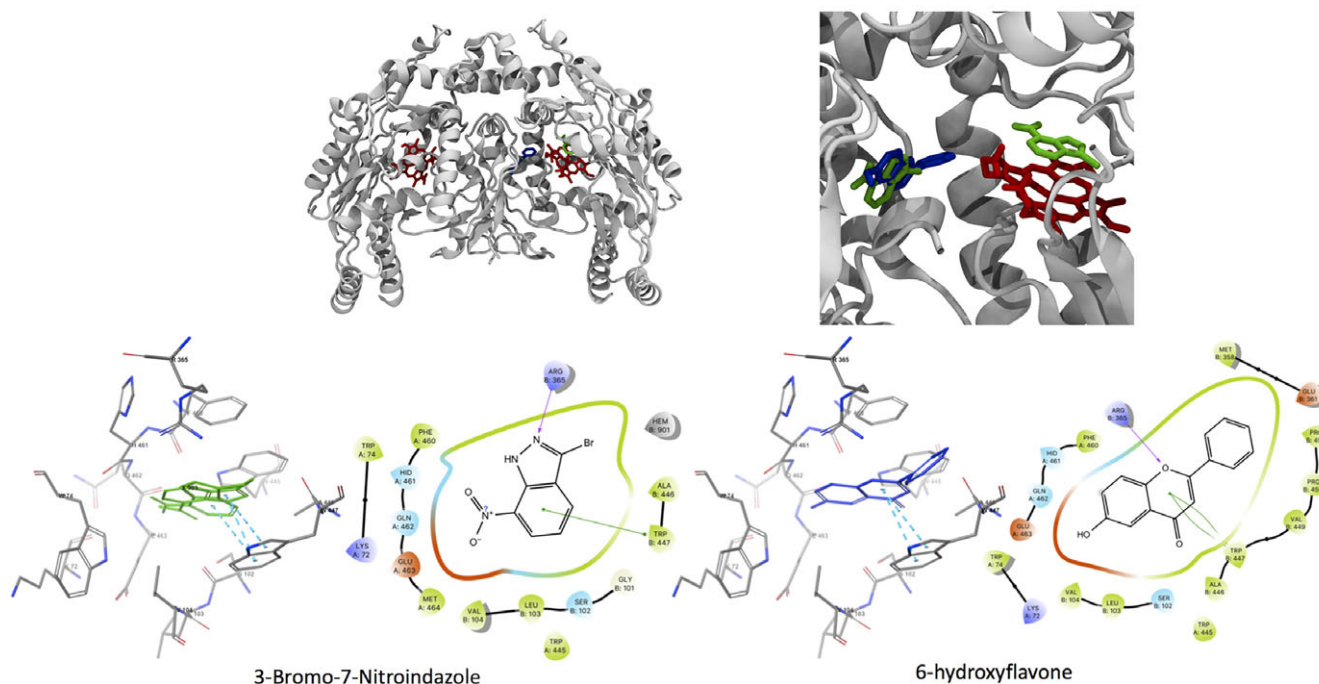
**FIGURE 2** (a) Relaxing concentration–response curves of 6-hydroxyflavone (**6-HOF**) on tracheal rat rings contracted with  $\text{KCl}$  (80 mM). (b) Inhibitory effect of **6-HOF** on the contraction curves induced by the cumulative concentration of extracellular  $\text{CaCl}_2$  in  $\text{Ca}^{2+}$ -free solution. Results are presented as the mean  $\pm$  the standard error of the mean,  $n = 6$ . \*\*\* $p < .001$  each point compared with control



**FIGURE 3** (a) Relaxing concentration–response curves (CRC) of 6-hydroxyflavone (6-HOF) on tracheal rat rings pretreated with *N*( $\omega$ )-nitro-L-arginine methyl ester and 1*H*-[1,2,4] oxadiazolo[4,3-*a*]quinoxalin-1-one and contracted with carbachol (1  $\mu$ M). (b) Relaxing CRC of 6-HOF on tracheal rat rings pretreated with isoproterenol (10  $\mu$ M) and contracted with carbachol (1  $\mu$ M). Data are expressed as the mean  $\pm$  the standard error of the mean,  $n = 6$  (\*\* $p < .01$ ; \*\*\* $p < .001$ ) compared with control

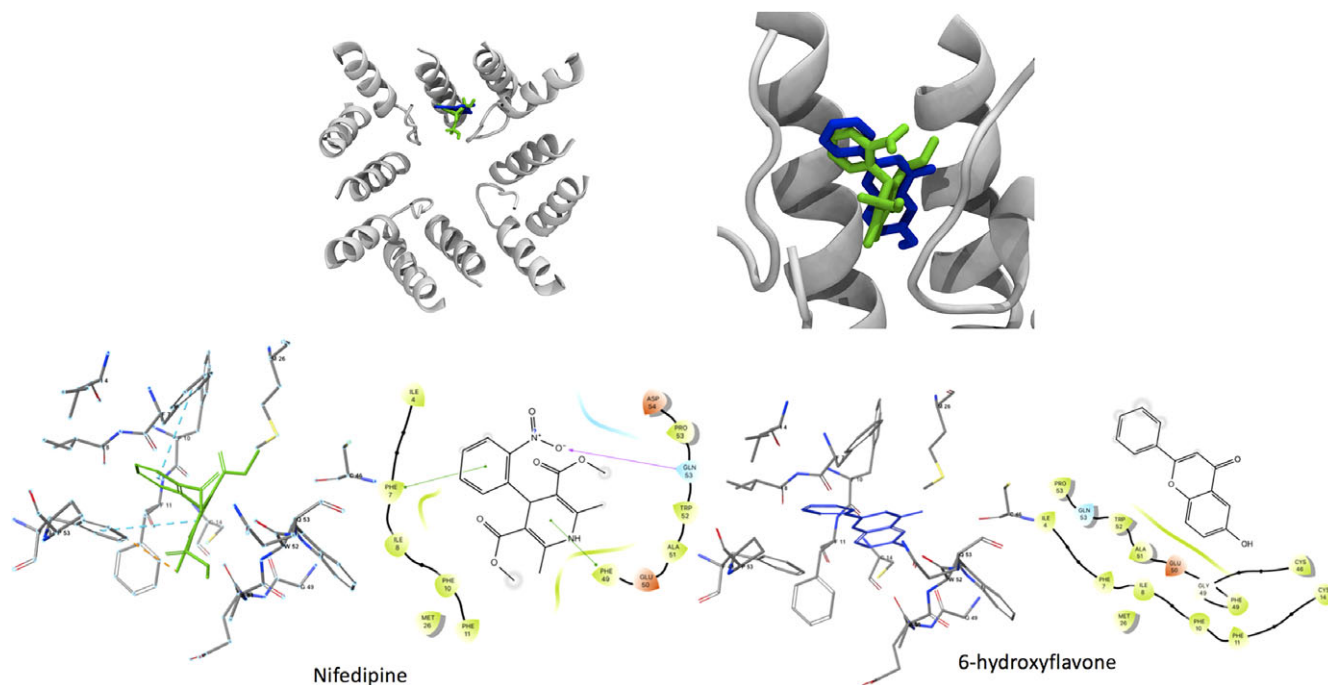
studies have revealed that nitric oxide (NO) exerts a significant bronchodilatory effect on asthmatic subjects (Chen & Ko, 2017; Hamad, Clayton, Islam, & Knox, 2003). Soluble guanylyl cyclase (sGC) is the main mammalian receptor for the gaseous signaling molecule NO, that is, the binding of NO to sGC increases the production of cGMP by several hundred-fold. cGMP is an important second-messenger molecule in cells and binds to protein kinase G, ion channels, and phosphodiesterases. This regulation by cGMP leads to various physiological responses, including vasodilation, bronchodilation, photosensitivity, and cell growth and differentiation (Vijayaraghavan,

Kramp, Harris, & van den Akker, 2016). However, it is well known that the activation of the  $\beta$ -adrenoceptor coupled to Gs-protein, by its  $\beta$ -agonists, involves the production of cAMP through the activation of adenylate cyclase, which induces bronchodilation and anti-inflammatory actions on airways through the activation of PKA (Barnes, 1995; Hamad et al., 2003). However, the effect of 6-HOF in the presence of isoproterenol was not modified (Figure 3b), which allowed us to discard  $\beta$ -adrenoceptor agonism and a possible involvement of cAMP production in the relaxant effect of the flavonoid.



**FIGURE 4** (Upper figures, left) Human endothelial nitric oxide synthase shown in cartoon representation with heme groups (red), 3-bromo-7-nitroindazole (green), and 6-hydroxyflavone (6-HOF) (blue). (Right) Closer look at the binding site used in this work (images made employing Visual Molecular Dynamics). (Lower figures) Tri- and bidimensional interactions map for 3-bromo-7-nitroindazole (left) and 6-HOF (right) (images generated with Maestro by Schrödinger, 2018)





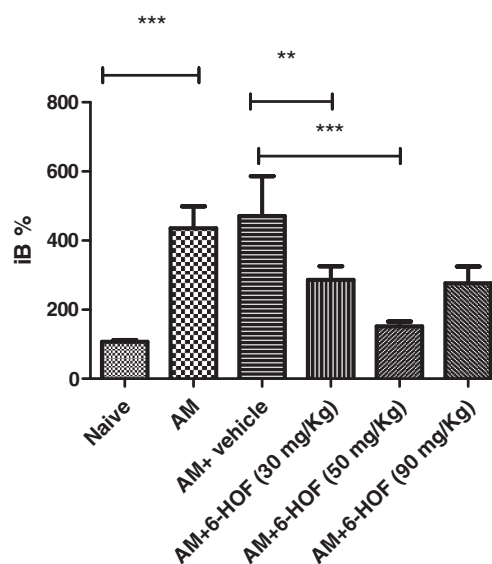
**FIGURE 5** (Upper figures, left) L-type human calcium channel model shown in cartoon representation with Nifedipine (green) and 6-hydroxyflavone (**6-HOF**) (blue). (Right) Closer look at the binding site used in this work (images made employing Visual Molecular Dynamics). (Lower figures) Tri- and bidimensional interactions maps for Nifedipine (left) and **6-HOF** (right) (images generated with Maestro by Schrödinger, 2018)

Because the relaxant effect of **6-HOF** is related with a calcium channel blockade and was greatly reduced by L-NAME (an established NOS inhibitor), we decided to investigate the *in silico* putative interaction of the flavonoid with an L-type calcium channel and NOS. **6-HOF** docking results against NOS and L-type calcium channels showed that, in both cases, it may bind with lower binding affinity than the ligands used as reference. For NOS, **6-HOF** had a binding affinity energy of  $-8.9 \pm 0.0$  kcal/mol versus  $-7.36 \pm 0.05$  kcal/mol for 3-bromo-7-nitroindazole ( $2.66 \pm 0.49$  Å against crystallographic pose). NOS docking with **6-HOF** revealed that it binds in nearly in the same position as 3-bromo-7-nitroindazole utilizing similar interactions. The lower binding-affinity energy of **6-HOF** might be attributable to better stacking interaction with TRP447 and to a large van der Waals-interaction surface when compared to 3-bromo-7-nitroindazole, as noted in the interaction map (Figure 4). 3-Bromo-7-nitroindazole and **6-HOF** interacted with nearly the same residues. However, **6-HOF** underwent interactions with five additional residues (VAL449, PRO450, PRO451, GLU361, and MET355), which 3-bromo-7-nitroindazole cannot reach because of its shorter molecular size. Calcium channel results demonstrated that **6-HOF** binding-affinity energy was  $-7.78 \pm 0.0$  kcal/mol versus  $-5.75 \pm 0.31$  kcal/mol for Nifedipine. Thus, **6-HOF** possesses a better affinity for the L-type calcium channel; as it can be seen in Figure 5 (upper right), both ligands (Nifedipine and **6-HOF**) fit at the same binding pocket with the same interactions. However, **6-HOF**, because of its lack of substituents, can fit deeper into the binding pocket having more interactions with residues. As with eNOS, **6-HOF** interacted with the same residues as Nifedipine but with three additional residues (CYS14, GLY49, and CYS46), because of its larger size. Taken together, the docking results indicate that **6-HOF** blocked ROC and VOC, that it could interact with

the binding pockets that access the catalytic site, and that this interaction might activate eNOS.

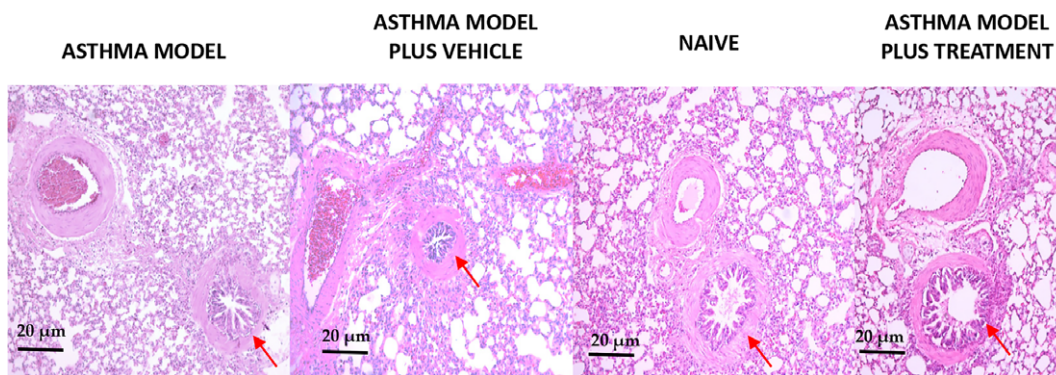
### 3.2 | *In vivo* antiasthmatic effect of **6-HOF** by anti-allergic action

Taking in account previous reports in which the efficacy of flavonoids as experimental antiasthmatic drugs was described (Goszcz et al.,



**FIGURE 6** Anti-allergic effect of 6-hydroxyflavone on aerosolized ovalbumin-induced acute bronchial obstruction in guinea pigs. The results are presented as the mean  $\pm$  the standard error of the mean,  $n = 7$  (\*\* $p < .01$ ; \*\*\* $p < .001$ ). iB = index of bronchial obstruction, AM = asthma model

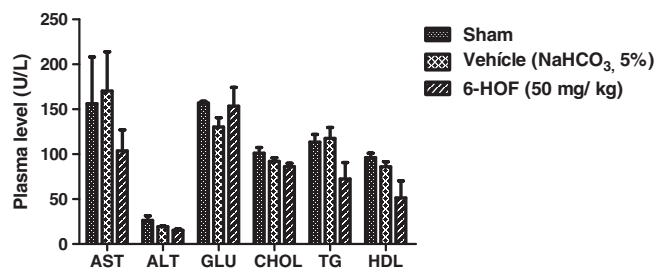
Histology



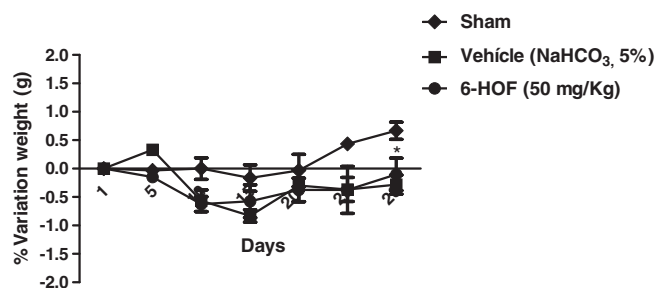
**FIGURE 7** Comparative micrographs of lung sections showing bronchioles of a guinea pig asthma model after treatment with 6-hydroxyflavone or vehicle

**TABLE 1** Dose used, body weight, and animal mortality in the 6-HOF acute toxicity study

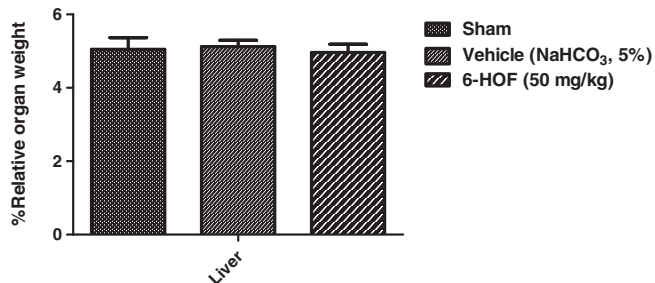
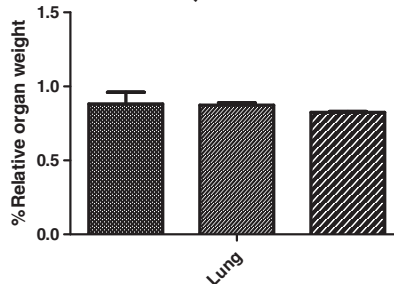
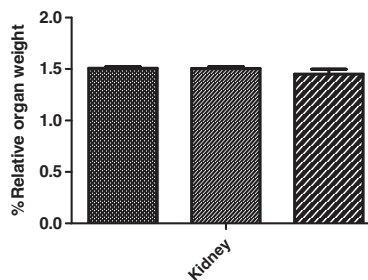
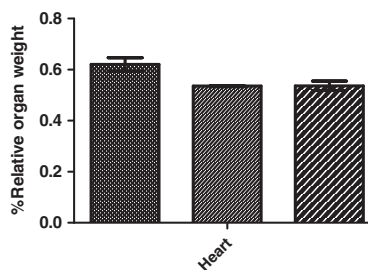
Dose (mg/kg)	Animals per group	Change in body weight	Mortality
5	3	No	0/3
50	3	No	0/3
300	3	No	0/3
2,000	3	No	0/3



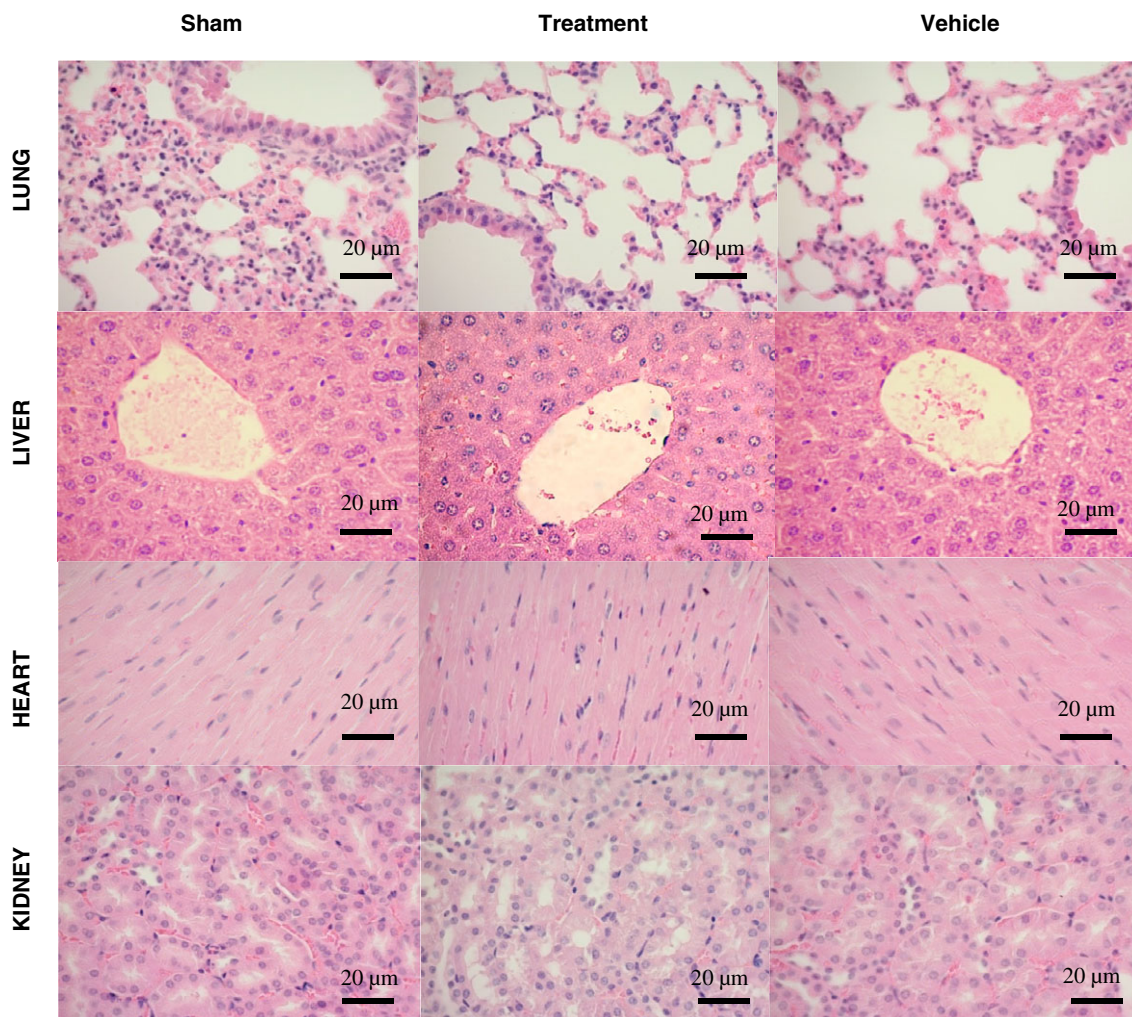
**FIGURE 8** Blood transaminases, glucose, and lipid profiles determined in animals treated daily with 6-hydroxyflavone (50 mg/kg) for 28 days, vehicle, and sham. Each bar represents the mean  $\pm$  the standard error of the mean of at least three animals compared with the sham and vehicle groups ( $*p < .05$ ). AST = aspartate aminotransferase; ALT = alanine aminotransferase; GLU = glucose; CHOL = cholesterol; TG = triglycerides; HDL = high-density lipoprotein



**FIGURE 9** Body weight in animals daily treated and untreated with 6-hydroxyflavone (50 mg/kg) for 28 days. Each bar represents the mean  $\pm$  the standard error of the mean,  $n = 6$  ( $*p < .05$ )



**FIGURE 10** Relative weight of heart, kidney, lung, and liver in animals daily treated and untreated with 6-hydroxyflavone (50 mg/kg) for 28 days. Each bar represents the mean  $\pm$  the standard error of the mean of at least three animals compared with sham

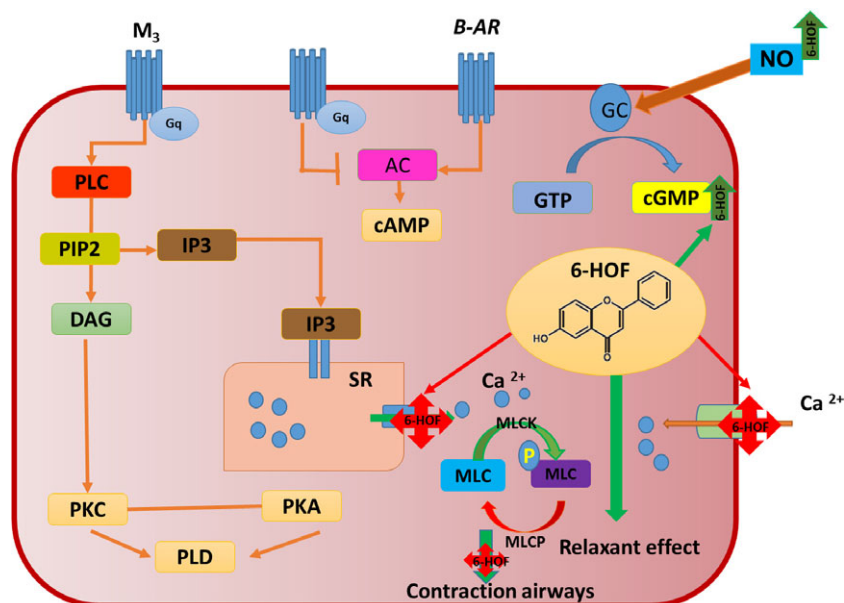


**FIGURE 11** Histology of lung, liver, heart, and kidney from mice treated for 28 days with repeated administration of 6-hydroxyflavone (**6-HOF**) in toxicity-dosage study. Representative micrographs of each group (40×X): treated group with **6-HOF** (50 mg/kg), vehicle (solution of NaHCO<sub>3</sub> 5%), and sham. There are no histological abnormalities among the groups (H&E-stained sections)

2017; Tanaka & Takahashi, 2013; Wang et al., 2018) and the relaxant effect that was exhibited by **6-HOF** (Flores-Flores et al., 2018), we decided to explore the potential antiasthmatic effect of this flavonoid in allergic OVA-induced bronchoconstriction in a guinea pig model. Animals exposed to OVA three times for 15 days (at Days 0, 8, and 15) were treated with **6-HOF** at 30, 50, and 90 mg/kg i.p. 45 min before the last OVA challenge. After that, bronchoconstriction was measured. As observed in Figure 6, **6-HOF** decreased OVA-induced bronchoconstriction in a dose-dependent manner (30 and 50 mg/kg); however, the effect at 90 mg/kg was less efficient than at 50 mg/kg. Histological slides of lungs (H&E) from guinea pigs treated and untreated with **6-HOF** (50 mg/kg) were analyzed (Figure 7). **6-HOF** produced a significant opening of bronchioles compared with that of the naïve and vehicle groups, suggesting very important antiasthmatic action. The decrease of bronchoconstriction induced by the flavonoid could be related with inhibiting the degranulation of the mast cells and/or with lowering IgE, IL-4, IL-5, and IL-13 levels, as reported for other flavonoids (Tanaka & Takahashi, 2013). Further experiments are necessary to determine the immunomodulatory action of **6-HOF**.

### 3.3 | In vivo acute and sub-chronic toxicological studies

For preclinical studies in the development of potential drugs, it is necessary to determine their efficacy and the safety involved in their use. Thus, we decided to evaluate toxicity in experimental animals to establish the safety or potential toxicity of **6-HOF**. Flavonoids currently entertain a high impact on several biological systems, which depends on their chemical structure, because of various substituents such as glycosides, esters, amides, and hydroxyls, among others, which modulate the polarity, toxicity, and the extracellular and/or intracellular actions of these compounds (Flores-Flores et al., 2018; Goszcz et al., 2017; Harborne & Williams, 2000). Thus, OECD Guideline 425 with modifications was utilized to determine the acute toxicity of **6-HOF**. Table 1 reveals that treatment with different doses of the flavonoid (5, 50, 300, and 2,000 mg/kg) did neither cause death in the animals nor a change in their body weight. Also, the animals were observed carefully during the first 4 hr and exhibited neither signs of toxicity such as tremors, seizures, salivation, piloerection, diarrhea, and lethargy nor in behavioral and physical changes (skin, coat, eyes,



**SCHEME 1** Representation of the signal transduction pathways involved in the regulation of airway smooth muscle contraction and the potential interaction of the 6-hydroxyflavone (**6-HOF**)-induced relaxant effect by calcium-channel blockade and enhanced production of nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate. Green arrows represent pathways activated by **6-HOF** and red arrows and crosses show the **6-HOF** blockade of calcium channels, avoiding airway smooth muscle contraction. AC = adenylate cyclase; cAMP = cyclic adenosine monophosphate; SR = sarcoplasmic reticulum; PIP<sub>2</sub> = (4,5)-bis phosphate to generate second messengers; IP<sub>3</sub> = inositol trisphosphate; DAG = diacylglycerol

or mucous membranes). The animals did not show signs of toxicity during the 14 days following administration. The LD<sub>50</sub> of the **6-HOF** was estimated to be greater than 2,000 mg/kg, which allowed classifying it in Category 5 as a nontoxic compound based on OECD Guideline 425, with relatively low acute toxicity, but that, under certain circumstances, it may pose a hazard to vulnerable populations. Compounds classified in this category are less toxic than others.

However, after 28 days of treatment with **6-HOF** (50 mg/kg) by intragastric route, the mice exhibited any significant alterations neither in blood-glucose and lipid profiles nor in liver-marker enzymes (alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase) (Figure 8), indicating that metabolism and liver function was not altered. Moreover, no deaths or symptoms of toxicity were documented during the 28 days of treatment by oral route with **6-HOF**. The animals did not show any changes in general behavioral or in other physiological activities, such as pain sensitivity and locomotion. A similar absence of toxicity was observed regarding food and water consumption; also, no change in body weight in the treated animals was observed (Figure 9). Nevertheless, at the end of the sub-chronic study, sham animals gained weight compared to those treated with the extract or the vehicle, probably because of the handling of these groups during **6-HOF** administration. Finally, there was no change in the relative weight of the organs dissected out (heart, kidney, lung, and liver) after 28 days of daily treatments with the flavonoid (Figure 10).

Moreover, histological analysis revealed that daily administration of **6-HOF** during the sub-chronic period did not cause pathological alterations in heart, kidney, lung, and liver when compared with normal and sham control mice. Histological sections of diverse tissues from treated or control animals did not demonstrate necrosis or inflammation (Figure 11), and the cyto-architecture was well

preserved in all studied tissues. Oral, sub-chronic treatment with 50 mg/kg of the flavonoid during 28 days did not alter blood transaminases, suggesting that the sample test did not produce toxicity. Furthermore, histopathological analysis of the lung, liver, heart, and kidney indicates that all of these were normal that, on their being well intact, correlated with biochemical data. Thus, the results of the present study contributed solid evidence in terms of the safety and pharmacological efficacy of **6-HOF** as a potential antiasthmatic drug and also demonstrated its nontoxic activities at the physiologic and cellular levels (Ávila-Villareal et al., 2016; Cassani et al., 2015; Hernández-Vázquez et al., 2017).

## 4 | CONCLUSION

These experiments suggest that **6-HOF** possesses significant relaxant activity through calcium channel blockade on rat trachea, which interferes with the contraction mechanism of smooth muscle cells in the airways as main mode of action. It appears that NO and cGMP production are involved in the relaxant effect (Scheme 1). Furthermore, based on the pharmacological and safety evidence, we propose this flavonoid as a potential lead for the development of novel therapeutic agents for the treatment of asthma.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by SEP-CONACyT Ciencia Básica (grants 167044 and 256197). The authors are grateful to Hugo Ocampo-Montalbán, Guadalupe Hiriart-Valencia, Ivonne Pacheco-Alba, and Silvia Guerrero-Clorio.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

Idea and design of experiments: S.E.S., B.B.P., and R.V.M. ex vivo functional experiments: A.F.F., S.E.S., and R.V.M. Docking studies: C.M.P. and S.E.S. Antiasthmatic studies: A.F.F., B.B.P., and L.M.F. Toxicological profiles: A.F.F., S.E.S., and R.H.P. Blood biochemical profiles: A.F.F. and S.G.J. Analyzed data: A.F.F., S.E.S., J.C.R.L., and B.B.P. Contributed to the writing of the manuscript: S.E.S. and A.F.F. All authors have provided several corrections for comments on the manuscript and approval of the final version of the manuscript.

## ORCID

Samuel Estrada-Soto  <https://orcid.org/0000-0003-1860-0744>

Sara García-Jiménez  <https://orcid.org/0000-0002-6039-7172>

## REFERENCES

- Alemán-Pantitlán, S., Millán-Pacheco, C., Vázquez, M. A., Hernández-Borja, F., Villalobos-Molina, R., Bazán-Perkins, B., & Estrada-Soto, S. (2016). Mechanism of relaxant action of ethyl 6-amino-5-cyano-2-methyl-4-(pyridin-4-yl)-4H-pyran-3-carboxylate mainly through calcium channel blockade in isolated rat trachea. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences*, 6, 29–36.
- Ávila-Villareal, G., González-Trujano, M. E., Carballo-Villalobos, A. I., Aguilar-Guadarrama, B., García-Jiménez, S., Giles-Rivas, D., ... Estrada-Soto, S. (2016). Anxiolytic-like effects and toxicological studies of *Brickellia cavanillesii* (Cass.) A. Gray in experimental mice models. *Journal of Ethnopharmacology*, 192, 90–98.
- Barnes, P. J. (1995). Cyclic nucleotides and phosphodiesterases and airway function. *The European Respiratory Journal*, 8, 457–462.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., ... Bourne, P. E. (2000). The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, 28, 235–242.
- Cassani, J., Ferreyra-Cruz, O. A., Dorantes-Barrón, A. M., Villaseñor, R. M., Arrieta-Báez, D., & Estrada-Reyes, R. (2015). Antidepressant-like and toxicological effects of a standardized aqueous extract of *Chrysactinia mexicana* A. Gray (Asteraceae) in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 171, 295–306.
- ChemAxon. (2018). MarvinSketch. Retrieved from <https://chemaxon.com/products/marvin>.
- Chen, J., & Sanderson, M. J. (2017). Store-operated calcium entry is required for sustained contraction and  $Ca^{2+}$  oscillations of airway smooth muscle. *The Journal of Physiology*, 595, 3203–3218.
- Chen, J. L., & Ko, W. C. (2017). Relaxation of isolated guinea-pig trachea by apigenin, a constituent of celery, via inhibition of phosphodiesterase. *European Journal of Pharmacology*, 811, 129–133.
- Estrada-Soto, S., Sánchez-Recillas, A., Navarrete-Vázquez, G., Castillo-España, P., Villalobos-Molina, R., & Ibarra-Barajas, M. (2012). Relaxant effects of *Artemisia ludoviciana* on isolated rat smooth muscle tissues. *Journal of Ethnopharmacology*, 139, 513–518.
- Flores-Flores, F., Hidalgo-Figueroa, S., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., Bazán-Perkins, B., Navarrete-Vázquez, G., & Estrada-Soto, S. (2018). Relaxant effect of structurally related flavonoids on isolated tracheal rat rings: A SAR study. *Medicinal Chemistry Research*, 27, 122–127.
- Ghayur, M. N., Gilani, A. H., Khan, A., Amor, E. C., & Choudhary, M. I. (2006). Presence of calcium antagonist activity explains the use of *Syzygium samarangense*. *Phytotherapy Research*, 52, 49–52.
- Global Initiative for Asthma. (2017). Global Strategy for Asthma Management and Prevention. 1-156. Retrieved from <https://www.ginasthma.com>.
- Godfraind, T. (2017). Discovery and development of calcium channel blockers. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 286.
- Goszcz, K., Duthie, G. G., Stewart, D., Leslie, S. J., & Megson, I. L. (2017). Bioactive polyphenols and cardiovascular disease: Chemical antagonists, pharmacological agents or xenobiotics that drive an adaptive response? *British Journal of Pharmacology*, 174(11), 1209–1225.
- Hamad, A. H., Clayton, A., Islam, B., & Knox, A. J. (2003). Guanylyl cyclases, nitric oxide, natriuretic peptides, and airway smooth muscle function. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology*, 285, L973–L983.
- Harborne, J. B., & Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 55, 481–504.
- Havsteen, B. H. (2002). The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology & Therapeutics*, 96, 62–202.
- Hernández-Vázquez, E., Ocampo-Montalban, H., Cerón-Romero, L., Cruz, M., Gomez-Zamudio, J., Hiriart-Valencia, G., ... Estrada-Soto, S. (2017). Antidiabetic, antidiyslipidemic and toxicity profile of ENV-2: A potent pyrazole derivative against diabetes and related diseases. *European Journal of Pharmacology*, 803, 159–166.
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD—Visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 14, 33–38.
- Jo, W. R., & Park, H. J. (2017). Antiallergic effect of fisetin on IgE-mediated mast cell activation *in vitro* and on passive cutaneous anaphylaxis (PCA). *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 48, 103–111.
- Lipkind, G. M., & Fozzard, H. A. (2003). Molecular modeling of interactions of dihydropyridines and phenylalkylamines with the inner pore of the L-type  $Ca^{2+}$  channel. *Molecular Pharmacology*, 63, 499–511.
- Morel, N., & Godfraind, T. (1987). Prolonged depolarization increases the pharmacological effect of dihydropyridines and their binding affinity for calcium channels of vascular smooth muscle. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 243, 711–715.
- OECD. (2008). *Test No. 425: Acute Oral Toxicity - Up-and-Down-Procedure (UDP)*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, (pp. 1–27). Paris: OECD Publishing.
- Parasuraman, S. (2011). Toxicological screening. *Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics*, 2, 74–79.
- Pfizer, G. (2001). Invited review: Regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *Journal of Applied Physiology*, 91, 497–503.
- Ríos, M. Y., López-Martínez, S., López-Vallejo, F., Medina-Franco, J. L., Villalobos-Molina, R., Ibarra-Barajas, M., ... Estrada-Soto, S. (2012). Vasorelaxant activity of some structurally related triterpenic acids from *Phoradendron reichenbachianum* (Viscaceae) mainly by NO production: *ex vivo* and *in silico* studies. *Fitoterapia*, 83, 1023–1029.
- Sánchez-Recillas, A., Navarrete-Vázquez, G., Millán-Pacheco, C., Aguilar-Guadarrama, B., Ortiz-Andrade, R., & Estrada-Soto, S. (2014). Relaxant effect of 7-ethoxy-4-methyl-2H-chromen-2-one by calcium channel blockade: Computational and *ex vivo* studies. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences*, 4, 46–51.
- Schrödinger. (2018). *Schrödinger release 2018-2: Maestro*. New York, NY: Schrödinger, LLC.
- Schrödinger L. (2010). *The PyMOL Molecular Graphics System Version 2.0*. Retrieved from <https://pymol.org/2/support.html>.
- Seeliger, D., & de Groot, B. L. (2010). Ligand docking and binding site analysis with PyMOL and Autodock/Vina. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 24, 417–422.
- Tanaka, T., & Takahashi, R. (2013). Flavonoids and asthma. *Nutrients*, 5, 2128–2143.
- Torres-Piedra, M. P., Figueroa, M., Hernández-Abreu, O., Ibarra-Barajas, M., Navarrete-Vázquez, G. V., & Estrada-Soto, S. (2011). Vasorelaxant effect of flavonoids through calmodulin inhibition: *ex vivo*, *in vitro*, and *in silico* approaches. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19, 542–546.
- Trott, O., & Olson, A. J. (2010). AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *Journal of Computational Chemistry*, 31, 455–461.
- Vijayaraghavan, J., Kramp, K., Harris, M. E., & van den Akker, F. (2016). Inhibition of soluble guanylyl cyclase by small molecules targeting the catalytic domain. *FEBS Letters*, 590, 3669–3680.
- Wang, T. Y., Li, Q., & Bi, K. S. (2018). Bioactive flavonoids in medicinal plants: Structure, activity and biological fate. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 13, 12–23.
- Wen, L., Jiang, Y., Yang, J., Zhao, Y., Tian, M., & Yang, B. (2017). Structure, bioactivity, and synthesis of methylated flavonoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1398, 20–129.

- Yagi, Y., Kuwahara, M., & Tsubone, H. (2002).  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel blockers induce PKC modulated oscillatory contractions in guinea pig trachea. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 131, 511–519.
- Zeinali, M., Rezaee, S. A., & Hosseinzadeh, H. (2017). An overview on immunoregulatory and anti-inflammatory properties of chrysin and flavonoids substances. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 92, 998–1009.

**How to cite this article:** Flores-Flores A, Estrada-Soto S, Millán-Pacheco C, et al. Functional mechanism of tracheal relaxation, antiasthmatic, and toxicological studies of 6-hydroxyflavone. *Drug Dev Res.* 2018;1–12. <https://doi.org/10.1002/ddr.21484>