



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

## FACULTAD DE FARMACIA

“Estudio del mecanismo de acción funcional  
del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona y  
su efecto antihipertensivo”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**LICENCIADA EN FARMACIA**

PRESENTA

**DHAMAR DOLORES DUARTE CERVANTES**

Co-directores:

Dr. Samuel Enoch Estrada Soto

Dr. Cesar Millán Pacheco

Asesor técnico: M. en F. Luis Arias Durán

Cuernavaca Morelos 2021

**“ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN FUNCIONAL DEL FLAVONOIDE 2-FENIL-1-BENZOPIRAN-4-ONA Y SU EFECTO ANTIHIPERTENSIVO”**



FACULTAD DE FARMACIA  
SECRETARÍA DE DOCENCIA  
JEFATURA DE LA LICENCIATURA

Fecha: 28 de julio de 2021  
Asunto: VOTOS APROBATORIOS  
Medio de Notificación: Electrónica  
Folio: FF/D/SD/JLF/0085/2021

**DRA. DULCE MARIA ARIAS ATAIDE  
DIRECTORA DE SERVICIOS ESCOLARES  
U.A.E.M  
PRESENTE**

Los suscritos catedráticos de la Facultad de Farmacia, dependiente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, se dirigen a Usted con el fin de comunicarle que, después de haber revisado el trabajo de tesis **“Estudio del mecanismo de acción funcional del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona y su efecto antihipertensivo”** presentada por la pasante de la carrera de Licenciado en Farmacia, **C. Dhamar Dolores Duarte Cervantes, (20151002424)**, consideramos que reúne todos los requisitos que exige un trabajo de esta especie, por lo que hacemos saber nuestro **VOTO APROBATORIO**.

Jurado	Firma
Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez	_____
Dr. Jaime Escalante García	_____
Dr. Jorge Armando Moreno Escobar	_____
Dr. Germán Bernal Fernández	_____
Dra. Laura Patricia Álvarez Berber	_____



**ATENTAMENTE  
“POR UNA HUMANIDAD CULTA”**

**M.P.D. Reyna América Serrano López  
Secretaría de Docencia**

Cp. Archivo  
Cp. Bdm

Av. Universidad 1001 Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México.  
C.P. 62210 Tel. 777 329 7000 Ext. 3365



# “ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN FUNCIONAL DEL FLAVONOIDE 2-FENIL-1-BENZOPIRAN-4-ONA Y SU EFECTO ANTIHIPERTENSIVO”



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

## Sello electrónico

REYNA AMERICA SERRANO LOPEZ | Fecha:2021-07-29 14:12:19 | Firmante  
upsYydx1zuzmWwtoBjKosvFBIi6vkF+uGpNgydXwLXwtHkdZwwbBejFbjHeaMRH6i041sO1fSrNn6UtQRMG0XqwWcO/OsPi9D5ZwZd3XE1RpfAMi4yWJVrfvEd0Kj9nlQn0pYpb  
W5STNhtb9os3LheUjmqjWmopWrmuSyM9tZLYpw3aKybtVpVWFKc57F80WXfkJteP99CFMxCLLPAXPCNVFqzsN6o8nMC2esQuuAKxt93ajXoc6TLwxtfqgsKie9zN3biR3CCQXH  
BjGxyslJ5qYvnnVqR4r6u2LAU6UWWC0zk4+Z9CsKi/qgs2VdJ8OYLXDirMLjrc1Ys4QvoHg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



985b06

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/kZpD62AcBcthb2P2hFJGrX1ADLgdA25>

UA  
EM

Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



# “ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN FUNCIONAL DEL FLAVONOIDE 2-FENIL-1-BENZOPIRAN-4-ONA Y SU EFECTO ANTIHIPERTENSIVO”



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

## Sello electrónico

**JAIME ESCALANTE GARCIA | Fecha: 2021-08-06 15:58:54 | Firmante**  
IXypaTdB6W+11lyCTw3mr0/9D3qrAZJpOosXDTxJ4wm1CC2T4eMu+S8QNsHfb927JEWEMGTS5SR86Zc7mo4sXEQOP6Wd4G1dnz6E8bY0YExbkgpRffgGOGO+vAHI98/k4S38SHnUgOnagr81OmBX9RXkp90le9ZupK4v5psn+XO/USnkDWK5ta5yMWD3B8HdNMQOg6FGntMyhDI+L2N3k6EDWLaXUA9myfuHIN8ckFLLAKTrH39z5XgEulJ7r7uleo+u7qFlj1X+ZFEVhktJijjLCP1ZeL7ul4ja4Uc5Dod8pelUmsQt+NaRIGee9yZQY0aQcsnemA==

**LAURA PATRICIA ALVAREZ BERBER | Fecha: 2021-08-06 16:05:27 | Firmante**  
IGuMYUg215U855Zui1ld9+rUOSJCEVM99XC4emxL688F9sXLGeyoxmGhHiwnk7HcJIRgHon1QHHzwqykBqvgF3341RvWJ8b9hIKzDob3B0B00celFbjX85yLURqCj5Dda11apz8pJqhUfP81JB4rAJcql8z+S3rP56+grV4MzHbsojLlA32FWOTBIAFbqS7cP+5VdIijyKd6hHbjFBILeZCPMeZ7yBBJyZMVZXRQqIVQEWSGjQPY63loLGFx4pWdWgmUyoF0BgZc/G3R9US/reUPNLLw9xPGim3JXA2IXR6dhHRbY46n8Eo84uFhhAlIKHpB/hg==

**JUAN GABRIEL NAVARRETE VAZQUEZ | Fecha: 2021-08-06 17:05:06 | Firmante**  
GnJqT7HXs+OS4MkKcpPN9RmUqZAqvOOlcqh3U+dLswMwp6N2GLOu/lblyhGFo95gTA2ND6SN/hwUmzHQpIKhEY9G0mwkAQ1TIFcshS5/QmnCxoCVDNzm/ONfzGd5B0pS+jkU/3jrR9q8XPpgOYQzqifCLIGHH+c+hvuZQQD+XgiddHcNB6PATY/JVrbvcCEJBC+Ump/YfCQ7EEmpeivO2WhMOABd4dbYpXigX2kqUJHwhTWuoBzL9vNIPXCjOSE9EVPqvg9nsCyDq1V2SIOsorZO6x61GFpk7+aacv1ZOQL5C32QPIK9YNxkekUFISY9kJO4KqH==

**GERMAN BERNAL FERNANDEZ | Fecha: 2021-08-10 12:28:48 | Firmante**  
EYy0W5WhxlDibPWWvmUYVN4xDw7+Xep+YXpUIROB+M7vLYxPbN1ANwT6WbPew66zoBqkRC+gjd/A5R1+al5+3tWM4to7mcV3KPq0Xfr5LmOVIIKjGdfob5PySI PyXtsBwCnHvnx2sPsfK4nyJdaE4uFrf/F9MPxbOrFe6MyfyQhtxgTDLacJPB7rZUSWmQMkgDuPRtI+FqEq7kAMf3tuVAsCIBwiy9hbiHxpE6ZyyYZqtNXgF5vUudL05gxbtINCPwZDtwercbY61YutfrukQ7n14NfPT7p3G47vmtQYSnAwWYDMvJE5gkMcBT7U8BM0Pn+SIDBg==

**JORGE ARMANDO MORENO ESCOBAR | Fecha: 2021-08-12 01:21:22 | Firmante**  
V/XES62YhLU/bv0Vw7CdTdN8yfo690/kSrbVzaQXFTFJJFII0kX+y55gMJTnkV0VDYTxURUKmSjYwG0EF18j71jxeY0fFq7NITzYgVdXPQ33OX+SM18X26VCA2m7D1b8C WPkPSXvirRw6yw6UxIUZj9qpY5d68DPFUIQO6gWdOr2ARwRE7b6iRCwEHEgC+2ecrJaSXJ5th0S90Sxu4NwO49h3xCISR+4AcOJYghLThuBI5kvrEzFpLJhULdv+omN1laM765wS7Y7RpatOO+VyyXeygBdc8pMaeJKxcQk1gWIH8DSki2u0ibAePAZg3Ht9639qg==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



e0kza1

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/Pa6hCXZomc7gv2iLF6SmGI5Xn8Z3Q5z>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023



“No son las habilidades lo que demuestra lo que somos, son nuestras decisiones” Albus Dumbledore (J.K.Rowling)

“La fuerza de tus convicciones determina tu éxito, no el número de tus seguidores” Remus Lupin (J.K. Rowling)

“Trabaja hasta que tus ídolos se conviertan en tus rivales.” Kwon Ji Yong



*Facultad de Farmacia*

*Conocimiento al servicio de la salud*

# **AGRADECIMIENTOS**

A la facultad de farmacia por la facilidad de usar sus instalaciones durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Samuel Enoch Estada Soto por dirigir este proyecto de investigación, por compartirme su atención, tiempo, conocimientos, su infinita paciencia, confianza y dedicación que me ayudaron a culminar este proyecto.

Al Dr. César Millán Pacheco, por su conocimiento, consejos, paciencia, dedicación, regaños y amistad para el desarrollo de este proyecto.

Al M. en F. Luis Arias Durán por compartir sus conocimientos, orientaciones, asesoría técnica y paciencia que me ayudaron a realizar este proyecto.

Al M. en F. Emmanuel Gaona Tovar por su enseñanza académica, paciencia, apoyo, amistad, asesoría técnica y dedicación en el desarrollo de los diferentes ensayos farmacológicos utilizados en este proyecto.

A los miembros del jurado asignado Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez, Dr. Jaime Escalante García, Dr. Jorge Armando Moreno Escobar, Dr. Germán Bernal Fernández, Dra. Laura Patricia Álvarez Berber por sus aportaciones, comentarios, cuestionamientos y mejoras que me ayudaron a obtener la mejor versión del presente documento.





# DEDICATORIAS

A Dios, por nunca dejarme sola y poner delante de mí cada una de las oportunidades de aprendizaje y personas indicadas para mi enriquecimiento en esta vida.

A mis padres, Luis y Edith que jamás encontraré la forma de agradecer el cariño, paciencia y apoyo sin escatimar esfuerzo alguno, ayudándome a cumplir una meta más. Gracias por estar en las derrotas, tristezas, alegrías y éxitos. Son lo más valiosos que tengo. Los amo.

A mis hermanas Karla y Dara que siempre han sido un sistema de apoyo vital para mí. Gracias por las risas, travesuras, complicidad, gritos y enojos que tenemos día a día que me hacen sentir parte de ustedes, si yo puedo, ustedes lo harán mejor. Las amo enanas.

A mis abuelos, Tete, Pablo y Güte que, con su cariño, me han hecho ser muy feliz. Gracias por estar siempre al pendiente de mí y acompañarme en mis pasos, espero llegar a su edad y tener la sabiduría que ustedes tienen. Los amo.

A la familia Duarte Garnica (José, Reynaldo, Carlos y Leonor) por aportar de alguna u otra manera para que yo pudiera continuar aprendiendo, mejores patrocinadores no pude encontrar, he saldado mi deuda.

A mi compañero de vida, José Pablo, por nunca soltarme y alentarme a seguir, por ser el mejor equipo que puedo tener para conseguir lo que me propongo. Gracias por tomar mi mano desde ese 14/11/14 y darme tu amor, tus consejos y consuelo durante todo este tiempo, no habría podido sin ti flaco. 사랑해 여보 to the moon and back.

A mi mejor amiga, Zezu, que siempre está para mí a pesar de los caminos que hemos elegido. Gracias por todo tu amor y tu lealtad, jamás encontraré alguien como tú. Te amo Chugul-le.

A mi Team TecLab, que muchas veces han sido un respiro en esta marea, 2011410 hermanos.

Al Dr. Samuel Enoch Estada Soto, por la orientación, la ayuda que me brindó para la realización de esta tesis, por su apoyo, tiempo y sobre todo la paciencia y compromiso hacia conmigo. Gracias por permitirme trabajar bajo su tutela en un marco de confianza y libertad. De usted me llevo invaluable lecciones de vida para ser mejor persona.

Al Dr. Cesar Millán Pacheco por su guía y ayuda, no solo en la realización de esta tesis, sino desde el inicio de la carrera, por su apoyo, tiempo, paciencia y la amistad brindada. Gracias por permitirme trabajar con usted y enseñarme con su ejemplo a ser una persona bondadosa.

A todo el personal de la facultad de farmacia que de alguna forma son parte de mi formación académica y crecimiento personal.



“ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN FUNCIONAL DEL FLAVONOIDE 2-FENIL-1-BENZOPIRAN-4-ONA Y SU EFECTO ANTIHIPERTENSIVO”

---

	Abreviaturas	IX
	Lista de figuras	XI
	Lista de gráficas	XIII
	Lista de tablas	XIV
	Resumen	1
1	Introducción	5
2	Antecedentes	7
2.1	Sistema vascular y vasos sanguíneos	8
2.1.1	Músculo liso (ML)	10
2.1.2	Regulación del ML	12
2.1.2.1	Canales de calcio (Ca <sup>2+</sup> )	13
2.1.2.2	Contracción del músculo liso vascular (CMLV)	13
2.1.2.3	Relajación del músculo liso vascular (MLV)	14
2.1.3	Presión arterial (PA)	15
2.1.3.1	Pulso arterial	16
2.1.3.2	Determinación de la presión arterial no invasiva	17
2.1.3.3	Mecanismo de la presión arterial	17
2.2	Endotelio vascular (EV)	19
2.2.1	Disfunción endotelial	21
2.2.2	Óxido nítrico (NO)	22
2.3	Presión arterial sistémica	24
2.3.1	Clasificación de la hipertensión arterial	25
2.3.2	Epidemiología	25
2.3.3	Terapéutica de la hipertensión arterial	26
2.4	Flavonoides	30
2.4.1	Localización y distribución	30
2.4.2	Síntesis y estructura de los flavonoides	30
2.4.3	Clasificación	32
2.4.4	Antecedentes farmacológicos de los flavonoides	33
2.4.5	2-Fenil-1-benzopiran-4-ona	35
3	Justificación	36
4	Hipótesis	38
5	Objetivo general	40
5.1	Objetivos específicos	41
6	Metodología	43
6.1	Evaluaciones farmacológicas	43
6.1.1	Animales	43
6.1.2	Reactivos	43
6.1.3	Obtención de la aorta de la rata	43
6.1.4	Sistema de determinación del efecto vasorrelajante, registro de datos	44
6.1.5	Evaluación del efecto vasorrelajante	45
6.1.5.1	Determinación del mecanismo de acción del compuesto flavona dependiente de endotelio	46
6.1.5.2	Determinación del mecanismo de acción vasorrelajante	47



“ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN FUNCIONAL DEL FLAVONOIDE 2-FENIL-1-BENZOPIRAN-4-ONA Y SU EFECTO ANTIHIPERTENSIVO”

---

	independiente de la presencia de endotelio	
6.1.5.2.1	Influencia de la actividad vasorrelajante del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona sobre el efecto contráctil de NA en anillos de aorta de rata sin endotelio	47
6.1.5.2.2	Evaluación del efecto del flavonoide sobre la contracción inducida con CaCl <sub>2</sub> 80 Mm	48
6.1.5.2.3	Contracciones acumulativas con CaCl <sub>2</sub>	48
6.2	Análisis estadístico	49
6.3	Determinación del efecto antihipertensivo del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en ratas espontáneamente hipertensas (SHR)	49
6.3.1	Animales	49
6.3.2	Evaluación del efecto antihipertensivo del 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en un modelo agudo no invasivo	50
6.4	Análisis <i>in silico</i>	50
6.4.1	Acoplamiento molecular	50
6.4.1.1	Validación	51
7	Resultados y discusión	53
7.1	Determinación del efecto vasorrelajante del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona	54
7.2	Determinación del mecanismo de acción funcional del compuesto	55
7.2.1	Determinación del mecanismo de acción vasorrelajante independiente de la presencia de endotelio	59
7.2.1.1	Influencia de la actividad vasorrelajante del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona sobre el efecto contráctil de NA en anillos de aorta de rata sin endotelio	60
7.2.1.2	Efecto del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona sobre la concentración inducida con KCl 80 mM	61
7.2.1.3	Efecto del flavonoide sobre las concentraciones acumulativas con CaCl <sub>2</sub>	63
7.3	Determinación del efecto antihipertensivo del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en ratas espontáneamente hipertensas (SHR)	64
7.4	Acoplamiento molecular	69
8	Conclusiones	77
9	Perspectivas	79
10	Referencias	

## ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
AC	Adenilciclasa
ACh	Acetilcolina
Ang	Angiotensina II
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
ATP	Adenosín trifosfato
BRs	Barorreceptores
[Ca <sup>2+</sup> ]	Concentración ion calcio
CaM	Calmodulina
CCR	Curvas Concentración-Respuesta
CE	Células endoteliales
CE <sub>50</sub>	Concentración efectiva media
CMLV	Contracción del músculo liso vascular
COX-2	Ciclooxigenasa
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado de endotelio
EDRF	Factor de relajación derivado del endotelio
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético,
E <sub>max</sub>	Efecto máximo
ENSANUT	Encuesta Nacional de Salud y Nutrición
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EV	Endotelio vascular
FC	Frecuencia cardíaca
GCs	Guanilato ciclasa soluble
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GTP	Guanosín trifosfato
HAS	Hipertensión arterial sistémica
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP <sub>3</sub>	Inositol trifosfato
L-NAME	Nitro-arginina-metil-éster
mL	Mililitros
ML	Musculo liso
MLC	Cadena ligera de miosina
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de miosina
mM	Milimolar
mmHg	Milímetros de mercurio
mV	Milivoltios



“ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN FUNCIONAL DEL FLAVONOIDE 2-FENIL-1-BENZOPIRAN-4-ONA Y SU EFECTO ANTIHIPERTENSIVO”

---

NA	Noradrenalina
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
NOs	Óxido nítrico sintasa
OMS	Organización mundial de la salud
O <sub>2</sub> /CO <sub>2</sub>	Gas carbógeno
PA	Presión arterial
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
PAD	Presión arterial diastólica
PAS	Presión arterial sistólica
PAM	Presión arterial media
PGL <sub>2</sub>	Prostaciclina
PKG	Proteína quinasa G
RP	Resistencia periférica
RS	Retículo sarcoplásmico
SHR	Ratas espontáneamente hipertensas
TD	Tensión diastólica
TS	Tensión sistólica
VWf	Factor de Von Willebrand
WKY	Wistar Kyoto
μM	Micromolar



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Redes circulatorias	9
Figura 2	Estructura del vaso sanguíneo	10
Figura 3	Tipos de músculo liso	11
Figura 4	Histología de una fibra de músculo liso relajada y contraída.	15
Figura 5	Funciones de las células endoteliales	20
Figura 6	Sustancias liberadas por el endotelio	21
Figura 7	Factores que estimulan la síntesis de NO y su mecanismo de acción	23
Figura 8	Cascada de señalización del NO/GMPc	24
Figura 9	Estructura base de los flavonoides	31
Figura 10	Ruta del ácido shikímico: desaminación de fenilalanina y formación de ácidos cinámico y cumárico, precursores de los flavonoides	31
Figura 11	Biosíntesis de los diferentes flavonoides y taninos.	32
Figura 12	Estructura química de la 2-fenil-1-benzopiran-4-ona	35
Figura 13	Obtención de la aorta de rata	44
Figura 14	Sistema de determinación del efecto vasorrelajante	45
Figura 15	Sistema de detección BIOPAC®	45
Figura 16	Evaluación del efecto vasorrelajante en anillos de aorta de rata contraídos con NA. 0.1 $\mu$ M	46
Figura 17	Determinación del mecanismo de acción del compuesto flavona dependiente de endotelio con los inhibidores L-NAME, ODQ e Indometacina	47
Figura 18	Influencia de la actividad vasorrelajante de las muestras de prueba sobre el efecto contráctil de NA.	48

Figura 19	Determinación del mecanismo de acción del compuesto flavona independiente de la presencia de endotelio. Contracción inducida por calcio extracelular	48
Figura 20	Determinación del mecanismo de acción del compuesto flavona independiente de la presencia de endotelio. Contracciones acumulativas con CaCl <sub>2</sub>	49
Figura 21	Evaluación del efecto antihipertensivo de la 2 fenil-1-benzo-piran-4-ona en un modelo agudo no invasivo	50
Figura 22	Biosíntesis de la prostaciclina (PGL <sub>2</sub> )	57
Figura 23	Vía de señalización de PGI <sub>2</sub> /AMPc	58
Figura 24	LE 5001 medidor de presión arterial incruenta.	65
Figura 25	Proceso de las ondas durante la toma de una medida.	66
Figura 26	Diagrama de interacciones de la 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en el sitio 1 contra 3NOS	70
Figura 27	Diagrama de interacciones de la 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en el sitio 2 contra 3NOS	70
Figura 28	Diagrama de interacciones del L-NAME en el sitio 1 contra 3NOS	71
Figura 29	Diagrama de interacciones del L-NAME en el sitio 2 contra 3NOS	72
Figura 30	Diagrama de interacciones del L-arginina en el sitio 1 contra 3NOS	73
Figura 31	Diagrama de interacciones del L-arginina en el sitio 2 contra 3NOS	74
Figura 32	Diagrama de interacciones bidimensionales de la nifedipina en canales de calcio tipo L humano	75
Figura 33	Diagrama de interacciones bidimensionales de la 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en canales de calcio tipo L humano	75

## LISTA DE GRÁFICAS

- Gráfica 1: Efecto vasorrelajante del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en presencia y ausencia de endotelio. 54
- Gráfica 2: Efecto vasorrelajante del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en presencia de endotelio y preincubado con los inhibidores L-NAME y ODQ. 56
- Gráfica 3: Efecto vasorrelajante del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona preincubado con el inhibidor indometacina. 59
- Gráfica 4: Efecto vasorrelajante del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona sobre el efecto contráctil de NA en anillos de aorta de rata sin endotelio. 61
- Gráfica 5: Efecto del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona con contracción a KCl 80 mM. 62
- Gráfica 6: Efecto vasorrelajante del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona con contracciones acumulativas con CaCl<sub>2</sub>. 64
- Gráfica 7: Determinación del efecto agudo ejercido por el flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona a una dosis de 50 mg/Kg sobre la frecuencia cardíaca en un modelo *in vivo*. 67
- Gráfica 8: Determinación del efecto agudo ejercido por el flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona a una dosis de 50 mg/Kg sobre la presión sistólica en un modelo *in vivo*. 68
- Gráfica 9: Determinación del efecto agudo ejercido por el flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona a una dosis de 50 mg/Kg sobre la presión diastólica en un modelo *in vivo*. 69

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Marcadores de lesión endotelial	22
Tabla 2	Clasificación de la Hipertensión arterial sistémica publicada por la Asociación Americana del Corazón y el Colegio Americano de Cardiología 2017	25
Tabla 3	Clasificación del tratamiento farmacológico empleado en la HAS de acuerdo a su mecanismo de acción.	27
Tabla 4	Clasificación general de los flavonoides	33
Tabla 5	Estructuras de los flavonoides	33



*Facultad de Farmacia*

*Conocimiento al servicio de la salud*

# **RESUMEN**

Las enfermedades crónico-degenerativas han incrementado sustancialmente en los últimos años, siendo de las primeras causas de muerte a nivel mundial. Dentro de estas encontramos a la hipertensión arterial, que según la OMS afecta a millones de personas en el mundo y en México, uno de cada cuatro adultos la padece. La hipertensión es un factor de riesgo para desencadenar otras enfermedades del tipo cerebrovasculares, renales y cardíacas. Una condicionante para desarrollar este padecimiento es el estilo de vida, ya que están estrechamente relacionadas y aunque existe una amplia gama de medicamentos para tratar este padecimiento, estos presentan diversas reacciones adversas, así como la existente polifarmacia que genera una baja adherencia por parte del paciente, que con el uso prolongado de este cuadro terapéutico desarrollará una tolerancia. Para poder abordar de mejor manera el tratamiento, se buscan nuevas alternativas terapéuticas a partir de diversas estrategias, una de ellas es utilizar los conocimientos derivados de la medicina tradicional. Se ha demostrado, de manera general, que los flavonoides presentan diversos efectos farmacológicos, dentro de los cuales podemos encontrar el efecto vasorrelajante del músculo liso vascular. En el presente trabajo, se determinó el mecanismo de acción vasorrelajante del compuesto 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en un modelo *ex vivo* de anillos de aorta aislada de rata con y sin endotelio precontraídos con noradrenalina 0.1  $\mu\text{M}$ . Dicho compuesto indujo un efecto vasorrelajante parcialmente dependiente de la presencia de endotelio y dependiente de la concentración. Debido al potente efecto vasorrelajante reflejado, se estableció el posible mecanismo de acción. La pre-incubación con L-NAME 10  $\mu\text{M}$  y ODQ 10  $\mu\text{M}$  produjo una disminución significativa de la muestra de prueba, sugiriendo que la vasorrelajación en presencia de endotelio, está dada por la producción de NO desencadenando la activación de Guanilato Ciclasa soluble induciendo la producción de GMPc. La pre-incubación con indometacina no mostró una diferencia significativa con respecto a la CCR control, lo que sugiere que no hay relación con la producción de prostaciclina PGI<sub>2</sub>. Al pre-incubar la CE<sub>50</sub> del compuesto con soluciones acumulativas de noradrenalina (NA), se observó una oposición a la contracción significativa con respecto a la curva control sugiriendo un

efecto antagónico no competitivo a un sitio alostérico sobre receptores adrenérgicos. La evaluación con  $\text{CaCl}_2$  mostró una reducción significativa en el ingreso de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular de manera funcional, lo que indica un bloqueo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ . Los estudios de docking molecular corroboraron los efectos mostrados de la muestra de prueba como un potencial bloqueador del canal de calcio tipo L.





*Facultad de Farmacia*

*Conocimiento al servicio de la salud*

# 1.- INTRODUCCIÓN



## 1.- INTRODUCCIÓN

En la actualidad, las enfermedades crónico-degenerativas constituyen más de la mitad de la carga mundial de morbilidad, teniendo un gran impacto en la esperanza de vida ya que son la primera causa de muerte en la mayoría de los países. La hipertensión arterial sistémica (HAS) es considerada dentro de este grupo de enfermedades que representa un creciente factor de riesgo cardiovascular de primer orden y grave problema de salud pública para el Sistema Nacional de Salud. Se estima que la HAS, según la OMS, afecta a mil millones de personas a nivel mundial, en países como México, 1 de cada 4 adultos sufre hipertensión arterial, esto representa el 25.5 % de la población mexicana adulta, de los cuales el 40% desconoce su padecimiento, siendo esta enfermedad un factor de riesgo para otras condiciones como infarto al miocardio, insuficiencia cardíaca, eventos cerebrovasculares y enfermedad renal. El estilo de vida está estrechamente relacionado dado a un crecimiento de la incidencia por malos hábitos alimenticios relacionado con la alta ingesta calórica y la inactividad física que son factores muy importantes para el desarrollo de este padecimiento **(OMS, 2013; ENSANUT, 2016)**.

El tratamiento para la hipertensión arterial está constituido por eficientes medicamentos como los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, antagonistas de los receptores de angiotensina, beta-bloqueadores, bloqueadores de los canales de calcio y diuréticos tiazídicos **(Aristil, 2010)**. Sin embargo, estos grupos de medicamentos presentan diferentes efectos adversos, además la falta de adherencia al tratamiento por parte del paciente representa un problema significativo en la recuperación de la salud, debido a estas razones se busca recurrir a diferentes alternativas, tal es el caso de la medicina tradicional a la que se le ha acuñado potencial terapéutico para tratar la HAS, mediante ella se busca identificar nuevas estructuras químicas que presenten efectos y/o mecanismos farmacológicos novedosos.

En este sentido, los flavonoides presentan diferentes efectos farmacológicos para tratar enfermedades como infecciones de diferentes etiologías, enfermedades crónico-degenerativas, enfermedades neurológicas, entre otras. Así mismo, se ha reportado el efecto contra enfermedades cardiovasculares y se ha comprobado su efecto antihipertensivo y vasorrelajante (**Hernández-Abreu et al., 2009**). Por tanto, el presente trabajo pretende evaluar el potencial antihipertensivo a nivel preclínico y el mecanismo de acción funcional del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona (Flavona).





## **2.- ANTECEDENTES**

## 2.- ANTECEDENTES

### 2.1 Sistema vascular y vasos sanguíneos

El sistema vascular (**Figura 1**) es un sistema de transporte que consta de una bomba muscular que conocemos como corazón, proporcionando la energía necesaria para mover la sangre en un circuito cerrado de tubos elásticos llamados vasos sanguíneos. Los principales vasos sanguíneos que componen el sistema vascular son arterias, arteriolas, capilares, vénulas y venas. Las arterias tienen la función de conducir la sangre que bombea el corazón hacia los órganos, las arterias denominadas elásticas, abandonan las cavidades del corazón y se dividen en arterias musculares de calibre medio que se distribuirán en el organismo, estas a su vez se dividen para formar arterias de menor calibre llamadas arteriolas que actúan como válvulas controlando la cantidad de sangre que entra a los capilares, cuando las arteriolas entran a un tejido se ramifican en diminutos vasos llamados capilares. Las paredes de los capilares presentan una fina capa de células endoteliales que están rodeadas por una membrana basal en la que se llevará a cabo un intercambio entre la sangre y los tejidos corporales, al conjunto de capilares se le denomina vénulas, al converger en vasos más grandes los llamamos venas, estas estructuras cuentan con la capacidad de contraerse y relajarse, por tanto, se encargarán de transportar la sangre para cerrar el circuito desde los tejidos al corazón (**Tortora et al., 2013**). El lecho que comprende arteriolas, capilares y vénulas se denomina microcirculación (**Duarte, 2004**).

Dentro de las arterias encontramos 2 que son de suma importancia en el sistema vascular que cumplen funciones vitales, estas son la aorta y el tronco pulmonar, la aorta es una estructura de gran calibre que sale del ventrículo izquierdo en el corazón, dando origen a diferentes arterias que van por lo general a miembros superiores, a su vez, esta desciende por la columna vertebral, cavidad torácica y abdomen hasta llegar a los miembros inferiores (**Tortora et al., 2013**).

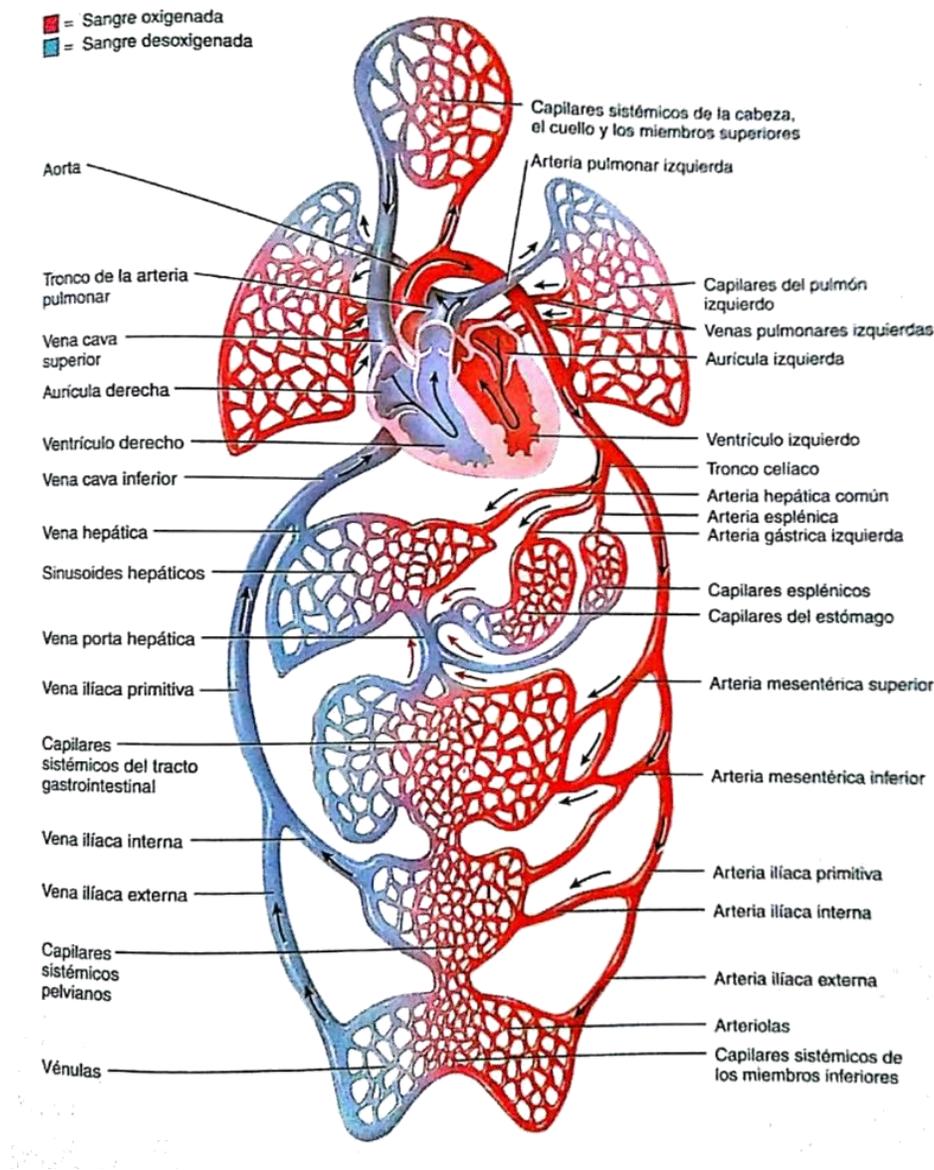


Figura 1. Redes circulatorias (Tortora *et al.*, 2013).

Las venas y arterias poseen una conformación trilaminar (**Figura 2**), en donde la capa más interna es la capa o túnica íntima constituida por una capa de células endoteliales y está en contacto directo con la sangre, la capa intermedia o túnica media está formada por células del músculo liso vascular y contiene una capa de tejido conectivo formando un sistema encargado de efectuar la contracción y relajación vascular, y finalmente la capa o túnica adventicia es la que se encuentra de manera externa, está constituida de tejido conectivo, fibroblastos, mastocitos y

terminaciones nerviosas variadas, debido a las funciones que presenta esta capa nosotros podemos generar una medición de la presión arterial, ya que las paredes de los vasos sanguíneos se expanden cuando se realiza el bombeo de la sangre. **(Tortora et al., 2013)**. Una de las propiedades más importantes que deben presentar las arterias es la elasticidad aórtica esta depende de las fibras elásticas contenidas en la pared del vaso, esta elasticidad se pierde de manera progresiva debido a la edad o bien, por procesos ateroscleróticos, como resultado hay cambios importantes en la rigidez del vaso y en la composición del colágeno y la elastina de su pared **(Duarte, 2004)**.

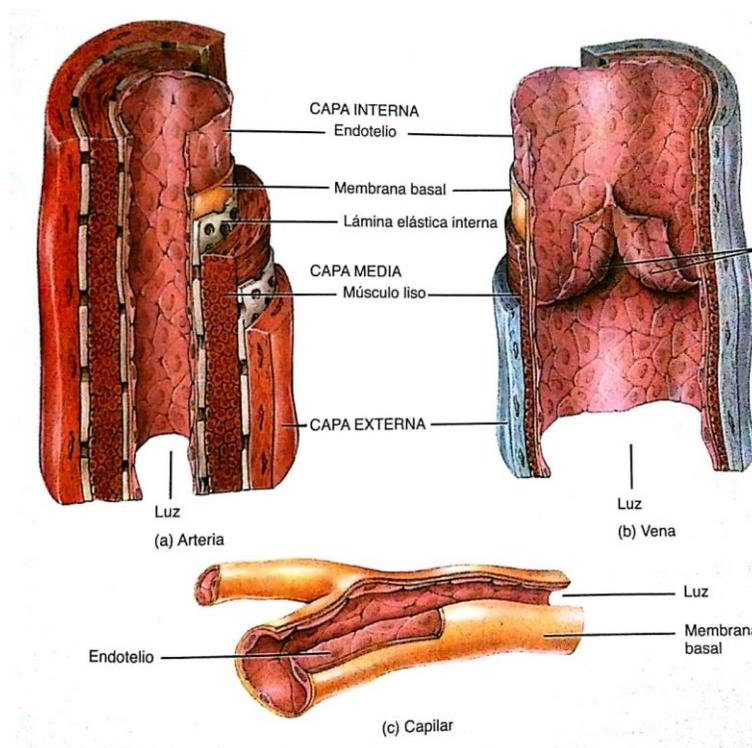


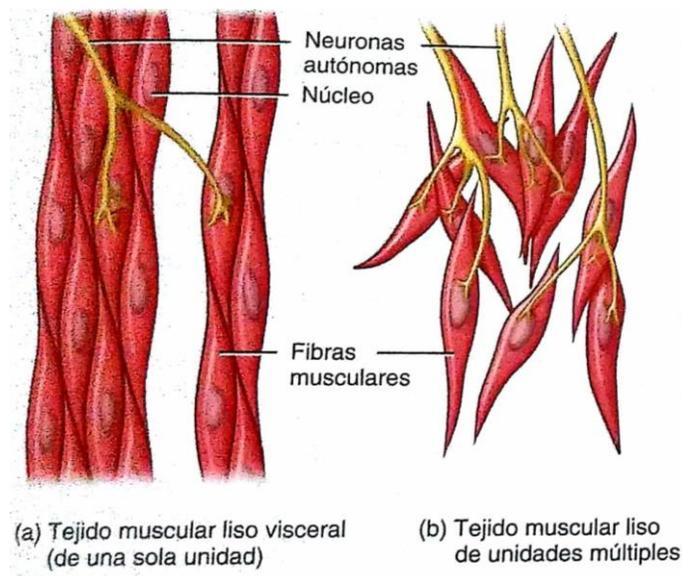
Figura 2. Estructura del vaso sanguíneo (Tortora et al., 2013)

### 2.1.1 Músculo liso (ML)

El músculo liso (**ML**) es constituyente de las paredes de casi todos los órganos huecos del cuerpo, como aquellos que conforman el tracto gastrointestinal (esófago, estómago e intestinos), tracto urinario (uréteres y vejiga) y vasos sanguíneos

exceptuando el corazón. Dependiendo del órgano y función en el cual se encuentre el **ML**, será el papel que este desempeñe y el control de la contracción varían (**Raff et al., 2011; Moore, 1999**).

El **ML** está clasificado en dos tipos: unitario y multiunitario (**Figura 3**). El unitario, también conocido como músculo liso sincitial o visceral son fibras dispuestas en láminas o fascículos, y sus membranas celulares están adheridas entre sí en múltiples puntos, así la fuerza que se genera en una fibra se transmite a la siguiente y todas se contraen como una única unidad. Se encuentra en el tracto digestivo y genitourinario, así como en los vasos sanguíneos que presenten pequeño calibre. El multiunitario está formado por fibras musculares lisas separadas y discretas que actúan independientemente de las demás y su inervación está dada por una única terminación nerviosa en donde la superficie externa está cubierta por una capa que consta de una mezcla de colágeno y glucoproteínas. Al contrario del tejido unitario, este se localiza dentro de la pared de algunos vasos sanguíneos con mayor diámetro. (**Guyton et al., 2011; Tortora et al., 2013**).



**Figura 3: Tipos de músculo liso (Guyton et al., 2011).**

Ambos son involuntarios e inervados por sistema nervioso autónomo de modo que desempeñan funciones dependientes del sistema simpático y parasimpático. En el músculo liso vascular encontramos filamentos contráctiles por la presencia de los polímeros de actina globular y miosina, que confieren la propiedad de contracción, generando una fuerza en el **ML** para la regulación del flujo sanguíneo y la presión **(Raff et al., 2011)**.

### 2.1.2 Regulación del ML

El ML se mantiene en un estado de semicontracción, esto es lo que conocemos como “tono vascular” que está dado por un equilibrio relacionado entre los estímulos relajantes y constrictores que actúan en forma simultánea, pero en proporciones diferentes según sea la situación a la que se exponga, el principal mediador en esta regulación es el sistema simpático **(Duarte, 2004)**. Dentro de los mecanismos podemos encontrar la activación por estimulación mecánica, aferencias nerviosas e influencias hormonales **(Raff et al., 2011; Moore, 1999)**.

Dos de los principales mecanismos involucrados en esta regulación se encuentran el acoplamiento electromecánico (consecuencia de la despolarización de la membrana) y el acoplamiento farmacomecánico (consecuencia de la interacción de agonistas con receptores específicos de la membrana celular). Estos mecanismos no se llevan a cabo de manera independiente, ya que, por el contrario, muchas veces ocurren de manera simultánea. El acoplamiento electromecánico se da cuando el potencial de reposo (-50-60 mV) de la membrana celular sufre una despolarización, es decir, estos valores se vuelven menos negativos ocasionando la apertura de los canales de calcio  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje lo que permite la entrada de este ion al interior de la célula, por consiguiente, las concentraciones intracelulares de  $Ca^{2+}$  incrementan, generando así, vasoconstricción. El acoplamiento farmacomecánico está ampliamente relacionado con una serie de mecanismos de señalización celular que, al contrario del acoplamiento electromecánico, no modifican el potencial de membrana y el aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular se debe principalmente a los iones provenientes del retículo

sarcoplásmico y en menor medida al  $\text{Ca}^{2+}$  que ingresa a la célula por medio de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de la activación por receptor (ROC) (**González-Rodríguez, 2004**).

#### 2.1.2.1 Canales de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ )

Los canales de calcio son proteínas oligoméricas que se caracterizan por tener una subunidad principal ( $\alpha_1$ ) que sirve como poro y sensor cuando hay un cambio de potencial (**Catterall, 1991**), así mismo, cuenta con diversas subunidades reguladoras o auxiliares ( $\beta$ ,  $\alpha_2$ ) y dependiendo del tejido, una quinta subunidad. Existen seis tipos funcionales de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , denominados T, L, N, P, Q y R. Se clasifican dependiendo las características biofísicas y farmacológicas, pero principalmente están clasificadas por el rango de voltaje necesario para su activación, en donde encontramos dos categorías: los de bajo (Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T) y de alto umbral (Canales de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo L, N, P, Q y R) (**Zhang et al., 1993**). Dentro de las funciones fisiológicas, podemos encontrar transmisión de los impulsos nerviosos, contracción muscular y la activación de genes. La activación de los mismos, ocurre cuando hay un cambio en el voltaje a través de la membrana de la célula, esto provocara su apertura permitiendo así que el calcio extracelular fluya hacia el interior de la célula (**Campbell, 2003**).

#### 2.1.2.2 Contracción del músculo liso vascular (CMLV)

La contracción y relajación del músculo liso en los vasos sanguíneos regula el flujo sanguíneo y por consiguiente la presión arterial. El proceso de contracción de las células musculares lisas vasculares se debe principalmente a la activación de las proteínas contráctiles actina y miosina por cambios en el potencial de la membrana inducidos por procesos mecánicos, disparo de potenciales de acción o por activación de canales iónicos dependientes de estiramiento en la membrana plasmática. Para dar inicio a la activación de la miosina es necesario llevar a cabo una fosforilación de su cadena ligera de 20-kDa, esto dará paso a la interacción

entre la miosina y la actina formando puentes cruzados entre sí, esto determinará el proceso de CMVL, cuando este proceso se mantiene a niveles bajos se da lo que conocemos como tono basal del **ML (Guyton et al., 2011; Valle 2006)**.

El proceso de contracción del músculo liso esta mediado por el incremento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y por el cambio en los filamentos gruesos. Existen 2 vías de señalización en la célula, una de estas vías es la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de canales que están regulados por receptores en la membrana y de los canales dependientes de voltaje. En la vía de regulación por receptores, los agonistas como la norepinefrina, angiotensina II o endotelina se unen a los receptores acoplados a proteína G, estimulando la actividad de la fosfolipasa C que se encarga de catalizar fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, para dar paso a la formación de dos potentes segundos mensajeros: inositoltrifosfato ( $\text{IP}_3$ ) y diacilglicerol (DAG), en donde la unión de  $\text{IP}_3$  a los receptores en el retículo sarcoplásmico provoca la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol. Los iones  $\text{Ca}^{2+}$  se unen a la calmodulina (CaM) formando el complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM que se une a la miosina cinasa de cadena ligera y la activa, una de las cadenas ligeras de cada una de las cabezas de miosina o cabeza reguladora se fosforila, la cabeza tiene la capacidad de unirse repetidamente al filamento de actina formando un proceso de tirones intermitentes produciendo la contracción muscular. En la segunda vía dependiente de voltaje, los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L se abren como respuesta a la despolarización de la membrana provocada por estiramiento de la MLV (**Raff, et al., 2011; Guyton et al., 2011**).

### 2.1.2.3 Relajación del músculo liso vascular (MLV)

La relajación del músculo liso vascular se genera cuando hay eliminación del estímulo contráctil o por interferir directamente en la acción de una sustancia que estimula la inhibición del mecanismo contráctil. En el proceso de contracción la elevación en la concentración intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  es transitoria y llegará un punto donde la relajación se hará presente debido a la disminución del  $\text{Ca}^{2+}$  a nivel

intracelular, esto será debido a la disociación de los complejos formados entre la calmodulina y la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK), así mismo, la defosforilación de la cadena ligera de miosina (MLC) en la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina inactivándolo y provocando así la vasodilatación (**Raff, et al., 2011; Guyton et al., 2011**).

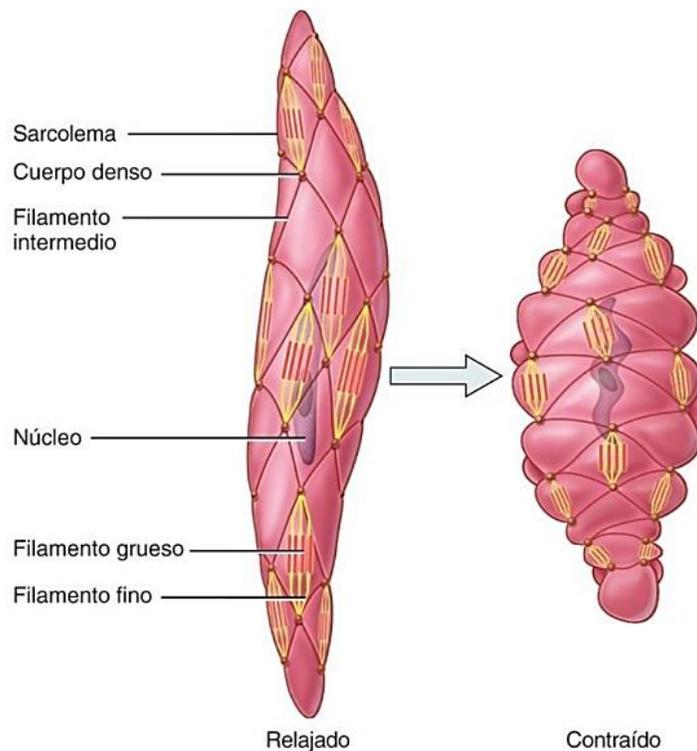


Figura 4: Histología de una fibra de músculo liso relajada y contraída (Guyton et al., 2011).

### 2.1.3 Presión arterial (PA)

La presión arterial (PA) es un parámetro que puede brindarnos información del funcionamiento del sistema vascular. La PA es la fuerza que la sangre ejerce contra las paredes de las arterias, durante cada ciclo cardíaco la presión arterial varía entre un valor máximo y se expresa a través de diferentes técnicas de medición, en donde la tensión sistólica (TS) es la fuerza de expulsión de la sangre del corazón y la rigidez de las grandes arterias (número superior) y la tensión diastólica (TD) es la presión que ejerce la sangre cuando el corazón se relaja (número inferior). La

presión en el interior del árbol arterial es representada por un promedio entre dichos valores, conocidos como presión arterial media (PAM) y su valor puede calcularse por la siguiente fórmula:  $PAM = PAD + \frac{PAS - PAD}{3}$

Cuando esta presión es excesiva, aparece la hipertensión arterial **(De la Serna et al., 2015; Aristil, 2010)**.

La presión arterial sistólica (PAS) es dependiente en su mayoría de la medida del volumen sistólico (VS) y de la elasticidad de la aorta, así mismo, aunque no se ve influido de forma directa, se ha observado que hay una participación de la resistencia periférica (RP). Por lo que se refiere a la presión arterial diastólica (PAD) puede ser medida antes del VS, depende de la RP y de la distensibilidad del sistema arterial **(Goodman et al., 2003)**.

A partir de las mediciones de PAS y PAD podemos determinar una diferencia numérica entre ellas a lo que llamamos presión diferencial. Una presión diferencial baja (menos de 40) puede ser indicativo de un mal funcionamiento del corazón. Una presión diferencial alta (más de 60) puede ser indicativo de fugas en las válvulas del corazón, es decir, insuficiencia valvular, que a menudo es consecuencia de la pérdida de la elasticidad aórtica en donde el endurecimiento puede deberse a depósitos de grasa que dañan las paredes de las arterias y las hacen menos elásticas (ateroesclerosis). Otras afecciones que pueden causar una presión diferencial alta son la deficiencia de hierro (anemia) e hipertiroidismo. Cuanto más alta sea la presión diferencial, se considera que los vasos están más endurecidos y dañados **(Franklin, 2007)**.

### 2.1.3.1 Pulso arterial

Conocemos como pulso arterial a la expresión palpatoria de volumen sistólico, es dependiente de la velocidad de expulsión del latido y de la distensibilidad del sistema arterial. Se caracteriza por tres factores: La frecuencia, la regularidad y la igualdad. Frecuencia, es la cantidad de ondas que se perciben en un minuto, en un adulto en estado de reposo puede presentar valores aproximados entre 60 y 100

pulsaciones sobre minuto, mientras que en niños esta presenta valores aproximados de entre 80 y 120 pulsaciones por minuto. Factores externos que alteren este estado de reposo, tal es el caso del ejercicio, emociones o estados de hiperactividad simpática pueden causar un incremento de la frecuencia, conocida como taquisfigmia o taquicardia, por el contrario, un estado de reposo, sueño, actividad vagal aumentada causa una disminución en la frecuencia lo que conocemos como bradicardia o bradisfigmia. Regularidad, es la similitud de los intervalos de tiempo, en este caso diastólicos, entre las ondas pulsátiles, mientras que la igualdad hace referencia a la similitud existente de las ondas pulsátiles **(González *et al.*, 2012)**.

#### **2.1.3.2 Determinación de la presión arterial no invasiva**

El método para determinar la presión arterial de manera no invasiva, es el auscultatorio y se realiza mediante un esfigmomanómetro. Este consta de un manguito de presión que se coloca alrededor del brazo y se insufla hasta que supera el valor de la presión sistólica, esto impide el paso del flujo en la arteria humeral. Cuando este se comienza a desinflar habrá paso del flujo sanguíneo, una vez que la presión del manguito caiga por debajo de la presión sistólica, el diámetro del vaso se verá disminuido y el flujo circulante se volverá turbulento lo que provocará que este sea audible con el estetoscopio, entonces el latido cardiaco es audible hasta que la presión del manguito descienda tanto como para dejar liberado por completo el vaso arterial, entonces habrá silencio auscultatorio debido a que el flujo se vuelve laminar. Como resultado, el primer ruido escuchado hace referencia al valor de la presión PAS y el último audible al de la PAD **(Goodman *et al.*, 2003)**.

#### **2.1.3.3 Mecanismos de regulación de la presión arterial.**

Como todo sistema hidráulico, la presión dentro del sistema cardiovascular depende básicamente de la volemia, las características elásticas de los vasos, volumen sistólico y la resistencia al flujo, ya que el flujo para cada tejido es regulado en su mayoría por factores locales dependientes de las necesidades metabólicas

**(Goodman et al., 2003).** Una de las funciones más importantes para el sistema nervioso es regular la presión arterial. En esta regulación intervienen las funciones vasoconstrictoras (constricción parcial de los vasos sanguíneos, regulación del centro vasomotor, activación de la médula suprarrenal, etc.) y cardioaceleradoras (activación cardíaca, centro vagal cardioinhibidor, situaciones de alerta, etc.) pertenecientes al sistema nervioso simpático, estas son estimuladas, para inhibir las señales vagales parasimpáticas, cuando estos dos efectos se unen producen aumento de la presión arterial. Para la regulación de la presión arterial, se ven implicados diferentes mecanismos como reflejo barorreceptor, quimiorreceptores, el sistema vasoconstrictor renina-angiotensina y la respuesta renal a la presión arterial **(Bedillo et al., 2003).**

Los barorreceptores (BRs) son terminaciones nerviosas que funcionan como receptores de presión debido a que son sensibles a la distensión y detectan los cambios bruscos de la presión arterial. Al haber un aumento en la presión arterial, los barorreceptores se estimularán inhibiendo el centro vasomotor bulbar y se excita el vago. Por el contrario, al haber una disminución de la presión arterial también disminuye la actividad de los barorreceptores **(Aristil, 2010).**

Los quimiorreceptores se encuentran en los cuerpos aórticos y carotídeos que al estar en contacto directo con la sangre detecta la concentración de oxígeno, dióxido de carbono e hidrógeno. Los quimiorreceptores transmiten señales estimulantes para el centro vasomotor aumentando la actividad simpática que a su vez aumenta el gasto cardíaco, la resistencia vascular periférica y por consecuencia la presión arterial. Los receptores de estiramiento también llamados receptores de baja presión, se localizan en aurículas y arterias pulmonares, estos receptores, tienen como función detectar cambios de presión debido al aumento del volumen en zonas que presenten baja presión y tiene como finalidad desencadenar reflejos paralelos a los barorreceptores. Cuando hay aumento de volumen en las aurículas, habrá dilatación consecuente de las arteriolas aferentes presentes en riñones y algunas arteriolas periféricas provocando un aumento en la intensidad del filtrado

glomerular, desencadenando declive del volumen sanguíneo, gasto cardiaco y por consecuencia de la presión arterial. Cuando hay aumento del volumen de las aurículas se transmiten señales al hipotálamo, disminuyendo así la vasopresina y la resorción de agua (**Guyton et al., 2011; Wagner, 2010**).

El sistema vasoconstrictor renina-angiotensina se encarga de la regulación hemodinámica, así como del equilibrio de agua y electrolitos, la disminución del volumen sanguíneo, la perfusión renal y la concentración de sodio en plasma son factores desencadenantes para que se active este sistema (**Aristil, 2010**).

El mecanismo renal de los líquidos corporales es considerado el sistema fundamental para el control de la presión arterial a largo plazo. Este mecanismo se centra en la diuresis por presión. Al haber un incremento en la presión arterial se desencadena un proceso que llevará a la pérdida del volumen de líquido extracelular causado por el aumento en la eliminación de agua y sales, provocando disminución del volumen sanguíneo, el retorno venoso y el gasto cardiaco, a su vez, habrá declive en la presión arterial. Por el contrario, una disminución en la presión arterial se verá reflejada en las arteriolas renales y de la actividad neural simpática, provocando la producción de renina que, a su vez, aumenta la producción de angiotensina II, aumentando así la retención de agua y electrolitos y finalmente se estimula la síntesis y secreción de aldosterona (**Lahera et al., 2010**).

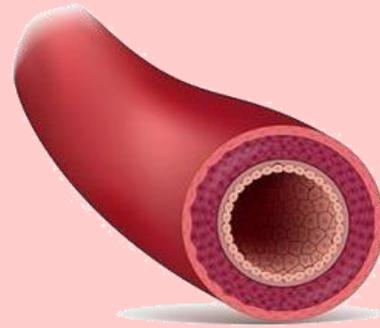
## 2.2 Endotelio vascular (EV)

Las células endoteliales (CE) presentan diferentes funciones, intervienen en la regulación, mantenimiento y control de las funciones cardiocirculatorias mediante la producción y liberación de múltiples sustancias encargadas de llevar a cabo el proceso de vasodilatación, mantenimiento del tono vasomotor basal, coagulación, y fibrinólisis (**Figura 5**). A nivel histológico, el endotelio se encuentra recubriendo la luz vascular. Es una capa simple de 10-50  $\mu\text{m}$  de espesor, donde las células que lo conforman presentan formas poligonales con heterogeneidad estructural y

orientadas siguiendo la dirección del flujo, este alineamiento representa un remodelamiento estructural endotelial vinculado a la tensión de roce (*shear stress*) (De la Serna, 2010).

**Endotelio funciones:**

Barrera con permeabilidad selectiva  
Regula el tono vascular  
Antitrombótica-antiagregante  
Evita la adhesión de células  
Controla el crecimiento del MLV  
Interviene en el desarrollo y remodelado  
Participa en la conversión de AI en AII



**Figura 5: Funciones de las células endoteliales (Goodman et al., 2003)**

La membrana celular de las CE está formada por una capa doble de fosfolípidos, atravesada por proteínas transportadoras que establecen conexión entre el exterior y el interior celular. En el citoplasma se encuentran las proteínas contráctiles actina y miosina, responsables de la actividad motora, por otro lado también se observan invaginaciones denominadas caveolas que son necesarias para el proceso de endocitosis ya que en las CE y en las células musculares lisas vasculares (CMLV) estas invaginaciones son sitios de preferencia para la entrada de  $Ca^{2+}$  ya que en él se encuentran vías de transducción vinculadas a los GPCR (*G Protein Coupled Receptors*) y enzimas concentradas como la adenilciclasa, la prostaciclina sintasa ( $PGI_2$ ) y la óxido nítrico sintasa (NOs) (De la Serna, 2010; Fernández et al., 2010).

Las células endoteliales producen de manera endógena sustancias de gran importancia, ya que gracias a ellas se llevarán a cabo diferentes procesos fisiológicos, estas se encuentran relacionadas con la vasoconstricción y la vasorrelajación del músculo liso vascular (Figura 6).

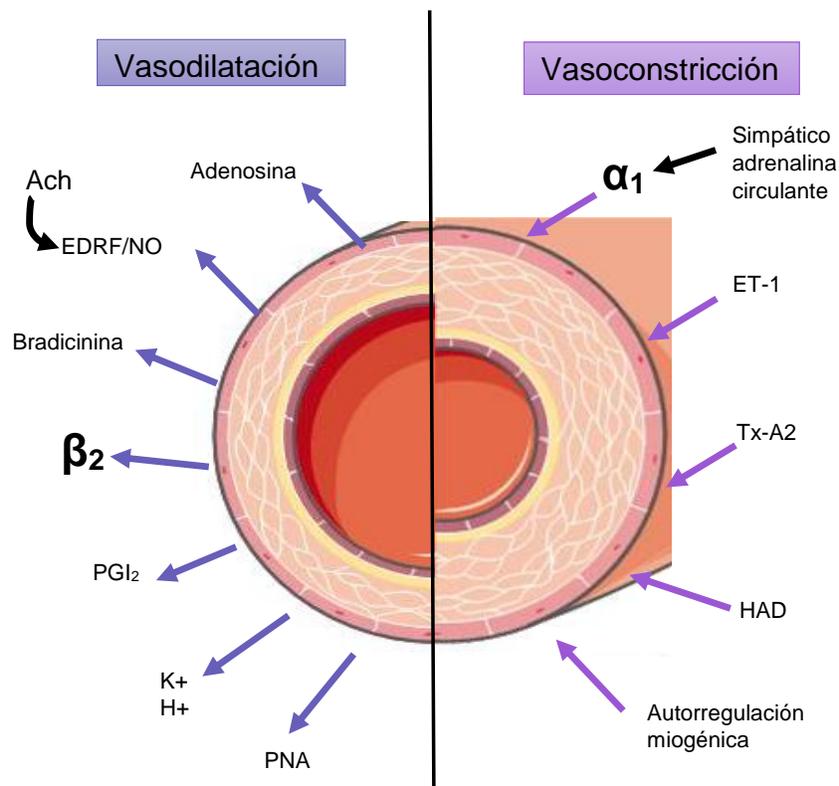


Figura 6: Sustancias liberadas por el endotelio (De la Serna, 2010; Goodman *et al.*, 2003).

### 2.2.1 Disfunción endotelial

El endotelio con funciones normales se caracteriza por tener efecto inhibitorio de la contracción vascular, trombosis, adhesión de leucocitos y del crecimiento de las células del MLV. Cuando existe la disfunción endotelial se verá reflejado en estas actividades, ya que se verán afectadas y la pérdida de homeóstasis de estos sistemas es un determinante en prácticamente todas las enfermedades cardiovasculares. La disfunción endotelial consta prácticamente en la pérdida de la integridad funcional del endotelio, estará presente en pacientes hipercolesterolémicos, diabéticos, fumadores y principalmente hipertensos. Los principales mecanismos involucrados en la disfunción endotelial son el aumento del tono vascular, hipercoagulabilidad, interacción endotelio-células y proliferación del

MLV. Cuando hay disfunción endotelial, la disminución de la vasodilatación en respuesta a la acetilcolina (ACh) podría ser la evidencia más temprana de este daño, también se encuentran otras sustancias características como marcadores de lesión endotelial, tales como las que se muestran en la **Tabla 1**.

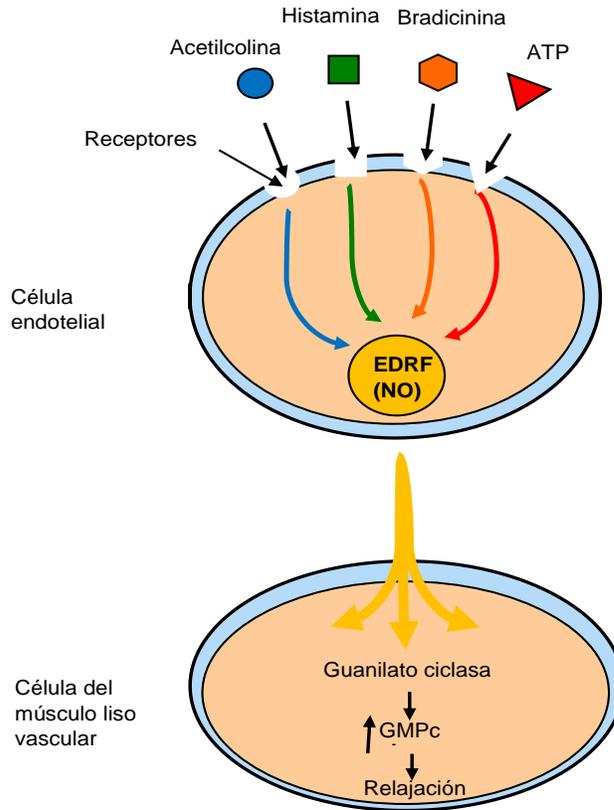
**Tabla 1: Marcadores de lesión endotelial (Goodman et al., 2003).**

Marcadores de lesión endotelial
Microalbuminuria
Endotelina 1
PAI-1
VWf
Trombomodulina sérica soluble
Moléculas de adhesión

### 2.2.2 Óxido nítrico (NO)

El factor de relajación derivado del endotelio (EDRF) que actualmente se conoce como NO, es uno de los principales mediadores endógenos que desempeña numerosas funciones como: vasodilatador, inhibidor de la mitogénesis, antiagregante, inhibidor de adhesión plaquetaria, afectador inmune, mediador de la hipotensión en la sepsis y neurotransmisor que interviene, incluso en la memoria **(Lermoli, 2003)**. Se ha demostrado que la estimulación mecánica como la presión pulsátil, estiramiento, estrés de la pared y la hipoxia, así como los estímulos metabólicos o aquellos mediados por receptores, tal es el caso de los muscarínicos de las CE provocan su liberación **(Goodman et al., 2003)**. La síntesis del NO se lleva a cabo en el núcleo de las células endoteliales por medio de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) partiendo de la L-arginina y llevado a cabo el proceso por diversos estímulos químicos y físicos. Existen tres isoformas de la NOS, dos constitutivas y una inducible donde la NOS neuronal (nNOS) se expresará en diferentes tipos de neuronas presentes en el sistema nervioso central y periférico. La NOS inducible (iNOS) es elaborada por macrófagos y CMLV a partir de estímulos ocasionados por endotoxinas o citosinas y por último la NOS endotelial (eNOS) presente en la membrana celular de las células endoteliales en donde se expresará

cuando sea necesario para la producción de NO (De la Serna, 2010; Lorenzo *et al.*, 2008; Murray *et al.*, 1996).



**Figura 7: Factores que estimulan la síntesis de NO y su mecanismo de acción (Goodman *et al.*, 2003).**

El NO es liberado de las células endoteliales de forma continua como respuesta a fuerzas físicas como la presión y humorales como catecolaminas A-II, ET-1, vasopresina, trombina y ATP (**Figura 7**). El NO es responsable de mantener el tono vascular y al ser difundido en la MLV, actúa a través de la guanilatociclasa soluble (GCs) transformando el GTP para aumentar el GMPc. La guanilatociclasa produce una desfosforilación de la cadena ligera de miosina, por otro lado, el GMPc activa a la proteincinasa G, estimulando la receptación de  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo sarcoplásmico



factor de riesgo que contribuye al desarrollo de enfermedades cardiovasculares como accidente cerebro vascular, infarto al miocardio, insuficiencia cardíaca o renal entre otras enfermedades (**Aristil, 2010; Hunt S.A, 2005**).

### 2.3.1 Clasificación de la hipertensión arterial

Actualmente la HAS se clasifica en 2 tipos: La primaria o esencial (afecta al 90% de los casos) en la cual no se conoce su etiología debido a la intervención de varios sistemas como son adrenérgicos, centrales o periféricos, renales, hormonales y vasculares. La secundaria (10% de los casos reportados) se desarrolla debido a una causa conocida y está relacionada principalmente con factores endocrinos, renales, cardiovasculares, fármacos, ambientales y gestacionales. Existen varios factores que aumentan el riesgo de padecer hipertensión arterial como el excesivo consumo de sal, mala alimentación, llevar una vida sedentaria, mal control del estrés y el consumo de alcohol (**Aristil, 2010**).

**Tabla 2: Clasificación de la Hipertensión arterial sistémica publicada por la Asociación Americana del Corazón y el Colegio Americano de Cardiología 2017.**

Categoría	PAS (mm Hg)	PAD (mm Hg)
Normal	< 120	< 80
Elevado	120-129	80
Grado 1	130-139	80-89
Grado 2	140	90
Crisis hipertensiva	180	120

### 2.3.2 Epidemiología

A nivel mundial se estima que hay 17 millones de muertes causadas por enfermedades cardiovasculares, entre ellas, 9.4 millones de muertes son debido a la hipertensión arterial sistémica. En 2008, el diagnóstico de hipertensión en adultos mayores de 25 años fue del 40%, hasta el 2008 se reportaron 1000 millones de casos, en donde la máxima prevalencia de hipertensión se registra en la Región de

África, mientras que la más baja es registrada en la Región de las Américas. De manera general, se ha observado que la prevalencia de la hipertensión es menor en los países de ingresos elevados en comparación con los países de otros grupos de ingresos. Existen diferentes factores que contribuyen a que la prevalencia de esta enfermedad sea mayor, una de ellas es debido a que en países bajos el número de habitantes es mayor que el de los países de ingresos elevados, también se debe al deterioro que presentan los sistemas de salud, al número de pacientes sin diagnóstico, tratamiento o control de la enfermedad **(OMS, 2013)**.

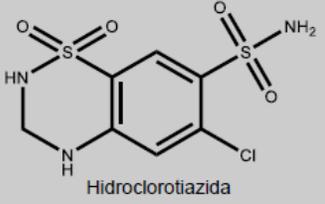
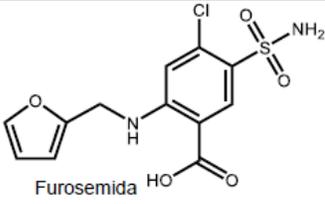
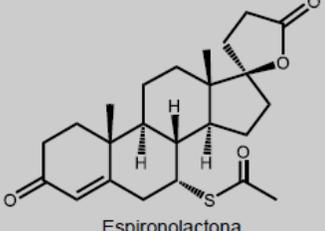
En México se tiene reportado hasta el 2016 que la prevalencia de hipertensión arterial es de 25.5% de la población adulta, de los cuales, el 40.0% desconocía que padecía esta enfermedad. La proporción de adultos con diagnóstico previo y cifras de tensión arterial controlada es de 58.7% y el 79.3% reportó tratamiento farmacológico. En los hombres la prevalencia de hipertensión arterial presente es menor que el reportado en las mujeres, ya que en hombres representa un 24.9% mientras que en las mujeres es del 26.1% **(ENSANUT, 2013)**.

### **2.3.3 Terapéutica de la hipertensión arterial**

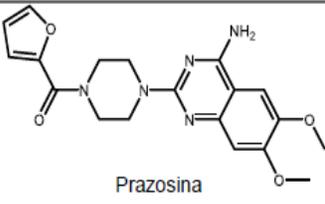
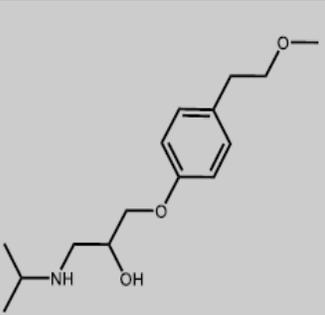
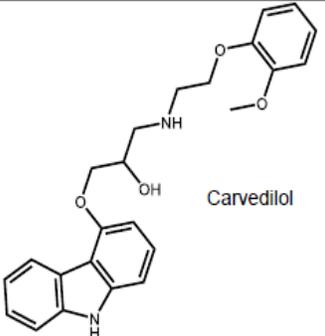
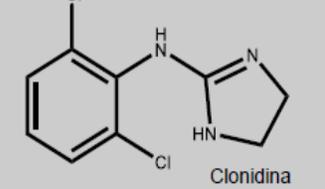
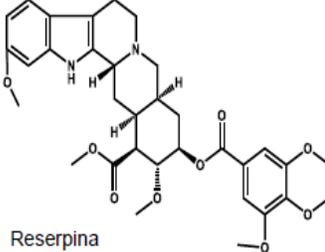
El tratamiento al que se puede recurrir puede ser de carácter farmacológico o no farmacológico. El tratamiento no farmacológico se dará a pacientes a quienes no se puede dar un tratamiento definitivo, que se encuentran en la clasificación en estadio grado I y que no muestran ninguna de las manifestaciones de la enfermedad en el órgano blanco, en este tratamiento se tomarán medidas específicas en donde las medidas dietarías establecen que debe disminuir la ingesta de sodio, alcohol, suspender el tabaquismo así como una dieta que contribuya a la disminución del peso corporal con ayuda de actividad física (30 min diarios) e incluso tener un buen manejo del estrés en acompañamiento de un monitoreo constante de las cifras de presión arterial **(Aristil, 2010)**.

El tratamiento farmacológico (**Tabla 3**) tiene como principal objetivo alcanzar la máxima reducción del riesgo de morbilidad y mortalidad cardiovascular, mediante la normalización sostenible de las cifras de presión arterial, este tipo de tratamiento está indicado a pacientes que se encuentran en estadio del grupo 1 que no responden al tratamiento no farmacológico durante un periodo de 2 a 3 meses, y también a todos los que se encuentran en estadio del grupo 2. Dentro de los grupos de fármacos indicados se encuentran los diuréticos (tiazídicos, de asa y Ahorradores de K<sup>+</sup>), antagonistas adrenérgicos selectivos  $\alpha$  y  $\beta$ , adrenérgicos de acción central, bloqueadores neuronales adrenérgicos, vasodilatadores directos, bloqueadores de canales de Ca<sup>2+</sup>, inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina y antagonistas del receptor de la angiotensina II (**Aristil, 2010**).

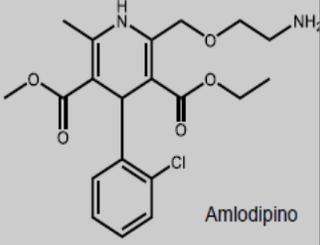
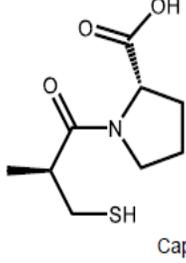
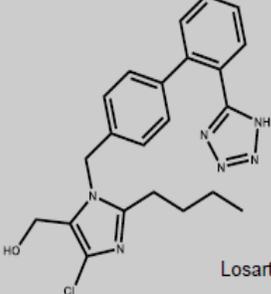
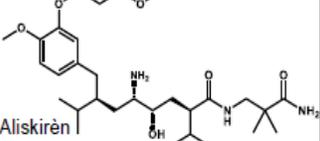
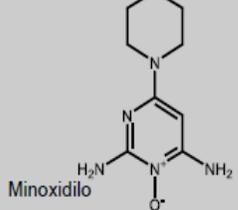
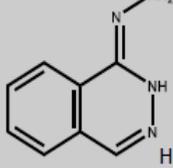
**Tabla 3: Clasificación del tratamiento farmacológico empleado en la HAS de acuerdo a su mecanismo de acción (Goodman *et al.*, 2003; Katzung *et al.*, 2012).**

Grupo farmacológico	Mecanismo de acción	Fármacos	Fármaco representativo	Efectos adversos
Diuréticos	Tiazídicos: Bloquean el transportador de Na/Cl en el túbulo contorneado distal renal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidroclorotiazida</li> <li>• Clorotiazida</li> <li>• Metilclotiazida</li> <li>• Clortalidona</li> <li>• Indapamida</li> <li>• Metolazona</li> </ul>	 <p align="center">Hidroclorotiazida</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hiponatremia</li> <li>• Hipocalemia</li> <li>• Hipomagnesemia</li> <li>• Hipocalcemia</li> <li>• Hipercalcemia</li> <li>• Alcalosis y acidosis metabólica</li> <li>• Hiperuricemia</li> </ul>
	De asa: Bloquean el transportador de Na/K/2Cl renal en el asa de Henle.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Furosemida</li> <li>• Bumetanida</li> <li>• Torsemida</li> <li>• Ácido etacrinico</li> </ul>	 <p align="center">Furosemida</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipernatremia</li> <li>• Hipocalemia</li> <li>• Hipomagnesemia</li> <li>• Hiponatremia</li> <li>• Alcalosis y Acidosis metabólica</li> <li>• Dermatitis</li> </ul>
	Ahorradores de K <sup>+</sup> : Antagoizan el receptor de aldosterona en el túbulo colector renal/ Bloqueador de los canales epiteliales de Na	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Espironolactona</li> <li>• Eplerenona</li> <li>• Amilorida</li> <li>• Triamtereno</li> </ul>	 <p align="center">Espironolactona</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipercalemia</li> <li>• Acidosis metabólica</li> <li>• Ginecomastia (poco frecuente)</li> </ul>

**“ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN FUNCIONAL DEL FLAVONOIDE 2-FENIL-1-BENZOPIRAN-4-ONA Y SU EFECTO ANTIHIPERTENSIVO”**

<b>Simpaticolíticos</b>	Antagonistas adrenérgicos $\alpha$ : Antagonizan a los receptores $\alpha_1$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Prazosina</li> <li>• Terazosina</li> <li>• Doxazosina</li> <li>• Fenoxibenzamina</li> <li>• Fentolamina</li> </ul>	 <p align="center">Prazosina</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipotensión</li> <li>• Taquicardia</li> <li>• Astenia</li> <li>• Náuseas</li> <li>• Cefalea</li> <li>• Vértigos</li> <li>• Edemas</li> </ul>
	Antagonistas adrenérgicos $\beta$ : Antagonizan los receptores $\beta$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Metoprolol</li> <li>• Atenolol</li> <li>• Betaxolol</li> <li>• Bisoprolol</li> <li>• Carteolol</li> <li>• Esmolol</li> <li>• Nadolol</li> <li>• Nebivolol</li> <li>• Penbutolol</li> <li>• Pindolol</li> <li>• Propanolol</li> <li>• Timolol</li> </ul>	 <p align="center">Metoprolol</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bradicardia</li> <li>• Hipotensión</li> <li>• Insuficiencia cardiaca</li> <li>• Bloqueo aurículo-ventricular</li> <li>• Hiperuricemia.</li> <li>• Fatiga</li> <li>• Mareos</li> </ul>
	Antagonistas adrenérgicos mixtos ( $\alpha$ y $\beta$ ): Antagonizan simultáneamente ambos tipos de receptores	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Carvedilo</li> <li>• Labetalol</li> </ul>	 <p align="center">Carvedilol</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bradicardia</li> <li>• Cefalea</li> <li>• Mareo</li> <li>• Vértigo</li> <li>• Depresión</li> <li>• Incremento de las transaminasas</li> <li>• Ictericia</li> <li>• Visión borrosa</li> </ul>
	Fármacos de acción central: Activan receptores adrenérgicos $\alpha_2$	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Clonidina</li> <li>• Metildopa</li> <li>• Guanfacina</li> </ul>	 <p align="center">Clonidina</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sedación</li> <li>• Sequedad bucal</li> <li>• Astenia</li> <li>• Cefalea</li> <li>• Bradicardia</li> <li>• Náuseas</li> <li>• Vómitos</li> </ul>
	Bloqueadores neuronales adrenérgicos: Antagonizan transporte de aminas en nervios noradrenérgicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reserpina</li> <li>• Guanadrel</li> </ul>	 <p align="center">Reserpina</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fatiga</li> <li>• Mareos</li> <li>• Somnolencia</li> <li>• Depresión</li> <li>• Hipotensión</li> <li>• Bradicardia</li> <li>• Arritmia</li> <li>• Trastornos gastrointestinales</li> </ul>

**“ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN FUNCIONAL DEL FLAVONOIDE 2-FENIL-1-BENZOPIRAN-4-ONA Y SU EFECTO ANTIHIPERTENSIVO”**

<p><b>Bloqueadores de canales de Ca<sup>2+</sup></b></p>	<p>Bloqueo de los canales de Ca<sup>2+</sup> vasculares</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amlodipina</li> <li>• Verapamilo</li> <li>• Diltiazem</li> <li>• Nimodipina</li> <li>• Felodipina</li> <li>• Nicardipina</li> <li>• Isradipina</li> <li>• Clevidipina</li> <li>• Nifedipina</li> </ul>	 <p>Amlodipino</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estreñimiento</li> <li>• Dolor de cabeza</li> <li>• Palpitaciones</li> <li>• Mareos</li> <li>• Erupción cutánea</li> <li>• Somnolencia</li> <li>• Enrojecimiento</li> <li>• Náuseas</li> </ul>
<p><b>Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina</b></p>	<p>Inhiben la enzima convertidora de angiotensina</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Captopril</li> <li>• Enalapril</li> <li>• Lisinopril</li> <li>• Quinapril</li> <li>• Ramipril</li> <li>• Benazepril</li> <li>• Fosinopril</li> <li>• Moexipril</li> <li>• Perindopril</li> <li>• Trandolapril</li> </ul>	 <p>Captopril</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tos seca</li> <li>• Hipercalemia</li> <li>• Cansancio</li> <li>• Mareos</li> <li>• Cefalea</li> <li>• Pérdida del sentido del gusto</li> <li>• Daño renal</li> </ul>
<p><b>Antagonistas de la enzima convertidora de angiotensina II</b></p>	<p>Antagonizan los receptores AT<sub>1</sub> para angiotensina</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Losartán</li> <li>• Candesartán</li> <li>• Irbesartán</li> <li>• Valsartán</li> <li>• Temilsartán</li> <li>• Condesartán</li> <li>• Eprosartán</li> <li>• Olmesartán</li> </ul>	 <p>Losartán</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipercalemia</li> <li>• Cansancio</li> <li>• Mareos</li> <li>• Cefalea</li> <li>• Angioedema</li> </ul>
<p><b>Inhibidor directo de la renina angiotensina</b></p>	<p>Inhibe la actividad enzimática de la renina</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aliskirén</li> </ul>	 <p>Aliskirén</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipercalemia</li> <li>• Alteración renal</li> <li>• Teratógeno potencial</li> </ul>
<p><b>Vasodilatadores</b></p>	<p>Arteriales (parenterales) Abre canales de K</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Minoxidilo</li> <li>• Diazóxido</li> </ul>	 <p>Minoxidilo</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hipertricosis</li> <li>• Hipotensión excesiva</li> <li>• Disnea</li> <li>• Mareos</li> </ul>
	<p>Activa receptores D<sub>1</sub></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fenoldopam</li> </ul>		
	<p>Arteriales y venosos: Libera Óxido nítrico</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hidralazina</li> <li>• Nitroprusiato</li> </ul>	 <p>Hidralazina</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síndrome similar al lupus eritematoso</li> <li>• Vómitos</li> <li>• Pérdida de apetito</li> <li>• Diarrea</li> <li>• Estreñimiento</li> <li>• Lagrimeo.</li> </ul>

## 2.4 Flavonoides

Los flavonoides pertenecen a una amplia familia de metabolitos secundarios polifenólicos (**Limón, et al., 2010**), son generalmente pigmentos presentes en los vegetales, es decir son responsables de la coloración de las flores frutos y a veces de las hojas. El color dependerá del tipo de flavonoide, las chalconas, las auronas y los flavonoles presentan coloración amarilla, los antocianósidos, roja, azul o violeta. En el caso de que estas no sean directamente visibles cumplirán un papel como copigmentos, tal es el caso de la flavona y flavonoles. Otra función que se ha descrito de los flavonoides, es que, debido a su presencia en la cutícula foliar y en las células epidérmicas de las hojas, proveen protección a la planta contra los efectos causados por las radiaciones ultravioletas (**Martínez-Flórez et al., 2002**).

De manera general podemos obtener estos metabólicos como productos procedentes de las rutas del ácido shikímico y de los policétidos (**Lapidot, et al., 2002; Limón, et al., 2010**).

### 2.4.1 Localización y distribución

Los heterósidos de flavonoides hidrosolubles se acumulan en las vacuolas o dependiendo la especie podrán encontrarse en la epidermis de las hojas o se reparten en el mesófilo. La distribución de las flavonas y flavonoles así como de sus heterósidos es universal, no obstante algunas se encuentran de manera particular en ciertas familias. Así los flavonoides 6-O-sustituidos se encuentran frecuentemente en *Lamiaceae*, *Rutaceae*, y *Asteraceae*, las 5-desoxiflavonas en *Fabaceae* y en *Myrtales* mientras que los flavonoles 2'-O-sustituidos en *Lamiaceae* y *Solanaceae* (**Bruneton, 2001**).

### 2.4.2 Síntesis y estructura de los flavonoides

Los flavonoides presentan una estructura base del tipo C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> y dos anillos aromáticos unidos entre sí por una cadena de 3 carbonos ciclada a través de un oxígeno (**Figura 9**).

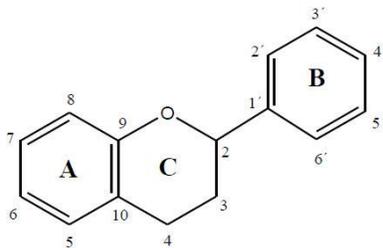
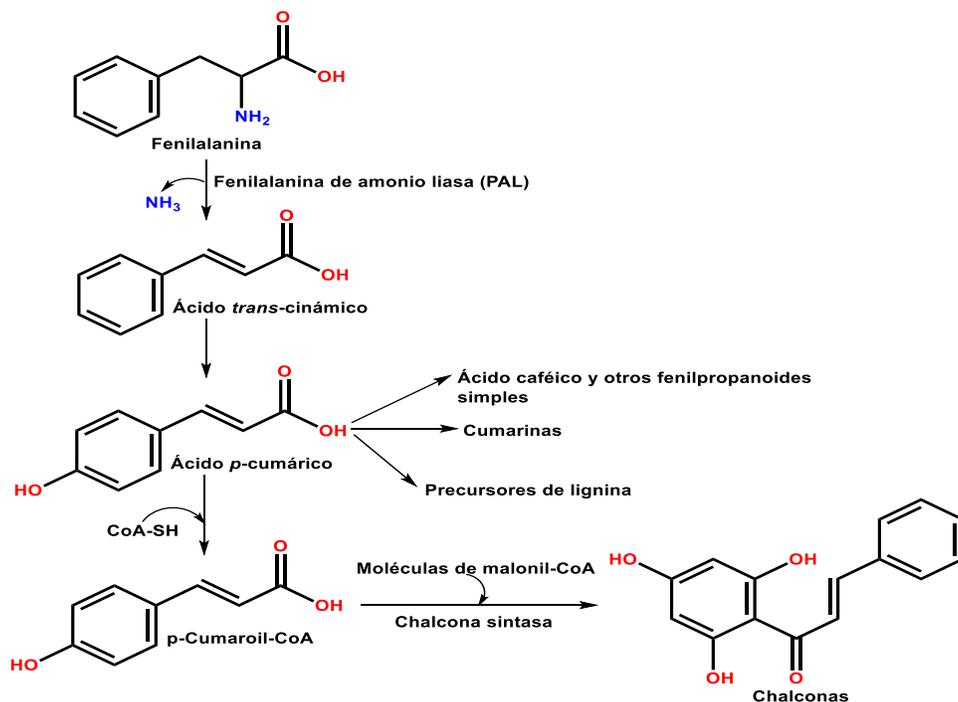


Figura 9: Estructura base de los flavonoides.

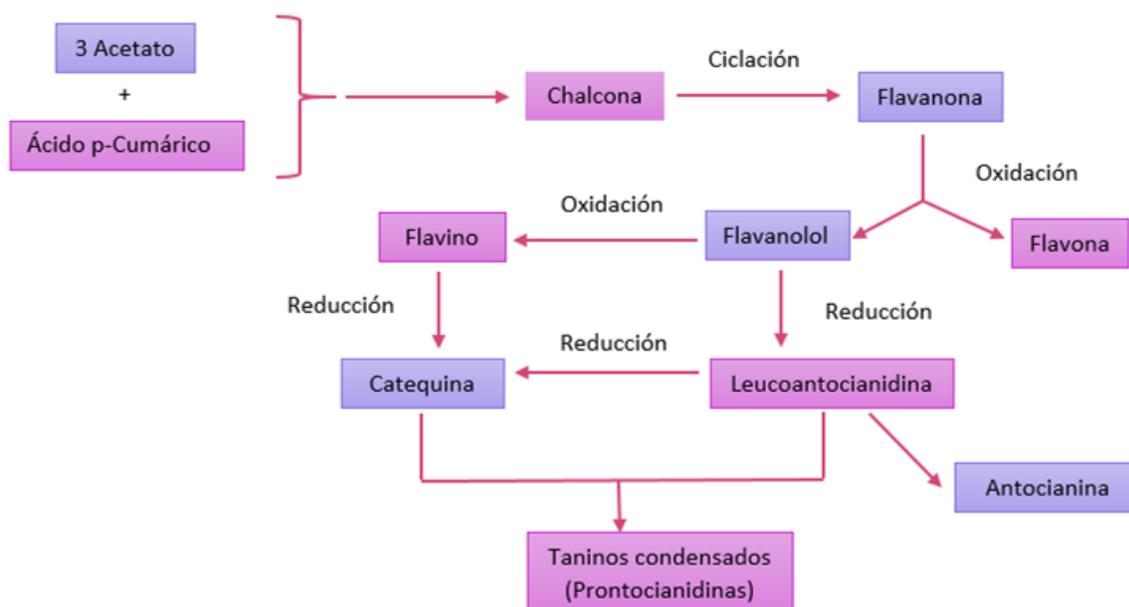
Todos los flavonoides poseen un carbonilo en la posición 4 y las variaciones entre cada uno se verán presentes en las posiciones 1, 2 y 3 de la unidad C<sub>3</sub> y el anillo B. De los tres anillos que componen los flavonoides, el A es sintetizado a través de la ruta de los policétidos, mientras que el anillo B y la unidad C<sub>3</sub> proceden de la ruta del ácido shikímico (**Kuklinski, 2003**).

La biosíntesis de los flavonoides se da a partir de una molécula de fenilalanina y tres de malonil-CoA. La reacción comienza con un tricétido que se cicliza y se condensa con una molécula de ácido p-cumárico, posteriormente ocurre una reacción con malonato para formar una cadena poliacetídica que la enzima chalcona sintetasa transformará en la chalcona correspondiente (**Figura 10**)



**Figura 10: Ruta del ácido shikímico: desaminación de fenilalanina y formación de ácidos cinámico y cumárico, precursores de los flavonoides.**

Estas chalconas catalizadas por la enzima chalcona isomerasa reaccionan mediante la adición de Michael para generar así las flavanonas que por medio de reacciones de oxidación o deshidrogenación darán lugar a los diferentes flavonoides. Así mismo, el fenilpropano sintetizado del ácido shikimico inicia la síntesis de policétidos que al agregar tres residuos de acetato harán posible cerrar el anillo y con una subsecuente hidroxilación y reducción forman diferentes flavonoides y taninos (**Figura 11**) (Limón, *et al.*, 2010; Raso, *et al.*, 2001).



**Figura 11: Biosíntesis de los diferentes flavonoides y taninos.**

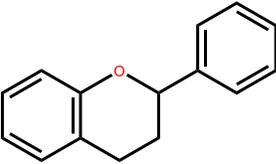
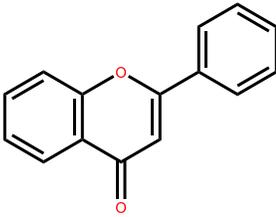
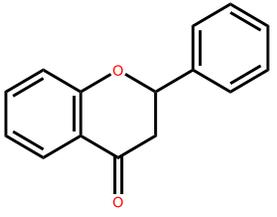
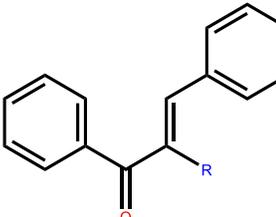
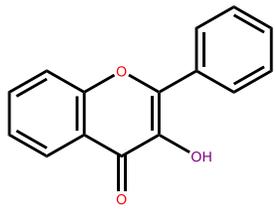
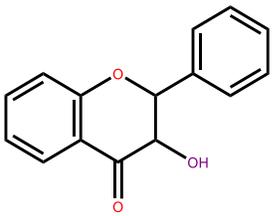
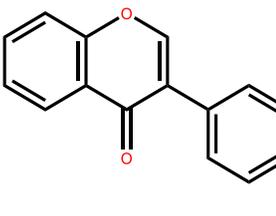
### 2.4.3 Clasificación

De manera general los flavonoides los podemos clasificar de acuerdo a las variaciones estructurales presentes. En la tabla 4 se muestra dicha clasificación, mientras que en la tabla 5 para ilustrar mejor, se muestran las estructuras base de los flavonoides:

Tabla 4: Clasificación general de los flavonoides (Kuklinski, 2003).

Doble enlace entre las posiciones 2 y 3	<b>Flavonas: Con H en la posición 3</b>
	Flavonoles: Con un OH en la posición 3
Sin doble enlace entre las posiciones 2 y 3	Flavononas: Con H en la posición 3
	Flavonololes: Con OH en la posición 3
<b>Chalconas</b>	Con el anillo C abierto
<b>Isoflavonoides</b>	Con el anillo B en la posición 3

Tabla 5: Estructuras de los flavonoides

Flavano	Flavona	Flavanona	Chalconas
			
	Flavonol	Flavanolol	Isoflavonoides
			

#### 2.4.4 Antecedentes farmacológicos de flavonoides

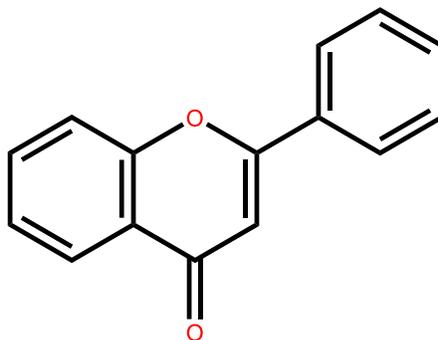
La principal actividad atribuida a los flavonoides es ser “venoactivos”, es decir, tienen la capacidad de disminuir la permeabilidad de los capilares sanguíneos y por consecuencia aumentar su resistencia, así mismo un pequeño número de flavonoides han demostrado ser anticancerígenos e inhibidores del crecimiento de células tumorales *in vitro*: interactúan con las enzimas del metabolismo

xenobiótico, poseen efectos anti-iniciadores y/o antipromotores e incluso ser citostáticos, sin embargo debidos a las variaciones que presentan en la relación estructura-actividad, no es posible generalizarlos.

Los flavonoides poseen una gran capacidad antioxidante, esta actividad está estrechamente relacionada con su estructura química, ya que contienen un número variable de grupos hidroxilo fenólicos y presenta excelentes propiedades de quelación de iones metálicos como  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , catalizar el transporte de electrones y depurar los radicales libres, es por ello que desempeñan un papel esencial en la protección frente a los fenómenos de daño oxidativo, y tienen efectos terapéuticos en un elevado número de patologías, incluyendo la cardiopatía isquémica, la aterosclerosis o el cáncer (**Martínez, et al., 2002; Gordo, et al., 2018**). Simultáneamente por el mecanismo de acción de estos fitoquímicos se han podido usar para tratar otras patológicas tales como la diabetes mellitus, cáncer, cardiopatías, infecciones virales, úlceras, igualmente como antialérgicos, antitrombóticos e incluso como antiinflamatorios. Adicionalmente se ha reportado el efecto protector de los flavonoides contra las enfermedades cardiovasculares y así mismo se ha comprobado su efecto antihipertensivo y vasorrelajante (**Hernández-Abreu et al., 2009**)

El efecto vasorrelajante que poseen los flavonoides es dependiente del endotelio vascular, sin embargo, hasta este momento el mecanismo de acción no es claro, y se sabe que dependerá del tipo de estructura química que posea el flavonoide, sin embargo, de manera general se asocia con la síntesis del óxido nítrico (NO) y a la presencia de un grupo carbonilo en la posición 4 y su doble enlace  $\text{C}_2\text{-C}_3$  que fungen acciones indispensables para el efecto vasodilatador (**Limón, et al., 2010**).

#### 2.4.5 2-Fenil-1-benzopiran-4-ona



**Figura 12:** Estructura química de la 2-fenil-1-benzopiran-4-ona

En los últimos años se han desarrollado trabajos de investigación en torno a la actividad biológica presente en los flavonoides, la 2-fenil-1-benzopiran-4-ona (Flavona) (**Figura 12**), tiene actividad farmacológica diversa, en 2007 se determinó su efecto antiinflamatorio, ya que presentó inhibición dosis dependiente sobre COX-2 (**Alberto et al., 2007**). Así mismo, en el 2014 se determinó su potencial efecto antimicrobacteriano, inmunoestimulante y toxicológico. Se demostró que esta presenta actividad antimicrobacteriana *in vitro* (eficacia contra *Mycobacterium tuberculosis*) mientras que en los ensayos *in vivo* no se observaron signos de toxicidad ni cambios en los parámetros bioquímicos, hematológicos, genotóxicos y mutagénicos. El análisis macroscópico de órganos como riñones, hígado y pulmones no mostró diferencias significativas entre los grupos (**Souza, 2014**).

Con respecto al sistema cardiovascular, se ha demostrado que la 2-fenil-1-benzopiran-4-ona presenta un potencial efecto vasorrelajante sobre la contracción inducida por noradrenalina, este efecto es dependiente de la concentración y parcialmente dependiente de la presencia de endotelio vascular (**Torres-Piedra et al., 2011**).



## 3.- JUSTIFICACIÓN

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades crónico-degenerativas representan un problema en el sector salud debido a su alta prevalencia, por lo que es de suma importancia la búsqueda de nuevas estrategias de tratamiento, alternativas estructurales y moléculas bioactivas con mecanismos de acción novedosos, con mayor eficiencia, especificidad y seguridad.

Los problemas más importantes que enfrenta el tratamiento farmacológico de la hipertensión arterial es el alto número de reacciones adversas debido a la polifarmacia, la baja adherencia al tratamiento por parte del paciente y la tolerancia que se desarrolla después de un tiempo prolongado con el uso de un mismo medicamento, es por ello que como parte de estas nuevas alternativas recurrimos a la medicina tradicional para la búsqueda de compuestos bioactivos con potencial efecto antihipertensivo. Se ha demostrado, de manera general, que los flavonoides presentan diversos efectos farmacológicos, tales como antioxidantes siendo este el más popular, independientemente de estos efectos, estudios anteriormente desarrollados han demostrado que los flavonoides presentan efecto vasorrelajante, la 2-fenil-1-benzopiran-4-ona actúa sobre la contracción inducida por noradrenalina, este efecto es dependiente de la concentración y parcialmente dependiente de la presencia de endotelio vascular (**Torres-Piedra *et al.*, 2011**).

En este sentido, el presente proyecto pretende abundar en el conocimiento del potencial terapéutico del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona para ser utilizada como prototipo en la obtención de nuevos fármacos para el tratamiento de la hipertensión arterial.



## 4.- HIPÓTESIS

#### 4. HIPÓTESIS

El flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona mostrará efecto vasorrelajante y antihipertensivo relacionado con la vía NO/GMPc así como un posible bloqueo de canales de  $Ca^{2+}$ .





## **5.- OBJETIVOS**

## 5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos vasorrelajante y antihipertensivo del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona.

### 5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto vasorrelajante del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en un modelo *ex vivo* de anillos de aorta aislada de rata en presencia y ausencia de endotelio vascular.
2. Caracterizar el mecanismo de acción funcional del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en el modelo *ex vivo* de anillos de aorta aislada de rata.
3. Determinar su potencial efecto antihipertensivo agudo en ratas de la cepa SHR
4. Realizar estudios de acoplamiento molecular del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona con sus dianas moleculares.





## **6.- METODOLOGÍA.**

## **6. METODOLOGÍA.**

### **6.1 Evaluaciones farmacológicas**

#### **6.1.1 Animales**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 250 y 300 g, alimentadas con Rodent Labs Chow<sup>®</sup> y libres de acceso a agua en condiciones de bioterio. El estudio se llevó a cabo bajo la NOM-062- ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

#### **6.1.2 Reactivos**

Para la realización de este proyecto se emplearon los siguientes reactivos: 2-fenil-1-benzopiran-4-ona, cloruro de carbacol, bitartrato de noradrenalina (NA), Nitro-arginina-metil-éster (L-NAME), 1-*H*-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3a]-quinoxalin-1-ona (ODQ), indometacina, nifedipina y amlodipina todos ellos adquiridos en Sigma-Aldrich<sup>®</sup> Co. (St. Louis, MO, USA).

#### **6.1.3 Obtención de la aorta de rata**

Para obtener los segmentos de aorta, los animales fueron colocados en una cámara de éter etílico para ser eutanizados, posteriormente, se realizó una disección abdominal para extraer la aorta torácica, esta se limpió de manera cuidadosa para eliminar el tejido conectivo, y evitar daño al tejido muscular y endotelial. Una vez limpia la aorta, fue cortada en segmentos de 3-5 mm de longitud. Por otro lado, para los segmentos empleados de aorta libre de endotelio, este fue retirado de manera mecánica.



Figura 13: Obtención de la aorta de rata

#### 6.1.4 Sistema de determinación del efecto vasorrelajante, registro de datos.

Para la determinación del efecto vasorrelajante, los anillos previamente cortados y limpios se colocaron en 10 mL de solución de Ringer-Krebs [ (mM) NaCl (118), glucosa 11.4, NaHCO<sub>3</sub> (25), KCl (4.7), MgSO<sub>4</sub> (1.2) ,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1.2) , EDTA (0.026), CaCl<sub>2</sub> (2.5)], a pH 7.4 y con un burbujeo constante de una mezcla gaseosa O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95:5%), la solución se mantuvo a 37°C, con un baño recirculador. De manera individual los anillos se colocaron en la cámara de incubación, donde por un lado se encontraba unido con un gancho al extremo de la cámara y, por otro lado, a un transductor de fuerza Grass modelo FT 03 el cual emite los registros, y posteriormente, las envía a un polígrafo BIOPAC systems UIM 100C (**Figuras 14 y 15**).

“ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN FUNCIONAL DEL FLAVONOIDE 2-FENIL-1-BENZOPIRAN-4-ONA Y SU EFECTO ANTIHIPERTENSIVO”

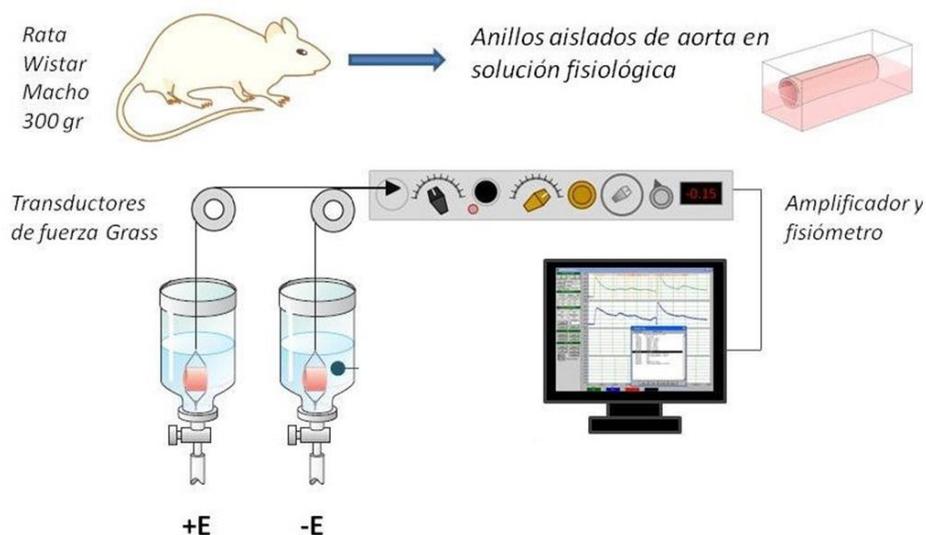


Figura 14: Sistema de determinación del efecto vasorrelajante

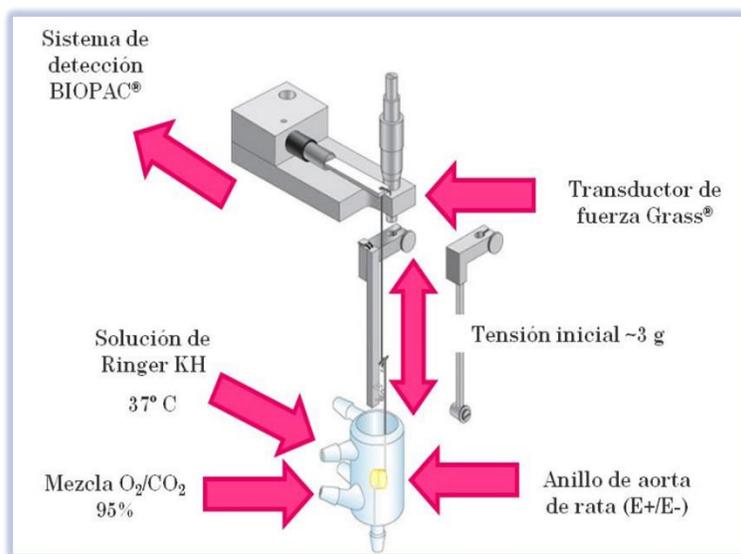


Figura 15: Sistema de detección BIOPAC (Vergara-Galicia, 2007)

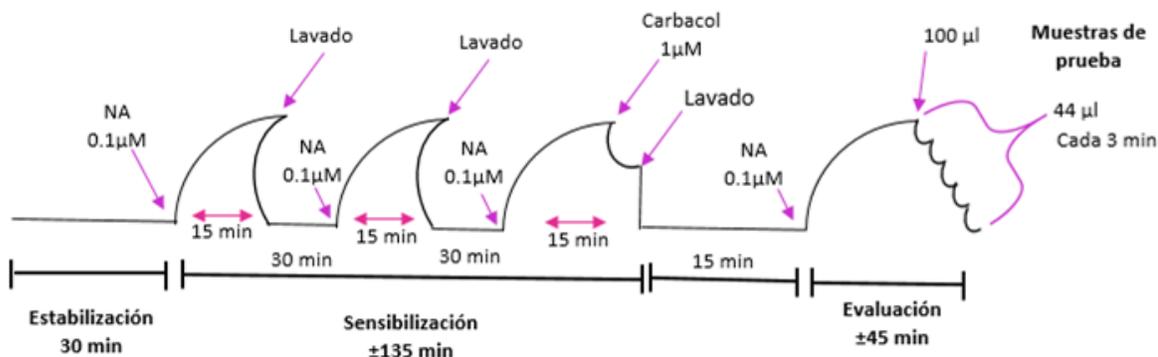
### 6.1.5 Evaluación del efecto vasorrelajante.

Los anillos fueron sometidos a una tensión basal de 3 g. de fuerza y durante un período de 30 minutos el tejido se dejó estabilizar. Posteriormente, durante 15 minutos el tejido se sensibilizó con noradrenalina (NA) 0.1  $\mu$ M a intervalos de 30

minutos (por triplicado). Después de cada una de las exposiciones del tejido a estimulación con NA este fue lavado con solución de Krebs y recuperar así el estado basal de tensión. Para identificar la presencia y ausencia de endotelio en los tejidos, se adicionó carbacol 1  $\mu\text{M}$ , esto antes del último lavado en la tercera contracción.

El tejido previamente sensibilizado con y sin endotelio dependiendo el ensayo realizado, fue puesto en contacto con las diferentes concentraciones del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona de forma acumulativa [3 a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ] en  $\frac{1}{4}$  de logaritmo (**Figura 16**). Posteriormente, se construyeron curvas concentración-respuesta, utilizando el programa AcqKnowledge (BIOPAC, INC., USA).

Para el control positivo en presencia de endotelio, se usó carbacol, es un agonista muscarínico encargado de la activación del receptor de acetilcolina presente en el sistema nervioso parasimpático, por el contrario, en el ensayo con ausencia de endotelio se empleará nifedipina (bloqueador de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) como vehículo para las muestras de prueba.

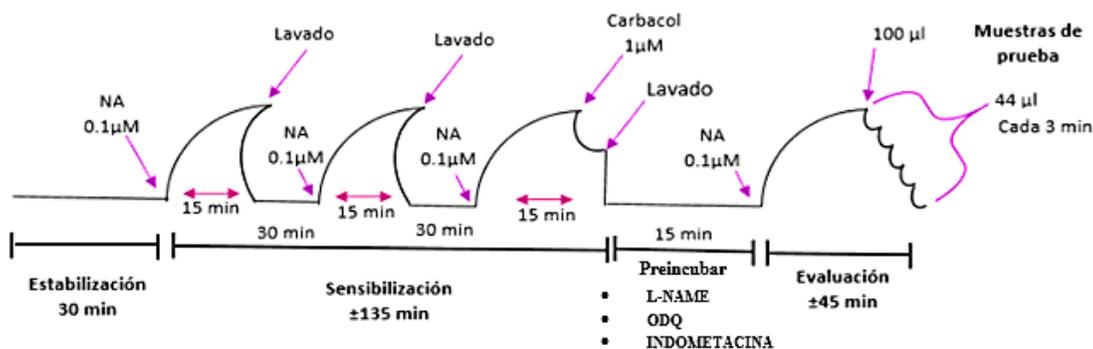


**Figura 16: Evaluación del efecto vasorrelajante en anillos de aorta de rata contraídos con NA 0.1  $\mu\text{M}$ .**

### 6.1.5.1 Determinación del mecanismo de acción del compuesto flavona dependiente de endotelio

La determinación del mecanismo de acción se realizó con el flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona, siguiendo la metodología anteriormente descrita. Se realizaron 5 experimentos usando anillos de aorta con endotelio que fueron puestos en contacto

durante 15 minutos con diferentes inhibidores, L-NAME (10  $\mu\text{M}$ ); inhibidor de la óxido nítrico sintasa, indometacina (10  $\mu\text{M}$ ); inhibidor de la ciclooxigenasa (COX) y ODQ (10  $\mu\text{M}$ ); inhibidor de la guanilato ciclasa soluble. Posteriormente, el tejido se contrajo con NA (0.1  $\mu\text{M}$ ) y se agregaron las concentraciones del flavonoide de manera acumulativa (**Figura 17**).



**Figura 17: Determinación del mecanismo de acción del compuesto flavona dependiente de endotelio con los inhibidores L-NAME, ODQ e Indometacina**

### 6.1.5.2 Determinación del mecanismo de acción vasorrelajante independiente de la presencia de endotelio.

Para la determinación del mecanismo de acción vasorrelajante independiente de la presencia de endotelio se realizaron 3 experimentos por separado usando NA, KCl 80 mM y  $\text{CaCl}_2$ .

#### 6.1.5.2.1 Influencia de la actividad vasorrelajante del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona sobre el efecto contráctil de NA en anillos de aorta de rata sin endotelio.

La determinación del efecto contráctil de NA se realizó siguiendo la metodología descrita en el punto 6.1.5 hasta la fase de sensibilización, se agregó NA de forma acumulativa (0.1  $\mu\text{M}$ ) con la finalidad de construir una curva concentración-respuesta, posteriormente se incubó durante 15 min el flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona y se agregó NA para comparar el efecto contráctil con respecto a la curva control (**Figura 18**).

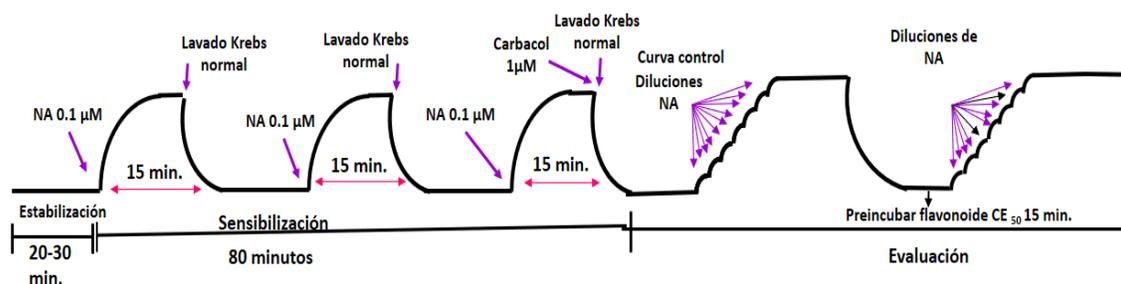


Figura 18: Influencia de la actividad vasorrelajante de las muestras de prueba sobre el efecto contráctil de NA.

### 6.1.5.2.2 Efecto del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona sobre la contracción inducida con KCl 80 mM

La determinación del mecanismo de contracción por calcio extracelular se realizó con el flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona, siguiendo la metodología anteriormente descrita en el punto 6.1.5. Se realizaron 5 experimentos usando anillos de aorta sin endotelio en donde la cuarta contracción se realizó adicionando una solución Krebs con KCl 80 mM. Posteriormente, se agregaron las concentraciones de manera acumulativa del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona (Figura 19).

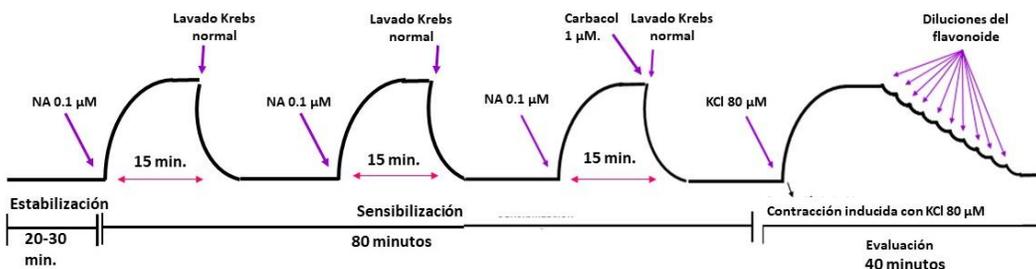
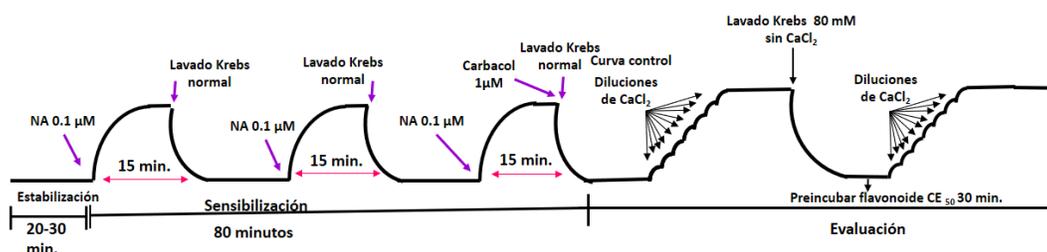


Figura 19: Determinación del mecanismo de acción del compuesto flavona independiente de la presencia de endotelio. Contracción inducida por calcio extracelular

### 6.1.5.2.3 Contracciones acumulativas con CaCl<sub>2</sub>

La determinación del mecanismo de acción independiente de endotelio se realizó con el flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona, siguiendo la metodología anteriormente descrita en el punto 6.1.5 hasta la tercera contracción en donde se realiza el lavado con Krebs sin Ca<sup>2+</sup>. Posteriormente, se realizó un lavado con Krebs

sin  $\text{Ca}^{2+}$  y se esperó a la estabilización del tejido. Subsiguientemente, se agregó  $\text{CaCl}_2$  (80  $\mu\text{M}$  a 27 mM) de forma acumulativa a la cámara de incubación, con el objetivo de construir una curva control. El tejido se lavó y se alcanzó el estado basal, a continuación, se pre-incubó a la  $\text{CE}_{50}$  del ED durante 15 minutos y, posteriormente, se agregó  $\text{CaCl}_2$  (80  $\mu\text{M}$  a 27 mM) de forma acumulativa, para finalmente comparar el efecto contráctil del  $\text{CaCl}_2$  en ausencia y presencia del compuesto (**Figura 20**)



**Figura 20: Determinación del mecanismo de acción del compuesto flavona independiente de la presencia de endotelio. Contracciones acumulativas con  $\text{CaCl}_2$ .**

## 6.2 Análisis estadístico

Los resultados obtenidos del efecto vasorrelajante y del mecanismo de acción son expresados como la media de 5 animales  $\pm$  el error estándar de la media. Las curvas concentración-respuesta (CCR) se realizaron con el programa Origin 8.0. El análisis estadístico para cada curva se realizó en el programa de GraphPad Prism 8, estableciendo una diferencia significativa de  $p < 0.05$  mediante un análisis de dos vías (ANOVA) seguida de una prueba comparativa de Bonferroni.

## 6.3 Determinación del efecto antihipertensivo del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

### 6.3.1 Animales

En este estudio se utilizaron ratas macho adultas de 6 meses de edad (250-300 g) de una cepa de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) y de la cepa Wistar Kyoto (WKY) alimentadas *ad libitum* con dieta comercial. El estudio se llevó a cabo bajo la NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

### 6.3.2 Evaluación del efecto antihipertensivo del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en un modelo agudo no invasivo

Para la determinación del efecto antihipertensivo del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona se formaron tres grupos de 8 animales de la cepa SHR: a un grupo (G1), donde se les administró, por vía intragástrica, el vehículo (agua/etanol 1%), al grupo de prueba (G2), que se le administró vía intragástrica el flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona a una dosis de 50 mg/kg, y al tercer grupo se le administró el fármaco de referencia (amlodipino 5 mg/kg) y un cuarto grupo de ratas WKY usadas como control normotenso a las cuales se les administró, por vía intragástrica, 1 mL de agua. Se midió PAS, PAD y frecuencia cardiaca (FC), esto con ayuda de un Pletistómetro LE5001, HARVARD APPARATUS previsto del programa Chart V 4.2 de Powerlab ADInstruments. Se realizaron al menos 8 lecturas por animal, al tiempo 0, 1, 3, 5 y 7 horas posteriores a la administración (Figura 21)

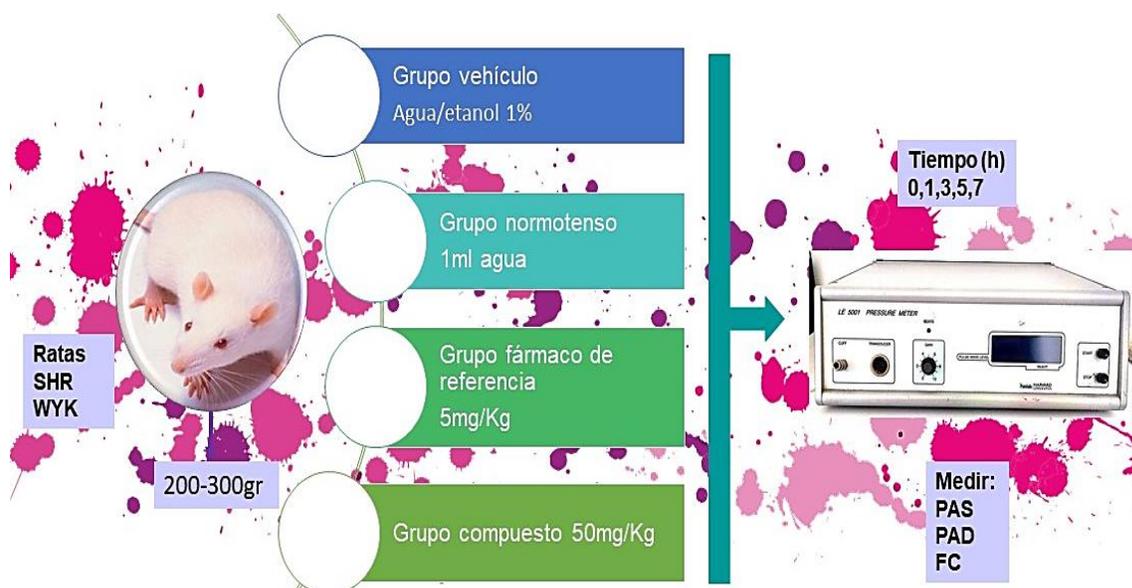


Figura 21: Evaluación del efecto antihipertensivo de la 2 fenil-1-benzo-piran-4-ona en un modelo agudo no invasivo

## 6.4 Evaluación *in silico*

Debido a los resultados obtenidos en los ensayos *ex vivo* se realizó el acoplamiento molecular del compuesto 2-fenil-1-benzopiran-4-ona sobre los sitios activos de la enzima eNOs (óxido nítrico sintasa endotelial humano) y canal de calcio humano (Lipkind y Fozzard 2003).

### 6.4.1 Acoplamiento molecular del compuesto 2-fenil-1-benzopiran-4-ona sobre eNOS y canal de calcio.

En primer lugar, se realizó el acoplamiento molecular sobre la enzima eNOS. Para ello se buscó modelo de la estructura tridimensional de esta enzima en la base de datos: Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>). Se escogió la estructura del óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) con sustrato de arginina (PDB ID 3NOS).

Inicialmente se removieron todas las moléculas de agua y también el ligando cristalográfico. Los experimentos de acoplamiento molecular fueron dirigidos al sitio de unión conocido de cada objetivo, el centro de la rejilla para el sitio uno se ubicó en las coordenadas (24.81, 17.64, 22.29) y para el sitio dos en (19.44, 13.30, 35.28) con un tamaño de malla de 25x30x25 Å.

En el caso del canal de calcio humano tipo L, se empleó el modelo de Lipkind y Fozzard, el centro se ubicó en (0.04, -0.11, -0.12) con un tamaño de 60x60x40 Å. Los sistemas fueron preparados en Chimera y el estudio de acoplamiento molecular se realizó utilizando el programa Autodock Vina 1.13.1 para cada ligando. Se realizaron 100 ejecuciones de acoplamiento independientes, en donde todas las torsiones del ligando fueron consideradas para moverse durante el acoplamiento, se calculó la desviación cuadrática (RMSD), y se construyeron diagramas de interacción proteína ligando con ayuda del software Maestro Schrödinger.

#### 6.4.1.1 Validación del acoplamiento molecular

La validación se efectuó a través del programa Autodock Vina 1.13.1 utilizando el código PDB (3NOS) de la proteína, siendo una enzima del organismo *Homo*



*Sapiens* cristalizada mediante rayos X y con una resolución de 2.40 Å. La estructura cristalográfica de rayos X fue construida, minimizada energéticamente y acoplada con la región de los sitios activos 1 y 2 constituida por los residuos de los aminoácidos principales. Para determinar la eficacia de la validación, se consideran las interacciones importantes entre el ligando unido y los aminoácidos involucrados en el sitio activo, indicando que los parámetros de simulación de acoplamiento son buenos y por tanto se reproducen dichas interacciones entre la estructura de rayos X de dicha enzima y ligando. Para que la validación se considere como tal, el valor de RMSD debe ser  $<2 \text{ \AA}$  (Hevener *et al.*, 2009).



# 7.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.



Como se observa en la **gráfica 1**, las curvas concentración-respuesta (CCR) muestran que el flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona posee un efecto vasorrelajante significativo siendo este dependiente de la concentración y parcialmente dependiente de la presencia de endotelio ya que al comparar los parámetros farmacológicos como el efecto máximo ( $E_{max}$ ) y la concentración efectiva 50 ( $CE_{50}$ ) observamos que la 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en presencia de endotelio es más potente que en ausencia de endotelio, esto sugiere que el mecanismo de acción vasorrelajante por el cual actúa puede estar dado por un conjunto de mecanismos relacionados con la activación de diferentes agentes vasorrelajantes derivados del endotelio tales como el óxido nítrico (NO), las prostaciclinas y el factor hiperpolarizante derivante del endotelio (EDHF) **(De la Serna, 2010)**.

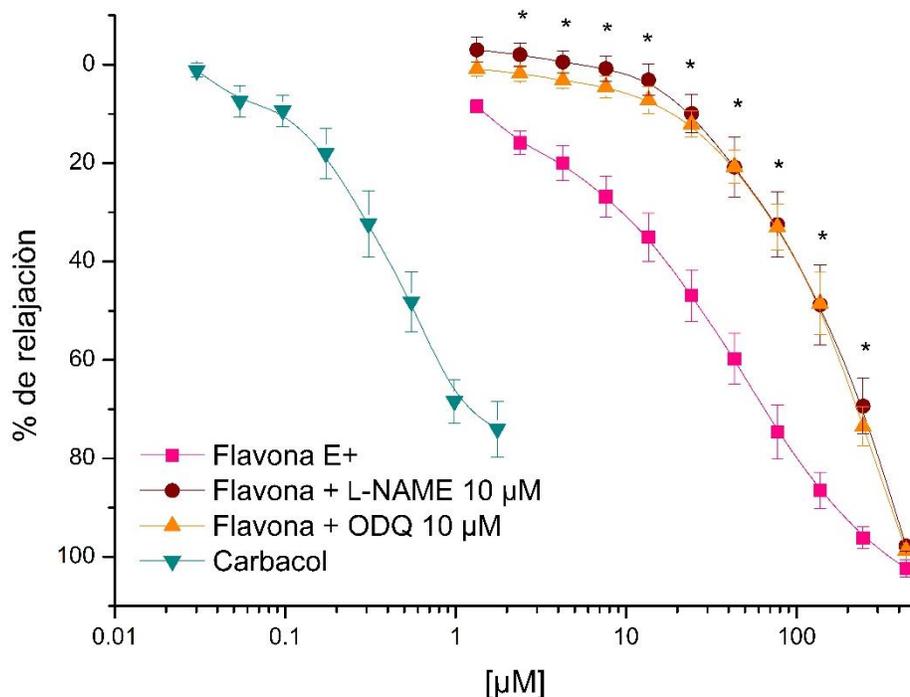
Debido a los resultados que mostró el flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en presencia y ausencia de endotelio, se decidió establecer el mecanismo de acción de manera más específica a través del uso de diferentes agentes inhibidores, bloqueadores y antagonistas.

## **7.2 Determinación del mecanismo de acción funcional del compuesto flavona dependiente de endotelio.**

Como se ha mencionado, el NO es un mediador endógeno que actúa como segundo mensajero, se encarga de realizar funciones variadas y dentro de las más importantes encontramos su función como vasodilatador regulando así el tono vascular, es sintetizado a partir de la enzima NOS procedente de la L-arginina **(Francis et al., 2010)**. El NO mantiene el tono vascular al unirse con su receptor, la proteína guanilatociclasa soluble (GCs) provocando la conversión del GTP a GMPc. A su vez el GMPc actúa como segundo mensajero de señalización que activa a su vez a la enzima proteína quinasa G (PKG) que es la encargada de fosforilar la proteína blanco para desencadenar la respuesta celular, que en este caso es vasorrelajación **(Tsai et al., 2009)**.

Para la determinación del mecanismo de acción del compuesto flavona, se usaron anillos de aorta de rata con endotelio, con el fin de corroborar si el efecto ejercido es dependiente de la producción de segundos mensajeros como el NO, GMPc, entre otros.

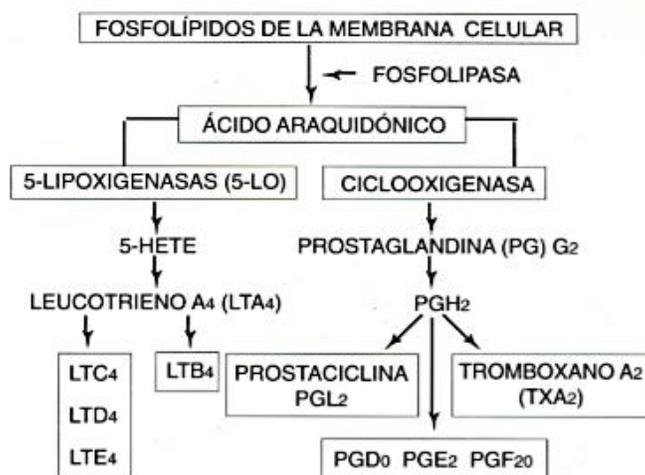
Los anillos de aorta de rata fueron probados en presencia del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona con endotelio contraídos con NA y pre incubados con diferentes inhibidores, L-NAME (inhibidor del óxido nítrico sintasa), ODQ (inhibidor de la guanilato ciclasa soluble) e indometacina (inhibidor de la COX-1) (Zhao, *et al.*, 2000; Ferrer, *et al.*, 1998).



**Gráfica 2: Efecto vasorrelajante del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en anillos de aorta aislada de rata precontraídos con NA en presencia de endotelio y preincubado con los inhibidores L-NAME y ODQ. Anova 2 vías, comparativa Bonferroni  $p < 0.05$  flavona + L-NAME, ODQ vs Flavona E+.**

Como se observa en la **gráfica 2**, la CCR del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en presencia de L-NAME presentó un  $E_{\text{max}} = 97.8 \pm 0.94 \%$  y una  $CE_{50}$  de  $128.61 \pm 8.13 \mu\text{g/mL}$ . La CCR muestra un desplazamiento a la derecha, en donde el efecto y la potencia disminuyeron de manera significativa con respecto a la curva control

(Flavona E+), este comportamiento sugiere que el proceso de vasorrelajación está relacionado con la producción del NO, ya que la inhibición de la NOS en presencia de L-NAME provoca la disminución de la producción de NO, y como consecuencia la disminución en la vasorrelajación (**Sánchez, 2003**). En el caso de la CCR de flavona en presencia de ODQ, se ve desplazada a la derecha con una disminución del efecto y la potencia con la misma intensidad que la mostrada en el experimento anterior, presentó un  $E_{max} = 98.69 \pm 0.84 \%$  y una  $CE_{50} = 136.78 \pm 6.28 \mu\text{g/mL}$ . Este resultado se debe al bloqueo que ejerce el ODQ sobre la guanilato ciclasa soluble evitando así la formación de GMPc a partir de GTP, que este a su vez impide la reducción del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular promoviendo así la relajación del músculo liso vascular (**Zhao, et al., 2000; Orallo, 2010**).



**Figura 22: Biosíntesis de la prostaciclina (PGL<sub>2</sub>) (Araya, 2006)**

Por otro lado, los eicosanoides son productos de oxigenación de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, uno de los más abundantes que podemos encontrar es el ácido araquidónico (AA), este es precursor de varias moléculas lipídicas a través de diferentes rutas. La prostaciclina (PGL<sub>2</sub>) es un derivado del ácido araquidónico a través de la ruta de la ciclooxigenasas (**Figura 22**), es un potente agente vasodilatador, antiproliferativo, anti-trombótico y antiplaquetario, sus efectos están relacionados con el agonismo de un receptor acoplado a proteína G

(Araya, 2006). Se sabe que la unión de PGI<sub>2</sub> (u otro de dichos agonistas) a su receptor conduce al acoplamiento con las proteínas G y aumenta los niveles intracelulares de AMPc (Figura 23) (Moncada *et al.*, 1979).

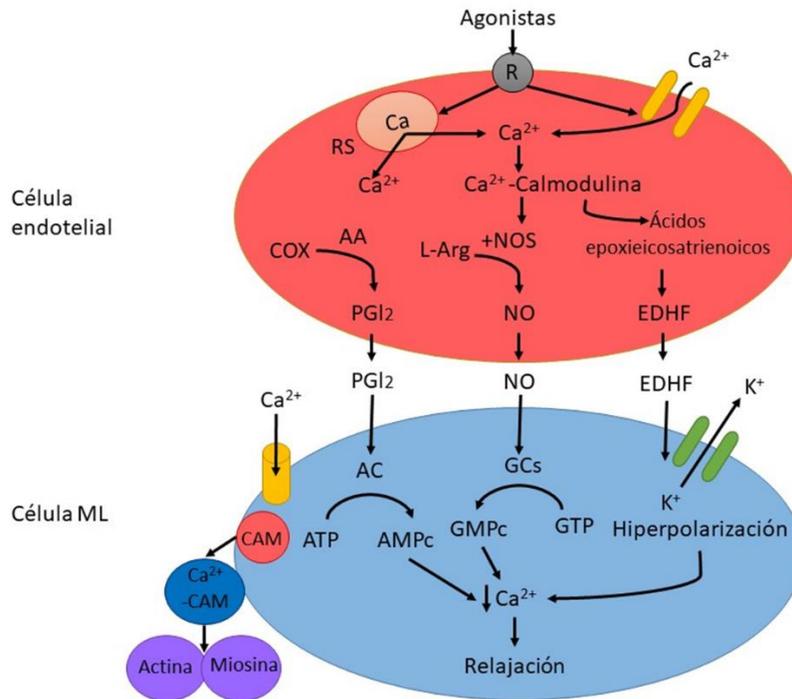
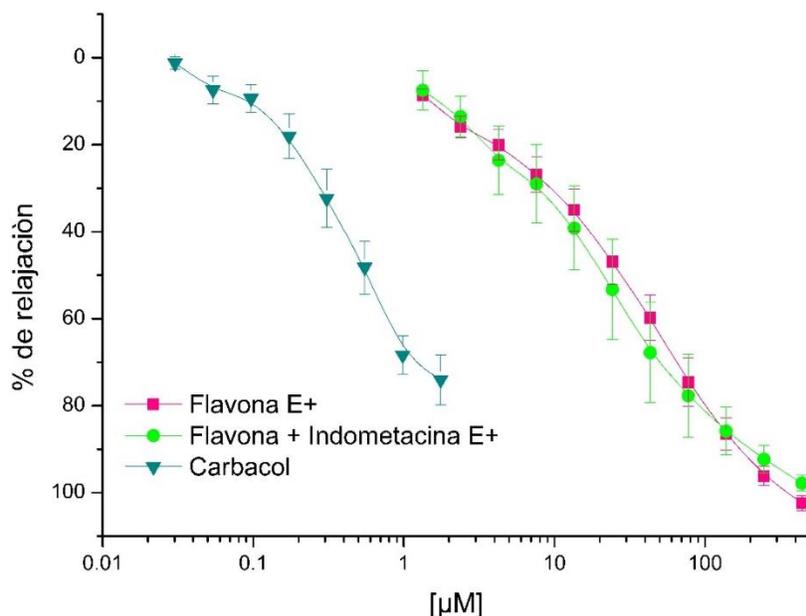


Figura 23: Vía de señalización de PGI<sub>2</sub>/AMPC



**Gráfica 3: Efecto vasorrelajante del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en anillos de aorta aislada de rata precontraídos con NA en presencia de endotelio y preincubado con el inhibidor indometacina. Anova 2 vías, comparativa Bonferroni  $p < 0.05$  flavona + Indometacina vs Flavona E+.**

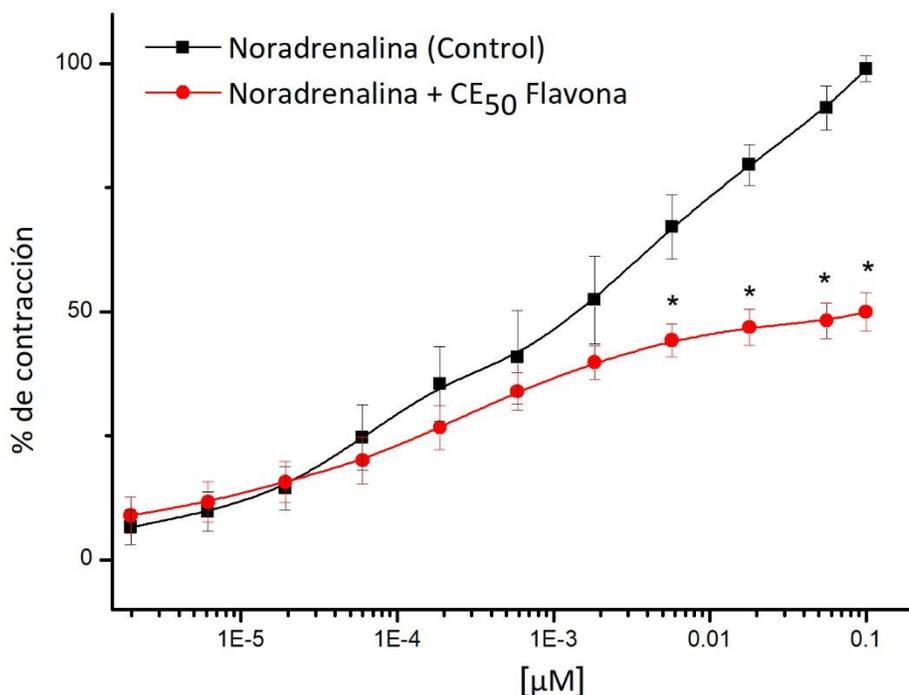
Este experimento fue realizado para descartar o asumir que el efecto vasorrelajante atribuido al flavonoide 2-fenil-1-benzopiran4-ona está relacionado con la vía de las prostaciclina  $PGI_2$ . Como se observa en la **gráfica 3**, la CCR del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran4-ona en presencia de indometacina mostró un  $E_{max} = 97.8 \pm 1.81 \%$  y una  $CE_{50}$  de  $48.8 \pm 11.53 \mu g/mL$ . La CCR del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran4-ona + indometacina no muestra una diferencia significativa con respecto a la CCR control, dicho comportamiento sugiere que el proceso de vasorrelajación no está relacionado con la producción de prostaciclina  $PGI_2$ , la indometacina provoca inhibición la enzima ciclooxigenasa (COX) aunque su efecto es más intenso sobre la COX-1 que sobre la COX-2, es responsable de la síntesis de prostaglandinas impidiendo así la síntesis de prostaciclina  $PGI_2$  (**Pérez, 2008**).

### 7.2.1 Determinación del mecanismo de acción vasorrelajante independiente de la presencia de endotelio.

### 7.2.1.1 Influencia de la actividad vasorrelajante del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona sobre el efecto contráctil de NA en anillos de aorta de rata sin endotelio.

La noradrenalina es un neurotransmisor perteneciente al grupo de las catecolaminas, estas se encargan de llevar a cabo múltiples funciones de regulación, dentro de las cuales encontramos vasodilatación o vasoconstricción. Su liberación esta mediada por hormonas tales como la histamina, angiotensina II y bradicinina, ejerce su efecto mediante la unión a los receptores adrenérgicos o adrenorreceptores **(Alcántara-Hernández et al., 2018)**. Cuando los adrenorreceptores se encuentran localizados en la membrana plasmática de las células y son activados, se generan respuestas celulares específicas mediante varias vías de señalización en las que participan elementos como las proteínas G, enzimas membranales como la fosfolipasa C y adenilciclase (AC) que producen moléculas conocidas como “segundos mensajeros” tales como el DAG o IP<sub>3</sub> que al difundirse por la célula activan el retículo sarcoplásmico por unión a sus receptores que a su vez provocan la liberación de Ca<sup>2+</sup> generando contracción **(Reyes-Juárez et al., 2006)**.

El propósito de este experimento es evaluar si el efecto ejercido por el flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona actúa sobre sistemas de contracción regulados por receptores adrenérgicos.

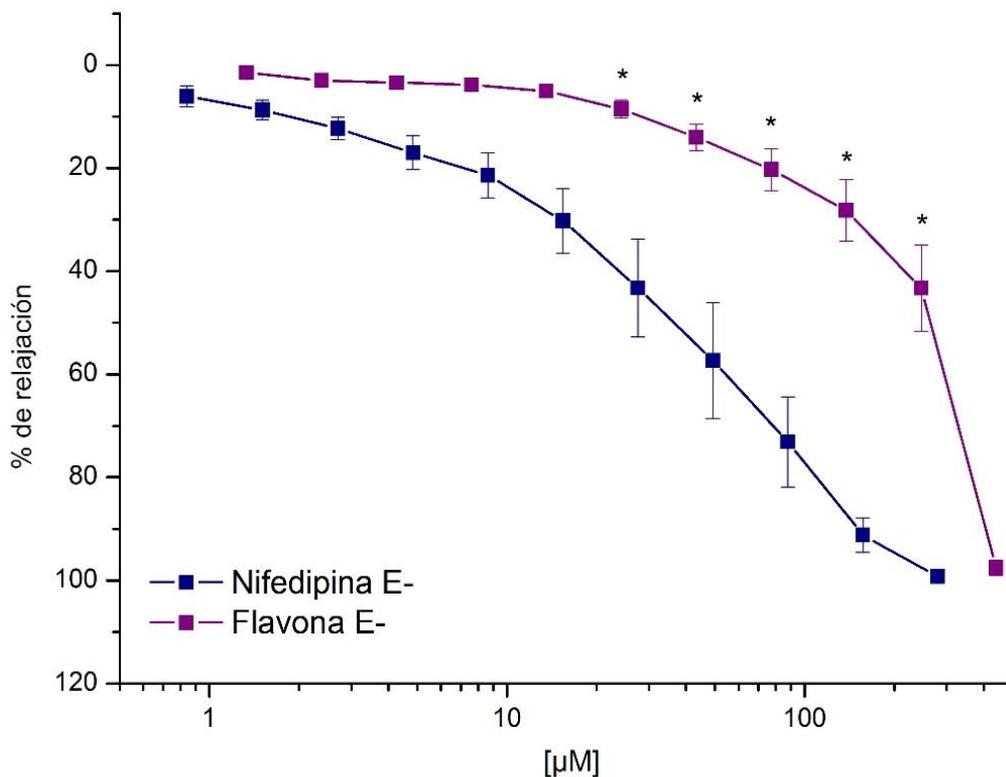


**Gráfica 4: Efecto vasorrelajante del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona sobre el efecto contráctil de NA en anillos de aorta de rata sin endotelio. Anova 2 vías, comparativa Bonferroni \*p<0.05 control NA vs NA + CE<sub>50</sub> flavona.**

En la gráfica 4 se puede observar que al preincubar la CE<sub>50</sub> del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona ( $97.56 \pm 5.87 \mu\text{M}$ ) se opuso a la contracción inducida por la NA ( $0.1 \mu\text{M}$ ) con respecto a la curva control, sugiriendo un antagonismo no competitivo a un sitio alostérico sobre los receptores adrenérgicos implicados en la contracción del músculo liso de la aorta de rata, sin embargo, este no es el único mecanismo implicado en la vasorrelajación, ya que pueden estar implicados otros mecanismos tales como el bloqueo de canales de calcio, despolarización de la membrana o la participación de segundos mensajeros, como ya se ha corroborado anteriormente, la participación de la vía NO/GMPc.

### 7.2.1.2 Efecto del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona sobre la contracción inducida con KCl 80

El estado contráctil del MLV depende en primera instancia de la concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ . Para mantener este nivel intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  es necesario que este sea liberado desde los depósitos intracelulares, ejemplo de ello es el retículo sarcoplásmico y la mitocondria. Otra forma de obtener  $\text{Ca}^{2+}$  es la entrada de este ion de manera extracelular a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes, estos canales se abren ante la despolarización del potencial de membrana provocando consecuentemente contracción muscular, por el contrario, una hiperpolarización los cierra generando relajación (Baylie *et al.*, 2011).



Gráfica 5: Efecto del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona, contracción a KCl 80 mM.

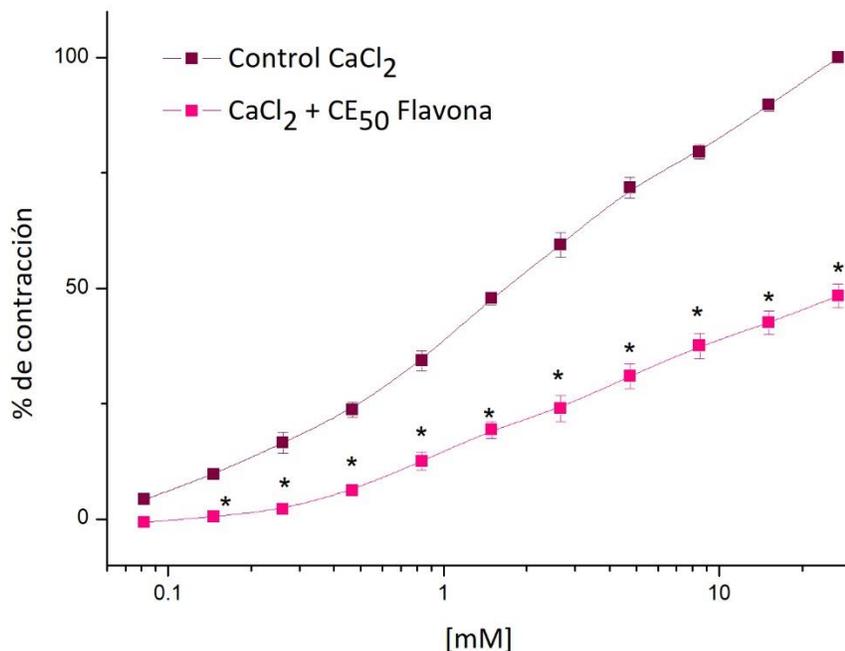
Cuando se adiciona una solución despolarizante, en este caso una solución de KCl 80 mM, la polaridad del medio externo es modificada debido al aumento de la concentración de los iones, es así como el potencial de membrana cambia, induciendo una respuesta contráctil mediada por el movimiento del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , en cambio cuando la membrana se hiperpolariza, estos canales

se cierran disminuyendo así la concentración del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, induciendo a la relajación de la célula.

De acuerdo a los datos mostrados en la gráfica 5, el efecto del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona sobre la contracción inducida por KCl 80 Mm es dependiente de la concentración al inhibir la contracción inducida por el mismo, mostrando un  $E_{\text{max}} = 97.52 \pm 1.44 \mu\text{g/mL}$ , sin embargo, el efecto presentado es menos potente comparado con el control nifedipina con un  $E_{\text{max}} = 99.20 \pm 0.92 \mu\text{g/mL}$ , estos datos sugieren que uno de los mecanismo por el cual actúa el flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona está relacionado con el bloqueo de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$ , y preliminarmente podría ver su interacción con el bloqueo de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ , impidiendo el aumento del mismo y a su vez la contracción del ML. Sin embargo, es importante realizar otros experimentos para corroborar dicho efecto farmacológico.

### 7.2.1.3 Efecto del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona sobre las contracciones acumulativas con $\text{CaCl}_2$

Existe un número importante de canales de calcio en el sistema nervioso, estas se clasifican de acuerdo a sus propiedades farmacológicas y electrofisiológicas, siendo de este último el voltaje la característica particular para activarlos. Encontraremos 3 categorías para estos, desde alto voltaje hasta bajo voltaje, siendo los canales de calcio tipo L los más usados y hasta ahora descritos en la literatura. Se ha comprobado que las células musculares lisas de los vasos contienen este tipo de canales de calcio voltaje dependiente. La regulación del flujo de calcio a través de estos canales es un medio importante para controlar el estado contráctil de la musculatura lisa. Los canales tipo L son regulados por diversos segundos mensajeros pertenecientes a mecanismos señaladores (**Moreno et al., 2005**).



**Gráfica 6: Efecto vasorrelajante del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona las contracciones acumulativas con CaCl<sub>2</sub>.**

Como se mencionó con anterioridad, se observó de manera preliminar la participación de los canales de calcio, debido a esto, mediante este experimento se comprobó si dicha aseveración era certera. Como se observa en la gráfica 6, la preincubación del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona generó un  $E_{max} = 48.38 \pm 2.57$  % reduciendo de manera significativa el  $E_{max} = 100$  % inducido por CaCl<sub>2</sub> en las curvas control, que fue adicionado de manera acumulativa generando un cambio dependiente de la concentración. Con los resultados obtenidos se comprueba que la aseveración era certera ya que el flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona actúa sobre el bloqueo directo de los canales de Ca<sup>2+</sup> generando un decremento en el ingreso de Ca<sup>2+</sup> extracelular hacia el interior de las CML.

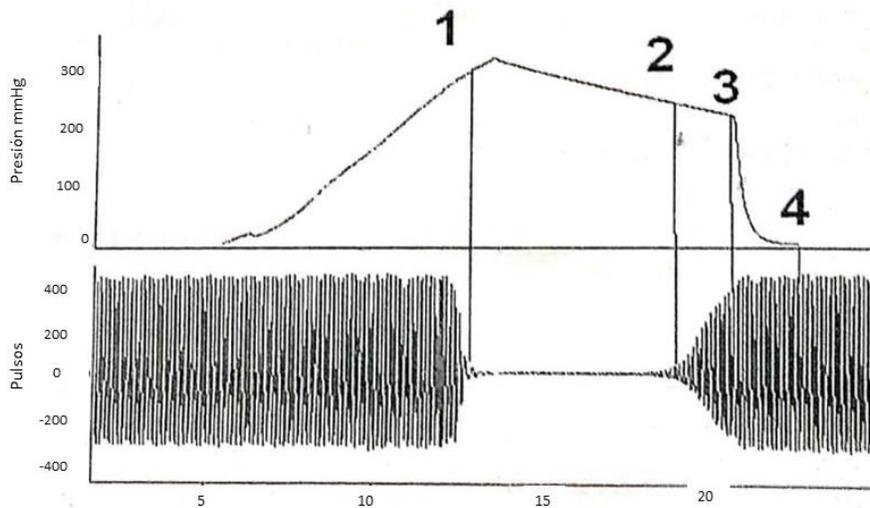
### 7.3 Determinación del efecto antihipertensivo del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en ratas espontáneamente hipertensas (SHR).

El pletistómetro LE 5001, es un aparato especialmente diseñado para la toma de medidas de presión arterial en animales usados en experimentación tales como ratones, ratas o perros. Su funcionamiento se basa en la técnica esfigmomanométrica usada para tomar medidas de presión en humanos. Este aparato consta de una membrana de presión, cuya función es ocluir el paso de sangre seguido de un transductor que captura los pulsos de presión arterial y ambos se colocan en la cola del animal para operar en la arteria caudal.



**Figura 24: LE 5001 medidor de presión arterial incruenta.**

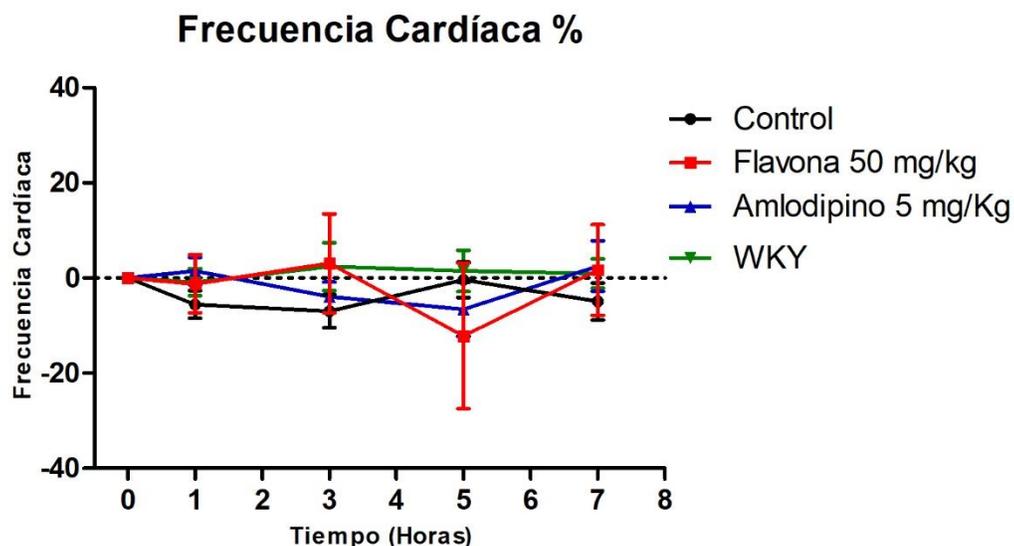
El LE 5001 (**Figura 24**) toma diversas medidas tales como presión sistólica o también conocida como presión máxima (SP), presión diastólica o presión mínima (DP), la presión media en donde esta es calculada a partir de la Fórmula:  $MP = DP + 0.33 \cdot (SP + DP)$  y por último la frecuencia cardiaca (HR).



**Figura 25: Proceso de las ondas durante la toma de una medida.**

El proceso de las ondas durante la toma de una medida (**Figura 25**) comienza cuando se enciende la bomba y la presión aumenta, haciendo que, a partir de cierta presión alcanzada, la amplitud de los pulsos empieza a caer llegando hasta cero (punto 1). Es ahí cuando la bomba para y la presión comienza a descender haciendo que la membrana comience a deshincharse. El punto uno sería la presión sistólica detectada en modo UP. Cuando reaparecen los pulsos (punto 2) representan la presión sistólica detectada en modo Down. Seguido de esto, la presión continúa descendiendo hasta que se llega a la detección de la presión diastólica, es cuando los pulsos han recuperado la amplitud original (punto 3) es así cuando se libera el aire de la bomba a través de una electro-válvula hasta que llega a cero y el equipo está preparado para tomar una nueva medición (punto 4).

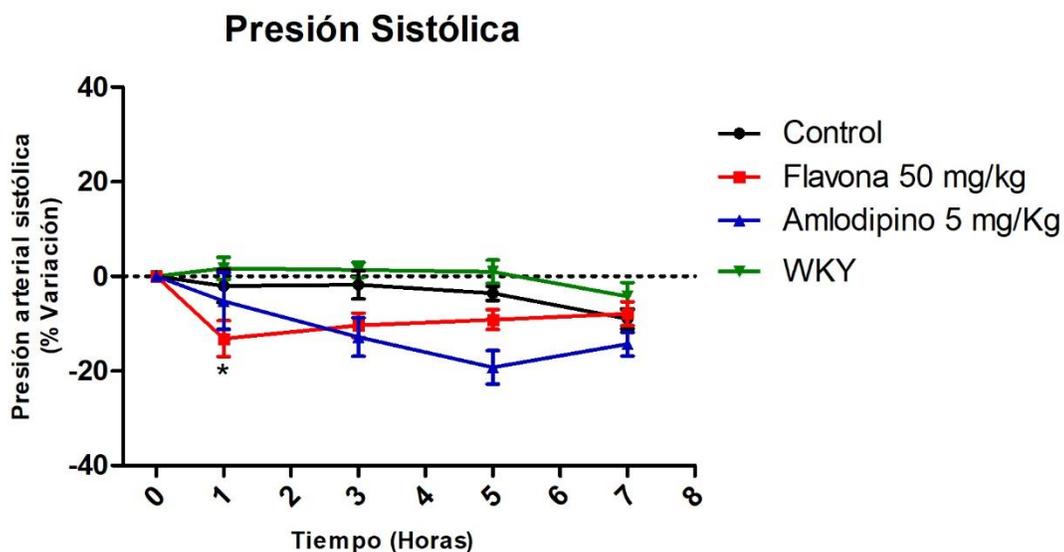
Una vez determinado el efecto vasorrelajante y el mecanismo de acción funcional del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona, se evaluó el efecto antihipertensivo por medio de un método no invasivo con el fin de correlacionar los efectos obtenidos de manera *ex vivo* con el comportamiento *in vivo*.



**Gráfica 7:** Determinación del efecto ejercido por el flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona a una dosis de 50 mg/Kg sobre la frecuencia cardíaca en un modelo *in vivo*. Los resultados son expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media de 8 experimentos. Anova de 2 vías comparativa Bonferroni  $*p < 0.05$  control vs flavona.

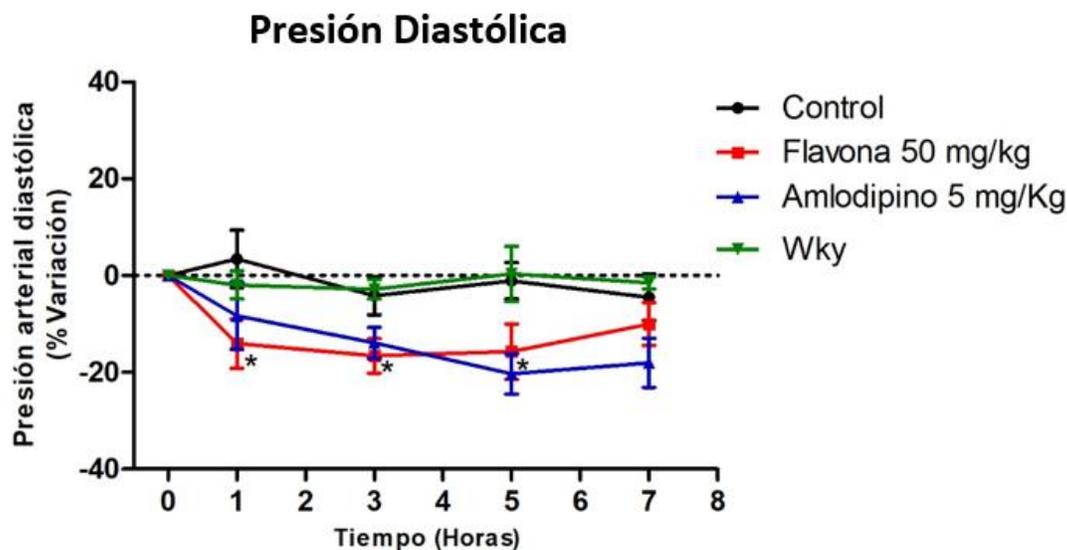
Una premisa básica y muy importante que debemos tomar en cuenta es que la presión sanguínea de animales es una variable fisiológica que puede cambiar rápidamente produciendo resultados dispares generalmente asociado a estímulos externos y al estado mental del animal. Por tanto, si los animales no están en condiciones normales y estos se encuentran en estado de estrés, las medidas tomadas no serán las correctas, ya que no estaremos tomando medidas basales sino los indicadores de estrés.

Como se observa en la **gráfica 7**, el flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona no modificó la frecuencia cardíaca de manera significativa, sin embargo, se observa una disminución de los valores a la hora 5 en el grupo tratado con el compuesto, mencionado lo anterior, podemos atribuirlo a un estado de estrés en los animales, que pudo ser causado por el tiempo de exposición al experimento o por un mal manejo de ellos, causando así, estos resultados dispares, sin embargo no existe una diferencia significativa dicho efecto.



**Gráfica 8: Determinación del efecto ejercido por el flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona a una dosis de 50 mg/Kg sobre la presión sistólica en un modelo *in vivo*. Los resultados son expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media de 8 experimentos. Anova de 2 vías comparativa Bonferroni \* $p < 0.05$  control vs flavona.**

La gráfica 8 muestra la actividad del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona sobre la presión sistólica, en donde observamos modificación significativa de los valores, ya que en la primera hora posterior a la administración hubo una disminución de los valores con respecto al control, sin embargo, este efecto no se mantuvo durante todo el experimento y conforme trascurrió el tiempo, los valores de la presión sistólica regresaron a su estado basal siendo estos similares a los presentados por el control.



Gráfica 9: Determinación del efecto ejercido por el flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona a una dosis de 50 mg/Kg sobre la presión diastólica en un modelo *in vivo*. Los resultados son expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media de 8 experimentos. Anova de 2 vías comparativa Bonferroni \* $p < 0.05$  control vs flavona.

La **gráfica 9** muestra el efecto antihipertensivo agudo del flavonoide 2-fenil-1-benzopiran-4-ona sobre la presión diastólica, mostrando una disminución significativa de los valores desde la primera hora, observando en la hora tres, el mayor efecto, sin embargo, este efecto no se mantuvo sostenido durante todo el experimento y en la hora 7 podemos visualizar el retroceso del mismo a valores basales. Este efecto puede estar relacionado con los mecanismos de acción relacionados a la activación de la vía del NO/GMPc, y la activación de canales de  $Ca^{2+}$ , disminuyendo de manera importante la resistencia de los vasos sanguíneos y por lo tanto una disminución de la presión arterial.

#### 7.4 Acoplamiento molecular del compuesto 2-fenil-1-benzopiran-4-ona sobre eNOS y canal de calcio.

Como se observó en los ensayos *ex vivo*, el compuesto 2-fenil-1-benzopiran-4-ona presenta efecto vasorrelajante relacionado con su participación en la cascada de señalización del NO/GMP así como el bloqueo de canales de calcio. Debido a estos

“ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN FUNCIONAL DEL FLAVONOIDE 2-FENIL-1-BENZOPIRAN-4-ONA Y SU EFECTO ANTIHIPERTENSIVO”

resultados se decidió realizar el acoplamiento molecular de este compuesto sobre 2 de los sitios activos de la enzima eNOS y sobre canales de calcio con la finalidad de conocer la interacción de dicho compuesto como regulador en el proceso de vasoconstricción y efecto sobre el MLV (Torres-Piedra *et al.*, 2011).

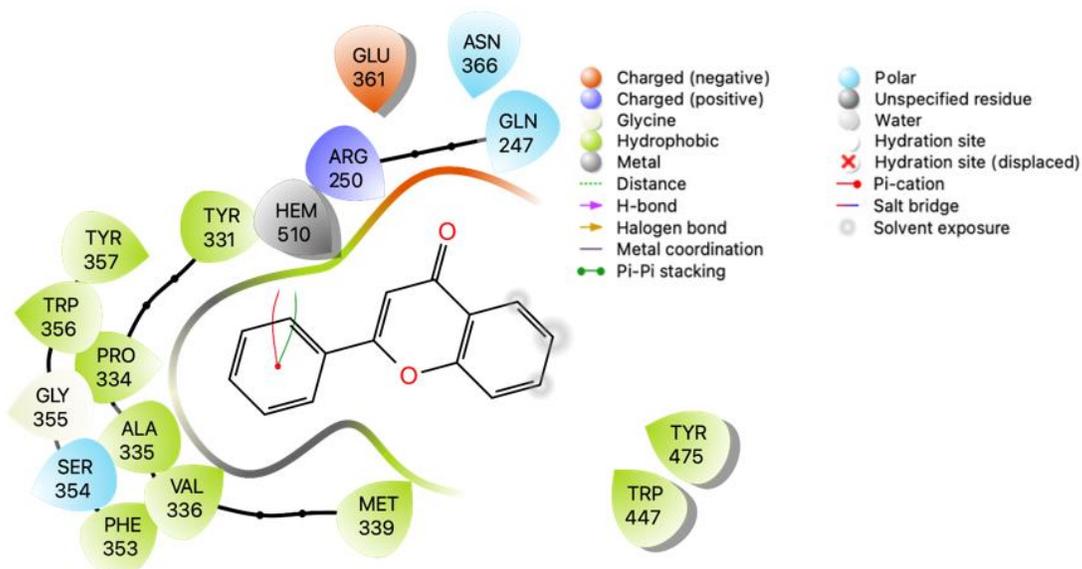


Figura 26: Mapa de interacción 2-D de la 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en el sitio 1 (proteína-ligando) contra 3NOS (imágenes creadas con el software maestro Schrödinger 2018)

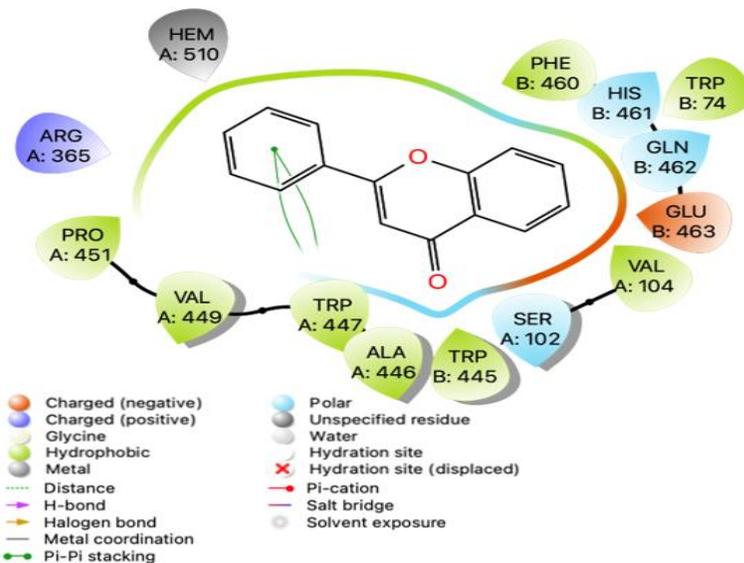
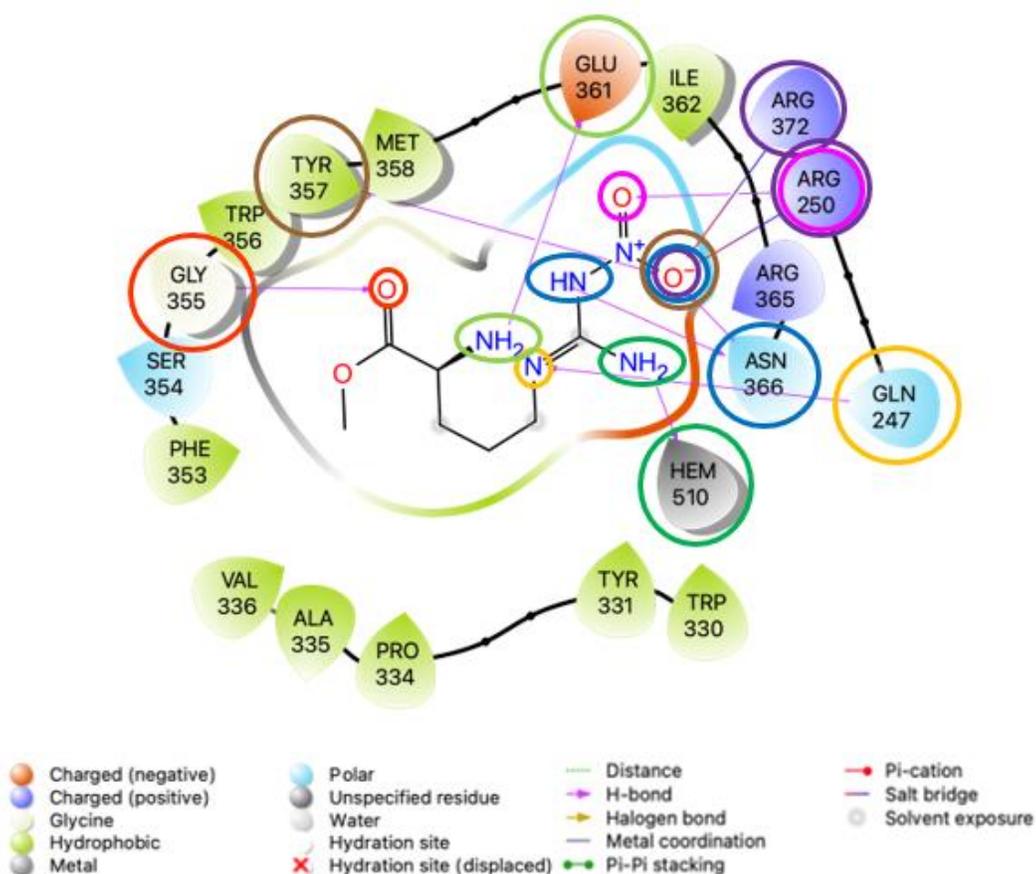
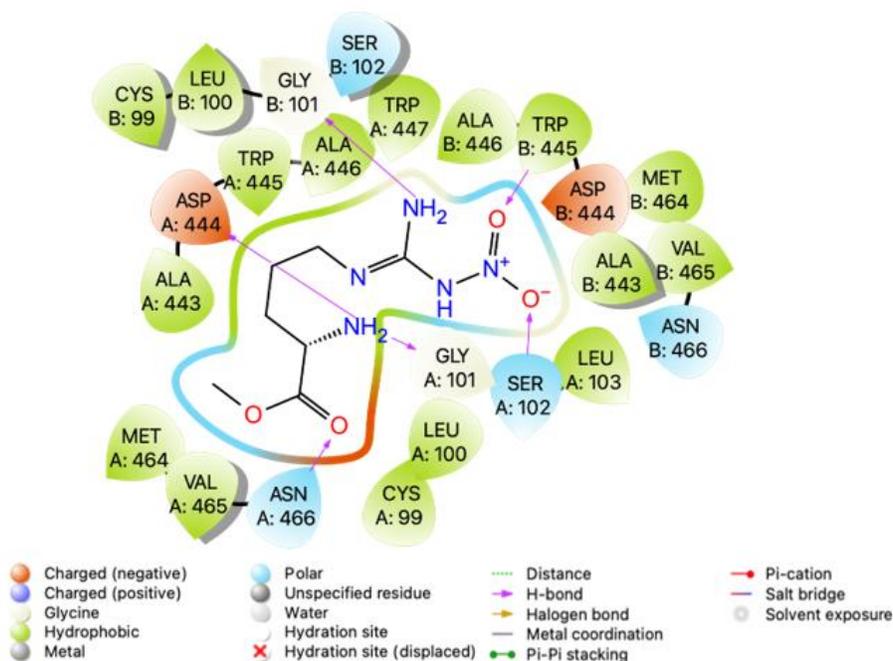


Figura 27: Mapa de interacción 2-D de la 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en el sitio 2 (proteína-ligando) contra 3NOS (imágenes creadas con el software maestro Schrödinger 2018).

En el caso de **3NOS**, el compuesto 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en el sitio 1 presentó al reagrupar las soluciones del acoplamiento molecular un RMSD= 0.61 Å y una energía de afinidad de unión de  $-7.9 \pm 0.01$  kcal/mol. En la **figura 26** se aprecian 2 tipos de interacciones entre el grupo Hem-510 y el anillo A de la flavona, en color verde las interacciones de tipo  $\pi$ - $\pi$ , siendo esta una de las interacciones más fuertes entre anillos aromáticos, y en color rojo podemos apreciar las interacciones  $\pi$ -catión siendo este un tipo de enlace no covalente (**Rosselló et al., 2006**). En el caso de del acoplamiento en el sitio 2 se presentó un RMSD= 0.08 Å y una energía de afinidad de unión de  $-9.6 \pm 1.6^{-14}$  kcal/mol, en la **figura 27** podemos observar las interacciones tipo  $\pi$ - $\pi$  entre la Trp-447 y el anillo A de la flavona, en color verde.



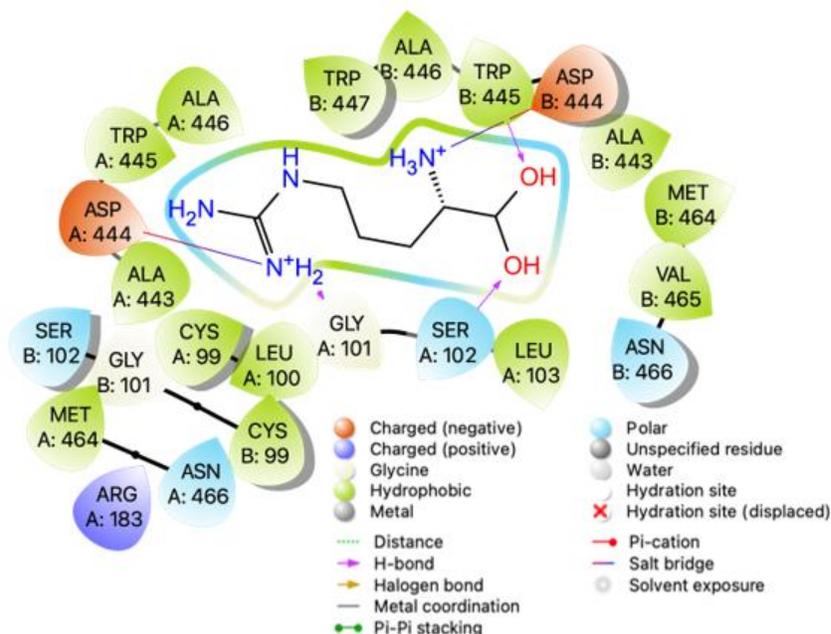
**Figura 28: Mapa de interacción 2-D del L-NAME en el sitio 1 (proteína-ligando) contra 3NOS (imágenes creadas con el software maestro Schrödinger 2018).**



**Figura 29: Mapa de interacción 2-D del L-NAME en el sitio 2 (proteína-ligando) contra 3NOS (imágenes creadas con el software maestro Schrödinger 2018).**

En el caso del acoplamiento de **3NOS** con el compuesto L-NAME en el sitio 1 presentó un RMSD= 1.34 Å y una energía de afinidad de unión de  $-7.2 \pm 0.02$  kcal/mol. En la **figura 28** podemos ver varias interacciones del tipo puente de hidrógeno (flechas moradas) entre el éster y la Gly-355 (naranja), la amina primaria cerca del éster y el Glu-361 (verde) y la otra con el Hem-510 (verde fuerte), la amina secundaria y el Asn-366 (azul), la amina terciaria y el Gln-247(amarillo), en el grupo nitro, podemos ver varias interacciones como el oxígeno con doble enlace y el Arg-250 (rosa), el oxígeno negativo, el Asn-366 (azul) y la Tyr-357 (café), este tipo de enlace da gran estabilidad a la unión entre la molécula y los aminoácidos, pero es más débil que el enlace covalente o el enlace iónico (**Ávila et al., 2005**). Así mismo, se encuentran interacciones del tipo puente salino (ion-ion) entre el oxígeno con carga negativa del grupo nitro y los aminoácidos Arg-372 y 250 (morado) siendo estas frecuentes entre una enzima y su sustrato. Mientras que en el caso del acoplamiento en el sitio 2 se presentó un RMSD= 3.84 Å y una energía de afinidad

de unión de  $-7.3 \pm 0.16$  kcal/mol, en la **figura 29** podemos observar las interacciones con los aminoácidos de la cadena A de tipo puentes de hidrógeno (flechas moradas) entre el éster y el Asn-466, la amina primaria pegada al éster con Asp-444 y el Gly-101 así como el oxígeno con carga negativa del grupo nitro y la Ser-102. Las interacciones con la cadena B son 2 una amina primaria y la Gly-101 y el grupo nitro con la Trp-445.



**Figura 30: Mapa de interacción 2-D del L-arginina en el sitio 1 (proteína-ligando) contra 3NOS (imágenes creadas con el software maestro Schrödinger 2018).**

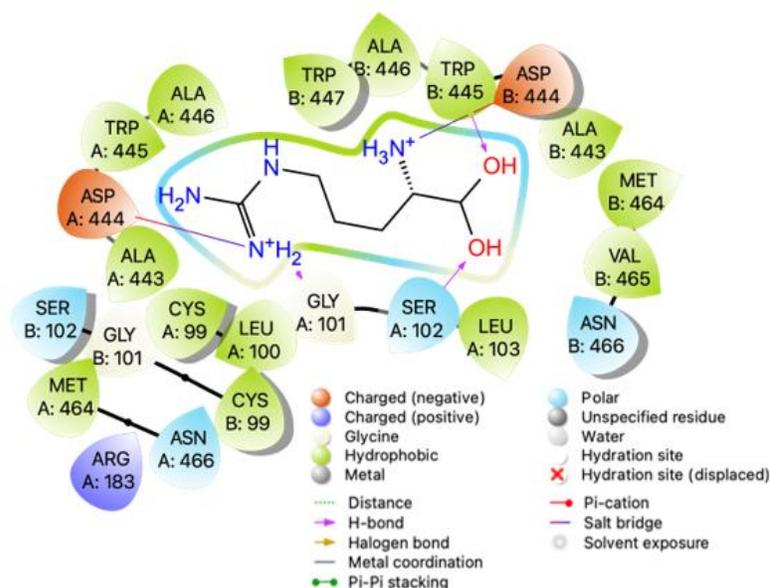


Figura 31: Mapa de interacción 2-D de la L-arginina en el sitio 2 (proteína-ligando) contra 3NOS (imágenes creadas con el software maestro Schrödinger 2018).

En el último acoplamiento de 3NOS con el compuesto L-Arginina en el sitio 1 presentó un RMSD= 1.09 Å y una energía de afinidad de unión de  $-6.1 \pm 0.05$  kcal/mol. En la figura 30 podemos ver 2 interacciones del tipo puente salino (flechas bicolors) entre el amoniaco y el Glu-361 y la Hem-510 así como una unión  $\pi$ -catión. El acoplamiento realizado en el sitio 2 presentó un RMSD= 2.6 Å y una energía de afinidad de unión de  $-6 \pm 0$  kcal/mol, en la figura 31 podemos observar las interacciones con los aminoácidos de la cadena A de tipo puentes de hidrógeno (flechas moradas) entre un alcohol y la Ser102, la amina primaria y la Gly-101 así como un puente salino entre esta amina y el Asp-444, Las interacciones con la cadena B son 2, una entre el otro alcohol y el Trp-445 y un puente salino entre el amoniaco y el Asp-444.

“ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN FUNCIONAL DEL FLAVONOIDE 2-FENIL-1-BENZOPIRAN-4-ONA Y SU EFECTO ANTIHIPERTENSIVO”

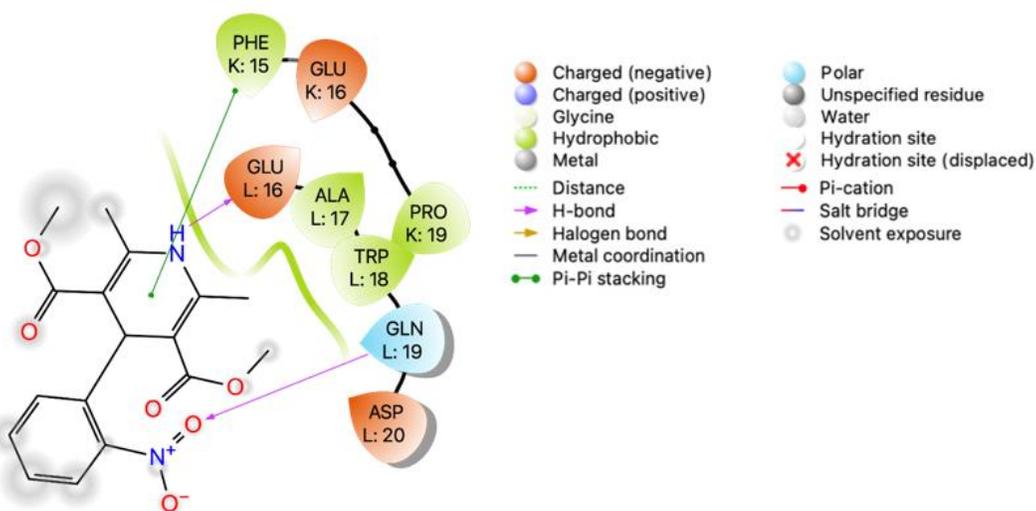


Figura 31: Mapa de interacción 2-D de la nifedipina en canales de calcio tipo L humano (imágenes creadas con el software maestro Schrödinger 2018).

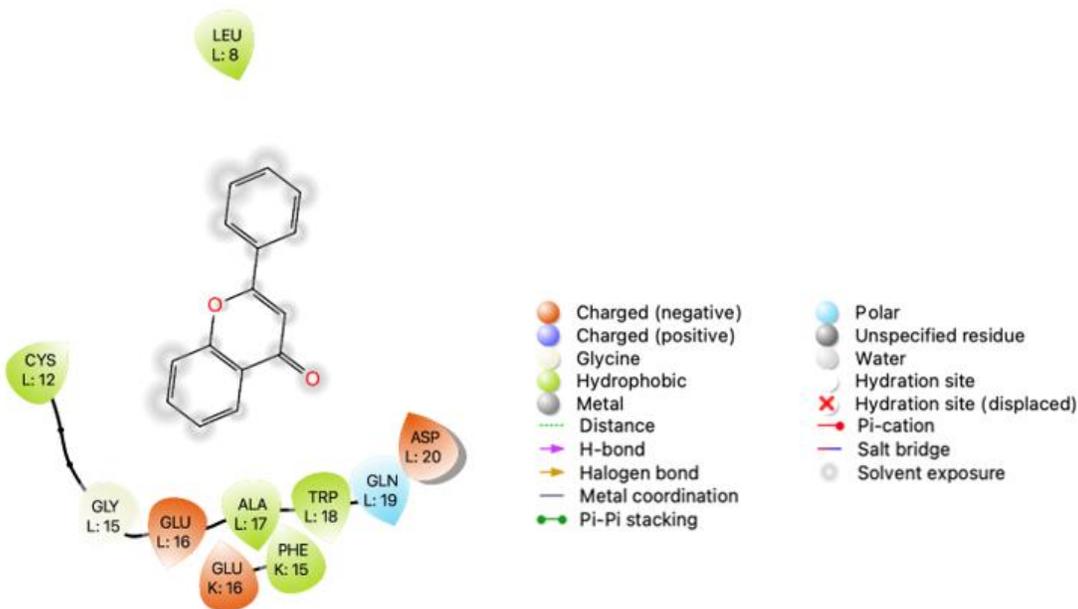


Figura 32: Mapa de interacción 2-D de la 2-fenil-1-benzopiran-4-ona en canales de calcio tipo L humano (imágenes creadas con el software maestro Schrödinger 2018).

En la **figura 31** podemos apreciar el acoplamiento del canal de calcio tipo L humano con el compuesto nifedipina, este presentó un RMSD= 1.5 Å y una energía de afinidad de unión de  $-6.7 \pm 0.1$  kcal/mol. Se pueden apreciar interacciones del tipo

$\pi$ - $\pi$  (verde) entre la dihidropiridina y el Phe-15 así como un puente de hidrógeno (flecha morada) con el Glu-16 y otro entre la parte del nitrofenil y el Gln-19. El acoplamiento realizado con el compuesto 2-fenil-1-benzopiran-4-ona presentó un RMSD= 0.01 Å y una energía de afinidad de unión de  $-8.1 \pm 1.4$  kcal/mol, en la **figura 32** podemos observar que la molécula se encuentra en contacto con el solvente (sombreado gris), es decir, está cerca de la entrada del canal de calcio, sin embargo hay la ausencia de enlaces, esto se puede deber a que la pose que se analizó no presentó enlaces tipo  $\pi$ - $\pi$  o puentes de hidrógeno, esto debido a que la molécula de la flavona al ser plana, no alcanza a estar en contacto con el canal, ya que al ser completamente conjugada no puede adoptar conformeros que le permitan alcanzar los aminoácidos de la proteína, sin embargo también podemos pensar que las interacciones presentes son del tipo fuerzas de Van der Waals, son fuerzas relativamente débiles en comparación con los enlaces covalentes y suelen ser dipolos no permanentes, es decir, son transitorios.

Con la información obtenida mediante los cálculos de acoplamiento molecular se puede correlacionar el resultado *ex vivo* sobre la inhibición de la 3NOS, ya que flavona conservaría múltiples interacciones con residuos de aminoácidos involucrados, así como un bloqueador parcial de canales de calcio.



## 8.- CONCLUSIONES

## 8. CONCLUSIONES

El compuesto 2-fenil-1-benzopiran-4-ona genera un efecto antihipertensivo al modificar de manera significativa la presión arterial sistólica y diastólica, el efecto observado podría estar relacionado con la participación de la vía NO/GMPc y un bloqueo de los canales de  $Ca^{2+}$  como parte de la cascada de señalización de la relajación del músculo liso vascular.

Los resultados obtenidos demuestran que el efecto vasorrelajante de la flavona en estudio tiene un mecanismo de acción relacionado con la vía NO/GMPc y un antagonismo funcional sobre receptores adrenérgicos y, además, actúa como bloqueador de canales de calcio.





## 9.- PERSPECTIVAS

“ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN FUNCIONAL DEL FLAVONOIDE 2-FENIL-1-BENZOPIRAN-4-ONA Y SU EFECTO ANTIHIPERTENSIVO”

---

- Realizar el estudio toxicológico agudo y subagudo del compuesto 2-fenil-benzo-piran-4-ona en modelos murinos
- Buscar la DE50 del compuesto 2-fenil-benzo-piran-4-ona





## 10.- REFERENCIAS

## 10. REFERENCIAS

1. Alcántara-Hernández, R., & Hernández-Méndez, A. (2018). Complejos moleculares de la señalización adrenérgica. *Gaceta Médica de México*, 154 (2), pp. 223-235.
2. Araya, C. G. (2006). Ulceración gástrica asociada al uso de antiinflamatorios no esteroidales (AINES). *TecnoVet*, 12 (1), p. 24.
3. Aristil, C. (2009). *Manual de farmacología básica y clínica 6a*. McGraw Hill Mexico, pp. 87-91
4. Bellido, C., Fernández, L., López, J., Simón, P., & Padial, L. R. (2003). *Etiología y fisiopatología de la hipertensión arterial esencial*. *Monocardio*, 3 (5), pp.141-160.
5. Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales*, 2, pp.306-323.
6. Catterall, W. (1991). Functional Subunit Structure of Voltage-Calcium channels. *Science* 253, pp. 23-32.
7. De La Serna, F. (2010) “Insuficiencia Cardíaca Crónica” *Editorial Federación Argentina*, Capítulo 6 Endotelio, pp. 114-115,119-121.
8. Duarte, M. (2004). Fisiología y fisiopatología del control nervioso de la presión arterial: el barorreflejo. *Boletín del Consejo Argentino de HTA*.
9. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición. (2016). *Informe final de resultado*, pp. 55-56
10. Fernández, A., Fernández, A., Fernández, I., Gómez, J., Marzal, D., Vicent, M., Vidal, R. (2017). Cardiología hoy 2017: Resumen anual de los avances en investigación y cambios en la práctica clínica. *Sociedad Española de Cardiología*, pp. 89,825.
11. Francis, S., Busch, J. & Corbin, J. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. *Pharmacol Rev* 2010; 62, pp. 525–563.

12. Franklin, S. (2007). Importancia de la presión arterial diastólica en relación con la edad. *Hipertensión*, pp. 172-175.
13. Ferrer, D., Jorge, C., García, R., & Martínez, A. (1998). Óxido nítrico. Importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. *Medisan*, 2 (3), pp. 45-53.
14. Goodman Gilman, A., Hardman, J. G., & Limbird, L. W. (2003). *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (No. 615), pp. 365-369,445-456.
15. González, J. V., Arenas, O. A. V., & González, V. V. (2012). Semiología de los signos vitales: Una mirada novedosa a un problema vigente:/Vitals sign semiology: the new look to an actual problem. *Archivos de Medicina (Manizales)*, pp. 221-240.
16. González Rodríguez, E. (2004). *Alteraciones del acoplamiento excitación-contracción y la función del factor de crecimiento similar a la insulina-I en el deterioro del músculo esquelético con el envejecimiento*.
17. Gordo, D. (2018). Los Compuestos Fenólicos, Un Acercamiento A Su Biosíntesis, Síntesis Y Actividad Biológica. *RIAA*, vol. 9, pp. 4.
18. Guyton & Hall. (2011) *Tratado de fisiología médica*. Ed. Elsevier España S.L., pp 92-99,161-163.
19. Hernández, B. (2003). Mecanismo de acción del óxido nítrico en el organismo y su acción como agente terapéutico. *Revista Mexicana de Enfermería Cardiológica*, 11 (2), pp. 72-76.
20. Hernández-Abreu, O., Castillo-España, P., León-Rivera, I., Ibarra-Barajas, M., Villalobos-Molina, R., González-Christen, J. & Estrada-Soto, S. (2009). Antihypertensive and vasorelaxant effects of tilianin isolated from *Agastache mexicana* are mediated by NO/cGMP pathway and potassium channel opening. *Biochemical Pharmacology*, 78 (1), pp. 54-61.
21. Kuklinski, C. (2003). Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural. *Farmacognosia. Barcelona: Omega*, pp. 116-119.
22. Katzung, B. G., Masters, S. B., & Trevor, A. J. (2012). *Farmacología básica y clínica*. McGraw Hill Educación, pp. 169-339.

23. Lapidot, T., Walker, M. D., & Kanner, J. (2002). Antioxidant and prooxidant effects of phenolics on pancreatic  $\beta$ -cells in vitro. *Journal of agricultural and food chemistry*, vol. 50, pp. 720-725.
24. Leiva-Suero, L. E., del Pozo Jeréz, H. A., & Pérez Caballero, D. (2000). Óxido nítrico y su relación con la hipertensión arterial. *Revista Cubana de Medicina*, 39 (3), pp. 174-175.
25. Limón, D., Díaz, A., Mendieta, L., Luna, F., Zenteno, E., & Guevara, J. (2010). Los flavonoides: mecanismo de acción, neuroprotección y efectos farmacológicos. *Mensaje bioquímico*, 34 (1), pp. 143-155.
26. 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 (3), pp. 499–511.
27. Moncada S & Vane JR. (1979). Pharmacology and endogenous roles of Prostaglandin endoperoxidase, thromboxane  $A_2$  and prostacyclin. *Pharmacol Rev.* 30, pp. 293-331.
28. Martínez, S., González, J., Culebras, M., & Tuñón, M. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutr Hosp*, 17 (6), pp. 271-278.
29. Moreno, H., & Moreno, C. B. (2005). Transmisión sináptica-canales de calcio y liberación de neurotransmisores. *Revista Ciencias de la Salud*, 3 (1), pp. 47-61.
30. Monroy-Ortíz, C., & España, P. C. (2007). Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos, pp. 6,9,39-41.
31. Orallo, F. (2008). *Actividad vasodilatadora del trans-resveratrol en la aorta torácica aislada de rata: una clara evidencia de sus efectos cardioprotectores*. Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela.
32. Organización Mundial de la Salud (2013). *Información general sobre la hipertensión en el mundo*. Organización Mundial de la Salud, pp. 5,7.
33. Organización Mundial de la Salud (2011). *Global atlas on cardiovascular disease prevention and control*. Organización Mundial de la Salud, pp. 18,38.

34. Pérez Ruiz, A. O., Padrón, C., Valencia Fernández, V., Sanjurjo Gámez, V., & Ilisástigui Ortueta, T. (2008). Biosíntesis de los productos del ácido araquidónico y su repercusión sobre la inflamación. *Revista Cubana de Estomatología*, 35 (2), pp. 56-61.
35. Raff, H., & Levitzky, M. G. (2013). *Fisiología médica: un enfoque para aparatos y sistemas*. McGraw Hill. pp 355-358.
36. Raso, G. M., Meli, R., Di Carlo, G., Pacilio, M., & Di Carlo, R. (2001). Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A. 1. *Life sciences*, vol. 68, pp. 921-931.
37. Reyes-Juárez, J. L., & Zarain-Herzberg, Á. (2006). Función del retículo sarcoplásmico y su papel en las enfermedades cardíacas. *Archivos de cardiología de México*, 76, pp. 18-32.
38. Souza, V. V. D. (2014). Análise toxicogenética e atividade antimicobacteriana in vitro do composto flavona.
39. Tortora, G. J., & Derrickson, B. (2013). *Principios de anatomía y fisiología*. Médica Panamericana, pp 354-356,803-810.
40. Tsai, E.J. y Kass, D.A. Cyclic GMP signaling in cardiovascular pathophysiology and therapeutics. *Pharmacology and Therapeutics* 2009; 122: pp 216-238.
41. Valle Rodríguez, A. D. (2006). *Acoplamiento excitación-contracción en músculo liso: nuevo papel metabotrópico de los canales de calcio en la regulación del tono vascular*.
42. Wagner-Grau, P. (2010, December). *Fisiopatología de la hipertensión arterial*. In *Anales de la Facultad de Medicina*. Vol. 71 (4), pp. 225-229
43. Zhang, J.F., Randall, A.D., Ellinor, P.T., Horne, W. A., Sather, W. A., Tanabe, T., Schwarz, T.L. & Tsien, R.W. (1993). Distinctive pharmacology and kinetics of cloned neuronal Ca<sup>2+</sup> channels and their possible counterparts in mammalian CNS neurons. *Neuropharmacology*, pp. 1075-1088.

44. Zhao, Y., Brandish, P. E., DiValentin, M., Schelvis, J. P., Babcock, G. T., & Marletta, M. A. (2000). Inhibition of soluble guanylate cyclase by ODQ. *Biochemistry*, 39(35), 10848-10854.

